

شاپا: ۴۱۶۱-۱۷۳۵

شماره پیاپی ۷۹

عنوان مقالات

- ۳ مطالعه خصوصیات عملکردی و رفتار بیاتی نشاسته طبیعی گندم در حضور صمغ دانه شاهی و ساکارز
شکوفه تازیکی شمس آبادی- سید محمدعلی رضوی
- تهیه کرم اردده رژیمی با استفاده از جایگزین های ساکارز (ایزومالت، ربیادپوزید a، اریتریتول)
و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، بافتی و حسی آن ۱۹
الهه دهقان- بهزاد محمدی
- بررسی تاثیر پودر پالپ گلایی خاردار (*Opuntia stricta*) بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی برگرهای
آنالوگ خام و پخته تولیدی ۳۳
پرینا شهری طبرستانی- محبوبه کشیری- یحیی مقصودلو- هدی شهری طبرستانی- محمد قربانی
- ریز پوشانی چند لایه لیمون بر پایه جذب الکترواستاتیک و ارزیابی رهائش آن تحت شرایط شبیه سازی شده دهان ۴۵
محمد خلیلیان موحد- محبت محبی- شارلوت سیندینگ
- توسعه و ارزیابی خصوصیات لیپوزوم بهینه یابی شده جهت درون پوشانی کورکومین ۵۹
سیده فاطمه موسوی بایگی- آرش کوچکی- بهروز قرآنی- محبت محبی
- شناسایی گروه های عاملی، محتوای فنل و فلاونوئید کل، پتانسیل آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی عصاره
آبی لفل سیاه و برهمکنش آن با آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B ۸۱
احسان صفری- حسن برزگر- حسین جوینده- بهروز علیزاده بهبهانی- محمد نوشاد
- تاثیر پوشش خوراکی کیتوزان بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی و فعالیت آنزیمی میوه انگور رقم فخری
در شرایط سردخانه ۹۷
معصومه شکری- مصطفی رحمتی جنید آباد- مختار حیدری- موسی رسولی- احمد زارع
- افزودن ترکیبات احیا کننده، ویتامین C و اسید سیتریک حین مشروط نمودن گندم و اثر آنها بر ویژگی های
کیفی خمیر حاصل از آرد آن ۱۰۹
محیا صید حسین زاده- محمدیار حسینی- محمد شاهدی- مهدی کدیور
- بهینه سازی فرمولاسیون دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و شیرین کننده استویا ۱۲۷
فریبا حدیدی- علی گنجلو- محمد هادی فکور
- مدلسازی فرآیند اتمیزاسیون التراسونیک شیر و تولید پودر شیر به روش خشک کردن پاششی ۱۴۷
علی حیدری- مسعود گوهری منش- محمدرضا قرب- علی کوچی
- تولید و ارزیابی نانولیپوزوم های حامل عصاره هندوانه کوهی ۱۷۱
معصومه سلامتیان- یونس زاهدی- رضوان شاددل
- تعیین شرایط بهینه تولید پپتیدهای ضد اکسایش حاصل از هیدرولیز تریپتیکی پروتئین هسته انار ۱۸۳
مریم رحیمی پناه- علیرضا صادقی ماهونک- محمد قربانی- هدی شهری طبرستانی- محسن نبی میدی

نشریه پژوهشهای 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

جلد ۱۹ شماره ۱ فروردین - اردیبهشت ۱۴۰۲
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 پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران. تلفن: ۲۰-۸۷۹۵۶۱۸ داخلی ۳۲۱ 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)

پست الکترونیکی: ifstrj@um.ac.ir

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

- ۳ مطالعه خصوصیات عملکردی و رفتار بیانی نشاسته طبیعی گندم در حضور صمغ دانه شاهی و ساکارز شکوفه تازیکی شمس آبادی- سید محمدعلی رضوی
- ۱۹ تهیه کرم ارده رژیمی با استفاده از جایگزین‌های ساکارز (ایزومالت، ریبادیوزید a، اریتریتول) و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، بافتی و حسی آن
الله دهقان- بهزاد محمدی
- ۳۳ بررسی تاثیر پودر پالپ گلابی خاردار (*Opuntia stricta*) بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی برگرهای آنالوگ خام و پخته تولیدی
پریسا شهیری طبرستانی- محبوبه کشیری- یحیی مقصودلو- هدی شهیری طبرستانی- محمد قربانی
- ۴۵ ریز پوشانی چند لایه لیمون بر پایه جذب الکترواستاتیک و ارزیابی رهائش آن تحت شرایط شبیه‌سازی شده دهان
محمد خلیلیان موحد- محبت محبی- شارلوت سیندینگ
- ۵۹ توسعه و ارزیابی خصوصیات لیپوزوم بهینه‌یابی شده جهت درون پوشانی کور کومین
سیده فاطمه موسوی بایگی- آرش کوچکی- بهروز قرآنی- محبت محبی
- ۸۱ شناسایی گروه‌های عاملی، محتوای فنل و فلاونوئید کل، پتانسیل آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی فلفل سیاه و برهمکنش آن با آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B
احسان صفری- حسن برزگر- حسین جوینده- بهروز علیزاده بهبهانی- محمد نوشاد
- ۹۷ تاثیر پوشش خوراکی کیتوزان بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و فعالیت آنزیمی میوه انگور رقم فخری در شرایط سردخانه
معصومه شکر- مصطفی رحمتی جنیدآباد- مختار حیدری- موسی رسولی- احمد زارع
- ۱۰۹ افزودن ترکیبات احیا کننده، ویتامین C و اسید سیتریک حین مشروط نمودن گندم و اثر آنها بر ویژگی‌های کیفی خمیر حاصل از آرد آن
محیا صید حسین زاده- محمد یار حسینی- محمد شاهی- مهدی کدیور
- ۱۲۷ بهینه‌سازی فرمولاسیون دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کنیرا و شیرین کننده استویا
فریبا حدیدی- علی گنجلو- محمد هادی فکور
- ۱۴۷ مدل‌سازی فرآیند اتمیزاسیون التراسونیک شیر و تولید پودر شیر به روش خشک کردن پاششی
علی حیدری- مسعود گوهری منش- محمدرضا قریب- علی کوچی
- ۱۷۱ تولید و ارزیابی نانولیپوزوم‌های حامل عصاره هندوانه کوهی
معصومه سلامتیان- یونس زاهدی- رضوان شاددل
- ۱۸۳ تعیین شرایط بهینه تولید پپتیدهای ضد اکسایش حاصل از هیدرولیز تریپتیک پروتئین هسته انار
مریم رحیمی پناه- علیرضا صادقی ماهونک- محمد قربانی- هدی شهیری طبرستانی- محسن نبی میدی



Study of the Functional Properties and the Retrogradation Behavior of Native Wheat Starch in the Presence of Cress Seed Gum and Sucrose

Sh. Taziki Shams-abadi¹, S.M.A. Razavi^{2*}

Received: 2021.04.07

Revised: 2021.05.22

Accepted: 2021.05.31

Available Online: 2021.05.31

How to cite this article:

Taziki Shams-abadi, Sh., & Razavi, S.M.A. (2023). Study of the functional properties and the retrogradation behavior of native wheat starch in the presence of cress seed gum and sucrose. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 1-15. (In Persian with English abstract).
<http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2021.69660.1029>

Introduction

Wheat starch granules are composed of amylose and amylopectin, which are responsible for the functions of starch such as swelling, gelatinization, pasting, gel formation, and retrogradation. The retrogradation changes the functional properties, it is an undesirable phenomenon in some starch-based foods which reduces the acceptability of food, and shortens the shelf life. Delaying or preventing of starch retrogradation is a major challenge in the food industry. Various ingredients such as carbohydrates imply an important role in improving the functional properties, decreasing amylose leaching and retarding the retrogradation of starch gels. Cress seed gum (CSG), as an emerging galactomannan, has shown the ability to improve the textural and rheological features of food systems based on its unique properties. Addition of CSG to the composite wheat-rice bread increased dough stability and improved the staleness of bread compared to guar gum. Also, the addition of CSG and xanthan gum to gluten-free bread stabilized the texture of bread during storage. Sucrose (SUC) is a common additive in food formulations which is useful as a sweetening agent and textural modification. Sugars have been able to reduce amylose leaching and accelerate or delay starch gel formation. They also delay retrogradation of starch gels during storage. Therefore, the objectives of this study were to determine the impact of different substitution levels of CSG (0, 5, 10 and 15%), SUC (0, 5 and 10%), and their blend on the functional properties (swelling strength and solubility), microstructure features, retrogradation kinetics and synthesis of native wheat starch (NWS) gel (4% w/w).

Materials and Methods

Cress seeds were purchased from a local medicinal market. NWS and SUC were supplied from Sigma Aldrich (Spain) and Merck (Germany) respectively. Starch suspensions (0.6 gr powder/20 ml water) substituted with CSG (0, 5, 10, and 15% w/w) and SUC (0, 5, and 10% w/w) were prepared to estimate the swelling power and solubility index. To produce starch gel, the 4% w/w suspensions of NWS-CSG-SUC were prepared by dissolving the appropriate amount of CSG powder and SUC in deionized water. Then, each suspension was poured into a stainless-steel cylindrical container and was heated to 95 °C and held at 95 °C for 3 min and then cooled to 50 °C while stirring continuously at 160 rpm with a mechanical mixer. Finally, the pastes were kept at ambient temperature (25 °C) for 1 h. To assess gel structure, imaging of the gels was performed by scanning electron microscopy (SEM). The retrogradation kinetics and syneresis of gel samples were determined after storage at 4 °C for 0, 1, 7 and 14 days.

Results and Discussions

The swelling power and solubility index of NWS increased with increasing the replacement level of CSG. CSG promotes adhesive interactions among the gelatinized granules. This can enhance the forces applied to them, facilitating water entering (increasing swelling), amylose solubilization and its exudation. In contrast, SUC compete with starch molecules for water in the system and thus preventing gelatinization and mobility of starch molecules reduced the

1 and 2- M.Sc Graduated Student and Professor, Center of Excellence in Native Natural Hydrocolloids of Iran, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran, respectively.

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

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2021.69660.1029](http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2021.69660.1029)

swelling power. The starch-gum-sugar mixtures had a higher swelling power compared to the starch and starch-sugar samples. The mixed samples had higher solubility values than each of them individually. SEM images showed that the pore size of starch gel decreased and increased from 33.01 to 29.44 μm and to 45.37 μm with increasing the substitution levels of CSG and SUC, respectively. NWS-15% CSG-5% SUC gel had 31.34 μm pore size. After storage for 14 days at 4 °C, the CSG substitution with NWS reduced the rate of retrogradation and syneresis from 0.101 to 0.52 (s^{-1}) and from 50% to 23%, respectively. It could be related to creating a film around the granules by the leaked amylose and the CSG in the continuous phase, so inhibiting further swelling and polymers leaking out and related to high water holding capacity of CSG. The addition of SUC reduced the rate of the process to 0.096 (s^{-1}) but because of its low water holding capacity, the value of syneresis enhanced to 57%. In the mixed gels, more reduction of the retrogradation rate and syneresis was observed which was clearly at high CSG replacement. The retrogradation rate of the NWS-15%CSG-5%SUC was 0.057 (s^{-1}) and its syneresis was 45%. According to the results, it can be concluded that 15% CSG and 5% SUC replacement levels can effectively improve the functional properties and reduce the rate of retrogradation and syneresis of NWS during storage.

Keywords: Gel structure, Hydrocolloids, Starch, Sugar, Syneresis

مقاله پژوهشی

مطالعه خصوصیات عملکردی و رفتار بیاتی نشاسته طبیعی گندم در حضور صمغ دانه شاهی و ساکارز

شکوفه تازیکی شمس آبادی^۱ - سید محمدعلی رضوی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۳/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۰

چکیده

در این پژوهش، اثر سطوح جایگزینی صمغ دانه شاهی (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵٪) و ساکارز (۰، ۵ و ۱۰٪) بر خصوصیات عملکردی (قدرت تورم و حلالیت) سوسپانسیون نشاسته و همچنین ساختمان، کنتیک بیاتی و آباندازی ژل نشاسته گندم پس از نگهداری به مدت صفر، ۱، ۷ و ۱۴ روز در دمای ۴ °C مورد مطالعه قرار گرفتند. قدرت تورم نشاسته گندم با افزایش غلظت جایگزینی صمغ و قند به ترتیب افزایش و کاهش یافت. نمونه‌های مخلوط سه جزئی نشاسته-صمغ-قند دارای قدرت تورم بالاتری در مقایسه با نمونه نشاسته و مخلوط نشاسته-قند داشتند. میزان حلالیت نشاسته با افزایش غلظت صمغ و قند افزایش یافت و نمونه‌های مخلوط دارای مقادیر حلالیت بالاتری نسبت به هر یک به صورت مجزا بودند. تصاویر میکروسکوپی نشان دادند که حضور صمغ منجر به ایجاد ساختمان متراکم‌تر با اندازه حفرات کوچک‌تر ژل نشاسته شد، درحالی که حضور قند ساختمانی گسسته‌تر با اندازه حفرات بزرگ‌تری را ایجاد کرد. پس از نگهداری نمونه‌های ژل به مدت ۱۴ روز در دمای ۴ °C مشاهده شد که افزودن صمغ تأثیر بسزایی در کاهش سرعت بیات شدن و میزان آباندازی نشاسته به ترتیب از (۱) ۰/۱۰۱ به ۰/۵۲ و از ۵۰٪ به ۲۳٪ داشت. قند نیز منجر به کاهش سرعت بیات شدن ژل نشاسته تا (۲) ۰/۰۹۶ شد، اما میزان آباندازی آن را تا ۵۷٪ افزایش داد. نمونه‌های ژل مخلوط به خصوص در غلظت ۱۵٪ جایگزینی صمغ دارای سرعت بیات شدن (۳) ۰/۰۵۷ و میزان آباندازی ۴۵٪ بودند.

واژه‌های کلیدی: آباندازی، ساختار ژل، قند، نشاسته، هیدروکلئید

مقدمه

شده‌اند که مسئول عملکردها و رفتارهای نشاسته هستند. دیسپرسیون نشاسته در طی فرآیند گرم کردن - سرد کردن رفتارهای جذب آب، تورم، ژلاتینه شدن، خمیری شدن، تشکیل ژل و بیات شدن را از خود نشان می‌دهد. رخداد پدیده بیاتی از خصوصیات عملکردی نشاسته از جمله قدرت تورم و حلالیت و در نتیجه نشت مولکول‌های آمیلوز به فاز پیوسته نشأت می‌گیرد (Shevkani et al., 2017). نشاسته گندم به‌عنوان ماده اولیه در دسترس و ارزان قیمت (Dengate, 1984) در حوزه صنایع غذایی به‌عنوان قوام دهنده در سوپ‌ها، پُر کننده، بافت دهنده و نگهدارنده رطوبت در کیک‌ها و فرآورده‌های گوشتی، تشکیل ژل در ژله‌ها، پایدار کننده و جایگزین چربی در غذاهای بر پایه نشاسته به کار می‌رود (Mason, 2009; Maningat et al., 2009). اما پدیده بیاتی نشاسته یک مسئله مهم در محصولات فرآوری شده بر

نشاسته در صنعت غذا از منابع مختلفی شامل ذرت، برنج، گندم، سیب‌زمینی، کاساوا، موز و سورگوم بدست می‌آید (Murphy, 2000). از بین منابع تولید نشاسته، گندم به مقدار زیاد در کشور ایران کشت می‌شود. میزان تولید گندم در کشور در سال ۲۰۱۹ به ۱۶ میلیون و ۸۰۰ تن رسیده است (FAO, 2020) و میزان نشاسته تولیدی در ایران به طور متوسط ۴۵۰ هزار تن در سال می‌باشد. گرانول‌های نشاسته گندم از دو پلیمر آمیلوز و آمیلوپکتین تشکیل

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استاد، قطب علمی هیدروکلئیدهای طبیعی بومی ایران، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
(Email: s.razavi@um.ac.ir)
(*)- نویسنده مسئول

پایه نشاسته می‌باشد. این پدیده نامطلوب، طی مدت‌زمان نگهداری آب‌اندازی را به دنبال دارد، از قابلیت پذیرش محصولات غذایی می‌کاهد و زمان نگهداری آنها را کوتاه می‌کند (Shevkani et al., 2017). تأخیر یا جلوگیری از بیات شدن نشاسته در صنعت مواد غذایی یک چالش بزرگ می‌باشد و برای تولید کنندگان حائز اهمیت است. حضور افزودنی‌های مختلف از جمله کربوهیدرات‌ها نقش مهمی در تأخیر سرعت بیات شدن نشاسته‌ها داشته اند، اگرچه در برخی پژوهش‌ها مشخص شده است که قندهای ساکارز و گلوکز باعث افزایش سرعت بیات شدن نشاسته شده‌اند (Biliaderis, 2009; Wang et al., 2015). بسیاری از مطالعات نشان دادند که هیدروکلوئیدها (صمغ گوار، صمغ زانتان، صمغ لوبیای افاقیا، کربوکسی متیل سلولز، صمغ عربی، کنجاک گلوکومانان و غیره) با برهمکنش با اجزای اصلی گرانول‌های نشاسته (آمیلوز و آمیلوپکتین) اثرات مثبتی بر خصوصیات نشاسته داشتند و تا حدودی خصوصیات عملکردی و رفتار آن از جمله قدرت تورم، حلالیت، آب‌اندازی، دماهای شروع، حداکثر و نهایی ژلاتینه شدن، تشکیل ژل، بیات شدن و خصوصیات رئولوژیکی و ویژگی‌های بافتی را بهبود بخشیدند (Bahnassey and Biliaderis et al., 1997; Christianson et al., Breene, 1994; 1981; Lo and Ramsden, 2000; Lee et al., 2002; Tester and Sommerville, 2003; Funami et al., 2005, 2008; Zhou et al., 2008; Zhang et al., 2015; Xiong et al., 2017; Matia-Merino et al., 2019; Mirnezhad et al., 2021).

صمغ دانه شاهی به‌عنوان یک منبع هیدروکلوئیدی بومی از دسته گالاکتومانان‌ها هست. این هیدروکلوئید دارای خواص فیزیکوشیمیایی و عملکردی منحصر به فرد است. صمغ دانه شاهی دارای وزن مولکولی ۵۴۰ کیلودالتون و ویسکوزیته ذاتی ۳/۹۱۶ دسی‌لیتر بر گرم و کنفورماسیون زنجیره نیمه سخت است که باعث تشکیل تجمعات و درگیری‌های ماکرومولکولی می‌شود (Karazhiyan et al., 2011b; Behrouzian et al., 2014). به‌علاوه خصوصیات رئولوژیکی صمغ دانه شاهی در محیط غلیظ نشان دهنده پتانسیل بالای این صمغ به‌عنوان قوام دهنده و پایدار کننده (امولسیون‌ها و کف‌ها) است. صمغ دانه شاهی نه تنها تحت فرآیندهای حرارتی شدید (فرآیندهای پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون، سرد کردن (دمای یخچال) و انجماد) ویژگی‌های رفتار جریان و عملکردی خود (مانند خصوصیات رئولوژیکی، بافتی، امولسیون کنندگی و تشکیل کف) را حفظ می‌کند بلکه خصوصیات عملکردی آن بعد از شرایط حرارتی تقویت می‌شود (Naji et al., 2013; Naji and Razavi, Naji et al., 2012; 2014). افزودن صمغ دانه شاهی در نان مخلوط گندم و برنج با افزایش جذب آب، باعث افزایش مقاومت خمیر و بهبود بیشتر بیاتی نان نسبت به صمغ گوار شد (Sahraiyani et al., 2013). همچنین

افزودن صمغ دانه شاهی و زانتان به نان بدون گلوتن در طی زمان نگهداری با حفظ آب، باعث پایداری بافت مغز نان گردید (Naji-Tabasi and Mohebbi, 2015). نتایج انتشار یافته نشان داده است گالاکتومانان‌ها از طریق زنجیره‌های جانبی گالاکتوز در پیکره خود با ایجاد پیوندهای هیدروژنی با دیگر پلی‌ساکاریدها از جمله نشاسته برهمکنش می‌کنند (Brennan et al., Funami et al., 2005; Kontogiorgos, 2015; 2006) و در نتیجه باعث کاهش مقدار آمیلوز نشت یافته و تأخیر در رترورگراسیون نشاسته شدند (Funami et al., 2005).

ساکارز به‌عنوان یک افزودنی رایج در سیستم‌های غذایی و جزئی از فرمولاسیون فرآورده‌های غذایی است که حضور آن بر رفتار و خصوصیات عملکردی نشاسته تأثیرگذار است. قند به علت رقابت با پلیمر نشاسته بر سر آب موجود در سیستم و با کاهش ثابت دی‌الکتریک آب، ویژگی‌های حلال را تغییر می‌دهد و باعث کاهش برهمکنش مولکول‌های حلال با مولکول‌های پلیمر می‌شود. قندها با گرانول‌های نشاسته به رقابت می‌پردازند و آب در دسترس برای ژلاتینه شدن نشاسته را محدود می‌کنند؛ همچنین به علت برهمکنش‌های نشاسته و قند، اثر نرم کنندگی^۱ کمتر قند نسبت به آب و پایدار کردن ناحیه آمورف توسط برقراری اتصالات عرضی با زنجیره‌های نشاسته، ژلاتینه شدن نشاسته گندم را به تأخیر می‌اندازند (Gunaratne et al., 2007). براساس نتایج انتشار یافته، قندها باعث افزایش یا کاهش ویسکوزیته برگشت^۲ (تمایل به بیات شدن) نیز می‌شوند (Xing et al. 2017; Gunaratne et al., 2007). با توجه به مکانیسم قندها، آن‌ها از نشت بیشتر مولکول‌های آمیلوز به فاز پیوسته جلوگیری می‌کنند (Gunaratne et al., 2007). از طرفی سرعت کریستالیزاسیون مجدد آمیلوپکتین در ژل‌ها را طی نگهداری کاهش می‌دهند (Berski et al., 2018; Zhang et al., 2017).

از آنجایی که تاکنون اثر صمغ دانه شاهی بر خصوصیات مخلوط نشاسته گندم- ساکارز بررسی نشده است، بنابراین اهداف کلی مطالعه حاضر ارزیابی تأثیر سطوح مختلف جایگزینی صمغ دانه شاهی (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵٪) و ساکارز (۰، ۵ و ۱۰٪) و مخلوط آن‌ها بر خصوصیات عملکردی (قدرت تورم و حلالیت) سوسپانسیون نشاسته و ساختمان، رفتار بیات شدن و آب‌اندازی ژل نشاسته گندم در طی زمان نگهداری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دانه‌های شاهی از بازار عطاری مشهد تهیه گردید. صمغ دانه شاهی تحت شرایط بهینه استخراج به روش کاراژیان تهیه شد

1- Plastisizing
2- Setback viscosity

(Karazhiyan et al., 2018). نشاسته معمولی گندم (شماره کاتالوگ: S5127) از شرکت سیگما آلدیج (آمریکا) خریداری گردید. ماده شیمیایی سدیم آزید و ساکارز با گرید آزمایشگاهی از شرکت میرک (آلمان) خریداری شدند. در تمامی آزمون‌ها از آب دیونیزه استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون و ژل مخلوط نشاسته گندم-صمغ دانه شاهی-ساکارز

سوسپانسیون ۴٪ نشاسته گندم و سوسپانسیون‌های مخلوط نشاسته-صمغ-قند با جایگزین کردن صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵٪ از صمغ دانه شاهی و صفر، ۵ و ۱۰٪ از ساکارز با پودر نشاسته تهیه شد. جزئیات نمونه‌ها و مقادیر وزنی اجزا آن‌ها بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم محلول در جدول ۱ آورده شده است. برای این منظور، ابتدا محلول صمغ دانه شاهی در حضور و یا غیاب ساکارز توسط آب دیونیزه حاوی ۰/۰۲٪ سدیم آزید آماده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار گرفت تا به‌طور کامل هیدراته شود. پودر نشاسته گندم به مقدار

جدول ۱- تیمارهای تحقیق شامل سطوح هر تیمار و مقدار وزنی اجزای تشکیل دهنده

Table 1- The treatments including the levels of each treatment and the weight amount of the components (Native wheat starch (NWS), Crees seed gum (CSG) and Sucrose (SUC))

نمونه Sample	صمغ CSG (%)	ساکارز SUC (%)	اجزا Components (g/100g)		
			نشاسته گندم NWS	صمغ CSG	ساکارز SUC
1		0	4	0	0
2	0	5	3.8	0	0.2
3		10	3.6	0	0.4
4		0	3.8	0.2	0
5	5	5	3.6	0.2	0.2
6		10	3.4	0.2	0.4
7		0	3.6	0.4	0
8	10	5	3.4	0.4	0.2
9		10	3.2	0.4	0.4
10		0	3.4	0.6	0
11	15	5	3.2	0.6	0.2
12		10	3	0.6	0.4

۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به دقت مایع شفاف رویی^۱ به پلیت توزین شده منتقل شد و در دمای °C ۱۰۵ خشک گردید. درصد حلالیت از تقسیم سوپرناتانت خشک شده به وزن اولیه نمونه پودر محاسبه شد. رسوب باقی‌مانده نیز توزین شد و از تقسیم وزن رسوب به وزن اولیه نمونه پودر، قدرت تورم (گرم/گرم) به دست آمد (Dos santos et al., 2019).

تصویربرداری میکروسکوپی الکترونی

اندازه‌گیری قدرت تورم و حلالیت

اندازه‌گیری قدرت تورم و حلالیت به روش داس سانتوس و همکاران (Dos santos et al., 2019) با کمی تغییرات انجام شد. ۰/۶ گرم از نمونه پودر (نشاسته یا مخلوط نشاسته با ساکارز و صمغ دانه شاهی) با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر درون لوله سانتریفیوژ مخلوط شده و در دمای °C ۹۵ به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس فوراً تا دمای اتاق سرد شده و در rpm ۵۶۰۰ به مدت

آباندازی ژل نشاسته گندم به تنهایی و در حضور صمغ دانه شاهی و یا ساکارز طبق روش فونامی و همکاران (Funami et al., 2005) با کمی تغییرات تعیین شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌های ژل، خمیر به‌صورت داغ به مقدار ۱۰ گرم در فالكون ۱۵ ml وزن شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط، فالكون‌ها به یخچال منتقل شدند. نمونه‌ها به مدت ۱، ۷ و ۱۴ روز در دمای °C ۴ نگهداری شدند. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت قبل از انجام آزمون از یخچال خارج شدند تا به دمای محیط برسند. سپس در ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ (Hettich EBA 20 Centrifuge) انجام شد. درصد آباندازی از رابطه ۲ به دست آمد.

$$\text{رابطه (۲)} \quad 100 \times \frac{\text{وزن بلایج تصاف رویی}}{\text{وزن اولیه نمونه}} = \text{درصد آباندازی}$$

طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش اثر تیمارهای صمغ دانه شاهی در سطوح جایگزینی (صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵٪)، ساکارز در سطوح جایگزینی (صفر، ۵ و ۱۰٪) بر خصوصیات ژل نشاسته گندم به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شدند. تحلیل نتایج داده‌ها توسط آنالیز واریانس (ANOVA) صورت گرفت و میانگین‌ها به روش آزمون توکی^۲ در سطح آماری ۵٪ مقایسه شدند. به‌منظور رسم نمودارها و آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزارهای Excel و Minitab (نسخه ۱۷) استفاده شد. برازش مدل آرومی با استفاده از جعبه ابزار برازش نرم‌افزار متلب (نسخه 2016a) انجام گردید.

نتایج و بحث

قدرت تورم و شاخص حالیت

پارامتر قدرت تورم بیانگر توانایی گرانول‌های نشاسته در هیدراته شدن طی فرآیند پختن و حرارت‌دهی در °C ۹۰ می‌باشد. قدرت تورم نشاسته گندم در محدوده ۱۲/۶۴ تا ۱۶/۷۵ g/g گزارش شده است (Kumar and Khatkar, 2017). همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌کنید، قدرت تورم نشاسته گندم در این پژوهش ۱۳/۱۱ g/g تخمین زده شد. در حضور صمغ دانه شاهی و با افزایش غلظت جایگزینی صمغ تا ۱۵٪، قدرت تورم نشاسته به صورت چشمگیر به میزان ۶۹٪ افزایش پیدا کرد. در این راستا نتایج مشابهی توسط تکاویفارات و همکاران (Techawipharat et al., 2008)، چپاسونگ و سوفانتاریکا (Chaisawang and Supphantharika, 2006) و

جهت تصویربرداری ابتدا نمونه‌های ژل به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۴ نگهداری شدند. سپس توسط نیتروژن مایع عمل انجماد سریع صورت گرفت. آنگاه توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی در دمای °C ۴۰- به مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک شدند. مقدار کمی از نمونه‌های خشک شده توسط دستگاه Sputter Coater (مدل SC7620) با طلا پالادیوم به مدت ۲۲۰ ثانیه پوشش دهی شدند. تصویربرداری از ژل توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (مدل LEO1450 VP، ساخت آلمان) با وضوح (قدرت تفکیک) nm ۲/۵ تحت ولتاژ ۲۰ kv در بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر انجام گردید (Kaur et al., 2008). همچنین متوسط قطر حفرات توسط نرم افزار ImageJ Luncher محاسبه گردید، بدین صورت که ۱۰ حفره به صورت تصادفی از هر تصویر انتخاب شد سپس قطر آن‌ها توسط ابزار اندازه‌گیری طول موجود در نرم‌افزار اندازه‌گیری شد و میانگین آن‌ها گزارش گردید.

ارزیابی کنتیک بیات شدن

کنتیک بیاتی با توجه به تغییرات سختی بافت نمونه‌ها در طی زمان نگهداری ارزیابی شد. سختی بافت نمونه‌های ژل با استفاده از دستگاه بافت‌سنج بروکفیلد (Brookfield CT3-10Kg, US) از طریق آزمون اکستروژن پس‌رو تعیین شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، تا ارتفاع ۱۶ میلی‌متر درون ظروف استوانه‌ای پلاستیکی با ابعاد ۲۹×۴۵ میلی‌متر ریخته شد. بافت نمونه‌ها پس از سرد شدن به مدت ۱ ساعت در دمای محیط و پس از نگهداری به مدت ۱، ۷ و ۱۴ روز در دمای °C ۴ ارزیابی شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت قبل از انجام آزمون از یخچال خارج شدند تا به دمای محیط برسند. آزمون توسط پروب استوانه‌ای (با قطر ۲۵/۴ میلی‌متر) با سرعت ۱ mm/s تا رسیدن به کرنش ۵۰٪ انجام گردید. پارامتر سختی (حداکثر نیرو طی مرحله بارگذاری (g) توسط نرم‌افزار TA از منحنی نیرو-زمان استخراج شد. در نهایت به منظور ارزیابی کنتیک بیاتی نشاسته، تغییرات سختی طی زمان نگهداری توسط معادله‌ی ساده شده‌ی آرومی^۱ (رابطه ۱) برازش داده شد (Berski et al., 2018):

$$H_t = H_{\infty} - (H_{\infty} - H_0) \times e^{-kt} \quad \text{رابطه (۱)}$$

که در این معادله H_0 ، H_t و H_{∞} به ترتیب سختی نمونه‌ها بر حسب گرم (g) در زمان‌های صفر، بی‌نهایت و t می‌باشند و k بر حسب (۱/s) ثابت سرعت بیات شدن است.

اندازه‌گیری آباندازی ژل

این پژوهش حلالیت نشاسته گندم حدود ۸٪ به دست آمد (جدول ۲). نتایج ارائه شده در جدول ۲ نشان می‌دهند که حلالیت گرانول‌های نشاسته تحت تأثیر جایگزینی صمغ دانه شاهی و ساکارز قرار گرفته است. از نظر آماری جایگزینی آن‌ها بر تغییرات درصد حلالیت معنی‌دار نبود اما حضور صمغ دانه شاهی در سیستم منجر به افزایش چشمگیر درصد حلالیت نشاسته گندم شد و مقدار آن از حدود ۸٪ به ۲۱٪ رسید. بایاس و ماندالا (Bayas and Mandala, 2004) و تکاویفارات و همکاران (Techawipharat et al., 2008) نیز گزارش کردند که افزودن صمغ‌های زانتان، کاراگینان و مشتقات سلولز به ترتیب به محلول نشاسته گندم و نشاسته برنج باعث افزایش درصد حلالیت و مواد جامد محلول در فاز پیوسته شدند. افزایش درصد حلالیت نشاسته در حضور هیدروکلوئیدها توسط لطفی و همکاران (Lutfi et al., 2017) نیز گزارش شده است. هرچند که با افزایش غلظت صمغ از ۵ تا ۱۰ و ۱۵٪، این افزایش مقدار، به ترتیب از ۲۱٪ به حدود ۲۰٪ و ۱۶٪ کاهش یافت اما همچنان بالاتر از نشاسته گندم بود. این پدیده می‌تواند به این علت باشد که طی افزایش غلظت صمغ، آمیلوز نشت یافته و صمغ از طریق تشکیل فیلم اطراف گرانول‌های نشاسته (Techawipharat et al., 2008) از انحلال بیشتر گرانول‌ها و خروج مواد به فاز پیوسته جلوگیری کرده‌اند. با افزایش غلظت قند از ۰ تا ۱۰٪، حلالیت نشاسته از ۸/۲۸٪ به ۱۶/۶۷٪ افزایش یافت (جدول ۲). به عبارت دیگر جایگزینی صمغ و قند با نشاسته گندم، منجر به افزایش مقدار مواد جامد محلول در فاز پیوسته شد. با مقایسه نتایج می‌توان دریافت که اثر حضور صمغ دانه شاهی در مقایسه با حضور ساکارز بر حلالیت بیشتر بود.

ساختمان میکروسکوپی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی جهت بررسی ساختمان ژل‌ها از نظر تراکم و پیوستگی و همچنین اندازه حفرات ساختمان ژل تهیه شدند. با توجه به نتایج ارائه شده در شکل ۱ و جدول ۳، ساختمان ژل نشاسته گندم (الف) به‌صورت یک شبکه متخلخل با متوسط اندازه حفرات $33/01 \mu\text{m}$ (ساختمان لانه‌زنبوری) مشاهده شد. سان و همکاران (Sun et al., 2015) نیز ساختمان متراکم لانه‌زنبوری را برای ژل نشاسته گندم گزارش دادند. با جایگزینی صمغ دانه شاهی و ساکارز، تفاوت‌های آشکاری در میکروساختمان ژل نشاسته گندم مشاهده شد. با افزودن صمغ دانه شاهی پیوستگی ساختمان ژل افزایش پیدا کرد و اندازه حفرات کوچک‌تر شد که این تغییرات در غلظت بالای صمغ (۱۵٪) بسیار چشمگیر بود، به‌طوری که متوسط قطر حفرات از $33/01 \mu\text{m}$ به $29/44 \mu\text{m}$ کاهش یافت (جدول ۳، شکل ۱: ت، چ و د).

بایاس و ماندالا (Bayas and Mandala, 2004) گزارش شده است. این محققان یافتند قدرت تورم نشاسته در حضور هیدروکلوئیدها افزایش پیدا می‌کند. متیا مرینو و همکاران (Matia-Merino et al., 2019) مشاهده کردند که افزایش غلظت صمغ زانتان و صمغ دانه ریحان اثر بسزایی در افزایش قدرت تورم نشاسته ذرت معمولی داشت. همچنین میرنژادعنبرانی و همکاران (Mirnezhad Anbarani et al., 2021) یافتند که افزایش غلظت جایگزینی صمغ دانه مرو منجر به افزایش قدرت تورم نشاسته معمولی گندم شد. هیدروکلوئیدها از طریق تقویت برهمکنش مولکول‌های نشاسته باعث فشرده‌تر شدن شبکه گرانولی می‌شوند و این امر باعث افزایش نیروهای وارده بر آن‌ها شده و ورود آب به داخل شبکه گرانولی را تسهیل می‌کند و منجر به افزایش قدرت تورم گرانول‌های نشاسته می‌شود. این امر حل شدن و نشت آمیلوز به فاز پیوسته را نیز تسهیل می‌کند اما آمیلوز نشت یافته و هیدروکلوئید در فاز پیوسته یک فیلم در اطراف گرانول‌ها ایجاد می‌کنند و از تورم بیشتر و نشت پلیمرها جلوگیری می‌کنند (Techawipharat et al., 2008; Mandala and Bayas, 2004). با افزایش غلظت ساکارز تا ۱۰٪، میزان قدرت تورم نشاسته گندم ۱۱٪ کاهش یافت. گونارانتان و همکاران (Gunarantne et al., 2007) گزارش کردند که قدرت تورم نشاسته‌های گندم و سیب‌زمینی در غلظت بیش از ۲۰٪ قند، به ویژه ساکارز کاهش یافته است، اما چن و همکاران (Chen et al., 2014) یافتند که با افزایش غلظت قندهای ساکارز و گلوکز تا ۲٪ قدرت تورم به‌طور معنادار کاهش پیدا کرد. ساکارز از طریق محدود کردن تحرک و انعطاف‌پذیری زنجیره‌های نشاسته منجر به کاهش قدرت تورم نشاسته گندم شده است. بدین طریق که پلهایی بین زنجیره‌های نشاسته و مولکول‌های قند تشکیل شده و متورم شدن گرانول‌های نشاسته را محدود کرده است (Chen et al., 2014; Gunarantne et al., 2007). نتایج ارائه شده در جدول ۲ نشان می‌دهند هر چند حضور ساکارز در نمونه‌های ژل مخلوط باعث کاهش مقادیر قدرت تورم مخلوط نشاسته-صمغ شده است، اما حضور صمغ دانه شاهی از اثرات منفی قند جلوگیری کرده است و نمونه‌های مخلوط دارای مقادیر قدرت تورم بالاتری در مقایسه با نشاسته معمولی گندم هستند. چن و همکاران (Chen et al., 2014) نیز نتایج مشابهی را ارائه دادند. آن‌ها گزارش کردند که افزایش غلظت پلی‌ساکارید بذر کتان باعث افزایش قدرت تورم مخلوط نشاسته سیب‌زمینی- قندها به ویژه ساکارز شد. حلالیت نشاسته به معنای از دست دادن نظم مولکولی در درون گرانول‌ها و افزایش مواد جامد محلول در فاز پیوسته می‌باشد. حلالیت نشاسته معمولی گندم در دمای 95°C حدود ۵ تا ۷٪ گزارش شده است (Abedi et al., 2019; Mandala and Bayas, 2004). در

جدول ۲- قدرت تورم و حلالیت ژل نشاسته گندم در حضور صمغ دانه شاهی و ساکارز

Table 2- Swelling power (SP) and solubility index (SI) of native wheat starch gel (NWS, 4%)
In the presence of cress seed gum (CSG) and sucrose (SUC)

صمغ CSG (%)	ساکارز SUC (%)	پارامترها Parameters	
		قدرت تورم SP (g/g)	حلالیت SI (%)
0	0	13.11±0.84 ^{ef}	8.28±2.11
	5	12.03±0.41 ^f	11.67±1.67
	10	11.66±0.22 ^f	16.67±0.00
5	0	15.74±0.14 ^{cd}	21.11±0.96
	5	14.82±0.31 ^{de}	24.45±1.93
	10	14.39±0.41 ^{de}	26.61±0.10
10	0	18.15±0.16 ^b	20.56±0.96
	5	17.60±1.03 ^b	20.89±0.84
	10	17.41±1.24 ^{bc}	25.33±1.76
15	0	22.17±0.34 ^a	16.67±1.67
	5	21.72±0.57 ^a	17.50±0.83
	10	19.12±0.24 ^b	22.15±1.87

کنتیک بیاتی

کنتیک بیات شدن ژل نشاسته گندم در حضور صمغ دانه شاهی و ساکارز با برآزش داده‌های سختی-زمان توسط معادله آورامی مطالعه شد. پارامترهای معادله آورامی در **جدول ۴** ارائه شده اند. سختی ژل نشاسته معمولی گندم در زمان صفر (H_0) و زمان بی‌نهایت (H_∞) به ترتیب حدود ۴۷ g و ۱۷۳ g برآورد شد. مقدار سختی ژل نشاسته گندم در حضور صمغ دانه شاهی و ساکارز کاهش یافت. در کاهش سختی در زمان بی‌نهایت افزایش غلظت صمغ بسیار مؤثرتر بود و میزان آن در بالاترین غلظت صمغ (۱۵٪) حدود ۶۲٪ و در بالاترین غلظت قند (۱۰٪) حدود ۳۵٪ کاهش یافت. کاهش چشمگیر در سختی در زمان بی‌نهایت نمونه‌های مخلوط نشاسته-صمغ-قند به خصوص در غلظت ۱۵٪ صمغ مشاهده شد.

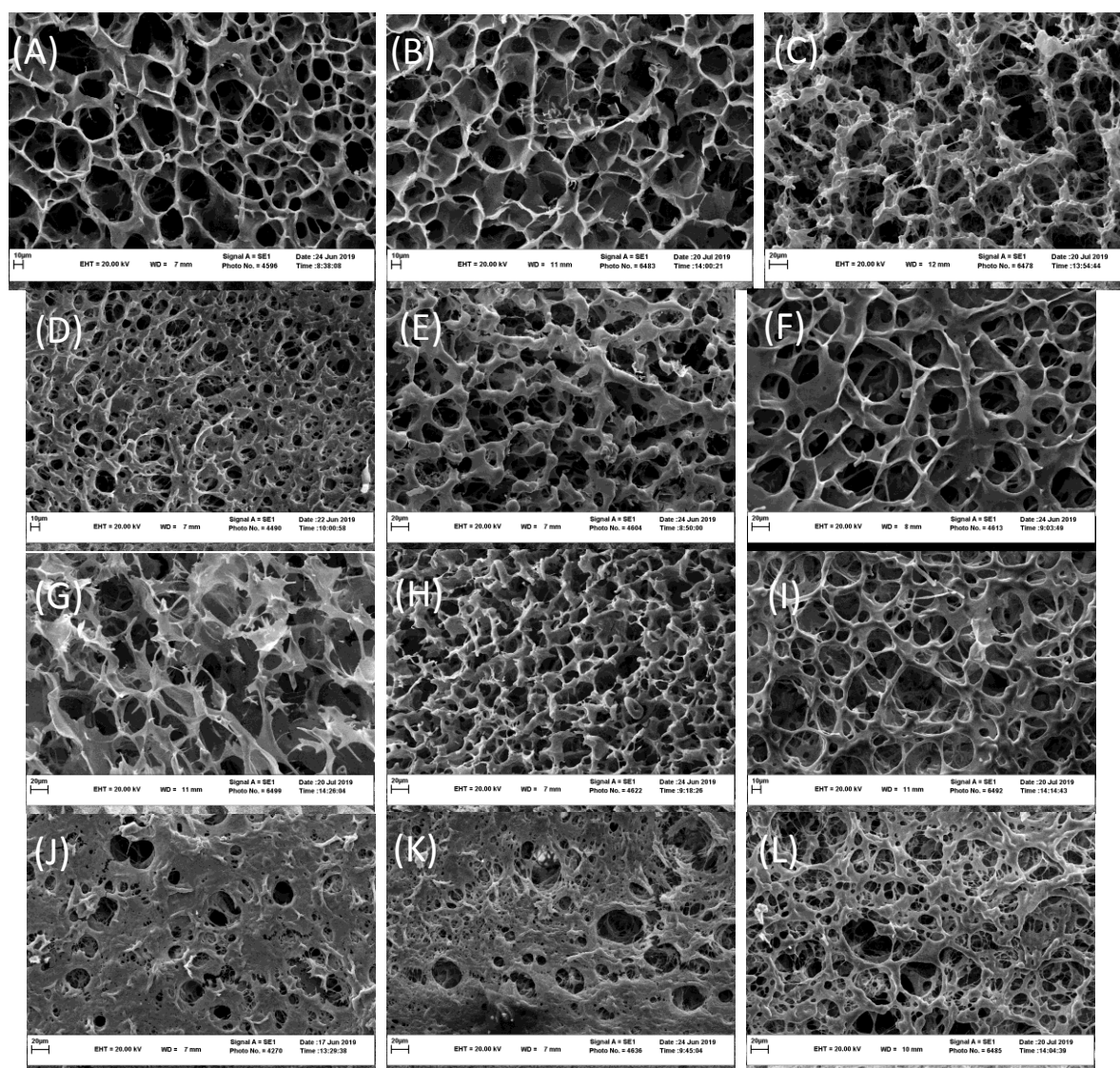
پارامتر k بیانگر سرعت بیات شدن نشاسته می‌باشد. افزایش غلظت جایگزینی صمغ دانه شاهی از ۵ تا ۱۵٪ به استثنای غلظت ۱۰٪ منجر به کاهش سرعت بیاتی ژل نشاسته معمولی گندم طی مدت ۱۴ روز نگهداری در دمای ۴ °C شد (**جدول ۴**)، به‌طوری که در غلظت ۱۵٪ سرعت آن به میزان ۴۸٪ کاهش یافت. فونامی و همکاران (Funami et al., 2005) نیز به نتایج مشابهی مبنی بر کاهش ثابت سرعت بیات شدن مخلوط نشاسته/پلی‌ساکاریدهای گوار، تارا، کنجاک و لوبیای افاقا نسبت به نشاسته گندم بعد از ۱۴ روز نگهداری در دمای ۴ °C رسیدند. میرنژادعبرانی و همکاران (Mirnezhad Anbarani et al., 2021) نیز در جایگزینی ۵٪ صمغ دانه مرو با نشاسته گندم کاهش سرعت بیاتی ژل نشاسته و در جایگزینی ۱۰٪ صمغ افزایش سرعت را مشاهده کردند. همچنین با

بنابراین صمغ دانه شاهی می‌تواند در ایجاد ساختمان در محصولات غذایی بر پایه نشاسته نقش داشته باشد. کائور و همکاران (Kaur et al., 2008) طی بررسی میکروساختمان‌های نشاسته ذرت و نشاسته ذرت-صمغ کاسیا نتایج مشابهی را گزارش دادند. آن‌ها بیان کردند با افزایش غلظت صمغ کاسیا ماتریکسی از صمغ-آمیلوز فضاهای بین گرانول‌ها را پوشانده و یک ساختمان لانه‌زنبوری منظمی را تشکیل داده‌اند.

در حضور ساکارز به‌خصوص در غلظت بالای آن (۱۰٪)، پیوستگی ساختمان ژل نشاسته گندم بسیار کم شد و ساختمان تضعیف گردید و اندازه حفرات آن نیز بزرگ‌تر شد به‌طوری که با جایگزینی ۵ و ۱۰٪ ساکارز، متوسط قطر حفرات به ترتیب به ۳۸/۰۹ و ۴۵/۲۷ μm تغییر یافت (**جدول ۳**، **شکل ۱: ب و پ**). در ژل‌های مخلوط حاوی هر دو ترکیب صمغ و قند، مشاهده می‌شود که باوجود اینکه ساکارز از پیوستگی ساختمان ژل‌های حاوی نشاسته-صمغ کاسته است اما حضور صمغ باعث شده اثر منفی قند بر ساختمان ژل نشاسته کم شود و از تضعیف ساختمان ژل جلوگیری کرده است. به‌خصوص در نمونه‌های حاوی ۱۵٪ صمغ دانه شاهی و ۵٪ ساکارز نسبت به نمونه شاهد ساختمانی پیوسته‌تر و با حفرات خیلی کمتر مشاهده شد (**شکل ۱، د**). اندازه‌گیری قطر حفرات نشان داد که ژل‌های مخلوط در ساختمان خود دارای حفراتی با متوسط قطر در محدوده ۵۶/۸۵ تا ۸۷/۲۰ μm می‌باشند. اما در نمونه‌ی مخلوط حاوی ۱۵٪ صمغ و ۵٪ قند متوسط قطر حفرات ۳۱/۳۴ μm برآورد شد که در مقایسه با ژل نشاسته اندازه آن‌ها کوچکتر است.

مجدد (بیات شدن) مشاهده شد. زهنگ و همکاران (Zhang et al., 2017) و برسکی و همکاران (Berski et al., 2018) به ترتیب نتایج مشابهی را مینی بر کاهش سرعت کریستالیزاسیون مجدد ژل نشاسته تاپیوکا با افزودن قندهای ساکارز، ترهالوز و گلوکز و ژل نشاسته گندم با افزایش غلظت شربت گلوکز گزارش کردند.

جایگزینی ساکارز سرعت بیات شدن نشاسته کاهش پیدا کرد که جایگزینی ۵٪ قند نسبت به ۱۰٪ موثرتر بود. در غلظت ۵٪ ساکارز تقریباً ۲۴٪ کاهش و در غلظت ۱۰٪ ساکارز تقریباً ۵٪ کاهش در سرعت بیاتی نشاسته مشاهده شد (جدول ۴). در نمونه‌های مخلوط نیز با برهمکنش صمغ دانه شاهی و ساکارز به خصوص در غلظت ۱۵٪ صمغ و ۵٪ قند، کاهش تقریباً ۴۳ درصدی در سرعت کریستالیزاسیون



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) ژل نشاسته گندم (الف)، ۵٪ S (ب)، ۱۰٪ S (پ)، ۵٪ G (ت)، ۱۰٪ G (ج)، ۱۵٪ G (د)، ۵٪ S-۵٪ G (ث)، ۱۰٪ S-۵٪ G (ج)، ۱۰٪ S-۱۰٪ G (ح)، ۱۵٪ S-۵٪ G (ذ)، ۱۵٪ S-۱۰٪ G (ر).

S، درصد جایگزینی ساکارز و G، درصد جایگزینی صمغ دانه شاهی

Fig. 1- Scanning electron micrographs (SEM) of native wheat starch gel (A) with 5%S (B), 10%S (C), 5%G (D), 10%G (E), 15%G (J), 5%G-5%S (F), 5%G-10%S (G), 10%G-5%S (H), 10%G-10%S (I), 15%G-5%S (K), 15%G-10%S (L). S, sucrose and G, cress seed gum

جدول ۳- متوسط قطر حفرات ساختمان ژل نشاسته گندم در حضور صمغ دانه شاهی و ساکارز

Table 3- Mean pores diameter values for native wheat starch gel containing cress seed gum (CSG) and sucrose (SUC)

صمغ CSG (%)	ساکارز SUC (%)	متوسط قطر حفرات Mean pore diameter (μm)
0	0	33.01±9.09 ^d
	5	38.09±16.89 ^{cd}
	10	45.37±11.43 ^{cd}
5	0	30.10±4.91 ^d
	5	87.20±19.20 ^a
	10	92.14±12.45 ^a
10	0	79.00±6.21 ^{ab}
	5	33.89±10.35 ^d
	10	88.18±17.79 ^a
15	0	29.44±6.81 ^d
	5	31.34±16.31 ^d
	10	56.85±17.42 ^{bc}

پیوسته یک فیلم در اطراف گرانول‌ها ایجاد می‌کنند که از نشت بیشتر مولکول‌های آمیلوز جلوگیری می‌کنند و یا به علت برهمکنش با یکدیگر از به هم پیوستن مجدد مولکول‌های آمیلوز جلوگیری می‌کنند که منجر به کاهش وسعت بیاتی شده است. برسکی و همکاران (Berski *et al.*, 2018) نیز گزارش کردند وسعت بیات شدن نشاسته گندم با افزودن شربت گلوکز به سیستم به دلیل محدود شدن نشت مولکول‌های آمیلوز از گرانول‌ها کاهش یافت.

وسعت یا بزرگی بیات شدن نمونه‌های ژل توسط پارامتر $H_{\infty}H_0/H_0$ ارزیابی شد. با توجه به جدول ۴، میزان وسعت بیاتی ژل نشاسته ۲/۶۳ برآورد شد که با افزایش غلظت صمغ دانه شاهی و ساکارز مقدار آن کاهش یافت و در حداکثر غلظت‌های جایگزینی صمغ بدون حضور ساکارز (۱۵٪) به ۰/۴۸ و قند بدون حضور صمغ (۱۰٪) به ۲/۰۶ رسید. نتایج این تحقیق نشان داد که صمغ دانه شاهی منجر به افزایش حلالیت نشاسته و افزایش مواد جامد محلول در فاز پیوسته شد اما احتمالاً آمیلوز نشت یافته و هیدروکلوئید در فاز

جدول ۴- پارامترهای معادله آورامی برای ارزیابی کتیک بیاتی ژل نشاسته گندم در حضور صمغ دانه شاهی و قند ساکارز

Table 4- The Avrami equation parameters determined for retrogradation kinetic of native wheat starch gel in the presence of cress seed gum (CSG) and sucrose (SUC)

صمغ CSG (%)	ساکارز SUC (%)	پارامترها Parameters				
		H_0 (g)	H_{∞} (g)	$H_{\infty}-H_0/H_0$	k (1/s)	R ²
0	0	47.74±1.47 ^a	173.40±14.28 ^a	2.63±0.19 ^b	0.101±0.021 ^{abcde}	0.960
	5	44.79±0.58 ^{abc}	152.40±10.32 ^a	2.40±0.27 ^b	0.076±0.005 ^{def}	0.942
	10	36.50±3.10 ^e	111.50±5.66 ^a	2.06±0.10 ^b	0.096±0.020 ^{bcdef}	0.978
5	0	44.96±1.40 ^{ab}	171.60±10.04 ^a	2.82±0.10 ^b	0.073±0.011 ^{def}	0.905
	5	38.81±2.09 ^{de}	143.30±5.66 ^a	2.70±0.34 ^b	0.085±0.006 ^{cdef}	0.937
	10	38.47±0.14 ^{de}	186.00±15.84 ^a	3.84±0.43 ^a	0.028±0.002 ^f	0.970
10	0	43.91±2.60 ^{abcd}	77.66±2.54 ^a	0.77±0.16 ^c	0.168±0.00 ^a	0.992
	5	41.07±0.12 ^{bcde}	63.27±4.33 ^a	0.54±0.10 ^c	0.139±0.001 ^{abcd}	0.974
	10	39.01±0.52 ^{cde}	47.85±1.71 ^a	0.23±0.06 ^c	0.157±0.006 ^{ab}	0.979
15	0	44.33±0.71 ^{abcd}	65.81±0.71 ^a	0.48±0.01 ^c	0.052±0.001 ^{ef}	0.975
	5	42.25±0.34 ^{abcde}	58.63±7.42 ^a	0.39±0.19 ^c	0.057±0.035 ^{ef}	0.957
	10	38.83±0.43 ^{de}	44.11±1.17 ^a	0.14±0.04 ^c	0.154±0.04 ^{abc}	0.973

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار برای سه تکرار است. میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($p > 0.05$).

All data are expressed as mean ± standard deviation of three determinations. Values followed by the same letters show no significant differences ($P > 0.05$).

همان طور که مشاهده شد، افزایش غلظت ساکارز منجر به کاهش قدرت تورم و افزایش حلالیت و مواد جامد محلول در فاز پیوسته شد، اما احتمالاً قندها با قرارگیری در فاز پیوسته و در لابه لای مولکول های آمیلوز یا به علت واکنش با آن ها از به هم پیوستن آن ها جلوگیری کرده و منجر به کاهش وسعت بیاتی شده اند. برهمکنش صمغ دانه شاهی و ساکارز در نمونه های مخلوط باعث کاهش بیشتر این وسعت شد که این تغییرات را می توان در نمونه های مخلوط حاوی بیش از ۱۰٪ صمغ به خوبی مشاهده کرد. مقدار وسعت بیات شدن از ۲/۶۳ (مربوط به ژل نشاسته) به ۰/۳۹ و ۰/۱۴ که به ترتیب مربوط به نمونه های مخلوط حاوی ۱۵٪ صمغ-۵٪ قند و ۱۵٪ صمغ-۱۰٪ قند می باشند، رسید.

آب اندازی

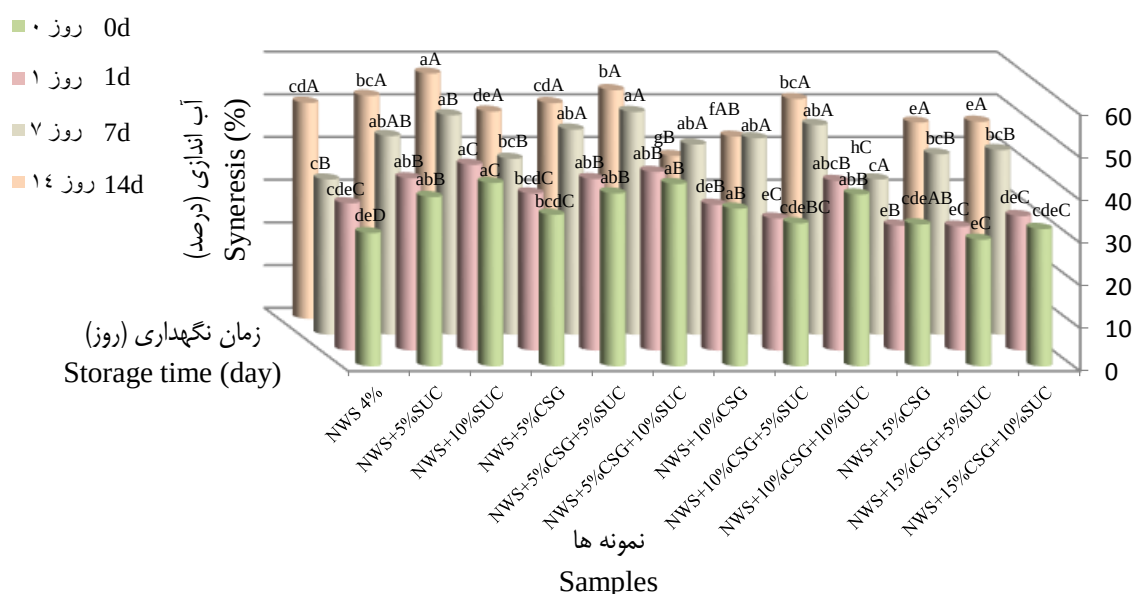
آب اندازی نمونه های ژل جهت بررسی میزان و سرعت بیاتی آن ها طی زمان نگهداری اندازه گیری شد. طی نگهداری ژل نشاسته گندم، به دلیل به هم پیوستن مجدد مولکول های آمیلوز و آمیلوپکتین، شبکه پلیمری با کریستال های نوع B تشکیل می شود و به دنبال آن استحکام شبکه (سختی) به تدریج افزایش می یابد، از طرفی جدایی فاز بین حلال و زنجیره های پلیمر اتفاق می افتد، در نتیجه باعث کاهش ظرفیت نگهداری آب (یا توسعه آب اندازی) می شود (Biliaderis, 2009). نتایج ارائه شده در شکل ۲ نشان می دهد که آب اندازی ژل نشاسته گندم بلافاصله بعد از تولید و بعد از نگهداری به مدت ۱، ۷ و ۱۴ روز در دمای ۴ °C افزایش پیدا کرد و مقدار آن به ترتیب از حدود ۳۱٪ به ۳۴٪، ۳۶٪ و ۵۰٪ رسید؛ اما رفتار متفاوتی از تغییرات آب اندازی در حضور صمغ دانه شاهی و ساکارز مشاهده شد. بلافاصله بعد از تولید، جایگزینی ۵، ۱۰ و ۱۵٪ نشاسته با صمغ دانه شاهی باعث افزایش بسیار جزئی آب اندازی از ۳۱٪ به ۳۳٪ شد. اما بعد از ۱ روز نگهداری، در نمونه های مخلوط نشاسته-صمغ، با افزایش غلظت جایگزینی صمغ تا سطح ۱۵٪، کاهش چشمگیر آب اندازی از حدود ۳۴٪ به ۲۹٪ مشاهده شد. بعد از یک هفته نگهداری نمونه های ژل در دمای ۴ °C، برخلاف انتظار، ژل حاوی ۱۵٪ صمغ دانه شاهی دارای آب اندازی معادل با ژل نشاسته گندم به تنهایی داشت و بقیه نمونه ها دارای آب اندازی بالاتری در مقایسه با ژل نشاسته داشتند. طی مدت ۱۴ روز نگهداری، افزایش غلظت ۵، ۱۰ و ۱۵٪ صمغ اثر بسزایی در کاهش آب اندازی ژل نشاسته داشت و مقدار آن را از حدود ۵۰٪ به ترتیب به ۴۸٪، ۳۸٪ و ۲۳٪ کاهش داد. نتایج نشان دادند که حضور صمغ بر سرعت بیات شدن در هفته اول تأثیری چندانی نداشت و حتی نسبت به نمونه شاهد بیشتر هم شد، اما در هفته دوم نگهداری

سرعت آن کاهش یافت. پلی ساکاریدها ابتدا با تشکیل یک مانع یا فیلم اطراف گرانول های نشاسته از تورم گرانول ها (هیدراته شدن کامل) جلوگیری می کنند و ظرفیت نگهداری آب را کاهش می دهند (یعنی باعث افزایش آب اندازی می شوند) (Funami et al., 2008; Lutfi et al., 2017). از طرفی هیدروکلئیدها ظرفیت نگهداری آب بالایی دارند، لذا احتمالاً نگهداری در دمای پایین باعث اتصال مولکولی بین زنجیره مانان در صمغ دانه شاهی شده در نتیجه یک شبکه پلیمری تشکیل می شود که مولکول های آب را در خود به دام می اندازد و از خروج مولکول های آب جلوگیری می کند (Naji and Razavi, 2014). بدین ترتیب میزان آب در دسترس جهت کریستاله شدن مجدد مولکول های آمیلوز و آمیلوپکتین را کاهش می دهد و از رتروگراسیون نشاسته طی مدت زمان نگهداری طولانی جلوگیری می کند (Funami et al., 2005). در این راستا فونامی و همکاران (Funami et al., 2005) نتایج مشابهی را مبنی بر کاهش آب اندازی ژل نشاسته گندم در حضور پلی ساکاریدهای گوار، تارا، کنجاک گلوکومانان و صمغ لوبیای اقایا بعد از نگهداری در ۴ °C به مدت ۱۴ روز ارائه دادند.

اندازه گیری آب اندازی نمونه های ژل نشاسته حاوی قند در دمای محیط (بلافاصله بعد از تولید) نشان داد جایگزینی ۵ و ۱۰٪ ساکارز به طور چشمگیر منجر به افزایش آب اندازی از ۳۱٪ به ۴۲٪ شده است و پس از یک روز نگهداری در دمای ۴ °C، مقدار آب اندازی ژل نشاسته گندم از حدود ۳۴٪ به ۴۳٪ رسید. مقدار آب اندازی ژل های نشاسته در حضور ۵ و ۱۰٪ قند در طی ۷ روز نگهداری در دمای ۴ °C به ترتیب از ۳۶٪ به ۴۶٪ و ۵۱٪ افزایش یافت. پس از گذشت ۱۴ روز نگهداری نمونه های ژل در دمای ۴ °C نیز مقدار آب اندازی آن ها از ۵۰٪ به ترتیب به ۵۲٪ و ۵۷٪ افزایش یافت. اگرچه با افزایش غلظت جایگزینی ساکارز تا ۱۰٪، به علت ظرفیت نگهداری آب پایین قند، میزان آب اندازی ژل در تمامی روزهای نگهداری افزایش یافته است. مقدار افزایش آب اندازی برای ژل نشاسته معمولی گندم در هفته اول حدود ۵٪ و در هفته دوم حدود ۴۷٪ را نشان می دهد، در حالی که با ۵ و ۱۰٪ جایگزینی قند این درصدها به ترتیب به ۳۰-۱۵٪ و ۳۲-۱۸٪ تغییر پیدا کرد. می توان این گونه استنباط کرد که سرعت بیاتی ژل نشاسته گندم در حضور ساکارز در مدت ۱۴ روز نگهداری کاهش یافته است. در این راستا، نتایج ارائه شده در این پژوهش مطابق با یافته های کارینز و همکاران (Cairns et al., 1991) بود. آن ها بیان کردند در حضور ساکارز کریستالیزاسیون مجدد آمیلوپکتین ژل نشاسته گندم طی ۳۰ روز نگهداری کاهش یافت که بیانگر کاهش بیات شدن بلند مدت بود. همچنین زهنگ و

۲۸٪ رسید. درحالی که نگهداری نمونه‌ها به مدت ۷ روز در دمای °C ۴ منجر به افزایش آب‌اندازی نمونه‌های مخلوط نشاسته-صمغ-قند نسبت به ژل نشاسته گندم شد. پس از ۱۴ روز نگهداری ژل‌های مخلوط سه جزئی در غلظت ۱۵٪ صمغ-۵ و ۱۰٪ قند به ترتیب دارای مقادیر آب‌اندازی حدود ۴۵٪ و ۴۶٪ بودند که در مقایسه با ژل نشاسته گندم کمتر بود. تغییرات آب‌اندازی ژل‌های مخلوط سه جزئی نشاسته-صمغ-قند طی مدت نگهداری نشان داد که حضور صمغ دانه شاهی در سیستم بر اثر منفی ساکارز (در هر دو غلظت آن) در افزایش آب‌اندازی ژل غلبه کرده است به‌طوری که با افزایش غلظت صمغ، افزایش آب‌اندازی ژل در اثر حضور قند، روند کندتری پیدا کرد.

همکاران (Zhang et al., 2017) دریافتند که سرعت کریستالیزاسیون مجدد ژل نشاسته تاپوکا در حضور ساکارز طی ۲۸ روز نگهداری کاهش پیدا کرد. احتمالاً مولکول‌های ساکارز به علت رقابت بر سر مولکول‌های آب با مولکول‌های نشاسته گندم، آب را از دسترس مولکول‌های آمیلوپکتین خارج می‌کنند (Gunaratne et al., 2007) و باعث کندتر شدن کریستالیزاسیون بلند مدت می‌شوند. درصد آب‌اندازی نمونه‌های ژل مخلوط نشاسته-صمغ-قند در غلظت ۱۵٪ صمغ و ۵٪ قند بلافاصله بعد از تولید نسبت به ژل نشاسته گندم به صورت جزئی کاهش یافته است اما پس از ۱ روز نگهداری در دمای °C ۴ مقدار آن در این غلظت‌ها از حدود ۳۴٪ به



شکل ۲- درصد آب‌اندازی ژل نشاسته معمولی گندم (NWS) در حضور صمغ دانه شاهی (CSG) و ساکارز (SUC) طی مدت‌زمان نگهداری (a-h)، حروف غیر مشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های جایگزینی صمغ و قند می‌باشد. A-D، حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های نگهداری می‌باشد)

Fig. 2- The values of syneresis (%) of native wheat starch (NWS) gel containing cress seed gum (CSG) and sucrose (SUC) during storage time

(a-h, means followed by the different letters in the each row for substitution levels of CSG and SUC are significantly different ($P < 0.05$). A-D, means followed by the different letters in the each column for storage times are significantly different ($P < 0.05$))

نتیجه‌گیری

مولکول‌های نشاسته و تشکیل یک لایه فیلم در اطراف گرانول‌ها از نشستن بیشتر مولکول‌های آمیلوز به فاز پیوسته جلوگیری کرده و از آنجایی که صمغ دانه شاهی ظرفیت نگهداری آب بالایی دارد، طی نگهداری نمونه‌های ژل در دمای °C ۴، منجر به کاهش سرعت بیات شدن و میزان آب‌اندازی ژل نشاسته شد، که اثر آن در غلظت بالای جایگزینی مشهودتر بود. در مقابل ساکارز، احتمالاً به دلیل رقابت با مولکول‌های نشاسته بر سر آب موجود در سیستم و در نتیجه

در این تحقیق، هدف مطالعه خواص عملکردی، ساختمان ژل، رفتار بیات شدن و میزان آب‌اندازی نشاسته معمولی گندم در حضور صمغ دانه شاهی و ساکارز بود. کنترل و تأخیر بیاتی و کاهش آب‌اندازی محصولات بر پایه نشاسته در حوزه صنعت مواد غذایی بسیار حائز اهمیت است. جایگزینی صمغ دانه شاهی باعث افزایش قدرت تورم و حلالیت نشاسته گندم شد، اما به دلیل واکنش با

ژل نشاسته کاهش داده است. در یک جمع بندی، جایگزینی ۱۵٪ نشاسته گندم با صمغ دانه شاهی و ۵٪ با ساکارز می‌تواند به طور موثر منجر به بهبود خصوصیات عملکردی و کاهش سرعت بیات شدن و میزان آباندازی آن طی مدت نگهداری شود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد (گرت شماره ۳۴۸۵۱) و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (گرت شماره ۹۶۰۱۵۵۴۰) بابت حمایت مالی و تجهیزاتی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

جلوگیری از ژلاتینه شدن و تحرک مولکول‌های نشاسته، منجر به کاهش قدرت تورم شد و از طرف دیگر به دلیل کم بودن ظرفیت نگهداری آب توسط قند، منجر به افزایش آباندازی ژل نشاسته گردید. بررسی رفتار بیاتی نشان داد که حضور قند باعث کاهش سرعت آن شده است. نمونه‌های مخلوط سه جزئی نشاسته-صمغ-قند قدرت تورم و حلالیت بالاتری در مقایسه با نمونه نشاسته و مخلوط نشاسته-قند داشتند. نمونه‌های ژل مخلوط به خصوص در غلظت ۱۵٪ جایگزینی صمغ دارای سرعت بیاتی و میزان آباندازی کمتری در مقایسه با هر دو نمونه نشاسته گندم و مخلوط نشاسته-قند بودند. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت که در سیستم سه تایی، صمغ با قند رقابت کرده و اثرات تضعیف کنندگی آن را بر خصوصیات

منابع

1. Abedi, E., Pourmohammadi, K., Jahromi, M., Niakousari, M., & Torri, L. (2019). The effect of ultrasonic probe size for effective ultrasound-assisted pregelatinized starch. *Food and Bioprocess Technology* 12(11): 1852-1862. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02347-2>.
2. Bahnassey, Y.A., & Breene, W.M. (1994). Rapid Visco-Analyzer (RVA) pasting profiles of wheat, corn, waxy corn, Tapioca and Amaranth Starches (A. hypochondriacus and A. cruentus) in the presence of Konjac flour, gellan, guar, xanthan and Locust bean gums. *Starch - Stärke* 46(4): 134-141. <https://doi.org/10.1002/star.19940460404>.
3. Behrouzian, F., Razavi, S.M.A., & Karazhiyan, H. (2014). Intrinsic viscosity of cress (*Lepidium sativum*) seed gum: Effect of salts and sugars. *Food Hydrocolloids* 35: 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.019>.
4. BeMiller, J.N. (2011). Pasting, paste, and gel properties of starch-hydrocolloid combinations. *Carbohydrate Polymers* 86(2): 386-423. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.064>.
5. Berski, W., Ziobro, R., Witczak, M., & Gambuś, H. (2018). The retrogradation kinetics of starches of different botanical origin in the presence of glucose syrup. *International Journal of Biological Macromolecules* 114: 1288-1294. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.019>.
6. Brennan, C.S., Suter, M., Matia-Merino, L., Luethi, T., Ravindran, G., Goh, K., & Ovortrup, J. (2006). Gel and pasting behaviour of fenugreek-wheat starch and fenugreek - wheat flour combinations. *Starch - Stärke* 58(10): 527-535. <https://doi.org/10.1002/star.200600525>.
7. Biliaderis, C.G. (2009). *Structural transitions and related physical properties of starch*. Third Edition ed. in: *Starch: Chemistry and Technology* (Eds.) J. BeMiller, R. Whistler, Academic Press. San Diego. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00008-2>.
8. Biliaderis, C.G., Arvanitoyannis, I., Izydorczyk, M.S., & Prokopowich, D.J. (1997). Effect of hydrocolloids on gelatinization and structure formation in concentrated waxy maize and wheat starch gels. *Starch - Stärke* 49(7-8): 278-283. <https://doi.org/10.1002/star.19970490706>.
9. Cairns, P., I'Anson, K.J., & Morris, V.J. (1991). The effect of added sugars on the retrogradation of wheat starch gels by X-ray diffraction. *Food Hydrocolloids* 5(1): 151-153. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80302-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80302-0).
10. Chaisawang, M., & Supphantharika, M. (2006). Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum. *Food Hydrocolloids* 20(5): 641-649. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.06.003>.
11. Chen, H.H., Wang, Y.S., Leng, Y., Zhao, Y., & Zhao, X. (2014). Effect of NaCl and sugar on physicochemical properties of flaxseed polysaccharide-potato starch complexes. *Science Asia* 40(1): 60-68. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2014.40.060>.
12. Christianson, D.D., Hodge, J.E., Osborne, D., & Detroy, R.W. (1981). Gelatinization of wheat starch as modified by xanthan gum, guar gum, and cellulose gum. *Cereal Chemistry* 58(6): 513-517.
13. Dengate, H.N. (1984). *Swelling, pasting, and gelling of wheat starch*. in: *Advances in Cereal Science and Technology*, (Ed.) Y. Pomeranz, Vol. VI, American Association of Cereal Chemists, INC. St. Paul, Minnesota, pp. 49-82.
14. Dos Santos, T.P.R., Franco, C.M.L., do Carmo, E.L., Jane, J.L., & Leonel, M. (2019). Effect of spray-drying and extrusion on physicochemical characteristics of sweet potato starch. *Journal of Food Science and Technology* 56(1): 376-383. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3498-y>.

15. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Homepage of FAO. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, 2020(last update: 22 December 2020)
16. Funami, T., Kataoka, Y., Omoto, T., Goto, Y., Asai, I., & Nishinari, K. (2005). Effects of non-ionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behavior of wheat starch. *Food Hydrocolloids* 19(1): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.04.024>.
17. Funami, T., Nakauma, M., Noda, S., Ishihara, S., Asai, I., Inouchi, N., & Nishinari, K. (2008). Effects of some anionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behaviors of wheat starch: Soybean-soluble polysaccharide and gum arabic. *Food Hydrocolloids* 22(8): 1528-1540. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.10.008>.
18. Gunaratne, A., Ranaweera, S., & Corke, H. (2007). Thermal, pasting, and gelling properties of wheat and potato starches in the presence of sucrose, glucose, glycerol, and hydroxypropyl β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers* 70(1): 112-122. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.03.011>.
19. Karazhiyan, H., Razavi, S.M.A., & Phillips, G.O. (2011a). Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. *Food Hydrocolloids* 25(5): 915-920. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.022>.
20. Karazhiyan, H., Razavi, S.M.A., Phillips, G.O., Fang, Y., Al-Assaf, S., & Nishinari, K. (2011b). Physicochemical aspects of hydrocolloid extract from the seeds of *Lepidium sativum*. *International Journal of Food Science & Technology* 46(5): 1066-1072. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02583.x>.
21. Kaur, L., Singh, J., Singh, H., & McCarthy, O.J. (2008). Starch–cassia gum interactions: A microstructure–Rheology study. *Food Chemistry* 111(1): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.027>.
22. Kontogiorgos, V. (2015). Galactomannans (Guar, Locust Bean, Fenugreek, Tara). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21589-8>.
23. Kumar, R., & Khatkar, B.S. (2017). Thermal, pasting and morphological properties of starch granules of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Journal of Food Science and Technology* 54(8): 2403-2410. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2681-x>.
24. Lee, M.H., Baek, M.H., Cha, D.S., Park, H.J., & Lim, S.T. (2002). Freeze–thaw stabilization of sweet potato starch gel by polysaccharide gums. *Food Hydrocolloids* 16(4): 345-352. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00107-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00107-2).
25. Lo, C., & Ramsden, L. (2000). Effects of xanthan and galactomannan on the freeze/thaw properties of starch gels. *Food/Nahrung* 44(3): 211-214. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20000501\)44:3<211::AID-FOOD211>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20000501)44:3<211::AID-FOOD211>3.0.CO;2-O).
26. Lutfi, Z., Nawab, A., Alam, F., Hasnain, A., & Haider, S.Z. (2017). Influence of xanthan, guar, CMC and gum acacia on functional properties of water chestnut (*Trapa bispinosa*) starch. *International Journal of Biological Macromolecules* 103: 220-225. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.046>.
27. Mandala, I.G., & Bayas, E. (2004). Xanthan effect on swelling, solubility and viscosity of wheat starch dispersions. *Food Hydrocolloids* 18(2): 191-201. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00064-X).
28. Maningat, C.C., Seib, P.A., Bassi, S.D., Woo, K.S., & Lasater, G.D. (2009). *Wheat Starch*. in: Starch (Third Edition), (Eds.) J. BeMiller, R. Whistler, Academic Press. San Diego.
29. Mason, W.R. (2009). *Starch Use in Foods*. in: Starch (Third Edition), (Eds.) J. BeMiller, R. Whistler, Academic Press. San Diego, pp. 745-795.
30. Matia-Merino, L., Prieto, M., Roman, L., & Gómez, M. (2019). The impact of basil seed gum on native and pregelatinized corn flour and starch gel properties. *Food Hydrocolloids* 89: 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.005>.
31. Mirnezhad Anbarani, N., Razavi, S.M.A., & Taghizadeh, M. (2021). Impact of sage seed gum and whey protein concentrate on the functional properties and retrogradation behavior of native wheat starch gel. *Food Hydrocolloids* 111. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106261>.
32. Murphy, P. (2000). *Starch*. in: Handbook of Hydrocolloids, (Eds.) G.O. Phillips, P.A. Williams, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
33. Naji-Tabasi, S., & Mohebbi, M. (2015). Evaluation of cress seed gum and xanthan gum effect on macrostructure properties of gluten-free bread by image processing. *Journal of Food Measurement and Characterization* 9(1): 110-119. <https://doi.org/10.1007/s11694-014-9216-1>.
34. Naji, S., & Razavi, S.M.A. (2014). Functional and textural characteristics of cress seed (*Lepidium sativum*) gum and xanthan gum: Effect of refrigeration condition. *Food Bioscience* 5: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.10.003>.
35. Naji, S., Razavi, S.M.A., & Karazhiyan, H. (2012). Effect of thermal treatments on functional properties of cress seed (*Lepidium sativum*) and xanthan gums: A comparative study. *Food Hydrocolloids* 28(1): 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.11.012>.

36. Naji, S., Razavi, S.M.A., & Karazhiyan, H. (2013). Effect of freezing on functional and textural attributes of Cress Seed Gum and Xanthan Gum. *Food and Bioprocess Technology* 6(5): 1302–1311. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0811-z>.
37. Sahraian, B., Naghipour, F., Karimi, M., & Davoodi, M.G. (2013). Evaluation of *Lepidium sativum* seed and guar gum to improve dough rheology and quality parameters in composite rice–wheat bread. *Food Hydrocolloids* 30(2): 698-703. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.013>.
38. Shevkani, K., Singh, N., Bajaj, R., & Kaur, A. (2017). Wheat starch production, structure, functionality and applications—a review. *International Journal of Food Science & Technology* 52(1): 38-58. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13266>.
39. Sun, Q., Wu, M., Bu, X., & Xiong, L. (2015). Effect of the amount and particle size of wheat fiber on the physicochemical properties and gel morphology of starches. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128665>.
40. Techawipharat, J., Suphantharika, M., & BeMiller, J.N. (2008). Effects of cellulose derivatives and carrageenans on the pasting, paste, and gel properties of rice starches. *Carbohydrate Polymers* 73(3): 417-426. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.019>.
41. Tester, R., & Sommerville, M. (2003). The effects of non-starch polysaccharides on the extent of gelatinisation, swelling and α -amylase hydrolysis of maize and wheat starches. *Food Hydrocolloids* 17(1): 41-54. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00032-2).
42. Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. (2015). Starch retrogradation: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14(5): 568-585. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12143>.
43. Xing, Q., Hou, C., Zhang, Z., Han, K., Yan, Q., & Luo, J. (2017). Comparative study on the physicochemical properties of pea, chickpea, and wheat starch gels in the presence of sweeteners. *Starch - Stärke* 69(9-10): 1600287-n/a. <https://doi.org/10.1002/star.201600287>.
44. Xiong, J., Li, Q., Shi, Z., & Ye, J. (2017). Interactions between wheat starch and cellulose derivatives in short-term retrogradation: Rheology and FTIR study. *Food Research International* 100: 858-863. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.061>.
45. Zhang, H., Sun, B., Zhang, S., Zhu, Y., & Tian, Y. (2015). Inhibition of wheat starch retrogradation by tea derivatives. *Carbohydrate Polymers* 134: 413-417. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.018>.
46. Zhang, X., Li, R., Kang, H., Luo, D., Fan, J., Zhu, W., Liu, X., & Tong, Q. (2017). Effects of low molecular sugars on the retrogradation of tapioca starch gels during storage. *PloS One* 12(12): e0190180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190180>.
47. Zhou, Y., Wang, D., Zhang, L., Du, X., & Zhou, X. (2008). Effect of polysaccharides on gelatinization and retrogradation of wheat starch. *Food Hydrocolloids* 22(4): 505-512. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.01.010>.



Dietetic Sesame Paste Cream Using Sucrose Replacers (Isomalt, Rebaudioside a, Erythritol)

E. Dehghan¹, B. Mohammadi^{ID 2*}

Received: 2021.05.16

Revised: 2021.11.15

Accepted: 2021.11.22

Available Online: 2021.11.22

How to cite this article:

Mohammadi, B., & Dehghan, E. (2023). Dietetic sesame paste cream using sucrose replacers (Isomalt, Rebaudioside a, Erythritol). *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 17-30. (In Persian with English abstract). <http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2021.70353.1045>

Introduction

Sesame paste is a product that is obtained by mixing Ardeh obtained from peeling of Sesame seeds with sugar or other sweeteners and flavorants such as cardamom and vanilla. Each 100 grams of this nutritious product contains 558 kcal and providing 17% of the daily calcium need, 100% for iron and 26% for protein. Sesame cream /Ardeh cream provides 478 kcal per 100 grams. Ardeh cream is also a good alternative to chocolates with artificial colors, so it is a very good choice in cases of hypoglycemia, such as before the exam session of students or during heavy exercise such as mountaineering. Sugar substitutes are compounds that, like sugars, are used to sweeten foods, except that they are not digested without the need for metabolized insulin, or are digested sparingly and therefore have little caloric value. The diet products are usually based on reducing calorie intake, which today, the growing interest of people in eating healthy diet has led to an increase in their desire to consume low-calorie products. Patients with diseases caused by sugar consumption such as diabetes, hypertension and hyperlipidemia, osteoporosis, obesity, etc. tend to use artificial sweeteners such as saccharin, aspartame, cyclamate and acesulfame.

Materials and Methods

Hydrogenated oil, Skim milk powder, Whey powder, Soy lecithin, Potassium dichromate, Ethanol, Ardeh, Erythritol, Isomalt Powder, Ribodioside a, Sugar Stable micro histometer systems, Ballmer, Memmert model digital scale, Autoclave, Oven, N Hexane, Desiccator, Soxhlet device, 500 cc balloon, Peptone water, Dichlorine-Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DG18), coax reagent, EC broth culture medium, lauryl sulfate culture medium, pH meter with measuring accuracy of 0.1%, 0.1 N sulfuric acid solution, Potassium sulfate, dioxide Selenium, boric acid solution, crystallized copper sulfate, aluminum plate were used in this study. First, to prepare a control sample, raw materials such as flour, oil and sugar were added to the mixer and mixed together, then the rest of the ingredients were added and mixed inside the machine to make the cream uniform and homogeneous. Then it was transferred to the filter and packed in the desired containers. Sugar substitutes were used for the rest of the samples.

Results and Discussion

The prevalence of obesity and diabetes has increased dramatically in recent years, forcing consumers to look for low-calorie sweeteners. Replacing low-calorie sweeteners with sucrose results in low-calorie, and healthy foods. The aim of this study was to present a new formulation using isomalt, ribadioside a, erythritol as sucrose substituents and to investigate its effect on chemical, physical and sensory properties of substituted samples compared to the control sample. The use of sucrose substituents was effective in improving some physicochemical properties of Ardeh so that the moisture content of the substituted samples increased. The results of histological examination also showed that the

1- Former M.Sc Student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Yazd branch, Yazd, Iran

2- Former M.Sc Student, Department of Food Science and Technology, Afagh Higher Education Institute, Urmia, Iran

(*- Corresponding Author Email: behzadmohammadi722@gmail.com)

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2021.70353.1045](https://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2021.70353.1045)

replaced samples had softer tissue than the control sample, which was due to the weakening of tissue stability by sucrose substitutes. The results of sensory properties based on aroma, taste, odor and texture also showed that sample 2 with the formula 25% sucrose, 6.25% isomalt, 0.003 ribodioside obtained the highest score in terms of overall acceptance. The reason for the decrease in the general acceptance of the samples replaced with complete elimination of sucrose is the lack of regulation of the desired sweetness by these alternatives. The results of microbial analysis of samples also showed that sugar substitutes have no effect on the microbial properties of Ardeh. According to the obtained results, sample 2 with 25% sucrose, 6.25% isomalt, 0.003% ribodioside a is the best combination and a healthy and low calorie snack.

Keywords: Dietetic sesame paste cream, Erythritol, Isomalt, Rebaudioside a, Sucrose replacers

مقاله پژوهشی

تهیه کرم ارده رژیمی با استفاده از جایگزین‌های ساکارز (ایزومالت، ریبادیوزید a، اریتریتول) و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، بافتی و حسی آن

الهه دهقان^۱ - بهزاد محمدی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۱

چکیده

در سال‌های اخیر شیوع چاقی و دیابت به طور چشمگیری رو به افزایش است و این مسئله مصرف‌کنندگان را وادار می‌کند به دنبال محصولات حاوی شیرین‌کننده‌های کم کالری باشند. جایگزینی شیرین‌کننده‌های کم کالری با ساکارز باعث تولید محصولی با ارزش غذایی بالا و کالری کم و ایمنی تغذیه‌ای بالا (غذایی سالم) می‌شود. هدف از انجام این پژوهش ارائه فرمولاسیون جدید با استفاده از جایگزین‌های قندی ایزومالت، ریبادیوزید a، اریتریتول به عنوان جایگزین ساکارز و بررسی تاثیر آن بر ویژگی‌های شیمیایی، فیزیکی و حسی نمونه‌های جایگزین شده نسبت به نمونه کنترل بود. استفاده از جایگزین‌های ساکارز در بهبود برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کرم ارده موثر بود به طوری که میزان رطوبت نمونه‌های جایگزین شده افزایش یافت. نتایج بررسی بافتی نیز نشان داد نمونه‌های جایگزین شده بافت نرم‌تری نسبت به نمونه شاهد داشتند که ناشی از تضعیف پایداری (سفتی) بافت توسط جایگزین‌های ساکارز بود. نتایج بررسی خصوصیات حسی که بر مبنای، عطر، طعم، بو و بافت بود نیز نشان داد نمونه ۲ با فرمول ۲۵٪ ساکارز، ۶/۲۵٪ ایزومالت، ۰/۰۳٪ ریبادیوزید بیشترین نمره را از نظر پذیرش کلی کسب کرد. علت کاهش پذیرش کلی نمونه‌های جایگزین شده با حذف کامل ساکارز عدم تنظیم شیرینی مطلوب توسط این جایگزین‌ها می‌باشد. نتایج بررسی میکروبی نمونه‌ها نیز نشان داد جایگزین‌های قندی تاثیری بر خواص میکروبی کرم ارده ندارد. با توجه به نتایج بدست آمده نمونه ۲ با میزان ۲۵٪ ساکارز، ۶/۲۵٪ ایزومالت، ۰/۰۳٪ ریبادیوزید a به عنوان بهترین ترکیب و یک میان وعده سالم و کم کالری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اریتریتول، ایزومالت، جایگزین‌های ساکارز، ریبادیوزید a، کرم ارده رژیمی

مقدمه

تمایل به مصرف شیرین‌کننده‌های مصنوعی مانند ساخارین، آسپارتام، سیکلامات و آسه سولفام دارند (Kant, 2005). با این حال، برخی از این شیرین‌کننده‌ها سبب بروز عوارضی از جمله اختلالات ذهنی، مشکلات روانی، سرطان مثانه، نارسایی قلبی و تومورهای مغزی می‌شوند (Weihrach and Bohlen, 2002). کرم ارده، فرآورده‌ای است که از مخلوط کردن ارده حاصل از پوست‌گیری و بودادن کنجد با شکر یا شیرین‌کننده‌های دیگر و طعم دهنده‌هایی مانند هل و وانیل به دست می‌آید. هر صد گرم از این ماده غذایی حاوی ۵۵۸ کیلوکالری می‌باشد و ۱۷ درصد نیاز افراد به کلسیم و ۱۰۰ درصد نیاز به آهن و ۲۶ درصد نیاز به پروتئین را مرتفع می‌سازد. کرم کنجد یا کرم ارده هر صد گرم آن ۴۷۸ کیلوکالری انرژی دارد. همچنین کرم

امروزه علاقه رو به رشد انسان‌ها به سلامتی و داشتن یک رژیم غذایی مناسب منجر به افزایش تمایل آنها به مصرف محصولات کم کالری شده است. مبتلایان به بیماری‌های ناشی از مصرف قند مانند دیابت، فشارخون بالا و چربی خون، پوکی استخوان، چاقی و غیره

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یزد، یزد، ایران

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، مؤسسه غیر انتفاعی آفاق ارومیه، ارومیه، ایران

(*) نویسنده مسئول: (Email: behzadmohammadi722@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70353.1045

ارده جایگزین مناسبی برای شکلات‌هایی با رنگ‌های مصنوعی است، از این رو در مواقع افت قند خون همچون پیش از جلسه امتحان دانش آموزان و دانشجویان یا حین ورزش‌هایی سنگین مثل کوهنوردی انتخاب بسیار مناسبی است. جایگزین‌های شکر ترکیباتی هستند که مثل قندها برای شیرین کردن مواد غذایی استفاده می‌شوند، با این تفاوت که بدون نیاز به انسولین متابولیزه شده هضم نمی‌شوند و یا به میزان کمی هضم می‌شوند و در نتیجه ارزش کالری زایی زیادی ندارند (Keramat, 2008). اساس محصولات رژیمی بر پایه کاهش کالری دریافتی است. در تهیه محصولات رژیمی فاقد شکر معمولاً از یک یا چند شیرین‌کننده کم کالری نظیر الکل‌های قندی و یا شیرین‌کننده‌های غیر مغذی (مصنوعی) استفاده می‌شود. از مهمترین پلی‌ال‌های شیرین می‌توان به سوربیتول، مانیتول، زایلیتول، اریتریتول، لاکتیتول و مالتیتول و از انواع شیرین‌کننده‌های مصنوعی می‌توان به آسپارتام، سوکرالوز و آسه سولفام پتاسیم اشاره کرد که مصرف آنها مورد تایید FDA است (Movahed, 2011). ایزومالت ($C_{12}H_{22}O_{11}$) یکی از جایگزین‌های شکر می‌باشد که همانند شکر دارای نقش‌های مختلفی در محصولات می‌باشد. که از جمله آنها می‌توان به تولید محصولاتی با شاخص گلیسمی پایین، کالری کم و اثر کمتر در پوسیدگی دندان اشاره کرد قدرت شیرین‌کنندگی ایزومالت حدوداً بین ۰/۴۵ و ۰/۶ است که میزان آن در ساکارز ۱٪ می‌باشد. از آنجایی که ایزومالت باعث تشدید طعم در غذاها می‌شود، عمدتاً در ترکیب با شیرین‌کننده‌های مغذی و غیرمغذی استفاده می‌شود. اثرات سینرژیستی در آن آشکار می‌شود که ایزومالت در ترکیب با شیرین‌کننده‌های حجم دهنده نظیر شربت مالتیتول، لاکتیتول، سوربیتول، مانیتول یا زایلیتول مورد استفاده قرار می‌گیرد. (Metchel, 2006). ایزو مالت یک دی ساکارید الکی است و به‌منظور جذب بایستی به مونومرهای سازنده خود هیدرولیز شود. آنزیم‌های تجزیه‌کننده کربوهیدرات‌ها در روده کوچک، کمپلکس ساکاراز- ایزومالتاز و کمپلکس گلوکوامیلاز-مالتاز روده، ایزو مالت را با سرعت کمتری نسبت به مالتوز و ساکارز هیدرولیز می‌کنند (Yang, 2010). مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد سرعت نسبی تجزیه ایزومالت توسط آنزیم‌های موکوزی روده: ۳ برای مالتوز: ساکارز ۲۵: ایزومالت ۱۰۰ است. بر اساس مطالعات صورت گرفته در انسان‌ها و حیوانات، تقریباً حدود ۱۰٪ ایزومالت در بدن جذب شده و ۹۰٪ آن در روده بزرگ تخمیر می‌شود. پاسخ سطح گلوکز خون پس از مصرف ایزومالت بسیار پایین است. نتایج بررسی بین افراد سالم و دیابتی نوع اول و دوم نشان داده که بیشترین سطح گلوکز خون به ایزومالت ۱۲٪ و کمترین آن ۲٪ می‌باشد. بعلاوه پاسخ انسولین نیز به همین ترتیب پایین است. بر خلاف سایر کربوهیدرات‌ها از قبیل ساکارز یا گلوکز، اثر

هایپرگلیسمیک برای ایزومالت دیده نشده است. اسنک و شیر شکلاتی تهیه شده با ایزومالت، نسبت به محصول معمولی، باعث ایجاد اثرات کمتری در افزایش سطح گلوکز یا انسولین می‌شود. اریتریتول ($C_4H_{10}O_4$) نوعی الکل قندی چهار کربنه، شیرینی معادل ۶۰-۸۰٪ ساکارز و میزان کالری آن ۵/۵ Kcal/g نسبت به شکر کمتر است. در نتیجه می‌تواند در تولید غذاهای کم کالری استفاده شود. اریتریتول در صنعت داروسازی، شیرینی‌سازی، محصولات نانویی و شکلات‌سازی کاربرد دارد (Pometta, 1985). در حال حاضر اریتریتول به عنوان افزودنی‌های غذایی در بسیاری از کشورها مثل آمریکا، ژاپن، تایوان، استرالیا و نیوزلند پذیرفته شده است (Sardesai and Waldshan, 1991).

ریبادیوزید a گلیکوزیدهای دی ترینی ترکیباتی می‌باشند که به عنوان عامل اصلی ایجاد طعم بسیار شیرین در عصاره‌های گیاه استویا شناخته شده‌اند. به طوری که میزان شیرینی آن‌ها تا ۳۰۰ برابر شکر تخمین زده شده است (Hamzehlouei et al., 2009). استویوزید، ۷۰ - ۶۰٪ از کل گلیکوزیدها را تشکیل می‌دهد و همچنین حدود ۲۷۰ - ۱۱۰ برابر شیرین‌تر از شکر می‌باشد. این گلیکوزید دارای پس طعم (طعم شیرین بیان) می‌باشد. ریبادیوزید A، ۳۰-۴۰٪ از کل گلیکوزیدها را تشکیل می‌دهد و شیرینی آن ۱۸۰-۴۰۰ برابر شیرینی شکر می‌باشد؛ این گلیکوزید بدون پس طعم تلخی می‌باشد (Pometta, 1985). تمایز ریبادیوزید a از شیرین‌کننده‌های طبیعی دیگر، این است که کاملاً بدون کالری می‌باشد و هرگز باعث افزایش قند خون نمی‌شود. در ضمن، به عنوان منبع تغذیه‌ای برای میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها و مخمرها محسوب نمی‌گردد (Gasmalla et al., 2014).

هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر سه ترکیب ایزومالت، ریبادیوزید a، اریتریتول بعنوان جایگزین‌های چربی در ترکیب کرم ارده و بررسی خصوصیات بافت و فیزیکوشیمیایی حسی باهدف دستیابی به فرآورده‌ای با ارزش تغذیه‌ای بالا و خصوصیات فیزیکوشیمیایی مناسب برای تولید محصولی کم کالری برای مصرف افراد جامعه بود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه مورد استفاده در این پژوهش شامل روغن هیدروژنه (شرکت هنتا ایران)، شیرخشک اسکیم (شرکت شیرپویان مهریز- ایران)، پودر آب پنیر (شرکت شیرپویان مهریز- ایران)، لیستین سویا (KESHAV- هند)، پتاسیم دی کرومات (سیگما)، اتانول (مرک)، ارده ساده (شرکت فرآورده‌های کنج‌دی شیررضا- ایران)، اریتریتول (شرکت

(ایران)، سولفات مس متبلور (مرک)، پلیت آلومینیومی (ایران) از شرکت‌های تولیدی خریداری شدند.

تولید و فرآوری کرم ارده

ابتدا دانه‌های کنجد که قبلاً خیس شده بودند توسط آسیاب آزمایشگاهی به حالت خمیری در آورده شدند تا کرم یکنواختی بدست آید و در ادامه خمیر حاصله بعلاوه روغن، شکر، شیرخشک، لیستین و وانیل وارد دستگاه میکسر اسپیرال فیما (MI30SN-ایتالیا) با دور ۱۰۰ الی ۲۰۰ دور در دقیقه شده، و باهم مخلوط شدند. مخلوط شدن تازمانی که کرم یکنواخت و همگن بدست آید ادامه یافت. سپس به صافی منتقل گردیده و در ظروف مورد نظر بسته‌بندی شد. این روش برای تمامی نمونه‌ها یکسان بود فقط در نمونه‌های مورد آزمایش ایزومالت، اریتریتول، ریبودیوزید a جایگزین ساکارز شدند.

الوند -ایران)، پودر ایزومالت (سیرال-فرانسه)، ریبودیوزید (سیرال-فرانسه)، شکر (کارخانه قند میبد-ایران)

دستگاه‌های مورد استفاده: بافت‌سنج Stable micro systems (مدل TA-Xt plus -انگلستان)، دستگاه بالمیر (سپهرماشین -ایران)، ترازوی دیجیتال مدل (Memmert -آلمان)، لکوره الکتریکی (تهران گدازه ساز-ایران)، اتوکلاو (تهران گدازه ساز-ایران)، آون (الکترواستیل-ایران)، N هگزان (بایوکم-فرانسه)، دسیکاتور (شیماز-ایران)، دستگاه سوکسله، بالن ته‌گرد ۵۰۰ سی‌سی (سینا شیشه ایران)، آب پپتونه (شرکت پارس پیوند -ایران)، محیط کشت دی کلران - رز بنگال کلرامفنیکل آگار (DG18) (مرک - آلمان)، معرف کوکس (مرک)، محیط کشت EC براث (مرک)، محیط کشت لوریل سولفات (مرک)، pH متر با دقت اندازه‌گیری ± 0.1 (Milwaukee Martini - ایتالیا)، محلول اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال (ایران)، سولفات پتاسیم خشک (مرک)، دی اکسید سلنیوم (مرک)، محلول اسید بوریک

جدول ۱- مواد تشکیل دهنده کرم ارده رژیمی

Table 1- Ingredients of diet cream

	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3	Sampel 4	Sampel 5
	نمونه ۱ (شاهد)	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵
%ساکارز	50	25	0	0	0
Sucrose%					
%ایزومالت	0	6.26	0	0.03	25
Isomalt%					
%ریبودیوزید	0	0.03	0.003	0.03	0.03
Rebaudioside a%					
%اریتریتول	0	0	30	22	22.2
Erythritol%					
%ارده	27	33.33	55	50	50
Arde%					
%لیستین					
Lecithin%					
%شیرخشک	2.5	6.76	1.11	1.11	1.11
milk powder%	13	1.66	7.13	8	8
%روغن	25	25	11.2	10	10
Oil%	2.1	3.2	3.33	3	3
%پودر آب پنیر	0.12	0.15	0.2	14	14
whey powder %					
%وانیل					
Vanille%					

درجه به مدت نیم ساعت قرار داده شد تا به وزن ثابت برسد (M_1). مقدار ۵ گرم از آزمون روی کاغذ صافی وزن (M) و داخل کارتوش قرار داده سپس داخل سوکسله قرار داده شد. در نهایت دستگاه سوکسله وصل و استخراج چربی بمدت ۳-۴ ساعت ادامه داده شد.

تهیه نمونه‌های کرم ارده رژیمی

اندازه‌گیری میزان چربی کرم ارده

اندازه‌گیری چربی طبق استاندارد AOAC, 2002 انجام گرفت. بالن ته‌گرد ۵۰۰ سی‌سی، به همراه چند دانه سنگ جوش در آون ۱۰۳

در ادامه بالن ته‌گرد حاوی چربی بعد از سپری شدن زمان استخراج داخل آون ۱۰۳ به مدت یک ساعت قرار داده شد تا به وزن ثابت برسد (M_2). میزان چربی ارده از معادله زیر بدست محاسبه می‌شود:

$$\text{درصد چربی} = \frac{\text{وزن بالن بعد از استخراج چربی} - \text{وزن بالن به همراه سنگ جوش و چربی}}{\text{نمونه (گرم)}} \times 100 \quad (۱)$$

اندازه‌گیری رطوبت کرم ارده

اندازه‌گیری رطوبت طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۶۲ انجام گرفت. ابتدا پلیت آلومینیومی به مدت نیم ساعت در آون ۱۰۳ قرار داده شد تا به وزن ثابت برسد. سپس پلیت از آون خارج و در دسیکاتور سرد شده و با ترازو با حساسیت ۰/۰۱ گرم وزن شد (M_0). مقدار ۵ گرم از حلو ارده یکنواخت شده و داخل پلیت وزن شد (M_1) سپس پلیت حاوی نمونه داخل آون ۱۰۳ به مدت ۲-۳ ساعت قرار داده شد تا به وزن ثابت برسد. در ادامه پلیت حاوی نمونه را از آون خارج و در دسیکاتور سرد شده و با ترازو با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شد (M_2). رطوبت کرم ارده از معادله زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100 \quad (۲)$$

M_0 - وزن پلیت پس از خشک کردن

M_1 - وزن پلیت حاوی نمونه قبل از خشک کردن

M_2 - وزن پلیت حاوی نمونه بعد از خشک کردن

اندازه‌گیری خاکستر کرم ارده

اندازه‌گیری خاکستر طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۷۰۶ انجام گرفت. ابتدا بوته چینی به مدت نیم ساعت در کوره ۵۵۰-۵۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا به وزن ثابت برسد بوته بعد از سرد شدن در دسیکاتور با ترازو با حساسیت ۰/۱ میلی‌گرم وزن شد (M_1). سپس مقدار ۵-۲ گرم آزمونه وزن شده (M) و داخل بوته چینی از قبل وزن شده ریخته شد. بوته حاوی نمونه روی شعله سوزانده شد تا خاکستر شود. بعد از خارج شدن کامل دود نمونه، بوته داخل کوره قرار داده شد تا رنگ خاکستر سفید یا خاکستری شود. بعد از کامل شدن خاکسترگیری، بوته را داخل دسیکاتور قرار داده شد تا خنک شود. سپس بوته با ترازوی با حساسیت ۰/۱ میلی‌گرم وزن شد (M_2).

خاکستر کرم ارده از معادله (۳) محاسبه می‌شود:

$$\text{درصد خاکستر} = \frac{\text{وزن بوته قبل از خاکسترگیری} - \text{وزن بوته بعد از خاکسترگیری}}{\text{گرم آزمونه برداشتی}} \times 100 \quad (۳)$$

اندازه‌گیری پروتئین کرم ارده

ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰٪ نمونه داخل بالن هضم کجدال ریخته شد. سپس حدود ۸ گرم کاتالیزور (شامل سولفات پتاسیم ۵۰۰

گرم -سولفات مس ۵۰ گرم اکسید سلینم ۱۰ گرم) به کاغذ اضافه شد. کاغذ صافی تا شده و داخل بالن کجدال ۵۰۰ قرار داده شد و ۲۵ سی‌سی اسید سولفوریک غلیظ به بالن اضافه شد. در ادامه بالن را روی هیتر قرار داده و سیستم هضم برقرار شد. در ابتدا دمای هیتر باید کم باشد و سپس تا حد ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد بمدت ۰/۵ ساعت برسد. پس از هضم نمونه و ظهور رنگ سبز یا آبی کاملاً شفاف نیم ساعت دیگر هضم را ادامه می‌دهیم و بعد هیتر را خاموش و بالن را از سیستم هضم خارج می‌کنیم تا کاملاً سرد شود. ۲۰۰ سی‌سی آب مقطر به نمونه اضافه می‌کنیم. چند عدد سنگ جوش و ۲ قرص پارافین و یک کاغذ PH داخل بالن انداخته شده و مجدداً بالن را روی هیتر گذاشته و سیستم تقطیر را سوار می‌کنیم. ۵۰ سی‌سی محلول اسید بوریک داخل ارلن ریخته و چند قطره معرف اضافه می‌کنیم و در سیستم تقطیر بعنوان ارلن جمع‌آوری قرار می‌دهیم. بعد از خروج هوا از سیستم تقطیر (با علامت خروج حباب از محلول اسید بوریک در ارلن جمع‌آوری) سود را از شیر مخصوص وارد نمونه می‌کنیم. زمانی‌که رنگ کاغذ PH آبی شد یا محلول به رنگ سبز لجنی در آمد عملیات افزودن سود را قطع کرده و حرارت دستگاه را بالاتر برده شد تا بجوشد. جمع‌آوری گاز را تا حجم ۲۰۰ سی‌سی ادامه داده و ارلن جمع‌آوری را پس از پایان کار خارج و با اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال تا ظهور رنگ نارنجی تیتیر می‌کنیم. آزمون شاهد را با همان مقدار ساکاروز خالص تکرار شد (Lima et al, 2000).

درصد خاکستر غیر محلول در اسید از رابطه (۴) بدست می‌آید:

$$\text{درصد پروتئین} = \frac{(V_1 - V_2)1/4008 \times 1 \times 5/7}{W} \times 100 \quad (۴)$$

V_1 - مقدار میلی‌لیتر اسیدکلریدریک مصرف شده برای نمونه

V_2 - میلی‌لیتر اسیدکلریدریک مصرف شده برای شاهد

W - مقدار نمونه بر مقدار حسب گرم

اندازه‌گیری میزان ساکارز کرم ارده پس از هیدرولیز

اندازه‌گیری ساکارز مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۵۵۳ انجام گرفت. ۲ گرم از نمونه را داخل بالن ۱۰۰ سی‌سی ریخته شده و با ۲۵ سی‌سی آب مقطر گرم حل کرده و مقدار ۲ سی‌سی از هر کدام از محلول‌های رسوب دهنده A و B به آن اضافه شد و سپس حجم محلول به ۱۰۰ رسانیده و صاف شد. ۲۵-۲۰ سی‌سی از محلول زیر صافی بالا داخل بالن سی‌سی ۱۰۰ ریخته و سپس ۲ سی‌سی HCl غلیظ به آن اضافه شد و در حمام بمدت ۳ دقیقه تکان داده ۷ دقیقه ثابت نگهداشته شد. بعد از سرد شدن تا دمای محیط آن را با سود ۳۲٪ و سود ۰/۱ نرمال خنثی کرده تا رنگ صورتی کم‌رنگ ظاهر

سود ۰/۰۱ نرمال در مجاورت فنل فتالین تا پیدایش رنگ صورتی کمرنگ و ثابت تیترا شد. محلول اتانول گرم خنثی شده را به ارلن حاوی نمونه اضافه شد و در حضور معرف فنل فتالین با سود ۰/۰۱ نرمال تا پیدایش رنگ صورتی کمرنگ تیترا شد (AOAC, 2002).

$$(9) \quad \text{اسید چرب های آزاد بر حسب اسید اولئیک در صد گرم نمونه} = \frac{V \times N \times 28/2}{W}$$

V-حجم سود مصرفی بر حسب میلی لیتر

N-نرمالیه محلول سود مصرفی

W- وزن چربی بر حسب گرم

آزمون‌های میکروبی کرم ارده

آزمون کشت آنتروباکتریاسه

کشت آنتروباکتریاسه طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۳۳۹۵ انجام گرفت. ابتدا محیط کشت VRBD طبق دستورالعمل درج شده بر روی ظرف تهیه گردید. سپس مقدار ۵ گرم از آزمون به ۴۵ میلی‌لیتر محلول رینگر اضافه و به مدت ۵-۱۰ دقیقه تکان داده شد تا کاملاً حل گردد. بعد از حل مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه داخل پلیت استریل ریخته شده و محیط کشت را تا دو سوم پلیت ریخته شده و پلیت به صورت هشت انگلیسی یا علامت بی نهایت حرکت داده شد. به مدت چند دقیقه اجازه داده شد تا محیط کشت ببندد. سپس در انکوباتور معلولی در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار داده شد و در انتها بعد از کشت از نظر تشکیل کلنی شمارش صورت گرفت.

آزمون کشت کپک و مخمر

کشت کپک و مخمر طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۳۳۹۵ انجام گرفت. با استفاده از پی‌پت سترون مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از آزمایش (فرآورده‌های مایع) یا ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) را به یک پلیت حاوی محیط کشت DG18 انتقال داده و با استفاده از یک پی‌پت سترون دیگر ۰/۱ میلی‌لیتر از اولین رقت اعشاری ۱-۱۰ (فرآورده‌های مایع) یا ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت ۲-۱۰ (سایر فرآورده‌ها) را به یک پلیت حاوی محیط کشت DG18 انتقال داده شد. برای سهولت در شمارش تعداد کم کپک‌ها و مخمرها، می‌توان مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر از آزمایش (فرآورده‌های مایع) یا رقت اولیه (سایر فرآورده‌ها) را به سه پلیت مجزا هر کدام به مقدار تقریبی ۰/۱ میلی‌لیتر انتقال داد به کمک پخش کننده سترون مایعات تلقیحی را روی سطوح محیط کشت پخش کرده تا همه مایعات به طور کامل جذب شوند. پلیت‌های کشت داده شده را به طور هوازی، با درپوش بالا و ایستاده در انکوباتور ۲۵ درجه به مدت ۵ روز گرمخانه‌گذاری شد. در صورت لزوم می‌توان پلیت‌ها را برای مدت ۱ تا ۲ روز در

شود و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ رسانیده شد. از این محلول به عنوان تیترا برای تیترا محلول‌های فله‌ینگ استفاده شد. میزان قند بعد از هیدرولیز از رابطه (۵) محاسبه می‌شود:

$$(5) \quad Y = \frac{A \times 100 \times 100}{25 \times M \times 1000} \times 100$$

میلی لیترهای تیتراسیون

Y- مقدار قند پس از هیدرولیز

M= وزن نمونه مورد آزمون

A= عیار فله‌ینگ

اندازه‌گیری قند قبل از هیدرولیز

محلول صاف شده از آزمایش به بورت ۲۵ میلی‌لیتری منتقل و مقدار ۵ میلی‌لیتر فله‌ینگ A و مقدار ۵ میلی‌لیتر فله‌ینگ B را در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری به آن اضافه شده و عمل تیتراسیون را تا ظهور رنگ قرمز آجری ادامه داده شد. مقدار قند پیش از هیدرولیز با استفاده از رابطه (۶) محاسبه می‌شود:

$$(6) \quad Y = \frac{A \times 100 \times 100}{25 \times M \times 1000} \times 100$$

میلی لیترهای تیتراسیون

X- مقدار قند پیش از هیدرولیز

M- وزن نمونه مورد آزمون

A- عیار فله‌ینگ

روش محاسبه میزان ساکارز:

$$(7) \quad \text{مقدار ساکارز} = (X - Y) \times 0.95$$

اندازه‌گیری میزان پراکسید کرم ارده

اندازه‌گیری میزان پراکسید طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۴۱۷۹ صورت گرفت. بدین منظور ۵-۴ گرم از چربی استخراجی نمونه مورد آزمون داخل ارلن مایر ۲۵۰ سی‌سی وزن شده سپس ۲۰-۳۰ میلی‌لیتر مخلوط اسیداستیک و کلروفرم و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول KI اشباع به آن اضافه شده و به مدت یک دقیقه در تاریکی گذاشته شد. و در ادامه ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و در حضور چند قطره معرف چسب نشاسته محلول با تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تیترا شد تا رنگ آبی از بین برود.

$$(8) \quad \text{عدد پراکسید بر حسب میلی اکی والان} = \frac{V \times N \times 100}{M} \times 100$$

V- مقدار میلی لیتر هیپوسولفیت یا هیپوسولفات سدیم

N- نرمالیه هیپوسولفیت یا هیپوسولفات سدیم

M- وزن چربی بر حسب گرم

اندازه‌گیری میزان اسیدیته کرم ارده

۲-۳ گرم از چربی استخراجی نمونه مورد آزمون داخل ارلن مایر ۲۵۰ سی‌سی وزن شده و ۳۰ میلی‌لیتر اتانول اضافه شده و با محلول

آزمون مورد استفاده در این ارزیابی، امتیازبندی بر اساس روش هدونیک به صورت پنج نقطه‌ای بود که در نهایت به منظور امکان بررسی آماری، نتایج ارزیابی به صورت عدد بیان شد (Lee et al, 2008).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات حداقل در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام می‌شود. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۸) و روش تجزیه واریانس یک طرفه (one way ANOVA) استفاده می‌شود که در صورت معنی‌دار بودن تفاوت مابین میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده می‌شود. جهت رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار EXCEL نسخه ۲۰۱۳ تحت ویندوز استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج آزمون میزان چربی ارده

شکل ۱ نتایج آزمون اندازه‌گیری چربی ارده را نشان می‌دهد. میزان چربی در نمونه ۴ با فرمول ۰/۰٪ ساکارز، ۲۲٪ اریتریتول، ۰/۰۳٪ ریبادیوساید a بیشترین میزان افزایش چربی را نشان می‌دهد (به دلیل استفاده از ارده زیاد) که بخودی خود می‌تواند دلیل محکمی برای صرف نظر کردن از این فرمول باشد. میزان چربی اندازه‌گیری شده نمونه‌ها نسبت به نمونه شاهد دارای روند افزایشی می‌باشد نمونه ۲ بدلیل داشتن کمترین میزان ارده در فرمولاسیون خود کمترین چربی را بخود اختصاص داده است. افزایش جایگزینی ساکارز باعث افزایش درصد ارده مصرفی می‌شود و همین امر میزان چربی و رطوبت را در نمونه‌ها افزایش می‌دهد. عبارتی در فرمولاسیون حاوی جایگزین‌های چربی حجم نمونه کمتری برای شیرین‌کنندگی لازم است بنابراین مقدار چربی در کل محصول افزایش می‌یابد در حالی که ساکارز اثر رقیق‌کنندگی بر روی چربی می‌گذارد (Parvane, 1995).

نتایج میزان رطوبت کرم اره

نتایج آزمون رطوبت کرم ارده در **شکل ۲** نشان می‌دهد، با کاهش میزان ساکارز، رطوبت نمونه‌ها افزایش معنی‌داری یافت. میانگین رطوبت نمونه‌ها با یکدیگر بجز نمونه‌های ۲ و ۵ اختلاف معناداری داشت و میانگین رطوبت نمونه‌ها با نمونه شاهد نیز اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P < 0.05$). همچنین میزان رطوبت در نمونه ۲ با میزان ساکارز ۲۵٪، ایزومالت ۶/۲۵٪ و نمونه ۵ با ساکارز ۰/۰٪ اریتریتول ۲۴٪ یکسان می‌باشد.

معرض نور غیر مستقیم روز قرار داد. پلیت‌های دارای کمتر از ۱۵۰ کلنی، پروپاگول یا جوانه را انتخاب و همه شمارش شدند. در صورت لزوم برای تمایز بین سلول‌های مخمر و یا کپک و باکتری‌ها، کلنی‌ها را با میکروسکوپ یا ذره بین می‌توان بررسی کرد و نیز تعداد کلنی‌های مخمرها، پروپاگول‌ها یا جوانه‌های کپک‌ها جداگانه شمارش شد.

آزمون بافت کرم ارده

ارزیابی بافت طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۵۵۴ انجام گرفت. ارزیابی ویژگی‌های بافت توسط دستگاه بافت‌سنج Stable Micro System مدل TA-XT Plus ساخت کشور انگلستان به روش آزمون آنالیز پروفایل بافتی انجام شد. جهت اندازه‌گیری ویژگی‌های بافتی کرم ارده میزان بارگذاری دستگاه بر روی (Load Sel) ۵ کیلوگرم انجام شد. پروب مورد استفاده در این آزمون از نوع هرمی با قطر ۴۵ میلی‌متر در ثانیه و عمق نفوذ آن ۵۰ میلی‌متر انتخاب شد. سپس نمونه در دو سیکل رفت و برگشت توسط پروب هرمی شکل فشرده و سپس فشارزدایی شد. اندازه‌گیری در سه تکرار انجام و ویژگی‌های بافتی نظیر سختی^۱ انسجام و چسبندگی در قالب منحنی نیرو-زمان توسط دستگاه اندازه‌گیری و رسم شد.

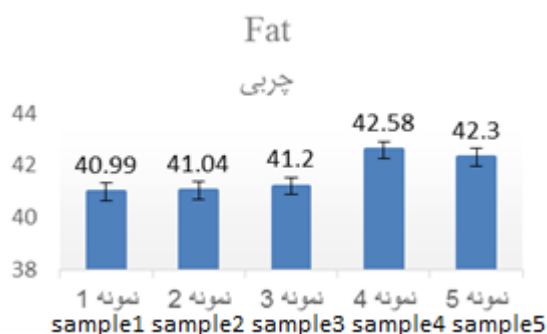
آزمون پایداری کرم ارده

برای اندازه‌گیری پایداری نمونه‌های کرم ارده ۲۵ گرم نمونه در لوله سانتریفوژ توزین و به مدت ۱۰ دقیقه با دور (۳۰۰۰) سانتریفوژ می‌شود. سپس نمونه‌های سانتریفوژ شده به مدت ۴۸ ساعت در آون ۵۰ درجه قرار داده می‌شود و پس از این مرحله روغن جدا شده از کرم ارده دور ریخته می‌شود (AOAC, 2002). در نهایت پایداری کرم ارده بر حسب درصد و با استفاده از معادله زیر تعیین می‌شود:

$$(10) \quad \text{وزن رسوب در سانتریفوژ} \times 100 = \frac{\text{وزن اولیه نمونه}}{\text{پایداری امولسیون}}$$

ارزیابی حسی

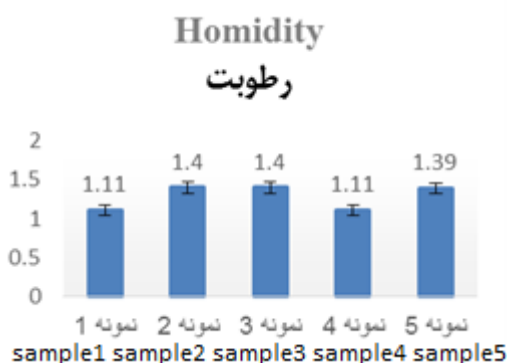
در ارزیابی حسی نمونه‌های کرم ارده از گروه ارزیابی ۵ نفره استفاده شد، افراد گروه دانشجویان صنایع غذایی بودند که با اصول ارزیابی حسی مواد غذایی آشنایی نسبی داشتند. برای ارزیابی نمونه‌های کرم ارده، به هر یک از آزمون‌کنندگان نمونه‌های کرم ارده (حدود ۱۵ گرم) در ظروف پلاستیکی کوچک داده شد و از آنها خواسته شد که خصوصیات مختلف نمونه‌ها مانند طعم و مزه، قوام و بافت، بو، رنگ و پذیرش کلی محصول را مورد ارزیابی قرار دهند.



شکل ۱- میزان چربی نمونه‌های کرم ارده
Fig. 1- The amount fat in the samples of sesame cream

ایزومالت، نشان داده است با افزایش جایگزینی ساکارز محتوی رطوبتی نمونه‌ها بطور معنی‌داری افزایش یافته است ($P < 0.05$). همچنین با جایگزینی بیشتر ساکارز عدد پراکسید نمونه‌ها نسبت به نمونه شاهد بطور معنی‌داری کاهش یافت (Jali et al., 2013).

علت اختلاف معنی‌دار نمونه دوم نسبت به نمونه شاهد را می‌توان حضور قند الکلی ایزومالت در فرمولاسیون کرم ارده نسبت داد. زیرا قندهای الکلی به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل تمایل به نگه داشتن آب در ساختمان خود را دارند نتایج تحقیق جلی و همکاران (Jali et al., 2013) در زمینه جایگزینی ساکارز با سوکرالوز و



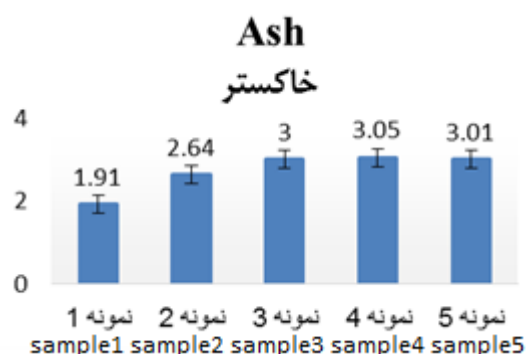
شکل ۲- میزان رطوبت در نمونه‌های کرم ارده
Fig. 2- The amount of humidity in the samples of sesame cream

پروتئین کرم ارده

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود میزان پروتئین در نمونه‌ها افزایش چشمگیری داشته است. بیشترین میزان پروتئین مربوط به نمونه ۵ می‌باشد که دلیل این امر استفاده از آرد سویا (برای افزایش قوام) در فرمولاسیون نمونه ۵ است. در زمینه مقایسه میزان پروتئین در محصولات مختلف طی جایگزینی ساکارز با ایزومالت، اریتریتول و ربودپوزید مطالعات زیادی انجام نگرفته است. این شیرین‌کننده‌ها بطور مستقیم با پروتئین واکنش نمی‌دهند بلکه می‌تواند به دلیل ایجاد شبکه و نگهداری آب در داخل آن افزایش حجم بیشتر بوده و بر روی پروتئین تاثیر منفی گذاشته است (Ahmadi et al., 2010).

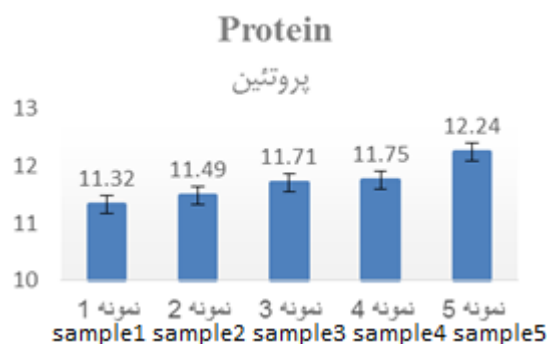
خاکستر کرم ارده

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود که با کاهش میزان ساکارز میزان خاکستر کرم ارده افزایش معنی‌داری داشت همچنین میزان خاکستر کرم ارده در نمونه شاهد در مقایسه با میانگین نمونه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری رو نشان می‌دهد. افزایش درصد ارده باعث افزایش خاکستر در نمونه‌های ۲ تا ۵ می‌شود. (Watankhah et al., 2014).



شکل ۳- میزان خاکستر در نمونه‌های کرم ارده

Fig. 3- The amount of ash in sesame cream samples



شکل ۴- میزان پروتئین در نمونه‌های کرم ارده

Fig. 4- The amount of protein in sesame cream samples

جدول ۲- ویژگی‌های بافت نمونه‌های کرم ارده

Table 2- Texture characteristics of sesame cream samples

Sample	Taste	maximum negative force (negative peak) حداکثر نیروی منفی (پیک منفی)	maximum positive force (hardness) حداکثر نیرو مثبت (سختی)
نمونه شاهد	طعم و مزه		
Control sample	1071.56	-1422.6	1308.1
نمونه ۲	850.03	-2092	1369
Sample2			
نمونه ۳	01.751	-4913	1236
Sample3			
نمونه ۴	4186.01	-5060	6612.7
Sample4			
نمونه ۵	2588.91	-4221	3940
Sample2			

ویژگی‌های بافتی کرم ارده

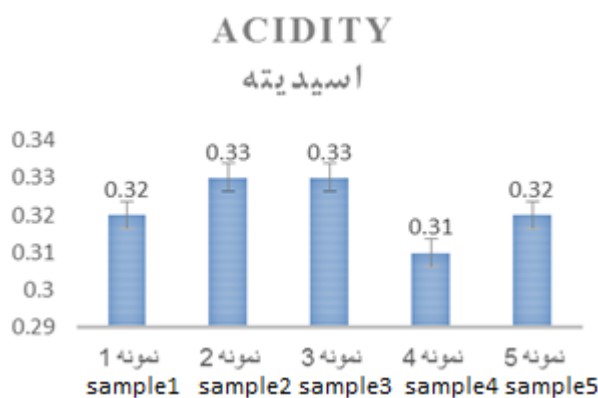
همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود ویژگی بافت نمونه ۲ از نظر سختی و حداکثر نیروی لازم برای بلع با ترکیب شیمیایی ۲۵٪ ساکارز، ۶/۲۵٪ ایزومالت و ۰/۰۳٪ بافتی نزدیکتر به بافت نمونه

شاهد را دارا می‌باشد. که دلیل این امر استفاده از ساکارز و ایزومالت در ترکیب این نمونه می‌باشد. سپس نمونه ۵ که با ترکیب شیمیایی ۲۴٪ اریتریتول و حاوی آرد سویا (برای سفتی بافت) و درصد ارده بیشتر می‌باشد بافتی نزدیک به بافت نمونه شاهد و سپس نمونه ۴ که با

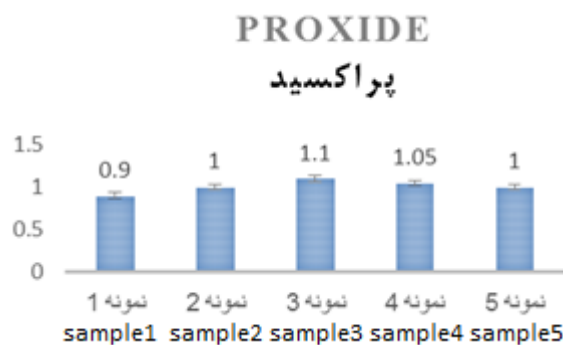
ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی (پراکسید و اسیدیت)

به لحاظ اسیدیت نمونه‌های کرم ارده، تفاوت معنی‌داری بین فرمولاسیون نمونه‌های کرم ارده تهیه شده مشاهده شد. همانطور که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود کمترین اسیدیت مربوط به نمونه ۴ با فرمول ساکارز ۰٪، اریترتول ۲۲٪ و ریبادیوساید ۳٪ می‌باشد. همچنین میزان اسیدیت نمونه شاهد و نمونه ۵ با فرمول ساکارز ۰٪، اریترتول ۲۴٪ و ریبادیوساید ۳٪ یکسان می‌باشد. همچنین جایگزینی ساکارز از روند ثابت افزایشی یا کاهشی پیروی نمی‌کند در نمونه‌های ۲ و ۳ این روند نسبت به نمونه شاهد افزایشی و در نمونه ۴ بدون تغییر و در نمونه ۵ بدون تغییر باقی ماند. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج باقری و همکاران (Baqeri et al., 2013) در سال در راستای جایگزینی استوزید با شکر در تهیه خامه صبحانه شیرین مطابقت داشت چنانچه که نمونه حاوی استویا اسیدیت بالاتری داشت (Baqeri, 2010).

ترکیب شیمیایی ۲۲٪ اریتریتول و بدون آرد سویا و درصد ارده بیشتر می‌باشد. نمونه ۳ نیز که با ترکیب شیمیایی ۳۰٪ اریتریتول بدون آرد سویا و درصد ارده کمتر به دستگاه بافت‌سنج جواب نداده است. با افزایش میزان جایگزینی جذب آب افزایش و سختی بافت کاهش می‌یابد. احتمالاً با جایگزینی ساکارز با ریبادیوزید، اریتریتول و ایزومالت ویسکوزیته ایجاد شده کمتر از نمونه شاهد باشد. به همین دلیل سلول‌های هوایی ایجاد شده در بافت به یکدیگر متصل شده و موجب افزایش قطر و سطح حفرات شده است. وطن خواه و همکاران (Vatankhah et al., 2014) امکان تولید بیسکویت رژیمی با استفاده از شیرین‌کننده استویوزید را بررسی کرده و گزارش نمودند که با افزایش سطح جایگزینی شکر با استویوزید سختی بافت بیسکویت بصورت معنی‌داری کاهش یافت به طوری که نمونه تهیه شده با فرمولاسیون ۱۰۰٪ استویوزید کمترین میزان سفتی را از خود نشان داد (Jali et al., 2013).



شکل ۵- اسیدیت نمونه‌های کرم ارده
Fig. 5- Acidity of sesame cream samples



شکل ۶- میزان پراکسید نمونه‌های کرم ارده
Fig. 6- Peroxide level of sesame cream samples

ارزیابی حسی

نتایج ارزیابی حسی به روش هدونیک در (جدول ۳) نشان داده شده است. میانگین نتایج ارزیابی حسی نشان می‌دهد از نظر ارزیابان بیشترین امتیاز از نظر پذیرش کلی، عطر و طعم، بو، بافت و رنگ مربوط به نمونه ۲ بود و در بقیه نمونه‌ها در مقایسه با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مهمترین دلیل کاهش مطلوبیت کلی را می‌توان به عدم تنظیم شیرینی محصول نسبت داد. دهخدا و

همکاران (Dehkhoda and Movahed, 2015) در مطالعه‌ای اثر ایزومالت و مالتیتول بر خصوصیات کیفی و حسی کیک اسفنجی را مورد مطالعه قرار دادند نتایج نشان داد نمونه حاوی ۷۵ درصد مالتیتول، ۲۵ درصد ساکارز در مجموع روزه‌های ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ نگهداری بیشترین امتیاز و نمونه حاوی ۱۰۰ درصد ایزومالت کمترین امتیاز را بدست آورد و اختلاف آن از نظر آماری با نمونه حاوی ۷۵ درصد مالتیتول و ۲۵ درصد ساکارز معنی‌دار بود.

جدول ۳- نتایج ارزیابی حسی نمونه‌های کرم ارده

Table 3- Sensory evaluation results of sesame cream samples

Sensory and physical characteristics	Test	Color	smell	Consistency and texture	General acceptance
ویژگی‌های حسی و فیزیکی	طعم و مزه	رنگ	بو	قوام و بافت	پذیرش کلی
نمونه ۱ Sample 1	7	7	7	7	7
نمونه ۲ Sample 2	7	7	7	7	7
نمونه ۳ Sample 3	4	4	4	4	4
نمونه ۴ Sample 4	5	5	5	5	5
نمونه ۵ Sample 5	5	5	5	5	5

آزمون میکروبی و کپکی

تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که تمام عوامل مورد بررسی بر شمارش کلی نمونه‌ها بی‌تاثیر می‌باشد و همچنین هیچ کدام از اجزای فرمولاسیون اثر معنی‌داری بر شمارش کلی کپک‌ها نداشتند. از آنجا که کپک‌ها برای رشد خود اکسژن نیاز دارند و از طرفی اکسیژن موجود در ظروف حاوی نمونه‌ها نیز محدود است، لذا رشد محدودی داشته و عوامل مختلف تاثیر معنی‌داری بر تعداد آن‌ها نداشتند. دمای مناسب برای رشد اکثر میکروارگانیسم‌ها دمای محیط می‌باشد. همه

نمونه‌ها از نظر میکروبی و کپکی مشابه نمونه شاهد و در محدوده استاندارد می‌باشند. باتوجه به اجزای فرمولاسیون نظیر ارده و ساکارز و قندهای الکلی و خاصیت جاذبه‌الرطوبه بودن آنها، میزان آب قابل دسترس برای میکروارگانیسم‌ها از جمله کپک‌ها کاهش می‌یابد. باتوجه به اینکه باکتری‌های بیمارزا در $aw \ 0/9$ و کپک‌ها در $aw \ 0/6$ قادر به رشد می‌باشند به نظر می‌رسد فرمولاسیون محصول باعث می‌شود میزان aw به کمتر از $0/6$ رسیده است.

جدول ۴- نتایج آزمون میکروبی و کپکی کرم ارده (استاندارد شماره ۹۹۷)(۲۶)

Table 4- Microbial and mold test results of sesame cream (Standard No. 997)(26)

Microbial characteristics	<i>Escherichia coli</i>	Limit	Mold and yeast	Limit	Enterobacteriaceae	Limit
ویژگی‌های میکروبی	اشریشیا کلی	حدمجاز	کپک و مخمر	حدمجاز	آنتروباکتریاسه	حدمجاز
نمونه شاهد Control sample	منفی Negative	منفی Negative	>100	حداکثر ۱۰۰ Max 100	>10	حداکثر ۱۰۰ Max 100
نمونه ۲ Sample 2	منفی Negative	منفی Negative	>100	حداکثر ۱۰۰ Max 100	>10	حداکثر ۱۰۰ Max 100
نمونه ۳ Sample 3	منفی Negative	منفی Negative	>100	حداکثر ۱۰۰ Max 100	30	حداکثر ۱۰۰ Max 100
نمونه ۴ Sample 4	منفی Negative	منفی Negative	>100	حداکثر ۱۰۰ Max 100	>10	حداکثر ۱۰۰ Max 100
نمونه ۵ Sample 5	منفی Negative	منفی Negative	>100	حداکثر ۱۰۰ Max 100	20	حداکثر ۱۰۰ Max 100

نتیجه‌گیری

باتوجه به پایین بودن میزان کالری و جذب آهسته پلی‌ال‌ها از این ترکیبات می‌توان به عنوان جایگزین ساکارز استفاده کرد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد استفاده از ایزومالت، ریبادیوزید a، اریتریتول بعنوان جایگزین‌های ساکارز در بهبود برخی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی کرم ارده موثر بوده بطوری‌که با کاهش ساکارز میزان رطوبت افزایش و میزان سفتی کاهش پیدا نمود. همچنین با کاهش ساکارز میزان پروتئین کرم ارده افزایش یافت. جایگزینی کامل ساکارز منجر به افت ویژگی‌های مانند چربی کرم ارده، پایداری و خاکستر شد. در مجموع

نمونه حاوی ۲۵ درصد ساکارز، ۶/۲۵ درصد ایزومالت و ۰/۰۳ درصد ریبادیوزید به عنوان بهترین نمونه از ارزیابی حسی انتخاب گردید که در ویژگی‌هایی مانند عطر و طعم و بافت و خواص حسی مشابه نمونه کنترل بود. نتایج حاصل از بررسی خواص میکروبی میکروبی کرم ارده نیز نشان داد که جایگزین‌های چربی تأثیری بر خواص میکروبی کرم ارده ندارند. اما تحقیقات بیشتری برای دستیابی به غلظت بهینه و ترکیبی با سایر جایگزین‌ها می‌تواند صورت گیرد تا محصولی کم کالری و ایمنی تغذیه‌ای بالا تولید شود.

منابع

- Ahmadi, H.A., Jahanian, M.H., & Amirkaveei, SH. (2010). Evaluation of replacemet of date liquid sugar as areplacement for inver tsyrup in a layer cake. *Iranian Journal of Food Science* 14: 11-18.
- AOAC International. (2002). Official Method of Analysis from Official Analytical Chemists.
- Baqeri Farod, R.M. (2012). Preparing cream using a type of dietary sweeteners. *Civilca* 82: 101-105.
- Dehkhoda, M., Khodaiyan, F., & Movahed, S. (2015). Effect of isomalt and maltitol on quality and sensory properties of sponge cake. *Iranian Journal of Biosystems Engineering* 46(2): 147-155.
- Gasmalla, M.A.A., Yang, R., & Hua, X. (2014). Stevia rebaudiana Bertoni: an alternative sugar replacer and its application in food industry. *Food Engineering Reviews* 6: 150-162.
- Hamzehlouei, M., Mirzaei, H.A., & Ghorbani, M.O.H.A.M.M.A.D. (2009). Evaluation effects of evaluation of sugar replacement by glycosidic sweeteners of Stevia on the peroxide index in biscuit. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 16(1-A). (In Persian)
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Method of measuring grain fat and its products specifications. ISIRI no 2862. 1rd revision, Karaj: ISIRI; 2014. (In Persian)
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Cereals, pulses and by products -Determination of ash yeild by incineration . SIRI no 2706. 1rd revision, Tehran: ISIRI; 2008. (In Persian)
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Koluche- Specifications and test methods . SIRI no 2554. 1rd revision, Karaj: ISIRI; 2001. (In Persian)
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Animal and vegetable fats and oils .SIRI no 4179. 2rd revision, Tehran: ISIRI; 2017. (In Persian)
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Microbiology of pastry and confectionery products- specifications and test methods .SIRI no 2395. 2rd revision, Tehran: ISIRI; 2018. (In Persian)
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -.SIRI no 10899. 1rd revision, Tehran: ISIRI; 2008. (In Persian)
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Method of searching and counting mold and yeast. -.SIRI no997.1.rd revision, tehran: ISIRI;1991. (In Persian)
- Jali, A., Keramat, J., Hojjatolslami, M., & Jahadi, M. (2013). Investigation of the effect of sucrose replacement by a mixture of sucralose and isomalt on the physicochemical properties of roller biscuits, *Journal of New Food Technologies* 1(1): 64-49. (In Persian)
- Keramat, J. (2008). Fundamentals of food chemistry. *Isfahan University of Technology* 404-405. (In Persian)
- Kant, R. (2005). Sweet proteins-potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutrition Journal* 4(1): 1-6. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-4-5>.
- Lee, C.C., Wang, H.F., & Lin, S.D. (2008). Effect of isomaltooligosaccharide syrup on quality characteristics of sponge cake. *Cereal Chemistry* 85(4): 515-521. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-4-0515>.
- Lima, I.M., Guraya, H.S., & Champagne, E.T. (2000). Improved peanut flour for a reduced-fat peanut butter product. *Journal of Food Science* 65(5): 854-861. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb13600.x>
- Movahed, S. (2011). *Science Nan*, Marz Danesh Publications p. 192. (In Persian)
- Mitchel, H.(2006). *Swetenrs and sugar alternatives in food technology*. Blackwell Publishing Ltd. PP. 177-204.
- Pometta, D., Trabichet, C., & Spengler, M. (1985). Effects of a 12-week administration of Isomalt (Palatinit®) on metabolic control in type-II-diabetics. *Aktuelle Ernährungsmedizin* 10(4): 174-177.

22. Parvane, V. (1995). *Quality control and chemical testes*. No. 1481, University of Tehran.
23. Sardesai, V.M., & Waldshan, T.H. (1991). Natural and synthetic intense sweeteners. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2(5): 236-244. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(91\)90081-F](https://doi.org/10.1016/0955-2863(91)90081-F).
24. Watankhah, M., Elhamirad, Al-F., Yaghbani, M., Nadian, N., & Akbarian Meymand, M.J. (2014). Investigating the possibility of producing diet biscuits, using stevioside sweetener, *Journal of Research and Innovation in Food Science and Industry* 3(2): 170-157. (In Persian)
25. Weihrauch, M.R., Diehl, V., & Bohlen, H. (2002). Artifcl swetenrs- are they potentially carcinogenic? *Med kiln (munich)* 96: 670-675.3.
26. Yang, Q. (2010). Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 83(2): 101.



Evaluation of Prickly Pear's Pulp Powder (*Opuntia stricta*) on Physicochemical Properties of Raw and Cooked Analogue Burgers

P. Shahiri-Tabrestani¹, M. Kashiri^{2*}, Y. Maghsoudlou³, H. Shahiri-Tabarestani⁴, M. Ghorbani⁵

Received: 2021.06.29

Revised: 2021.08.31

Accepted: 2022.04.20

Available Online: 2022.04.20

How to cite this article:

Shahiri-Tabrestani, P., Kashiri, M., Maghsoudlou, Y., Shahiri-Tabarestani, H., & Ghorban, M. (2023). Evaluation of prickly pear's pulp powder (*Opuntia stricta*) on physicochemical properties of raw and cooked analogue burgers. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 31-41. (In Persian with English abstract). <http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.71095.1066>

Introduction

There has been an increasing demand for functional analog meat products due to environmental, human health, and animal welfare concerns. Burger analogs are plant-based products that are designed to mimic the taste, texture, and appearance of meat burgers. They are typically made from a combination of plant-based ingredients such as textured vegetable protein, legumes, grains, and vegetables. The goal of burger analogs is to provide a meat-like experience without using animal-based products. These formulations aim to provide a healthier and sustainable alternative to conventional meat products. The organoleptic properties of burger analogs, including texture, taste, and aroma, are crucial for their acceptance by consumers.

Prickly pear (*Opuntia stricta*) is a fruit from the Cactaceae family that contains various beneficial components, including natural pigments, proteins, fibers, and polysaccharides. Pectic polysaccharides and arabinogalactans are two types of polysaccharides found in prickly pear that have thickening properties and can improve the texture of food products. Moreover, Prickly pear is a nutritious and functional fruit that can provide various benefits when incorporated into the diet or used as an ingredient in food products. To date, no health benefit analog burgers incorporating *Opuntia* fruit have been developed. This study investigated the effects of adding Prickly pear pulp powder at levels of 0.5-2.5% on the physicochemical, sensory, and textural properties of analog burgers.

Materials and Methods

Analog burgers were formulated according to Iranian national standards using common ingredients (texturized soy protein, water, canola oil, garlic, dehydrated onion, soy sauce, and guar gum) as a control sample. Mature prickly pear fruits (*Opuntia stricta*) were collected from west of Mazandaran province in February. The fruits were washed, peeled, and dried in a forced oven dryer at a temperature of 45 °C. The dried samples were then ground into a powder and stored at 4 °C until further physico-chemical parameters of the including moisture, pH, ash, protein, lipid, color and total phenolic content. For developing new formulation of analog burgers, the roasted flour was substituted with prickly pear pulp powder at 0.5%, 1.5%, and 2.5% of the base recipe. The average moisture, ash, fat, carbohydrate content, pH, holding capacity, and color of each raw packed burger were measured. The hardness, springiness, cohesiveness, and chewiness of cooked analog burgers were evaluated using a texturometer instrument. Sensory analysis was performed by 10 panelists who judged discrimination scales of color, odor, taste, and texture characteristics. Analysis and sample treatments were repeated at least three times. Statistical analysis was performed using SPSS (version 19.0), and data were expressed as means ± standard deviation (SD).

Results and Discussion

1, 2, 3 and 4- M.Sc Student, Associate Professor, Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.

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

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2022.71095.1066](https://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.71095.1066)

The lowest and highest cooking losses were observed in analog burgers with 2.5% pulp powder ($21.03 \pm 0.47\%$) and the control ($22.2 \pm 0.63\%$), respectively. However, moisture retention and juiciness did not show significant differences ($p > 0.05$) between analog burgers with prickly pear pulp powder and the control. The results indicated that increasing prickly pear pulp powder levels significantly decreased the redness ($+a^*$) parameter and yellowness ($+b^*$) of raw analog burgers. Moreover, a reduction in cooking loss and shrinkage were observed for cooked soy burger samples using prickly pear pulp powder. However, cooked analog burgers with added prickly pear pulp powder showed significantly higher juiciness. The elasticity of the produced analog burgers significantly decreased with an increasing percentage of pulp powder ($p < 0.05$).

Conclusion

The incorporation of prickly pear pulp powder in analog burger formulation resulted in a significant decrease in cooking loss and shrinkage of the cooked burgers, while not significantly affecting moisture retention and juiciness. An increase in prickly pear pulp powder levels in analog burger formulation led to a significant decrease in the redness and yellowness of the raw analog burgers, as well as a decrease in their elasticity. Based on the sensory evaluation and consumers' overall tendency to consume burgers, it is recommended to use 1.5% prickly pear pulp powder in analog burger formulation.

Keywords: Meat analog products, Meat alternatives, Plant-based burger, Prickly pear

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر پودر پالپ گلابی خاردار (*Opuntia stricta*) بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی برگرهای آنالوگ خام و پخته تولیدی

پریسا شهیری طبرستانی^۱ - محبوبه کشیری^{۲*} - یحیی مقصودلو^۳ - هدی شهیری طبرستانی^۴ - محمد قربانی^۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱

چکیده

تقاضای محصولات گوشتی آنالوگ سلامت بخش با قابلیت ایجاد ظاهر، بافت، عطر، طعم و احساس دهان مشابه گوشت با توجه به نگرانی‌های زیست‌محیطی و مسائل مربوط به حقوق حیوانات با افزایش چشمگیری همراه بوده است. هدف از پژوهش حاضر استفاده از پودر پالپ گلابی خاردار (۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ درصد) در تولید برگر گیاهی بر پایه پروتئین آنالوگ و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و حسی محصولات خام و پخته بود. نتایج نشان داد با افزایش درصد پودر پالپ گلابی خاردار ظرفیت نگهداری آب برگرهای خام آنالوگ افزایش یافت. همچنین شاخص‌های قرمزی و زردی برگر خام تولیدی با افزایش درصد پودر پالپ گلابی خاردار به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری یافت. کم‌ترین و بیش‌ترین افت پخت به ترتیب مربوط به برگر آنالوگ دارای ۲/۵ درصد پودر پالپ و برگر شاهد بود. قابلیت ارتجاع برگرهای آنالوگی پخته تولیدی با افزایش درصد پودر پالپ به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0/05$). با افزایش درصد پودر پالپ، تغییرات معنی‌داری در درصد آبداری و چروکیدگی برگر پخته شده مشاهده شد. با توجه به بررسی‌های تکنولوژیکی، ارزیابی حسی و تمایل مصرف‌کننده، افزودن ۱/۵ درصد پودر پالپ گلابی خاردار در تولید برگر آنالوگ توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: برگر آنالوگ، برگر گیاهی، پالپ گلابی خاردار، جایگزین گوشت

مقدمه

محدودیت‌های مذهبی، مسائل مربوط به حقوق حیوانات و دلایل اقتصادی کاهش یافته است (Ledesma et al., 2015, Summo et al., 2015; Beth Small, 2007). در این بین یکی از راه‌های پیشنهادی در پاسخ به نگرانی مصرف‌کننده‌ها جهت تولید محصولات سلامت‌بخش، جایگزینی گوشت با پروتئین‌های گیاهی است (Asgar 2010). در همین راستا محصولات گوشتی آنالوگ^۵ به محصولاتی اطلاق می‌گردد که از لحاظ ظاهری و خواص ارگانولپیتیکی و ویژگی‌های شیمیایی برگرفته و تقلیدی از محصولات گوشتی متداول می‌باشد (Bohrer, 2019). بر اساس گزارش بازار، تقاضا برای محصولات گوشتی آنالوگ رشد ۷/۹ درصدی بین سال ۲۰۱۹ الی ۲۰۲۴ خواهد داشت. در برآوردی اقتصادی، سود صنعت محصولات گوشتی آنالوگ تا سال ۲۰۲۵ بیش از ۲۱/۲۳ بیلیون دلار

گوشت و فرآورده‌های گوشتی به علت داشتن اسیدهای آمینه ضروری و ویتامین‌های خانواده B، املاح و سایر ترکیبات مغذی بسیار مورد توجه هستند. از طرفی تمایل به مصرف گوشت و فرآورده‌های گوشتی به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب اشباع فراوان و کلسترول و نقش آن در بروز بیماری‌های قلبی - عروقی و نگرانی در خصوص جنون گاوی، کمبود جهانی پروتئین‌های حیوانی و تقاضای فراوان برای غذاهای سالم‌تر (بدون کلسترول و چربی اشباع کم)،

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، استادیار و استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

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

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.71095.1066

نوشیدنی تخمیری با استفاده از باکتری *Lactobacillus fermentum* (Panda et al., 2017) و سوسیس سالامی (Kharat et al., 2018) گزارش شده است.

بسیاری از مصرف‌کنندگان انتظار دارند که محصولات گوشتی آنالوگ دارای ویژگی‌های مشابه محصولات رایج گوشتی از نظر ظاهر، رنگ، بافت، طعم و حس دهانی باشند (Bohrer, 2019). از طرفی محصولات گوشتی آنالوگ بدلیل حذف گوشت فاقد بسیاری از ریزمغذی‌های مهم می‌باشند (Kumar et al., 2017) که با استفاده از محصولات گیاهی مختلف مناسب می‌توان بسیاری از این کمبودها را جبران کرد (Do Prado et al., 2018). بر همین اساس با توجه به اینکه تاکنون در تولید برگرهای آنالوگ از ترکیبات طبیعی حاوی ترکیبات آنتی اکسیدانی استفاده نشده بود لذا در این پژوهش از پودر پالپ تهیه شده از میوه *Opuntia stricta* در سه سطح ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ درصد در فرمولاسیون برگر آنالوگ استفاده و ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی محصول تولیدی خام و پخته شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

در این پژوهش میوه گلابی خاردار از گلخانه‌های غرب مازندران (چالوس) تهیه و پس از تأیید پژوهشگر گیاهان دارویی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مواد اولیه تهیه برگر گیاهی آنالوگ شامل سویای بافت‌دار حاوی ۵۲ گرم پروتئین، ۳/۱ گرم چربی و ۲۹ گرم کربوهیدرات (سبحان، ایران)، آرد سوخاری (تردک، ایران)، روغن آفتابگردان (بهار، ایران)، ادویه‌جات (گلستان، ایران)، صمغ گوار (سیگما آلدریج، آمریکا)، پودر ایزوله آب پنیر با خلوص ۹۰ درصد (پگاه، گلستان)، گلوتن (آردینه، ایران)، پیاز و سیر از فروشگاه‌های معتبر تهیه شد. همچنین سود (به‌آزما، ایران)، DPPH^۳ (سیگما آلدریج، آمریکا)، متانول (شارلو، اسپانیا)، هگزان (مجللی، ایران)، تری کلرواستیک اسید (تتراکم، ایران)، فنل فتالین (به‌آزما، ایران)، اسید سولفوریک (مرک، آلمان)، سولفات پتاسیم (مرک، آلمان)، اسید سولفات مس (مرک، آلمان)، دی‌اکسید سلنیوم (مرک، آلمان)، اسید کلریدریک (مرک، آلمان) و اسید بوریک (مرک، آلمان) خریداری شد.

تهیه پودر پالپ گلابی خاردار و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی آنها

تخمین زده شده است (Zion Market Research, 2019). از مهمترین پروتئین‌ها در تولید محصولات گوشتی آنالوگ می‌توان به حبوبات، غلات (Van Mierlo et al., 2017)، دانه‌های روغنی (Bohrer, 2019) و مایکوپروتئین (پروتئین های قارچی) (Asgar et al., 2010) اشاره کرد. دانه سویا یکی از مهمترین منابع پروتئینی محصولات گوشتی آنالوگ است (Adeniyi et al., 2018). از مهم‌ترین فراورده‌های حاصل از پروتئین سویا می‌توان به آرد سویا (۵۰ درصد پروتئین)، کنسانتره پروتئین سویا (۷۰ درصد پروتئین) و ایزوله پروتئین سویا (۹۰ درصد پروتئین) اشاره کرد که از نظر تغذیه‌ای ضمن دسترسی به پروتئین بالاتر نسبت به ماده اولیه از نظر لیزین و متیونین قابل مقایسه با پروتئین‌های حیوانی می‌باشند (Hasan, Devine, 2002; 2013). پروتئین سویای بافت‌دار^۱ از فرآیند مکانیکی آرد سویا یا کنسانتره سویا با استفاده از اکسترودر بدست می‌آید. محصول حاصل از این فرآیند پس از جذب آب و فرایند حرارتی، هنگام جویدن دارای بافتی شبیه گوشت می‌گردد (Riaz, 2011).

امروزه صنعت غذا در تلاش برای استفاده از نگهدارنده‌ها و افزودنی‌های طبیعی در پاسخ به تقاضای رو به افزایش مصرف‌کنندگان برای مواد غذایی سالم‌تر است تا ضمن کاهش زیان‌های ناشی از افزودنی‌های مصنوعی، از ویژگی‌های فوق‌العاده این افزودنی‌های گیاهی استفاده شود (Nemzer et al., 2011). به همین منظور گلابی خاردار میوه گیاهی از خانواده کاکتاسه‌ها و جنس آپونتیا^۲ (*Opuntia stricta*) مورد توجه قرار گرفته است که از پتانسیل رشد خوبی در مناطق خشک و نیمه‌خشک برخوردار است (Ennouri et al., 2005). میوه این گیاه به شکل بری و دارای پوستی نیمه‌سخت همراه با پالپی پر از دانه است و با نام انجیر هندی و انجیر بربری معروف است (Barba et al., 2017). *Opuntia stricta* دارای میوه گلابی شکل و به رنگ قرمز- بنفش می‌باشد (Obon et al., 2009). پالپ میوه این گیاه دارای طیف گسترده‌ای از ترکیبات بیولوژیکی فعال مانند کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، پلی‌فنل‌ها، کاروتنوئیدها، بتالائین و غیره است که بسیاری از این ترکیبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند (Majdoub et al., 2001). رنگ قرمز- بنفش این میوه بدلیل رنگدانه بتاسیانین می‌باشد (Felker et al., 2003; 2008). میوه گلابی خاردار در فرمولاسیون به‌صورت مختلف در محصولات غذایی نظیر پالپ میوه در بستنی (El-Samahy et al., 2009)، پودر در ماست و نوشیدنی‌های گوارا (Obon et al., 2009)، به شکل عصاره در تولید

1- Texturized Soy Protein (TSP)

2- *Opuntia*

3- 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

اندازه‌گیری شاخص‌های رنگ

شاخص‌های رنگ پودر پالپ گلابی خاردار توسط دستگاه رنگ‌سنج (ابزار کاران فن پویای شمال، IMG- Pardazesh, CAM-system XIUF55، ایران) با استفاده از روش شهری و مظاهری (Shahiri and Mazaheri, 2014) اندازه‌گیری شد. شاخص L^* بیانگر میزان روشنایی نمونه و دامنه آن از صفر (سیاه مطلق) تا ۱۰۰ (سفید مطلق) متغیر است. شاخص a^* میزان نزدیکی رنگ نمونه به رنگ‌های سبز و قرمز را نشان می‌دهد و دامنه آن از -۱۲۰ (سبز مطلق) تا ۱۲۰ (قرمز مطلق) متغیر است. شاخص b^* میزان نزدیکی رنگ نمونه به رنگ‌های آبی و زرد را نشان می‌دهد و دامنه آن از -۱۲۰ (آبی مطلق) تا ۱۲۰ (زرد مطلق) متغیر است.

ارزیابی خواص فیزیکی و شیمیایی برگ‌های آنالوگ پخته شده تولیدی

ارزیابی افت پخت برگ‌های آنالوگ

پخت برگ‌های آنالوگ در فر با دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد و بدون روغن انجام شد. یک طرف برگ‌ها به مدت ۵ دقیقه و طرف دیگر به مدت ۳ دقیقه پخته شد. درصد افت پخت برگ‌های تولیدی از رابطه زیر محاسبه شد (Cengiz and Gokoglu, 2005):

$$100 \times \frac{\text{وزن نمونه خام} - (\text{وزن نمونه خام} - \text{وزن نمونه پخته})}{\text{افت پخت}} \text{ (درصد)}$$

ارزیابی چروکیدگی برگ‌های آنالوگ پخته شده تولیدی

قطر و ضخامت برگ‌های آنالوگ پخته با استفاده از کولیس دیجیتال (اینسایز، اتریش) در نقاط مختلف اندازه‌گیری شد و چروکیدگی برگ‌ها از رابطه زیر بدست آمد (Basati et al., 2018).

$$100 \times \frac{\text{ضخامت نمونه خام} - \text{قطر نمونه خام} - \text{ضخامت نمونه پخته} - \text{قطر نمونه پخته}}{\text{چروکیدگی}} \text{ (درصد)}$$

ارزیابی بافت برگ‌های آنالوگ پخته شده تولیدی

ارزیابی بافت برگ‌های آنالوگ پخته با استفاده از آزمون پروفایل بافت^۳ و توسط دستگاه بافت‌سنج (استیبل میکروسیستم، TA-XT.Plus، انگلستان) انجام شد. از مرکز نمونه‌های پخته پس از ۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، قطعاتی به ابعاد ۱×۱×۱ جدا و با استفاده از پروب استوانه‌ای (قطر ۵ سانتی‌متر)، آزمون فشرده‌سازی دو مرحله‌ای تا ۵۰ درصد ارتفاع اولیه (۵ میلی‌متر) و با سرعت ۲۰ میلی‌متر بر دقیقه ارزیابی شدند. شاخص‌های سختی^۴ (نیوتن)، پیوستگی بافت (انسجام)^۵ (بدون واحد)، خاصیت جهندگی

میوه گلابی خاردار پس از شستشو به صورت دستی پوست‌گیری و دانه‌ها از پالپ جدا شدند. پالپ حاصل در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و به وسیله آسیاب (آسان طوس شرق، ۱۰۰۰، ایران) پودر و از الکی با مش ۶۰ عبور داده شد. در نهایت پودر پالپ تا زمان استفاده در بسته‌های نایلونی زیپ‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ترکیبات پودر پالپ گلابی خاردار شامل رطوبت، پروتئین، چربی، خاکستر، اسیدیته (بر حسب اسید مالیک) مطابق AOAC^۱ (۲۰۰۶) و pH بر اساس روش خطی و همکاران (۲۰۱۶) اندازه‌گیری شد. میزان کربوهیدرات نمونه‌ها از تفاضل مجموع ترکیبات فوق از عدد ۱۰۰ بدست آمد. همچنین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نیز مطابق روش پالمری و همکاران (Palmeri et al., 2018) اندازه‌گیری شد.

تولید برگر آنالوگ

در تولید برگر آنالوگ سویای بافت‌دار (۲۰ درصد)، پیاز بدون آب (۱۵/۸ درصد)، آب (۳۳/۳۴ درصد)، سیر (۲/۸ درصد)، نمک (۱ درصد)، فلفل (۰/۲۶ درصد)، ادویه (۱/۷ درصد)، آرد سوخاری (۱۱/۶ درصد)، پودر آب پنیر (۴/۶ درصد)، گلوتن (۳/۱ درصد)، صمغ گوار (۰/۳ درصد) و روغن (۵/۵ درصد) با یکدیگر مخلوط و در قالب‌های ۵۰ گرمی وزن و در کیسه‌های زیپ‌دار در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. ضمناً در تولید برگر آنالوگ دارای پودر پالپ گلابی خاردار فرمولاسیون با کاستن از آرد سوخاری در سطوح ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ درصد طراحی شد.

ارزیابی خواص فیزیکی و شیمیایی برگر آنالوگ خام تولیدی

ارزیابی ترکیبات تشکیل دهنده برگر آنالوگ خام

ترکیبات برگ‌های آنالوگ خام شامل رطوبت، پروتئین، چربی، خاکستر، اسیدیته (بر حسب اسید مالیک) مطابق روش AOAC^۱ (۲۰۰۶) و pH آن بر اساس روش سلطانی‌زاده و غیائی اصفهانی (Soltanizade and Ghiasi-Esfahani, 2015) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری ظرفیت نگهداری آب^۲

۱۰ گرم از برگر آنالوگ خام با ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. نمونه پس از حذف آب اضافی توزین شد. ظرفیت نگهداری آب برگر آنالوگ از رابطه زیر محاسبه گردید (Sumu et al., 2015):

$$100 \times \frac{\text{وزن نمونه قبل از آبگیری} - \text{وزن نمونه بعد از آبگیری}}{\text{ظرفیت نگهداری آب}} \text{ (درصد)}$$

3- Texture Profile Analyzer (TPA)

4- Hardness

5- Cohesiveness

1- Association of Official Analytical Chemists (AOAC)

2- Water Holding Capacity (WHC)

(ارترجاعی^۱) (میلی متر) و قابلیت جویدن^۲ (نیوتن میلی متر) محاسبه شدند (Barba et al., 2018).

ارزیابی آبداری برگهای آنالوگ پخته شده تولیدی

از مرکز برگ پخته ۵ گرم جدا کرده و به قطعات ۳ میلی متری برش داده شد. مقدار ۱ گرم از نمونه برش خورده در کاغذ واتمن شماره ۴۰ قرار داده و پس از پوشاندن با فویل آلومینیومی با استفاده از دستگاه بافت سنج (استیل میکرو سیستم، TA-XT.Plus، انگلستان) به مدت ۳۰ ثانیه تحت نیروی ۵ کیلوگرمی با سرعت ۵ میلی متر بر دقیقه و فاصله هدف ۵ میلی متر قرار داده شد. پس از پرس، کاغذ صافی دوباره وزن شد و میزان آبداری برگهای آنالوگ از رابطه زیر بدست آمد (Ali et al., 2017).

۱۰۰× (وزن برگ / وزن کاغذ صافی قبل از پرس - وزن کاغذ صافی بعد از پرس) = میزان آبداری (درصد)

ارزیابی حفظ رطوبت برگهای آنالوگ پخته شده تولیدی

درصد حفظ رطوبت برگهای پخته از رابطه زیر به دست آمد (Soltanizade and Ghiasi-Esfahani, 2015):

۱۰۰× (وزن برگ خام - رطوبت برگ خام / وزن برگ پخته - رطوبت برگ پخته) = حفظ رطوبت (درصد)

ارزیابی حسی برگهای آنالوگ پخته شده تولیدی

نمونه‌ها از نظر رنگ، بو، طعم، بافت و پذیرش کلی توسط ۱۰ نفر پانلیست آموزش دیده زن و مرد در محدوده سنی ۲۰ الی ۴۰ ساله در مقیاس توصیفی ارزیابی شدند. عدد یک نشان دهنده نمونه بسیار ضعیف و عدد نه نشان دهنده نمونه بسیار عالی می‌باشد (Beth Small, 2007).

آنالیز آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به منظور بررسی اثر استفاده از پودر پالپ گلابی خاردار بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی برگ آنالوگ با استفاده از طرح کاملاً تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ صورت گرفت. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ آنالیز شده و برای رسم نمودار از اکسل ۲۰۱۶ استفاده شد. تمامی نتایج به صورت میانگین سه تکرار گزارش گردیدند.

نتایج و بحث

ویژگی‌های پودر پالپ گلابی خاردار

نتایج حاصل از ارزیابی ویژگی‌های پودر پالپ گلابی خاردار در جدول ۱ آمده است. بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پودر پالپ گلابی خاردار به منظور تأیید نقش سلامت بخش آن در برگ آنالوگ ضروری است. مهار رادیکال آزاد در پالپ میوه $3/28 \pm 0/63$ درصد بود. بر اساس گزارش محققان فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه گلابی خاردار ناشی از حضور ترکیبات فنولی و ویتامین C موجود در آن می‌باشد. این ترکیبات رادیکال‌های آزاد را جذب و خنثی، اکسایش را دفع و یا پراکسیدها را تجزیه می‌کنند (Felker et al., 2008; Diaz Sanchez et al., 2006). pH پالپ میوه گلابی خاردار $0/5 \pm 3/65$ تعیین گردید که ناشی از حضور زیاد اسیدهای آلی در این میوه است (Castellar et al., 2003; Panda et al., 2017).

تأثیر پودر پالپ گلابی خاردار بر ویژگی‌های برگهای آنالوگ خام تولیدی

نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی برگ آنالوگ خام حاوی پودر پالپ گلابی خاردار در جدول ۲ آمده است. با افزایش درصد پودر پالپ گلابی خاردار در میزان رطوبت، پروتئین، چربی، کربوهیدرات و خاکستر برگهای آنالوگ تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). مقدار pH در برگهای گوشتی و گیاهی به عنوان شاخصی است که کیفیت فرآورده را نشان می‌دهد و بر اساس گزارش محققان در محدوده ۶/۲-۵/۸ قرار دارد و pH بیش از ۶/۴ طی نگهداری نشان دهنده بروز فساد میکروبی در محصول است (Do Prado 2018). بیشترین و کمترین مقدار pH به ترتیب به نمونه شاهد ($6/06 \pm 0/4$) و در برگ آنالوگ دارای ۲/۵ درصد پودر پالپ گلابی خاردار ($5/76 \pm 0/2$) تعلق داشت که دلیل این امر می‌توان به حضور اسیدهای آلی و ویتامین C در پودر میوه گلابی خاردار نسبت داد (Kharrat et al., 2018).

نتایج حاصل از افزودن پودر پالپ گلابی خاردار بر ظرفیت نگهداری آب برگهای آنالوگ خام در جدول ۲ آمده است. ظرفیت نگهداری آب برگ به توانایی فرآورده در نگهداشتن رطوبت خود و رطوبت افزوده شده طی فرآیند اطلاق می‌شود. میوه گلابی خاردار به دلیل وجود کربوهیدرات‌های پیچیده به ویژه پکتین در جذب و نگهداری آب نقش مؤثری دارد (Majdoub et al., 2001). نتایج نشان داد با افزایش درصد پودر پالپ گلابی خاردار ظرفیت نگهداری آب برگهای آنالوگ خام افزایش یافت که دلیل این امر به علت حضور پکتین می‌باشد که به تنهایی و همراه با پروتئین شبکه‌ای را ایجاد می‌کند که با به دام اندازی آب از آزادسازی آن جلوگیری می‌کند (Soltanizade and Ghiasi-Esfahani, 2015).

1- Springiness

2- Chewiness

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پودر پالپ گلابی خاردار

Table 1- Physicochemical properties of prickly pear pulp powder

رطوبت Moisture (%)	پروتئین Protein (%)	چربی Fat (%)	خاکستر Ash (%)	کربوهیدرات Carbohydrate (%)	اسیدیته pH	DPPH (%)
10.45 ± 0.08	5.2 ± 0.07	3.6 ± 0.09	12.47 ± 0.14	68.22 ± 0.15	3.65 ± 0.05	3.28 ± 0.63

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی برگه‌های آنالوگ خام حاوی پودر پالپ گلابی خاردار

Table 2- Physicochemical properties of un-cooked burger analogue with prickly pear pulp powder

پودر و ویژگی‌های برگه Powder Burger properties	Control (0%)	0.5%	1.5%	2.5%
Moisture (%)	50.48 ± 0.51 ^a	50.06 ± 0.07 ^a	50.84 ± 0.57 ^a	0.28 ± 51.17
Protein (%)	12.10 ± 0.67 ^a	12.12 ± 0.25 ^a	12.18 ± 0.34 ^a	0.46 ± 12.23
Fat (%)	12.13 ± 0.59 ^a	12.16 ± 1.44 ^a	12.18 ± 0.52 ^a	0.45 ± 12.26
Ash (%)	2.51 ± 0.10 ^a	2.75 ± 0.14 ^a	2.7 ± 0.37 ^a	0.07 ± 2.82
Carbohydrates (%)	22.76 ± 0.64 ^a	22.66 ± 1.64 ^a	0.834 ± 22.10	0.40 ± 21.52
pH	6.42 ± 0.06 ^a	6.32 ± 0.01 ^b	6.02 ± 0.05 ^c	0.02 ± 5.76
WHC (%)	22.57 ± 1.01 ^a	22.68 ± 1.29 ^a	23.63 ± 0.73 ^a	1.66 ± 24.57
<i>L</i> [*]	47.85 ± 0.74 ^a	45.88 ± 0.68 ^b	40.84 ± 0.84 ^c	0.6 ± 38.66
<i>a</i> [*]	12.47 ± 0.34 ^d	18.36 ± 0.84 ^c	25.8 ± 0.4 ^b	0.5 ± 30.37
<i>b</i> [*]	22.48 ± 0.58 ^a	19.37 ± 0.75 ^a	15.96 ± 0.46 ^b	0.23 ± 15.37

درصد پودر پالپ گلابی خاردار بیشترین (۳۷/۶ ± ۳۰/۰) مقدار مشاهده شد. علت این امر مرتبط به حضور فراوان رنگدانه بتاسیانین در پالپ گلابی خاردار که منتج به رنگ قرمز- بنفش می‌گردد افزایش (Diaz Sanchez et al., 2006; Obon et al., 2009). درصد پودر پالپ گلابی خاردار سبب کاهش شاخص زردی (a^*) گردید که می‌تواند از لحاظ تجاری مطلوب و شباهت بیشتری به برگه‌های گوشتی داشته باشد و مورد توجه مصرف‌کننده قرار گیرد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج خراط و همکاران (Kharrat et al., 2018) با افزودن عصاره میوه گلابی خاردار در فراوده گوشتی سلامی مطابقت داشت.

نتایج حاصل از ارزیابی شاخص‌های رنگ نیز نشان داد که شاخص روشنایی (L^*) با افزایش درصد پودر پالپ گلابی خاردار کاهش معنی‌دار یافت ($p < 0.05$). به‌طوری‌که در نمونه شاهد بیشترین (۴۷/۸۵ ± ۰/۷۴) و در تیمار دارای ۲/۵ درصد پودر پالپ گلابی خاردار کمترین (۳۸/۶۶ ± ۰/۶) بود. کاهش انعکاس نور از سطح برگه‌ها دلیل اصلی گزارش شده است (Nunes et al., 2015). نمایی از برگه‌های تولیدی در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طوری که مشاهده می‌شود، شاخص قرمزی (a^*) با افزایش درصد پودر پالپ گلابی خاردار افزایش معنی‌داری یافت به طوری که در نمونه شاهد کمترین (۳۴/۱۲ ± ۱۲/۴۷) و در برگه دارای ۲/۵



شکل ۱- نمایی کلی از آنالوگ برگه‌های خام

Fig. 1- Overview of un-cooked analouge burgers

بررسی افزودن پودر پالپ گلابی خاردار بر ویژگی‌های برگر آنالوگ پخته شده تولیدی

نتایج حاصل از افزودن پودر پالپ گلابی خاردار بر افت پخت برگرهای آنالوگ در جدول ۳ آمده است. افت پخت در برگرها به میزان کاهش وزن برگر قبل و بعد از پخت مربوط می‌باشد. میزان افت پخت در برگرهای گوشتی بیش از برگرهای آنالوگ و به‌طور معمول در محدوده ۲۲-۲۵ درصد می‌باشد که علت این امر به‌دلیل حضور پروتئین‌های گوشت است که شبکه ژلی مستحکمی را تشکیل می‌دهند (Soltanizade and Ghiasi-Esfahani, 2015). کمترین و بیشترین درصد افت پخت به‌ترتیب مربوط به برگر آنالوگ دارای ۲/۵ درصد پودر پالپ (۰/۴۷ ± ۲۱/۰۳) و برگر شاهد (۰/۶۳ ± ۲۲/۲) بود. در اثر پخت رطوبت بخار شده می‌شود اما با استفاده از پودر پالپ گلابی خاردار بدلیل وجود کربوهیدرات‌های پیچیده مثل پکتین و تشکیل شبکه ژلی، آب در بافت برگر حفظ شده و برگر در اثر پخت آب کمتری از دست می‌دهد. از این حیث نتایج این پژوهش با

مشاهدات حسینی و بساطی (Hosseini and Bassati, 2018) مبنی بر افزودن زانتان و کربوکسی متیل سلولز به برگر سویا و همچنین بس اسمال (Beth small, 2007) مبنی بر افزودن پوره بلوبری به برگر گیاهی سویا مطابقت داشت.

نتایج حاصل از افزودن پودر پالپ گلابی خاردار بر چروکیدگی برگرهای آنالوگ پخته در جدول ۳ آمده است. چروکیدگی یک ویژگی مهم در ارزیابی برگرهاست و بدلیل رهاسازی آب و چربی و دنا تورا سیون پروتئین‌ها در حین پخت رخ می‌دهد. چروکیدگی برگرهای آنالوگ در نمونه شاهد ۲/۱۱ ± ۰/۳۹ درصد تعیین گردید. از عوامل کاهش دهنده چروکیدگی در برگرها می‌توان به افزودن فیبر (Aleson-Carbonll et al., 2005) و صمغ (Soltanizade and) اشاره کرد. همان‌طوری که مشاهده می‌شود با افزایش درصد پودر پالپ گلابی خاردار، چروکیدگی برگرهای آنالوگ کاهش یافت.

جدول ۳- تاثیر افزودن پودر پالپ گلابی خاردار بر ویژگی‌های برگر آنالوگ پخته تولیدی
Table 3- Effect of prickly pear pulp powder on cooked analogue burgers properties

پودر Powder (%)	Control (0%)	0.5%	1.5%	2.5%
ویژگی‌های برگر Burger properties				
Cooking loss (%) (افت پخت (درصد))	22.20 ± 0.63 ^a	21.06 ± 0.59 ^a	21.04 ± 0.85 ^a	21.03 ± 0.47 ^a
Cooking shrinkage (%) (چروکیدگی (درصد))	2.11 ± 0.39 ^a	1.65 ± 0.73 ^a	1.34 ± 0.77 ^b	0.99 ± 0.36 ^b
Hardness (N) (سفتی (نیوتن))	9.89 ± 0.14 ^b	15.09 ± 0.33 ^a	12.15 ± 0.23 ^b	11.85 ± 0.18 ^{ab}
Cohesiveness (ratio) (انسجام (بدون واحد))	0.28 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.03 ^a	0.28 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.01 ^a
Springiness (mm) (قابلیت ارتجاع (میلی‌متر))	0.48 ± 0.02 ^a	0.45 ± 0.02 ^{ab}	0.41 ± 0.04 ^{bc}	0.38 ± 0.01 ^c
Chewiness (N.mm) (قابلیت جویدن (نیوتن میلی‌متر))	1.39 ± 0.13 ^a	1.98 ± 0.6 ^a	1.54 ± 0.70 ^a	1.25 ± 0.31 ^a
Juiciness (آبداری (درصد))	5.10 ± 0.37 ^b	5.22 ± 0.51 ^{ab}	5.81 ± 0.06 ^{ab}	6.03 ± 0.62 ^a
Moisture retention (%) (حفظ رطوبت (درصد))	69.2 ± 11.47 ^a	71.67 ± 3.78 ^a	72.29 ± 11.47 ^a	72.77 ± 4.65 ^a

خرد شدن بوسیله دندان دلالت می‌کند که این پارامتر در برگرهای آنالوگ تغییر معنی‌داری نداشت (p > ۰/۰۵). قابلیت ارتجاع مقدار برگشت یک ماده غذایی به حالت اولیه بدون تغییر شکل پس از حذف نیروی جویدن می‌باشد. همان‌طوری که در جدول ۳ مشاهده می‌گردد، قابلیت ارتجاع برگرهای آنالوگی تولیدی با افزایش درصد پودر پالپ به طور معنی‌داری کاهش یافت (p < ۰/۰۵) که دلیل این امر را می‌توان به کاهش تراکم شبکه پروتئین باشد که سبب ایجاد ساختاری با الاستیسیته کمتر نسبت داد. انرژی لازم برای جویدن ماده غذایی تا دستیابی به محصولی آماده بلع (قابلیت جویدن) با افزایش درصد پودر

نتایج حاصل از اثر افزودن پودر پالپ گلابی خاردار بر پروپایل بافت برگرهای آنالوگ پخته در جدول ۳ آمده است. میزان سفتی بافت برگرها با افزایش درصد پودر پالپ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p < ۰/۰۵). علت این امر می‌تواند بدلیل هیدراته شدن کربوهیدرات‌های پیچیده موجود در پودر پالپ گلابی خاردار باشد که همراه با پروتئین سویا شبکه ژلی ضعیفی تشکیل می‌دهد و نیروی لازم برای تغییر شکل ماده غذایی را افزایش می‌دهد. از این حیث با مشاهدات سلطانی زاده و غیائی اصفهانی (Soltanizade and Ghiasi-Esfahani, 2015). مبنی بر افزودن آلونئورا به بیف برگر مطابقت داشت. انسجام بافت، به میزان تغییر شکل ماده غذایی قبل از

مصرفکننده دارد. با افزایش درصد پودر پالپ گلابی خاردار، درصد حفظ رطوبت برگرها افزایش یافت ($p > 0.05$). با افزایش ظرفیت نگهداری آب برگرها در اثر افزودن پودر پالپ، برگرها رطوبت را بهتر در بافت خود حفظ می‌کنند. نتایج این پژوهش با پژوهش السون کربونل و همکاران (Aleson-Carbonell et al., 2005) مبنی بر افزودن لایه آلبدو لیمو به بیف برگر و همچنین دوپرادو و همکاران (Do Prado et al., 2018) مبنی بر افزودن آرد سورگوم به برگرهای تولیدی مطابقت داشت.

نتایج حاصل از اثر افزودن پودر پالپ گلابی خاردار بر ارزیابی حسی برگرهای آنالوگ در جدول ۴ آمده است. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش درصد پودر پالپ گلابی خاردار تغییر معنی‌داری در بافت، رنگ و بوی برگرهای آنالوگ مشاهده نشد ($p > 0.05$) اما برگر آنالوگ دارای ۱/۵ درصد پودر پالپ گلابی خاردار در مقایسه با سایر نمونه‌ها به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) دارای بیشترین امتیاز طعم و پذیرش کلی بود.

پالپ در قابلیت جویدن برگرهای آنالوگی تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$).

نتایج حاصل از افزودن پودر پالپ گلابی خاردار بر آبداری برگر آنالوگ پخته در جدول ۳ آمده است. با افزایش درصد پودر پالپ گلابی خاردار آبداری برگرها به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). علت این امر به عمل موسیلاژهای موجود در پودر پالپ گلابی خاردار مربوط می‌باشد که سبب به دام انداختن آب در شبکه تشکیل شده می‌شود و از سینرسیس جلوگیری کرده و اجازه خروج آب از بافت برگر در حین پخت و در اثر فشار وارد شده را نمی‌دهد. درنتیجه به دنبال افزایش ظرفیت نگهداری آب، آبداری برگرهای آنالوگ افزایش می‌یابد. و همکاران (Ali et al., 2017) گزارش کردند که با افزودن پوره کدو حلوائی به سبب حضور ترکیبات پکتینی بر افزایش میزان آبداری برگر ماهی تیلاپیا برگر مثبت ارزیابی کردند.

نتایج حاصل از اثر افزودن پودر پالپ گلابی خاردار بر حفظ رطوبت برگر آنالوگ پخته در جدول ۳ آمده است. نگهداری رطوبت در بافت برگر نقش زیادی در ایجاد حس دهانی مطلوب برای

جدول ۴- ارزیابی حسی برگرهای آنالوگ تولیدی
Table 4- Sensory evaluations of burgers analouge

پودر Powder (%)	Control (0%)	0.5%	1.5%	2.5%
ویژگی‌های حسی Sensory characteristics				
بافت Texture	6.57 ± 1.27 ^a	7.14 ± 0.6 ^a	7.43 ± 1.13 ^a	7.14 ± 1.38 ^a
رنگ Colour	7.00 ± 1.29 ^a	7.57 ± 0.97 ^a	7.43 ± 1.13 ^a	7.14 ± 1.52 ^a
طعم Taste	6.71 ± 1.38 ^{ab}	6.71 ± 0.75 ^{ab}	8.00 ± 1.41 ^a	6.43 ± 1.39 ^b
بو Odour	6.71 ± 1.25 ^{ab}	6.43 ± 0.53 ^a	6.85 ± 0.89 ^a	6.14 ± 1.06 ^b
پذیرش کلی Overall acceptability	5.85 ± 0.69 ^{ab}	6.28 ± 0.48 ^b	8.42 ± 0.53 ^a	6.28 ± 0.95 ^b

می‌توان علاوه بر استفاده از ترکیبات تغذیه‌ای مفید گلابی خاردار، یک فرآورده گیاهی مناسب با نزدیکترین شباهت ظاهری به فرآورده‌های گوشتی به‌خصوص برای گیاهخواران عرضه کرد. تاثیر خواص آنتی اکسیدانی بر دوره ماندگاری و فساد اکسیداتیو برگرهای آنالوگی که در دست بررسی است.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و پارک علم و فناوری مازندران بدلیل حمایت‌های در خصوص اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری

استفاده از پودر پالپ گلابی خاردار در فرمولاسیون برگر آنالوگ نشان داد که با افزایش درصد پودر پالپ، محتوی رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر افزایش، اما مقدار کربوهیدرات‌ها کاهش یافت. شاخصهای روشنایی، زردی و pH کاهش و شاخص قرمزی افزایش یافت. همچنین به سبب حضور کربوهیدرات‌های پیچیده و تشکیل شبکه ژلی، آب در بافت برگر آنالوگ حفظ و ظرفیت نگهداری آب، میزان آبداری و درصد حفظ رطوبت افزایش و افت پخت و چروکیدگی برگرهای پخته کاهش یافت. در آزمون ارزیابی حسی، برگر آنالوگ دارای ۱/۵ درصد پودر پالپ بهترین پذیرش کلی را داشت. بنابراین با بکاربردن پودر پالپ گلابی خاردار در فرمولاسیون برگر آنالوگ

منابع

- Adeniyi, P., Obatolu, V.A., & Kehinde, H.A. (2018). Comparative evaluation of the nutritional, physical and sensory properties of beef, chicken and soy burgers. *Agriculture and Food Science Research* 5(2): 57-63.
- Aleson-Carbonell, L., Fernandes-Lopez, J., Perez-Alvarez, J.A., & Kuri, V. (2005). Characteristics of beef burger as influenced by various types of lemon albedo. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6: 247-255.
- Ali, H.A., Mansour, E.H., ElBedawey, A.E-F., & Osheba, A.S. (2017). Evaluation of tilapia fish burgers as effected by different replacement levels of mashed pumpkin or mashed potato. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. <http://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.01.003>.
- Asgar, M.A., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R., & Karim, A. (2010). Nonmeat protein alternative as meat extender and meat analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety* 9: 51-521.
- Association of Official Analytical Chemists. (2006). 18th end AOAC Washington DC.
- Barba, F., Putnik, P., Kovacevic, D., Poojary, M., Roohinejad, Sh., Lorenzo, J., & Koubba, M. (2017). Impact of conventional and non-conventional processing on prickly pear and their derived products: from preservation of beverages to valorization of by-products. *Trends in Food Science & Technology* 67: 260-270.
- Bassati, A., & Hosseini, S.E. (2018). The effect of adding xanthan and carboxy methyl cellulose on cooking and sensory characteristics of soya burger. *Journal of Food Biosciences and Technology* 8(1): 59-64.
- Beth Small, P. (2007). *Development of soy-blueberry burger and the changes in anthocyanins and phenolics during storage and broiling*. M.Sc. Theses, University of Maine.
- Bohrer, B.M. (2019). An investigation of the formulation and nutritional composition of modern meat analogue products. *Food Science and Human Wellness*. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.11.006>.
- Castellar, R., Obon, J.M., Alacid, M., & Fernandes-Lopez, J.A. (2003). Color properties and stability betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2772-2776.
- Cengiz, E., & Gokoglu, N. (2005). Changes in energy and cholesterol contents of frankfurter-type sausages with fat reduction and fat replacer addition. *Food Chemistry* 91: 443-447.
- Devine, D. 2002. Soya and health- clinical evidence, dietetic applications. *British Nutrition Foundation* 27: 195-198.
- Diaz Sanchez, F., Santos Lopez, E.M., Filardo Kerstupp, S., Villagomez, R., & Scheinvar, L. (2006). Colorant extraction from red prickly pear (*Opuntia lasiacantha*) for food application. *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry* 5(2): 1330-1337.
- Do Prado, M.E.A., Queiroz, V.A.V., Correia, V.T.V., Neves, E.O., Ronchetti, E.F.S., Goncalves, A.C.A., Menezes, C.B., & Oliveira, F.C.E. (2018). Physicochemical and sensorial characteristics of beef burgers with added tannin-free whole sorghum flours isolated soy protein replacer. *Meat Science* <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.12.006>.
- El-Samahy, S.K., Youssef, K.M., & Moussa-Ayoub, T.E. (2009). Producing ice cream with concentrated cactus pear pulp: A preliminary study. *Journal of PACD* 11: 1-12.
- Ennouri, M., Evelyne, B., Laurence, M., & Hamadi, A. (2005). Fatty acid composition and rheological behavior of prickly pear seed oils. *Food Chemistry* 93: 431-437.
- Felker, P., Stintzing, F.C., Mussig, E., Leitenberger, M., Carle, R., Vogt, T., & Bunch, R. (2008). Colour inheritance in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits. *Annals of Applied Biology* 307-318.
- Hassan, Sh. (2013). *Soybean, nutrition and health*. Intech open. 453-473.
- Kharrat, N., Salem, H., & Mrabet, A. (2018). Synergistic effect of polysaccharides, betalain pigment and phenolic compounds of red prickly pear (*Opuntia stricta*) in the stabilization of salami. *International Journal of Biological Macromolecules* 111: 561-568.
- Kumar, P., Chatli, M.K., Mehta, N., Singh, P., Malav, O.P., & Verma, A.K. (2017). Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes. *Critical Reviews in Food Science Technology* 57: 923-932.
- Ledesma, E., Rendueles, M., & Diaz, M. (2015). Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and Prevention. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.016>.
- Majdoub, H., Roudesli, S., & Deratani, A. (2001). Polysaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia ficus-indica*: extraction, characterization and polyelectrolyte behavior. *Polymer International* 50: 552-560.
- Nemzer, B., Pietrzakowski, Z., Sporna, A., Stalica, P., Thresher, W., Michalowski, T., & Wybraniec, S. (2011). Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chemistry* 127: 42-53.
- Nunes, A.N., Saldanha do carmo, C., & Duarte, C. (2015). Production of natural red pigment derived from opuntia spp. using a novel high pressure CO₂ assisted-process. *Royal Society of Chemistry* 5: 83106-83114.
- Obon, J.M., Castellar, M.R., Alacid, M., & Fernandes-Lopez, J.A. (2009). Production of red purple food colorant from *opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food models systems. *Journal of Food Engineering* 90: 471-479.

26. Palmeri, R., Parafati, L., Restuccia, C., & Fallico, B. (2018). Application of prickly pear fruit extract to improve domestic shelf life, quality and microbial safety of sliced beef. *Food and Chemical Toxicology* <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.044>.
27. Panda, S.K., Behera, S.K., Qaku, X.V., Sekar, S., Ndinteh, D.T., Nanjundaswamy, H.M., Ray, R.C., & Kayitesi, E. (2017). Quality enhancement of prickly pears (*Opuntia* sp.) juice through probiotic fermentation using *Lactobacillus fermentum* – ATCC 9338. *Food Science and Technology* 75: 453-459.
28. Riaz, M.N. (2011). *Texturized vegetable proteins*. Hand Book of proteins 395-418.
29. Shahiri Tabarestani, H., & Mazaheri Tehrani, M. (2014). Optimization of physicochemical properties of low-fat hamburger formulation using blend of soy flour, split-pea flour and wheat starch as part of fat replacer system. *Journal of Food Processing and Preservation* 38: 278-288.
30. Soltanizadeh, N., & Ghiasi-Esfahani, H. (2015). Qualitative improvement of low meat beef burger using *Aloe vera*. *Meat Science* 99: 75-80.
31. Summo, C., Centomani, I., Paradiso, V., Caponio, F., & Pasqualone, A. (2015). The effect of the type of cereal on the chemical and textural properties and on the consumer acceptance of pre-cooked, legume-based burgers. *Food Science and Technology* 65: 290-296.
32. Van Mierlo, K., Rohmer, S., & Gerdessen, J.C. (2017). A model for composing meat replacers: Reducing the environmental impact for our food consumption pattern while retaining its nutritional value. *Journal of Cleaner Production* 165: 930-950.
33. Zion Market Research. (2019). Accessed June 23, 2019 at <http://www.globenewswire.com/news-release/2019/03/28/1781303/0/en>.



Encapsulated Limonene based Multi-layer Electrostatic Adsorption and Evaluate Its Release under Simulated Oral Conditions

M. Khalilian-Movahhed¹, M. Mohebbi^{ID 2*}, Ch. Sinding³

Received: 2021.09.02

Revised: 2021.11.11

Accepted: 2021.12.01

Available Online: 2021.12.01

How to cite this article:

Khalilian-Movahhed, M., Mohebi, M., & Sinding, Ch. (2023). Encapsulated limonene based multi-layer electrostatic adsorption and evaluate its release under simulated oral conditions. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 43-56. (In Persian with English abstract).
<http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2021.72290.1090>

Introduction

Efforts have always been made to protect valuable compounds of medicine, food and aromatics materials that are highly sensitive to environmental conditions by the encapsulation method. encapsulation of flavors, in addition to its protection, allows the aromatic substance to be released in a long time, and the time and place of its release can be controlled. To design these protection systems requires detailed information on encapsulation and release methods, the nature of walls and aromatic materials (Gunning *et al.*, 1999). For encapsulation of sensitive compounds such as lipophilic materials, it is necessary to produce an emulsion of the desired substance in wall materials such as proteins, polysaccharides or a mixture of them. The important factors in encapsulation are the molecular weight, chemical properties and polarity of the core materials, the properties of the materials of the walls, and finally, the methods used to produce microcapsules. (Jafari *et al.*, 2008).

The aim of this study was to produce and evaluate the properties of two and six layer multilayer microcapsules containing limonene using soy protein isolate and starch modified by spray drying. The release of encapsulated limonene was investigated under artificial oral conditions under different stress conditions. The results of this study can be used to predict the release rate of the encapsulated flavors and their release conditions.

Materials and Methods

Solution preparation: The solution of SPI (0-3%) was prepared by methods of Huang *et al.* (2012). The OSA starch stock solution (0-2%) was prepared by methods of Nilsson and Bergens (2007).

Emulsion's preparation: the primary emulsion of the optimum SPI and secondary emulsion of optimum OSA starch concentration prepared by the method of Noshad *et al.* (2015).

Microcapsule production: To prepare the Microcapsules, a laboratory spray dryer was used. 180±5 °C, inlet air temperature, 25 (ml/min) feed rate, and 90±10 °C outlet air temperature were used. Six layer microcapsules was also prepared in the same conditions (Ansarifar *et al.*, 2017)

The micro structure, morphology and release of limonene were evaluated and finally by Zero order, First order, Higuchi, and Korsmeyer- peppas models were used to the fitting of experimental data.

Limonene release: To investigate the release of the encapsulated limonene, the release of these microcapsules (two and six layer) at 37 ° C and pH = 6.8, as well as frequent chewing (0, 50 and 100 rpm) were examined. For the apply of shear stress, an oral simulator was designed and developed by the Department of Food Science and Technology of Ferdowsi University of Mashhad was used.

1 and 2- Ph.D. Student and Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

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

3- Assistant Professor, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS, INRAE, Institut Agro, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2021.72290.1090](http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2021.72290.1090)

Results and Discussion

The results of particle size changes of the initial emulsion formed with different levels of soy protein isolate showed that the particle size decreased with increasing the concentration of this protein to 1.5% and then it was increased. The results of zeta potential showed that with increasing the concentration of soy protein isolate to 1.5%, the zeta potential of the samples increased and with more than 1.5%, it did not have much effect on the zeta potential of the samples, which indicates that concentrate of 1.5% soy protein isolate has a good ability to cover surface of limonene particles. Similarly, 1.2% of OSA starch was determined for the secondary layer.

SEM images of the microcapsules showed that in the two-layer wall microcapsules have cavities, cracks and shrinkage. In the starting of drying, the rate of moisture lost is high and on the other hand, the wall is not strong enough to withstand the stresses caused by the exit of moisture from the walls, so the microcapsule has cavities. In six-layer microcapsules, a smooth, non-cracked surface was observed, which can be attributed to the wall strength due to the increase in the number of layers. Fourier transform infrared spectroscopic (FTIR) test showed that the outer surface of the microcapsules was covered by OSA starch in two and six layer microcapsules.

The release profile of encapsulated limonene showed that the release rate in two layer samples was faster than six layer samples. Also, with increasing shear rate, the amount of release increased. The results of experimental models fitting showed that the first-order model had the best description for releasing limonene from two- and six-layer samples in different conditions. Calculation of diffusion coefficient showed that six-layer microcapsules have a lower diffusion coefficient than two-layer microcapsules, which leads to a decrease in the release rate of limonene.

Conclusion

The results of this study showed that the layer-by-layer method could be used to produce limonene microcapsules. Soy protein isolate and modified starch can cover limonene droplets well. SEM images showed that the structure of six-layer microcapsules is free of cracks and cavities and has a more uniform surface than two-layer microcapsules. To investigate the mechanism of limonene release from two- and six-layer microcapsules, different kinetic models were used to fit the experimental release data. The results showed that the release of these microcapsules occurred based on the diffusion mechanism and Fick's law, which is the main mechanism of mass transfer in the release process. Also, the results showed that the six-layer microcapsules had a lower diffusion coefficient than the two-layer microcapsules and the release rate was lower in the two-layer microcapsule; This is due to the repetitive coating of soy protein isolate and modified starch around the microcapsules and the increase in wall thickness.

Keywords: Artificial mouth, Limonene, Multilayer microcapsules, Release

مقاله پژوهشی

ریز پوشانی چند لایه لیمون بر پایه جذب الکترواستاتیک و ارزیابی رهایش آن تحت شرایط شبیه سازی شده دهان

محمد خلیلیان موحد^۱ - محبت محبی^{۲*} - شارلوت سیندینگ^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰

چکیده

در این پژوهش از روش جذب لایه به لایه پلی الکترولیت های ایزوله پروتئین سویا و نشاسته اصلاح شده برای تولید میکروکپسول محتوی لیمون استفاده شد. ویژگی های مورفولوژیکی و ساختاری میکروکپسول های تولیدی بررسی گردید. میزان رهایش لیمون از میکروکپسول های تولید شده به صورت دو و شش لایه در شرایط دهان مصنوعی در شرایط تنش برشی مختلف (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ دور در دقیقه) مورد ارزیابی قرار گرفت. نمایه رهایش لیمون از میکروکپسول ها نشان داد لیمون در میکروکپسول های دو لایه با شیب بیشتری نسبت به شش لایه، رهایش یافته و سریع تر به حداکثر رهایش می رسد زیرا با افزایش تعداد لایه های دیواره، رهایش به تأخیر می افتد. نتایج به دست آمده از رهایش لیمون از میکروکپسول ها نشان داد مدل درجه اول بهترین توصیف را از رهایش داشت و بر اساس معادله کورسمیر-پاس رهایش لیمون از میکروکپسول ها غالباً از نوع نفوذ بود. همچنین نتایج نشان داد ضریب نفوذ با افزایش تنش برشی، بیشتر شد و ضریب نفوذ در میکروکپسول های دو لایه نسبت به شش لایه بیشتر بود.

واژه های کلیدی: ریز پوشانی چند لایه، رهایش، دهان مصنوعی، لیمون

مقدمه

در فرایند ریز پوشانی، ترکیبات فعال درون ماده حامل به دام می افتد؛ بدین طریق این ترکیبات فعال به صورت کنترل شده رهایش یافته و تحویل می گردد (Nedovic, Kalusevic, Manojlovic, 2011). اهمیت این فرایند در صنعت غذا به قابلیت خوراکی بودن مواد تشکیل دهنده دیواره ها، قیمت پایین و در دسترس بودن آن برای واحدهای تولید کننده است؛ لذا فرایند ریز پوشانی به آسانی قابلیت صنعتی شدن را دارد (Sagis et al., 2008). روش های متعددی برای فرایند ریز پوشانی قابل استفاده است که در این میان دچهر و هونگ در سال ۱۹۹۱ روشی به نام جذب سطحی لایه به لایه الکترواستاتیک^۴ را معرفی کردند که می تواند در صنعت به کار رود (GJDH Decher and Hong, 1991). این روش به دلیل فرایند ساده جذب و قابل کنترل بودن آن، یکی از روش های محبوب برای تولید کپسول های الکترولیت بوده و امکان تولید کپسول های در

همواره تلاش بر این بوده است تا ترکیبات ارزشمند دارویی، غذایی و مواد معطر که حساسیت بالایی نسبت به شرایط محیطی دارند با روش های مختلف ریز پوشانی و محافظت شوند. ریز پوشانی طعم ها علاوه بر محافظت آن، این امکان را فراهم می کند تا ماده معطر در زمان طولانی تری رهایش داشته باشد و زمان و محل رهایش آن قابل کنترل باشد. برای طراحی این سامانه های پوشش دهی نیازمند اطلاع دقیق از نحوه ریز پوشانی، رهایش، ماهیت مواد دیواره و مواد معطر است (Gunning et al., 1999).

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*) نویسنده مسئول: (Email: m-mohebbi@um.ac.ir)

۳- استادیار، مرکز علوم طعم و غذا، اینرا، دانشگاه بورگوگن، دیژون، فرانسه

کربوکسیلیک با بار منفی است که می‌تواند به سطوح با بار مثبت جذب شود. علاوه بر این به‌عنوان عاملی برای افزایش ویسکوزیته عمل کند. اما ظرفیت ایجاد قوام آن نسبت به سایر ماکرو مولکول‌هایی که برای افزایش ویسکوزیته استفاده می‌شوند بسیار محدود است. با این حال به علت خصوصیات امولسیون کنندگی و ایجاد ویسکوزیته، نشاسته اکتیل - سوکسینات باعث کاهش هزینه‌ها به دلیل نیاز کمتر به استفاده از ترکیبات پایدارکننده در محصولات مختلف می‌شود (Dokić, Krstonošić, and Nikolić, 2012; Tesch et al., 2002; Nilsson and Bergenstahl, 2007).

در بین روش‌های خشک‌کردن، فرایند خشک‌کردن افشانه‌ای، مواد فرار بیشتری را در داخل کپسول نگهداری می‌نماید. مایع اولیه تزریق‌شده در خشک‌کن افشانه‌ای می‌تواند به‌صورت امولسیون، محلول یا سوسپانسیون باشد. روش خشک‌کردن افشانه‌ای یکی از رایج‌ترین و متداول‌ترین روش‌های ریز پوشانی است. به‌طور کلی مواد معطر با فراریت و قطبیت کمتر و وزن مولکولی بالاتر، ماندگاری بیشتری در کپسول‌های حاصل از خشک‌کن افشانه‌ای دارند (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, and Saurel, 2007).

بررسی ویژگی‌های انتقال جرم و محاسبه ضریب نفوذ ماده ریز پوشانی شده برای پیش‌بینی رهایش و برازش داده‌های آزمایشگاهی با مدل‌های ریاضی اهمیت بالایی برای مدل‌سازی رهایش و طراحی سیستم‌های ریز پوشانی دارد که می‌تواند منجر به کنترل رهایش و رسیدن به سرعت مطلوب آن گردد (Zuidam and Nedovic, 2010). لذا از جمله اهداف این پژوهش بررسی و برازش مدل‌های رهایش برای معرفی بهترین شرایط رهایش نمونه‌های حاوی لیمون است.

انصاری فر و همکاران (Ansarifar et al., 2017) در مطالعه‌ای از فیبریل استخراجی از پروتئین سویا و پکتین با درجه متوکسیل بالا به‌صورت لایه‌های متناوب و روش درون‌پوشانی چندلایه برای ریز پوشانی لیمون و دی استیل استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد علاوه بر کارایی بالای این روش درون‌پوشانی، با افزایش لایه‌های استفاده شده، ضریب نفوذ کاهش یافته و سرعت رهایش طعم‌های مورد استفاده کم می‌شود (Ansarifar, Mohebbi et al., 2017).

نوشاد و همکاران (Noshad et al., 2015) از روش انکپسولاسیون لایه به لایه با استفاده از ایزوله پروتئین سویا، نشاسته و کیتوزان برای درون‌پوشانی وانیلین استفاده کردند. نتایج آن‌ها به‌خوبی نشان داد که این روش درون‌پوشانی به‌خوبی باعث افزایش زمان رهایش کامل وانیلین کپسوله شده می‌شود. همچنین آن‌ها در تحقیق دیگری در مقایسه ضریب نفوذ وانیلین رهایش شده از

اندازه نانومتر تا میکرومتر را میسر می‌کند (Peyratout and Yow and Routh, Sagis et al., 2008; Daehne, 2004; 2006). در این تکنولوژی با تغییر تعداد لایه‌های دیواره‌ها و همچنین تغییر در ویژگی‌های مواد حامل و دیواره می‌توان نفوذپذیری و ویژگی‌های مکانیکی کپسول‌ها را کنترل کرد (Sagis et al., 2008). در روش جذب سطحی لایه به لایه، مواد تشکیل دهنده دیواره‌ها که دارای ماهیت پلی الکترولیت بوده به‌وسیله پیوندهای الکتروستاتیک روی یکدیگر متصل می‌شود و ایجاد کپسول را ایجاد می‌کنند (Gero Decher and Schlenoff, 2006; McClements, 2005).

برای ریز پوشانی ترکیبات حساس از جمله مواد چربی‌دوست لازم است امولسیون ماده موردنظر در مواد دیواره مانند پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و یا مخلوطی از آن‌ها تولید شود. از جمله عوامل مؤثر در ریز پوشانی می‌توان وزن مولکولی، ویژگی‌های شیمیایی و قطبیت ماده مورد نظر برای ریز پوشانی و همچنین خصوصیات دیواره مورد استفاده و در نهایت فرایند مورد استفاده برای تولید میکروکپسول‌ها را نام برد (Jafari, Assadpoor, He, and Bhandari, 2008).

استفاده از پروتئین سویا به دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا، ویژگی‌های عملکردی مناسب و هزینه پایین آن گسترش یافته است و یکی از مهم‌ترین منابع پروتئین در مصارف تجاری محسوب می‌شود. ایزوله پروتئین سویا علاوه بر ارزش بیولوژیکی آن به دلیلی ترکیب شیمیایی، انعطاف‌پذیری زنجیره‌های مولکولی و خواص آمفی فیلیکی، برای ایجاد پایداری امولسیون‌های غذایی استفاده می‌شود (Nesterenko, Alric, Silvestre, and Durrieu, 2012).

نشاسته اصلاح‌شده اکتیل - سوکسینات (OSA^۱) با نام تجاری Hi-Cap 100، از استری شدن نشاسته و اسید اکتیل سوکسینیک بدون آب در شرایط قلیایی تولید شده است که در این فرایند تعدادی زنجیره آب‌گریز به شاخه‌های آب‌دوست نشاسته اضافه شده، باعث خاصیت آب‌گریزی آن می‌شود (Tesch, Gerhards, and Schubert, 2002). خاصیت آب‌گریزی نشاسته اصلاح‌شده OSA باعث تضعیف پیوندهای درونی بین گرانول‌های آن می‌شود لذا حالیت نشاسته در آب سرد افزایش و ویسکوزیته محلول آن کاهش می‌یابد.

ایزوله پروتئین سویا در pH های پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک (حدود ۴/۶) دارای بار مثبت است و در pH های بالاتر از این مقدار بار منفی دارد (Elzoghby, Samy, and Elgindy, 2012; Mendanha et al., Huang, Sun, Xiao, and Yang, 2012; 2009). نشاسته اکتیل - سوکسینات حاوی بخشی از اسید

برای تهیه نشاسته، ابتدا مقادیر مورد نظر نشاسته اصلاح شده (۲-۰ درصد) در بافر استات ۵ میلی مولار حل شده به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۸۵ درجه سانتی گراد به هم زده شد، سپس تا دمای اتاق سرد کرده و در یخچال ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد تا جذب آب کامل انجام شود (Nilsson and Bergenstahl, 2007). از آب دیونیزه برای تهیه دیسپرسیون ایزوله پروتئین سویا و نشاسته استفاده شد.

تهیه امولسیون

برای تهیه امولسیون ابتدا ۱ درصد (وزنی/حجمی) لیمون با سوسپانسیون ایزوله پروتئین سویا آبیوشی شده در $\text{pH} = 3/5$ که با محلول اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال و هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال تنظیم شده بود، مخلوط شد و برای مدت ۲ دقیقه هموژنیزاسیون توسط هموژنایزر (IKA-T50، آلمان) با سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق انجام شد. برای همگن سازی ثانویه از پروپ اولتراسوند (مدل VCX750، شرکت Sonics & Material، امریکا) با بیشینه توان اسمی ۷۵۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز به مدت ۲ دقیقه استفاده شد. دمای نمونه ها در طول فرایند با چرخش آب سرد در حدود ۲۰ درجه سانتی گراد ثابت نگه داشته شد. جداسازی سرم از ذرات امولسیون توسط سانتریفیوژ کردن در دو مرحله انجام شد: مرحله اول به مدت ۴۵ دقیقه در $50 \times g$ و مرحله دوم برای ۱ دقیقه در $750 \times g$ در دمای محیط (۲۰ درجه سانتی گراد) انجام شد. ۲ درصد (وزنی/حجمی) از ذرات امولسیون جدا شده به محلول بعدی، نشاسته آبیوشی شده (لایه زوج) و یا محلول ایزوله پروتئین سویا (لایه فرد) در $\text{pH} = 3/5$ اضافه شد. برای هر لایه روش فوق تکرار شد (Ansarifar, Mohebbi, et al., 2017).

تهیه میکروکپسول

برای تهیه میکروکپسول ها از خشک کن پاششی آزمایشگاهی (Mini Spray Dryer, Buchi) سوئیس استفاده شد. شرایط خشک کردن شامل دمای هوای ورودی 180 ± 5 درجه سانتی گراد، سرعت پمپ خوراک ورودی ۲۵ میلی لیتر و دمای هوای خروجی 90 ± 10 درجه سانتی گراد طبق روش انصاری فر و همکاران (Ansarifar et al., 2017) در نظر گرفته شد. جهت جلوگیری از جذب رطوبت، پودرهای تولیدی سریعاً در ظرف شیشه ای منتقل شده در دسیکاتور نگهداری شد.

تعیین بار الکتریکی ذرات

اندازه گیری بار الکتریکی ذرات امولسیون بر اساس سنجش جابجایی الکتروفروریتیک ذرات با دستگاه زتا سائزر (Nano-ZS،

کپسول های یک و دو لایه نشان دادند میکروکپسول های یک لایه نسبت به میکروکپسول های دو لایه دارای ضریب نفوذ بیشتری هستند (Mohebbi, Varidi, Noshad, and Khalilian, 2019; Noshad et al., 2015; Movahhed, 2019).

سایر پژوهشگران نیز گزارش کردند که در میکروکپسول های چندلایه آلزینات/کیتوزان (Ye, Wang, Liu, and Tong, 2005) و یا برای میکروکپسول های چندلایه پلی استایرن سولفانات/پلی آلیامین هیدروکلرید^۱ (Qiu, Leporatti, Donath, and Möhwald, 2001) با افزایش تعداد لایه های دیواره ها، ضریب نفوذ ماده ریز پوشانی شده کاهش یافت.

هدف از این تحقیق امکان تولید و ارزیابی ویژگی های میکروکپسول های چند لایه ۲ و ۶ لایه ایزوله پروتئین سویا و نشاسته اصلاح شده به کمک خشک کن پاششی و بررسی رهایش لیمون ریز پوشانی شده در این میکروکپسول ها در شرایط دهان مصنوعی تحت شرایط تنشی مختلف است. نتایج این پژوهش می تواند برای پیش بینی میزان رهایش طعم های درون پوشانی شده و شرایط رهایش آن ها استفاده شود.

مواد و روش ها

مواد اولیه

ایزوله پروتئین سویا با ۹۴ درصد پروتئین از شرکت به پارس، نشاسته اصلاح شده (ذرت با استخلاف های اکتینیل سوکسینات^۲) از شرکت National Starch، لیمون (97% limonene) - (+) - (R) از شرکت Sigma Aldrich، فسفات دی هیدروژن پتاسیم (KH_2PO_4)، هیدروکسید سدیم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم (K_2HPO_4) و آنزیم آلفا-آمیلاز با درجه خلوص حداقل ۹۹ درصد از شرکت Merck آلمان، اسید هیدروکلریدریک ۳۷ درصد، کلرید سدیم (NaCl)، بیکربنات سدیم (NaHCO_3) و کلرید کلسیم از شرکت Sigma تهیه شدند.

تهیه سوسپانسیون

پروتئین ایزوله سویا (۳-۰ درصد) در بافر استات ۵ میلی مولار به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد. سپس در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه تحت تأثیر امواج فراصوت (سیستم حمام Schaper model Unique USC 25 kHz) قرار گرفت. در نهایت دیسپرسیون حاصل در $500 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای ایجاد حداکثر آب پوشی توسط پروتئین ها، محلول نهایی در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد (Huang et al., 2012).

- 1- Polystyrene sulfonate/polyallylamine hydrochloride
- 2- Octenyl Succinic Anhydride

Malvern) (انگلیس) انجام شد. برای هر نمونه سه بار اندازه‌گیری انجام شد (Ansarifar et al., 2017).

اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات نمونه‌ها به کمک دستگاه انکسار نور لیزر (Fritsch Analysette 22، آلمان) اندازه‌گیری شد. نمونه امولسیون قطره‌قطره به درون مخزن آب دستگاه اضافه شد تا ذرات امولسیون به محدوده انسداد نوری قابل قبول توسط دستگاه برسد. پس از آن ذرات به محفظه عبور نور لیزر منتقل شده توزیع اندازه ذرات از روی میزان پراکنش نور بر حسب مدل لورنزی و نظریه فرانوفر تعیین شد (Ansarifar et al., 2017).

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی

توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (Axford, S-360، انگلیس) ساختار میکروکپسول‌های تولیدی مشاهده شد. نمونه‌ها با استفاده از چسب نقره روی تیغه آلومینیومی چسبانده و توسط یک لایه نازک جنس طلا پوشانده شد. نمونه‌ها سپس در اتاقک تحت خلأ قرار گرفتند. الکترون‌های پرشتاب با ولتاژ بالا (۲۰ کیلووات) به سطح ذرات ثابت‌شده تابیده شد و بر با توجه شعاع الکترونی برگشتی از سطح، تصاویر به دست آمد.

آزمون طیف سنجی انتقال فوری مادون قرمز

گروه‌های ساختاری ترکیبات مورد استفاده در دیواره‌ها و برهم‌کنش‌های بین آن‌ها با آزمون طیف سنجی انتقال فوری مادون قرمز (FTIR^۱) ارزیابی شد. ۲ میلی گرم از پودر امولسیون‌های خشک‌شده بین ۲۰۰ میلی گرم قرص‌های برمید پتاسیم فشرده شد و طیف‌های آن‌ها با دستگاه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (Shimadzu 6650, Japan) در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ اندازه‌گیری شدند (Noshad et al., 2015).

راندمان ریز پوشانی

راندمان ریز پوشانی، با اندازه‌گیری مقدار لیمون در پودر تولیدی و مقدار اولیه آن در امولسیون مطابق رابطه ۱ محاسبه شد:

$$100 \times (\text{لیمون در امولسیون اولیه (گرم) / مقدار لیمون در پودر رابطه (۱)}) = \text{راندمان ریز پوشانی (گرم)}$$

برای اندازه‌گیری لیمون موجود در میکروکپسول‌ها، یک گرم از پودر تولیدی را با ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه به داخل لوله آزمایش با

درب پیچی ریخته و به مدت یک دقیقه با شیکر لوله (ZX3, velp scientifica, Italy) هم زده شد. سپس ۲۰ میلی لیتر هگزان به آن اضافه گردید و مجدد به مدت یک دقیقه با شیکر لوله هم زده شد. لوله آزمایش را در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۰ دقیقه داخل حمام آب گرم گذاشته و هم می‌زنیم. سپس در دمای اتاق سرد شد و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد تا حلال جدا گردد. مقدار جذب لیمون رهائش یافته در طول موج ۲۵۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت و ثبت گردید (Soottitantawat, Yoshii, Furuta, Ohkawara, and Linko, 2003). منحنی کالیبراسیون با استفاده از لیمون و هگزان رسم شد و از حلال هگزان به عنوان شاهد بدون لیمون برای صفر کردن دستگاه استفاده گردید.

بررسی رهائش لیمون

برای ارزیابی نحوه رهائش لیمون درون پوشانی شده، رهائش میکروکپسول‌های دو و شش لایه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (دمای معادل بدن) و تنش برشی دهان شامل: ۰، ۵۰ و ۱۰۰ دور در دقیقه و مدت ۷ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. برای اعمال تنش برشی از دستگاه شبیه‌ساز دهان طراحی شده توسط گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد، استفاده شد. تنظیم pH روی ۶/۸ با استفاده از محلول‌های ۰/۱ نرمال اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم صورت گرفت. تولید بزاق با استفاده از روش Zandi و همکاران (۲۰۱۴) انجام گردید.

بررسی رهائش لیمون درون پوشانی شده از میکروکپسول‌های دو و شش لایه تولیدی در شرایط دهانی انجام پذیرفت. میزان رهائش در حضور بزاق مصنوعی تولیدشده، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در تنش برشی ۰، ۵۰ و ۱۰۰ معکوس ثانیه انجام شد. نسبت بزاق مصنوعی به میکروکپسول بر اساس پژوهش زندگی و همکاران (Zandi et al., 2014) تعیین شد، به نحوی که میکروکپسول‌ها با بزاق به نسبت ۴ به ۱ مخلوط و رهائش بررسی شد (Zandi et al., 2014).

برای رسم پروفایل رهائش لیمون در بزاق، در بازه‌های زمانی معین مقدار ۱ میلی لیتر از نمونه با استفاده از سرنگ از مخزن دهان مصنوعی برداشته و از کاغذ واتمن با شماره ۱، صاف شد تا دیواره‌ها و ذرات میکروکپسول رهائش نیافته از محیط جدا گردند. در نهایت نمونه خارج شده از کاغذ صافی برای اندازه‌گیری میزان لیمون موجود در آن از روش طیف سنج مرئی-فرابنفش و طول موج ۲۵۲ نانومتر استفاده شد (Rodríguez, Wilderjans, Sosa, & Bernik, 2013).

مدل سازی رهایش لیمون

برای بررسی رهایش لیمون از میکروکپسول های دو و شش لایه و ارزیابی سرعت رهایش آن، از مدل های مختلفی شامل معادله درجه صفر^۱ (رابطه ۲)، درجه اول^۲ (رابطه ۳)، کورسمیر-پیپاس^۳ (رابطه ۴) و هیگوچی^۴ (رابطه ۵) استفاده شد (Dash, Murthy, Nath, & Chowdhury, 2010).

$$C = K_0 t \quad \text{رابطه (۲)}$$

$$\ln M_t = \ln M_0 - K_1 \times t \quad \text{رابطه (۳)}$$

$$C = K_{KP} t^n \quad \text{رابطه (۴)}$$

$$C = K_H t^{0.5} \quad \text{رابطه (۵)}$$

در این روابط C غلظت لیمون آزاد شده در زمان t، n توصیف کننده فرایند رهایش و K₀ ثابت کینتیکی برای معادله درجه صفر، K₁ ثابت معادله درجه اول، K_{KP} ثابت کورسمیر-پیپاس و K_H ثابت هیگوچی بوده، پارامتر n مشخص کننده مکانیسم های مختلف رهایش است.

برای محاسبه ضریب نفوذ از مدل تجربی معرفی شده توسط سیپمان و سیپمان (Siepmann and Siepmann, 2008) که برآمده از قانون فیک است، استفاده شد. این قانون برای ذرات کروی که تحت فرایندهایی با مدت زمان کوتاه قرار می گیرند و شرایطی که مقدار رهایش کمتر از ۴۰ درصد باشد، استفاده شد:

$$\frac{M_t}{M_0} = 6 \left(\frac{D t}{r^2} \right)^{\frac{1}{2}} - \frac{3 D t}{r^2} \quad \frac{M_t}{M_0} < 0.4 \quad \text{رابطه (۶)}$$

در رابطه (۶)، t زمان رهایش (ثانیه)، D ضریب نفوذ (مترمربع بر ثانیه)، M₀ و M_t به ترتیب مقدار لیمون آزاد شده در زمان t و صفر و R بیانگر شعاع میکروکپسول است که شعاع میکروکپسول دو لایه ۵/۶ میکرون و شعاع میکروکپسول شش لایه ۶/۷ میکرون توسط دستگاه انکسار نور لیزر (مدل Shimadzu, SALD-2101، ساخت ژاپن) اندازه گیری شد.

آنالیز آماری و برازش نتایج

از طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی برای آنالیز آماری داده ها استفاده شد. کلیه آزمون ها حداقل در سه تکرار انجام شد. از آزمون دانکن برای تعیین اختلاف بین میانگین اعداد استفاده گردید.

برازش داده های آزمایشگاهی حاصل از رهایش لیمون با استفاده از معادله های تجربی و به کمک نرم افزار متلب (نسخه 2016 a) صورت گرفت و بر اساس بالاترین ضریب همبستگی، بهترین مدل

انتخاب و پیشنهاد شد. از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۹ برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج و بحث

تهیه امولسیون اولیه و ثانویه

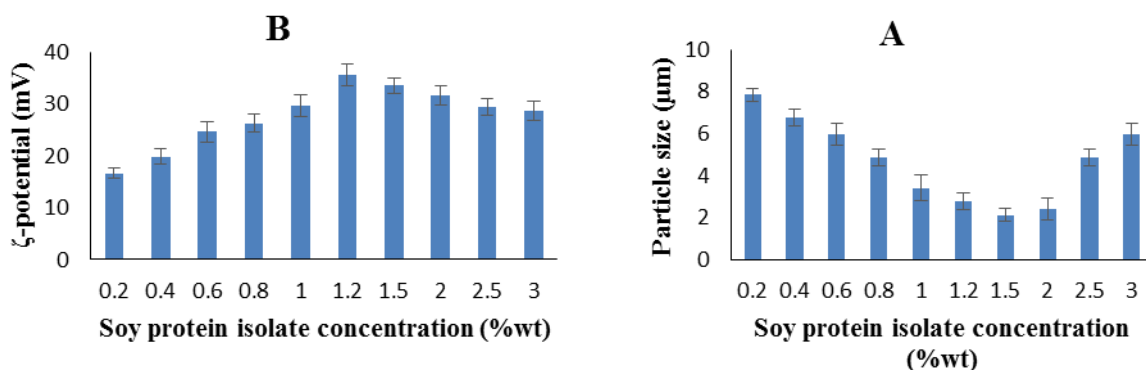
اندازه ذرات امولسیون از مهم ترین ویژگی های هر امولسیون بوده که هر چه کوچک تر باشد پایداری بیشتری برخوردار است. هرچه پتانسیل زتا امولسیون بیشتر باشد به دلیل افزایش نیروهای دافعه الکترواستاتیک و هیدراسیونی، پایداری امولسیون بیشتر می شود (Güzey and McClements, 2006). از متغیرهای اندازه ذرات و پتانسیل زتا برای انتخاب مقدار بهینه ایزوله پروتئین سویا جهت تشکیل امولسیون اولیه پایدار استفاده شد.

نتایج بررسی تغییرات اندازه قطرات در سطوح مختلف غلظت ایزوله پروتئین سویا نشان داد که با افزایش غلظت این پروتئین تا ۱/۵ درصد اندازه ذرات تشکیل شده کاهش یافت. افزایش غلظت ایزوله پروتئین سویا از ۱/۵ تا ۲ درصد تغییر محسوسی بر اندازه ذرات نداشت اما با افزایش غلظت ایزوله پروتئین تا ۳ درصد، اندازه ذرات افزایش یافت (شکل ۱A).

طی فرایند هموژن کردن، ذرات بزرگ امولسیون شکسته و باعث تولید ذرات کوچک تر می شود لذا سطح و تعداد ذرات امولسیون افزایش می یابد. اگر ایزوله پروتئین سویا در این حین به مقدار کافی موجود نباشد، سطح مشترک بین هسته و آب به صورت کامل پوشش داده نشده لذا ذرات کوچک تولید شده از طریق تشکیل پل عرضی و یا تشکیل خوشه به هم متصل می شوند. در نتیجه اندازه ذرات افزایش می یابد. همچنین با افزایش مقدار ایزوله پروتئین سویا در محیط امولسیون، پدیده فلوکوله شدن ناقص و درهم آمیختگی ذرات اتفاق افتاده و باعث افزایش اندازه ذرات امولسیون می شود. لذا برای ایجاد پایداری مناسب، غلظت ایزوله پروتئین سویا باید به صورت بهینه استفاده شود تا تمام سطح مشترک لیمون-آب را بپوشاند.

محبی و همکاران (Mohebbi et al., 2019) نشان دادند با افزایش پروتئین سویا تا ۱ درصد، اندازه میانگین ذرات امولسیون کاهش معنی داری داشت و بعد از آن با افزایش میزان پروتئین سویا، اندازه ذرات درشت تر شدند. کوردیگ و روزچ (Corredig and Roesch, 2002) نتایج مشابهی را گزارش دادند؛ آن ها نشان دادند که میانگین اندازه قطرات امولسیون ها، با افزایش غلظت پروتئین سویا، کاهش معنی داری داشت و سپس از یک غلظت مشخص به بعد با افزایش آن، اندازه قطرات امولسیون تقریباً ثابت باقی ماند.

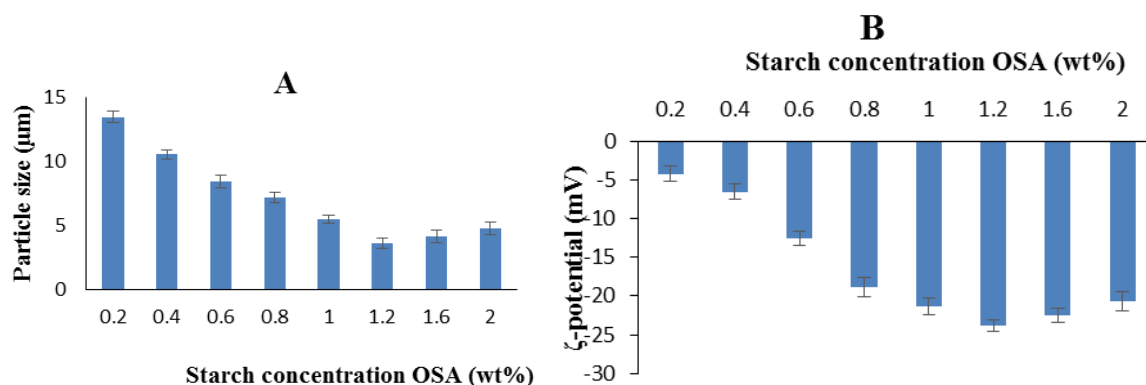
- 1- zero-order
- 2- First order model
- 3- Korsemeyer –Peppas
- 4- Higuchi



شکل ۱- تأثیر غلظت ایزوله پروتئین سویا بر A: اندازه ذرات امولسیون اولیه و B: پتانسیل زتا امولسیون اولیه
Fig. 1- Effect of soy protein isolate concentration on A: particle size and B: zeta potential of initial emulsion

به وسیله غلظت ۱/۵ درصد ایزوله پروتئین سویا پایدار شده بود، اضافه شد. بهینه یابی غلظت نشاسته اصلاح شده با اندازه گیری اندازه ذرات امولسیون دوم و پتانسیل زتا انجام شد. بررسی تغییرات اندازه ذرات امولسیون ثانویه در مقادیر مختلف نشاسته اصلاح شده نشان داد که با افزایش غلظت نشاسته تا ۱/۲ درصد، کاهش معنی داری در قطر ذرات مشاهده شد؛ همچنین افزایش آن تا ۲ درصد تأثیری بر اندازه ذرات ندارد که این امر به این دلیل است که غلظت ۱/۲ درصد نشاسته اصلاح شده بالاترین توانایی پوشش دهی قطرات ذرات و پایداری آن‌ها بعد از تشکیل امولسیون دوم را دارد (شکل ۲A).

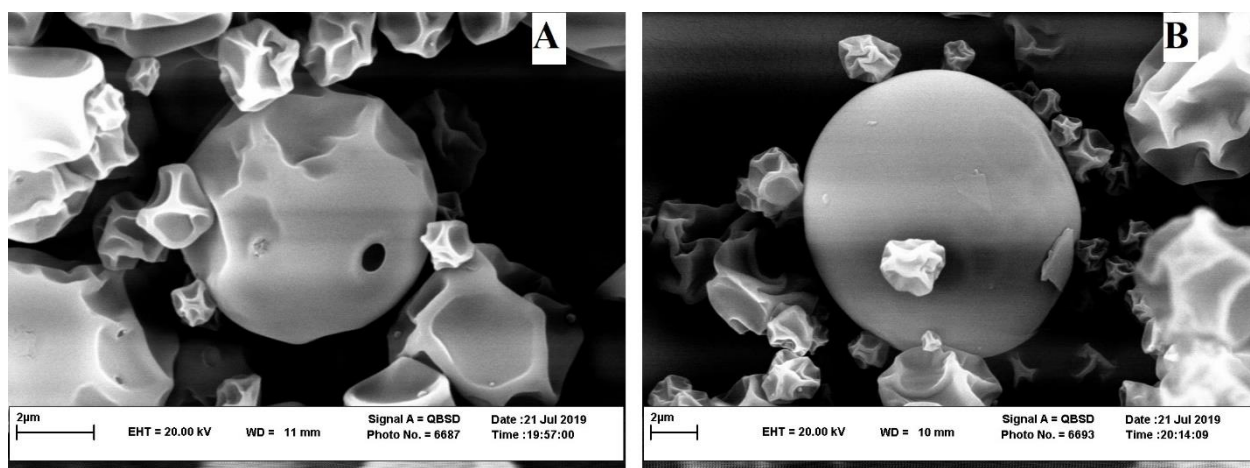
نتایج پتانسیل زتا نشان می‌دهد که سطح قطرات امولسیون اولیه دارای بار الکتریکی مثبت بوده با توجه به pH نمونه‌ها (pH = ۳/۵) و نقطه ایزوالکتریک ایزوله پروتئین سویا (pH = ۴/۶) قابل انتظار است. تغییرات پتانسیل زتای نمونه‌ها با افزایش غلظت ایزوله پروتئین سویا تا ۱/۵ درصد، افزایشی بوده و بعد از آن تغییرات محسوسی مشاهده نشد لذا غلظت ۱/۵ درصد ایزوله پروتئین سویا بیشترین توانایی را در پوشش دهی سطح مشترک ذرات لیمون- آب را دارد (شکل ۱B). برای تولید امولسیون با لایه دوم، از نشاسته اصلاح شده در غلظت‌های مختلف (۰-۲ درصد) استفاده و به امولسیون اولیه که



شکل ۲- تأثیر غلظت نشاسته اصلاح شده بر A: اندازه ذرات و B: پتانسیل زتا امولسیون دوم
Fig. 2- Effect of modified starch concentration on A: particle size and B: zeta potential of the second emulsion

مقدار منفی بزرگتری می‌شود که به علت اثر پوشش دهی زنجیره‌های نشاسته است و سطح اطراف مولکول‌های پروتئین سویا (لایه اولیه) را احاطه می‌کند. نوشاد و همکاران (Noshad et al., 2016) برای میکروکپسولاسیون وانیلین، مقادیر ۱ درصد ایزوله پروتئین سویا و ۰/۸ درصد نشاسته را به عنوان شرایط بهینه برای پوشش دهی لایه های اولیه و ثانویه، گزارش کردند (Noshad et al., 2016).

مقدار پتانسیل زتا در شرایط استفاده از غلظت‌های مختلف نشاسته اصلاح شده در شکل ۲B، آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود ذرات امولسیون دوم دارای بار الکتریکی منفی بوده که به دلیل نوع استخلاف‌های زنجیره پلی ساکاریدی (بنیان‌های انهدرو اکتئیل سوکسینات) موجود در مولکول‌های نشاسته است. با افزایش غلظت نشاسته اصلاح شده تا ۱/۲ درصد بار الکتریکی سطح ذرات



شکل ۳- تصاویر SEM میکروکپسول های چند لایه؛ A: دو لایه و B: شش لایه
Fig. 3- SEM images of multilayered microcapsules; A: two layers and B: six layers

میکروسکوپ الکترونی روبشی

از تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) برای بررسی ویژگی های مورفولوژی نظیر شکل ظاهری و اندازه میکروکپسول های دو و شش لایه تهیه شده با امولسیون های چند لایه، استفاده شد. تصاویر SEM میکروکپسول های با تعداد لایه های ۲ و ۶ لایه در شکل ۳ آورده شده است. همان طور که در شکل ۳A (مربوط به میکروکپسول با دو لایه) مشاهده می شود دیواره دارای حفره، ترک خوردگی و چروکیدگی است. در مراحل اولیه خشک کردن، سرعت خروج رطوبت بالا بوده و از طرفی دیواره از استحکام کافی برای تحمل تنش های ناشی از خروج رطوبت از دیواره ها نبوده لذا میکروکپسول دارای حفرات است (Sagis et al., 2008).

همان طور که در تصویر مشاهده می شود، میکروکپسول های شکل ۳B (میکروکپسول با دیواره شش لایه) سطحی صاف، فاقد حفرات و ترک خوردگی داشت که علت آن استحکام دیواره ها به دلیل افزایش تعداد لایه ها است. هومبولت هوا و همکاران (Humblet-Hua et al., 2011) و انصاری فر و همکاران (Ansarifar et al., 2017) نشان دادند تمایل به چروکیدگی و ترک خوردگی در میکروکپسول های با لایه های کمتر، بسیار زیاد بوده اما با افزایش تعداد لایه های میکروکپسول ها، شکل آن ها کروی و ساختار دیواره صاف و یکنواخت تر می شود.

آزمون طیف سنجی انتقال فوریه مادون قرمز

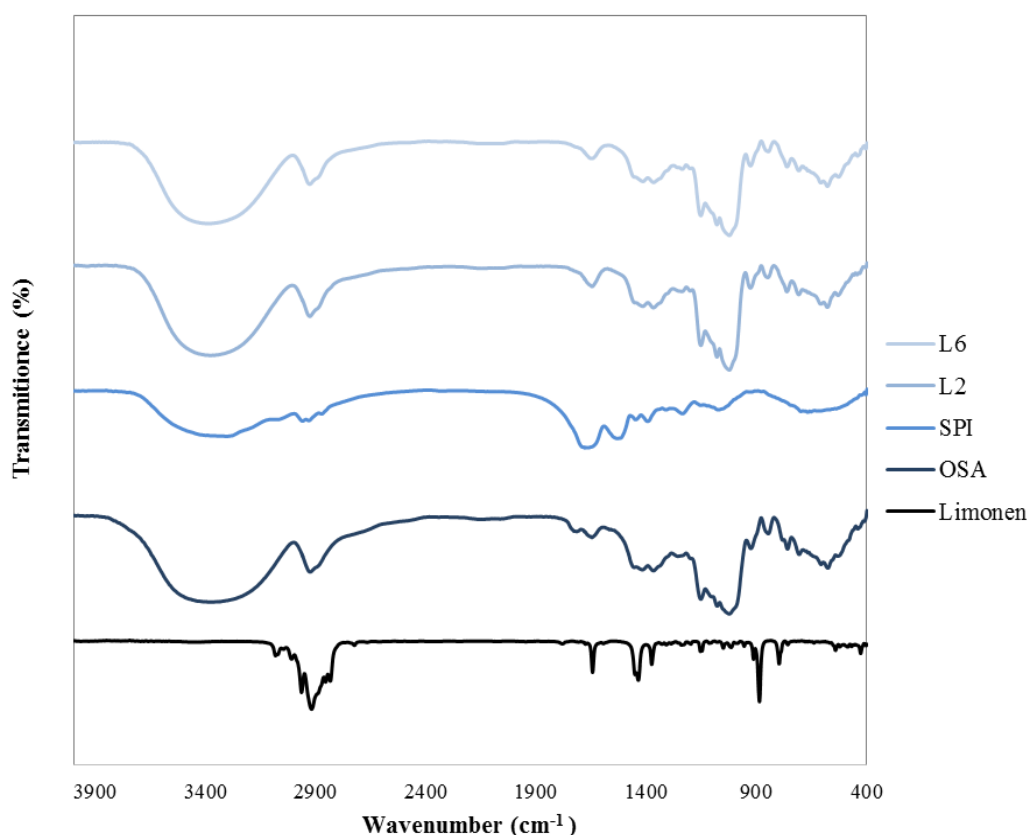
جهت تعیین ساختار میکروکپسول های تولیدی، آزمون FTIR انجام شد. طیف مادون قرمز میکروکپسول های دو و شش لایه و مواد

اولیه بکار رفته در دیواره در ناحیه $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ در دمای اتاق (25°C) ثبت شد (شکل ۴). برای نمونه لیمون، پیک های ناحیه 1375 cm^{-1} (CH_3 خمشی)، 1437 cm^{-1} (CH_2 خمشی)، 1644 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$)، 2835 cm^{-1} تا 2965 cm^{-1} ($\text{C}-\text{H}$ آلیفاتیک کششی) و 3083 cm^{-1} ($\text{C}-\text{H}$ هیدریداسیون sp^2) قابل مشاهده است. پیک محدوده 3400 مربوط به گروه های آزاد پیوند شده $\text{N}-\text{H}$ و $\text{O}-\text{H}$ است. پیک های موجود در حدود 1650 ، 1537 و 1240 به ترتیب متعلق هستند به $\text{C}=\text{O}$ نوسان کششی (آمید I)، $\text{N}-\text{H}$ نوسان خمشی (آمید II) و $\text{N}-\text{H}$ در سطح و $\text{C}-\text{N}$ نوسان کششی (آمید III) (Wang et al., 2011). در طیف نشاسته اصلاح شده، عدد مربوط به موج $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه پیوندهای $\text{C}-\text{H}$ گروه های متیل است و نوار عریض که مرکز آن حدود 3387 cm^{-1} بوده، به علت حضور گروه های هیدروکسیل است. همچنین پیک های متعددی نیز در این ناحیه طیف نشاسته اصلاح شده وجود دارند که نشان دهنده حضور پیوندهای کششی $\text{C}=\text{O}$ و $\text{C}-\text{N}$ است. پیک های موجود در ناحیه $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$ ارتعاشات متعدد پیوندهای $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ و $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ گلیکوزیدی را نشان می دهد (Luo, Huang, Fu, Zhang, and Yu, 2009).

سطح خارجی ذرات ریز پوشانی شده دو لایه نشاسته اصلاح شده است همان طور که در شکل مشاهده می شود پیک محدوده 3000 تا 3500 نسبت به ایزوله پروتئین سویا تیزتر و بزرگ تر شده است. تیز شدن پیک در این منطقه نشان دهنده تشکیل پیوندهای هیدروژنی را بیان می کند. همچنین پیک های مربوط به ویژگی های پروتئین در نواحی 1654 cm^{-1} که نشان دهنده پیوندهای کششی $\text{C}=\text{O}$ است، حفظ شده اند. بررسی پیک ها نشان داد لیمون باعث کاهش یک واحدی در ناحیه های 1418 ، 1627 و 2927 cm^{-1} شده است.

شدن لایه‌های ایزوله پروتئین سویا بود و تأثیر آن بر پیک‌های لایه ششم است.

بررسی پیک‌های نمونه‌های با شش لایه نشان داد که تقریباً از همه پیک‌ها و سطح زیر نمودار کاسته شده است که به دلیل افزوده



شکل ۴- طیف‌های FTIR مواد اولیه میکروکپسول (لیمونن، ایزوله پروتئین سویا SPI، نشاسته اصلاح شده OSA) و میکروکپسول‌های دو و شش لایه

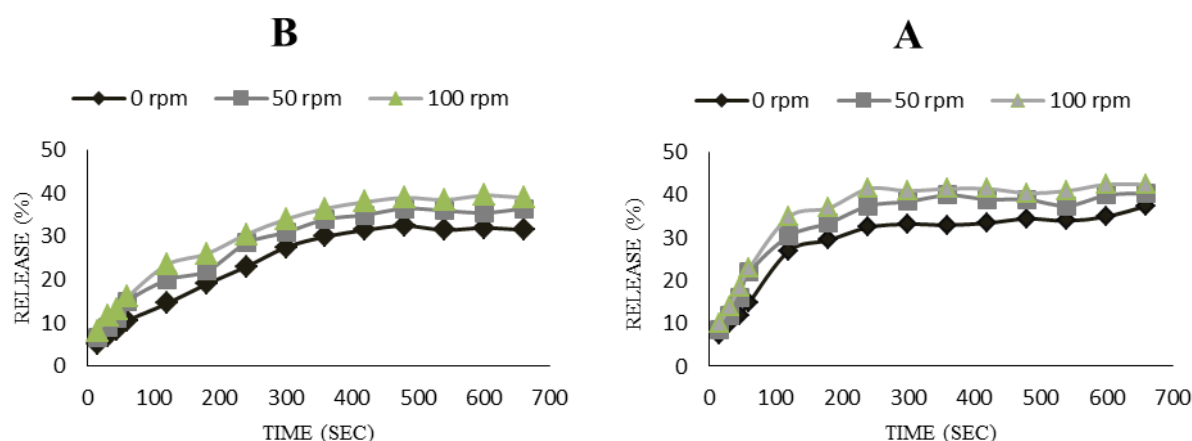
Fig. 4- FTIR spectra of microcapsule raw materials (limonene, soy protein isolate SPI, modified starch OSA) and two- and six-layer microcapsules

شرایط دهان مصنوعی نشان داده شده است. این نتایج نشان داد که اعمال تنش برشی، سرعت رهایش لیمونن افزایش می‌یابد. تنش برشی اعمال شده همانند یک نیروی فشاری عمل می‌کند و منجر به خروج لیمونن از منافذ میکروکپسول‌ها می‌شود. همچنین این تنش برشی باعث تخریب برخی از میکروکپسول‌ها شد و میزان انتشار لیمونن به محیط افزایش می‌یابد. انصاری فر و همکاران (Ansarifar *et al.*, 2017) محبی و همکاران (Mohebbi *et al.*, 2019) زندگی و همکاران (Zandi *et al.*, 2014) و ون راث و روژن (Van Ruth *et al.*, 2000) گزارش نمودند که با افزایش نیروی برشی دهانی، سبب افزایش سرعت رهایش آروما و مزه از ماتریکس کپسوله کننده می‌گردد.

بررسی رهایش از میکروکپسول‌های دو و شش لایه محتوی لیمونن

میزان رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های دو و شش لایه به‌عنوان تابعی از زمان در شکل ۵ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش تعداد لایه‌ها، زمان رهایش لیمونن افزایش یافت. در میکروکپسول‌های دو لایه نسبت به شش لایه زمان رهایش حداکثری بیشتر بود که به دلیل افزایش لایه‌ها، حفرات و شکستگی در سطح میکروکپسول‌ها کاهش یافته و پوشش دهی منسجم‌تری اطراف قطرات لیمونن شکل می‌گیرد که منجر به کاهش سرعت انتقال آن به خارج از میکروکپسول می‌شود.

در شکل B و ۵A پروفایل رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های دو و شش لایه به‌صورت تابعی از تنش برشی محیط رهایش در



شکل ۵- پروفایل رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های A: دو لایه و B: شش لایه به‌عنوان تابعی از زمان رهایش تحت تأثیر تنش‌های برشی مختلف

Fig. 5- Limonene release profile from microcapsules A: two layers and B: six layers as a function of release time under the influence of different shear stresses

جدول ۱- پارامترهای حاصل از برازش مدل‌های مختلف بر نتایج تجربی برای میکروکپسول‌های چند لایه

Table 1- Parameters obtained from fitting different models on experimental results of multilayer microcapsules

Layers of microcapsule	Chewing rate	Zero-order		First order		Korsemeyer –Peppas			Higuchi	
		K	R ²	K	R ²	n	K	R ²	K	R ²
L2	0	0.391	0.92	0.0345	0.97	0.220	0.687	0.96	0.491	0.92
	50	0.437	0.87	0.0413	0.96	0.268	0.702	0.92	0.628	0.83
	100	0.461	0.86	0.0457	0.95	0.313	0.863	0.91	0.712	0.88
L6	0	0.214	0.75	0.0192	0.92	0.324	0.456	0.92	0.243	0.89
	50	0.253	0.79	0.0253	0.98	0.359	0.523	0.91	0.312	0.77
	100	0.286	0.81	0.0302	0.97	0.363	0.571	0.93	0.421	0.86

داده، این نوع رهایش به‌عنوان مکانیسم اصلی در رهایش لیمونن از میکروکپسول‌ها است (جدول ۱).

همان‌طور که گفته شد برای محاسبه ضریب نفوذ از مدل ارائه شده توسط سیپمان و همکاران (Siepmann et al., 2013) که برآمده از قانون فیک برای فرایندهایی با مدت زمان کوتاه و شرایطی که رهایش ترکیبات ریز پوشانی شده کمتر از ۴۰ درصد باشد، استفاده شد (معادله ۶). جدول ۲ مقدار ضریب نفوذ را برای فرآیند رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های دو و شش لایه را در شرایط نیروی برشی ۵۰ و ۱۰۰ S⁻¹ نشان می‌دهد. نتایج نشان داد میکروکپسول‌های شش لایه نسبت به میکروکپسول‌های دو لایه دارای ضریب نفوذ کمتری می‌باشند در نتیجه باعث سرعت رهایش لیمونن کمتر می‌شود. این امر احتمالاً به دلیل افزایش ضخامت پوسته میکروکپسول شش لایه و همچنین پوشش نشاسته اصلاح‌شده اطراف پوسته‌ها است که باعث کاهش سرعت انتشار لیمونن از میکروکپسول‌های شش لایه می‌شود. با افزایش نیروی برشی، ضریب نفوذ افزایش یافته و در

مدل‌های رهایش و بررسی ضریب نفوذ

برای بررسی مکانیسم رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های دو و شش لایه، مدل‌های ریاضی سینتیکی مختلفی با داده‌های تجربی رهایش لیمونن از میکروکپسول‌ها، برازش شد. پارامترهای حاصل از مدل‌های تجربی درجه صفر، درجه یک، کورسمیر-پیپاس و هیگوچی در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد مدل کینتیکی درجه اول بهترین توصیف را برای رهایش لیمونن از کپسول‌های دو و شش لایه در شرایط مختلف را داشت.

پارامتر n که توان موجود در رابطه کورسمیر-پیپاس بوده به‌عنوان شاخصی از مکانیسم رهایش لیمونن از میکروکپسول‌های چند لایه، محاسبه شد. نتایج حاصل از برازش داده‌های رهایش لیمونن نشان داد که این شاخص در محدوده بین ۰/۲۲ تا ۰/۳۶ قرار گرفته که نشان‌دهنده این است که رهایش بر اساس مکانیسم نفوذ فیک^۱ رخ

1- Fickian diffusional

نتیجه سرعت رهائش در میکروکپسول‌های دو و شش لایه افزوده می‌شود. تنش برشی به‌عنوان یک نیروی فشاری باعث این افزایش سرعت رهائش می‌شود. همچنین این تنش به تخریب میکروکپسول‌ها کمک کرده در نتیجه سبب افزایش میزان انتشار لیمونن به محیط نیز می‌شود.

جدول ۲- ضریب نفوذپذیری برای رهائش لیمونن از میکروکپسول چند لایه در نیروی برشی مختلف

Table 2- Diffusion coefficient for the release of limonene from multilayered microcapsules at different shear rates

	Shear rate (S ⁻¹)	Two layers (L ₂)	Six layers (L ₆)
Diffusion coefficient (cm ² /s)	0	4.125×10 ⁻⁹	8.465×10 ⁻¹⁰
	50	8.995×10 ⁻⁹	4.362×10 ⁻⁹
	100	2.114×10 ⁻⁸	6.682×10 ⁻⁹

دو لایه دارای ضریب نفوذ کمتری بودند، پس در شرایط یکسان تنش برشی، سرعت رهائش لیمونن از میکروکپسول‌های شش لایه کمتر از میکروکپسول‌ها دو لایه بوده که این امر به دلیل تکرار پوشش ایزوله پروتئین سویا و نشاسته اصلاح‌شده اطراف میکروکپسول و افزایش ضخامت دیواره‌ها است که باعث کاهش سرعت انتشار لیمونن از میکروکپسول‌های شش لایه می‌شود.

سپاسگزاری

مقاله علمی-پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۳/۴۵۰۲۷ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد است. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد همچنین معاونت پژوهش و فناوری دانشکده کشاورزی به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد از روش لایه به لایه می‌توان برای تولید میکروکپسول‌های لیمونن استفاده کرد. ایزوله پروتئین سویا و نشاسته اصلاح‌شده به‌خوبی توانایی پوشش دهی قطرات لیمونن را دارند. تصاویر SEM به‌خوبی نشان داد که ساختار میکروکپسول‌های شش لایه فاقد ترک‌خوردگی و حفرات بوده و سطح یکنواخت‌تری نسبت به میکروکپسول‌های دو لایه دارد.

به‌منظور بررسی مکانیسم رهائش لیمونن از میکروکپسول‌های دو و شش لایه، از مدل‌های کینتیکی مختلف برای برازش داده‌های تجربی رهائش استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که رهائش از این میکروکپسول‌ها بر اساس مکانیسم نفوذ و قانون فیک رخ داده است که به‌عنوان اصلی‌ترین مکانیسم انتقال جرم در فرایند رهائش است. همچنین نتایج بررسی رهائش میکروکپسول‌های دو و شش لایه نشان داد که میکروکپسول‌های شش لایه نسبت به میکروکپسول‌های

منابع

1. Ansarifar, E., Mohebbi, M., Shahidi, F., Koocheki, A., & Ramezani, N. (2017). Novel multilayer microcapsules based on soy protein isolate fibrils and high methoxyl pectin: Production, characterization and release modeling. *International Journal of Biological Macromolecules* 97: 761-769. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.056>.
2. Ansarifar, E., Shahidi, F., Mohebbi, M., Koocheki, A., & Ramazanian, N. (2017). Investigation of multilayer microcapsules based on electrostatic adsorption of soy protein isolated fibrils and high methoxyl pectin containing diacetyl. *Iranian Journal Food Science and Technology Research* 13(4): 553-565.
3. Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* 67(3): 217-223.
4. Decher, G., & Hong, J. (1991). Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: II. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 95(11): 1430-1434. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19910951122>.
5. Decher, G., & Schlenoff, J.B. (2006). *Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials*: John Wiley & Sons.
6. Dokić, L., Krstonošić, V., & Nikolić, I. (2012). Physicochemical characteristics and stability of oil-in-water emulsions stabilized by OSA starch. *Food Hydrocolloids* 29(1): 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.008>.
7. Elzoghby, A.O., Samy, W.M., & Elgindy, N.A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 157(2): 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.008>.

8. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* 40(9): 1107-1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.
9. Gunning, Y.M., Gunning, P.A., Kemsley, E.K., Parker, R., Ring, S.G., Wilson, R.H., & Blake, A. (1999). Factors affecting the release of flavor encapsulated in carbohydrate matrixes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(12): 5198-5205. <https://doi.org/10.1021/jf990039r>.
10. Güzey, D., & McClements, D.J. (2006). Influence of environmental stresses on O/W emulsions stabilized by β -lactoglobulin-pectin and β -lactoglobulin-pectin-chitosan membranes produced by the electrostatic layer-by-layer deposition technique. *Food Biophysics* 1(1): 30-40. <https://doi.org/10.1007/s11483-005-9002-z>.
11. Huang, G.-Q., Sun, Y.-T., Xiao, J.-X., & Yang, J. (2012). Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry* 135(2): 534-539. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.140>.
12. Humblet-Hua, K., Scheltens, G., Van Der Linden, E., & Sagis, L. (2011). Encapsulation systems based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids* 25(4): 569-576. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.003>.
13. Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying technology* 26(7): 816-835. <https://doi.org/10.1080/07373930802135972>.
14. Luo, F.-x., Huang, Q., Fu, X., Zhang, L.-x., & Yu, S.-j. (2009). Preparation and characterisation of crosslinked waxy potato starch. *Food Chemistry* 115(2): 563-568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.052>.
15. McClements, D.J. (2005). Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions. *Langmuir* 21(21): 9777-9785. <https://doi.org/10.1021/la0512603>.
16. Mendanha, D.V., Ortiz, S.E.M., Favaro-Trindade, C.S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E.S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International* 42(8): 1099-1104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>.
17. Mohebbi, M., Varidi, M., Noshad, M., & Khalilian Movahhed, M. (2019). Evaluation of the Release of Microcapsulated Vanillin under Simulated Oral Conditions. *Research and Innovation in Food Science and Technology* 8(2): 111-124. <https://doi.org/10.22101/JRIFST.2019.07.22.821>.
18. Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* 1: 1806-1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>.
19. Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2012). Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International* 48(2): 387-396. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.023>.
20. Nilsson, L., & Bergenståhl, B. (2007). Adsorption of hydrophobically modified anionic starch at oppositely charged oil/water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 308(2): 508-513. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.01.024>.
21. Noshad, M., Mohebbi, M., Koocheki, A., & Shahidi, F. (2016). Influence of interfacial engineering on stability of emulsions stabilized with soy protein isolate. *Journal of Dispersion Science and Technology* 37(1): 56-65. <https://doi.org/10.1080/01932691.2015.1027907>.
22. Noshad, M., Mohebbi, M., Shahidi, F., & Koocheki, A. (2015). Effect of layer-by-layer polyelectrolyte method on encapsulation of vanillin. *International Journal of Biological Macromolecules* 81: 803-808. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.012>.
23. Peyratout, C.S., & Daehne, L. (2004). Tailor-made polyelectrolyte microcapsules: from multilayers to smart containers. *Angewandte Chemie International Edition* 43(29): 3762-3783. <https://doi.org/10.1002/anie.200300568>.
24. Qiu, X., Leporatti, S., Donath, E., & Möhwald, H. (2001). Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles. *Langmuir* 17(17): 5375-5380. <https://doi.org/10.1021/la010201w>.
25. Rodríguez, S.D., Wilderjans, T., Sosa, N., & Bernik, D.L. (2013). Image texture analysis and gas sensor array studies applied to vanilla encapsulation by octenyl succinic anhydride starches. *Journal of Food Research* 2(2): 36-48. <https://doi.org/10.5539/jfr.v2n2p36>.
26. Roesch, R., & Corredig, M. (2002). Characterization of oil-in-water emulsions prepared with commercial soy protein concentrate. *Journal of Food Science* 67(8): 2837-2842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08825.x>.
27. Sagis, L.M., de Ruiter, R., Miranda, F.J.R., de Ruiter, J., Schroën, K., van Aelst, A. C., van der Linden, E. (2008). Polymer microcapsules with a fiber-reinforced nanocomposite shell. *Langmuir* 24(5): 1608-1612. <https://doi.org/10.1021/la7032115>.

28. Siepmann, J., Siegel, R.A., & Siepmann, F. (2012). *Diffusion controlled drug delivery systems*. In *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery* (pp. 127-152): Springer. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.006>.
29. Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 364(2): 328-343. <https://doi.org/j.ijpharm.2008.09.004>.
30. Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2003). Microencapsulation by spray drying: influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *Journal of Food Science* 68(7): 2256-2262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05756.x>.
31. Tesch, S., Gerhards, C., & Schubert, H. (2002). Stabilization of emulsions by OSA starches. *Journal of Food Engineering* 54(2): 167-174. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00206-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00206-0).
32. Van Ruth, S., & Roozen, J. (2000). Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system. *Food Chemistry* 71(3): 339-345. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00186-2).
33. Wang, J.-M., Yang, X.-Q., Yin, S.-W., Yuan, D.-B., Xia, N., & Qi, J.-R. (2011). Growth kinetics of amyloid-like fibrils derived from individual subunits of soy β -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(20): 11270-11277. <https://doi.org/10.1021/jf202541m>.
34. Ye, S., Wang, C., Liu, X., & Tong, Z. (2005). Multilayer nanocapsules of polysaccharide chitosan and alginate through layer-by-layer assembly directly on PS nanoparticles for release. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 16(7): 909-923. <https://doi.org/10.1163/1568562054255691>.
35. Yow, H.N., & Routh, A.F. (2006). Formation of liquid core-polymer shell microcapsules. *Soft Matter* 2(11): 940-949. <https://doi.org/10.1039/B606965G>.
36. Zandi, M., Mohebbi, M., Varidi, M., & Ramezani, N. (2014). Evaluation of diacetyl encapsulated alginate-whey protein microspheres release kinetics and mechanism at simulated mouth conditions. *Food Research International* 56: 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.035>.
37. Zuidam, N.J., & Nedovic, V. (2010). *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Springer New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0>.



Evaluation of Behavior and Modeling of Curcumin Release from Liposomes under Simulated Gastrointestinal Laboratory Conditions

S.F. Mousavi Baygi¹, A. Koocheki^{ID 2*}, B. Ghorani³, M. Mohebbi^{ID 4}

Received: 2021.11.30

Revised: 2021.12.11

Accepted: 2021.12.12

Available Online: 2021.12.12

How to cite this article:

Mousavi Baygi, S.F., Koocheki, A., Ghorani, B., & Mohebbi, M. (2023). Evaluation of behavior and modeling of curcumin release from liposomes under simulated gastrointestinal laboratory conditions. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 57-78. (In Persian with English abstract).
<http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2021.73945.1118>

Introduction

Curcumin, as a natural polyphenolic nutraceutical has been shown many health-promoting effects, mainly associated with its chemical structure. In various studies, different properties of this compound, including anti-tumor and anti-cancer activity, reduction of blood and liver cholesterol levels, increase of immune function, prevention of cardiovascular diseases, prevention of damage to biological membranes against peroxidation and anti-inflammatory properties have been reported. Despite possessing a potential health benefits to humans, the susceptibility of this polyphenol towards environmental conditions and low chemical stability has restricted the direct usage of curcumin into aqueous-based food formulations. The encapsulation of curcumin in liposomes is a potentially effective way to protect them from degradation during passing the digestive system.

Materials and Methods

Curcumin (powder, purity greater than 99%, 368.38 g/mol), lecithin, cholesterol (C3045-25G), pancreatin (extracted from porcine pancreas, P7545-25G), bile salts (B8756-10G) and calcium chloride (CaCl₂) was obtained from Sigma Aldrich (USA). Consumable ethanol was purchased from Pars Ethanol Company (96%, Iran). Lipase enzyme (extracted from pig pancreas, L8070) and pepsin (activity 3500-3000 NFU/g, P8390) were obtained from Solarbio (China). Potassium chloride, dipotassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄) and alpha-amylase enzyme with a purity of at least 99% were obtained from Merck, Germany, sodium chloride (NaCl), sodium bicarbonate (NaHCO₃) and calcium chloride were obtained from Sigma. The effect of lecithin content (0.02- 0.08 g), lecithin cholesterol ratio (0.5- 4), curcumin level (1.5- 6mg) and ultrasound treatment time (1-5 minutes) on production of liposomes containing curcumin was evaluated. The particle size, particle size distribution, zeta potential and efficiency were determined by response surface methodology. Furthermore, physical nature, molecular structure, physical stability at 4°C and 25°C and release behavior of curcumin loaded-liposome in mouth, stomach and intestines were explored.

Results and Discussion

The results showed that all independent variables had a significant effect on liposome particle size and increasing the ratio of lecithin: cholesterol caused more uniform particle size. Lecithin was determined to be the only component affecting the zeta potential of liposome particles, and increasing the ultrasound time increased the efficiency of curcumin encapsulation in liposomes. The optimal point of liposome preparation conditions in the amount of 0.08 g lecithin, 4: 1 the ratio of lecithin: cholesterol, 4.16 mg curcumin and 5 minutes the ultrasound treatment was introduced by Design Expert software. In addition, curcumin was amorphous in optimal liposome spherical particles. Furthermore, the results of TEM showed that the liposomes are in the form of single-layer particles, spherical and without membrane rupture. This

1, 2 and 4- Former Ph.D. Student and Professors, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, respectively.

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

3- Associate Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), km 12 Mashhad-Guchan Highway, PO box: 91895-157-356, Mashhad, Iran

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2021.73945.1118](http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2021.73945.1118)

makes the bilayered nature of the vesicles clearly visible in this micrograph. The size of the particles obtained from this method was consistent with the data obtained from the dynamic light scattering method. From the results of infrared spectroscopy, it can be seen that curcumin is trapped in the liposome through hydrogen bonding in the double-layered vesicle of the liposome, the phenolic ring of curcumin with the phospholipid head group, as well as the hydrophobic interactions of the aromatic rings with the acyl phospholipid chains. Liposomes were more stable at refrigeration temperature. A very small amount of curcumin was released in the simulated oral phase, which is probably due to the short time and lack of specific enzymes to disrupt the phospholipid bilayers of the liposome. Although the pepsin enzyme is unable to penetrate the liposome membrane, acidic conditions change the angle of the head and tail groups of the lipids and lead to a change in the surface charge of the liposomes. The release of curcumin from liposome vesicles was greatly increased in the intestine. This sudden increase is due to the presence of bile salts as an emulsifying agent that can disrupt the phospholipid membrane and make the membrane more fluid. In addition, pancreatic lipase is adsorbed on the surface of lipids and then hydrolyzes the phospholipid into 2-acyl and 1-acyl lysophospholipids and free fatty acids. The release behavior of curcumin under gastrointestinal conditions was based on the Fick mechanism.

Keywords: Curcumin, Liposome, Optimization, Release behavior

مقاله پژوهشی

توسعه و ارزیابی خصوصیات لیپوزوم بهینه‌یابی شده جهت درون‌پوشانی کورکومین

سیده فاطمه موسوی بایگی^۱ - آرش کوچکی^{۲*} - بهروز قرآنی^۳ - محبت محبی^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۹/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۱

چکیده

کورکومین به عنوان یک ترکیب زیست فعال چربی دوست دارای خواص سلامتی بخش ویژه‌ای می‌باشد اما پایداری کم و حساسیت بالای آن موجب محدودیت دسترسی زیستی این ماده شده است. هدف از این پژوهش طراحی و توسعه سیستم حامل لیپوزومی جهت ریزپوشانی کورکومین است. درون پوشانی ترکیبات حساس از جمله کورکومین در ساختار لیپوزومی، می‌تواند روشی موثر بر حفاظت آنها طی شرایط هضم دستگاه گوارشی باشد. هدف از این پژوهش، ارزیابی تاثیر میزان لستین (۰/۰۸ - ۰/۰۲ گرم)، نسبت لستین: کلسترول (۴ - ۵/۰)، میزان کورکومین (۶ - ۱/۵ میلی گرم) و زمان تیمار فراصوت (۵ - ۱ دقیقه) بر تولید لیپوزوم‌های حاوی کورکومین بود. نمونه بهینه با آزمون‌های تعیین اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و بازده درون پوشانی به روش تکنیک سطح پاسخ تعیین گردید و سپس ماهیت فیزیکی، ساختار مولکولی و همچنین رفتار رهائش کورکومین درون پوشانی شده در سه شرایط شبیه سازی دهان، معده و روده برای نمونه بهینه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که همه متغیرهای مستقل بر اندازه ذرات لیپوزوم دارای اثر معنی‌دار ($p < 0.01$) بود و افزایش نسبت لستین: کلسترول موجب یکنواختی هرچه بیشتر اندازه ذرات گردید. لستین تنها جزء اثرگذار بر پتانسیل ذرات تعیین شد و افزایش زمان امواج فراصوت موجب افزایش بازده درون پوشانی کورکومین در لیپوزوم گردید. نقطه بهینه تهیه لیپوزوم با بالاترین بازده درون پوشانی ($11.0 \pm 6.9\%$) و کمترین اندازه ذرات (214.174 ± 0.9 نانومتر)، توزیع اندازه ذرات (0.2 ± 0.105) و پتانسیل زتا ($31.16/541 \pm 0.31$ میلی‌ولت) در شرایط میزان لستین ۰/۰۸ گرم، نسبت لستین: کلسترول ۴:۱، میزان کورکومین ۴/۱۶ میلی گرم و تیمار فراصوت ۵ دقیقه توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت معرفی شد. کورکومین در ذرات کروی لیپوزوم بهینه به حالت آمورف بود. پایداری این لیپوزوم‌ها طی زمان تحت تاثیر دما بوده به طوری که در مقایسه با دمای ۴ درجه سانتی گراد، کورکومین بیشتری از لیپوزوم در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد رهائش یافته بود. همچنین رفتار رهائش کورکومین در شرایط دستگاه گوارش اساس مکانسیم انتشار بود.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌یابی، رفتار رهائش، کورکومین، لیپوزوم

مقدمه

درصد کورکومین، ۱۷ درصد دی‌متوکسی کورکومین و ۳ درصد بیس دمتوکسی کورکومین است (Adhikary et al., 2011). بر اساس تحقیقات انجام شده کورکومین یک ترکیب طبیعی آبریز و دارای ویژگی‌های عملکردی چشمگیری می‌باشد و در مطالعات مختلف خواص متفاوتی از این ترکیب از جمله فعالیت ضدتوموری و ضدسرطانی، کاهش سطح کلسترول خون و کبد، افزایش عملکرد ایمنی بدن، جلوگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی، جلوگیری از آسیب

امروزه به اهمیت ترکیبات زیست فعال و خواص سلامتی‌زایی آنها بیشتر توجه می‌شود، با این حال بی‌ثباتی این ترکیبات طی فرآوری (دما، اکسیژن و نور)، ذخیره‌سازی و همچنین شرایط سامانه گوارشی (اسید، آنزیم و حضور دیگر مواد مغذی)، کاربرد آنها را محدود می‌کند (Jahanshahi and Mehravar, 2009). رنگ زردچوبه توسط گروهی از پلی‌فنول‌ها به نام کورکومینوئیدها ایجاد شده است که شامل ۷۷

۱، ۲ و ۴ - به ترتیب دانش‌آموخته دکتری و استادان، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳ - دانشیار، گروه نانوفناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی (RIFST)، کیلومتر ۱۲ بزرگراه آسپایی مشهد-قوچان، صندوق پستی: ۹۱۸۹۵-۱۵۷-۳۵۶، مشهد، ایران

(Email: koochehi@um.ac.ir)

(*) - نویسنده مسئول:

ارزیابی دسترسی زیستی از طریق به دام اندازی در لیپوزوم در شرایط سیستم شبیه سازی شده دهان، معده و روده است. برای این پژوهش ابتدا شرایط فرآیند تولید لیپوزوم حاوی کورکومین بهینه شد و سپس خصوصیات لیپوزوم بهینه شده بررسی گردید و رهایش آن طی انبارمانی در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی گراد و تحت شرایط شبیه سازی دهان، معده و روده مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کورکومین (پودری، خلوص بیشتر از ۹۹ درصد، ۳۶۸/۳۸ گرم بر مول)، لستین، کلسترول (C3045-25G)، پانکراسین (استخراج شده از پانکراس خوک، P7545-25G)، نمک صفر (B8756-10G) و کلسیم کلرید (CaCl_2) از شرکت سیگما آلدریج (آمریکا) تهیه شد. اتانول مصرفی از شرکت پارس اتانول (۹۶ درصد، ایران) خریداری شد. آنزیم لیپاز (استخراج شده از پانکراس خوک، L8070) و پیپسین (فعالیت ۳۰۰۰ - ۳۵۰۰ NFU/g، P8390) از شرکت سولارابو^۱ (چین) تهیه شد. کلرور پتاسیم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم (K_2HPO_4) و آنزیم آلفا-آمیلاز با درجه خلوص حداقل ۹۹ درصد از شرکت Merck آلمان، کلرید سدیم (NaCl)، بیکربنات سدیم (NaHCO_3) و کلرید کلسیم از شرکت Sigma تهیه شدند.

تهیه لیپوزوم حاوی کورکومین

لیپوزوم حاوی کورکومین طبق روش تزریق اتانول تهیه شد. بر این اساس نسبتی از لستین به کلسترول و کورکومین در اتانول در دمای محیط حل شده و سپس محلول حاصل به طور مساوی به محلول بافر فسفات (PBS) به صورت سریع تزریق شد (pH 7.0) و در ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق همزده شد. با ورود سریع اتانول در محیط آبی و رقیق شدن آن، مولکول های لیپید رسوب کرده و ساختار کوچک و تک لایه ای غشاء ماندی تشکیل می شود. در نهایت محلول مخلوط شده به یک فلاسک ته گرد منتقل شد و روی اوپراتور چرخشی در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت تا اتانول به طور کامل تبخیر شود. لیپوزوم های تهیه شده جهت کاهش اندازه تحت انرژی فراصوت با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (VCX750، SONICS، آمریکا) به مدت معلوم (دقیقه) با توان ۷۵۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز پراکنده شدند. در این مرحله برای جلوگیری از اثر انرژی بیش از حد امواج صوتی که منجر به سیالیت غشای لیپوزومی و تخریب دیواره می شود، نمونه ها در حمام یخ قرار داده شد. همچنین برای جلوگیری از شکست غشای لیپوزومی و ایجاد شکل گیری مجدد، به

غشاء های زیستی در مقابل پراکسیداسیون، خاصیت ضد التهابی و کاهش آرتروز روماتیسمی و حفاظت در مقابل بیماری آلزایمر گزارش شده است (Ravichandran, 2013). با وجود منافع مذکور برای کورکومین، حلالیت پایین در محیط آبی، حساسیت به شرایط محیطی به خصوص pH، دما و پایین بودن دسترسی زیستی این ترکیب در سیستم گوارشی (۱۰ تا ۳۰ درصد کورکومین مصرفی) (Lin et al., 2011; 2009 Chavhan et al.) باعث محدود شدن کاربرد این ترکیب در صنایع غذایی شده است. بنابراین، استفاده از یک راهبرد محافظت کننده، که مولکول ها را تا زمان مصرف به شکل فعالشان حفظ کند و یا آنها را به بافت مورد نظر انتقال دهد، ضروری به نظر می رسد. در این راستا، سامانه های انتقال مواد بر اساس به دام اندازی و حفاظت از این مواد مورد توجه هستند. در چند دهه اخیر استفاده از فناوری نانو برای درون پوشانی ترکیبات زیست فعال به منظور ویژگی های منحصر به فرد نانوحامل ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. با کاهش اندازه سیستم حامل از میکرومتر به نانومتر، نسبت سطح به حجم به شدت افزایش یافته و منجر به افزایش کارایی درون پوشانی، بهبود دسترسی زیستی ماده کپسوله شده و رهایش کنترل شده و یکنواخت تر هسته می شود (Mozafari et al., 2008). برای پایداری و بهبود دسترسی زیستی کورکومین، روش های متعددی صورت گرفته است برخی از این رویکردها شامل: استفاده از کمک کننده ها مانند پیپرین که مانع از گلوکورونید شدن کورکومین می شود؛ استفاده از کورکومین لیپوزومی، نانوذرات کورکومین، استفاده از کمپلکس کورکومین فسفولیپید و استفاده از آنالوگ های ساختاری کورکومین است (Anand et al., 2007). همچنین برای رهایش محافظت شده و رسانش هدفمند از نانوحامل ها مانند حامل های لیپید نانو ساختار (Madane & Mahajan, 2016)، نانوامولسیون (Qazi et al., 2021)، عوامل چلاته کننده (Chen et al., 2014)، میسل ها (Zhi et al., 2021) و لیپوزوم (Nakajima et al., 2015) در زمینه درون پوشانی کورکومین استفاده می شود. از میان روش های ارائه شده، لیپوزوم ها دارای ساختارهای کره ای شکل که در آن گروه های آبگریز و آبدوست به ترتیب در در بخش مرکزی و غشاء کره حضور دارند، هستند (Li et al., 2018). درون پوشانی کورکومین در لیپوزوم باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی، جذب دستگاه گوارش (Takahashi et al., 2009) و حلالیت در آب (Sun et al., 2012) می شود. افزون بر این تحقیقات نشان داده است که تخریب کورکومین در شرایط قلیایی به طور قابل ملاحظه ای در لیپوزوم کاهش می یابد (El Khoury and Patra, 2013). با توجه به موارد فوق، هدف از این پژوهش بررسی پایداری کورکومین در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی گراد، درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و

پایداری فیزیکی

پایداری فیزیکی لیپوزوم‌ها در طی انبارمانی در دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط انکوباتور اندازه‌گیری شد. بدین منظور میزان رهایش کورکومین در فواصل زمانی معین (صفر (بلافاصله پس از تولید)، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) با اسپکتروفوتومتری تعیین و مطابق با رابطه ۳-۷ اندازه‌گیری گرد (Lu et al., 2014). به‌منظور تعیین مقدار کورکومین، نمونه برداشته شده جهت قرائت جذب با اتانول به‌عنوان حلال مخلوط گردید و پس از سانتریفوژ کردن، جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV-visible light Hanch, spectrophotometer، ایالات متحده آمریکا) اندازه‌گیری شد. درصد رهایش تجمعی کورکومین از تقسیم مقدار کل کورکومین آزاد شده از ابتدا تا زمان t (Mt) به وزن اولیه کورکومین بارگذاری شده در لیپوزوم (M0)، محاسبه شد:

$$\text{درصد رهایش تجمعی} = \sum_{t=0}^t \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

بررسی رهایش در شرایط شبیه‌سازی شده دهان، معده و روده

جهت بررسی رفتار رهایش در شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش ۶ میلی‌لیتر از نمونه در داخل کیسه دیالیز (۱۲ کیلو دالتون، ۲۵ قطر میلی‌متر، سیگما، آلمان) در سه مرحله شبیه‌سازی دهان، شبیه‌سازی معده و شبیه‌سازی روده قرار گرفت. جهت فاز دهانی، بزاق مصنوعی تهیه گردید ۱/۳۶۹ گرم دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۸۷۷ گرم کلرید سدیم، ۰/۴۴۱ گرم کلسیم کلرید دی‌هیدرات، ۲/۱۶۰ گرم موسین، ۵/۲۰۸ گرم بی‌کربنات سدیم، ۰/۴۷۷ گرم کلریدپتاسیم و ۲۰۰۰۰ واحد آنزیم آلفا‌آمیلاز به یک لیتر آب مقطر با pH ۷ اضافه شد (Van Ruth et al., 1994). جهت شبیه‌سازی حرکات مکانیکی دهان نمونه به‌طور مداوم در دور ۱۰۰ بر ثانیه با همزن مغناطیسی به مدت ۲/۵ دقیقه همزده شد. پس از آن نمونه وارد محیط شبیه‌سازی معده با mg/ml ۳/۲ پیپسین، ۲/۰ mg/ml کلرور سدیم با pH ۱/۲ به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. بعد از عبور از این مرحله نمونه وارد محلول شبیه‌سازی روده با mg/ml ۲/۰ پانکراسین، ۱۲/۰ mg/ml نمک های صفراوی، ۸/۸ mg/ml سدیم کلرید، ۲۴/۰ mg/ml و ۰/۲۵ مولار کلرور کلسیم با pH تنظیم شده ۷ به مدت ۲ و نیم ساعت قرار گرفت. در تمام مدت دمای فرآیند ۳۷ درجه ثابت نگه داشته شد (Ahmed et al., 2012; Chen et al., 2020). سپس میزان کورکومین از رابطه ۱ محاسبه شد.

ازای هر یک دقیقه سیکل تیمار، یک دقیقه فاصله استراحت داده شد. جهت اندازه‌گیری بازده لیپوزوم نمونه با دور $g \times 1000$ به مدت یک دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی با ۲ میلی‌لیتر حلال اتانول رقیق گردید تا محتوای بدون کپسول توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۵۸ نانومتر مشخص شود. سپس با استفاده از منحنی استاندارد میزان کورکومین محاسبه گردید (Liu et al., 2015).

اندازه‌گیری پتانسیل زتا و اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات
بار سطحی لیپوزوم‌ها (میلی‌ولت) با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Zeta Compact, CAD، فرانسه) ارزیابی گردید. جهت جلوگیری از پراکنش نور، از آب دیونیزه با نسبت ۱:۵۰ حجمی/حجمی جهت رقیق کردن نمونه‌ها استفاده شد. تمامی نمونه‌ها بلافاصله پس از تهیه با ۲ تکرار اندازه‌گیری شدند و سپس میانگین آن‌ها گزارش گردید. قطر متوسط و توزیع اندازه ذرات نمونه‌ها بادستگاه Particle Size Analyzer (Cordouan, Vasco3، فرانسه) اندازه‌گیری شد.

میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM)

جهت بررسی ریزساختار لیپوزوم بهینه از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (Zeiss 100 KV, Leo 906، آلمان) استفاده شد. در ابتدا یک قطره از نمونه لیپوزوم رقیق شده (نسبت ۱:۲۰۰) بهینه بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری تصویربرداری شد (Klang et al., 2012).

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FT-IR)

به‌منظور تأیید حضور کورکومین در لیپوزوم، بررسی ساختار مولکولی و نیز برهمکنش‌های احتمالی بین ماتریس لیپوزوم و کورکومین بارگذاری شده، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه اجرا شد. ۱ میلی‌گرم از نمونه خشک شده لیپوزوم حامل کورکومین به روش انجمادی با پتاسیم بروماید (KBr) با نسبت ۱:۱۰۰ مخلوط شد و تحت فشار از آن قرص تهیه گردید و سپس با استفاده از دستگاه طیف سنج مادون قرمز (Thermo Nicolet، ۳۷۰، آمریکا) آنالیز شد. طیف مادون قرمز در محدود ۶۰۰ الی 4000 cm^{-1} ارزیابی گردید.

طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس (XRD)

بررسی تفرق اشعه ایکس در دمای اتاق بر روی نمونه خشک شده به روش انجمادی انجام شد. بدین منظور از دستگاه پراش‌دهنده (X Pert PANalytical، آمریکا) تحت ولتاژ ۴۰ کیلوولت و شدت جریان ۳۰ میلی‌آمپر استفاده گردید.

مدل سازی رهایش

برای بررسی رهایش کورکومین از لیپوزوم و ارزیابی سرعت رهایش آن، از مدل های مختلفی شامل معادله درجه صفر^۱، کوپچا^۲، پیاس سالهین^۳ و هیگوچی^۴ استفاده شد.

$$C = K_0 t \quad (2)$$

$$M_t = A \times t^{0.5} + B \times t \quad (3)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m} \quad (4)$$

$$C = K_H t^{0.5} \quad (5)$$

در این روابط t برابر زمان رهایش برحسب دقیقه، C غلظت کورکومین آزاد شده در زمان t توصیف کننده فرایند رهایش و K_0 ثابت کینتیکی برای معادله درجه صفر، و K_H ثابت هیگوچی بوده و K_1 و K_2 ثابت کینتیکی فیک و ثابت نرخ فرسایش است. پارامتر n مشخص کننده مکانیسم های مختلف رهایش است.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

در این پژوهش به منظور مطالعه بهینه یابی تهیه لیپوزوم از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی برای پارامترهای موثر استفاده شد. برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای وابسته در مدل رگرسیونی با متغیر مستقل، نمودار سطوح آنها به وسیله نرم افزار دیزاین اکسپرت ترسیم گردید. به منظور ارزیابی صحت مدل های برازش داده شده، آزمون ضعیف برازش، ضریب تغییرات و ضریب تبیین و میزان معناداری تعیین گردید. علاوه بر بررسی رفتار متغیرها بر خصوصیات لیپوزوم های به دست آمده، مدل های به دست آمده نیز می توانند به منظور بهینه سازی مورد استفاده قرار بگیرند. لذا بهینه یابی عددی بر مبنای بیشترین بازده درون پوشانی، کمترین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات و میزان پتانسیل زتا انجام شد. برای بهینه یابی عددی با استفاده از نرم افزار Design Expert نسخه ۶.۰.۲ (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minn., USA) طراحی و مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. به منظور تأیید صحت مدل ها، اعداد پیش بینی شده و تجربی با استفاده از آزمون t student و نرم افزار Minitab با یکدیگر مقایسه شدند. به منظور ترسیم نمودارها از نرم افزار اکسل استفاده گردید. همچنین برازش داده های آزمایشگاهی حاصل از رهایش کورکومین با استفاده از معادله های تجربی و به کمک نرم افزار Matlab (نسخه b 2018) صورت گرفت و بر اساس بالاترین ضریب همبستگی، بهترین مدل انتخاب و پیشنهاد شد.

نتایج و بحث

بهینه یابی درون پوشانی کورکومین درون لیپوزوم

جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل (میزان کورکومین، میزان لستین، نسبت لستین: کلسترول و تیمار فراصوت) بر متغیرهای وابسته (تغییرات اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و بازده درون پوشانی کورکومین) طی فرایند تهیه لیپوزوم از طرح سطح پاسخ با نقاط حداکثر، میانی و حداقل استفاده شد (جدول ۱). برای هر یک از متغیرهای وابسته، مدل های سطح پاسخ مختلفی با الگوی حذف پسخور برازش گردید تا بهترین مدل انتخاب شود. در این روش، مدل های اثرات خطی، میانگین پاسخ، دو فاکتوری (تعاملی)، درجه دوم و درجه سوم مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). در روش سطح پاسخ، ضرایب مدل با استفاده از روش رگرسیونی چندگانه و حداقل مربع ها محاسبه و سپس پاسخ تخمین زده شده با استفاده از رابطه مدل محاسبه گردید. صحت هر مدل پیشنهاد شده از ضریب تبیین و آزمون عدم برازش ارزیابی گردید. مقدار ضریب تبیین بین صفر و یک متغیر است به طوری که هرچه این عدد به یک نزدیک تر باشد یعنی مدل با دقت بالایی تقریباً تمامی داده ها را برازش می کند. با اینکه ضریب تبیین به دست آمده برای پاسخ پتانسیل زتا ۰/۷۸ درصد بود، اما پاسخ های اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و بازده درون پوشانی کورکومین به ترتیب ۰/۸۵، ۰/۹۰ و ۰/۸۲ بود که نشان دهنده این است که داده های تجربی به خوبی با مدل برازش شدند (جدول ۳). ضریب تغییرات یک مدل نسبت جذر مجموع مربعات خطا به میانگین متغیر پاسخ می باشد و بیانگر میزان پراکنش داده ها است. مقدار کم ضریب تغییرات (کمتر از ۱۰ درصد) نشانگر برازش بهتر مدل و کوچک بودن مقادیر باقی مانده نسبت به مقادیر پیش بینی شده و نزدیکی مقادیر پیش بینی شده به مقادیر واقعی است. در پژوهش حاضر تمامی ضرایب تغییرات به جز توزیع اندازه ذرات (۱۰/۸۶) و پتانسیل زتا (۱۱/۴۲-) کمتر از ۱۰ درصد بود که بیانگر دقت و اعتبار آزمایشات است (جدول ۳). در این پژوهش، آزمون عدم برازش برای تمامی مدل های ارائه شده در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی داری نبود، که در این آزمون عدم برازش بیانگر صحت مدل در پیش بینی پاسخ ها است (جدول ۴).

3- Peppas-Salhin

4- Higuchi

1 Zero-order

2 Kopcha

جدول ۱- نتایج طرح مرکب مرکزی برای متغیرهای مستقل و وابسته فرآیند تهیه لیپوزوم

Table 1- The results of the central composite design for the independent and dependent variables of the liposome preparation process

Row	Lecithin (A) (g) لستین	Lecithin: Cholesterol (B) لستین: کلسترول	Curcumin (C) (mg) کورکومین	Ultrasound treatment (D) (min) تیمار فراصوت	Size (Nanometer) اندازه	Particle size distribution توزیع اندازه ذرات	Zeta potential (mV) پتانسیل زتا	Efficiency (Percent) راندمان
1	0.05	2.25	3.75	3.00	253.41	0.15	-12.51	66.78
2	0.02	0.50	6.00	5.00	251.88	0.23	-8.87	69.09
3	0.08	2.25	3.75	3.00	238.18	0.12	-15.72	71.01
4	0.08	4.00	6.00	5.00	215.03	0.13	-16.60	67.28
5	0.05	0.50	3.75	3.00	245.16	0.12	-12.56	69.70
6	0.02	0.50	1.50	5.00	249.52	0.25	-10.56	67.56
7	0.05	2.25	3.75	5.00	245.39	0.14	-12.17	71.61
8	0.02	4.00	1.50	5.00	245.11	0.21	-11.28	74.72
9	0.08	4.00	1.50	1.00	221.79	0.20	-19.50	64.34
10	0.05	2.25	1.50	3.00	262.13	0.24	-11.47	68.34
11	0.02	4.00	6.00	1.00	271.88	0.14	-9.51	73.01
12	0.05	2.25	3.75	3.00	245.54	0.13	-11.75	66.65
13	0.05	2.25	3.75	1.00	259.20	0.12	-12.59	68.59
14	0.05	2.25	3.75	3.00	254.26	0.12	-13.91	70.36
15	0.05	4.00	3.75	3.00	235.36	0.10	-13.57	71.34
16	0.08	0.50	1.50	5.00	225.66	0.27	-14.16	70.86
17	0.02	4.00	1.50	1.00	264.07	0.20	-10.02	70.98
18	0.08	0.50	6.00	1.00	242.40	0.16	-18.16	69.31
19	0.02	2.25	3.75	3.00	279.25	0.10	-8.19	70.43
20	0.05	2.25	6.00	3.00	276.34	0.15	-12.36	70.11
21	0.05	2.25	3.75	3.00	271.06	0.14	-13.76	67.72
22	0.05	2.25	3.75	3.00	250.20	0.09	-10.27	70.65
23	0.05	2.25	3.75	3.00	257.10	0.10	-12.21	69.96
24	0.08	0.50	1.50	1.00	234.01	0.23	-15.21	65.99
25	0.08	0.50	6.00	5.00	231.76	0.18	-17.45	73.28
26	0.02	0.50	1.50	1.00	250.49	0.23	-8.31	59.47
27	0.08	4.00	1.50	5.00	210.00	0.23	-15.91	69.10
28	0.02	4.00	6.00	5.00	248.85	0.15	-11.56	76.82
29	0.08	4.00	6.00	1.00	225.30	0.13	-19.81	63.23
30	0.02	0.50	6.00	1.00	286.32	0.17	-11.12	60.12

اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ‌های مورد بررسی

اندازه ذرات

بر اساس مدل اندازه ذرات لیپوزوم، اثرات خطی میزان لستین، نسبت لستین: کلسترول، میزان کورکومین و تیمار فراصوت و همچنین اثر درجه دوم نسبت لستین: کلسترول معنی‌دار شد ($P < 0.01$). ضرایب معادلات مدل‌های به‌دست آمده و تجزیه واریانس آن‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است. همانطور که مشخص است، هیچ اثر متقابل بین متغیرهای مستقل مشاهده نشد. رابطه بین اندازه ذرات با متغیرهای مستقل به صورت دو به دو در نقطه مرکزی متغیر سوم در شکل ۱ نشان داده شده است. در مدل درجه دوم انتخاب شده، با افزایش متغیر مستقل میزان لستین، اندازه ذرات به‌صورت خطی کاهش یافت. تاثیر

لستین بر اندازه لیپوزوم‌ها ممکن است ناشی از پدیده‌های مختلف از جمله، اندازه و بار گروه‌های فسفولیپیدی باشد که بر قرارگیری، برهمکنش^۲ و انحنای بهینه^۳ لایه‌های فسفولیپیدی تاثیر می‌گذارد و همچنین وجود برخی از اجزای غیرفسفولیپیدی در نمونه‌های لستین مانند پروتئین‌ها و یا یون‌های معدنی باشد که ممکن است در تشکیل لیپوزوم تداخل داشته باشند (Peng et al., 2018). بر اساس یافته‌های شوبرت و همکاران (Schubert et al., 2006)، تاثیر لستین بر کاهش اندازه ذرات تا غلظتی می‌باشد که هندسه شکل لیپوزوم تغییر کند و افزایش بیش از حد آن تاثیر بر اندازه ذرات ندارد (Schubert et al., 2006).

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس مدل‌های برازش یافته بر داده‌های پاسخ فرآیند تهیه لیپوزوم
 Table 2- The results of the variance analysis of the fitted models on the response data

Response پاسخ	Source منبع	Sum of squares مجموع مربعات	Degrees of freedom درجه آزادی	Average of squares میانگین مربعات	F	Probability of F احتمال F
Particle size اندازه ذرات	Average میانگین	1.85E+00	1	1.85E+00		
	Linear خطی	6854.58	4	1713.64	13.12	<0.0001
	2FI	469.39	6	78.23	0.53	0.7777
	Quadratic درجه ۲	2110.03	4	527.51	11.52	0.0002
	درجه ۳	224.12	8	28.01	0.42	0.8741
	Residual باقیمانده	462.96	7	66.14		
	Total مجموع	1.85E+00	30	61951.36		
Particle size distribution توزیع اندازه ذرات	Average میانگین	0.80	1	0.80		
	Linear خطی	0.031	4	7.63E-003	3.81	0.0149
	2FI	1.76E-003	6	2.93E-004	0.12	0.9934
	Quadratic درجه ۲	0.043	4	0.011	33.75	<0.0001
	درجه ۳	1.75E-003	8	2.18E-004	0.50	0.8267
	Residual باقیمانده	3.09E-003	7	4.40E-004		
	Total مجموع	0.89	30	0.03		
Zeta potential پتانسیل زتا	Average میانگین	5097.86	1	5097.86		
	Linear خطی	234.68	4	58.67	30.19	<0.0001
	2FI	15.48	6	2.58	1.48	0.2375
	Quadratic درجه ۲	13.07	4	3.27	2.45	0.0916
	درجه ۳	8.52	8	1.07	0.65	0.7224
	Residual باقیمانده	11.51	7	1.64		
	Total مجموع	5381.11	30	179.37		
Efficiency راندمان	Average میانگین	1.43E+00	1	1.43E+00		
	Linear خطی	159.83	4	39.36	3.95	0.0128
	2FI	199.88	6	33.31	11.94	<0.0001
	Quadratic درجه ۲	8.15	4	2.04	0.68	0.6159
	درجه ۳	17.52	8	2.91	0.56	0.7828
	Residual باقیمانده	27.36	7	3.91		
	Total مجموع	1.43E+00	30	4767.45		

جدول ۳- نتایج آنالیز آماری مدل‌های انتخاب شده برای هر یک از داده‌های پاسخ

Table 3- The results of the statistical analysis of the selected models for each of the response data

Response پاسخ	R ² adj (Adjusted R-squared) ضریب تبیین تعدیل شده	R ² (Coefficient of Determination) ضریب تبیین	Coefficient of variation ضریب تغییرات	Standard deviation انحراف معیار	Average میانگین
Particle size اندازه ذرات	0.82	0.85	3.16	7.85	248.22
Particle size distribution توزیع اندازه ذرات	0.88	0.90	10.84	0.02	0.16
Zeta potential پتانسیل زتا	0.77	0.78	-11.42	1.49	-13.04
Efficiency راندمان	0.80	0.83	2.46	1.70	68.97

لیپوزوم قرار گرفته و با برهمکنش بین زنجیره‌های آسیل، اندازه نانولیپوزوم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. همچنین گروه‌های O- آنها می‌توانند با گروه‌های کولین سر فسفولیپیدها با بار مثبت پیوندهای هیدروژنی یا پیوندهای یونی پایداری برقرار کرده و به‌طور موثری موجب تغییرات سازه‌ای در ساختارهای دو لایه لیپوزومی شوند (Wink et al., 2010). همچنین بارگذاری ترکیبات فنلی در دو لایه بر روی مدول الاستیک و سیالیت غشا تاثیر می‌گذارد (Rafiee et al., 2017; Olbrich et al., 2000). نهر همکاران (Nahr et al., 2019) اعلام کردند که با افزایش میزان مولکول‌های آگریز در ساختار منظم لستین در غشای لیپوزوم سیالیت غشا و اندازه ذرات لیپوزومی افزایش می‌یابد. کارویچ و همکاران (Karewicz et al., 2011) گزارش کردند که افزایش کورکومین موجب سفتی دو لایه وزیکولی شده و باعث افزایش قطر لیپوزوم می‌شود (Karewicz et al., 2011). محدوده اندازه ذرات در این پژوهش ۲۸۶/۳۲-۲۱۰/۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در مطالعات گذشته، میانگین اندازه ذرات لیپوزوم‌های حاوی کورکومین تهیه شده با لستین سویا را ۲۷۱/۳ نانومتر با توزیع اندازه ذرات ۵۱۲/۰ گزارش شده است (Ng et al., 2018). جین و همکاران (Jin et al., 2016)، اندازه ذرات (۴۷۱/۴ نانومتر) و توزیع اندازه ذرات (۰/۴۹۹) را در لیپوزوم‌های حاوی کورکومین اندازه‌گیری کردند.

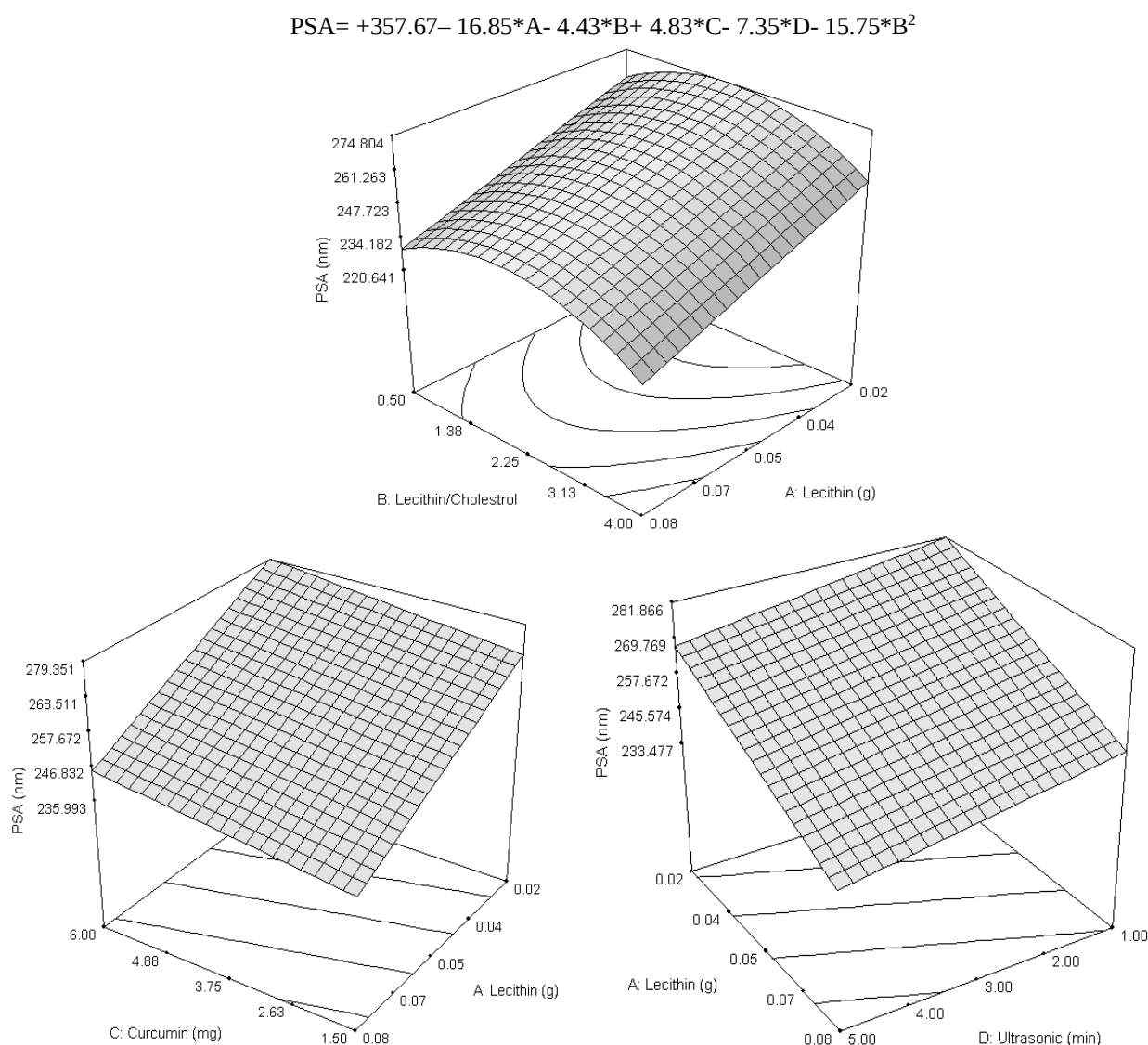
نتایج نشان داد که ابتدا با افزایش نسبت لستین به کلسترول از ۰/۵ به ۲/۲۵، اندازه ذرات افزایش و سپس با افزایش هرچه بیشتر این نسبت از ۲/۲۵ به ۴، اندازه ذرات کاهش یافت (شکل ۱). کلسترول باعث پایداری و تثبیت لیپوزوم‌های تشکیل یافته می‌گردد و حضور آن در ساختار دو لایه منجر به افزایش تراکم چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود (Mohammadi et al., 2014). به‌طور کلی هنگامی که نسبت مناسبی از کلسترول به‌عنوان ماده غشاء اضافه می‌شود، ساختار دو لایه لیپیدی تقویت شده و موجب کاهش اندازه ذرات می‌شود (Lu et al., 2011). مشابه با این نتایج، چن و همکاران (Chen et al., 2019) گزارش کردند با افزایش نسبت لستین به کلسترول از ۱:۲ به ۱:۶ میانگین اندازه ذرات لیپوزومی حاوی کوئرستین به طرز چشمگیری کاهش یافت. علاوه بر این چی و همکاران (Chen et al., 2019) اعلام داشتند که با افزایش نسبت لستین به کلسترول (۵/۹۶: ۱) اندازه نانوذرات لیپوزومی حاوی آنتوسیانین کاهش می‌یابد.

اندازه لیپوزوم‌ها تحت تاثیر میزان کورکومین ارزیابی شد. با افزایش میزان کورکومین از ۱۵ به ۶۰ میلی گرم اندازه ذرات به صورت خطی افزایش یافت (شکل ۱). به احتمال زیاد مقدار ماده موثره چربی‌دوست می‌تواند به علت واکنش با گروه‌های قطبی زنجیره آسیل لیپیدی بر ساختار غشای لیپوزومی و اندازه آن تاثیر بگذارد (Chi et al., 2019). علاوه بر این ترکیبات فنلی که گروه‌های هیدروکسیل فنولیک را حمل می‌کنند کورکومین به‌عنوان یک مولکول آگریز بین دو لایه چربی

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیون مدل انتخاب شده برای متغیرهای پاسخ

Table 4- Results of analysis of variance and regression coefficients of the selected model for response variables

Source منبع	Sum of squares مجموع مربعات	Degrees of freedom درجه آزادی	Average of squares میانگین مربعات	F	Probability of F احتمال F
Particle size اندازه ذرات					
Model مدل	8640.63	5	1728.13	28.02	<0.0001
A	5108.58	1	5108.58	82.82	<0.0001
B	353.87	1	358.87	5.74	0.0248
C	420.31	1	420.31	6.81	0.0153
D	971.82	1	971.82	15.75	0.0006
B2	1786.05	1	1786.05	28.95	<0.0001
Residual باقیمانده	1480.45	24	61.69		
Lack of fit مولفه عدم برازش مدل	1102.92	19	58.05	0.77	0.6949
Total مجموع	10121.07	29			
Particle size distribution توزیع اندازه ذرات					
Model مدل	0.07	4	0.02	57.64	<0.0001
B	7.12E-003	1	7.12E-003	22.58	<0.0001
C	0.02	1	0.02	67.52	<0.0001
D	2.09E-003	1	2.09E-003	6.63	0.0163
C2	0.04	1	0.04	133.84	<0.0001
Residual باقیمانده	7.88E-003	25	3.15E-004		
Lack of fit مولفه عدم برازش مدل	4.90E-003	20	2.45E-004	0.41	0.9292
Total مجموع	0.08	29			
Zeta potential پتانسیل زتا					
Model مدل	221.20	1			
A	221.20	1	221.20	99.81	<0.0001
Residual باقیمانده	62.05	28	221.20	99.81	<0.0001
Lack of fit مولفه عدم برازش مدل	52.92	23	2.22		
Total مجموع	283.25	29	2.30	1.26	0.4352
Efficiency راندمان					
Model مدل	340.79	4	85.20	29.61	<0.0001
A	3.38	1	3.38	1.17	0.2888
B	35.96	1	35.96	12.49	0.0016
D	113.90	1	113.90	39.58	<0.0001
AB	187.55	1	187.55	65.17	<0.0001
Residual باقیمانده	71.94	25	2.88		
Lack of fit مولفه عدم برازش مدل	54.95	20	2.75	0.81	0.6711
Total مجموع	412.74	29			



شکل ۱- نمودار سطح پاسخ تاثیر متغیر میزان لسیتین، نسبت لسیتین: کلسترول، میزان کورکومین و زمان فراصوت بر اندازه ذرات لیپوزومی
Fig. 1- The response surface diagram of the variable effect of lecithin, lecithin: cholesterol ratio, curcumin amount and ultrasound time on the size of liposomal particles.

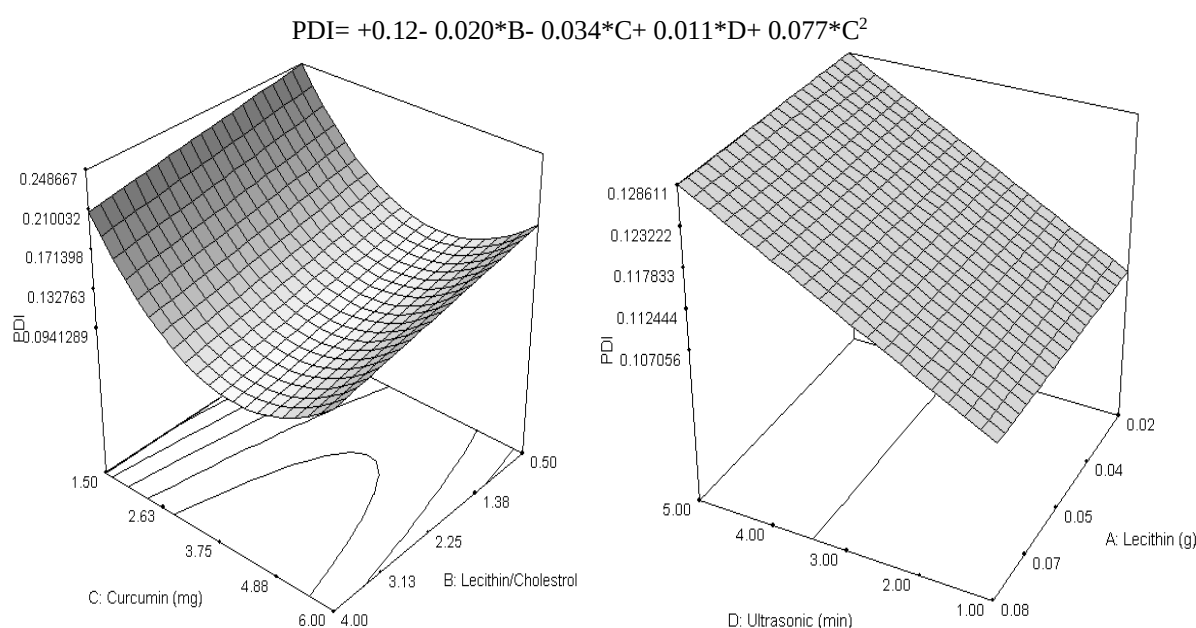
توزیع اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات یک شاخص بدون واحد و بیانگر نسبت انحراف استاندارد به متوسط اندازه ذرات است به طوری که مقادیر نزدیک به صفر نشانگر یکنواختی اندازه ذرات است. مقدار کمتر از ۰/۱ این شاخص نشان‌دهنده پراکندگی ذرات و مقدار بیش از ۰/۳ دلالت بر ناهمگنی ذرات دارد. توزیع اندازه ذرات تمامی لیپوزوم‌ها در محدوده ۰/۲۶۷-۰/۰۸۴ مشاهده شد که بیانگر توزیع باریک وزیکول‌های لیپوزوم بود. بر اساس داده‌های جدول ۲ اثرات خطی نسبت لستین: کلسترول، میزان

تیمار فراصوت معمولاً در جهت تهیه وزیکول‌های لیپوزوم تک لایه‌ای استفاده می‌شود. نتایج نشان داد که افزایش زمان متغیر تیمار فراصوت منجر به کاهش اندازه ذرات لیپوزومی حاوی کورکومین شد ($p < 0.001$). میدان برشی و امواج موئینگی حاصل از تشکیل و فروپاشی حباب‌های ریز هوا ناشی از ایجاد حفره‌زایی صوتی امواج فراصوت بر اندازه ذرات تاثیرگذار بود. همراستا با این نتایج باسن و همکاران (Basnet et al., 2011) گزارش کردند که اندازه ذرات لیپوزومی حاوی کورکومین با اعمال تیمار فراصوت به ۲۰۰ نانومتر کاهش یافت.

دارد که به طور منظم در بین دو لایه غشایی به موازات زنجیره‌های هیدروکربنی فسفولیپیدها توزیع شود و باعث منظم شدن ساختار شود (Mosca et al., 2011). با افزایش کورکومین از ۱۵ به ۳۷/۵ میلی گرم، توزیع اندازه ذرات کاهش یافت و با افزایش هرچه بیشتر کورکومین تا ۶۰ میلی گرم، غیریکنواختی را افزایش داد. احتمالاً بارگذاری بیشتر دارو منجر به اثرات بی‌ثبات کننده غشا بر روی لیپوزوم‌ها شده و غیریکنواخت شدن (Jain et al., 2012). متغیر وابسته توزیع اندازه ذرات تحت تاثیر هیچ یک از اثرات متقابل متغیرهای مستقل قرار نگرفت. رابطه بین توزیع اندازه ذرات با متغیرهای مستقل فرآیند به صورت دو به دو و در نقطه مرکزی متغیر سوم در شکل ۲ نشان داده شده است.

کورکومین و همچنین اثر درجه دوم میزان کورکومین بر توزیع اندازه ذرات بسیار معنی‌دار ارزیابی گردید ($p < 0.01$). همچنین اثر خطی تیمار فراصوت معنی‌دار بود ($p < 0.05$). با اینکه افزایش نسبت لستین: کلسترول موجب یکنواختی اندازه ذرات شد، اما افزایش زمان تیمار فراصوت باعث افزایش توزیع اندازه ذرات گردید. پائینی و همکاران (Paini et al., 2015) اعلام کردند که افزایش زمان فراصوت موجب کاهش اندازه ذرات لیپوزومی شد در حالی که تاثیر ناچیزی بر توزیع اندازه ذرات داشت (Paini et al., 2015). همچنین جین و همکاران (Jin et al., 2016) گزارش کردند که اعمال بیش حد تیمار فراصوت موجب تخریب دیواره فسفولیپیدی و گستردگی توزیع اندازه ذرات می شود. از طرفی با افزایش نسبت لستین به کلسترول، کلسترول تمایل



شکل ۲- نمودارهای سطح پاسخ تاثیر متغیر میزان لستین، نسبت لستین: کلسترول، میزان کورکومین و تیمار فراصوت بر توزیع اندازه ذرات لیپوزوم

Figure 2- Response surface graphs of variable effect of lecithin, lecithin: cholesterol ratio, curcumin amount and ultrasound treatment on liposome particle size distribution

فسفاتیدیل کولین پیوند هیدروژنی برقرار کرده و گروه کولین که دارای بار مثبت می‌باشد به داخل غشا کشیده می‌شود و گروه فسفاتیدیل که دارای بار منفی است به سطح غشا کشیده آمده و باعث افزایش بار منفی و دفع الکترواستاتیک ذرات می‌گردد (Makino et al., 1991). مقدار پتانسیل زتای لیپوزوم‌های حاوی کورکومین در این پژوهش در بازه ۱۶/۵۴- تا ۱۹/۸۱- اندازه‌گیری شد. لیو و همکاران (Liu et al., 2015) پتانسیل زتای لیپوزوم‌های حاوی کورکومین را $4/63 \pm 24/37$ - گزارش کردند. مطالعات پیشینه پژوهشی، هنگامی که قدر مطلق پتانسیل زتا به دلیل دافعه الکتریکی بین ذرات بیشتر از ۳۰ میلی‌ولت

پتانسیل زتا

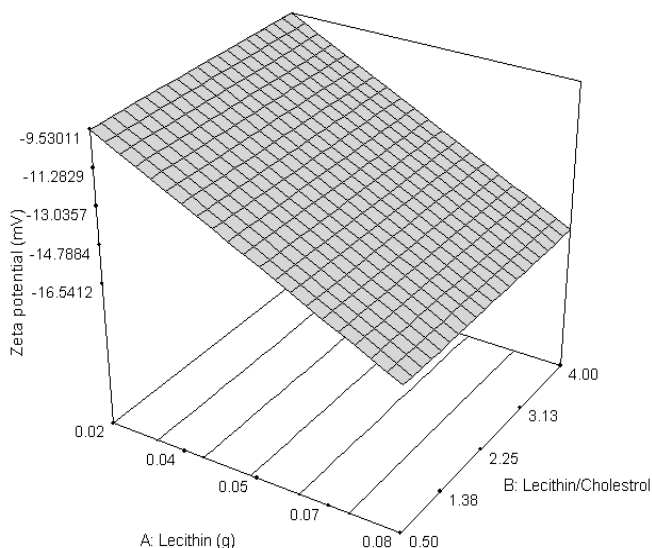
پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی دیسپرسیون‌ها است زیرا نشان‌دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره است. تنها اثر خطی میزان لستین تاثیر بسیار معنی‌داری بر میزان پتانسیل زتا داشت ($p < 0.0001$). ارتباط پتانسیل زتا به صورت دو به دو در نقطه مرکزی متغیر سوم در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشخص است با افزایش میزان لستین، پتانسیل زتا کاهش یافت. گروه هیدروکسیل موجود در سر کلسترول با گروه کولین موجود در سر قطبی

حتی با مقدار پتانسیل زتا پایین نشان دادند، بنابراین مقدار بالقوه زتا تنها عاملی نیست که بر پایداری لیپوزوم‌ها تاثیر می‌گذارد (Zou et al., 2014).

باشد، پراکندگی ذرات را پایدار می‌داند. از سوی دیگر برخی پژوهشگران ادعا می‌کنند که لیپوزوم‌هایی که مقدار پتانسیل زتای آن بالاتر از ۲۰ میلی‌ولت باشد پایدار است (Laouini et al., 2016; Balanč et al., 2011).

با این حال، برخی از مطالعات پایداری سیستم لیپوزومی را

$$PZ = -13.04 - 3.51 * A$$



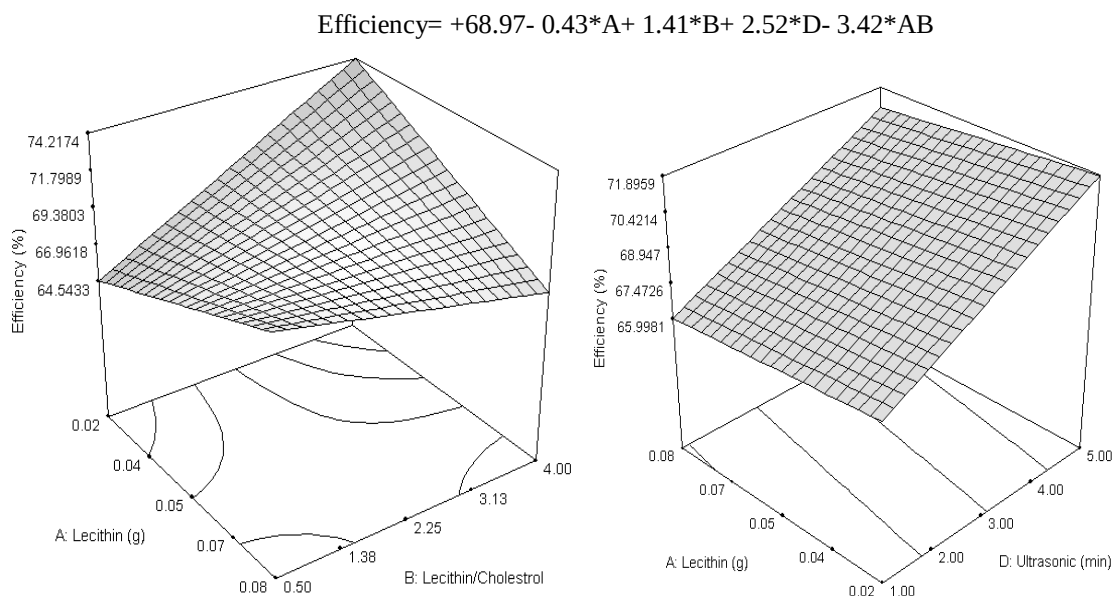
شکل ۳- نمودار سطح پاسخ تاثیر متغیر میزان لستین و نسبت لستین: کلسترول بر پتانسیل زتای لیپوزوم

Fig. 3- Response surface diagram of the variable effect of lecithin and lecithin:cholesterol ratio on liposome zeta potential

کارایی بارگذاری داروی لیپوتروپیک سیلی مارین در لیپوزوم شود (El-Samaligy et al., 2006). همانطور که در جدول ۴ ملاحظه می‌شود کورکومین هیچ تاثیر معنی‌داری بر بازده درون‌پوشانی نداشت، نتایج پژوهشگران نشان می‌دهد که سطوح نسبتا پایین کورکومین می‌تواند کاملا در حوزه آبگریز داخل دو لایه فسفولیپیدی گنجانده شود اما افزایش بیش از حد کورکومین باعث اختلال در دو لایه فسفولیپیدی و بالتبع آن تغییر ساختار لیپوزوم‌ها شده و موجب کاهش ظرفیت آنها می‌شود (Cheng et al., 2017). افزایش زمان امواج فراصوت موجب افزایش کارایی درون‌پوشانی کورکومین در لیپوزوم گردید. چن و چنگ (Chen and Chang, 2020) مشاهده کردند که تیمار فراصوت هیچ تاثیر معنی‌داری بر کارایی درون‌پوشانی عصاره استخراج شده از گلبرگ *Clitoria ternatea* درون لیپوزوم نداشت. بازده درون‌پوشانی کورکومین در لیپوزوم ۵۹/۴۷-۷۶/۸۲ درصد اندازه‌گیری شد در حالی که لی و همکاران (Li et al., 2017) گزارش کردند که توانایی لیپوزوم‌ها برای درون‌پوشانی کورکومین $88/75 \pm 1/65$ درصد بود. این تفاوت را می‌توان به نوع و ویژگی‌های ساختاری فسفولیپید (اشباع و طول زنجیره هیدروکربن اسیدهای چرب)، روش آماده‌سازی و سایر پارامترها نسبت داد (Hasan et al., 2014).

بازده درون‌پوشانی

عوامل مختلفی بر کارایی درون‌پوشانی ماده موثره در لیپوزوم تاثیرگذار هستند که به ویژگی‌های خود لیپوزوم (حجم قسمت آبی، سفتی غشاء، سطح غشاء و روش تولید) و ماده کپسوله شده (آبدوست یا آبگریز بودن ماده کپسوله شده و تمایل به برهمکنش با غشای دو لایه ای لیپوزوم) بستگی دارند (Mozafari et al., 2008). نتایج نشان داد که تاثیر لستین، تیمار فراصوت و اثر متقابل میزان لستین و نسبت لستین: کلسترول بسیار معنی‌دار بود ($p < 0.01$)، در حالی که میزان نسبت لستین: کلسترول به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر بازده درون‌پوشانی نداشت ($p > 0.05$) (شکل ۴). احتمالا افزایش لستین منجر به محیطی متراکم با حرکت آزاد کمتر ترکیبات فنلی شده که منجر به کاهش عملکرد به دام افتادن می‌گردد (Huh et al., 2017; Rafiee et al., 1996). از طرفی سفت شدن غشای لیپوزومی و پر شدن فضای دو لایه به علت حضور کلسترول می‌تواند باعث کاهش بارگذاری مواد فعال آبگریز در آن شده به‌طوری که کلسترول با ماده موثره آبگریز برای پر کردن فضای بین لایه‌ای رقابت می‌کند (Chen et al., 2019). همچنین ال-سامالیگی و همکاران (El-Samaligy et al., 2006) اعلام کردند که افزایش بیش از غلظت حد کلسترول می‌تواند ساختار خطی منظم غشای لیپوزومی را مختل کند و در نتیجه موجب کاهش



شکل ۴- نمودارهای سطح پاسخ تاثیر متغیر میزان لستین، نسبت لستین: کلسترول و تیمار فراصوت بر بازده درون پوشانی ذرات لیپوزومی
Fig. 4- Response surface diagrams of the variable effect of lecithin, lecithin: cholesterol ratio and ultrasound treatment on the encapsulation efficiency of liposomal particles

بهینه‌یابی

شرایط بهینه تهیه لیپوزوم بر پاسخ‌ها از طریق بهینه‌یابی با درجه مطلوبیت ۰/۷۵۹ تعیین شد. کمینه نمودن اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا و بیشینه نمودن بازده درون پوشانی کورکومین در محدوده متغیرهای مستقل به‌عنوان اهداف مورد نظر آزمایشات در تجزیه و تحلیل‌های آماری مورد نظر قرار گرفت. برای اطمینان از صحت شرایط، آزمایش در شرایط بهینه تکرار گردید. نتایج پیشنهاد شده توسط نرم افزار در جدول ۵ آورده شده است. نقاط پیش‌بینی شده در

آزمایشگاه با ۲ تکرار مورد آزمون قرار گرفت. با انجام آزمون t مشخص شد که اختلاف معنی‌داری بین پیش‌بینی نرم‌افزار و نتایج آزمایشگاهی وجود نداشت. با توجه به نتایج به‌دست آمده و آنالیز آماری می‌توان ادعا کرد نتایج به‌دست آمده بر روی مدل انتخاب شده به‌خوبی برازش شده‌اند و نتایج حاصل از نظر آماری مورد اعتماد می‌باشد. در نقطه بهینه، تهیه لیپوزوم در شرایط میزان لستین ۰/۰۸ گرم، نسبت لستین: کلسترول ۴:۱، میزان کورکومین ۴/۱۶ میلی‌گرم و تیمار فراصوت ۵ دقیقه انجام شد.

جدول ۵- کمینه و بیشینه پاسخ‌های به‌دست‌آمده بر اساس طرح سطح پاسخ بهینه‌یابی

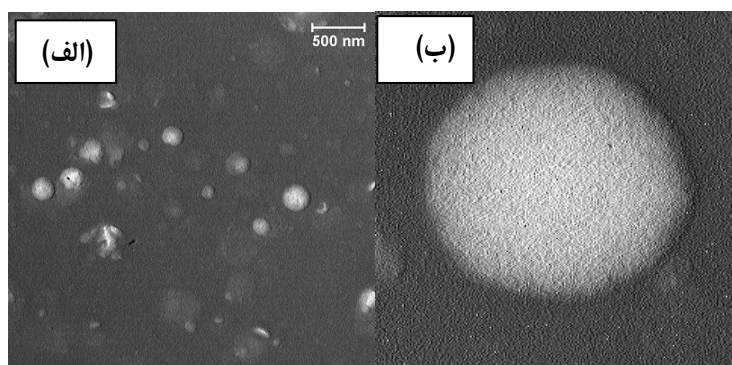
Table 5- The minimum and maximum responses obtained based on the optimization response level plan

Response پاسخ	Minimum value مقدار کمینه	Predicted value مقدار پیش‌بینی شده	Maximum value مقدار بیشینه
Particle size اندازه ذرات	210	214.17	286.32
Particle size distribution توزیع اندازه ذرات	0.08	0.11	0.27
Zeta potential پتانسیل زتا	-19.81	-16.54	-8.19
Efficiency راندمان	59.47	69.02	76.82

مورفولوژی لیپوزوم

مورفولوژی سوسپانسیون لیپوزوم بهینه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. همانطور که در شکل ۵ مشخص است لیپوزوم‌ها به صورت ذرات تک لایه، کروی شکل و بدون پارگی غشاء

هستند. این امر باعث می‌شود که ماهیت دو لایه وزیکول‌ها به وضوح در این میکروگراف قابل مشاهده باشد. اندازه ذرات به‌دست آمده از این روش $(208/334 \pm 0/16)$ با داده‌های حاصل از روش پراکندگی دینامیکی نور همراستا بود.



شکل ۵- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری لیپوزوم بهینه حاوی کورکومین (الف: $\times 4000$ ، ب: $\times 5000$)
Fig. 5- Transmission electron microscopy image of optimal liposome containing curcumin (A: $\times 4000$, B: $\times 5000$)

الگوی افتراق اشعه ایکس

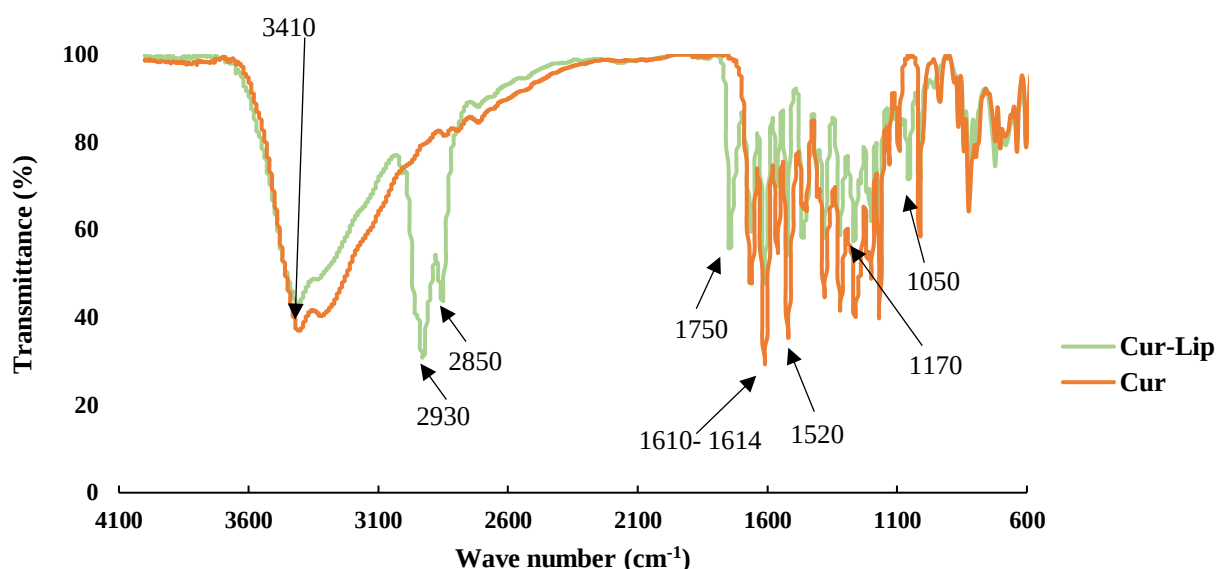
الگوی افتراق اشعه ایکس جهت ارزیابی ماهیت فیزیکی کورکومین استفاده شد (شکل ۷). برای کورکومین در زاویه $10/8^\circ$ ، $12/59^\circ$ ، $17/26^\circ$ ، $23/19^\circ$ و $27/68^\circ$ درجه (2 θ) پیک‌هایی با الگوی پراش تیز و باریک با شدت قوی تشخیص داده شد که ساختار بسیار کریستالی کورکومین را آشکار می‌کند که این نتایج همراستا با یافته‌های شیخ و همکاران، (Shaikh et al., 2009) بود. با این حال، زمانی که کورکومین در سیستم لیپوزومی به دام افتاده بود، پیک‌های کورکومین غیرکریستالی مشاهده شد و حالت آمورف کورکومین را آشکار کرد. پدیده مشابهی در مطالعات قبلی مشخص شده است و شواهدی ارائه می‌دهد که ساختار کریستالی پس از محصور شدن در لیپوزوم به حالت آمورف تبدیل شده است (Liu et al., 2015). با این حال پیک ایجاد شده برای کورکومین در طیف XRD لیپوزوم حاوی کورکومین مشاهده نشد که احتمالاً ناشی از حضور کورکومین به حالت آمورف در داخل ماتریکس لیپوزوم است (Liu et al., 2015). ویجیانی و همکاران (Wijiani et al., 2020) اظهار داشتند که حالت آمورف کورکومین بعد از درون‌پوشانی باعث افزایش پایداری و حلالیت در آب می‌شود. این نتایج مشابه یافته‌های گزارش شده چنگ و همکاران (Cheng et al., 2017) برای درون‌پوشانی کردن کورکومین درون لیپوزوم بود.

پایداری فیزیکی

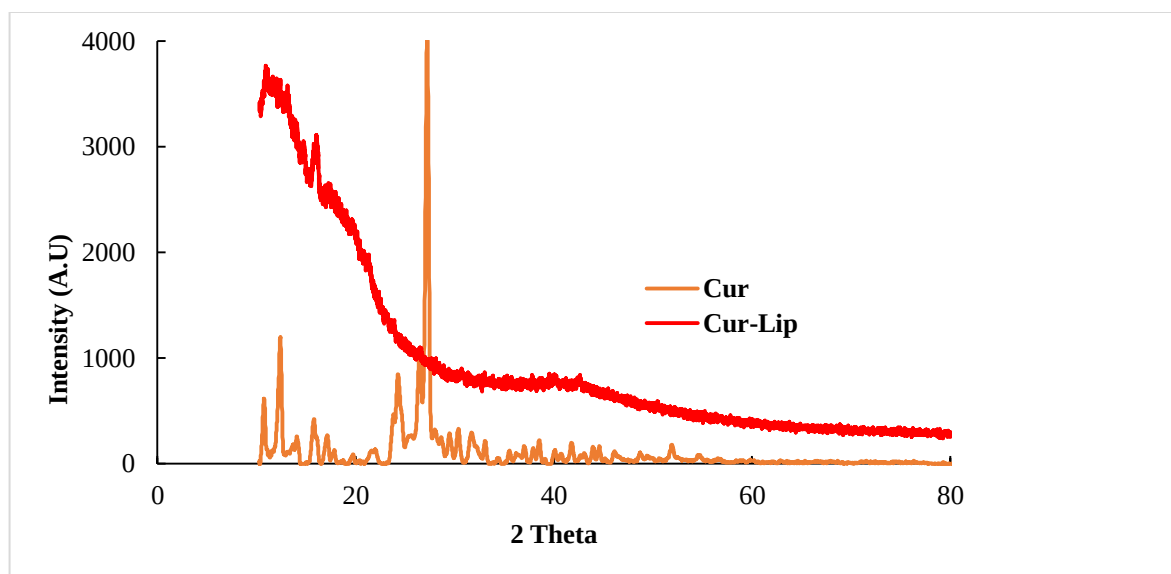
پایداری فیزیکی لیپوزوم‌ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل متعددی مانند یکپارچگی لیپوزوم، توزیع اندازه ذرات، مقدار و ماهیت فسفولیپید و پایداری‌کننده مورد استفاده، شرایط محیطی از جمله قدرت یونی و دما باشد (Anderson and Omri, 2004).

طیف‌سنجی مادون قرمز

تجزیه و تحلیل طیف مادون قرمز به‌عنوان یک تکنیک سریع و غیرمخرب برای ارزیابی کورکومین و لیپوزوم حاوی کورکومین استفاده شد. همانطور که برای کورکومین خالص در شکل ۶ مشاهده می‌شود، جذب در ناحیه 3410 cm^{-1} مربوط به کشش ارتعاشی گروه‌های حلقه بنزن بوده و پیک ایجاد شده در طول موج 1260 cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاش گروه آروماتیک می‌باشد. طیف‌سنجی مادون قرمز همچنین ارتعاش گروه‌های $\text{C}=\text{O}$ (1520 cm^{-1})، $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ اینولیک (cm^{-1}) 1380 ، مشخصه‌های $\text{C}-\text{O}$ و $\text{C}-\text{C}$ (1610 cm^{-1})، ارتعاش کششی آروماتیک متقارن حلقه $\text{C}-\text{C}$ (1614 cm^{-1}) را نشان داد (Darandale and Vavia, 2013). برای لیپوزوم حامل کورکومین، جذب در ناحیه 2850 cm^{-1} و 2930 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن گروه CH_2 در کلسترول است. علاوه بر این پیک ایجاد شده در طول موج 1750 cm^{-1} بیانگر حضور گروه‌های $\text{C}=\text{O}$ در زنجیره آسیل لیپید می‌باشد (Tai et al., 2020). پیک‌های ایجاد شده در 1050 cm^{-1} و 1170 cm^{-1} به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن PO_2^- مربوط می‌شود که نشان‌دهنده فسفولیپید لیپوزوم است (Liu et al., 2015). همانطور که در شکل مشخص است برخی از پیک‌های کورکومین آزاد از جمله 1610 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$ و $\text{C}-\text{C}$) و 1614 cm^{-1} (ارتعاش کششی آروماتیک متقارن) هنگامی که در لیپوزوم به دام افتاده ناپدید شده است و شدت پیک کشش ارتعاشی گروه‌های حلقه بنزن در طول موج 3410 cm^{-1} کاهش یافته است. از نتایج می‌توان دریافت که از طریق پیوند هیدروژنی در وزیکول دو لایه‌ای لیپوزوم، حلقه فنولی کورکومین با گروه سر فسفولیپید و همچنین برهمکنش‌های آگریز حلقه‌های آروماتیک با زنجیره‌های آسیل فسفولیپید، کورکومین در لیپوزوم به دام افتاده است (Hasan et al., 2016).



شکل ۶- طیف سنجی مادون قرمز لیپوزوم بهینه حاوی کورکومین و کورکومین خالص
Fig. 6- Infrared spectroscopy of optimized liposome containing curcumin and pure curcumin



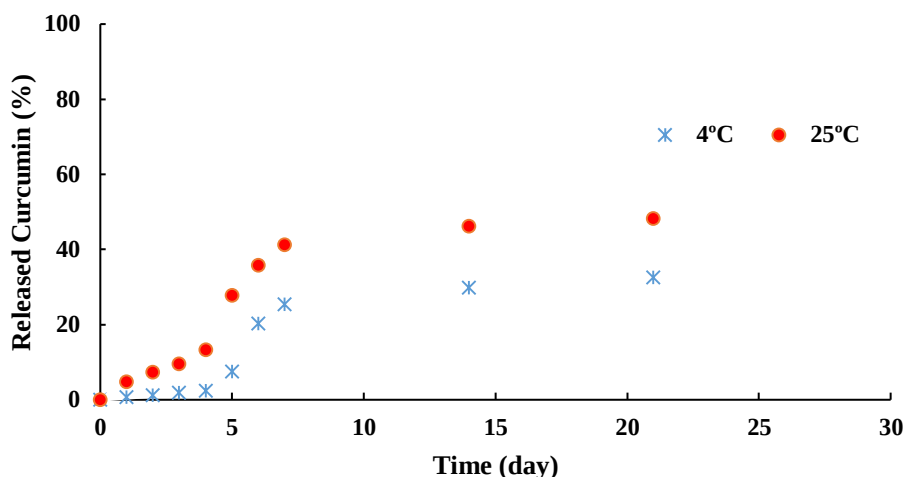
شکل ۷- الگوی پراش اشعه ایکس لیپوزوم بهینه حاوی کورکومین و کورکومین خالص
Fig. 7- X-ray diffraction pattern of optimal liposome containing curcumin and pure curcumin

مولکول کلاسترول و گروه کربونیل موجود در مولکول فسفولیپید باشد که منجر به کاهش حرکت آزادانه زنجیره های آسیل و در نتیجه کاهش سیالیت و نفوذپذیری غشای لیپیدی و افزایش پایداری و تثبیت ساختار غشای لیپوزوم شده است (Sulkowski et al., 2005).

ارزیابی انتشار و خروج کورکومین از ساختار لیپوزوم طی زمان در دو دمای ۴ درجه سانتی گراد و محیط نشان داد که در ۳ اولیه کمتر از ۱۰ درصد از کورکومین در هر دو دما از لیپوزوم خارج شدند (شکل ۸) که می تواند به علت وجود پیوند هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل

طی زمان می‌تواند به بی‌نظمی بیشتر و نظم‌گیری مجدد زنجیره‌های فسفولیپیدی در اثر حضور ترکیب قعال در دو لایه فسفولیپیدی نسبت داده شود (Taylor et al., 2005). نتایج نشان داد که افزایش دما باعث تغییر خصوصیت نفوذپذیری و حرکات براونی لیپیدها در ساختار لیپوزوم می‌شود (Taylor et al., 2005). با افزایش دما گروه‌های سر لیپیدی تغییر آرایش داده و گروه‌های فسفاتیدیل در معرض محیط قرار می‌گیرند (Fathi et al., 2012).

گزارش شده است درون پوشانی مواد لیپوفیل بعد از کپسوله شدن در دو لایه‌ی فسفولیپیدی باعث کاهش سرعت رهایش در طی زمان می‌شود (Xia and Xu, 2005). بعد از گذشت ۲۵ روز رهایش کورکومین به شدت افزایش یافت و این میزان در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود (شکل ۸)، همچنین توده‌ای شدن ذرات در دمای محیط مشاهده گردید که این پدیده احتمالاً به پایین بودن پتانسیل زتای ذرات مربوط می‌شود. کاهش کورکومین درون پوشانی شده در



شکل ۸- میزان رهایش کورکومین از لیپوزوم طی زمان در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد

Fig. 8- Curcumin release rate from liposome over time at two temperatures of 4 and 25 degrees Celsius

نسبت داده می‌شود که بر غربالگری الکترواستاتیک، تجمع لیپوزوم و در نتیجه نشت قابل توجه ترکیبات کپسوله‌شده تأثیر می‌گذارد (Tan et al., 2014). اگرچه آنزیم پپسین قادر به نفوذ به غشای لیپوزوم نیست، شرایط اسیدی زاویه گروه‌های سر و دم لیپیدها را تغییر می‌دهد و منجر به تغییر در بار سطحی لیپوزوم‌ها می‌شود (Lähdesmäki et al., 2010). علاوه بر این، چنگ و همکاران (Cheng et al., 2019) گزارش کردند که وضعیت یونیزاسیون گروه‌های کربوکسیل و آمینه روی گروه‌های سر فسفولیپید لیپوزوم‌های حاوی کورکومین به pH وابسته است. در هضم شبیه‌سازی شده روده کوچک، آزادسازی کورکومین از وزیکول‌های لیپوزوم باقی مانده پس از هضم معده به شدت افزایش یافت. این افزایش ناگهانی به دلیل وجود نمک‌های صفراوی به‌عنوان یک عامل امولسیون‌کننده است که می‌تواند لیپوزوم را با مکانیسم ورود به فسفولیپیدهای لیپوزوم از بین ببرد که در نتیجه غشای فسفولیپید را مختل کرده و غشا را سیال‌تر می‌کند (Maherani et al., 2013). علاوه بر این، لیپاز پانکراس بر روی سطح لیپیدها جذب

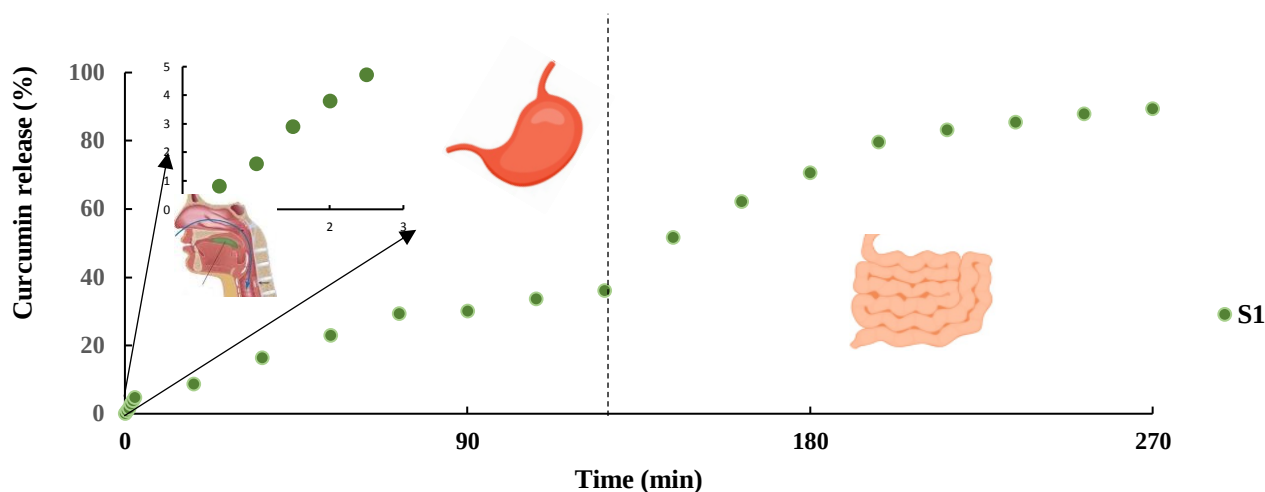
عملکرد آزادسازی آزمایشگاهی در هضم شبیه‌سازی شده و

ارزیابی زیست‌دسترسی

آزادسازی کورکومین از لیپوزوم موجود در سوسپانسیون لیپوزوم با رسم صدک انتشار تجمعی در مقابل زمان آزادسازی طی سه فرآیند متوالی هضم گوارشی آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد (شکل ۹). نتایج نشان داد که مقدار بسیار کمی از کورکومین در مرحله دهان شبیه‌سازی شده منتشر شد که احتمالاً ناشی از زمان کوتاه و عدم وجود آنزیم‌های خاص برای مختل کردن دو لایه‌های فسفولیپید لیپوزوم است. آزادسازی تجمعی کورکومین از لیپوزوم در پایان فاز دهانی، شاهد خوبی برای سهم نیروی مکانیکی در فاز دهانی ارائه می‌کند. نیروی مکانیکی می‌تواند مستقیماً بر پارگی غشای لیپوزومی تأثیر بگذارد (Taylor et al., 2005). بلافاصله پس از مرحله شبیه‌سازی شده دهانی، رفتار متفاوت کورکومین تحت pH اسیدی و محیط آنزیمی مشاهده شد. البته کورکومین توسط لیپوزوم دو لایه لیپیدی باقی ماند. تغییرات مربوطه در غشای لیپوزوم به ترکیب نمک‌های یونی، pH و آنزیم‌های گوارشی

آورده شده است. با توجه به ضریب تبیین، مدل کینتیکی پیاس-سالهین با ضریب تبیین بیش از ۰/۹۹ برای توصیف رهایش کورکومین از لیپوزوم در فازهای سه گانه دستگاه گوارش انتخاب شد. در این معادله K_1 و K_2 ثابت کینتیکی فیک و ثابت نرخ فرسایش است. با توجه به اینکه در تمام سه فاز دستگاه گوارش (دهان، معده و روده کوچک) نسبت K_1/K_2 بالاتر از ۱ بود رهایش بر اساس مکانسیم نفوذ فیک رخ داده است.

می شود و سپس فسفولیپید را به لیزوفسفولیپیدهای ۱-آسیل و ۲-آسیل و اسیدهای چرب آزاد هیدرولیز می کند که ممکن است دلیل دیگری برای افزایش تخریب لیپوزومها باشد (Liu et al., 2015). جهت اطلاع از مکانسیم رهایش کورکومین از لیپوزوم در شرایط دستگاه گوارشی انسان، مدل های ریاضی کینتیکی مختلفی با داده های تجربی رهایش کورکومین برازش شد. پارامترهای حاصل از مدل های تجربی درجه صفر، هیگوجی، کورسمر- پیاس و کوپچا در جدول ۶



شکل ۹- رفتار رهایش کورکومین از لیپوزوم بهینه تحت شرایط شبیه سازی شده دهان، معده و روده

Fig. 9- Curcumin release behavior from the optimal liposome under simulated mouth, stomach and intestinal conditions

جدول ۶- پارامترهای حاصل از برازش مدل های مختلف بر نتایج تجربی برای رهایش کورکومین از لیپوزوم در شرایط شبیه سازی دستگاه گوارش

Table 6- The parameters obtained by fitting different models on the experimental results for the release of curcumin from liposome in the conditions of simulating the digestive system

	Zero-order		Higuchi		Kupcha			Peppas sahlin			
	$K (min^{-1})$	R^2	$K (min^{1/2})$	R^2	A	B	R^2	K_1	K_2	m	R^2
Mouth دهان	1.87	0.99	2.47	0.85	-0.43	2.18	0.99	2.67	-0.64	1.50	0.99
Stomach معده	0.35	0.55	3.47	0.96	4.80	-0.14	0.99	4.63	-0.001	0.46	0.99
Intestine روده	-	-	8.27	0.84	13.91	-0.54	0.90	18.84	-0.002	0.34	0.99

نسبت لستین: کلسترول، میزان کورکومین و تیمار فراصوت و همچنین اثر درجه دوم نسبت لستین: کلسترول برای اندازه ذرات لیپوزوم بسیار معنی دار ($p < 0/01$) به دست آمد. با اینکه افزایش نسبت لستین: کلسترول موجب یکنواختی اندازه ذرات شد، اما افزایش زمان تیمار فراصوت باعث افزایش توزیع اندازه ذرات گردید. پتانسیل زتا تنها متاثر از متغیر مستقل میزان لستین بود. همچنین تاثیر لستین، تیمار فراصوت

نتیجه گیری

جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل (میزان کورکومین، میزان لستین، نسبت لستین: کلسترول و تیمار فراصوت) بر متغیرهای وابسته (تغییرات اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و بازده ریزپوشانی کورکومین) طی فرآیند تهیه لیپوزوم از طرح سطح پاسخ استفاده شد. بر اساس مدل های ارائه شده برای هر پاسخ، اثرات خطی میزان لستین،

بود. اگرچه که کورکومین بعد از به محصور شدن در بین دو لایه لیپوزومی به حالت آمورف تبدیل شده بود. ارزیابی انتشار و خروج کورکومین از ساختار لیپوزوم طی زمان در دو دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و محیط نشان داد که در ۳ اولیه کمتر از ۱۰ درصد از کورکومین در هر دو دما از لیپوزوم خارج شده بودند و میزان رهایش کورکومین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود. رهایش کورکومین از سیستم حامل لیپوزوم در تمام سه فاز دستگاه گوارش (دهان، معده و روده کوچک) بر اساس مکانسیم انتشار رخ داده بود

و اثر متقابل میزان لستین و نسبت لستین: کلسترول بسیار معنی‌دار بر بازده ریزپوشانی بود. در نقطه بهینه، شرایط تهیه لیپوزوم با میزان ۰/۰۸ گرم لستین، ۱:۴ نسبت لستین: کلسترول، ۴/۱۶ میلی گرم کورکومین با ۵ دقیقه تیمار فراصوت تعیین شد. بالاترین بازده درون پوشانی ($1/01 \pm$)، ۶۹/۰۱۹ درصد و کمترین اندازه ذرات ($214/174 \pm 0/09$ نانومتر)، توزیع اندازه ذرات ($0/105 \pm 0/02$) و پتانسیل زتا ($16/541 \pm 0/31$ میلی‌ولت) برای لیپوزوم بهینه‌یابی شده، بدست آمد. این لیپوزوم‌ها به صورت ذرات تک لایه، کروی شکل و بدون پارگی غشاء بودند و به خوبی کورکومین کریستالی در بین دو لایه فسفولیپیدی آن به دام افتاده

منابع

- Adhikary, R., Barnes, C.A., Trampel, R.L., Wallace, S.J., Kee, T.W., & Petrich, J.W. (2011). Photoinduced trans-to-cis isomerization of cyclocurcumin. *The Journal of Physical Chemistry B* 115(36): 10707-10714. <https://doi.org/10.1021/jp200080s>.
- Ahmed, K., Li, Y., McClements, D.J., & Xiao, H. (2012). Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chemistry* 132(2): 799-807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.039>.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A., & Aggarwal, B.B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics* 4(6): 807-818. <https://doi.org/10.1021/mp700113r>.
- Anderson, M., & Omri, A. (2004). The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug Delivery* 11(1): 33-39. <https://doi.org/10.1080/10717540490265243>.
- Balanč, B., Trifković, K., Đorđević, V., Marković, S., Pjanović, R., Nedović, V., & Bugarski, B. (2016). Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes. *Food Hydrocolloids* 61: 832-842. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.005>.
- Basnet, P., Hussain, H., Tho, I., & Skalko-Basnet, N. (2012). Liposomal delivery system enhances anti-inflammatory properties of curcumin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101(2): 598-609. <https://doi.org/10.1002/jps.22785>.
- Chavhan, S.S., Petkar, K.C., & Sawant, K. (2011). Nanosuspensions in drug delivery: recent advances, patent scenarios, and commercialization aspects. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* 28(5).
- Chen, H.W., & Chang, Y.W. (2020). Encapsulation of Clitoria ternatea extract in liposomes by synergistic combination of probe-type ultrasonication and high-pressure processing. *Journal of Food Safety* 40(6): e12859. <https://doi.org/10.1111/jfs.12859>.
- Chen, L., Bai, G., Yang, S., Yang, R., Zhao, G., Xu, C., & Leung, W. (2014). Encapsulation of curcumin in recombinant human H-chain ferritin increases its water-solubility and stability. *Food Research International* 62: 1147-1153. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.054>.
- Chen, S., Li, Q., McClements, D.J., Han, Y., Dai, L., Mao, L., & Gao, Y. (2020). Co-delivery of curcumin and piperine in zein-carrageenan core-shell nanoparticles: Formation, structure, stability and in vitro gastrointestinal digestion. *Food Hydrocolloids* 99: 105334. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105334>.
- Chen, W., Zou, M., Ma, X., Lv, R., Ding, T., & Liu, D. (2019). Co-encapsulation of EGCG and quercetin in liposomes for optimum antioxidant activity. *Journal of Food Science* 84(1): 111-120. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14405>.
- Cheng, C., Peng, S., Li, Z., Zou, L., Liu, W., & Liu, C. (2017). Improved bioavailability of curcumin in liposomes prepared using a pH-driven, organic solvent-free, easily scalable process. *RSC Advances* 7(42): 25978-25986. <https://doi.org/10.1039/C7RA02861J>.
- Cheng, C., Wu, Z., McClements, D.J., Zou, L., Peng, S., Zhou, W., & Liu, W. (2019). Improvement on stability, loading capacity and sustained release of rhamnolipids modified curcumin liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 183: 110460. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110460>.
- Chi, J., Ge, J., Yue, X., Liang, J., Sun, Y., Gao, X., & Yue, P. (2019). Preparation of nanoliposomal carriers to improve the stability of anthocyanins. *LWT*, 109, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.070>.

15. Darandale, S.S., & Vavia, P.R. (2013). Cyclodextrin-based nanosponges of curcumin: formulation and physicochemical characterization. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 75(3-4): 315-322. <https://doi.org/10.1007/s10847-012-0186-9>.
16. El Khoury, E. D., & Patra, D. (2013). Ionic liquid expedites partition of curcumin into solid gel phase but discourages partition into liquid crystalline phase of 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(33), 9699-9708. <https://doi.org/10.1021/jp4061413>
17. El-Samaligy, M. S., Afifi, N. N., & Mahmoud, E. A. (2006). Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance. *International journal of pharmaceutics*, 319(1-2), 121-129. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.04.023>
18. Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 23(1), 13-27. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>
19. Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C. J. F., Jabbari, E., ... & Arab-Tehrany, E. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International journal of pharmaceutics*, 461(1-2), 519-528. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.007>
20. Hasan, M., Messaoud, G. B., Michaux, F., Tamayol, A., Kahn, C. J., Belhaj, N., ... & Arab-Tehrany, E. (2016). Chitosan-coated liposomes encapsulating curcumin: Study of lipid-polysaccharide interactions and nanovesicle behavior. *RSC advances*, 6(51), 45290-45304. <https://doi.org/10.1039/C6RA05574E>
21. Huh, N. W., Porter, N. A., McIntosh, T. J., & Simon, S. A. (1996). The interaction of polyphenols with bilayers: conditions for increasing bilayer adhesion. *Biophysical journal*, 71(6), 3261-3277. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79519-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79519-X)
22. Jahanshahi, M., & Mehravar, R. (2009). Protein Nanoparticles as a Novel System for Food Science and Technology. *Dynam Biochem Process Biotechnol Mol Biol*, 3(2), 1-11.
23. Jain, S., Kumar, D., Swarnakar, N. K., & Thanki, K. (2012). Polyelectrolyte stabilized multilayered liposomes for oral delivery of paclitaxel. *Biomaterials*, 33(28), 6758-6768. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.026>
24. Jin, H. H., Lu, Q., & Jiang, J. G. (2016). Curcumin liposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids and soybean lecithin. *Journal of dairy science*, 99(3), 1780-1790. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10391>
25. Karewicz, A., Bielska, D., Gzyl-Malcher, B., Kepczynski, M., Lach, R., & Nowakowska, M. (2011). Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88(1), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.06.037>
26. Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., and Hofer, F. 2012. Electron microscopy of nanoemulsions: *An essential tool for characterisation and stability assessment*. *Micron*, 43, 43(2-3), 85-103. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>
27. Lähdesmäki, K., Ollila, O. S., Koivuniemi, A., Kovanen, P. T., & Hyvönen, M. T. (2010). Membrane simulations mimicking acidic pH reveal increased thickness and negative curvature in a bilayer consisting of lysophosphatidylcholines and free fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798(5), 938-946. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.01.020>
28. Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Sfar, S., Charcosset, C., & Fessi, H. (2011). Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor—application to spironolactone encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 415(1-2), 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.034>
29. Li, R., Deng, L., Cai, Z., Zhang, S., Wang, K., Li, L., ... & Zhou, C. (2017). Liposomes coated with thiolated chitosan as drug carriers of curcumin. *Materials science and engineering: C*, 80, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.136>
30. Li, Z. L., Peng, S. F., Chen, X., Zhu, Y. Q., Zou, L. Q., Liu, W., & Liu, C. M. (2018). Pluronic modified liposomes for curcumin encapsulation: Sustained release, stability and bioaccessibility. *Food research international*, 108, 246-253. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.048>
31. Lin, C. C., Lin, H. Y., Chen, H. C., Yu, M. W., & Lee, M. H. (2009). Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. *Food Chemistry*, 116(4), 923-928. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.052>
32. Liu, Y., Liu, D., Zhu, L., Gan, Q., & Le, X. (2015). Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. *Food research international*, 74, 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.024>
33. Lu, Q., Li, D. C., & Jiang, J. G. (2011). Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 13004-13011. <https://doi.org/10.1021/jf203194w>

34. Lu, Q., Lu, P. M., Piao, J. H., Xu, X. L., Chen, J., Zhu, L., & Jiang, J. G. (2014). Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT-Food science and technology*, 57(2), 686-695. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.044>
35. Madane, R.G., & Mahajan, H.S. (2016). Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for nasal administration: design, characterization, and in vivo study. *Drug Delivery* 23(4): 1326-1334. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.975382>.
36. Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheiriloomoom, A., Geny, D., & Linder, M. (2013). Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie* 95(11): 2018-2033. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.006>.
37. Makino, K., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H., & Kondo, T. (1991). Temperature and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophys Chemistry* 41: 75-183. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(91\)80017-L](https://doi.org/10.1016/0301-4622(91)80017-L).
38. Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Rezayi Mokarram, R., & Mohammadifar, M.A. (2014). Physical properties of vitamin D3-loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration-sonication. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 8(4): 175-188.
39. Mosca, M., Ceglie, A., & Ambrosone, L. (2011). Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 164(2): 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.12.006>.
40. Mozafari, M.R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G.G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties* 11(4): 833-844. <https://doi.org/10.1080/10942910701648115>.
41. Nahr, F.K., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Kafil, H.S., Hoseini, M., & Moghadam, B.E. (2019). Investigation of physicochemical properties of essential oil loaded nanoliposome for enrichment purposes. *LWT* 105: 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.010>.
42. Nakajima, M., Wang, Z., Chaudhry, Q., Park, H.J., & Juneja, L.R. (2015). Nano-science-engineering-technology applications to food and nutrition. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 61(Supplement): S180-S182.
43. Ng, Z.Y., Wong, J.Y., Panneerselvam, J., Madheswaran, T., Kumar, P., Pillay, V., & Chellappan, D.K. (2018). Assessing the potential of liposomes loaded with curcumin as a therapeutic intervention in asthma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 172: 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.027>.
44. Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., & Evans, E. (2000). Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophysical Journal* 79(1): 321-327. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76294-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76294-1).
45. Pains, M., Daly, S.R., Aliakbarian, B., Fathi, A., Tehrany, E.A., Perego, P., & Valtchev, P. (2015). An efficient liposome based method for antioxidants encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136: 1067-1072. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.038>.
46. Peng, S., Zou, L., Liu, W., Liu, C., & McClements, D.J. (2018). Fabrication and characterization of curcumin-loaded liposomes formed from sunflower lecithin: impact of composition and environmental stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(46): 12421-12430. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04136>.
47. Qazi, H.J., Ye, A., Acevedo-Fani, A., & Singh, H. (2021). In vitro digestion of curcumin-nanoemulsion-enriched dairy protein matrices: Impact of the type of gel structure on the bioaccessibility of curcumin. *Food Hydrocolloids* 117: 106692. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106692>.
48. Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M.A., & Maherani, B. (2017). Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high-valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chemistry* 220: 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.207>.
49. Ravichandran, R. (2013). Studies on dissolution behaviour of nanoparticulate curcumin formulation. <https://doi.org/10.4236/anp.2013.21010>.
50. Reza Mozafari, M., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetrios, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research* 18(4): 309-327. <https://doi.org/10.1080/08982100802465941>.
51. Schubert, M.A., Harms, M., & Müller-Goymann, C.C. (2006). Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27(2-3): 226-236. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.10.004>.
52. Shaikh, J., Ankola, D.D., Beniwal, V., Singh, D., & Kumar, M.R. (2009). Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 37(3-4): 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.02.019>.

53. Sulkowski, W.W., Pentak, D., Nowak, K., & Sułkowska, A. (2005). The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure* 744: 737-747. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.075>.
54. Sun, M., Su, X., Ding, B., He, X., Liu, X., Yu, A., & Zhai, G. (2012). Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine* 7(7): 1085-1100. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.80>.
55. Tai, K., Rappolt, M., Mao, L., Gao, Y., & Yuan, F. (2020). Stability and release performance of curcumin-loaded liposomes with varying content of hydrogenated phospholipids. *Food Chemistry* 326: 126973. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126973>.
56. Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y., & Wada, K. (2009). Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(19): 9141-9146. <https://doi.org/10.1021/jf9013923>.
57. Tan, C., Xue, J., Lou, X., Abbas, S., Guan, Y., Feng, B., & Xia, S. (2014). Liposomes as delivery systems for carotenoids: comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release. *Food & Function* 5(6): 1232-1240. <https://doi.org/10.1039/C3FO60498E>.
58. Taylor, T.M., Davidson, P.M., Bruce B.D., & Weiss, J. (2005). Ultrasonic spectroscopy and differential scanning calorimetry of liposomal-encapsulated Nisin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(22): 8722-8728. <https://doi.org/10.1021/jf050726k>.
59. van Ruth, S.M., & Roozen, J.P. (2000). Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system. *Food Chemistry* 71: 339-345. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00186-2).
60. Wijiani, N., Isadiartuti, D., Rijal, M. A. S., & Yusuf, H. (2020). Characterization and dissolution study of micellar curcumin-spray dried powder for oral delivery. *International Journal of Nanomedicine* 15: 1787.
61. Wink, M. (2010). *Functions and biotechnology of plant secondary metabolites*. (Second ed.). UK: Blackwell Publishing Ltd, PP. 433.
62. Xia, S., & Xu, S. (2005). Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research International* 38: 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.010>.
63. Zhi, K., Wang, R., Wei, J., Shan, Z., Shi, C., & Xia, X. (2021). Self-assembled micelles of dual-modified starch via hydroxypropylation and subsequent debranching with improved solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocolloids* 118: 106809. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106809>.
64. Zou, L., Q., Peng, S.F., Liu, W., Gan, L., Liu, W.L., Liang, R.H., & Chen, X. (2014). Improved in vitro digestion stability of (-)-epigallocatechin gallate through nanoliposome encapsulation. *Food Research International* 64: 492-499. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.042>.



Identification of Functional Groups, Total Phenol and Flavonoids Contents, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Aqueous Extract and Its Interactions with Chloramphenicol and Amphotericin B

E. Safari¹, H. Barzegar^{ID 2*}, H. Jooyandeh³, B. Alizadeh Behbahani⁴, M. Noshad⁵

Received: 2022.01.06

Revised: 2022.02.06

Accepted: 2022.02.27

Available Online: 2022.02.27

How to cite this article:

Safari, E., Barzegar, H., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2023). Identification of functional groups, total phenol and flavonoids contents, antioxidant potential and antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) aqueous extract and its interactions with chloramphenicol and amphotericin B. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 79-93. (In Persian with English abstract). <http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.74583.1132>

Introduction

The addition of chemical preservatives increases the shelf life of food products, but prolonged and indiscriminate use of chemical preservatives increases the resistance of microorganisms and the health risks associated with their uptake. Medicinal plants have a wide variety in the world as well as in Iran. In recent years, the use of natural preservatives such as plant extracts and essential oils, due to their importance and role in controlling the growth of pathogenic microorganisms, has been proposed as an alternative to chemical preservatives. Black pepper is an aromatic medicinal plant. The specific properties of black pepper essential oil, such as its antimicrobial and antioxidant activity, have also been confirmed. Amphotericin B is one of the effective antibiotics for treating infections caused by pathogenic fungi. The mechanism of action of amphotericin B is to destroy fungal cells in such a way that by binding to ergosterol in the cell membrane of fungi, it creates pores and eventually destroys them. One of the most important and common antibiotics used in the treatment of infections caused by pathogenic bacteria is chloramphenicol. This antibiotic is effective against gram-positive and gram-negative bacteria due to its broad spectrum. The aim of this study was to identify bioactive functional groups, antioxidant potential, phenol and total flavonoid compounds and to evaluate the antimicrobial activity of black pepper extract against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus coagulans* and *Aspergillus niger*.

Materials and Methods

In this study, the antimicrobial effect of black pepper aqueous extract was investigated against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus coagulans* and *Aspergillus niger* by disc diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration methods. Total phenol and flavonoid contents of the species were determined by Folin-Ciocalteu and $AlCl_3$ assays, respectively. Three biochemical assays, namely 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) free radical scavenging and β -caroten/linoleic acid activity systems, were used to evaluate antioxidant activity. Identification of functional groups as well as the structure of organic compounds in black pepper extract was also performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). To evaluate the synergistic effect of black pepper extract in combination with amphotericin B and chloramphenicol antibiotics, Sub-MIC was used.

1, 2, 3, 4 and 5- M.Sc., Associate Professor, Professor, Assistant Professor and 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, respectively.

(* - Corresponding Author Email: hbarzegar@asnrukh.ac.ir)

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2022.74583.1132](https://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.74583.1132)

Results and Discussion

The peaks observed in aqueous black pepper extract confirmed the presence of O-H ($3000-3500\text{ cm}^{-1}$), C-H ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$), C=O ($1613.62-1633.52\text{ cm}^{-1}$) and C-O ($100.57-1038.82\text{ cm}^{-1}$) functional groups of bioactive compounds. The total phenol and flavonoids content of the extract were 45.12 mg GAE/g extract and its flavonoid content was 29.66 mg QUE/g extract which had an important role in its antioxidant activity. The aqueous black pepper extract had remarkable DPPH free radical scavenging activity ($IC_{50}=32.37\text{ }\mu\text{g/ml}$), ABTS free radical scavenging activity ($IC_{50}=28.45\text{ }\mu\text{g/ml}$) and beta-carotene bleaching inhibitory effect (46.45%), revealing the electron/hydrogen donating ability of the essential oil. The results of measuring the antimicrobial activity of extract by disk diffusion and agar well showed that black pepper extract showed more antimicrobial effect on gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus coagulans* than gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. This could be due to the difference in their cell wall structure. *Aspergillus niger* is the most sensitive species to aqueous black pepper extract. The minimum inhibitory concentrations of extract for *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus coagulans* and *Aspergillus niger* were equal to 32, 16, 4, 8 and 4 mg/ml, respectively. The minimum bactericidal concentration of black pepper extract for two bacterial species, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was more than 512 mg/ml. Also, the minimum bactericidal concentration for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus coagulans* was 128 and 256 mg/ml, respectively, and 128 mg/ml for *Aspergillus niger*. The results of interaction of black pepper extract with chloramphenicol antibiotic showed that the *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were synergistic, but antagonism was observed for the gram-positive *Bacillus coagulans*.

Keywords: Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Black pepper, Fourier transform infrared spectroscopy, Extract

مقاله پژوهشی

شناسایی گروه‌های عاملی، محتوای فنل و فلاونوئید کل، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی فلفل سیاه و برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین

B

احسان صفری^۱ - حسن برزگر^{۲*} - حسین جوینده^۳ - بهروز علیزاده بهبهانی^۴ - محمد نوشاد^۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸

چکیده

در این پژوهش، گروه‌های عاملی زیست فعال، محتوای تام فنلی و فلاونوئید، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی فلفل سیاه و همچنین برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج طیف‌سنجی فروسرخ عصاره فلفل سیاه، پیک‌های مشاهده شده مؤید حضور گروه‌های عاملی O-H ($3500-3000\text{ cm}^{-1}$)، C-H ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$)، C=O ($1633/52 - 1613/62\text{ cm}^{-1}$) و C-O ($1038/82 - 1000/57\text{ cm}^{-1}$) ترکیبات زیست فعال بود. میزان فنل کل عصاره فلفل سیاه برابر $45/12$ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره و میزان فلاونوئید آن برابر با $29/66$ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره بدست آمد. نتایج حاصل از فعالیت آنتی‌اکسیدانی برحسب فاکتور IC₅₀ به روش (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH و (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) ABTS به ترتیب $32/37$ و $28/45\text{ }\mu\text{g/ml}$ بود. زوال رنگ بتا کاروتن برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی $46/45$ درصد بدست آمد. در روش انتشار در دیسک بیشترین قطر هاله عدم رشد (16 میلی‌متر) عصاره فلفل سیاه در غلظت 70 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* بود. در روش چاهک در آگار بیشترین قطر هاله عدم رشد در کمترین غلظت (10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مربوط به گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* با قطر هاله $8/40$ میلی‌متر بود، همچنین در این غلظت هیچ گونه هاله عدم رشد برای گونه باکتریایی *اشرشیا کلی* مشاهده نگردید. نتایج حاصل نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی برای *اشرشیا کلی*، *سودوموناس انروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس کواگولانس* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب 32 ، 16 ، 4 ، 8 و 4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل از برهمکنش عصاره فلفل سیاه با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل نشان داد که گونه‌های باکتریایی *اشرشیا کلی*، *سودوموناس انروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* حالت هم‌افزایی داشت اما برای گونه گرم مثبت *باسیلوس کواگولانس* حالت اثر کاهندگی مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، فلفل سیاه، طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرو سرخ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، عصاره

مقدمه

در حال حاضر بسیاری از جوامع بشری به سمت استفاده از مواد غذایی با ویژگی‌های تازه بودن، طبیعی بودن و داشتن کمترین میزان مواد افزودنی گرایش پیدا کرده‌اند (Roman et al., 2017). این

ویژگی‌ها توسط بسیاری از مصرف‌کنندگان فرآورده‌های غذایی که طرفدار سلامتی هستند بیان شده است (Granata et al., 2018). مطابق آمار سازمان بهداشت جهانی، هر ساله حدود 600 میلیون نفر (تقریباً یک نفر به ازای 10 نفر)، در سرتاسر دنیا پس از استفاده و مصرف غذاهای آلوده، به مسمومیت‌های گوارشی دچار می‌شوند که از این تعداد، 420 هزار نفر به علت بیماری‌های گوارشی ناشی از عفونت و مسمومیت‌های شدید غذایی جان خود را از دست می‌دهند (WHO, 2015). فساد مواد غذایی یک فرآیند متابولیکی می‌باشد که سبب می‌شود مواد غذایی به دلیل تغییر در ویژگی‌های حسی، برای

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، استادیار و دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

(Email: hbarzegar@asnrukh.ac.ir)

(*) نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.74583.1132

همچنین این گیاه می‌تواند در برابر اختلالات تنفسی از جمله تب، سرماخوردگی، آسم استفاده شود (Fan et al., 2011).

آمفوتریسین B، از جمله آنتی‌بیوتیک‌های موثر برای درمان عفونت‌های ناشی از قارچ‌های بیماری‌زا می‌باشد. مکانیسم عمل آمفوتریسین B جهت تخریب سلول‌های قارچی به نحوی است که با اتصال به ارگوسترول موجود در غشای سلول قارچ‌ها باعث ایجاد منافذ و در نهایت مرگ آن‌ها می‌شود. (Asghari et al., 2010) یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های بیماری‌زا، کلرامفنیکل می‌باشد. این آنتی‌بیوتیک به دلیل وسیع الطیف بودن بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موثر می‌باشد.

هدف از این پژوهش، شناسایی گروه‌های عاملی زیست‌فعال، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، تعیین محتوای کل ترکیبات فنل و فلاونوئیدی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره فلفل سیاه بر *شرشیا کلی* (ATCC 25992)، *سودوموناس ائروژینوزا* (ATCC 27853)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *باسیلوس کولانسنس* (ATCC 31284) و *آسپرژیلوس نایچر* (PTCC 5010) و برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و آمفوتریسین B در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره فلفل سیاه

فلفل سیاه به صورت خشک شده از بازار محلی اهواز تهیه گردید. پس از تایید نام علمی گیاه توسط متخصص گیاه شناسی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، عصاره‌گیری با آب مقطر استریل به روش خیساندن (ماسراسیون) مطابق با مطالعه نوشاد و همکاران (Noshad et al., 2021) انجام شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز عصاره فلفل سیاه

برای شناسایی گروه‌های عاملی موجود در عصاره فلفل سیاه از طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرو سرخ استفاده گردید. در این آزمون از دستگاه Thermo Nicolet، مدل Avatar 370، ساخت آمریکا استفاده شد. طیف مورد نظر با دقت ۴ بر سانتی‌متر در محدوده ۴۰۰۰-۵۰۰ بر سانتی‌متر رسم گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2019).

بررسی محتوای تام فنلی عصاره فلفل سیاه

مصرف انسان نامطلوب باشد (Rawat, 2015). استفاده از مواد افزودنی خوراکی، از جمله نگهدارنده‌های سنتزی و شیمیایی، با افزایش میزان آلرژی و اختلال بیش فعالی در کودکان ارتباط مستقیم دارد (Eigenmann and Haenggeli, 2004). جلوگیری از رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و در نهایت جلوگیری و به تأخیر انداختن عوامل فساد میکروبی در مواد و فرآورده غذایی به‌طور معمول به واسطه افزودن مواد شیمیایی و سنتزی سبب افزایش عمر نگهداری محصولات غذایی می‌گردد، اما استفاده طولانی مدت و بی‌رویه از نگهدارنده شیمیایی، سبب افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها و خطرات بهداشتی ناشی از مصرف آن‌ها می‌گردد (Pisoschi et al., 2018).

استخراج از گیاهان، فرآیندی می‌باشد که هدف اصلی آن خارج کردن برخی از ترکیبات و اجزای موجود در گیاهان به ویژه متابولیت‌های ثانویه است. از دیرباز استفاده از مشتقات گیاهی از جمله اسانس‌ها و عصاره‌های آن‌ها برای اهداف مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. اهمیت و تأثیر استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد به خوبی شناخته شده است. گیاهان دارویی تنوع بسیار زیادی در سطح جهان و ایران دارند. در طی چند سال اخیر، بکارگیری و استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی همانند عصاره و اسانس‌های گیاهی، با توجه به اهمیت و نقش آن‌ها در کنترل رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن به‌عنوان جایگزین مواد نگهدارنده شیمیایی مطرح شده است (Burt, 2004).

فلفل سیاه به‌عنوان گیاه بومی جنوب هند شناخته شده و از خانواده Piperaceae است. کشت فلفل سیاه به خاطر میوه آن است که معمولاً خشک شده و به‌عنوان یک ادویه و چاشنی استفاده می‌شود. فلفل سیاه یک گیاه معطر دارویی است. خواص مشخص اسانس فلفل سیاه، مثل فعالیت‌های ضد میکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن نیز تأیید شده است (Pino et al., 1992). اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از بخش‌های مختلف گیاه مانند گل، جوانه، برگ، میوه، شاخه، دانه، چوب، ریشه تهیه می‌شوند. مشتقات گیاهی از مهمترین نگهدارنده‌های طبیعی محسوب می‌شوند (Minooeian Haghighi and Khosravi, 2014). فلفل سیاه را می‌توان برای اهداف مختلفی از جمله رژیم‌های غذایی انسان، به‌عنوان دارو، نگهدارنده و همچنین به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک استفاده کرد. فلفل در سراسر جهان در انواع سس‌ها و غذاهایی مانند غذاهای گوشتی استفاده می‌شود. این ماده حاوی آلکالوئید پپرین (۱-پپروایل پپیریدین) است. از نظر دارویی فلفل سیاه را می‌توان در اختلالات گوارشی مانند سموم روده بزرگ، مشکلات مختلف معده، اسهال و سوء هاضمه استفاده کرد،

ارزیابی مهار رادیکال آزاد عصاره فلفل سیاه به روش ABTS^۲

جهت ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد ABTS عصاره فلفل سیاه از روش نوروزی و همکاران (Norouzi et al., 2018) استفاده شد. در این روش ابتدا محلول آبی با غلظت ۷ میلی‌مولار از ABTS تهیه گردید. پس از تهیه محلول ABTS، به آن پتاسیم پرسولفات افزوده شد تا غلظت نهایی محلول به ۲/۴۵ میلی‌مولار برسد. محلول تهیه شده در مکان تاریک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شد. پس از سپری شدن مدت زمان مذکور، رقیق‌سازی کاتیون رادیکال ABTS توسط متانول تا رسیدن جذب معرف به 0.2 ± 0.7 در طول موج ۷۳۴ نانومتر انجام گردید. پس از انجام کارهای مذکور، ۳۰ میکرولیتر از عصاره فلفل سیاه به ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول رادیکال ABTS افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت، در نهایت جذب آن توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۳۴ اندازه‌گیری و گزارش گردید.

ارزیابی مهار رادیکال آزاد عصاره فلفل سیاه به روش زوال رنگ بتا-کاروتن

جهت پایش زوال رنگ محلول بتا-کاروتن /لینولئیک اسید در حضور عصاره فلفل سیاه، روش اسپکتروفوتومتری مورد استفاده قرار گرفت. جذب محلول پس از ۱۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری (A_{120}) در ۴۹۰ نانومتر برابر نمونه کنترل در زمان صفر (C_0) و پس از ۱۲۰ دقیقه نگهداری (C_{120}) اندازه‌گیری شد. اثر بازدارندگی با استفاده از معادله ۱ به‌دست آمد (Namazi et al., 2021).

$$\text{معادله ۱} \quad [(A_{120}-C_{120})/(C_0-A_{120})] \times 100 = \text{اثر بازدارندگی (\%)}$$

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره

از کلنی‌های خالص میکروارگانیسم‌های مورد بررسی، جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با استاندارد نیم مک‌فارلند استفاده شد. در این روش با استفاده از لوپ حلقوی استریل از کلنی‌های خالص یک لوپ برداشته و به لوله‌های آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی انتقال داده شدند. سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید (جذب 0.08 تا 0.13) و تا برابر شدن کدورت میکروبی با کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند، توسط محلول سرم فیزیولوژی استریل رقیق گردید. در این حالت سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند برابر با

برای اندازه‌گیری میزان فنل کل عصاره فلفل سیاه از روش فولین-سیو کالتو^۱ استفاده شد. جهت انجام این آزمون، ۲/۵ میلی‌لیتر فنل با ۱ میلی‌لیتر عصاره فلفل سیاه در یک لوله آزمایش با یکدیگر ترکیب شدند. پس از سپری شدن مدت زمان ۶ دقیقه میزان ۲/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به محلول قبلی اضافه گردید و محلول مورد نظر به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت، محلول مورد نظر به دستگاه اسپکتروفوتومتری منتقل گردید و میزان جذب آن در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری و اعداد آن‌ها ثبت شدند. در انتها میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره فلفل سیاه بر حسب گالیک اسید و با توجه به مقادیر به‌دست آمده از معادله حاصل از استاندارد محاسبه و نتایج آن بر حسب معادل گالیک اسید بیان شد (Dehghan et al., 2018).

تعیین میزان فلاونوئید عصاره فلفل سیاه

برای انجام این آزمون، ۱ میلی‌لیتر از عصاره فلفل سیاه با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شده و به آن ۷۵ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵ درصد اضافه گردید. پس از سپری شدن مدت زمان ۵ دقیقه، به ترکیب قبلی ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم تری‌کلراید ۱۰ درصد افزوده شد. پس از افزودن آلومینیوم تری‌کلراید، محلول مورد نظر به‌مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. در نهایت ۱ میلی‌لیتر سود افزوده شد و میزان جذب نمونه در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در پژوهش حاضر از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده گردید. همچنین برای رسم منحنی استاندارد آن از محلول کوئرستین استفاده شد (Ansarpour et al., 2019).

ارزیابی مهار رادیکال آزاد به روش DPPH^۲ عصاره فلفل سیاه

در این آزمون، ۱ میلی‌لیتر از عصاره فلفل سیاه با ۳ میلی‌لیتر از محلول DPPH متانولی (۰/۱ میلی‌مولار)، درون لوله آزمایش با یکدیگر ترکیب شدند، سپس محلول تهیه شده در یک مکان تاریک و دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از سپری شدن مدت زمان مذکور میزان جذب نمونه‌ها با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل نمونه شاهد (آب)، در طول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت گردید (Alizadeh Behbahani and Shahidi., 2019). فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره فلفل سیاه بر حسب درصد بازدارندگی محاسبه گردید.

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

1- Folin-Ciocalteu
2- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

CFU/ml $10^8 \times 1/5$ بود (Tanavar et al., 2019). به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره فلفل، اولین روش استفاده شده، روش انتشار در آگار به کمک دیسک بود. برای انجام این آزمون پس از کشت دادن گونه‌های میکروبی روی سطح محیط مولر هیتتون آگار، دیسک‌های کاغذی بلانک (دارای قطر ۶ میلی‌متر) با غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره فلفل سیاه آغشته گردید. درون هر کدام از پتری‌دیش‌ها، ۳ دیسک (۲ دیسک حاوی غلظت‌های مختلف عصاره و ۱ دیسک شاهد فاقد عصاره) قرار داده شد. برای مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره فلفل سیاه با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استاندارد از آمفوتریسین B به عنوان یک آنتی‌بیوتیک ضد قارچ و کلرامفنیکل به عنوان یک آنتی‌بیوتیک ضد باکتری استفاده شد. پس از سپری شدن مدت زمان پیش انتشار، پتری‌دیش‌های حاوی باکتری‌ها و قارچ به ترتیب در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور، قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها، به کمک خط‌کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش شد (Barzegar et al., 2021). دومین روش اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی عصاره فلفل سیاه، روش انتشار در آگار به روش چاهک بود. در این روش مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هیتتون آگار مذاب درون پتری‌دیش ریخته شد. پس از سرد شدن محیط‌های کشت، درون پتری‌دیش‌های استریل با کمک پی‌پت پاستور استریل شده ۳ عدد چاهک به عمق ۶ میلی‌متر ایجاد گردید. سپس سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند روی سطح محیط کشت‌ها به صورت چمنی پخش گردید. سپس، از غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه (۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۱۰۰ میکرولیتر به درون ۲ چاهک اطراف ریخته شد و چاهک وسط به عنوان شاهد (حاوی آب مقطر استریل) در نظر گرفته شد. پس از افزودن غلظت‌های مختلف عصاره، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های باکتریایی و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت، قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف چاهک‌ها با کمک خط‌کش اندازه‌گیری شد و بر حسب میلی‌متر ثبت گردید (Ansari pour et al., 2019).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره فلفل سیاه

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره فلفل سیاه، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی عصاره (۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶ و ۸

میلی گرم بر میلی‌لیتر) به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و سپس سوسپانسیون میکروبی (۱۰ میکرولیتر) به چاهک‌ها اضافه شد. در ادامه، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های باکتریایی و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ، گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد به چاهک‌ها اضافه گردید (برای گونه قارچی کدورت بررسی گردید). بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۳۰ دقیقه، اولین خانه‌ای که تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی در آن مشاهده نگردید (عدم رشد باکتری)، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد گزارش شد. چاهک‌هایی که فاقد رشد میکروبی بودند برای تعیین حداقل غلظت کشندگی مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از محتوای چاهک روی محیط مولر هیتتون آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های باکتریایی و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ گرمخانه‌گذاری شدند و در نهایت پلیت‌های فاقد کلنی به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره فلفل سیاه در نظر گرفته شدند (Barzegar et al., 2019).

برهمکنش عصاره فلفل سیاه با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک

برای ارزیابی اثر هم‌افزایی و کاهش‌دهی عصاره فلفل سیاه در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسین B و کلروامفنیکل از غلظت تحت مهاری (Sub-MIC) استفاده گردید. این غلظت‌ها معمولاً برابر ۰/۵ و ۰/۲۵ حداقل غلظت مهارکنندگی می‌باشند. در پژوهش حاضر از غلظت تحت مهاری نصف حداقل غلظت مهارکنندگی ($\frac{1}{2} \text{ MIC}$) عصاره فلفل سیاه به محیط مولر هیتتون آگار اضافه شد. در این روش، عصاره فلفل سیاه با محیط کشت مولر هیتتون آگار با فرمول $X = \text{Sub-MIC} \times (19+1)$ با یکدیگر ترکیب شدند. سپس میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلند ($10^8 \times 1/5$) با اسفاده از سمپلر روی سطح محیط کشت بصورت چمنی کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B ($30 \mu\text{g}$) و کلرامفنیکل ($30 \mu\text{g}$) روی سطح محیط کشت مولر هیتتون آگار با استفاده از پنس استریل قرار گرفت. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های باکتریایی و ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت مدت زمان ذکر شده، قطر هاله عدم رشد میکروبی با کمک خط‌کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش شد (Barzegar et al., 2019).

آنالیز آماری

در این پژوهش، تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام پذیرفت. به منظور مقایسه میانگین بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و از آزمون چند دامنه دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS^۱ نسخه ۲۴ استفاده گردید.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری طیف‌سنجی فرو سرخ عصاره فلفل سیاه

یکی از مهمترین روش‌های شناسایی گروه‌های عاملی و همچنین شناسایی ساختار ترکیبات آلی، استفاده از طیف‌سنجی فرو سرخ می‌باشد. نتایج مربوط به طیف‌سنجی فرو سرخ عصاره فلفل سیاه در ناحیه $4000-500 \text{ cm}^{-1}$ در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در شکل ۱، مشاهده می‌گردد. پیک‌های موجود در ناحیه $3000-3500 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی هیدروکسیل (O-H) بوده و مربوط به گروه‌های الکلی یا اسیدهای کربوکسیلیک می‌باشد. در محدوده بین $2800-3000 \text{ cm}^{-1}$ به ویژه نوارهای پهن موجود در پیک‌های $2927/53$ و $2854/66 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به حالت‌های کششی پیوندهای C-H گروه‌های متیل (CH_3) است (Kak et al., 2016). وجود پیک در طول موج $1633/52 \text{ cm}^{-1}$ - $1613/62$ نشان دهنده پیوندهای کتونی (C=O) می‌باشد که مربوط به ترکیباتی همچون آلدهیدها، کتون‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، استرها و آلکن‌ها است. وجود پیک در گستره $1300-1500 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده وجود گروه‌های C-C در حلقه آروماتیک ترکیبات پلی‌فنی و گروه‌های OH موجود در ترکیبات فنی در ساختار عصاره است. وجود پیک‌ها در طول موج $1000/57$ - $1038/82 \text{ cm}^{-1}$ احتمالاً به دلیل ارتعاشات کششی C-O عصاره می‌باشد.

ارزیابی میزان فنل و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فلفل سیاه

میزان فنل کل عصاره فلفل سیاه برابر $45/12$ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره و میزان فلاونوئید آن برابر با $29/66$ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره بدست آمد. لی و همکاران (Lee, 2020)، در طی مطالعه‌ای ترکیب شیمیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فلفل سیاه را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که میزان فنل کل و فلاونوئید موجود در مطالعه آن‌ها به ترتیب $1421/95$ میلی‌گرم گالیک اسید بر صد گرم فلفل سیاه و $983/82$ میلی‌گرم بود. نتایج حاصل از پژوهش این محققین با نتایج پژوهش حاضر مطابقت نداشت. علت

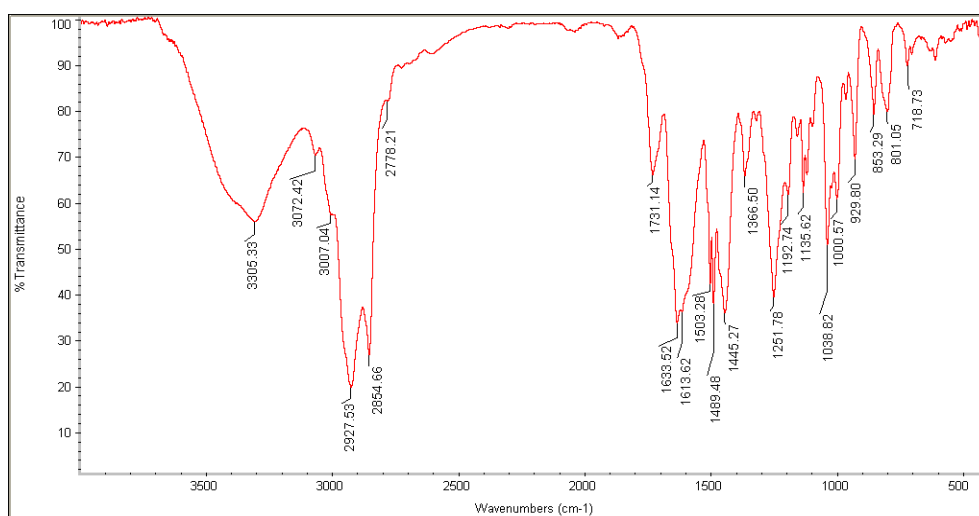
تفاوت نتیجه پژوهش حاضر با نتیجه پژوهشگران دیگر می‌تواند به جنس و گونه فلفل مورد مطالعه مرتبط باشد. بر اساس مطالعات سایر پژوهشگران، بخش عمده‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهان شامل ترکیبات فنی و فلاونوئیدی می‌باشد. این ترکیبات در قسمت‌های مختلف گیاهان وجود داشته و دارای فعالیت‌های متعدد زیستی نظیر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی می‌باشند. میزان آن‌ها به صورت طبیعی یا غنی‌شده در محصولات غذایی، بیانگر ارزش غذایی آن محصول جهت حفظ سلامتی مصرف‌کننده می‌باشد (Dehghan Tanha et al., 2018).

در پژوهش حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره فلفل سیاه به سه روش DPPH، ABTS و زوال رنگ بتا کاروتن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مربوط به این آزمون‌ها در جدول ۱، آورده شده است. در طی پژوهشی، جینا و همکاران (Jeena, 2014) اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس فلفل سیاه را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که با افزایش میزان غلظت اسانس، میزان بازدارندگی مهار رادیکال آزاد به روش DPPH نیز افزایش یافت. توریان و همکاران (Tooryan, 2019) در طی مطالعه‌ای اثر کنستاتره آب نارنج و پوشش خوراکی کیتوزان غنی شده با اسانس فلفل سیاه بر بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی و حسی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که بیشترین تا کمترین میزان قدرت مهارکنندگی در پژوهش آن‌ها به ترتیب مربوط به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHT با میزان $81/9$ درصد، آب نارنج با بریکس $1/39$ (۶۶/۹ درصد)، اسانس فلفل سیاه ۲ درصد (۶۴/۱ درصد)، اسانس فلفل سیاه ۱ درصد (۳۹/۸ درصد)، آب نارنج با بریکس $1/24$ (۳۳/۱ درصد) بود. همچنین نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که با افزایش میزان غلظت اسانس و بریکس قدرت مهار رادیکال آزاد افزایش یافت. گوپتا و همکاران (Gupta, 2014)، در طی پژوهشی بیان نمودند که ظرفیت مهار رادیکال آزاد به روش DPPH عصاره‌های آبی و متانولی فلفل سیاه به ترتیب $35/2$ و $45/66$ درصد بود. نتایج حاصل از پژوهش این محققین با مطالعه حاضر همخوانی داشت.

ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره فلفل سیاه

انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی-بوئر)

نتایج مربوط به ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره فلفل سیاه به روش انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی-بوئر) بر میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا در جدول ۲، آورده شده است. همانطور که نتایج نشان داد، با افزایش میزان غلظت عصاره فلفل سیاه، قطر هاله بازدارندگی از رشد نیز افزایش پیدا کرد.



شکل ۱- طیف FTIR عصاره آبی فلفل سیاه

Fig. 1- FTIR spectrum of black pepper aqueous extract

جدول ۱- میزان فنل و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره فلفل سیاه

Table 1- Total phenol and flavonoid content and antioxidant activity of black pepper extract

پارامتر مورد بررسی Parameter	مقادیر اندازه گیری شده Measured Values
فنل کل (mg GAE/g)	45.12 ± 0.14
Total phenol (mg GAE/g)	
فلاونوئید کل (mg QE/g)	29.66 ± 0.28
Total flavonoid (mg QE/g)	
مهار رادیکال DPPH (IC ₅₀ ; µg/ml)	32.37 ± 0.30
DPPH (IC ₅₀ ; µg/ml)	
مهار رادیکال ABTS (IC ₅₀ ; µg/ml)	28.45 ± 0.34
ABTS (IC ₅₀ ; µg/ml)	
بتا-کاروتن / لینولئیک اسید (درصد) beta-carotene bleaching inhibitory effect (%)	46.45 ± 0.29

این غلظت کمترین قطر هاله مربوط به باکتری گرم منفی /اشرشیا کلی با قطر هاله ۱۱/۵ میلی متر مشاهده گردید.

در این پژوهش عصاره فلفل سیاه اثر ضد میکروبی بیشتری بر باکتری های گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس کوآگولانس نسبت به باکتری های گرم منفی /اشرشیا کلی و سودوموناس اثرورینوزا نشان داد. این امر می تواند به دلیل تفاوت در ساختار دیواره سلولی آنها باشد. دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت دارای ترکیب موکوپپتیدی می باشد، اما در دیواره باکتری های گرم منفی علاوه بر لایه نازکی از موکوپپتید، بخش اعظمی از لیپوپروتئین ها و لیپوپلی ساکاریدها وجود دارد که باعث مقاومت آنها می شود. همچنین باکتری های گرم منفی دارای غشای دو لایه می باشند به گونه ای که لایه پپتیدوگلیکان این باکتری ها در فضای پری پلاسمی که فضای بین غشای داخلی و خارجی می باشد، قرار

در پژوهش حاضر، میزان غلظت عصاره فلفل سیاه با میزان مهار کنندگی آن رابطه مستقیم داشت. در این مطالعه بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره فلفل سیاه در غلظت ۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به گونه قارچی /آسپرژیلوس نایجر بود. در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای دو گونه باکتریایی /اشرشیا کلی و سودوموناس اثرورینوزا هیچ گونه قطر هاله عدم رشد مشاهده نگردید، مقایسه آماری دوتایی میان غلظت های مختلف عصاره فلفل سیاه نشان داد که در تمامی غلظت ها (۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر) برای تمامی گونه ها، اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) وجود داشت. در غلظت ۱۰ و ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای گونه باکتریایی سودوموناس اثرورینوزا اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده نگردید. بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به گونه قارچی /آسپرژیلوس نایجر با قطر هاله ۱۶ میلی متر بود. همچنین در

دارد. آنزیم‌هایی مانند پروتئازها، پنیسیلینازها، فسفاتازها و فسفریله کننده آمینوگلیکوزید، ترکیبات و مولکول‌های ورودی به فضای پری پلاست را تجزیه می‌کنند. این در حالی است که، در باکتری‌های گرم مثبت به دلیل عدم وجود چنین فضایی، ترکیبات ضد میکروبی می‌توانند به آسانی به دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی نفوذ کرده و باعث مرگ سلولی شوند (Noshad et al., 2021).

نگی و همکاران (Nagy et al., 2015)، در طی مطالعه‌ای که روی خاصیت ضد میکروبی ادویجات (سیر، فلفل آنوم و فلفل سیاه) انجام دادند، بیان نمودند که قطر هاله عدم رشد فلفل سیاه بر گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی موریوم* به ترتیب ۱۱/۷۵، ۱۲/۲۵، ۹/۷۵ و ۱۰/۵۰ میلی‌متر بود. احمدچودری و همکاران (Ahmed Chaudhry et al., 2006)، در طی پژوهشی اثر ضدباکتری جوشانده آبی فلفل سیاه (*Piper nigrum* L.)، برگ بو (*Laurus nobilis* L.)، انیسون (*Pimpinella anisum* L.) و گشنیز (*Coriandum sativum* L.) در برابر ۱۷۶ گونه باکتریایی جدا شده از دهان ۲۰۰ نفر را مورد ارزیابی قرار دادند. در پژوهش آن‌ها از روش انتشار در آگار به کمک دیسک استفاده شد. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که جوشانده فرآورده‌های آبی فلفل سیاه دارای خواص آنتی‌باکتریایی بسیار قوی در

مقایسه با سایر عصاره‌ها بود. پوندیر و همکاران (Pundir et al., 2010)، طی مطالعه‌ای، اثر ضدباکتری شش عصاره از دو ادویه، یعنی فلفل سیاه و زردچوبه را در سه حلال مختلف بررسی کردند. در این پژوهش، فعالیت ضدباکتریایی با روش انتشار چاهک آگار اندازه‌گیری شد. در عصاره آبی، فلفل سیاه و زردچوبه به ترتیب با قطر هاله عدم رشد، ۲۵ تا ۳۰ میلی‌متر و ۲۶ تا ۲۸ میلی‌متر فعالیت بازدارندگی خوبی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند. عصاره اتانولی فلفل سیاه، فعالیت ضدباکتریایی در برابر همه باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد که قطر هاله عدم رشد بین ۱۵ میلی‌متر و ۲۲ میلی‌متر است در حالی که زردچوبه فعالیت با قطر هاله عدم رشد بین ۱۳ میلی‌متر و ۲۴ میلی‌متر نشان داد. در عصاره متانولی، قطر هاله عدم رشد در فلفل سیاه بین ۱۲ میلی‌متر و ۲۸ میلی‌متر و در زردچوبه ۱۳ میلی‌متر و ۲۲ میلی‌متر متغیر بود. فعالیت ضد میکروبی بیشتر عصاره آبی فلفل سیاه بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به تفاوت ساختار دیواره سلولی آن‌ها نسبت داد که با پژوهش‌های علیزاده بهبهانی و همکاران (Alizadeh Behbahani et al., 2013) و طباطبایی یزدی و همکاران (Tabatabaei Yazdi et al., 2013) مطابقت داشت.

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (دیسک دیفیوژن) عصاره فلفل سیاه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (میلی‌متر)
Table 2- Mean inhibition zone (mm) of black pepper extract on pathogenic microorganisms (disk diffusion agar)

میکروارگانیسم Microorganism	غلظت Concentration (mg/ml)			
	10	30	50	70
<i>اشرشیا کلی</i> <i>E. coli</i>	- a	7.80 ± 0.30 ^b	9.00 ± 0.82 ^b	11.50 ± 0.31 ^c
<i>سودوموناس آئروژینوزا</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- a	8.00 ± 0.18 ^a	10.10 ± 0.19 ^b	12.20 ± 0.43 ^c
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	7.30 ± 0.33 ^a	9.90 ± 0.50 ^b	12.80 ± 0.27 ^c	15.10 ± 0.29 ^d
<i>باسیلوس کواگولانس</i> <i>Bacillus Coagulans</i>	7.20 ± 0.37 ^a	8.80 ± 0.41 ^b	11.00 ± 0.46 ^c	13.70 ± 0.56 ^d
<i>آسپرژیلوس نایجر</i> <i>Aspergillus niger</i>	8.10 ± 0.33 ^a	10.30 ± 0.21 ^b	12.80 ± 0.30 ^c	16.00 ± 0.47 ^d

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

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

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

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

انتشار در آگار به روش چاهک

در جدول ۳، نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره فلفل سیاه به روش انتشار در آگار به روش چاهک برای پاتوژن‌های بیماری‌زای مورد بررسی آورده شده است. بیشترین قطر هاله عدم رشد در کمترین

غلظت (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مربوط به گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* با قطر هاله ۸/۴۰ میلی‌متر بود، همچنین در این غلظت هیچ گونه قطر هاله رشد برای گونه باکتریایی *اشرشیا کلی* مشاهده نگردید. در غلظت‌های بالاتر، اثر ضد میکروبی برای تمامی گونه‌ها افزایش

قابل توجهی داشت، به نحوی که در غلظت ۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* قطر هاله ۱۶/۹۰ میلی متر مشاهده گردید. مقایسه نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که در میان غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* هیچ اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد وجود ندارد ($P < 0.05$). همچنین نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که در غلظت ۱۰ و ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای گونه باکتریایی *سودوموناس آئروژینوزا* هیچ گونه اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده نگردید.

اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی را می‌توان به ترکیبات زیست فعال موجود در آنها نسبت داد. این ترکیبات قادر به اتصال به سطح سلولی و نفوذ به لایه‌های فسفولیپیدی غشای سلولی می‌باشند. ازدیاد و انباشته شدن این ترکیبات در سلول، منجر به اختلال در یکپارچگی سلول و به دنبال آن تأثیر بر متابولیسم و در نهایت مرگ سلول می‌شود (Namazi et al., 2021). همچنین بر اساس نتایج تحقیق حاضر، تأثیر بیشتر عصاره بر باکتری‌ها در روش چاهک آگار در مقایسه با دیسک دیفیوژن به دلیل تماس مستقیم عصاره با میکروارگانیسم‌ها در روش چاهک آگار می‌باشد، در حالی که در روش دیسک دیفیوژن به دلیل عبور از دیسک به صورت غیر مستقیم اثر بخشی آن کمتر می‌شود (Noshad et al., 2021).

و همکاران (Ganesh et al., 2014)، در پژوهشی فعالیت شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی فلفل سیاه را در برابر برخی از عوامل

بیماری‌زای انسان مورد بررسی قرار دادند. در پژوهش آن‌ها ۵ گونه شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *پروتئوس میرابیلیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که گونه‌های *اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی*، *پروتئوس میرابیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی فلفل سیاه واکنش نشان دادند اما *سودوموناس آئروژینوزا* مقاومت نشان داد. همچنین، بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی فلفل سیاه مربوط به باکتری *اشرشیا کلی* و بیشترین قطر هاله عدم رشد در عصاره کلروفرمی مربوط گونه *پروتئوس* بود. هیکال (Hikal, 2018)، فعالیت ضدباکتریایی ترکیب پپیرین و اسانس فلفل سیاه را مورد بررسی قرار داد. در این پژوهش، روش ارزیابی اثر ضد میکروبی با کمک چاهک آگار اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که پپیرین و اسانس فلفل سیاه روی تمام گونه‌های باکتری‌های گرم مثبت دارای اثر ضدباکتریایی بود. قطر هاله عدم رشد برای ترکیب پپیرین ۸/۲۳ تا ۱۸/۱ میلی متر و برای اسانس فلفل سیاه ۳/۱۴ تا ۱۰/۴۳ میلی متر متغیر بود. شیواریانی و همکاران (Rani et al., 2013)، فعالیت ضد میکروبی فلفل سیاه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که حداکثر قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱۸ میلی متر و حداقل قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلی*، ۸ میلی متر بود.

جدول ۳- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی (چاهک آگار) عصاره فلفل سیاه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (میلی متر)
Table 3- Mean inhibition zone (mm) of black pepper extract on pathogenic bacteria (well diffusion agar)

میکروارگانیسم Microorganism	غلظت Concentration (mg/ml)			
	10	30	50	70
<i>اشرشیا کلی</i> <i>E. coli</i>	a ₋	7.90 ± 0.28 ^b	9.90 ± 0.13 ^b	12.90 ± 0.42 ^c
<i>سودوموناس آئروژینوزا</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.4 ± 0.19 ^a	8.30 ± 0.37 ^a	11.00 ± 0.46 ^b	13.10 ± 0.48 ^c
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	8.10 ± 0.50 ^a	10.80 ± 0.67 ^b	13.10 ± 0.35 ^c	16.30 ± 0.68 ^d
<i>باسیلوس کوآگولانس</i> <i>Bacillus Coagulans</i>	7.60 ± 0.14 ^a	9.50 ± 0.37 ^b	11.80 ± 0.60 ^c	14.00 ± 0.20 ^d
<i>آسپرژیلوس نایجر</i> <i>Aspergillus niger</i>	8.40 ± 0.31 ^a	10.60 ± 0.49 ^b	13.30 ± 0.66 ^c	16.90 ± 0.50 ^d

نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=3) گزارش شده اند.

حروف غیر مشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی دار در سطح معنی داری ۵ درصد میان غلظت‌های مختلف عصاره فلفل سیاه است ($P < 0.05$).

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

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

استافیلوکوکوس اورئوس و گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* بود و کمترین میزان بازدارندگی مربوط به گونه گرم منفی *اشرشیا کلی* با میزان ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

نتایج مربوط به حداقل غلظت کشندگی عصاره فلفل سیاه در جدول ۴ آورده شده است. همانطور که در جدول نشان داده شده است حداقل غلظت کشندگی برای دو گونه باکتریایی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* بیش از غلظت ۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود. همچنین حداقل غلظت کشندگی برای گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس کواگولانس* به ترتیب ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر و برای گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده گردید.

صباغ و همکاران (Sabbagh et al., 2015)، بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی فلفل سیاه و اسفند علیه گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که بیشترین و کمترین مقاومت به ترتیب متعلق به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم با میزان ۶۶/۶ درصد و وانکومایسن به میزان ۸/۱ درصد می‌باشد. ارزیابی مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی نشان داد که بیشترین اثر کشندگی فلفل و اسپند به ترتیب در غلظت ۱۰ و ۵ میلی گرم در میلی لیتر بود، در حالی که کمترین غلظت بازدارندگی در غلظت ۲/۵، ۰/۶۲ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد. بیشترین مقدار حداقل غلظت کشندگی به ترتیب در غلظت‌های ۲۰ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره‌های فلفل سیاه و اسفند مشاهده شد.

همچنین حداکثر فعالیت ضدقارچی نسبت به *فوزاریم آکسیسپورم*، ۱۴ میلی متر و کمترین اثر را در برابر *آسپرژیلوس نایجر*، ۳۸ میلی متر نشان داد. دورمن و همکاران (Dorman et al., 2000)، در طی پژوهشی نشان دادند که عصاره گیاهی فلفل سیاه دارای اثر ضدباکتریایی علیه گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. در پژوهش آن‌ها قطر هاله عدم رشد عصاره فلفل سیاه ۱۵ میلی متر بود. همچنین این عصاره در رقت ۲۵ میلی لیتر سبب مرگ این باکتری گردید. کارشا و همکاران (Karsha et al., 2010)، اثر بازدارندگی عصاره استونی فلفل سیاه در برابر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اتروکوک فکالیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سالمونلا تیفی* نشان داده است که این عصاره به ترتیب با غلظت‌های ۱/۲۵، ۱/۲۵، ۶/۲۵، ۰/۵، ۲/۵۰، ۱/۲۵ و ۲/۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین قطر هاله عدم رشد هاله را دارد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره فلفل سیاه

نتایج مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره فلفل سیاه برای پاتوژن‌های بیماری‌زا در جدول ۴ آورده شده است. نتایج حاصله نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی برای پاتوژن‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس کواگولانس* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۳۲، ۱۶، ۴، ۸ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود. بیشترین میزان بازدارندگی عصاره فلفل سیاه مربوط به گونه گرم مثبت

جدول ۴- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره فلفل سیاه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

Table 4- Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of black pepper extract on pathogenic microorganisms

میکروارگانیسم Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC/MFC (mg/ml)
<i>اشرشیا کلی</i> <i>E. coli</i>	32	>512
<i>سودوموناس آئروژینوزا</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	>512
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	4	128
<i>باسیلوس کواگولانس</i> <i>Bacillus Coagulans</i>	8	256
<i>آسپرژیلوس نایجر</i> <i>Aspergillus niger</i>	4	128

MIC= Minimum inhibitory concentration
MBC= Minimum bactericidal concentration
MFC= Minimum fungicidal concentration

برهمکنش عصاره فلفل سیاه با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک

نتایج مربوط به اثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی کلرامفتیکل و آمفوتریسین B و همچنین برهمکنش عصاره فلفل سیاه با آنتی‌بیوتیک‌های مذکور در جدول ۵ آورده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک کلرامفتیکل مربوط به گونه *باسیلوس کواگولانس* با قطر ۲۱/۲۰ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B بر گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* ۱۶/۶۰ میلی‌متر بود. نتایج حاصل از برهم‌کنش عصاره فلفل سیاه با آنتی‌بیوتیک کلرامفتیکل نشان داد که برای گونه‌های باکتریایی *اشرشیا کلی*، *سودوموناس اتروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* حالت سینرژیستی وجود داشت اما برای گونه گرم مثبت *باسیلوس*

کواگولانس حالت آنتاگونیسمی مشاهده گردید. همچنین مشاهده گردید که اثر برهم‌کنش عصاره فلفل سیاه و آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B بر گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* حالت سینرژیستی بود. عبدال‌تواب و همکاران (Abd EL-Tawab et al., 2017)، در پژوهشی فعالیت ضد میکروبی و هم‌افزایی عصاره فلفل سیاه در ترکیب آنتی-بیوتیک روی *اشرشیا کلی* جدا شده از مرغ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که در حالت ترکیب عصاره فلفل سیاه با آنتی‌بیوتیک‌های *آموکسی‌سیلین*، *داکسی‌سایکلین*، *جنتامایسین*، *اریترومایسین* و *سفوتاکسیم*، حالت افزایشی (سینرژیستی) مشاهده گردید.

جدول ۵- اثر آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفتیکل و آمفوتریسین B به تنهایی و توأم (برهم‌کنش) با عصاره فلفل سیاه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی بر حسب میلی‌متر)

Table 5- Antimicrobial effect of chloramphenicol and amphotericin B and their interaction with black pepper extract on pathogenic microorganisms

میکروارگانیسم Microorganism	ماده ضد میکروب Antimicrobial agent			
	کلرامفتیکل Chloramphenicol	آمفوتریسین B Amphotericin B	کلرامفتیکل + عصاره Chloramphenicol + Extract	آمفوتریسین B + عصاره Amphotericin B + Extract
<i>اشرشیا کلی</i> <i>E. coli</i>	14 ± 0.44 ^a	-	17.80 ± 0.72 ^a	-
<i>سودوموناس اتروژینوزا</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15.20 ± 0.36 ^a	-	18.30 ± 0.36 ^b	-
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	19.30 ± 0.68 ^a	-	24.40 ± 0.30 ^b	-
<i>باسیلوس کواگولانس</i> <i>Bacillus Coagulans</i>	21.20 ± 0.37 ^a	-	11.60 ± 0.50 ^b	-
<i>آسپرژیلوس نایجر</i> <i>Aspergillus niger</i>	-	16.60 ± 0.52 ^a	-	18.90 ± 0.38 ^b

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

حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد است (P<۰/۰۵).

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

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

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره آبی فلفل سیاه دارای مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال‌های DPPH، ABTS و میزان مقاومت در برابر اکسیداسیون لینولئیک اسید و تغییر رنگ بتاکاروتن) نشان داد که عصاره فلفل سیاه دارای اثر آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. نتایج آزمون‌های میکروبی نشان داد که حداقل

غلظت بازدارندگی برای *اشرشیا کلی*، *سودوموناس اتروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس کواگولانس* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۳۲، ۱۶، ۴، ۸ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی عصاره فلفل سیاه نشان داد که حداقل غلظت کشندگی برای دو گونه باکتریایی *اشرشیا کلی* و *سودوموناس اتروژینوزا* بیش از غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین حداقل غلظت کشندگی برای گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و

بود. در ادامه پیشنهاد می‌گردد پژوهش‌های بیشتری در زمینه تاثیر عصاره‌های مختلف فلفل سیاه بر سایر میکروارگانیسم‌ها نیز بررسی شده و اثر آن بر نگهداری مواد غذایی مختلف بررسی گردد تا بتوان از پتانسیل ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره فلفل سیاه به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا بهره برد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تشکر و قدردانی نمایند.

باسیلوس کوآگولانس به ترتیب ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای گونه قارچی آسپرژیلوس نایجر ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید. بیشترین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل مربوط به گونه باسیلوس کوآگولانس با قطر ۲۱/۲۰ میلی‌متر و قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B بر گونه قارچی آسپرژیلوس نایجر ۱۶/۶۰ میلی‌متر بود. نتایج حاصل از برهمکنش عصاره فلفل سیاه با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل نشان داد که برای گونه‌های باکتریایی اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس حالت سینرژیستی وجود داشت اما برای گونه گرم مثبت باسیلوس کوآگولانس حالت آنتاگونیسمی مشاهده گردید. همچنین نیز مشاهده گردید که اثر برهمکنش عصاره فلفل سیاه و آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B بر گونه قارچی آسپرژیلوس نایجر حالت سینرژیستی

منابع

1. Abd EL-Tawab., A, Ahmed, Ammar, M.A., Hamouda, M.A., El-Hofy, F., & Elgamal, A. (2017). Synergistic antimicrobial activity of black pepper extract with some antibiotics combination on *Escherichia coli* isolated from chickens. *Benha Veterinary Medical Journal* 32(1): 1–6. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2017.31104>.
2. Ahmed Chaudhry, N.M., & Tariq, P. (2006). Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 19(3): 214-8.
3. 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. <http://doi.org/10.29252/nfsr.6.1.17>.
4. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M.M., & Vasiee, A. (2013a). 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.
5. Ansari pour, A., Mehrnia, M.A., Noshad, M., Barzegar, H., & Alizadeh Behbahani, B. (2019). Antimicrobial effect of garlic essential oil on a number of foodborne pathogens and determination of its chemical composition and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology (Iran)* 91(16): 17-29.
6. Asghari ,M.H., Gharib, A., & Faezizadeh, Z. (2010). In vitro anti-fungal and toxicity of spray-dried amphotericin B-loaded poly lactideglycolide nanocapsules. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* 18(3): 19-28.
7. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M.A. (2019). Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. *Journal of Food Science and Technology (Iran)* 90(16): 113-125.
8. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2021). Evaluation of total phenol and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* aqueous extract against some Gram- positive and Gram- negative bacteria. *Journal of Food Science and Technology (Iran)* 116(18): 327-335. <http://doi.org/10.52547/fsct.18.116.327>.
9. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
10. Dehghan Tanha, R., Aminifard, M.H., & Bayat, H. (2018). Effect of ultrasound on extraction of carotenoids of lycopene and beta-carotene from chili pepper fruit and response surface optimization of extraction conditions. *Journal of Food Science and Technology (Iran)* 72(14): 177-185.
11. Dehghan, N., Barzegar, H., Mehrnia, M.A., & Jooyandeh, H. (2018). Investigation on the effect of Methanolic Bene (*pistachia atlantica*) hull extract on oxidative stability of soybean oil, *Innovative Food Technologies* 5(3): 499-507. <https://doi.org/10.22104/jift.2018.2577.1607>.
12. Dorman, H., & Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88(2): 308-16. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>.
13. Eigenmann, P.A., & Haenggeli, C.A. (2004). Food colourings and preservatives- allergy and hyperactivity. *Lancet* 364: 823-824. [https://psycnet.apa.org/doi/10.1016/S0140-6736\(04\)16996-1](https://psycnet.apa.org/doi/10.1016/S0140-6736(04)16996-1).

14. Fan, L.S., Muhmad, R., Omar, D., & Rahimani, M. (2011). Insecticidal properties of *Piper nigrum* fruit extracts and essential oils against *Spodoptera litura*. *International Journal of Agriculture and Biology* 13: 517-522. <https://doi.org/10-500/ZIP/2011/13-4-517-522>.
15. Ganesh, P., Suresh Kumar, R., & Saranraj, P. (2014). Phytochemical analysis and antibacterial activity of Pepper (*Piper nigrum* L.) against some human pathogens. *Central European Journal of Biology* 3(2):36-41.
16. Granata, G., Stracquadiano, S., Leonardi, M., Napoli, E., & Consoli, G.M.L. (2018). Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chemistry* 269: 286-292. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.140>.
17. Gupta, K.R., Chawla, P., Tripathi, M., Shukla, K.A., & Pandey, A. (2014). Synergistic antioxidant activity of tea with ginger, black pepper and tulsi. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(5): 477-479. <https://doi.org/10.4103%2F2231-4040.85538>.
18. Hikal, D.M. (2018). Antibacterial activity of piperine and black pepper oil. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 15(4): 877-880. <http://doi.org/10.13005/bbra/2697>.
19. Jeena, K., Liju, V.B., Umadevi, N., & Kuttan, R. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of black pepper essential oil (*Piper nigrum* L.). *Journal of Essential oil Bearing Plants* 17: 1-12. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.831562>.
20. Kak, M., Abdulkadhim, H.M. & Noori, S.I. (2016). Chemical composition and anti-bacterial effects of clove (*Syzygium aromaticum*) flowers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 5(2): 483-489. <http://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.502.054>.
21. Karsha, P.V., & Lakshmi, O.B. (2010). Antibacterial activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) with special reference to its mode of action on bacteria. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 1(2): 213-15.
22. Lee, J.G., Chae, Y., Shin, Y., & Jun Kim, Y. (2020). Chemical composition and antioxidant capacity of black pepper pericarp. *Biological Chemistry* 63(35): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00521-1>.
23. Minooeian Haghighi, M.H., & Khosravi, A. (2014). Effects of anti-aflatoxin of essential oils of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa*. *International Journal of Food Microbiology* 13: 396-404.
24. Nagy, M., Sonia, A., Socacil Tofana, M., Carmen, P., Muresan, C., Viorica, A., Salanta, L., & Ancuta, M. (2015). Determination of total phenolics, antioxidant capacity and antimicrobial activity of selected aromatic spices. *Napoca Food Science and Technology* 72(1):83-85. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:11094>.
25. Namazi, P., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M.A. (2021). Evaluation of functional groups of bioactive compounds, antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid content of red bell pepper extracts. *Journal of Food Science and Technology (Iran)* 113(14): 301- 311. <http://doi.org/10.52547/fsct.18.113.301>.
26. Norouzi, F., Hojjati, M., Jooyandeh, H., & Barzegar. (2018). Study of the possibility of application of tarragon essential oil in mayonnaise as a natural additive. *Journal of Food Research* 25(3): 85-99.
27. Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Barzegar, H. (2021). Determination of the antioxidant and antimicrobial activity of the hydroalcoholic extract of *Echinacea angustifolia* against *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Iranian Journal of Infectious Diseases* 93: 44-53.
28. Pino, J., Borges, P., & Sanchez, R. (1992). Alcohol deterpenation of black pepper. *International Journal of Food Science and Technology* 27(5): 551-555.
29. Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcus, V., Olah, N.K., & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry* 143: 922-935. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>.
30. Pundir, R.K., & Jain, P. (2010). Comparative studies on the antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum*) and extracts. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 1(2): 492-500.
31. Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research* 5: 47-56.
32. Roman, S., Sanchez-Siles, L.M., & Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends in Food Science & Technology* 67: 44-57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.010>.
33. Sabbagh, S.K., Dehbashi, S., & Mazaheri Naeeni, M. (2015). Antimicrobial activity of ethanolic extract of black pepper (*Piper nigrum*) and march (*Peganum harmala*) against antibiotic-resistant of *Staphylococcus aureus* strains, bimonthly. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 22(5): 854-861.
34. 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. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74472.1130>.
35. Tanavar, H., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M.A. (2020). Evaluation of the antimicrobial activity of *Mentha pulegium* essential oil on some foodborne pathogens and its interaction with gentamicin and

chloramphenicol in vitro, *Journal of Food Science and Technology (Iran)* 97(16): 77-87.
<http://doi.org/10.29252/fsct.16.97.77>.

36. Tooryan, F., & Azizkhani. M. (2019). Effect of orange juice concentrate and chitosan coating enriched with black pepper (*Piper nigrum*) essential oil on improvement of antioxidant and sensory properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 15(2): 381-394.
<https://doi.org/10.22067/ifstrj.v15i2.71775>.
37. WHO. (2015b). Country statistics (<http://www.who.int/gho/countries/brn.pdfua=1>)



The Effect of Chitosan Edible Coating on Physicochemical Properties and Enzymatic Activity of Grape Fruit Cultivar Fakhri in Cold Storage Conditions

M. Shokri¹- M. Rahmati-Joneidabad^{2*} - M. Heidari³- M. Rasouli⁴- A. Zare⁵

Received: 2022.02.21

Revised: 2022.04.06

Accepted: 2022.04.11

Available Online: 2022.04.11

How to cite this article:

Shokri, M., Rahmati-Joneidabad, M., Heidari, M., Rasouli, M., & Zare, A. (2023). The effect of chitosan edible coating on physicochemical properties and enzymatic activity of grape fruit cultivar Fakhri in cold storage conditions. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 95-106. (In Persian with English abstract). <http://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.75449.1150>

Introduction

Chitosan, as a bio-polymer, has many applications in agriculture. Coating fruits and vegetables with chitosan plays a positive role in increasing their shelf-life, since the chitosan coating reduce growth of fungi and preserves the quality of the fruits longer.

Materials and Methods

This study was conducted to evaluate the effect of chitosan treatments (0, 0.25, 0.5 and 1%) and storage time (0, 20, 40 and 60 days) on maintaining quantitative and qualitative parameters and shelf life of grape fruit of Fakhri cultivar. The experiments were factorial based on a completely randomized design with three replications. The fruits were stored for 2 months. Some characteristics of fruits including percentage of weight loss, percentage of berries abscission, percentage of decay of berries, browning of berries and biochemical characteristics including titratable acidity, ascorbic acid content, total phenol, enzymes activity including peroxidase (POD), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO) were measured in order to investigate the best treatment.

Results and Discussion

The results showed that the traits under study were affected by different concentrations of chitosan, with the lowest percentage of weight loss associated with the concentration of 0.5% chitosan. Chitosan, by forming a semi-permeable membrane, regulates gases, and reduces the transfer of water from fruit tissues. The lowest amount of browning of berries was observed in the concentration of 0.5% chitosan. Chitosan is partly prevented from increasing the activity of brown-peroxidase in chitosan-treated fruits. There was no significant difference in concentration of 0.5% chitosan with 1% concentration. The lowest percentage of contamination and percentage of berries abscission was observed in 1% chitosan concentration. It seems that these treatments prevent the effects of ethylene levels and the formation of a swab layer at the site of fruit attachment to the cluster. The slightest increase in the titratable acidity and the lowest decrease of ascorbic acid was observed in the concentration of 1% chitosan. Higher levels of ascorbic acid in fruits that are coated with chitosan may be due to decreased oxygen levels and respiration inhibition. The highest total phenol was related to the control treatment, which may be due to the loss of chlorophyll and the onset of synthesis of phenolic compounds. The highest level of activity of PAL enzyme was observed in the concentration of 0.5% chitosan and the control. This enzyme is stimulated by various live and non-living stresses. In general, the highest activity of peroxidase

1, 2 and 3- Graduated Student of Master of Science, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: Rahmati@asnrukh.ac.ir)

4- Associate Professor of Horticultural Sciences Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

5- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2022.75449.1150](https://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.75449.1150)

enzyme was observed in the concentration of 0.5% chitosan and the highest activity of polyphenol oxidase in 1% concentration of chitosan.

Conclusion

It seems that the concentration of 1% chitosan can improve the quality of fruits for a longer time while increasing the shelf life of fruit.

Keywords: Contamination percentage, Peroxidase enzyme, Polyphenol oxidase enzyme, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Storage life

مقاله پژوهشی

تاثیر پوشش خوراکی کیتوزان بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و فعالیت آنزیمی میوه انگور رقم فخری در شرایط سردخانه

معصومه شکری^۱ - مصطفی رحمتی جنیدآباد^{۲*} - مختار حیدری^۳ - موسی رسولی^۴ - احمد زارع^۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۱/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲

چکیده

استفاده از پوشش‌های خوراکی طبیعی برای افزایش عمر پس از برداشت محصولات میوه‌ها، امروزه بسیار متداول شده است. کیتوزان با قابلیت کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و کاهش سرعت تبخیر و تعرق آب از بافت گیاه، به عنوان یک ماده غیرسمی طبیعی و یک پوشش خوراکی طبیعی شناخته شده است. این پژوهش، با هدف بررسی اثر تیمار کیتوزان (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) و زمان انبارمانی (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روز) بر حفظ کیفیت و عمر انبارمانی میوه انگور رقم فخری، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. شاخص‌های مورد ارزیابی شامل درصد کاهش وزن، درصد آلودگی، درصد ریزش حبه، میزان قهوه‌ای شدن حبه، اسیداسکوربیک، اسیدیته قابل تیتراسیون، فنل کل، میزان فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیاز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز بود. نتایج نشان داد که غلظت ۱ درصد کیتوزان به خوبی توانست آلودگی، ریزش حبه، کاهش اسیدیته قابل تیتراسیون و کاهش اسیداسکوربیک را کنترل نماید و بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در غلظت ۱ درصد کیتوزان مشاهده گردید و غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان نیز سبب جلوگیری از کاهش وزن و قهوه‌ای شدن حبه‌ها نسبت به سایر غلظت‌ها و نمونه شاهد گردید و بیشترین میزان فنل کل و بالاترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز و پراکسیداز نیز مربوط به غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان بود، این در حالی است که بین دو غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان در بیش‌تر صفات تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پراکسیداز؛ آنزیم پلی فنل اکسیداز؛ آنزیم فنیل آلانین آمونیاز؛ پوشش خوراکی؛ عمر انبارمانی

مقدمه

برای مصرف‌کنندگان بسیار جذاب هستند. یکی از مشکلات مهم نگهداری میوه‌ها و سبزی‌ها، آلودگی به انواع بیماری‌های قارچی و عمر کوتاه این محصولات پس از برداشت بوده که این مسئله به دلیل وجود درصد بالای آب در محصولات تازه باغبانی است (Xing et al., 2016).

انگور (*Vitis vinifera* L.) یک میوه با عمر پس از برداشت کوتاه و نافرارگرا^۲ است. انگور رقم فخری از انواع دانه‌دار و میان‌رس بوده و با صفاتی مانند حبه‌های درشت و بیضی شکل به رنگ سبز مایل به زرد شناخته می‌شود. این رقم با پوست حبه ضخیم، گوشت سفت و خوشه‌های متوسط تا درشت، دارای ارزش تازه‌خوری است

میوه‌ها و سبزی‌های تازه به علت طعم و رنگ خوب و همچنین ترکیبات مغذی آن‌ها مانند ویتامین‌ها، مواد معدنی و اسیدهای آمینه

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

(*- نویسنده مسئول: Email: Rahmati@asnrukh.ac.ir)

۴- دانشیار، گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۵- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.75449.1150

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) و زمان انبارمانی (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روز) بر کیفیت و عمر انبارمانی میوه انگور رقم فخری، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار (هر تکرار شامل یک خوشه) در آزمایشگاه گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد.

تهیه نمونه‌های میوه انگور

میوه انگور رقم فخری از یک تاکستان تجاری واقع در ۴ کیلومتری جاده ملایر به اراک در منطقه افسریه شهرستان ملایر انتخاب شد. این تاکستان به عنوان یک باغ الگویی انگور که طی سال‌های مختلف به عنوان تاکستان نمونه از طرف وزارت جهاد کشاورزی انتخاب و معرفی شده، برای تهیه نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. این باغ دارای سیستم آبیاری قطره‌ای و نحوه تربیت کوردون^۳ بوده و هر ساله هرس و تغذیه مناسب تاک‌ها صورت گرفته است. میوه انگور رقم فخری در اواخر شهریورماه، زمانی که میوه‌های انگور به مرحله بلوغ تجاری رسیده بودند، برداشت و با رعایت اصول صحیح جابه‌جایی، به آزمایشگاه گروه علوم و مهندسی باغبانی واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل و پس از حذف حبه‌های آسیب‌دیده، خوشه‌ها با کلراکس ۰/۲۵ درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی سطحی شدند.

تهیه محلول کیتوزان

برای تهیه محلول کیتوزان، از کیتوزان خریداری شده از شرکت سیگما الدریج (کشور آمریکا) استفاده شد. پس از توزین مقدار مورد نیاز از این ماده، محلول کیتوزان ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد در اسیداستیک ۱ درصد تهیه و پس از حل شدن کامل، pH آن با استفاده از سود ۰/۱ نرمال به ۵/۶ رسانده و سپس با اسیداستیک ۱ درصد به حجم نهایی رسانده شد و در نهایت به ازای هر لیتر محلول کیتوزان تهیه شده ۲ میلی‌لیتر توئین ۸۰ نیز اضافه شد (Ghasemi Tavalei et al., 2015). خوشه‌های ضدعفونی شده به مدت ۵ دقیقه در محلول کیتوزان با غلظت‌های صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد تیمار شدند. پس از اعمال تیمار و حذف رطوبت سطحی، خوشه‌ها در ظروف یکبار مصرف درب‌دار قرار داده شدند و به سردخانه با دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰-۸۵ درصد منتقل و نگهداری شدند.

(Nejatian and Doulati Baneh, 2016). عمر انبارمانی میوه انگور با کاهش سفتی، قهوه‌ای شدن و خشک شدن چوب خوشه و پوسیدگی‌های قارچی کاهش می‌یابد. رایج‌ترین روش برای کنترل پوسیدگی قارچی میوه انگور در طی دوره انبارمانی استفاده از گاز دی‌اکسیدگوگرد است. علی‌رغم اثر فوق‌العاده این ماده در کنترل پوسیدگی و جلوگیری از رشد قارچ، در بسیاری از کشورها استفاده از آن محدود شده است. بقایای این ترکیب برای سلامت انسان خطرناک بوده و علاوه بر این باعث ایجاد صدمه به میوه‌ها و سبزی‌های تازه (از جمله سفید شدن حبه‌ها و قهوه‌ای شدن دم خوشه‌ها) می‌شود (Meng et al., 2008). امروزه با توجه به مضرات استفاده از سموم و مواد شیمیایی برای انسان و محیط زیست، رویکردهای جدید در استفاده از موادی که اثرات سوء و زیان‌آور به همراه نداشته باشند، مورد توجه قرار گرفته است. پوشش‌های خوراکی^۱ یکی از روش‌های حفظ کیفیت و افزایش مدت ماندگاری میوه‌ها و سبزی‌های تازه است (Dutta et al., 2009). کیتوزان، ماده غیرسمی، زیست تجزیه‌پذیر و زیست سازگار است (Ardakani et al., 2009). این ماده به عنوان یک ماده پوشش‌دهنده خوراکی، اتمسفر درونی میوه را تغییر داده و باعث تنظیم انتقال اکسیژن، دی‌اکسیدکربن و بخار آب می‌شود و تنفس، تبخیر و زوال میوه را به حداقل می‌رساند. کیتوزان همچنین دارای خاصیت ضد میکروبی بوده که گستره وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها را در بر می‌گیرد (Rabea et al., 2003). اردکانی و همکاران (Ardakani et al., 2009)، اثر کیتوزان بر افزایش زمان ماندگاری پس از برداشت و حفظ کیفیت انگور رقم شاهرودی را مورد بررسی قرار دادند، نتایج آن‌ها نشان داد که کیتوزان میزان کاهش وزن، ترک‌خوردگی، قهوه‌ای شدن، فساد و ریزش حبه‌ها را کاهش و کیفیت آن‌ها را به خوبی حفظ کرد. هرناندز مونوس و همکاران (۲۰۰۸) کاهش تنفس، تأخیر در پیری، کاهش وزن و کاهش پوسیدگی توت‌فرنگی را با کاربرد کیتوزان گزارش دادند. لی و جیانگ (Li and Jiang, 2000) نشان دادند که میوه‌های چشالو^۲ تیمار شده با کیتوزان در مقایسه با شاهد آب کمتری از دست داده و تیمارهای کیتوزان باعث حفظ بهتر کیفیت میوه‌ها نسبت به تیمار شاهد شد.

هدف از انجام این پژوهش بکارگیری کیتوزان به عنوان یک ماده پوشش‌دهنده خوراکی و ارزیابی پتانسیل آن در افزایش زمان ماندگاری و حفظ کیفیت میوه انگور رقم فخری طی دوره نگهداری بود.

1- Edible Coating

2- Dimocarpus longan

3- Cordon Trellis System

اندازه‌گیری صفات کمی و کیفی میوه

تغییرات صفات کمی و کیفی در طی دوره انبارمانی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری و اندازه‌گیری صفات در ۴ مرحله انجام شد. مرحله اول پس از برداشت و قبل از قرار دادن نمونه‌ها در سردخانه و سه مرحله بعد هر کدام به فاصله زمانی ۲۰ روز یکبار، در طول دوره انبارمانی خوشه‌های انگور صورت گرفت. بدین منظور درصد آلودگی به روش و همکاران (Ozgun et al., 2004)، درصد ریزش جبه به روش زو و همکاران (Xu et al., 2007)، میزان قهوه‌ای شدن جبه به صورت نمره‌دهی (۱- کاملاً سبز ۲- کمی قهوه‌ای ۳- متوسط ۴- شدید ۵- خیلی شدید) به روش مستوفی و همکاران (et al., 2011)، اسیدآسکوربیک به روش باراکات و همکاران (et al., 1973 Barakat)، اسیدیتیه قابل تیتراسیون به روش میردهقان و رحیمی (Mirdehghan and Rahimi et al., 2016) و فنل کل به روش سنگوتوان و همکاران (Senguttuvan et al., 2014) انجام شد. میزان فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالایز به روش تغییر یافته De Oliveira و همکاران (۲۰۱۶)، پلی‌فنل اکسیداز به روش تغییر یافته چن و همکاران (Chen et al., 2010) و پراکسیداز به روش تغییر یافته منگ و همکاران (Meng et al., 2008) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری درصد کاهش وزن، میوه‌های هر تکرار در ابتدای آزمایش، قبل از ورود به انبار و پس از انتقال به انبار در فواصل زمانی

تعیین شده با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شدند و درصد کاهش وزن بر اساس معادله زیر محاسبه گردید.

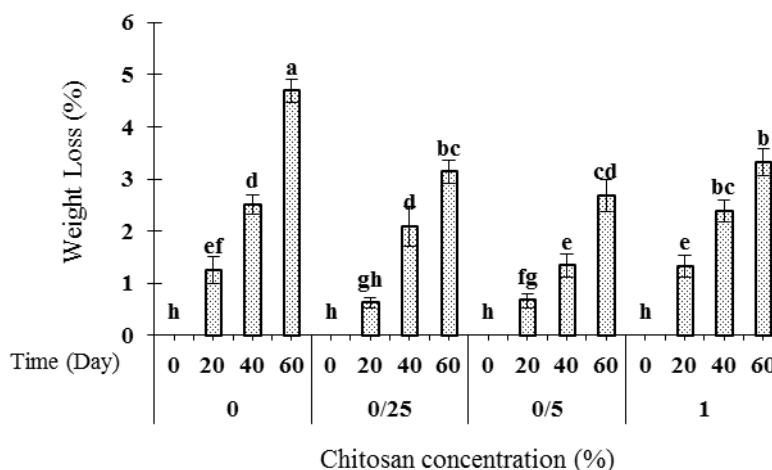
$$(۱) \quad W_1 - W_2 / W_1 \times 100 = \text{درصد کاهش وزن میوه}$$

W_1 : وزن اولیه W_2 : وزن ثانویه

تجزیه واریانس داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها و اثر متقابل عوامل آزمایشی براساس آزمون LSD با سطح احتمال خطای ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

درصد کاهش وزن: بررسی نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد درصد کاهش وزن به مرور زمان افزایش یافت (شکل ۱) و در تمام دوره‌های انبارمانی درصد کاهش وزن در میوه‌های تیمار شده با کیتوزان ۰/۵ درصد کمتر از سایر تیمارها و شاهد بود و بین دو غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. منگ و همکاران (Meng et al., 2008) گزارش دادند که میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان در طول ذخیره‌سازی کاهش وزن کمتری در مقایسه با تیمار شاهد داشتند که می‌توان آن را به عدم انتشار گازها از طریق روزه نسبت داد. زو و همکاران (Xu et al., 2007)، گزارش کردند که کیتوزان با تشکیل غشای نیمه‌تراوا موجب تنظیم گازها، کاهش انتقال آب از بافت‌های میوه می‌شود.



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر درصد کاهش وزن

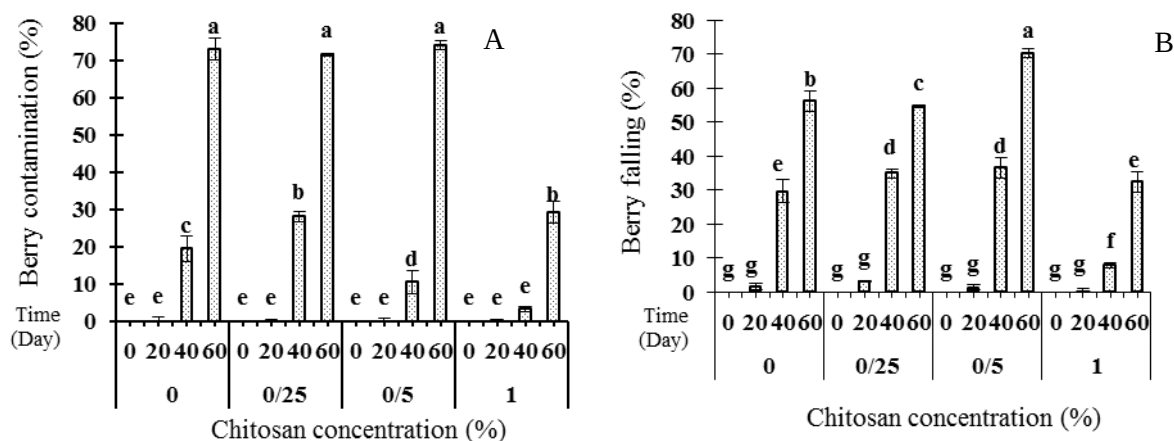
(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD ($P < 0.05$) و خطای استاندارد (Mean $\pm$ SE) می‌باشد).

Fig. 1- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the percentage of weight loss
(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test ($P < 0.05$) and the standard error of the Mean ($\pm$ SE)).

برابر مواد سمی) را تحریک می‌کند که بدین ترتیب موجب کاهش رشد قارچ‌ها می‌شود (Benhamou et al., 1994).

درصد ریزش حبه: نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر درصد ریزش حبه (شکل ۲-ب) نشان داد که با گذشت زمان میزان ریزش حبه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و پس از ۶۰ روز انبارمانی کم‌ترین میزان ریزش حبه (۳۲/۲۶۷) مربوط به غلظت ۱ درصد کیتوزان بود که با سایر غلظت‌ها و شاهد تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد داشت. احتمالاً ریزش حبه در اثر کاهش رطوبت همراه با تولید اتیلن باشد که باعث تشکیل لایه سواگر شده و ریزش میوه را تحریک می‌کند (Sekoba., 2014). به نظر می‌رسد این تیمارها از تأثیر سطوح اتیلن و نیز ایجاد لایه سواگر در محل اتصال میوه‌ها به خوشه جلوگیری می‌نمایند. هم‌چنین کاهش شدت تنفس و به دنبال آن کاهش هدر رفتن آب حبه‌ها منجر به کاهش شدت ریزش حبه در نمونه‌های پوشش داده شده گردیده است. افزایش ریزش حبه‌ها در میوه‌های فاقد پوشش احتمالاً می‌تواند ناشی از آلودگی قارچی و کاهش رطوبت در خوشه‌ها باشد.

درصد آلودگی حبه: نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که میزان آلودگی حبه‌ها در طی دوره‌های انبارمانی افزایش و کیفیت میوه‌ها به‌تدریج کاهش یافت (شکل ۲-ا). پس از ۶۰ روز انبارمانی کم‌ترین درصد آلودگی (۲۹/۱۶۶ درصد) در تیمار ۱ درصد کیتوزان مشاهده گردید که با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر غلظت‌ها و شاهد توانست میزان آلودگی را در طول دوره انبارمانی به‌خوبی کنترل کند و کیفیت میوه‌ها را برای مدت بیش‌تری در انبار حفظ کند. لیو و همکاران (Liu et al., 2007) بیان کردند که با افزایش غلظت کیتوزان رشد قارچ بوتریتیس سینرا و پی‌سیلیوم/اکسپانسون به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در تحقیقات بسیاری خواص ضد میکروبی کیتوزان به اثبات رسیده است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که پوشش کیتوزان سرعت تجزیه ترکیبات فنلی (اولین خط دفاعی در جلوگیری از رشد قارچ) را کاهش داده و تولید β -۱,۳ گلوکاناز (دومین مکانیسم محدودکنندگی در برابر حمله سلول‌های قارچی و حفاظت از بافت در



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر درصد آلودگی حبه (A) و درصد ریزش حبه (B)

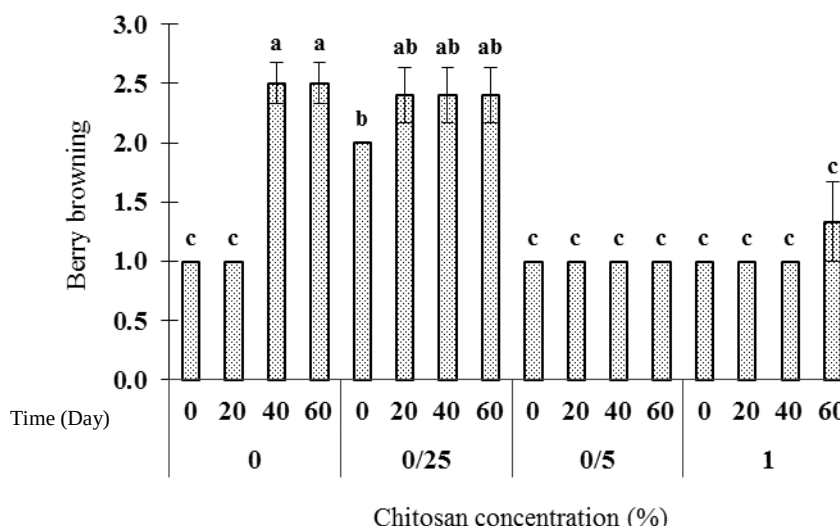
(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD ($P < 0.05$) و خطای استاندارد (Mean $\pm$ SE) می‌باشد).

Fig. 2- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the percentage of berry contamination (A) and the percentage of berry falling (B)

(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test ($P < 0.05$) and the standard error of the Mean ($\pm$ SE)).

اتصالات بین آن‌ها سست می‌شود و به دنبال آن اکسایش ترکیبات فنلی به‌وسیله آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز و تولید رنگ قهوه‌ای یا تیره اتفاق می‌افتد که نشانگر پیری بافت‌هاست (Meidani et al., 1997). لی و جیانگ (Li and Jiang et al., 2001) نشان دادند که تیمار کیتوزان قهوه‌ای شدن میوه‌ها را به تعویق انداخت.

قهوه‌ای شدن حبه: بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان قهوه‌ای شدن حبه (شکل ۳) نشان داد که کم‌ترین میزان قهوه‌ای شدن حبه (۱) مربوط به غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان بود که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. به‌طور کلی غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان توانستند به‌خوبی میزان قهوه‌ای شدن حبه را کنترل کنند. عامل مهم در تغییر بافت یا نرم شدن میوه، تجزیه پلی‌ساکاریدهای ساختمانی، به‌ویژه پکتین و همی سلولز است که در نتیجه این تجزیه دیواره سلولی ضعیف شده و



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان قهوه‌ای شدن جبه

(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD ($P < 0.05$) و خطای استاندارد (Mean $\pm$ SE) می‌باشد).

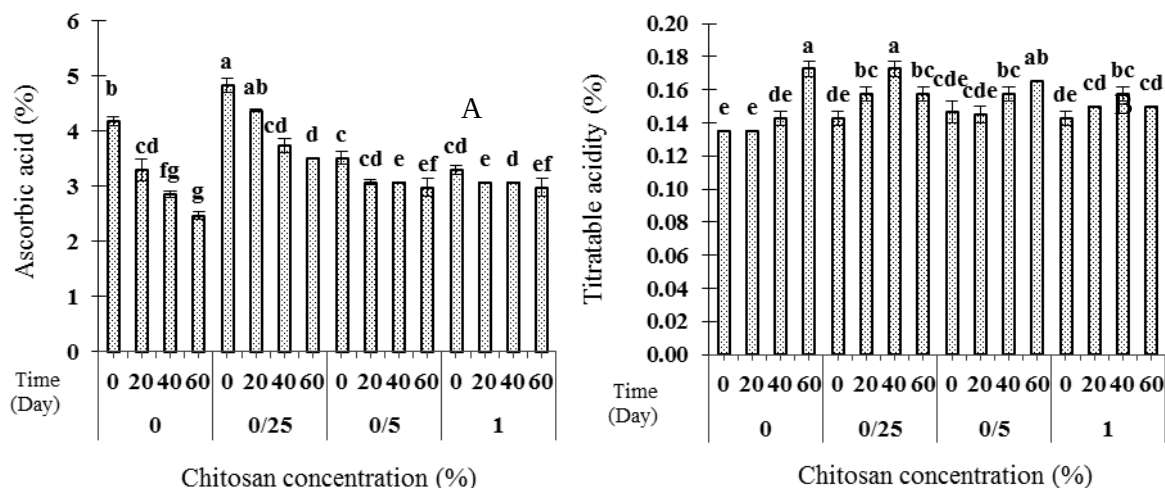
Fig. 3- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the browning of berries

(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test ($P < 0.05$) and the standard error of the Mean ($\pm$ SE)).

اسیدیتیه قابل تیتراسیون (TA): نتایج مقایسه میانگین اثر

متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان اسیدیتیه قابل تیتراسیون (شکل ۴-۲) نشان داد که اسیدیتیه قابل تیتراسیون به مرور زمان افزایش یافت اما در غلظت ۰/۵ و ۱ درصد این میزان افزایش جزئی بود و بیش‌ترین میزان اسیدیتیه قابل تیتراسیون (۰/۱۷۲ درصد) در ۶۰ روز پس از انبارمانی در شاهد و کم‌ترین میزان آن (۰/۱۵ درصد) در ۶۰ روز پس از انبارمانی در غلظت ۱ درصد کیتوزان مشاهده گردید. کیتوزان با ایجاد سد محافظتی در اطراف میوه از طریق ممانعت از ورود اکسیژن به داخل میوه میزان تنفس را کاهش می‌دهد (Jiang and Li., 2001). دوعا و همکاران (et al., 2010) گزارش کردند که درمیوه انبه اسیدیتیه قابل تیتراسیون تا ۹ روز پس از انبارمانی بدون تغییر باقی ماند ولی پس از آن اسیدیتیه قابل تیتراسیون در تیمار کیتوزان و شاهد افزایش یافت. قاسم نژاد و همکاران (Ghasemnezhad et al., 2010) نیز گزارش کردند که دلیل کاهش اسید آلی در پایان انبارمانی ممکن است به دلیل تغییرات متابولیک در میوه و یا ناشی از مصرف اسیدهای آلی در فرآیند تنفس باشد. کاهش اسیدیتیه قابل تیتراسیون ممکن است به دلیل گسترش آلودگی قارچی باشد که منجر به افزایش تنفس می‌شود.

گزارش شده که کیتوزان تا حدودی از افزایش فعالیت پراکسیداز مرتبط با قهوه‌ای شدن در میوه‌های توت‌فرنگی تازه و تمشک‌های تیمار شده با کیتوزان جلوگیری می‌کند (Hajitaghilo et al., 2017). اسیدآسکوربیک: بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان اسیدآسکوربیک (شکل ۴-۳) نشان داد که میزان اسیدآسکوربیک باگذشت زمان انبارمانی کاهش یافت و پس از ۶۰ روز انبارمانی کم‌ترین میزان اسیدآسکوربیک (۲/۴۷۶ درصد) در شاهد مشاهده گردید. به‌طور کلی بین غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. اسیدآسکوربیک ترکیبی ناپایدار است که به‌عنوان یک نوع اسید در میوه، با آغاز فرآیند پیری به‌سرعت در واکنش تنفسی مصرف می‌شود (Gil et al., 2006). لی و جیانگ (Li and Jiang et al., 2001) گزارش نمودند که سطوح بالاتر اسیدآسکوربیک در میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان ممکن است به‌دلیل کاهش اکسیژن و مهار تنفس باشد. کاهش اسیدآسکوربیک وابسته به حضور O_2 می‌باشد (O_2 سبب اکسیداسیون اسیدآسکوربیک می‌شود) وجود کیتوزان در فرمولاسیون پوشش میوه موجب کاهش انتشار O_2 ، در نتیجه پایین آمدن سرعت تنفس و تأخیر در رسیدن میوه و حفظ اسیدآسکوربیک می‌شود (Lerdthanangkul et al., 1996).



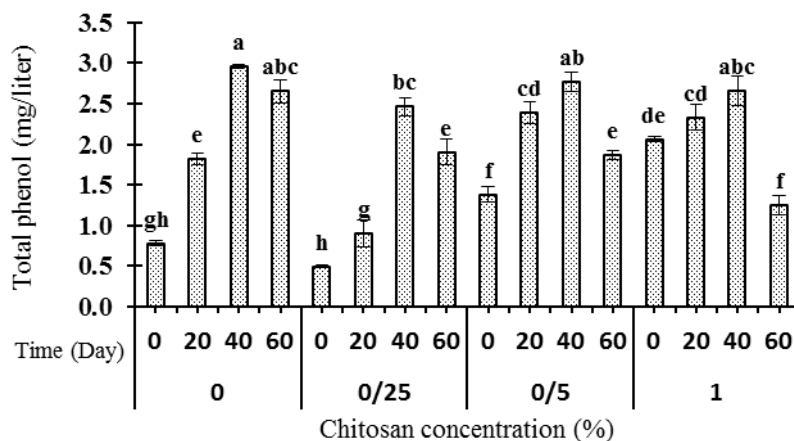
شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر اسیدآسکوربیک (A) و اسیدیته قابل تیتراسیون (B)

(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD ($P < 0.05$) و خطای استاندارد (Mean $\pm$ SE) می‌باشد).

Fig. 4- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on ascorbic acid (A) and titratable acidity (B)
(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test ($P < 0.05$) and the standard error of the Mean ($\pm$ SE)).

کلروفیل و شروع سنتز ترکیبات فنلی باشد که مصادف با دوره تغییر رنگ حبه‌ها است (Rabea et al., 2003). سالزو و همکاران (et al., 2004) کاهش میزان فنل در طول مدت انبارمانی را به فرآیند پیری نسبت دادند.

فنل کل: بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فنل کل (شکل ۵) نشان داد که میزان فنل تا ۴۰ روز پس از انبارمانی روند افزایشی داشت و پس از آن در پایان دوره انبارمانی کاهش یافت. بیش‌ترین میزان فنل (۲/۹۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در ۴۰ روز پس از انبارمانی در شاهد مشاهده گردید. افزایش در میزان فنل میوه انگور می‌تواند به‌دلیل از دست رفتن



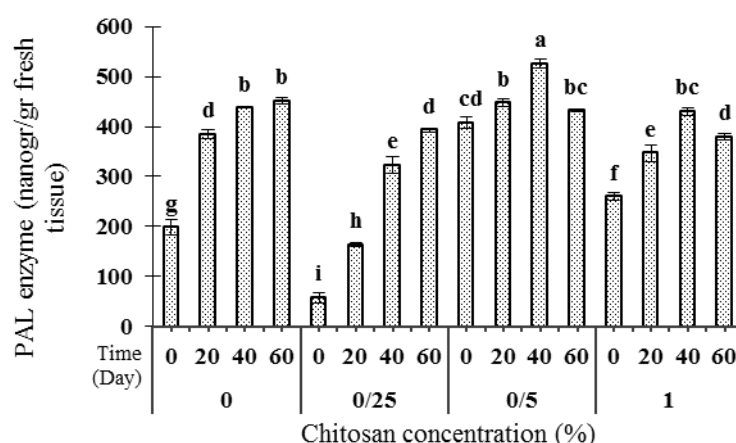
شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فنل کل

(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD ($P < 0.05$) و خطای استاندارد (Mean $\pm$ SE) می‌باشد).

Fig. 5- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the amount of total phenol
(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test ($P < 0.05$) and the standard error of the Mean ($\pm$ SE)).

این آنزیم گردید. افزایش در فعالیت این آنزیم موجب قهوه‌ای شدن و پوسیدگی بافت میوه‌ها و سبزی‌های تازه در طی دوره انبارمانی می‌گردد (Fujita et al., 2006). این آنزیم با استرس‌های مختلف زنده (آلودگی با ویروس‌ها، باکتری‌ها قارچ‌ها و غیره) و غیرزنده (دمای بالا و پایین، اشعه فرابنفش، زخم شدن و غیره) تحریک می‌شود که نتیجه آن تجمع فنیل آلانین آمونیازهای مانند اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها است (Eraslan et al., 2007).

آنزیم فنیل آلانین آمونیاز (PAL): نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز (شکل ۶) نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در طی دوره انبارمانی افزایش یافت و بیش‌ترین میزان فعالیت آن (۵۲۶/۵ نانوگرم بر گرم بافت تر) ۴۰ روز پس از انبارمانی در غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان مشاهده گردید. ناس و همکاران (Nath et al., 2015) بیان کردند پاتوژن و آلودگی در میوه موز باعث افزایش فعالیت



شکل ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز (حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD ($P < 0.05$) و خطای استاندارد (Mean $\pm$ SE) می‌باشد.

Fig. 6- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme (dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test ($P < 0.05$) and the standard error of the Mean ($\pm$ SE)).

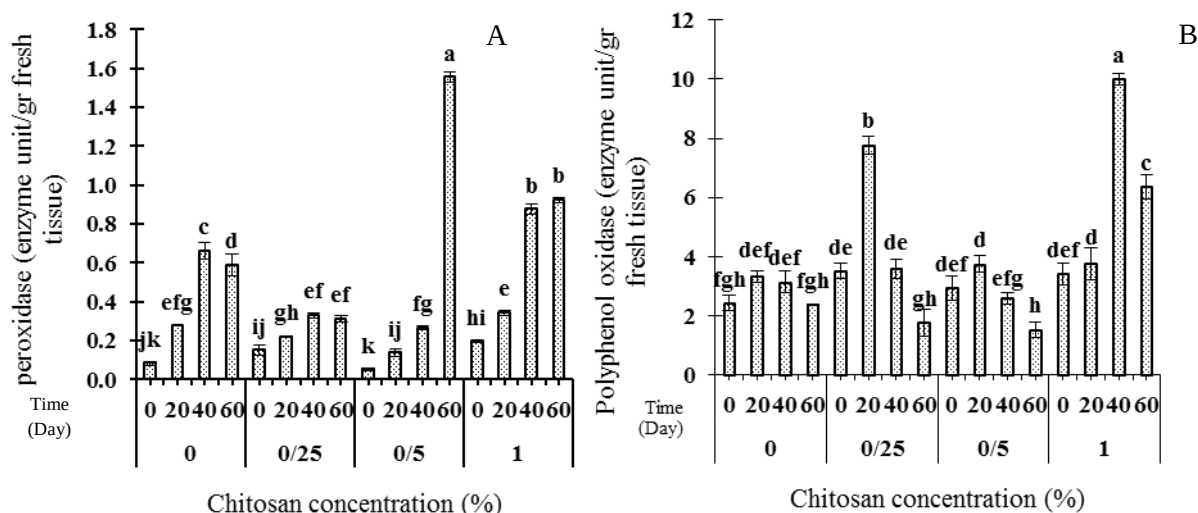
اکسیژن و رادیکال‌های آزاد در طی فرآیند رسیدن می‌تواند موجب ایجاد خسارت به غشاهای سلولی و افزایش سرعت پیری محصول گردد. سیستم آنتی‌اکسیدانی با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد باعث جلوگیری از اثر سوء آن‌ها می‌شود. تیمارهایی که باعث کاهش تنفس و تولید اتیلن و در نتیجه باعث کاهش سرعت پیری می‌شوند باعث کاهش سرعت تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شوند (Meng et al., 2008).

آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO): بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (شکل ۷-B) نشان داد که فعالیت این آنزیم در طی دوره انبارمانی ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت و بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (۶/۳۵۲ واحد آنزیم بر گرم بافت تر) در غلظت ۱ درصد کیتوزان در ۴۰ روز پس از انبارمانی مشاهده گردید. قهوه‌ای شدن آنزیمی یکی از مشکلات میوه‌ها بعد از برداشت می‌باشد. قهوه‌ای شدن جبه‌ها در انگور با اکسیداسیون طبیعی مواد

آنزیم پراکسیداز (POD): بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (شکل ۷-A)، میزان فعالیت این آنزیم در طی دوره انبارمانی روند افزایشی داشت به‌شکلی که بیش‌ترین میزان فعالیت آن (۱/۵۵۵ واحد آنزیم بر گرم بافت تر) در ۶۰ روز پس از انبارمانی در غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان مشاهده گردید. سکوبا (Sekoba, 2014) در بررسی اثر کیتوزان و نانو سیلیکا بر افزایش عمر انباری انگور گزارش کرد که فعالیت آنزیم پراکسیداز تا پایان دوره انباری روند صعودی داشت. یکی از تغییراتی که در زمان تنش‌های زنده و غیرزنده به‌وجود می‌آید تولید گونه‌های اکسیژن فعال است. آنزیم پراکسیداز از آنزیم‌های سیستم دفاعی گیاه می‌باشد. وظیفه این آنزیم سم‌زدایی و تجزیه پراکسیداز هیدروژن تولید شده در سلول‌ها است (Adriano et al., 2005). در طول انبارمانی میوه، فعالیت بالای پراکسیداز می‌تواند منجر به کاهش واکنش قهوه‌ای شدن و در نتیجه سبب افزایش عمر انباری گردد (Mirdehghan et al., 2016). افزایش گونه‌های فعال

طی دوره انبار برخوردار بودند که با نتایج برزمان و همکاران (Barzaman *et al.*, 2018) که در بررسی کاربرد توأم پلی‌آمین‌ها و کیتوزان بر ترکیبات زیستی فعال و قهوه‌ای شدن میوه پسته تر گزارش کردند، میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان از فعالیت آنزیمی بیش‌تری برخوردار بودند، مطابقت داشت.

فنی توسط آنزیم پلی فنل اکسیداز در ارتباط بوده و این آنزیم مهم‌ترین علت قهوه‌ای شدن می‌باشد (Hajitaghilo *et al.*, 2017). آنزیم پلی‌فنل اکسیداز غالباً در طی رسیدگی و پیری و یا در شرایط تنش زمانی که به غشاء آسیب وارد می‌شود، فعال می‌شود (Mayer, 1987). نتایج به‌دست آمده نشان داد که میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان از فعالیت آنزیمی بیش‌تری نسبت به میوه‌های بدون پوشش



شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان و زمان انبارمانی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (A) و پلی‌فنل اکسیداز (B)

(حروف غیرمشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD ($P < 0.05$) و خطای استاندارد (Mean $\pm$ SE) می‌باشد).

Figure 7- Effect of different concentrations of chitosan and storage time on the activity of peroxidase (A) and polyphenol oxidase (B)

(Dissimilar letters and bars on each column (Error Bars), respectively, indicate a significant difference based on the LSD test ($P < 0.05$) and the standard error of the Mean ($\pm$ SE)).

بود که بین دو غلظت ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان در بیش‌تر صفات تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. هرچند بین دو غلظت ۱ و ۰/۵ درصد کیتوزان در برخی موارد تفاوت معنی‌داری دیده نشد، اما به‌طور کلی غلظت ۱ درصد بهتر از ۰/۵ درصد کیتوزان توانست سبب افزایش عمر انبارمانی و حفظ کیفیت میوه انگور شود.

سپاسگزاری

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

نتیجه‌گیری

به‌نظر می‌رسد پوشش خوراکی کیتوزان می‌تواند باعث حفظ کیفیت میوه‌ها به مدت طولانی‌تر و در نتیجه افزایش عمر انبارمانی انگور شود. نتایج نشان داد که غلظت ۱ درصد کیتوزان به‌خوبی توانست آلودگی، ریزش حبه، کاهش اسیدیته قابل تیتراسیون و کاهش اسیدآسکوربیک را کنترل نماید و بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در غلظت ۱ درصد کیتوزان مشاهده گردید و غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان نیز سبب جلوگیری از کاهش وزن و قهوه‌ای شدن حبه‌ها نسبت به سایر غلظت‌ها و نمونه شاهد گردید و بیش‌ترین میزان فنل کل و بالاترین میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیااز و پراکسیداز نیز مربوط به غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان بود، این در حالی

منابع

1. Ardakani, M.D., Mostofi, Y. & Hedayatnejad, R. (2009). Study on the effects of chitosan in preserving some qualitative factors of table grape (*Vitis vinifera* 'Shahroudi'). VI International Postharvest Symposium 877: 739-742. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.877.97>.

2. Adriano, S., Bartolomeo, D., Cristos, X., & Andras, M. (2005). Antioxidant defenses in Olive trees during drought stress: changes in activiting of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology* 32: 45-53. <https://doi.org/10.1071/FP04003>.
3. Barakat, M.Z., Shahab, S.K., Darwish, N., & El-Zoheiry, A. (1973). A new titrimetric method for the determination of vitamin C. *Analytical Biochemistry* 53: 245-251.
4. Barzaman, M., Mirdehghan, S.H., & Nazoori, F. (2018). Combined application of polyamines and chitosan on bioactive compound and browning of fresh pistachio. *Nutrition Science and Food Technology* 15(81): 357-374. (In Persian)
5. Benhamou, N., Lafontaine, P.J., & Nicole, M. (1994). Induction of systemic resistance to fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* 84: 1432-1444.
6. Chen, S., Zhang, M., & Wang, S. (2010). Physiological and quality responses of Chinese 'Suli'pear (*Pyrus bretschneideri* Rehder) to 1-MCP vacuum infiltration treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(8): 1317-1322. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3939>.
7. De Oliveira, I.R., Crizel, G.R., Severo, J., Renard, C.M., Chaves, F.C., & Rombaldi, C.V. (2016). Preharvest UV-C radiation influences physiological, biochemical and transcriptional changes in strawberry cv. Camarosa. *Plant Physiology and Biochemistry* 108: 391-399. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.08.012>.
8. Djua, T., Charles, F., Freire, J.M., Filgueiras, H., Marie-Noello, D., & Sallanon, H. (2010). Combined effects of postharvest heat treatment and chitosan coating on quality of fresh-cut mangoes (*Mangifera Indica* L.). *International Journal of Food Science and Technology* 45: 849-855. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02209.x>.
9. Dutta, P., Tripathi, S., Mehrotra, G., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* 114(4): 1173-1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>.
10. Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., & Alpaslan, M. (2007). Impaect of exogenous salicylic acid on the growth antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 113:120-128. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.03.012>.
11. Fujita, N., Tanaka, E., & Murata, M. (2006). Cinnamaldehyde inhibits phenylalanine ammonia-lyase and enzymatic browning of cut lettuce. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70(3): 672-676. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.672>.
12. Ghasemi Tavalei, M., Ramin, A.A., & Amini, F. (2015). The effect of chitosan edible coating on quality and extension of postharvest life of cucumber in Zomorod. *Production and Processing of Crops and Horticulture* 5(15): 197-189.
13. Ghasemnezhad, M., Shiri, M.A., & Sanavi, M. (2010). Effect of chitosan coatings on some quality indices of apricot (*Prunus armeniaca* L.) during cold storage. *Environmental Science* 8: 25-33.
14. Gil, M.I., Aguayo, E., & Kader, A.A. (2006). Quality changes and nutrient retention in fresh-cut versus whole fruits during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(1): 96-4284. <https://doi.org/10.1021/jf060303y>.
15. Hajitaghilo, R., Jalili Marandi, R., Asghari, M.R., & Hemmaty, S. (2017). Effects of postharvest treatment with chitosan and salicylic acid on fungal decay caused by *Botrytis cinerea* and quality of rishbaba table grape (*Vitis vinifera* L.). *Research in Pomology* 2(1): 15-30. (In Persian)
16. Hernandez-Munos, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D., & Gavaara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry* 110: 428-435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.020>.
17. Jiang, Y., & Li, Y. (2001). Effects of chitosan on postharvest life and quality of longan fruit, *Food Chemistry* 73: 139-143. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00246-6).
18. Lerdthanakul, S., & Krochta, J.M. (1996). Edible coating effects on postharvest quality of green bell peppers. *Journal of Food Science* 61: 176-179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14753.x>.
19. Liu, H.F., Wu, B.H., Fan, P.G., Xu, H.Y., & Li, S.H. (2007). Inheritance of sugars and acids in berries of grape. *Euphytica* 153: 99-107.
20. Mayer, A.M. (1987). Polyphenol oxidase and peroxidase in plants recent progress. *Phytochemistry* 26: 11- 20.
21. Meidani, J., & Hashemi Dezfouli, A.A. (1997). *Postharvest physiology*. Publication of Agriculture Education in Karaj, P. 403.
22. Meng, X., Li, B., Liu, J., & Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry* 106(2): 501-508. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.012>.
23. Mirdehghan, S.H., & Rahimi, S. (2016). Pre-harvest application of polyamines enhances antioxidants and table grape (*Vitis vinifera* L.) quality during postharvest period. *Food Chemistry* 196: 1040-1047. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.038>.

24. Mostofi, Y., Dehestani Ardakani, M., & Razavi, S.H. (2011). The effect of chitosan on postharvest life extension and qualitative characteristics of table grape "Shahroodi". *Journal of Food Science and Technology* 8(31): 93-104.
25. Nath, K., Solanky, K.U., Mahatma, M.K., Madhubala, S.R., & Rakesh, M. (2015). Role of total soluble sugar, phenols and defense related enzymes in relation to Banana fruit rot by *Lasiodiplodia Theobromae* [(Path.) Griff. and Maubl.] during ripening. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 6(299): 2-8.
26. Nejatian, M.A., & Doulati Baneh, H. (2016). Identification, distinctness and registration of commercial and native grape cultivars of Iran. *Iranian Journal of Horticultural Science* 47(3): 581-594.
27. Ozgur, A., Gabler, K., Mansour, M., & Smilanick, J.L. (2004). Postharvest ethanol and hot water treatments of table grapes to control gray mold. *Postharvest Biology and Technology* 34(2): 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.05.003>.
28. Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4(6): 1457-1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>.
29. Scalzo, R.L., Iannocari, T., Summa, C., Morelli, R., & Rapisarda, P. (2004). Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 85(1): 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.005>.
30. Sekoba, E. (2014). *Influence of postharvest chitosan and nano silica coating application on preservation of fruit quality and shelf life of grape cv. Bedaneh -Sefid*. Master's degree in horticulture. University Zanjan, P. 36.
31. Senguttuvan, J., Paulsamy, S., & Karthika, K. (2014). Phytochemical analysis and evaluation of leaf and root parts of the medicinal herb, *Hypochaeris radicata* L. for in vitro antioxidant activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4: 359-367. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1030>.
32. Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Chen, C., Ma, L., Li, S., & Lin, H. (2016). Chitosan-based coating with antimicrobial agents: preparation, property, mechanism, and application effectiveness on fruits and vegetables. *International Journal of Polymer Science* 1-24. <https://doi.org/10.1155/2016/4851730>.
33. Xu, W.T., Huang, K.L., Guo, F., Qu, W., Yang, J.J., Liang, Z.H., & Luo, Y.B. (2007). Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 46(1): 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.019>.



Addition of Reducing Agents, Vitamin C and Citric Acid during Wheat Conditioning and their Effects on the Quality Characteristics of the Corresponding Flour and Dough

M. Seydhosseinzadeh¹, M. Hosseini^{2*}, M. Shahedi³, M. Kadivar⁴

Received: 2022.02.27

Revised: 2022.04.21

Accepted: 2022.04.26

Available Online: 2022.04.26

How to cite this article:

Seydhosseinzadeh, M., Hosseini, M., Shahedi, M., & Kadivar, M. (2023). Addition of reducing agents, vitamin C and citric acid during wheat conditioning and their effects on the quality characteristics of the corresponding flour and dough. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 107-127. (In Persian with English abstract). <http://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.75547.1151>

Introduction

The most important component of wheat proteins is gluten, and the most prominent bonds in gluten are disulfide bonds, which bind glutenin subunits. Therefore, oxidizing and reducing agents with great effects on the thiol-disulfide system of the dough can change the mechanical and rheological properties of the dough. Due to the positive effects of ascorbic acid on the properties of the dough, it is used as a flour improver. To weaken the structure of the dough, reducing agents such as cysteine-L can be used, and by adding organic acids, increasing the specific volume and decreasing the moisture, the pH and hardness are observed in comparison with the control. This study is performed to evaluate the effect of adding reducing compounds, vitamin C and organic acids during the conditioning of wheat and their effect on the yield of the resulting pulp.

Materials and Methods

First, Physical properties of wheat include: specific density, colorimetry, estimation of grain length, width and thickness, grain hardness, hectoliters, 1000-grain weight, grain moisture, degree of extraction were measured for the tested wheat. Moisture, pH, ash, particle size, fat, protein and zeal number tests were performed on wheat flour. From elementary cleaned and weighed wheat, 13 samples of 240 g each were weighed separately and poured into plastic bottles. One sample was conditioned with only 30 ml of distilled water and the other 12 samples were conditioned with the following solutions, respectively:

- 1- Cysteine solution at three levels of 0.25, 0.5 and 0.75% by weight
- 2- Citric acid solution in three levels of 0.3, 0.4 and 0.5% by weight
3. Vitamin C solution in three levels of 100, 150 and 200 ppm
- 4- solution of 80 ppm vitamin C and 0.1% cysteine, solution of 100 ppm vitamin C and 0.2% cysteine, solution of 120 ppm vitamin C and 0.3% cysteine

After 24 hours, the conditioned wheat samples were milled by a laboratory waltz mill, and then subsequent tests including gluten, sulfhydryl-disulfide, glutathione, and solvent retention capacity (SRC) were performed on the samples.

Statistical analysis was performed using SAS statistical software in a randomized complete block design. Each measurement was performed in at least three replications and the means were compared at 95% confidence level with the least significant difference in LSD.

Results and Discussion

The results of physical tests on wheat grain and chemical tests on flour obtained by milling the wheat samples without adding additives during conditioning are presented in tables. The results of gluten, glutathione, sulfhydryl-

1, 3 and 4- Master's Degree and Profesors, Department of Food Science and Industry, School of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, respectively.

2- Assistance Professor, Department of Food Science and Industry, School of Agriculture, Ilam University

(*- Correspponding Authors Email: m.hosseini@ilam.ac.ir)

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2022.75547.1151](https://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.75547.1151)

disulfide and solvent storage capacity tests on samples of conditioned wheat flours are also presented. Based on the results of gluten and glutathione test, it was shown that ascorbic acid is oxidizing and strengthening the dough, but cysteine is reducing and weakening the dough. Simultaneous addition of cysteine and ascorbic acid strengthened the dough, adding citric acid to certain level strengthened the dough as exhibited in the gluten test. However, beyond that level, weakened the dough, but in the glutathione test it was almost ineffective. The results of sulfhydryl-disulfide test showed that increasing the amount of vitamin C at three levels of 100, 150 and 200 ppm increases the number of disulfide bonds, although this increase was not in linear trend, which can be due to the limited number of groups of sulfhydryl with a suitable spatial arrangement for oxidation. Accordingly, the number of sulfhydryl groups is significantly reduced, although it does not reach zero. With the addition of reducing cysteine, the opposite trend was the case, as the number of thiol groups increased, the number of disulfide bonds and bridges decreased. The addition of organic acid had no significant effect on both parameters and showed that the performance of these two variables is independent. By adding both reducing and oxidizing compounds, it was found that the oxidizing effect of vitamin C is far greater than the reducing effect of cysteine. Regarding the solvent retention capacity test performed with 4 solvents of deionized water, 50% sucrose, 5% sodium carbonate and 5% lactic acid, the expected results are that the addition of cysteine has a reducing and weakening effect on the dough, adding vitamin C and cysteine + vitamin C strengthens the dough and the addition of citric acid initially strengthens the dough, but by increasing its level weakens the dough, but this effect is small and can be neglected. The results obtained by comparing the samples conditioned with cysteine, vitamin C, citric acid and cysteine + vitamin C, with the sample conditioned with distilled water in some additive levels matched the expected results, but in some cases did not.

Keywords: Additives, Citric acid, G, Oxidizing, Reducer

مقاله پژوهشی

افزودن ترکیبات احیا کننده، ویتامین C و اسید سیتریک حین مشروط نمودن گندم و اثر آنها بر ویژگی‌های کیفی خمیر حاصل از آرد آن

محیا صیدحسین زاده^۱ - محمدیار حسینی^{۲*} - محمد شاهی^۳ - مهدی کدیور^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۲/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۶

چکیده

در بین آردهای غلات، فقط آرد گندم می‌تواند یک خمیر ویسکوالاستیک سه بعدی تشکیل دهد. از مواد افزودنی معمولاً در صنعت پخت و پز برای بهبود کیفیت محصولات نانوائی استفاده می‌شود. از جمله این مواد، اکسیدکننده و احیاکننده می‌باشند. در این پژوهش، ابتدا روی گندم روشن یکسری آزمون‌های فیزیکی انجام شد، مقداری از گندم آسیاب و روی آرد حاصل آزمون‌های شیمیایی انجام شد، سپس ۱۳ نمونه ۲۴۰ گرمی از گندم توزین، یک نمونه فقط با ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر مشروط و سایر ۱۲ نمونه با ۳ سطح از ۴ نوع افزودنی مشروط شدند و ۲۴ ساعت بعد، آسیاب شدند و آزمایشاتی روی نمونه‌ها انجام شد. بررسی نتایج نشان می‌دهد که درصد گلوتن از ۲۷/۲ با افزودن ویتامین C به ۳۰/۳، با سیستین به ۲۵/۸، با سیستین + ویتامین C به ۲۴/۵ و با اسید سیتریک به ۲۹/۳ رسید، میزان گلوتن بالاتر به معنای تقویت خمیر است. میزان پیوند SS از ۱۲/۲۵ با افزودن ویتامین C به ۱۳/۴۴، با سیستین به ۸/۷۴، با سیستین + ویتامین C به ۱۲/۸۷ و با اسید سیتریک به ۱۲/۱۲ رسید که تغییر معنی‌داری نداشت. میزان گلوتاتینون از ۰/۹، با افزودن ویتامین C به ۰/۷۱، با سیستین به ۱/۰۲، با سیستین + ویتامین C به ۰/۷۵، با اسید سیتریک به ۰/۹۳ رسید و نسبتاً بی‌تاثیر بود. نتایج مورد انتظار آزمون ظرفیت نگهداری حلال بدین صورت است که افزودن سیستین باعث تضعیف خمیر، افزودن ویتامین C و سیستین + ویتامین C باعث تقویت خمیر، افزودن اسید سیتریک در ابتدا باعث تقویت خمیر و افزایش سطح آن باعث تضعیف خمیر می‌گردد. نتایج بدست آمده از مقایسه نمونه‌های مشروط شده با افزودنی‌ها، با نمونه مشروط شده با آب مقطر در برخی سطوح با نتایج مورد انتظار مطابقت داشت و در برخی موارد چنین نبود.

واژه‌های کلیدی: افزودنی‌ها، اکسیدکننده، احیاکننده، اسید سیتریک، گلوتن

مقدمه

بخش‌های قابل توجهی از جمعیت جهان محصولات بر پایه گندم را استفاده می‌نمایند (Bloksma et al., 1998). عمده مصرف گندم به عنوان مهم‌ترین محصول زراعی به صورت نان است که کیفیت مطلوب آن از نظر طعم، مزه، طول مدت نگهداری و کاهش ضایعات اهمیت بسزایی دارد (Barron et al., 2007). آرد گندم پرمصرف‌ترین و شناخته شده‌ترین نوع آرد می‌باشد (Gooding, 2009).

پروتئین‌های آرد گندم بر اساس حلالیت (تقسیم بندی آزبورن) به چهار گروه آلبومین‌ها، گلوبولین‌ها، گلیادین و گلوتنین تقسیم می‌شوند. آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها به عنوان پروتئین‌های غیر گلوتنی هستند و ۱۵ درصد پروتئین آرد را تشکیل می‌دهند. در حالی که گلیادین و

گندم بیش از هر محصول غذایی دیگری کشت می‌شود و این امر ممکن است به دو دلیل باشد، اول اینکه گندم گیاهی مقاوم است و می‌تواند تحت شرایط مختلف محیطی و خاک رشد کند و دوم،

۱، ۳ و ۴- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

(*)- نویسنده مسئول: (Email: m.hosseini@ilam.ac.ir)

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.75547.1151

گلوتنین که مجموعاً گلوتن خوانده می‌شوند، حدوداً ۸۵ درصد پروتئین آرد را تشکیل می‌دهند (Lagrain et al., 2006).

اگرچه گلیادین‌ها حاوی تعدادی اسید آمینه سیستمین هستند، آنها فقط پیوند SS درون مولکولی را تشکیل می‌دهند، از این رو در ساختار شبکه گلوتن دخیل نیستند. گلوتنین‌ها در مقایسه با گلیادین‌ها حاوی یک سیستمین اضافی هستند که در انتهای زنجیره قرار دارد، پیوندهای SS را با سایر پروتئین‌های گلوتنین تشکیل داده و در تشکیل شبکه گلوتن نقش دارد (Sahi, 2014). مهم‌ترین بخش پروتئین‌های گندم، گلوتن است که خصوصیات تکنولوژیکی گندم را به آن نسبت می‌دهند (Payan, 2011).

در طول مخلوط کردن و آبیگری آرد، گلوتن شبکه‌ای ویسکوالاستیک، منسجم و قوی تشکیل می‌دهد که به خمیر اجازه می‌دهد گازهای حاصل از تخمیر مخمر را نگه دارد و یک محصول سبک و دارای گاز را تشکیل دهد (Ravi, 2000). قبل از اینکه دانه فرآیند آسیاب کردن را طی نماید یا جهت خرد کردن و تبدیل به آرد وارد غلتک آسیاب کردن گردد، باید شسته شده یا آن را نم زده و حالت داد. به عبارت دیگر دانه را باید مشروط نمود (Khodabandeh, 2003).

مشروط‌سازی شامل افزودن آب به دانه خشک (به عنوان مثال گندم) و اجازه استراحت دانه برای مدت زمانی قبل از آسیاب شدن است. هدف از این کار نه تنها چرمی یا منعطف شدن سبوس و در نتیجه مقاوم کردن آن در برابر تکه تکه شدن در حین خرد کردن به قطعات کوچک است، بلکه همچنین نرم شدن آندوسپرم برای آسیاب آسان تر است. در واقع، سبوس با رطوبت بالا حالت چرمی و انعطاف‌پذیر دارد و در طول آسیاب در قطعات بزرگ باقی می‌ماند. این پدیده کمک زیادی به حذف سبوس از آرد می‌کند. آب آندوسپرم را نرم‌تر کرده و در نتیجه راحت تر آسیاب می‌شود. احتمال دارد که آب پیوند پروتئین-نشاسته را که عامل سختی دانه است می‌شکند یا ضعیف می‌کند.

به منظور تجزیه و تحلیل رابطه‌ی بین کیفیت آرد و کیفیت فرآورده‌های نانوائی، روش‌های سنجش رئولوژی خمیر (به عنوان مثال فارینوگرافی، میکسوگرافی، اکستنسوگرافی و آلوئوگرافی) و آزمون‌های پخت (نان، کلوچه و کیک) به صورت گسترده و سنتی استفاده شده است (Bloksma et al., 1998).

به طور کلی، آرد برای تولید نان، به جذب بالای آب، مقاومت مناسب گلوتن، محتوای نسبتاً بالای نشاسته آسیب دیده و آرایینوزایلان‌ها نیاز دارد، در حالی که برای تولید کوکی، نیاز به جذب کم آب، مقاومت حداقلی گلوتن و محتوای کم نشاسته آسیب دیده و آرایینوزایلان‌ها نیاز دارد (Slade et al., 1994).

در مجموع، آزمون‌های تجربی رئولوژیکی و پخت می‌توانند خصوصیتی از قبیل شدت آسیب نشاسته و ویژگی‌های رئولوژیکی پروتئین‌های گلوتن را مشخص نمایند ولی قادر به تعیین ظرفیت عملکردی اختصاصی هر یک از این اجزای پلی مری به طور جداگانه نمی‌باشند. توانایی تجزیه و تحلیل ظرفیت عملکردی اختصاصی هر جز پلی مری آرد، کاربران نهایی را به پیش‌بینی بهتر عملکرد کلی آرد و بدست آوردن فرآورده با کیفیت بهینه، از طریق درک بهتر مکانیسم‌ها برای مخلوط کردن خمیر و پختن، قادر می‌سازد. روش ظرفیت نگهداری حلال^۱ (SRC)، به عنوان یک ابزار ارزشمند برای اندازه‌گیری خواص عملکردی هر جز پلیمری آرد برای کاربردهای گندم نرم توسط لوئیس اسلید در نایسکو در اواخر سال (۱۹۸۰) شکل گرفت و توسعه یافت. ظرفیت نگهداری حلال (SRC) نوعی آزمون با استفاده از انواع خاصی از حلال برای آرد است که براساس رفتار تورمی تسریع شده‌ی اجزا پلی مری آرد می‌باشد. در ابتدا، آزمون SRC برای ارزیابی خواص عملکردی آرد گندم نرم طراحی شده بود اما بعدها برای ارزیابی خواص عملکردی آرد فرآورده‌های گندم سخت نیز به کار گرفته شد. آزمون SRC یک روش ساده، کوچک مقیاس، اقتصادی و کاربرپسند است (Kweon et al., 2011).

به دلیل ساده بودن روش SRC، تغییرات در مقادیر SRC آرد، بین آزمایشگاه‌ها و بین اپراتورهای آزمایشگاه بسیار کوچکتر از تغییرات دیگر آزمون‌های کیفیت آرد، مانند آزمون‌های رئولوژیکی و پخت نان است (Gaines et al., 2000). ظرفیت نگهداری حلال (SRC)، سازگاری انواع خاصی از حلال برای سه جزء عملکردی پلیمری آرد، شامل گلوتنین، نشاسته آسیب دیده و پنتوزان‌ها را فراهم می‌کند که به نوبه‌ی خود امکان پیش‌بینی وضعیت عملکردی هر یک از این اجزاء در آرد را نشان می‌دهد و در نتیجه امکان پیش‌بینی کیفیت فرآورده نهایی را امکان‌پذیر می‌سازد (Kweon et al., 2011). روش SRC علی‌رغم ساده بودن، به دلیل قدرت پیش‌بینی بسیار خوب، می‌تواند بسیاری از ویژگی‌های متنوع آرد دانه‌های غلات (گندم، جو، برنج، چاودار، چاودم و دانه‌های دیگر) را در زمان کوتاه و هزینه‌ی بسیار کم نشان دهد و به تنهایی و یا در کنار سایر روش‌های شناسایی، می‌تواند نقش بسیار مهمی را در تعیین کیفیت دانه و آرد غلات برای استفاده نهایی و تولید فرآورده‌های بهینه ایفا کند (Chavoshi et al., 2019). برجسته‌ترین پیوندها در گلوتن پیوندهای دی سولفید است که زیر واحدهای گلوتنین را به هم پیوند می‌دهد. از این رو، عوامل اکسید کننده و احیا کننده با تأثیرات زیاد بر سیستم تیول- دی سولفید خمیر می‌توانند بر میزان پلیمریزاسیون زیرواحدهای گلوتنین تأثیر بگذارند و در نتیجه خصوصیات مکانیکی و

زمان اختلاط می شود هر چند کاربرد مقادیر بالای سیستمین باعث افزایش تراکم خمیر خواهد شد. L- سیستمین همچنین می تواند در ترکیب با اکسیدان ها استفاده شود (Kweon et al., 2011). در یک مطالعه که با هدف بهبود کیفیت نان با افزودن اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید مالیک، اسید فوماریک و اسید سیتریک به ترکیبات آن انجام شد، اثرات اسیدهای آلی بر خصوصیات پخت نان، رفتار رئولوژیکی خمیر و مطالعه مکانیسم این تأثیرات مورد بررسی قرار گرفت. نان های دارای ۰/۱ درصد اسید استیک، ۰/۴ درصد اسید لاکتیک، ۰/۳ درصد اسید مالیک، ۰/۳ درصد اسید فوماریک و ۰/۳ درصد اسید سیتریک افزایش حجم ویژه و کاهش رطوبت، مقدار pH و سختی را در مقایسه با شاهد نشان دادند. رفتار رئولوژیکی نشان داد که اسیدهای آلی فعالیت مخمر را افزایش داده و به افزایش توانایی تولید گاز کمک می کند. با این حال، بر تضعیف شبکه گلوتن تأثیرگذار بود که منجر به کاهش توانایی نگهداری گاز شد. وجود اسیدهای آلی هیدرولیز پروتئین ها و نشاسته ها را در خمیرها آغاز کرد و منجر به افزایش SH، NH₂ آزاد و کاهش محتوای قند شد (Rasper et al., 1985).

این پژوهش به منظور ارزیابی اثر افزودن ترکیبات احیا کننده، ویتامین C و اسید سیتریک حین مشروط نمودن گندم و اثر آنها بر عملکرد خمیر حاصل از آن، انجام شد. با اینکه مشروط کردن از جمله کارهای روزمره ای است که بر روی گندم صورت می گیرد و مطالعات بسیاری بر روی اثر ویتامین C، اسید سیتریک و ترکیبات احیا کننده بر روی خمیر انجام شده است ولی تاکنون اثر افزودن این ترکیبات به خود گندم بررسی نشده و این ترکیبات فقط به آرد و خمیر حاصل از آن اضافه شده اند.

مواد و روش ها

چهار کیلوگرم گندم مورد استفاده در این مطالعه از نوع روشن و با مساعدت اداره کل جهاد کشاورزی استان خوزستان تهیه شد. سیستمین، ویتامین C و اسید سیتریک که به عنوان افزودنی حین مشروط نمودن گندم مورد استفاده قرار گرفتند، از شرکت سپاهان طب اصفهان تهیه شدند.

آزمون های فیزیکی شامل تعیین چگالی ویژه، هکتولتر، وزن هزار دانه، رطوبت دانه، درجه استحصال (بازده آرد)، سختی دانه، رنگ سنجی، برآورد طول و عرض و ضخامت دانه روی گندم انجام شد.

رئولوژیکی خمیر را تغییر دهند (Bloksma et al., 1998). اکسیدان های رایج برمات پتاسیم، اسید اسکوربیک و آزو دی کربن آمید، سورفاکتانت ها/ امولسیفایرها از جمله گلیسرول مونوستارت (GMS)، لاکتیلات سدیم استئاریل (SSL) و استرهای دی استیل تارتاریک مونوگلیسیریدها (DATEM) هستند. استفاده از این مواد افزودنی در فراورده های نانوائی به دلیل مزایایی که ارائه می دهد از جمله افزایش (بهبود) حجم، بافت، خرد کردن، ماندگاری و ویژگی های برش نان در سراسر دنیا در حال افزایش است. گزارش های متعددی در مورد تأثیر مواد افزودنی بر کیفیت خمیر و نان در دسترس است. مزایای افزودنی ها وقتی بیشتر است که آرد با کیفیت مطلوب در دسترس نباشد یا فراورده های نانوائی از آرد مرکب (آرد گندم همراه با آرد دیگری) تهیه شود، بیشتر است (Levine et al., 2004). اسید اسکوربیک به طور گسترده در صنعت نانوائی مورد استفاده قرار می گیرد و در برخی از کشورها، تنها ماده اکسیدکننده شیمیایی است که در تهیه نان و سایر فراورده های نانوائی استفاده می شود. این ماده طبیعی است که در میوه ها و سبزیجات یافت می شود و به عنوان ویتامین C شناخته می شود. با این حال، بیشتر اسید اسکوربیک مورد استفاده در فرآوری غذا و تولیدات ترکیب شده با گلوکز با استفاده از ترکیبی از تخمیر و روش های شیمیایی سنتز می شود. اسید اسکوربیک به خودی خود یک ماده احیا کننده است اما با حضور گاز اکسیژن و آنزیم- اسکوربیک اسید اکسیداز که به طور طبیعی در آرد گندم یافت می شود، اسید اسکوربیک به فرم دهیدرو تبدیل می شود (Sahi, 2014). اکسیداسیون اسید اسکوربیک به اسید دهیدرو اسکوربیک به سرعت انجام می شود و قبل از پایان مرحله ترکیب کامل شده است (Levine et al., 2004). به دلیل اثرات مثبت اسید اسکوربیک (AA) بر خواص خمیر است که به عنوان بهبود دهنده آرد از آن استفاده می شود (Hamed et al., 2015). برای تضعیف ساختار خمیر می توان از عوامل احیا کننده مانند L- سیستمین استفاده کرد (Kweon et al., 2011). L- سیستمین یک اسید آمینه طبیعی است که از ویژگی های عملکردی یک گروه SH آزاد در مولکول برخوردار است. این گروه به L- سیستمین اجازه می دهد تا پیوندهای دی سولفید بین پروتئین های تشکیل دهنده گلوتن را با واکنش های مبادله SH /SS شکسته و در نتیجه سیستمین پیوندهای دی سولفید بین پروتئین ها را احیا نموده و شبکه گلوتن خمیر را تضعیف کند که در نتیجه خمیر حاصل نرم تر و با خاصیت ویسکوالاستیک کمتر و قابلیت انعطاف پذیری بیشتر است (Sahi, 2014). به طور کلی، افزودن سیستمین منجر به افزایش جذب آب، کاهش زمان گسترش خمیر و کاهش ثبات خمیر، همچنین باعث کاهش اجزای الاستیک خمیر، کمک به استراحت خمیر و کاهش

چگالی ویژه

برای اندازه‌گیری چگالی ویژه دانه‌های گندم از روش پیکنومتر و تولون استفاده شد.

هکتولیتزر

وزن هکتولیتزر دانه‌های گندم با استفاده از دستگاه هکتولیتزر مدل روسی که دارای ظرف استوانه‌ای شکل به گنجایش یک لیتر است، اندازه‌گیری شد.

وزن هزار دانه

طبق روش ماروتی و همکاران (Mariotti et al., 2016) انجام شد. برای تعیین وزن هزار دانه از سینی مخصوص به نام دانه شمار پانصدتایی استفاده گردید. با دو بار استفاده از این سینی وزن هزار دانه بدست آمد.

رطوبت دانه

طبق روش مصوب AACC به شماره A ۴۴-۱۵ انجام شد.

درجه استحصال (بازده آرد)

درجه استحصال آرد بر اساس مقدار تولید آرد بر حسب گرم از مقدار مشخصی دانه محاسبه گردید.

سختی دانه

سختی دانه بر حسب یک دانه و یا بر حسب حجمی از دانه‌ها بیان می‌شود. در این روش با استفاده از دستگاه اینستران که مقاومت بافت را اندازه‌گیری می‌کند، سختی دانه‌ها به صورت انفرادی تعیین گردید. پس از تعیین ضخامت و عرض به وسیله کولیس، دانه در تکیه‌گاه مخصوص میز دستگاه قرار داده شد. منحنی بدست آمده، نیروی لازم برای برش را مشخص کرد و سختی دانه با فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{فاصله دو پایه تکیه‌گاه از یکدیگر (mm)} \times \text{نیروی وارد بر دانه (g)} \times 3 = \frac{\text{مقاومت تنش برشی (gr/mm}^2\text{)}}{2 \times (\text{مقاومت دانه (mm)}) \times \text{عرض دانه (mm)}}$$

رنگ‌سنجی

ویژگی‌های رنگی دانه‌های ارقام مختلف شامل سه بعد L^* (روشنی)، b^* (زردی-آبی) و a^* (قرمزی-سبزی) توسط دستگاه هانترلب تعیین شدند. این فضای رنگی از سه مولفه تشکیل شده است. L^* معادل روشنایی تصویر که بین صفر معادل مشکی و ۱۰۰ معادل انعکاس کامل نور است. مقادیر مولفه a^* نامحدود است و مقادیر مثبت

معادل رنگ قرمز و مقادیر منفی معادل رنگ سبز است. مقادیر b^* نامحدود است و مقادیر مثبت معادل رنگ زرد و مقادیر منفی معادل رنگ آبی است. در اکثر موارد در پژوهش‌های صنایع غذایی از فضای رنگی a^* ، b^* و L^* استفاده می‌شود (Jang et al., 2006).

برآورد طول و عرض و ضخامت دانه

اندازه‌گیری ابعاد دانه، طبق روش بایرام و همکاران (Bayram et al., 2004) توسط کولیس دیجیتالی انجام شد.

آزمون‌های رطوبت، pH، خاکستر، اندازه ذرات، چربی، پروتئین و عدد زلنی روی آرد حاصل از آسیاب گندم انجام شد.

رطوبت آرد

اندازه‌گیری درصد رطوبت طبق روش مصوب AACC به شماره ۴۴-۱۶ انجام شد.

pH آرد

با استفاده از روش مصوب ۳۷ استاندارد ملی ایران اندازه‌گیری شد.

خاکستر

اندازه‌گیری خاکستر طبق روش مصوب AACC به شماره ۰۱-۰۸ و ۳۲-۱۰ و با استفاده از بوتله چینی (کروزه) و کوره الکتریکی انجام شد.

اندازه ذرات

اندازه ذرات آرد (درصد) با استفاده از دستگاه الک شیکر و استاندارد ملی ایران به شماره ۷۳۱۰ اندازه‌گیری شد.

چربی

اندازه‌گیری درصد چربی با استفاده از روش AACC به شماره ۳۰-۲۵ انجام گرفت.

پروتئین

درصد پروتئین طبق روش AACC به شماره ۴۶-۱۲ انجام گرفت.

رسوب زلنی

با استفاده از روش AACC به شماره ۵۶-۶۱ و با کمی اصلاح به شرح ذیل انجام گرفت.

پس از مراحل فوق، از گندم پاک و توزین شده ابتدایی، ۱۳ نمونه ۲۴۰ گرمی به طور جداگانه توزین گردید و در بطری‌های پلاستیکی ریخته شد. یک نمونه فقط با ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر مشروط گردید و سایر ۱۲ نمونه به ترتیب با محلول‌های زیر مشروط شدند:

نتایج و بحث

آزمون‌های فیزیکی

ویژگی‌های فیزیکی گندم شامل: چگالی ویژه، رنگ سنجی، برآورد طول، عرض و ضخامت دانه، سختی دانه، هکتولیترا، وزن هزار دانه، رطوبت دانه، درجه استحصال (بازده آرد) برای گندم مورد آزمون (روشن) اندازه‌گیری شده و در **جداول ۱** و **۲** ارائه شده است.

آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی آرد گندم

نتایج آزمون‌های شیمیایی انجام شده بر روی آرد گندم (بدون مشروط کردن گندم و اضافه کردن افزودنی‌ها) در **جداول ۳** و **۴** ارائه شده است.

آزمون‌های شیمیایی روی نمونه‌های آرد گندم مشروط شده

گلوتن

نتایج حاصل از سنجش گلوتن مرطوب و گلوتن ایندکس در **جدول ۵** ارائه شده است. در نمونه آردی که گندم با آب مقطر مشروط شده بود مقدار گلوتن ۲۷/۲ درصد بود و افزودن ویتامین C در سطح ۱۰۰ ppm حین مشروط کردن گندم باعث افزایش این مقدار گلوتن به ۳۰/۳ درصد شد، ولی در سطوح بالاتر ویتامین C این مقدار اندکی کاهش یافت که می‌تواند به دلیل اثر احیاکنندگی این ویتامین در مقادیر زیاد باشد. همگام با این تغییرات گلوتن ایندکس نیز ابتدا با افزایش غلظت ویتامین C افزایش یافت و سپس در ادامه با افزایش مقادیر ویتامین C تا ۲۰۰ ppm کاهش یافت. از آنجایی که درصد گلوتن بیشتر به معنای آرد قوی‌تر می‌باشد، در واقع افزایش ویتامین C باعث تقویت خمیر شد. افزودن سیستین در سطح ۰/۲۵ درصد میزان گلوتن را کاهش داد و با بالا رفتن مقدار سیستین نیز درصد گلوتن باز هم اندکی کاهش یافت، یعنی سیستین باعث تضعیف خمیر شده است زیرا ماده‌ای بشدت احیاکننده است. این وضعیت را در مورد گلوتن ایندکس نمونه‌های مشروط شده با سیستین نیز می‌توان مشاهده نمود. در اثر افزودن اسید سیتریک مقدار گلوتن افزایش یافت. هر چند با افزایش بیشتر مقدار اسید سیتریک، میزان گلوتن کاهش یافت. افزودن همزمان ویتامین C و سیستین نشان داد که با افزایش سطح ویتامین C و سیستین مقدار گلوتن قابل اندازه‌گیری و از آن مهم تر گلوتن ایندکس افزایش یافت.

۱- محلول سیستین در سه سطح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد

وزنی-وزنی

۲- محلول اسید سیتریک در سه سطح ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ درصد

وزنی-وزنی

۳- محلول ویتامین C در سه سطح ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm

۴- محلول ۸۰ ppm ویتامین C و ۰/۱ درصد سیستین، محلول

۱۰۰ ppm ویتامین C و ۰/۲ درصد سیستین، محلول ۱۲۰ ppm

ویتامین C و ۰/۳ درصد سیستین (اضافه کردن همزمان به منظور افزایش تاثیر افزودنی‌ها صورت گرفت).

بعد از گذشت ۲۴ ساعت، نمونه گندم‌های مشروط شده، بوسیله آسیاب والسی آزمایشگاهی آسیاب شدند و سپس نمونه‌های آرد حاصله (با رطوبتی در حدود ۱۴/۵ درصد) برای آزمایشات بعدی که شامل: گلوتن، سولفیدریل- دی سولفید، گلوتاتینون و ظرفیت نگهداری حلال (SRC) بودند، در کیسه‌های پلاستیکی زیپ دار و در فریزر نگهداری شدند.

گلوتن

با استفاده از استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۳۹-۲ انجام شد.

سولفیدریل- دی سولفید

آزمایش طبق روش گوزمان و همکاران (*Guzman et al., 1974*) انجام شد.

گلوتاتینون

اندازه‌گیری کل مواد احیاء کننده طبق روش سوفیلد و چن (*Schofield and Chen, 1995*) انجام گردید.

ظرفیت نگهداری حلال (SRC)

ظرفیت نگهداری حلال (SRC) با استفاده از روش کوچک مقیاس طبق روش (*Guzman et al., 2015*) که با توجه به نسخه روش استاندارد SRC از AACC (روش ۱۱-۵۶، ۲۰۰۰) می‌باشد، تعیین شد.

آنالیز آماری

آنالیز واریانس اثر افزودن ترکیبات احیا کننده، ویتامین C و اسیدهای آلی حین مشروط نمودن گندم با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام شد. هر اندازه‌گیری حداقل در سه تکرار انجام و میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد و با حداقل تفاوت معنادار ^۱LSD مقایسه گردید.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی دانه

Table 1- Physical characteristics of seeds

آزمون (Test)	چگالی ویژه (Specific density)	سختی دانه (Hardness Index) (gr/mm^3)	وزن هکتولتر (Hectoliter weight) (kg)	وزن هزار دانه (TKW) (gr)	رطوبت (Moisture) (%)	درجه استحصال (Degree of extraction) (%)
میانگین (M)	1.2025	1811	79.5	35	8.08	73
انحراف معیار (Sd)	0.13	0.42	3.89	3.6	0.14	3.6

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکی دانه- رنگ و ابعاد

Table 2- Physical characteristics of seeds- Color and dimensions

آزمون (Test)	ضریب کروییت (Sphericity factor)	ابعاد دانه (mm) (Seed dimensions)			رنگ دانه (Seed color)		
		ضخامت (T)	عرض (W)	طول (L)	a*	b*	L*
میانگین (M)	0.57	2.47	3.1	6.38	10.81	25.03	53.8
انحراف معیار (Sd)	0.02	0.35	0.43	0.51	0.36	0.2	0.88

جدول ۳- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آرد گندم

Table 3- Physical and chemical characteristics of wheat flour

آزمون (Test)	عدد زلنی (ml) (Zeleny sedimentation)	پروتئین (%) (Pro)	چربی (%) (Fat)	خاکستر (%) (Ash)	pH	رطوبت (%) (Moisture)
میانگین (M)	21.93	13.1	0.56	1.1	6.16	8.9
انحراف معیار (Sd)	0.71	0.3	0.01	0.14	0.06	0.24

جدول ۴- ویژگی‌های فیزیکی آرد گندم- اندازه ذرات

Table 4- Physical characteristics of wheat flour- particle size

آزمون (Test)	اندازه ذرات به درصد (حداکثر) (Particle Size in percent (Maximum))				
	زیر الک 106 میکرون (Under the 106 micron sieve)	روی الک 106 میکرون (On a 106 micron sieve)	روی الک 125 میکرون (On a 125 micron sieve)	روی الک 180 میکرون (On a 180 micron sieve)	روی الک 425 میکرون (On a 425 micron sieve)
میانگین (M)	حداکثر 75 (Maximum 75)	حداکثر 20 (Maximum 20)	حداکثر 5 (Maximum 5)	—	—
انحراف معیار (Sd)	3.6	1.73	2.64	—	—

در مقایسه با شاهد کاهش یافت اما این کاهش معنی‌دار نبود ($P>0.05$)، حداکثر کاهش در عملکرد گلوتن مرطوب توسط گلوپتین ایجاد شد. درصد از دست دادن گلوتن مرطوب نیز تعیین شد، همه نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد داشتند. درصد از دست دادن گلوتن مرطوب با افزایش غلظت عوامل احیاکننده افزایش

سه عامل احیا کننده L-سیستئین هیدروکلراید، گلوپتین و پروتئاز در سطوح ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ ppm توسط کاتور و همکاران (Kaur et al., 2013). استفاده شد. اثرات عوامل احیاکننده بر بازیابی گلوتن و درصد کاهش گلوتن برای ارقام گندم PBW-343 و RAJ-3765 تعیین شد. با افزودن عوامل احیاکننده، بازیابی گلوتن مرطوب

یافت. بیشترین از دست دادن گلوتن مرطوب توسط گلوپروتین ایجاد شد. روند مشابهی در مورد عملکرد گلوتن خشک و درصد کاهش

جدول ۵- میزان گلوتن تر آرد گندم

Table 5- The gluten content of wheat flour

نوع آرد گندم (Type of wheat flour)	گلوتن ایندکس (Gluten index (%))	گلوتن تر (Wet gluten(%))
مشروط شده با آب مقطر (Conditioned with distilled water)	23 ±0.2 ^{fg}	27.2 ±0.3 ^{abcd}
مشروط شده با 100 ppm ویتامین C (Conditioned with vit C 100 ppm)	25.8 ±0.72 ^f	30.3 ±0.65 ^a
مشروط شده با 150 ppm ویتامین C (Conditioned with vit C 150 ppm)	22.9 ±0.36 ^{fg}	28.6 ±1.12 ^{ab}
مشروط شده با 200 ppm ویتامین C (Conditioned with vit C 200 ppm)	21.2 ±0.62 ^{gh}	27.5 ±0.87 ^{abcd}
مشروط شده با سیستئین 0.25 درصد (Conditioned with cys 0/25 %)	20.9 ±1.34 ^{gh}	25.8 ±0.62 ^{bcd}
مشروط شده با سیستئین 0.5 درصد (Conditioned with cys 0/5 %)	18.2 ±0.87 ^{gh}	25.1 ±0.65 ^{cd}
مشروط شده با سیستئین 0.75 درصد (Conditioned with cys 0/75 %)	14.2 ±1.04 ⁱ	24.5 ±0.62 ^d
مشروط شده با اسید سیتریک 0.3 درصد (Conditioned with citric acid 0/3 %)	48.1 ±0.5 ^{ab}	29.3 ±0.88 ^{ab}
مشروط شده با اسید سیتریک 0.4 درصد (Conditioned with citric acid 0/4 %)	44.4 ±0.55 ^{bc}	28.8 ±0.52 ^{abc}
مشروط شده با اسید سیتریک 0.5 درصد (Conditioned with citric acid 0/5 %)	40.2 ±1.04 ^d	28.1 ±0.45 ^{abcd}
مشروط شده با سیستئین 0.1 درصد و 80 ppm ویتامین C (Conditioned with cys 0/1 %+ vit C 80 ppm)	49.7 ±0.43 ^a	24.5 ±0.55 ^d
مشروط شده با سیستئین 0.2 درصد و 100 ppm ویتامین C (Conditioned with cys 0/2 %+ vit C 100 ppm)	43.4 ±0.6 ^{cd}	25.8 ±0.43 ^{bcd}
مشروط شده با سیستئین 0.3 درصد و 120 ppm ویتامین C (Conditioned with cys 0/3 %+ vit C 120 ppm)	35.5 ±1.08 ^e	27.6 ±0.65 ^{abcd}

* حروف مشترک نشانه عدم معنی داری و حروف غیر مشترک دلالت بر اختلاف معنی دار دارد.

*Common letters indicate lack of significance and non-common letters indicate meaningful differences.

*اعداد میانگین ± انحراف معیار می باشند.

*The number are mean ± standard deviation.

سولفیدریل- دی سولفید

نتایج حاصل از سنجش سولفیدریل و دی سولفید در جدول ۶ ارائه شده است. بر این اساس با افزایش مقدار ویتامین C بر تعداد پیوندهای دی سولفید افزوده شد هر چند این روند بصورت خطی خود را نشان نداد که می تواند بدلیل محدودیت تعداد گروه های سولفیدریل با آرایش فضایی مناسب جهت اکسید شدن باشد. بر همین اساس بشکلی معنی دار از تعداد گروه های سولفیدریل کاسته شد هر چند به صفر نرسید. با افزودن سیستئین احیا کننده عکس حالت فوق پدیدار شد به گونه ای که همگام با کاهش تعداد پیوندها و پل های دی سولفیدی، بر تعداد گروه های تیول افزوده شد. افزودن اسید آلی تاثیر

معنی داری بر هر دو پارامتر نداشت و نشان داد که عملکرد این دو بصورت مجزا از هم بوده است. با افزودن هر دو ترکیب احیا و اکسیدکننده مشخص گردید که اثر اکسیدکنندگی ویتامین C بمراتب بیشتر از تاثیر احیا کنندگی سیستئین بود که این امر می تواند بدلیل آن باشد که آنزیم های اکسیداز خود بطور مستقیم بر سیستئین بی اثرند و تنها در حضور دی هیدرواسکوربیک اسید است که امکان تشکیل پل های دی سولفیدی فراهم می شود. این وضعیت تا حدی است که تعداد پل های دی سولفیدی بدنبال افزودن همزمان هر دو پارامتر، به میزان پل ها در آرد اولیه نزدیک شود (Belitz et al., 1986).

جدول ۶- میزان سولفیدریل و دی سولفید
Table 6- Amount of sulfhydryl and disulfide

نوع آرد گندم (Type of wheat flour)	میزان دی سولفید (Amount of disulfide (mmol/g))	میزان سولفیدریل (Amount of sulfhydryl (mmol/g))
مشروط شده با آب مقطر (Conditioned with distilled water)	12.25 ± 1.03 ^b	0.54 ± 0.05 ^{cd}
مشروط شده با 100 ppm ویتامین C (Conditioned with vit C 100 ppm)	13.44 ± 0.87 ^a	0.31 ± 0.05 ^{fe}
مشروط شده با 150 ppm ویتامین C (Conditioned with vit C 150 ppm)	13.26 ± 0.91 ^{ab}	0.26 ± 0.07 ^f
مشروط شده با 200 ppm ویتامین C (Conditioned with vit C 200 ppm)	13.28 ± 1.11 ^{ab}	0.15 ± 0.02 ^f
مشروط شده با سیستین 0.25 درصد (Conditioned with cys 0/25 %)	8.74 ± 0.61 ^c	0.66 ± 0.04 ^c
مشروط شده با سیستین 0.5 درصد (Conditioned with cys 0/5 %)	6.11 ± 0.47 ^d	0.88 ± 0.08 ^b
مشروط شده با سیستین 0.75 درصد (Conditioned with cys 0/75 %)	3.76 ± 0.55 ^e	1.38 ± 0.06 ^a
مشروط شده با اسید سیتریک 0.3 درصد (Conditioned with citric acid 0/3 %)	12.12 ± 0.49 ^b	0.59 ± 0.04 ^{cd}
مشروط شده با اسید سیتریک 0.4 درصد (Conditioned with citric acid 0/4 %)	11.98 ± 0.98 ^b	0.49 ± 0.02 ^{cd}
مشروط شده با اسید سیتریک 0.5 درصد (Conditioned with citric acid 0/5 %)	12.67 ± 0.67 ^{ab}	0.51 ± 0.03 ^{cd}
مشروط شده با سیستین 0.1 درصد و 80 ppm ویتامین C (Conditioned with cys 0/1 %+ vit C 80 ppm)	12.87 ± 0.39 ^{ab}	0.44 ± 0.04 ^{de}
مشروط شده با سیستین 0.2 درصد و 100 ppm ویتامین C (Conditioned with cys 0/2 %+ vit C 100 ppm)	13.41 ± 0.76 ^a	0.49 ± 0.03 ^{cd}
مشروط شده با سیستین 0.3 درصد و 120 ppm ویتامین C (Conditioned with cys 0/3 %+ vit C 120 ppm)	13.89 ± 0.47 ^a	0.61 ± 0.02 ^{cd}

* حروف مشترک نشانه عدم معنی داری و حروف غیر مشترک دلالت بر اختلاف معنی دار دارد.

*Common letters indicate lack of significance and non-common letters indicate meaningful differences.

*اعداد میانگین ± انحراف معیار می باشند.

*The number are mean ± standard deviation.

گلوپاتیون

نتایج بدست آمده برای میزان گلوپاتیون در جدول ۷ ارائه شده است. براساس این نتایج میزان گلوپاتیون نمونه آردی که گندم آن با آب مقطر مشروط شده ۰/۹ بوده است و برای نمونه مشروط شده با سیستین این مقدار به ۱/۲۶ افزایش یافته است. یعنی سیستین توانسته حالت احیا در آرد حاصل را بیشتر کند و درواقع تعداد بیشتری گروههای سولفیدریل تامین کند و درنتیجه باعث تضعیف خمیر شده است. برای نمونه مشروط شده با ویتامین C مقدار گلوپاتیون به ۰/۵۷ کاهش یافته است و اثر احیاکنندگی آن نیز کاسته شده است و در نتیجه باعث تقویت خمیر شده است، ویتامین C شدت اثر گلوپاتیون را تا بیش از ۳۰ درصد کاهش داده است و اگر بصورت مستقیم به آرد

اضافه می شد تاثیر بیشتری داشت، بنابراین اگر در مرحله مشروط کردن مورد استفاده قرار گیرد امکان افزودن آن تا ۵۰۰ میلی گرم وجود دارد. در مورد نمونه مشروط شده با اسید سیتریک نیز به دلیل اینکه میزان گلوپاتیون تقریباً با نمونه مشروط شده با آب مقطر برابر بود، درنتیجه بی اثر بوده است. ذکر این نکته ضروری است که در آرد کامل گلوپاتیون بشکل دست نخورده در آرد باقی می ماند و یکی از دلایل کاهش حجم نان حاصل از آرد کامل یک وارسته در مقایسه با نان تهیه شده از همان آرد اما سبوس گرفته، وجود همین گلوپاتیون است. بنابراین استفاده از مواد افزودنی بویژه ویتامین C قبل از فرایند آسیاب باعث می شود تا در صورت تهیه آرد کامل، مشکل کاهش حجم نان کمتر دیده شود. کاتور و همکاران (Kaur et al., 2013) تاثیر عوامل احیاکننده بر ویژگی های کیفی خمیر و کلوچه را نیز

داشتند ($P < 0.05$). با افزایش غلظت عوامل احیا کننده، کشش پذیری خمیر افزایش یافت.

ظرفیت نگهداری حلال (SRC)

نتایج مقایسه میانگین SRC در حلال های متفاوت در جدول ۸ آمده است و نمودار مربوط به هر حلال نیز در شکل های ۱ تا ۴ ارائه شده است که محور عمودی هر نمودار نتایج مقدار SRC بدست آمده (واحد درصد) و محور افقی نوع تیمار انجام شده است.

بررسی کردند. با افزودن عوامل احیا کننده، مقاومت به کشش در مقایسه با شاهد کاهش یافت و کاهش معناداری داشت ($P < 0.05$). با افزایش غلظت عوامل احیا کننده، مقاومت به کشش پذیری نیز کاهش یافت، حداکثر کاهش مقاومت در برابر کشش توسط گلو تاتیون در مقایسه با L-سیستین و پروتئاز ایجاد شد. قابلیت کشش خمیر نیز با استفاده از اکستنسوگراف برای بررسی اثر عوامل احیا کننده تعیین شد. همه نمونه ها از نظر کشش پذیری خمیر تفاوت معنی داری با شاهد

جدول ۷- میزان گلو تاتیون آرد گندم

Table 7- The amount of glutathione in wheat flour

نوع آرد گندم (Type of wheat flour)	میزان گلو تاتیون (Amount of glutathione)
مشروط شده با آب مقطر (Conditioned with distilled water)	0.9 ± 0.04^c
مشروط شده با 100 ppm ویتامین C (Conditioned with vit C 100 ppm)	0.71 ± 0.03^c
مشروط شده با 150 ppm ویتامین C (Conditioned with vit C 150 ppm)	0.57 ± 0.04^a
مشروط شده با 200 ppm ویتامین C (Conditioned with vit C 200 ppm)	0.46 ± 0.07^a
مشروط شده با سیستین 0.25 درصد (Conditioned with cys 0/25 %)	1.02 ± 0.08^c
مشروط شده با سیستین 0.5 درصد (Conditioned with cys 0/5 %)	1.26 ± 0.07^b
مشروط شده با سیستین 0.75 درصد (Conditioned with cys 0/75 %)	1.43 ± 0.05^a
مشروط شده با اسید سیتریک 0.3 درصد (Conditioned with citric acid 0/3 %)	0.93 ± 0.03^c
مشروط شده با اسید سیتریک 0.4 درصد (Conditioned with citric acid 0/4 %)	0.85 ± 0.07^c
مشروط شده با اسید سیتریک 0.5 درصد (Conditioned with citric acid 0/5 %)	0.89 ± 0.04^c
مشروط شده با سیستین 0.1 درصد و 80 ppm ویتامین C (Conditioned with cys 0/1 %+ vit C 80 ppm)	0.75 ± 0.05^b
مشروط شده با سیستین 0.2 درصد و 100 ppm ویتامین C (Conditioned with cys 0/2 %+ vit C 100 ppm)	0.69 ± 0.04^b
مشروط شده با سیستین 0.3 درصد و 120 ppm ویتامین C (Conditioned with cys 0/3 %+ vit C 120 ppm)	0.61 ± 0.08^a

* حروف مشترک نشانه عدم معنی داری و حروف غیر مشترک دلالت بر اختلاف معنی دار دارد.

*Common letters indicate lack of significance and non-common letters indicate meaningful differences.

*اعداد میانگین $\pm$ انحراف معیار می باشند.

*The number are mean $\pm$ standard deviation.

جدول ۸- نتایج مقایسه میانگین درصد ظرفیت نگهداری حلال در حلال های متفاوت آب، ساکارز ۵۰ درصد، سدیم کربنات ۵ درصد و اسید لاکتیک ۵ درصد و تیمارهای متفاوت ویتامین C، سیستئین و اسید سیتریک

Table 8- The comparison results of the average percentage of solvent retention capacity in different solvents of water, sucrose 50%, sodium carbonate 5% and lactic acid 5% and different treatments of vitamin C, cysteine and citric acid

تیمار (Treatment)	آب دیونیزه (Distilled water)	ساکارز 50 درصد (Sucrose 50 %)	سدیم کربنات 5 درصد (Sodium carbonate 5%)	لاکتیک اسید 5 درصد (Lactic acid 5%)
مشروط شده (با آب مقطر) (Conditioned with distilled water)	±0.45 82.79	114.29 ±4.11	98.84 ±2.70	108.13 ±3.70
ویتامین C (100 ppm) (vit C 100 ppm)	±0.65 85.94	112.42 ±3.77	99.51 ±4.42	104.87 ±5.25
ویتامین C (200 ppm) (vit C 200 ppm)	±5.59 77.14	124.22 ±3.75	92.50 ±4.37	101.30 ±3.44
سیستئین 0.25 % (cys 0/25 %)	±2.31 77.14	122.11 ±8.90	92.66 ±2.17	97.64 ±4.20
سیستئین 0.5 % (cys 0/5 %)	±1.06 79.37	122.17 ±5.78	96.99 ±0.62	103.18 ±1.30
سیستئین 0.75 % (cys 0/75 %)	±4.26 80.50	123.64 ±3.60	95.67 ±0.61	99.16 ±1.38
اسید سیتریک 0.4 درصد (citric acid 0/4 %)	±3.34 83.96	116.04 ±0.24	99.47 ±2.97	107.91 ±1.74
اسید سیتریک 0.5 درصد (citric acid 0/5 %)	±2.15 74.26	126.80 ±1.78	91.36 ±2.03	106.06 ±1.98
اسید سیتریک 0.3 درصد (citric acid 0/3 %)	±0.31 80.24	118.12 ±1.88	96.71 ±2.98	108.99 ±0.29
سیستئین 0.1 + ویتامین C (80 ppm) (cys 0/1 %+ vit C 80 ppm)	±3.79 76.65	117.29 ±13.75	91.08 ±2.17	101.95 ±1.76
سیستئین 0.2 + ویتامین C (100 ppm) (cys 0/2 %+ vit C 100 ppm)	±2.72 84.10	122.28 ±8.64	101.27 ±3.19	±1.01 107.93
سیستئین 0.3 + ویتامین C (120 ppm) (cys 0/3 %+ vit C 120 ppm)	±1.83 80.27	124.00 ±6.34	98.19 ±2.77	107.61 ±5.62
LSD 5%	3.51	3.41	4.92	5.48

*اعداد میانگین ± انحراف معیار می باشند.

*The number are mean ± standard deviation.

*معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

*Significant at level of 5%

مورد انتظار است و بدین صورت است که افزودن ویتامین C (اکسید کننده) و افزودن همزمان ویتامین C و سیستئین باعث تقویت خمیر، افزودن سیستئین (احیا کننده) باعث تضعیف خمیر و افزودن اسید سیتریک ابتدا باعث تقویت خمیر و افزایش سطح آن باعث تضعیف خمیر شده است، مقایسه گردید.

نتایج تجزیه واریانس دلالت بر واکنش متفاوت تیمارها در زمینه حلال اب بود. مقدار SRC در حلال اب در نتیجه استفاده از تیمار ویتامین C با غلظت ۲۰۰ ppm بیشترین مقدار (۸۵/۹۴) و در تیمار اسید سیتریک ۰/۵ درصد کمترین مقدار را نشان داد. نتایج بدست آمده از میانگین ۳ تکرار آزمون SRC با حلال های مختلف با نتایجی که از اثرات مواد افزودنی حین مشروط کردن گندم

جدول ۹- تجزیه واریانس نتایج درصد ظرفیت نگهداری حلال در حلال های متفاوت آب، ساکارز ۵۰ درصد، سدیم کربنات ۵ درصد و لاکتیک اسید ۵ درصد و تیمارهای متفاوت ویتامین C، سیستئین و اسید سیتریک

Table 9- Variance analysis of the results of the percentage of solvent holding capacity in different solvents of water, sucrose 50%, sodium carbonate 5% and lactic acid 5% and different treatments of vitamin C, cysteine and citric acid

میانگین مربعات (Mean of squares)					
	درجه آزادی (Df)	آب دیونیزه (Distilled water)	ساکارز ۵۰ درصد (Sucrose 50 %)	سدیم کربنات ۵ درصد (Sodium carbonate 5%)	لاکتیک اسید ۵ درصد (Lactic acid 5%)
تکرار (Repetition)	2	50.09**	8.82**	2.81**	1.57**
تیمار (Treatment)	11	** 37.24	ns 59.42	ns 36.91	ns 44.45
خطا (Error)	22	4.30	4.06	8.45	10.49

*معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

*Significant at level of 5%

ظرفیت نگهداری حلال (SRC) با حلال ساکارز ۵۰ درصد برای نمونه مشروط شده با آب مقطر درصد SRC برابر ۱۱۴/۲۹ و برای سیستئین در ۳ سطح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد به ترتیب ۱۲۲/۱۱، ۱۲۲/۱۷ و ۱۲۳/۶۴ بود که با اثر احیا و تضعیف سیستئین و نتایج آزمون گلوتن مطابق نبود. درصد SRC برای نمونه مشروط شده با ویتامین C ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm به ترتیب ۱۱۲/۴۲ و ۱۲۴/۲۲ بود که با نتایج آزمون گلوتن و اثر تقویت ویتامین C در سطح ۲۰۰ ppm مطابقت داشت و درصد SRC آن به طور معناداری بالاتر بود ولی در سطح ۱۰۰ ppm مطابقت نداشت و با توجه به اینکه تفاوت معناداری با نمودار نمونه مشروط شده با آب مقطر نداشت تقریباً بی اثر بود (شکل ۲). درصد SRC افزودن همزمان سیستئین ۱۰۰/۱ و ویتامین C ۸۰ ppm برابر ۱۱۷/۲۹، سیستئین ۱۰۰/۲ و ویتامین C ۱۰۰ ppm برابر ۱۲۲/۲۸ و سیستئین ۱۰۰/۳ و ویتامین C ۱۲۰ ppm برابر ۱۲۴/۰۰ بوده است و با نتایج آزمون گلوتن در هر سه سطح مطابق بود و اثر تقویت بر روی خمیر داشت و پنتوزان بیشتر توانست حلال ساکارز بیشتری را در خود نگهداری کند و به دام ببندد. درصد SRC اسید سیتریک در سه سطح ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ درصد به ترتیب ۱۱۸/۱۲، ۱۱۶/۰۴ و ۱۲۶/۸۰ بوده است و در دو سطح ۰/۳ و ۰/۴ درصد با آزمون گلوتن مطابقت داشت ولی در سطح ۰/۵ درصد باعث تقویت خمیر شد و آزمون SRC نتیجه مورد انتظار که افزایش سطح اسید سیتریک باعث تضعیف خمیر می گردد را نشان نداد.

ظرفیت نگهداری حلال (SRC) با حلال کربنات سدیم ۵ درصد برای نمونه مشروط شده با آب مقطر درصد SRC برابر ۹۸/۸۴ و برای سیستئین در ۳ سطح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد به ترتیب ۹۲/۶۶، ۹۶/۹۹ و ۹۵/۶۷ بوده است که با نتایج آزمون گلوتن و اثر احیاکنندگی سیستئین مطابق بود و تا حدی باعث تضعیف خمیر شد. درصد SRC

در مورد ظرفیت نگهداری حلال (SRC) با حلال آب دیونیزه برای نمونه مشروط شده با آب مقطر درصد SRC برابر ۸۲/۷۹ و برای سیستئین در ۳ سطح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد به ترتیب ۷۷/۱۴، ۷۹/۳۷ و ۸۰/۵۰ بوده است، در مورد آزمون گلوتن نیز نمونه مشروط شده با آب مقطر در مقایسه با نمونه های مشروط شده با سیستئین درصد گلوتن بالاتری داشت و آرد قوی تری بود. درصد SRC برای نمونه مشروط شده با ویتامین C ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm به ترتیب ۸۵/۹۴ و ۷۷/۱۴ بوده است که در سطح ۱۰۰ ppm از نمونه مشروط شده با آب مقطر بالاتر بود و با نتایج آزمون گلوتن نیز مطابقت داشت ولی در سطح ۲۰۰ ppm آزمون SRC نتوانست اثر تقویت کنندگی ویتامین C بر روی خمیر را نشان دهد. درصد SRC افزودن همزمان سیستئین ۱۰۰/۱ و ویتامین C ۸۰ ppm برابر ۷۶/۶۵، سیستئین ۱۰۰/۲ و ویتامین C ۱۰۰ ppm برابر ۸۴/۱۰ و سیستئین ۱۰۰/۳ و ویتامین C ۱۲۰ ppm برابر ۸۰/۲۷ بوده است و با نتایج آزمون گلوتن در دو سطح سیستئین ۱۰۰/۱ و ویتامین C ۸۰ ppm و سیستئین ۱۰۰/۲ و ویتامین C ۱۰۰ ppm مطابق بود یعنی باعث تقویت خمیر شد ولی در سطح سیستئین ۱۰۰/۳ و ویتامین C ۱۲۰ ppm چنین نبود و بر روی نمودار با نمونه مشروط شده با آب مقطر تفاوت معناداری نداشت (شکل ۳-۱). درصد SRC اسید سیتریک در سه سطح ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ درصد به ترتیب ۸۰/۲۴، ۸۳/۹۶ و ۷۴/۲۶ بوده است و در مقایسه با نمونه مشروط شده با آب مقطر ابتدا باعث تقویت خمیر شد ولی با افزایش سطح آن باعث تضعیف خمیر گردید که در مورد آزمون گلوتن نیز چنین بود، از آنجایی که طبق نمودار اسید سیتریک در ۲ سطح ۰/۳ و ۰/۴ درصد با نمونه مشروط شده با آب مقطر تفاوت معناداری نداشت (شکل ۱) و نتایج آزمون گلوتهایون هم نشان داد اسید سیتریک نسبتاً بی تاثیر بوده است پس نتایج با آزمون مذکور هم مطابق بود.

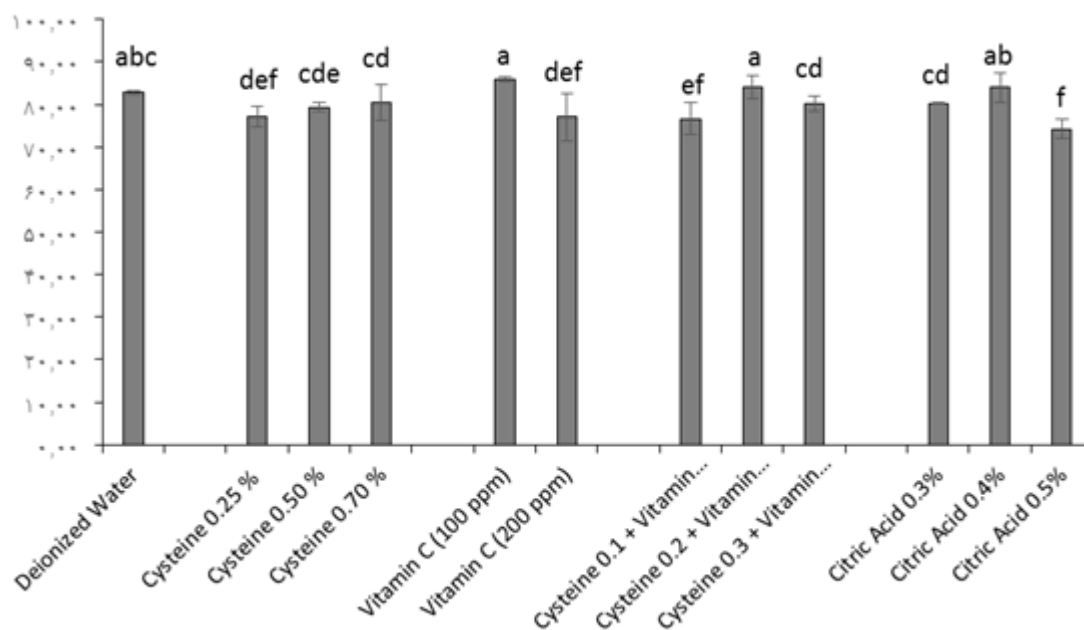
اسید سیتریک در سه سطح ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ درصد به ترتیب ۱۰۸/۹۹، ۱۰۷/۹۱ و ۱۰۶/۰۶ بود که نشان داد ابتدا در حد خیلی کم باعث تقویت و در سطوح بالاتر موجب تضعیف خمیر شده است که با آزمون گلوتن و همچنین با آزمون گلوپاتین و بی اثر بودن اسید سیتریک هم مطابقت داشت.

نتایج ظرفیت نگهداری حلال معمول برای مخلوط کردن آرد مورد نیاز برای افزایش حجم نان در گندم قرمز سخت بهاره (HRS) کانادا توسط وون و همکاران (Kweon et al., 2011) گزارش شده است، نتایج آنها نشان داد که ظرفیت نگهداری حلال آب مقطر (۷۳ درصد)، اسید لاکتیک (۱۴۸ درصد)، کربنات سدیم (۹۱ درصد) و ساکارز (۱۱۵ درصد) بود.

دایوجونک و همکاران (Duyvejonck et al., 2012)، مقادیر SRC برای ارزیابی کیفیت کوکی و نان نوزده نوع آرد تجاری اروپایی را بررسی و ارزش پیش‌بینی آنها را با برخی از پارامترهای کیفیت آرد معمولی، مقایسه کردند. تست‌های SRC برای ارزیابی کیفیت کوکی آرد گندم اروپایی مناسب بودند و آزمایش‌های جایگزین ارزشمندی برای روش‌های رایج کاربردی مانند روش‌های میکسوگراف، فارینوگراف و آلوئوگراف بودند. SRC آب و تا حدودی مقادیر SRC سدیم کربنات و ساکارز، تست‌های خوبی برای ارزیابی قطر کوکی‌ها از آرد گندم اروپایی بودند. به میزان کمتری، آزمایش‌های SRC توانستند برای ارزیابی کیفیت نان خمیر آرد گندم اروپایی مفید باشند. آزمایش SRC اسید لاکتیک توانست حجم نان را ارزیابی کند، به خصوص زمانی که مقدار SRC اسید لاکتیک به دست آمده برای سهم پلیمرهای غیر گلوپاتین با تقسیم مقدار SRC اسید لاکتیک بر مجموع مقادیر SRC سدیم کربنات و ساکارز تصحیح شود. همچنین، مقدار SRC آب توانست پیش‌بینی خوبی برای کیفیت نان داشته باشد، زیرا حجم نان معمولاً زمانی افزایش می‌یابد که درصد آب لازم برای تولید خمیر با قوام مطلوب پس از اختلاط افزایش یابد. یک مزیت کلی تست‌های SRC این است که بسیار در دسترس هستند و زمان زیادی نمی‌برند. علاوه بر این، آن‌ها برای افشای اطلاعات در مورد سهم ترکیبات مختلف در کیفیت آرد، به نیروی کار ماهر نیاز ندارند. همچنین، برای ارزیابی کافی کیفیت آرد برای یک محصول نهایی خاص، همیشه نیازی به تعیین کل مشخصات SRC نیست.

برای نمونه مشروط شده با ویتامین C ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm به ترتیب ۹۹/۵۱ و ۹۲/۵۰ بوده است که در سطح ۱۰۰ ppm با نمودار مشروط شده با آب مقطر تفاوت معناداری نداشت و بی اثر بود (شکل ۳) و در سطح ۲۰۰ ppm نیز با اثر تقویت‌کنندگی ویتامین C مطابق نبود و آزمون SRC نتوانست نشان دهد که نشاسته آسیب دیده بیشتر، حلال سدیم کربنات بیشتری را در خود نگه داشته است. درصد SRC افزودن همزمان سیستمین ۰/۱+ و ویتامین C ۸۰ ppm برابر ۹۱/۰۸، سیستمین ۰/۲+ و ویتامین C ۱۰۰ ppm برابر ۱۰۱/۲۷ و سیستمین ۰/۳+ و ویتامین C ۱۲۰ ppm برابر ۹۸/۱۹ بود و با نتایج آزمون گلوتن در دو سطح سیستمین ۰/۱+ و ویتامین C ۸۰ ppm و سیستمین ۰/۲+ و ویتامین C ۱۰۰ ppm تقریباً مطابق بود ولی در سطح سیستمین ۰/۳+ و ویتامین C ۱۲۰ ppm با نمودار نمونه مشروط شده با آب مقطر تفاوت معناداری نداشت و بی اثر بود (شکل ۳). درصد SRC اسید سیتریک در سه سطح ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ درصد به ترتیب ۹۶/۷۱، ۹۶/۴۷ و ۹۹/۴۷ بود که نسبتاً با آزمون گلوتن مطابقت داشت و نشان داد اسید سیتریک ابتدا اثر تقویت داشت و در سطح بالا باعث تضعیف خمیر شده است.

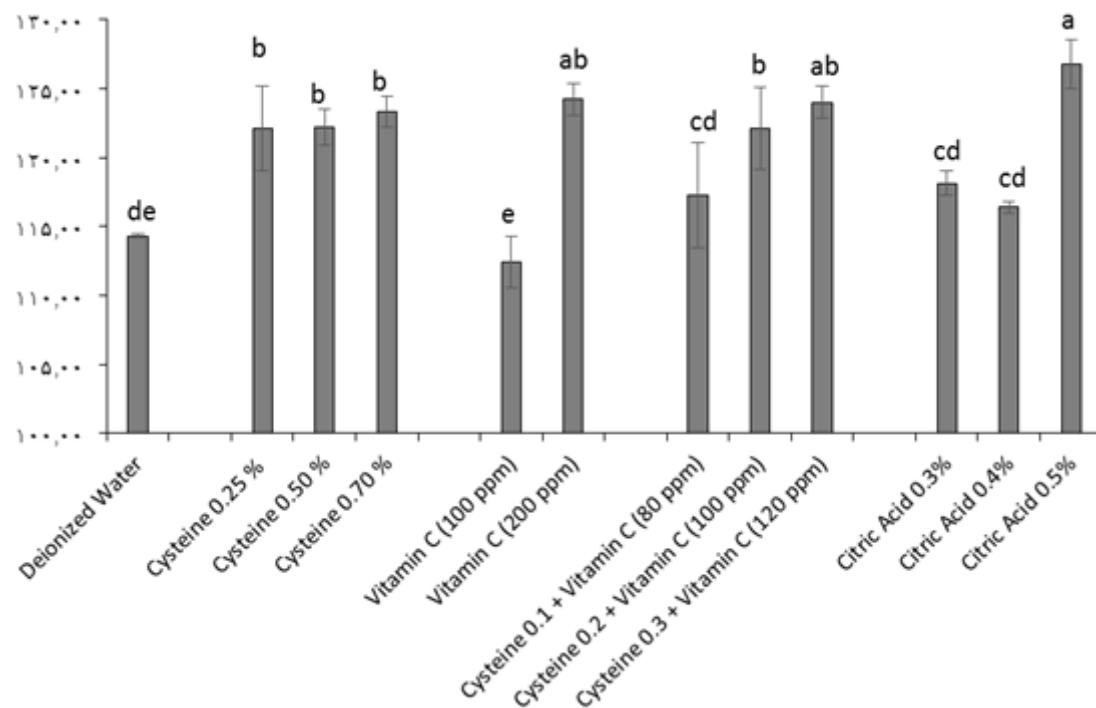
ظرفیت نگهداری حلال (SRC) با حلال اسید لاکتیک ۵ درصد برای نمونه مشروط شده با آب مقطر درصد SRC برابر ۱۰۸/۱۳ و برای سیستمین در ۳ سطح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد به ترتیب ۹۷/۶۴، ۱۰۳/۱۸ و ۹۹/۱۶ بوده است که با نتایج آزمون گلوتن و اثر احیاکنندگی سیستمین مطابقت داشت و خمیر تضعیف شد. درصد SRC برای نمونه مشروط شده با ویتامین C ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm به ترتیب ۱۰۴/۸۷ و ۱۰۱/۳۰ بود که با نتایج آزمون گلوتن و اکسیدکنندگی و تقویت ویتامین C مطابقت نداشت. درصد SRC افزودن همزمان سیستمین ۰/۱+ و ویتامین C ۸۰ ppm برابر ۱۰۱/۹۵، سیستمین ۰/۲+ و ویتامین C ۱۰۰ ppm برابر ۱۰۷/۹۳ و سیستمین ۰/۳+ و ویتامین C ۱۲۰ ppm برابر ۱۰۷/۶۱ بوده است و با نتایج آزمون گلوتن مطابق نبود و در دو سطح سیستمین ۰/۲+ و ویتامین C ۱۰۰ ppm و سیستمین ۰/۳+ و ویتامین C ۱۲۰ ppm تفاوت معناداری با نمونه مشروط شده با آب مقطر نداشت و بی اثر بود (شکل ۴)، در واقع آزمون SRC نتوانست در دو مورد افزودن ویتامین C و افزودن همزمان سیستمین و ویتامین C نشان دهد که گلوتن بیشتر توانسته حلال اسید لاکتیک بیشتری را در خود نگهداری کند. درصد SRC



شکل ۱- مقدار درصد ظرفیت نگهداری حلال در حلال آب دیونیزه و در تیمارهای متفاوت ویتامین C، سیستئین و اسید سیتریک
Fig. 1- The percentage of solvent storage capacity in deionized water solvent and in different treatments of vitamin C, cysteine and citric acid

* حروف مشترک نشانه عدم معنی داری و حروف غیر مشترک دلالت بر اختلاف معنی دار دارد.

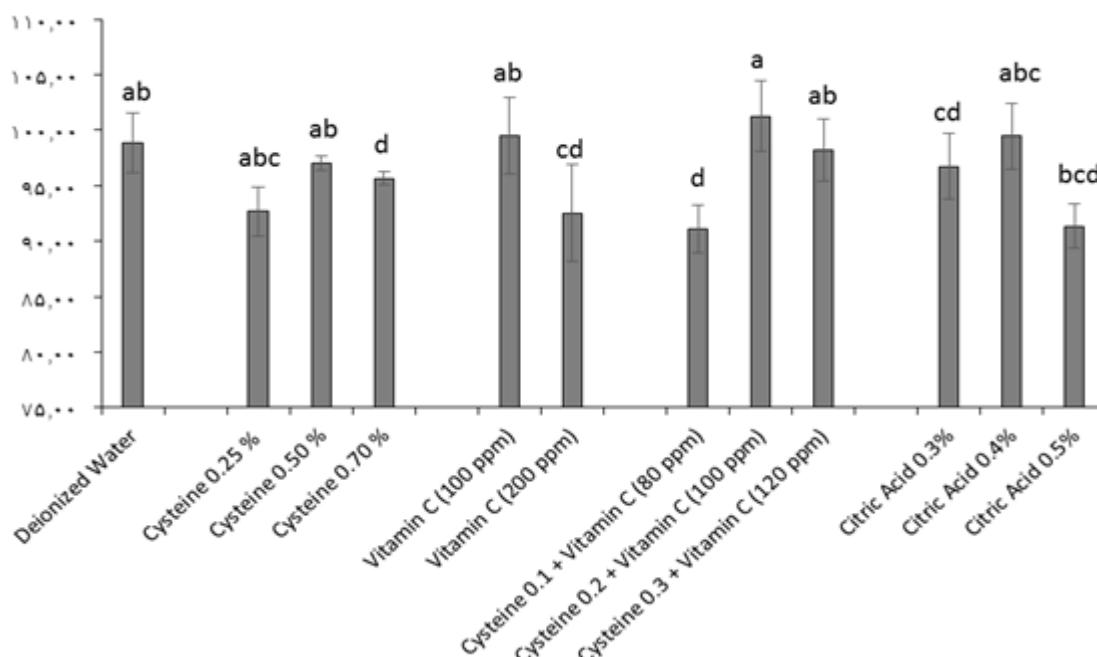
Common letters indicate lack of significance and non-common letters indicate meaningful differences.*



شکل ۲- مقدار درصد ظرفیت نگهداری حلال در حلال ساکارز ۵۰ درصد و در تیمارهای متفاوت ویتامین C، سیستئین و اسید سیتریک
Fig. 2- The percentage of solvent storage capacity in sucrose 50% solvent and in different treatments of vitamin C, cysteine and citric acid

* حروف مشترک نشانه عدم معنی داری و حروف غیر مشترک دلالت بر اختلاف معنی دار دارد.

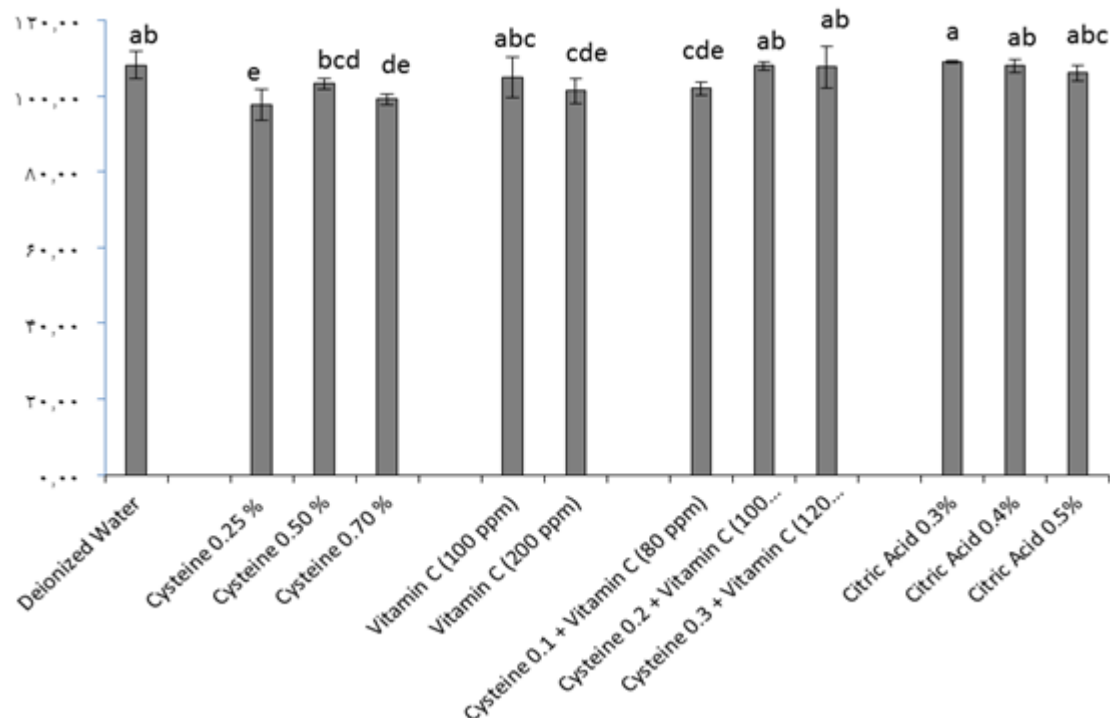
Common letters indicate lack of significance and non-common letters indicate meaningful differences.*



شکل ۳- مقدار درصد ظرفیت نگهداری حلال در حلال سدیم کربنات ۵ درصد و در تیمارهای متفاوت ویتامین C، سیستئین و اسید سیتریک
Fig. 3- The percentage of solvent storage capacity in sodium carbonate 5% solvent and in different treatments of vitamin C, cysteine and citric acid

* حروف مشترک نشانه عدم معنی داری و حروف غیر مشترک دلالت بر اختلاف معنی دار دارد.

* Common letters indicate lack of significance and non-common letters indicate meaningful differences.*



شکل ۴- مقدار درصد ظرفیت نگهداری حلال در حلال لاکتیک اسید ۵ درصد و در تیمارهای متفاوت ویتامین C، سیستئین و اسید سیتریک
Fig. 4- The percentage of solvent storage capacity in lactic acid 5% solvent and in different treatments of vitamin C, cysteine and citric acid

* حروف مشترک نشانه عدم معنی داری و حروف غیر مشترک دلالت بر اختلاف معنی دار دارد.

* Common letters indicate lack of significance and non-common letters indicate meaningful differences.*

نتیجه گیری

طبق آزمون‌های انجام شده در این پژوهش نتایج به این صورت بود که بر اساس آزمون وزن هزار دانه گندم روشن را می‌توان در دسته گندم‌های با کیفیت خوب قرار داد. مقدار متوسط وزن هکتولتر ۶۸ تا ۸۴ کیلوگرم و نتیجه آزمون وزن هکتولتر گندم روشن در محدوده متوسط قرار داشت. رطوبت گندم با توجه به حداقل و حداکثر مقدار رطوبت گندم در محدوده قابل قبول بود و نتیجه آزمون رنگ‌سنجی نشان داد که گندم روشن درصد بیشتری روشنایی (سفیدی) داشت، سپس درصد زردی و قرمزی آن به ترتیب کمتر بودند. بر اساس آزمون اندازه‌گیری ابعاد دانه، گندم روشن در دسته دانه‌های بلند قرار داشت. مقدار pH آرد گندم روشن و درصد خاکستر در محدوده مناسب قرار داشت. نتایج حاصل از آزمون اندازه ذرات آرد در این بررسی نشان داد که بیشتر ذرات دارای اندازه ریز بودند. با توجه به عدد زلنی بدست آمده و این که محدوده عدد زلنی گندم متوسط ۲۰ تا ۳۰ میلی‌متر است، نوع گندم مورد مطالعه متوسط بود. آزمون‌های گلوتن، گلوتاتین، سولفیدریل - دی سولفید و ظرفیت نگهداری حلال روی نمونه آردهای گندم مشروط شده با مواد افزودنی صورت گرفت، بر اساس بررسی نتایج مطالعات و تحقیقات پیشین

انتظار می‌رفت ویتامین C اکسید کننده بوده و موجب تقویت خمیر گردد ولی سیستمین احیا کننده بوده و خمیر را تضعیف کرد، اسید سیتریک باعث تقویت خمیر و افزایش سطح آن باعث تضعیف خمیر شود ولی اثر آن در حد ناچیزی بوده و می‌توان آن را تقریباً بی اثر دانست. بر اساس نتایج آزمون گلوتن و گلوتاتین، با افزودن اسید آسکوربیک، سیستمین و اسید سیتریک نتایج مورد انتظار بدست آمد و افزودن همزمان سیستمین و اسید آسکوربیک باعث تقویت خمیر شد، نتایج آزمون‌های سولفیدریل - دی سولفید نشان داد که با افزایش مقدار ویتامین C در سه سطح ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm بر تعداد پیوندهای دی سولفید افزوده شد (اثر تقویت خمیر) هر چند این روند بصورت خطی خود را نشان نداد، با افزودن سیستمین احیا کننده عکس حالت فوق پدیدار شد (تضعیف خمیر). افزودن اسید سیتریک اثر معنی‌داری بر نتیجه نداشت، با افزودن هر دو ترکیب احیا و اکسید کننده مشخص گردید که اثر اکسیدکنندگی ویتامین C به مراتب بیشتر از تاثیر احیاکنندگی سیستمین بود. نتایج آزمون ظرفیت نگهداری حلال با چهار حلال مختلف نیز به این صورت بود که در برخی از سطوح تیمارها نتایج مورد انتظار حاصل شد و در مورد سایر سطوح چنین نبود.

منابع

1. AACC. (2003). *Approved Methods of AACC*. St. Paul, Minnesota, USA.
2. Barron, C., Surget, A., & Rouau, X. (2007). Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science* 45(1): 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.07.004>.
3. Bayram, M., Öner, M.D., & Eren, S. (2004). Effect of cooking time and temperature on the dimensions and crease of the wheat kernel during bulgur production. *Journal Food Engineering* 64: 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.09.011>.
4. Belitz, H.D., & Grosch, W. (1986). *Food chemistry*. In: *Baked Products*. P.519. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(86\)90052-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(86)90052-X).
5. Beveridge, T., Toma, S.J., & Nakai, S. (1974). Determination of SH-and SS-groups in some food proteins using Ellman's Reagent. *Journal of Food Science* 39: 49-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb00984.x>.
6. Bloksma, A.H., & Bushuk, W. (1988). Rheology and chemistry of dough. In: *Wheat Chemistry and Technology*. Pomeranz, Y. (Ed.). Am. Assoc. Cereal Chemistry. St. Paul, MN. pp. 131-217. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.5.720>.
7. Chavoshi, M., Arzani, A., Kadivar, M., & Sabzalian, M. (2019). Evaluation of allographic parameters and proteins of chowdham giuten using solvent storage capacity method (2). 7(2): 163-187.
8. Duyvejonck, A.E., Lagrain, B., Dornez, E., Delcour, J.A., & Courtin, C.M. (2012). Suitability of solvent retention capacity tests to assess the cookie and bread making quality of European wheat flours. *LWT-Food Science. Technology* 47(1): 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.002>.
9. Gaines, C. (2000). Collaborative study of methods for solvent retention capacity profiles (AACC Method 56-11). *Journal of Cereal Foods World* 45(7): 303-306.
10. Gooding, M.J. (2009). *The wheat crop*. In: *Wheat: chemistry and technology*. (Ed. 4): p. 19-49.
11. Guzman, C., Romano, G.P., Espinosa, N.H., Dorantes, A.M., & Pena, R.G. (2015). A new standard water absorption criteria based on solvent retention capacity (SRC) to determine dough mixing properties, viscoelasticity, and bread-making quality. *Journal of Cereal Science* 66: 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.10.009>.

12. Hammed, A.M., Ozsisli, B., Ohm, J-B., & Simsek, S. (2015). Relationship between solvent retention capacity and protein molecular weight distribution, quality characteristics, and breadmaking functionality of hard red spring wheat flour. *Journal of Cereal Chemistry* 92(5): 466-474. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-12-14-0262-R>.
13. Hoseney, R.C. (1986). *Principles of Cereal and Technology*. AACC. St. Paul, Minnesota, USA, 372s. <https://doi.org/10.4141/cjps81-075>.
14. Housley, T., Kirleis, A.W., & Patterson, F.L. (1981). An evaluation of seed growth in soft red winter wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 61(3): 525-534.
15. Ijaz, A., Anjum, F.M., & Butt, M.S. (2001). Quality characteristics of wheat varieties grown in Pakistan from 1933 to 1996. *Journal of Food Sciences (Pakistan)*.
16. Kadivar, M. (2010). *Grain technology*. Isfahan University of Technology Publications.
17. Kaur, A., Singh, N., Ahlawat, A.K., Kaur, S., Singh, A.M., Chauhan, H., & Singh, G.P. (2013). Diversity in grain, flour, dough and gluten properties amongst Indian wheat cultivars varying in high molecular weight subunits (HMW-GS). *Food Research International* 53(1): 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.009>.
18. Kweon, M., Slade, L., & Levine, H. (2011). Solvent retention capacity (SRC) testing of wheat flour: principles and value in predicting flour functionality in different wheat-based food processes and in wheat breeding- A review. *Journal of Cereal Chemistry* 88: 537-552. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-07-11-0092>.
19. Kweon, M., Slade, L., & Levine, H. (2011a). Development of a benchtop baking method for chemically leavened crackers. I. Identification of a diagnostic formula and procedure. *Journal of Cereal Chemistry* 88: 19-24. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-08-10-0110>.
20. Lagrain, B., Brijs, K. & Delcour, J.A. 2006. Impact of redox agents on the physico-chemistry of wheat gluten proteins during hydrothermal treatment. *Journal of Cereal Science*. 44(1): p. 49-53. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.03.003>.
21. Levine, H., & Slade, L. (2004). Influence of hydrocolloids in low-moisture foods-A food polymer science approach. In: *Gums and Stabilisers for the Food Industry*. Williams P. A. and Phillips, G. O. (Eds.). Royal Soc. Chemistry, Cambridge, UK. pp. 425-436. <https://doi.org/10.1039/9781847551214-00423>.
22. Mariotti, M., Lucisona, M., Pagani, M.A., & Ng, P.K.W. (2016). Effects of dispersing media and heating rates on pasting profiles of wheat and gluten-free samples in relation to their solvent retention capacities and maxing properties. *Journal of LWT-Food Science Technology* 66: 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.041>.
23. Mosavi, B., & Kadivar, M. (2017). Effects of salt addition during conditioning of wheat on dough rheological properties. *Journal of Food Industry Research* 27(3): 37-46. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13631>.
24. Payan, R. (2011). *An introduction to grain technology*. Aizh Publications. Tehran.
25. Pomeranz, Y. (1987). *Modern cereal science and technology*. VCH Publications. NewYork, NY.
26. Rajabzadeh, N. *Grain technology*. Tehran University Publications.
27. Rasper, V.F., Hardy, K.M., & Fulcher, G.R. (1985). Constant water content vs. constant consistency techniques in alveography of soft wheat flours. In: *Rheology of Wheat Products*. Faridi, H. (Ed.). Am. Assoc. Cereal Chemistry. St. Paul, MN. pp. 51-73.
28. Ravi, R., Manohar, R.S., & Rao, P.H. (2000). Influence of additives on the rheological characteristics and baking quality of wheat flours. *Journal of European Food Research and Technology* 210(3): p. 202-208. <https://doi.org/10.1007/PL00005512>.
29. Sahi, S.S. (2014). Ascorbic acid and redox agents in bakery systems. In: *Bakery products science and technology*: p. 183-197. <https://doi.org/10.1002/9781118792001.ch10>.
30. Schofield, J.D., & Chen, X. (1995). Analysis of free reduced and free oxidised glutathione in wheat flour. *Journal of Cereal Science* 21:127-136. [https://doi.org/10.1016/0733-5210\(95\)90028-4](https://doi.org/10.1016/0733-5210(95)90028-4).
31. Slade, L., & Levine, H. (1994). Structure-function relationships of cookie and cracker ingredients. In: *The Science of Cookie and Cracker Production*. Faridi, H. (Ed.). Chapman and Hall, New York. pp. 23-141.
32. Wrigley, C.W., & Bietz, J.A. (1988). *Protein and amino acids*. In: *Wheat Chemistry and Technology* vol: 1. Pomeranz, Y. (Ed.). AACC, Inc. St. Paul, Minnesota. pp. 159 – 275.
33. Zeleny, L. (1971). *Criteria of wheat quality*. In: *Wheat Chemistry and Technology* Vol: 3. Pomeranz, Y. (Ed.). AACC, St Paul, Minnesota. pp. 19-49.
34. Zheng, C., Sun, D.W., & Zheng, L. (2006). Recent developments and application of image features for food quality evaluation and inspection. *Journal of Food science. Technology* 17: 113-128. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.06.005>.



Optimization of Non-dairy Dessert Formulation based on Almond Milk Containing Tragacanth Gum and Stevia Sweetener

F. Hadidi¹, A. Ganjloo^{2*}, M.H. Fakoor³

Received: 2022.03.07

Revised: 2022.05.27

Accepted: 2022.07.29

Available Online: 2022.07.29

How to cite this article:

Hadidi, F., Ganjloo, A., & Fakoor, M.H. (2023). Optimization of non-dairy dessert formulation based on almond milk containing tragacanth gum and stevia sweetener. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 125-143. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.69932.1157>

Introduction

The demand for non-dairy and reduced-calorie products has increased substantially for several reasons. Almond (*Prunus dulcis*) milk is highly appreciated by lactose-intolerant, hypertensive people and celiac patients whom are not able to consume animal's milk. Thus, the development of various non-dairy products is essential. Desserts are the most common and popular product containing high amount of fat and sucrose. The consumption of sucrose is restricted for diabetic people due to its high glycemic index. Stevia as a low-calorie sweetener is one of the sucrose substitutes in food products. Sucrose substitutes must mimic the techno-functional properties of sucrose. Generally, commercially available sucrose substitutes do not possess all of the required characteristics. Therefore, using them in blend form with sucrose is suggested. Moreover, sucrose replacement especially in desserts generates a negative effect due to low firmness or higher syneresis. In this regard, hydrocolloids can be used to overcome those drawbacks. Therefore, the current study was carried out to investigate and optimize the non-dairy dessert formulation based on almond milk containing Tragacanth gum and stevia. For this purpose, the effect of Tragacanth gum and stevia as a sucrose replacer on the physicochemical properties such as hardness, viscosity, color coordinates including lightness, redness-greenness (a^*), yellowness-blueness (b^*), total soluble solids and syneresis was evaluated and optimized using Response Surface Methodology (RSM).

Materials and Methods

All of the materials used for the manufacturing of non-dairy dessert including raw almond, stevia and Tragacanth gum were purchased from a local market of Zanjan, Iran. For the production of non-dairy dessert, the almond milk warmed up to 40 °C and then stevia as a sucrose substitutes and tragacanth gum powder as a stabilizer were added in the ranges of 25-75% and 0.4-1% w/w, respectively. Later, the temperature of the mixture increased to 72 °C and kept for 10 min and then, the temperature decreased to 42 °C to inoculate the starter culture (a mixture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, 2% w/w). The fermentation process was completed at 37 °C for 24 h. Finally, the temperature of non-dairy dessert based on almond milk was decreased to 4°C and kept at the same temperature until further analysis. The pH of the desserts was measured using a pH meter model AZ 86502 (AZ, Taiwan). Total soluble of the desserts was determined using a refractometer (ATAGO, Japan). Firmness was determined using a STM-5 texture analyzer (SANTAM Co., Iran) equipped with a 20 Kg load cell and 10 mm probe. Viscosity was measured using a programmable Viscometer (R/S-CPS+, Brookfield, USA) equipped with a cone-plate geometry at shear rate of 100 s⁻¹. Instrumental color measurement was carried out by a handheld colorimeter (TES135-A, Taiwan) considering L^* , a^* and b^* as color coordinates. Syneresis was measured by a centrifugation test. Fifteen semi-trained panelists (7 male and 8 female) were selected to evaluate sensory properties of the control (only contains

1- Former M.Sc Student, Department of Food Science and Engineering, Hidaj Branch, Islamic Azad University, Hidaj, Iran

2- Associate Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

(*- Corresponding Author Email: aganjloo@znu.ac.ir)

3- Assistant Professor, Department of Microbiology, Hidaj Branch, Islamic Azad University, Hidaj, Iran

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.69932.1157](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.69932.1157)

sucrose) and optimized formulation samples for texture, color, appearance, taste, flavor, total acceptance using a 5-point Hedonic scale (1= dislike extremely and 5=like extremely). The RSM-central composite design was used to build up the experimental design and identify the conditions that yield highest firmness, viscosity, L^* , and total soluble solids as well as lowest a^* , b^* and syneresis.

Results and Discussion

The results obtained revealed that the hardness, viscosity, a^* and total soluble solids increased significantly ($p<0.05$) while the lightness, b^* and syneresis decreased significantly ($p<0.05$) with increasing the Tragacanth gum in the formulation of non-dairy dessert based on almond milk. In addition, increasing the replacement of sucrose with stevia significantly ($p<0.05$) reduced the hardness, viscosity, total soluble solids, and increasing lightness and syneresis. However, increasing the percentage of sucrose replacement with stevia had no significant effect ($p>0.05$) on the changes of a^* and b^* . Optimization of non-dairy dessert formulation based on almond milk was carried out using numerical technique. The optimal formula was 1% Tragacanth gum and 45% replacement of sucrose with stevia. Under these conditions, hardness 0.08 N, viscosity 1.20 Pa.s, lightness 82.77, redness-greenness 0.95, yellowness-blueness 5.60, total soluble solids 8.29 °Brix and syneresis 11.88% were obtained. The results of sensory evaluation showed that addition of Tragacanth gum and replacing stevia at the optimal levels improved the total acceptance score compared to the control sample.

It can be concluded that in addition to the reliability of the RSM to select the optimal formulation conditions, Tragacanth gum and stevia can be used to produce a new, reduced-calorie and customer-friendly non-dairy dessert based on almond milk.

Keywords: Color, Response surface methodology, Sensorial properties, Syneresis, Viscosity

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی فرمولاسیون دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و شیرین کننده استویا

فریبا حدیدی^۱ - علی گنجلو^{۲*} - محمد هادی فکور^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۳/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۸

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی و بهینه‌سازی فرمولاسیون دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا صورت پذیرفت. بدین منظور تاثیر افزودن صمغ کتیرا در سطوح ۰/۴-۱ درصد و جایگزینی ساکارز با استویا در سطوح ۲۵-۷۵ درصد بر ویژگی‌هایی نظیر سفتی بافت، ویسکوزیته، پارامترهای رنگ‌سنجی شامل میزان روشنایی، قرمزی-سبزی (a^*)، زردی-آبی (b^*)، مواد جامد محلول و آب‌اندازی مورد ارزیابی قرار گرفت. طراحی آزمایشات بر اساس روش شناسی سطح-پاسخ و طرح مرکب مرکزی انجام پذیرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که با افزایش درصد صمغ کتیرا در فرمولاسیون سفتی بافت، ویسکوزیته، a^* و مواد جامد محلول به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافت در حالی که روشنایی، b^* و آب‌اندازی به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش یافتند. به‌علاوه، افزایش جایگزینی ساکارز با استویا به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) سبب کاهش سفتی بافت، ویسکوزیته، مواد جامد محلول و افزایش روشنایی و آب‌اندازی گردید. این در حالی است که افزایش درصد جایگزینی ساکارز با استویا تاثیر معنی‌داری بر تغییرات a^* و b^* نداشت. بهینه‌سازی فرمولاسیون دسر غیرلبنی بر پایه شیر بادام با استفاده از تکنیک عددی انجام شد. فرمول بهینه شامل ۱ درصد صمغ کتیرا و ۴۵ درصد جایگزینی ساکارز با استویا به‌دست آمد. تحت این شرایط سفتی بافت ۰/۰۸ نیوتن، ویسکوزیته ۱/۲۰ پاسکال.ثانیه، روشنایی ۸۲/۷۷، قرمزی-سبزی ۰/۹۵، زردی-آبی ۵/۶۰، مواد جامد محلول ۸/۲۹ درجه بریکس و آب‌اندازی ۱۱/۸۸ درصد پیش‌بینی شد. نتایج ارزیابی حسی نشان داد افزودن صمغ کتیرا و جایگزینی استویا در سطوح بهینه سبب افزایش امتیاز پذیرش کلی نسبت به نمونه کنترل می‌شود. لذا می‌توان نتیجه گرفت که علاوه بر قابل اطمینان بودن روش شناسی سطح-پاسخ برای انتخاب شرایط بهینه فرمولاسیون می‌توان از صمغ کتیرا و استویا برای تولید یک فراورده غیر لبنی جدید بر پایه شیر بادام با کالری کاهش یافته و مشتری پسند استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آب‌اندازی، رنگ، روش شناسی سطح پاسخ، ویسکوزیته، ویژگی‌های حسی

مقدمه

امروزه یکی از شاخص‌های توسعه جوامع انسانی سرانه مصرف شیر و فراورده‌های آن است. به‌علاوه اینکه تاثیر آن بر میزان سلامتی انسان‌ها به خوبی روشن شده است. اما طی سالیان اخیر به دلیل

مشکلات مربوط به عدم تحمل شیر گاو، حساسیت به پروتئین‌های حیوانی و یا به دلیل تغییر عادات غذایی تقاضا برای محصولات بر پایه شیرهای غیر لبنی (گیاهی) افزایش یافته است. لذا مطالعه بر روی شیرهای غیر لبنی و محصولات حاصل از آن از اهمیت بسزایی برخوردار است. در این راستا تولید شیرهای غیر لبنی بر پایه سویا (Li *et al.*, 2021)، فندق (Bernat *et al.*, 2015) و بادام (Wang *et al.*, 2020) مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاکی از آن است که شیرهای گیاهی منبع غنی از کلسیم، فسفر و پتاسیم و ترکیبات ضد اکسایش (Jenkins *et al.*, 2008) می‌باشند.

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد هیدج، دانشگاه آزاد اسلامی، هیدج، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

(*)- نویسنده مسئول: (Email: aganjloo@znu.ac.ir)

۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد هیدج، دانشگاه آزاد اسلامی، هیدج، ایران
DOI: [10.22067/iftstrj.2022.69932.1157](https://doi.org/10.22067/iftstrj.2022.69932.1157)

اما در مقایسه با شکر تجاری کالری بسیار کمتری دارد (Falah Shojae et al., 2018; Kennelly, 2002). این گیاه بومی نواحی آمریکای مرکزی و جنوبی است اما اکنون به دلیل اهمیت آن به عنوان یک منبع شیرین کننده طبیعی در سایر مناطق جهان نیز کشت می شود. در این راستا جایگزینی شکر تجاری با استویا برای فراورده هایی نظیر کیک و کلوچه (Walter and Soliah, 2010)، نکتار زردآلو (Asgari and Goli, 2018)، دسر ژلاتینی (Faghih Zadeh Gorji and Sharifi, 2020)، شربت رژیمی زعفران (Hashemi et al., 2015) و بستنی (Sheybani et al., 2018; Aranda-Gonzalez et al., 2016) بررسی شده است. نتایج این مطالعات نشان می دهند که استویا می تواند جایگزین مناسبی برای شکر تجاری باشد و رضایت مصرف کننده را نیز جلب نماید. از طرفی، استفاده از صمغ ها در فرمولاسیون فراورده هایی نظیر نوشیدنی ها و یا دسرهای لبنی یا غیر لبنی به عنوان هیدروکلوئیدهایی که توانایی تشکیل ژل از طریق ایجاد اتصال با آب، افزایش ویسکوزیته و ویژگی های امولسیون کنندگی دارند متداول است (Alirezadeh and Barzegar, 2017). در سالیان اخیر مطالعاتی با هدف بررسی تاثیر استفاده از صمغ ها یا موسیلاژهایی نظیر کاراگینان (Bayarri et al., 2010)، زرد یا همان صمغ فارسی (Jooyandeh et al., 2019)، به و بالنگو (Karbalaei Amini et al., 2021)، اسفرزه، شاهی و ریحان (Jooyandeh et al., 2019) در فراورده های غذایی مختلف صورت پذیرفته است.

کتیرا، صمغ تراوشی خشک شده نوعی گون از جنس آسترگالوس^۶ است که مرغوب ترین نوع آن به مقدار زیاد در ایران تولید می شود. این صمغ از نظر شیمیایی دارای دو بخش محلول و نامحلول در آب می باشد که به ترتیب تراگاکانتین^۷ و باسورین^۸ (تراگاکانتیک اسید^۹) نامیده می شوند. جزء نامحلول در آب قابلیت تورم و تشکیل ژل را دارد در حالی که جزء محلول، در آب حل شده و محلول کلوئیدی ایجاد می نماید (Weiping and Branwell, 2000). صمغ کتیرا توسط سازمان غذا و داروی آمریکا به عنوان یک افزودنی ایمن طبقه بندی شده است لذا از آن می توان به عنوان پایدارکننده، امولسیون کننده، قوام دهنده و ایجاد کننده احساس خامه ای در دهان در فراورده های غذایی استفاده نمود (Weiping and Branwell, 2000). تاکنون صمغ کتیرا در فرمولاسیون فراورده هایی نظیر کیک اسفنجی (Zomorodi et al., 2018)، شیر کاکائو (Nateghi et al., 2019)، نکتار زردآلو (Asgari and Goli,

بادام (*Prunus amygdalus*) متعلق به خانواده رزاسه^۱ و یکی از محبوب ترین دانه های آجیلی در سراسر جهان است که به علت خواص منحصر بفردش از آن به صورت میان وعده، به عنوان طعم دهنده و جزئی از فرمولاسیون فراورده های فرآوری شده استفاده می شود (Sang et al., 2002). مغز بادام غنی از اسیدهای چرب تک غیر اشباع، فیبر، پروتئین (عمدتا آماندین^۲)، ویتامین ها و مواد معدنی بدون محتوای لاکتوز و کلسترول است (Siriwardhana and Shahidi, 2010; Jalali-khanabadi et al., 2002). مطالعات اخیر نشان می دهند که به علت محدود بودن تجزیه فیزیکی و شیمیایی مغز بادام به صورت کامل (خام یا بو داده) در دهان، معده و روده کوچک ممکن است به طور کامل هضم انجام نشود (Grundy et al., 2015; Mandalari et al., 2014). از عصاره مغز بادام فراورده ای با قابلیت هضم بسیار بالا به نام شیر بادام که یک نوشیدنی غیر لبنی سلامت بخش کلوئیدی حاوی پروتئین ها، لیپیدها، پلی ساکاریدها، تانن ها، فیتات ها، فیبرها و ترکیبات ضد اکسایش است تولید می شود که منشأ آن به نواحی مدیترانه باز می گردد (Dhakal et al., 2014; Kamil and Chen, 2012; Valencia Flores et al., 2013). نتایج مطالعات حاکی از وجود ارتباط بین مصرف بادام و شیر بادام و کاهش خطر بیماری های چاقی و دیابت نوع دو (Tan and Mattes, 2013) و عروق کرونری به دلیل کاهش سطح کلسترول LDL (Chen et al., 2005) می باشد.

دسر به عنوان فرآورده ای که باید حداقل حاوی ۵۰ درصد شیر تازه حیوانی یا گیاهی یا ترکیبی از آنها باشد در بین مصرف کنندگان از محبوبیت بالایی برخوردار است. این فراورده با افزودن افزودنی های مجاز نظیر انواع طعم دهنده ها، قوام دهنده ها و پایدارکننده ها پس از طی فرآیند حرارتی تولید می شود (ISIRI, 2012). دسر ها معمولاً دارای عطر و طعم مطلوب هستند که برای مصرف کننده خوشایند است اما متأسفانه به علت استفاده از کربوهیدرات ها این فراورده کالری بالایی دارد. از آنجایی که ارتباط بین بروز چاقی و بیماری های ناشی از چاقی با مصرف فراورده های غذایی با کالری بالا به اثبات رسیده است لذا تولید فراورده های غذایی کم کالری یا با کالری کاهش یافته از اهمیت بسزایی برخوردار است.

استویا نام عمومی گیاه بوته ای پر برگ و چند ساله به نام استویا ربایودیانا برتونی^۳ متعلق به خانواده آفتابگردان است که گلیکوزیدهای استویول (استویوزید^۴ و ربایودیوزاید^۵) آن به شدت شیرین هستند

- 1- Rosaceae
- 2- Amandin
- 3- *Stevia rebaudiana* Bertoni
- 4- Stevioside
- 5- Rebaudioside A

6- *Astragalus*7- *Tragacanthin*

8- Bassorin

9- Tragacanthic acid

گذرانده شد. پودر استویا با برند بی‌لو^۲ (ایران) از یک فروشگاه مواد غذایی در شهر زنجان خریداری شد.

تولید شیر بادام

به منظور تولید شیر بادام ابتدا ۱۰۰۰ گرم مغز خام بادام درختی به همراه ۳ لیتر آب به مدت ۱۸-۲۰ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس خیسانده شد و پس جدا کردن مغزها از آب، پوسته‌های آن به صورت دستی جدا شدند. در مرحله بعد بادام‌ها به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به صورت بن ماری حرارت داده شدند. سپس بادام و آب با نسبت یک به سه به مدت ۳ دقیقه در مخلوط کن با سرعت کم مخلوط و ماده حاصل از دو لایه پارچه صافی عبور داده شد. در نهایت مخلوط از یک فیلتر با اندازه منافذ ۸۰ میکرومتر گذرانده شد. از این مخلوط صاف شده در ادامه به عنوان شیر بادام استفاده می‌شود (Maghsoudlou et al., 2016).

تهیه دسر بر پایه شیر بادام

برای تهیه دسر از روش عربی و همکاران (Aarabi et al., 2019) استفاده شد. بدین منظور ابتدا دمای شیر بادام تا ۴۰ درجه سلسیوس افزایش یافت و سپس استویا به عنوان شیرین کننده در محدوده ۲۵-۷۵ درصد به عنوان جایگزین ساکارز (برای محاسبه مقدار نهایی استویا شیرینی نسبی استویا ۷ برابر ساکارز در نظر گرفته شد) و همچنین پودر کتیرا به میزان ۱/۴-۱ درصد وزنی/وزنی به عنوان پایدار کننده بر اساس تیمارهای طراحی شده در جدول ۱ به آرامی به شیر بادام اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به طور مداوم هم زده شد. پس از افزایش دمای مخلوط شیر بادام، استویا و صمغ کتیرا به ۷۲ درجه سلسیوس، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد و در نهایت دما تا ۴۲ درجه سلسیوس کاهش یافت. در این دما مخلوطی از باکتری‌های /استریپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (کریستین هانسن، دانمارک) به عنوان آغازگر به میزان ۲ درصد وزنی/وزنی به مخلوط تلقیح شد و فرایند تخمیر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت تکمیل گردید. در نهایت دمای محصول تا ۴ درجه سلسیوس کاهش یافت (Aarabi et al., 2019).

اندازه‌گیری محتوای رطوبت، چربی، پروتئین، کربوهیدرات، فیبر و خاکستر مغز بادام و شیر بادام

(2018) و شیر پسته (Gerdabi Targhi et al., 2018) با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است.

روش شناسی سطح- پاسخ^۱ مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و آماری برای ایجاد مدل‌های تجربی در جهت توسعه، بهبود و بهینه‌سازی فرایندها است. از اهداف استفاده از این روش آماری می‌توان به تعیین تعامل بین فراسنجه‌های مختلف، کاهش تعداد دفعات آزمایش‌های تجربی، زمان و هزینه‌های کلی اشاره نمود (Samavati, 2013). در روش شناسی سطح- پاسخ از طرح‌هایی نظیر طرح مرکب مرکزی چرخش پذیر، مرکب مرکزی و باکس- بنکن می‌توان استفاده نمود. تاکنون از این روش شناسی برای بهینه‌سازی فرمولاسیون شیر پسته (Gerdabi Targhi et al., 2018)، پایداری به کمک فراصوت و فرمولاسیون شیر بادام (Maghsoudlou et al., 2016)، دسر شیری بر پایه عسل خرما، نشاسته ذرت و ژلاتین (Mehrabi and Goli, 2018) و دسرهای بر پایه سویا (Granato et al., 2010) با موفقیت استفاده شده است. بررسی منابع صورت پذیرفته حاکی از آن است که تاکنون مطالعه‌ای بر روی تولید دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و شیرین کننده استویا انجام نشده است. لذا این پژوهش با هدف توسعه یک دسر غیرلبنی مطلوب با کالری کاهش یافته بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و شیرین کننده استویا انجام شد. بدین منظور فرمولاسیون دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا (۱/۴-۰ درصد) و شیرین کننده استویا به عنوان جایگزین ساکارز (۲۵-۷۵ درصد) با استفاده از روش شناسی سطح- پاسخ و طرح مرکب مرکزی بهینه شد. بهینه‌سازی فرمولاسیون با هدف به حداکثر رساندن سفتی بافت، ویسکوزیته، مولفه روشنایی و مواد جامد محلول و به حداقل رساندن مولفه‌های قرمزی- سبزی، زردی- آبی و آب‌اندازی صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

مغزهای خام بادام درختی از بازار محلی زنجان خریداری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه به خوبی با آب سرد به منظور رفع آلودگی‌های خارجی شسته شد و در سایه و در دمای اتاق با جریان طبیعی هوا خشک گردید. صمغ کتیرا از یک عطاری در شهر زنجان تهیه شد و قبل از افزودن به فرمولاسیون به وسیله آسیاب برقی (گوسونیک، چین) به پودر تبدیل شد و از الک با مش استاندارد ۱۰۰

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه‌های دسر غیر لبنی شامل نمونه با فرمولاسیون بهینه و نمونه شاهد (تنها حاوی ساکارز) با حضور ۱۵ نفر از دانشجویان رشته علوم و مهندسی صنایع غذایی (۷ نفر آقا و ۸ نفر خانم) انجام شد. ویژگی‌هایی نظیر بافت، رنگ، ظاهر، مزه، عطر و طعم و پذیرش کلی به روش آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای (۱= بسیار ناخوشایند، ۵= بسیار خوشایند) بلافاصله پس از تولید مورد ارزیابی قرار گرفت.

بهینه‌سازی و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش، از نرم‌افزار آماری Design Expert 7.0.3 (Minneapolis, USA) برای اعمال روش شناسی سطح- پاسخ، بررسی روابط میان فراسنجه‌های مستقل و پاسخ‌ها، ایجاد نمودارهای سه بعدی و بهینه‌یابی استفاده شد. طراحی آزمایشات بر اساس طرح مرکب مرکزی شامل ۲۱ تیمار با ۵ تکرار در نقطه مرکزی انجام شد. فراسنجه‌های مورد مطالعه و سطوح بالا (+۱)، میانی (صفر) و پایینی (۱-) آنها بر اساس مطالعات اولیه انتخاب گردید (جدول ۱). از مدل چند جمله‌ای برای مدل‌سازی استفاده شد. مدل درجه دوم را می‌توان به صورت زیر نوشت:

$$Y(\%) = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

در این رابطه β_0 ، β_i ، β_{ii} و β_{ij} ضرایب رگرسیونی به ترتیب برای عرض از مبدا، اثرات خطی، درجه دوم، اثرات متقابل X_i و X_j فراسنجه‌های مستقل شامل غلظت صمغ کتیرا (۴/۰-۱ درصد) درصد جایگزینی ساکارز با استویا (۲۵-۷۵ درصد) هستند. از آزمون ضعیف برازش^۱، ضریب تغییرات (C.V.)، ضریب تبیین (R^2)، ضریب تبیین اصلاح شده ($\text{adj-}R^2$) و عدد p در سطح اطمینان ۹۵ درصد برای بررسی صحت مدل‌های پیشنهادی و تأثیر فراسنجه‌ها استفاده شد. برای تعیین شرایط بهینه از روش بهینه‌سازی عددی^۲ با هدف به حداکثر رساندن سفتی بافت، ویسکوزیته، روشنایی و مواد جامد محلول و به حداقل رساندن قرمزی- سبزی، زردی- آبی و آب‌اندازی استفاده شد. برای اعتبارسنجی مدل پیشنهادی، مقادیر پیش بینی شده پاسخ‌ها با مقادیر تجربی به دست آمده تحت شرایط بهینه (حداقل ۵ تکرار) مقایسه گردید. تمامی آزمون‌ها با سه تکرار انجام شدند و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردید.

محتوای رطوبت، چربی، پروتئین، کربوهیدرات، فیبر و خاکستر مغز بادام و شیر بادام مطابق با استاندارد AOAC (۲۰۰۰) تعیین شد.

اندازه‌گیری مواد جامد محلول کل و pH

برای اندازه‌گیری مواد جامد محلول کل از یک دستگاه رفاکتمتر چشمی (آتاگو، ژاپن) در دمای اتاق استفاده شد و نتایج بر حسب درجه بریکس بیان گردید.

اندازه‌گیری pH مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ و با استفاده از یک pH متر رومیزی (AZ 86502، تاپوان) در دمای اتاق انجام پذیرفت (ISIRI, 2006). نمونه‌های دسر قبل از اندازه‌گیری pH به طور کامل یکنواخت شدند.

ارزیابی بافت دسر غیر لبنی

به منظور ارزیابی بافت از دستگاه بافت‌سنج (STM-5، سنتام، ایران) مجهز به لود سل ۲۰ کیلوگرمی و پروب به قطر ۱۰ میلی‌متر با عمق نفوذ ۱۵ میلی‌متر (۵۰ درصد ارتفاع اولیه) با سرعت بیشینه ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه استفاده شد. حداکثر نیروی ثبت شده به عنوان سفتی در نظر گرفته و بر حسب نیوتن گزارش شد.

اندازه‌گیری ویسکوزیته

ویسکوزیته با استفاده از دستگاه رئومتر بروکفیلد (R/S-CPS+, USA) مجهز به سیستم تنظیم دما در نرخ برشی ۱۰۰ بر ثانیه اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری ویسکوزیته از اسپندل مخروطی- صفحه‌ای با قطر ۷۵ میلی‌متر با فاصله دو صفحه معادل ۱ میلی‌متر استفاده شد.

اندازه‌گیری رنگ

مولفه‌های روشنایی- تیرگی (L^*)، قرمزی- سبزی (a^*) و زردی- آبی (b^*) با استفاده از یک دستگاه رنگ‌سنج قابل حمل (TES135-A، تاپوان) کالیبره شده با کاشی سفید استاندارد در دمای اتاق اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری درصد آب‌اندازی

برای اندازه‌گیری میزان آب‌اندازی حدود ۱۰ گرم نمونه پس از توزین با ترازوی دیجیتال (WTC2000، لهستان) با دقت ۰/۰۱ گرم با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. درصد آب‌اندازی نمونه‌ها با استفاده از معادله زیر تعیین گردید (Aportela, 2005).

$$(1) \quad \left(\text{وزن نمونه اولیه} / \text{وزن آب جدا شده از نمونه} \right) \times 100 = \% \text{ آب‌اندازی}$$

1- Lack-of-fit test

2- Numerical optimization

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی

ترکیب شیمیایی مغز خام بادام درختی و شیر بادام اندازه‌گیری گردید. میزان رطوبت مغز خام بادام درختی 51.12 ± 0.16 ، چربی 4.01 ± 0.08 ، پروتئین 5.2 ± 0.26 ، خاکستر 4.01 ± 0.03 ، قند کل 94.4 ± 0.39 ، رطوبت، 2.66 ± 0.12 ، چربی، 1.82 ± 0.05 و فیبر 27.19 ± 0.15 و فیبر 7.31 ± 0.09 گرم در ۱۰۰ گرم بود. در حالی که شیر بادام حاوی 94.4 ± 0.39 ، رطوبت، 2.66 ± 0.12 ، چربی، 1.82 ± 0.05 و فیبر 27.19 ± 0.15 ، قند کل 94.4 ± 0.39 ، پروتئین 5.2 ± 0.26 و فیبر 4.01 ± 0.03 گرم در ۱۰۰ گرم بود. نتایج به‌دست آمده تقریباً با سایر نتایج محققان مشابهت داشت (Bernat et al., 2015; Maghsoudlou et al., 2016; Wang et al., 2020). همان‌طور که ملاحظه می‌شود شیر بادام در مقایسه با شیر گاو میزان چربی بالاتر و پروتئین پایین‌تری دارد. شیر بادام دارای pH برابر ۶/۲ بود در حالی که این مقدار برای دسر بر پایه شیر بادام برابر ۴/۵ بود.

بررسی تاثیر فراسنجه‌های مستقل بر خصوصیات دسر

غیر لبنی بر پایه شیر بادام

سفتی بافت

همان‌طور که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود محدوده سفتی بافت دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا در محدوده 0.02 تا 0.10 نیوتن قرار داشت. براساس جدول ۲، آزمون F برای مدل خطی معنی‌دار بود ($F\text{-value}=185/66$ ، $p<0.0001$). به‌علاوه، اثرات خطی تمامی فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری بر پاسخ داشتند ($p<0.0001$). مدل چند جمله‌ای نهایی به شرح زیر بود:

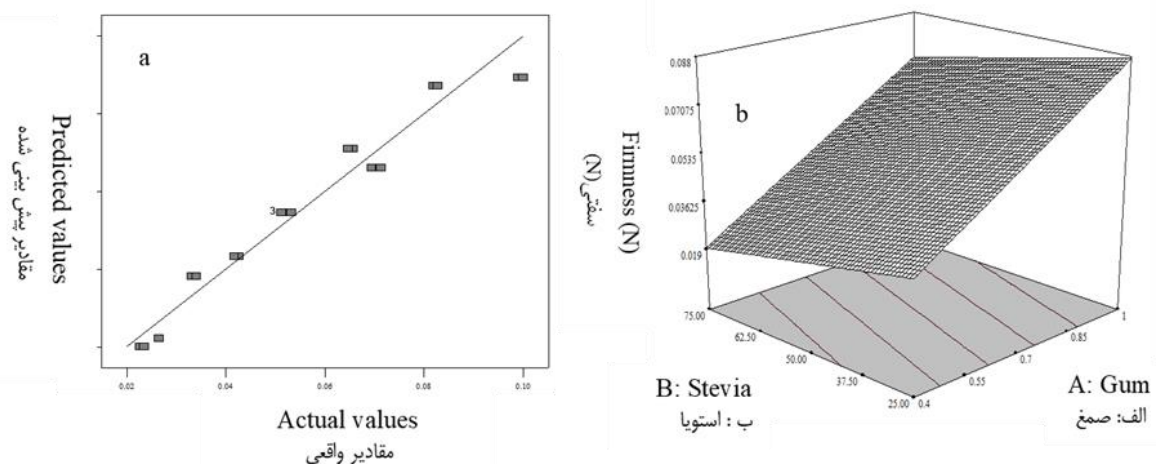
$$(N) = 0.053 + 0.026A - 8.39 \times 10^{-3}B \text{ Firmness}$$

در این معادله، A میزان صمغ کتیرا (درصد) و B میزان جایگزینی ساکارز با استویا (درصد) بود. علائم مثبت و منفی ضرایب به ترتیب نشان‌دهنده اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی فراسنجه‌های مستقل بر پاسخ می‌باشند. دقت و ارتباط بین پاسخ و فراسنجه‌های مستقل به وضوح توسط ضریب تبیین ($R^2=0.9538$) و ضریب تبیین تعدیل شده ($\text{adj-}R^2=0.9486$) نشان داده شده است. شکل ۱- الف نیز مؤید انطباق مطلوب بین داده‌های تجربی و پیش بینی شده است.

جدول ۱- ماتریس طراحی آزمایشات بر اساس طرح مرکب مرکزی و مقادیر داده‌های تجربی

Table 1- Central composite experimental design matrix and experimental values

Run	Independent variables				Responses				
	متغیرهای مستقل				پاسخ‌ها				
	Gum concentration (%) غلظت صمغ	Stevia (%) استویا	Firmness (N) سفتی	Viscosity (Pa.S) ویسکوزیته	L^*	a^*	b^*	Brix (°B) بریکس	Syneresis (%) آب اندازی
1	0.28	50.00	0.021	0.161	84.5	-0.630	6.870	6.5	25.26
2	0.28	50.00	0.020	0.163	84.7	-0.636	6.840	6.40	25.29
3	0.40	25.00	0.032	0.269	87.66	-0.333	6.230	7.30	18.12
4	0.40	75.00	0.024	0.220	88.38	-0.298	5.938	6.70	21.10
5	0.40	25.00	0.031	0.268	87.68	-0.336	6.200	7.31	18.15
6	0.40	75.00	0.024	0.221	88.35	-0.290	5.940	6.72	21.00
7	0.70	50.00	0.050	0.730	85.58	0.230	6.181	7.30	17.60
8	0.70	50.00	0.050	0.730	85.59	0.240	6.180	7.60	17.55
9	0.70	14.64	0.071	0.850	85.64	0.110	6.800	8.00	15.42
10	0.70	85.36	0.041	0.680	87.89	0.350	6.300	7.01	18.66
11	0.70	14.64	0.069	0.860	85.65	0.110	6.820	8.00	15.39
12	0.70	50.00	0.052	0.729	85.55	0.210	6.180	7.30	17.58
13	0.70	50.00	0.050	0.730	85.56	0.230	6.181	7.50	17.61
14	0.70	85.36	0.040	0.682	87.87	0.330	6.320	7.00	18.69
15	0.70	50.00	0.051	0.731	85.56	0.220	6.179	7.30	17.59
16	1.00	75.00	0.065	1.060	86.19	0.535	5.410	7.60	13.55
17	1.00	25.00	0.083	1.269	80.87	0.790	5.332	7.90	12.26
18	1.00	75.00	0.064	1.050	86.21	0.530	5.430	7.70	13.57
19	1.00	25.00	0.082	1.268	80.88	0.78	5.331	7.89	12.28
20	1.12	50.00	0.100	1.400	82.27	1.825	5.214	9.50	8.00
21	1.12	50.00	0.101	1.402	82.25	1.826	5.216	9.40	8.12



شکل ۱- (الف) کفایت برازش و (ب) نمودار سطح پاسخ تاثیر افزودن صمغ کتیرا (A; %) و جایگزینی ساکارز با استویا (B; %) بر سفتی (N)
Fig. 1- (a) Goodness of fit and (b) Response surface plot showing the effects of Tragacanth gum (A; %), and stevia substitution (B; %) on Firmness (N)

F برای مدل شامل اثرات متقابل معنی دار بود ($F\text{-value}=8.09/82$)، علاوه بر اثرات خطی ($p<0.0001$)، اثر متقابل فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه ($p<0.0055$) تاثیر معنی داری بر پاسخ داشتند (جدول ۲). مدل چند جمله‌ای نهایی به شرح زیر به دست آمد:

$\text{Viscosity (Pa.s)} = 0.74 + 0.45 A - 0.063B - 0.041AB$
در این معادله، A میزان صمغ کتیرا (درصد)، B میزان جایگزینی ساکارز با استویا (درصد) و AB اثرات متقابل فراسنجه‌های مذکور می‌باشند. دقت و ارتباط بین پاسخ و متغیرهای مستقل به وضوح توسط ضریب تبیین ($R^2=0.9931$) و ضریب تبیین تعدیل شده ($\text{adj-}R^2=0.9918$) نشان داده شده است. تکرارپذیری و قابلیت اطمینان به مدل توسط مقدار کم ضریب واریانس (۵ درصد) نیز تایید شد. شکل ۲- الف نیز مؤید انطباق مطلوب بین داده‌های تجربی و پیش بینی شده است.

تاثیر فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه بر ویسکوزیته دسرهای غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا به صورت سطح- پاسخ سه بعدی در شکل ۲- ب نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود ویسکوزیته دسرهای غیر لبنی بر پایه شیر بادام با افزایش غلظت صمغ کتیرا افزایش می‌یابد هرچند که افزایش میزان جایگزینی ساکارز با استویا سبب کاهش میزان ویسکوزیته می‌شود. به‌طور کلی ترکیب شیمیایی شیر گیاهی، میزان ساکارز و هیدروکلوئیدها و همچنین تعاملات بین آنها تاثیر مستقیم بر ویسکوزیته دارد (Tárrega and Costell, 2006). به‌طور کلی هیدروکلوئیدهایی نظیر صمغ کتیرا با ایجاد شبکه‌ای از اتصالات بین آب و اجزاء شیر گیاهی نظیر پروتئین‌ها مانع حرکت آزادانه آب

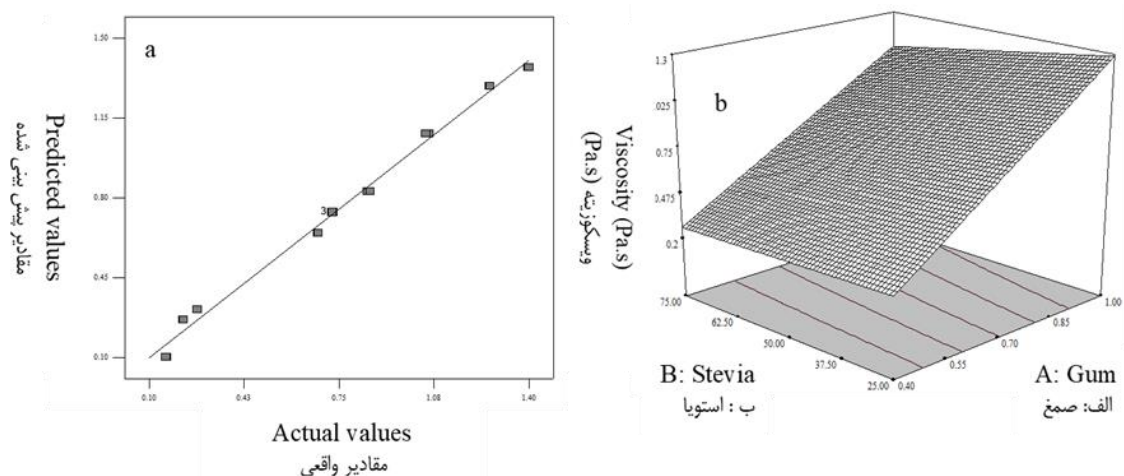
سفتی بافت به دلیل ایجاد احساس دهانی مطلوب یکی از ویژگی‌های مهم محسوب می‌شود. تاثیر فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه بر سفتی بافت دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا به‌صورت سطح- پاسخ سه بعدی در شکل ۱- ب نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌گردد با افزایش میزان صمغ کتیرا در فرمولاسیون دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام سفتی نمونه‌ها افزایش می‌یابد. افزایش صمغ کتیرا از طریق متراکم نمودن ساختار پروتئینی سبب افزایش سفتی بافت محصول می‌شود. بررسی سایر مطالعات نشان می‌دهد که با افزودن صمغ‌های مختلف نظیر به و بالنگو (Karbalaei Amini et al., 2021) و موسیلاژ دانه‌های اسفرزه، شاهی و ریحان (Jooyandeh et al., 2019) به ترتیب سفتی بافت دسرهای لبنی کم چرب و دسرهای لبنی شکلاتی کم چرب افزایش می‌یابد از طرفی نتایج به‌دست آمده موید این مطلب است که با افزایش درصد جایگزینی ساکارز با استویا سفتی بافت نمونه‌های دسر غیر لبنی کاهش می‌یابد. در نتیجه درصد شکر اثر قابل ملاحظه‌ای بر سفتی بافت نمونه‌ها دارد. کاهش سفتی بافت نمونه‌های حاوی مقادیر کمتر ساکارز را می‌توان به ویژگی‌های پلاستی‌سایزری و قوام دهنده‌گی ساکارز نسبت داد (Aranda-Gonzalez et al., 2016).

ویسکوزیته

مقادیر ویسکوزیته دسرهای غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا در جدول ۱ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان ویسکوزیته دسرهای غیر لبنی در محدوده ۰/۱۶۱ تا ۱/۴۰۲ پاسکال. ثانیه قرار داشت. براساس جدول ۲، آزمون

ویسکوزیته می‌شوند (Milani et al., 2011). لذا تاثیر افزودن شیرین کننده استویا نیز نباید از این قاعده مستثنی باشد اما از آنجایی که شدت شیرینی استویا بیشتر از ساکارز است و به‌منظور جلوگیری از شیرین شدن بیش از حد دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام مقدار مصرف آن کاهش یافته است لذا کاهش ویسکوزیته دور از انتظار نیست. نتایج هاشمی و همکاران (Hashemi et al., 2015) نیز نشان داد با افزایش میزان جایگزینی شیرین کننده استویا ویسکوزیته شربت رژیمی زعفران کاهش می‌یابد. علاوه بر این، نتایج سایر مطالعات نیز تایید کننده یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد (Homayouni Rad et al., 2012; Alizadeh et al., 2014).

می‌شوند. این ویژگی هیدروکلوئیدها می‌تواند سبب افزایش ویسکوزیته و کاهش آب‌اندازی فراورده نهایی گردد (Gómez-Guillén 2011; Morreale et al., 2018 et al.,). چنین به نظر می‌رسد که بخش نامحلول یا همان باسورین با ساختار خطی و وزن مولکولی بالای خود منجر به افزایش ویسکوزیته می‌شود (Zhihua et al., 2015). نتایج مطالعات پیشین حاکی از آن است که افزودن هیدروکلوئیدهایی نظیر ثعلب (Ayar et al., 2009)، پکتین و ژلاتین (Aarabi et al., 2019) سبب افزایش ویسکوزیته نمونه‌های مورد مطالعه می‌گردد. از طرفی قندها به دلیل ویژگی آب‌دوستی و ایجاد پیوندهای هیدروژنی از طریق گروه‌های هیدروکسیل با مولکول‌های آب سبب افزایش



شکل ۲- (الف) کفایت برازش مدل رگرسیونی و (ب) نمودار سطح پاسخ تاثیر افزودن صمغ کتیرا (A; %) و جایگزینی ساکارز با استویا (B; %) بر ویسکوزیته (Pa.s)

Fig. 2-(a) Goodness of fit and (b) Response surface plot showing the effects of Tragacanth gum (A; %), and stevia substitution (B; %) on viscosity (Pa.s)

$$L^* = 85.57 - 1.53A + 1.15 B + 1.16AB - 0.90A^2 + 0.77B^2$$

$$a^* = 0.28 + 0.68A + 0.014B$$

$$b^* = 6.05 - 0.47 A - 0.11B$$

در این معادلات، A میزان افزودن صمغ کتیرا (درصد)، B میزان جایگزینی ساکارز با استویا (درصد) و AB اثرات متقابل فراسنجه‌های مذکور بود. دقت و ارتباط بین پاسخ‌ها و فراسنجه‌های مستقل به وضوح توسط ضریب تبیین ($R^2=0.8851-0.6133$) و ضریب تبیین تعدیل شده ($adj-R^2=0.8418-0.5703$) نشان داده شده است. در شکل‌های ۳-۵ (الف) نیز انطباق نسبتاً مطلوب بین داده‌های تجربی و پیش‌بینی نشان داده شده است.

تاثیر فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه بر مولفه‌های روشنایی (L^*)، قرمزی-سبزی (a^*) و زردی-آبی (b^*) دسرهای غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا به صورت سطح-پاسخ سه

رنگ

نتایج اندازه‌گیری مولفه‌های رنگ نشان داد مولفه‌های روشنایی (L^*)، قرمزی-سبزی (a^*) و زردی-آبی (b^*) دسرهای غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا به ترتیب در محدوده ۸۰/۸۷ تا ۸۸/۳۸، ۰/۶۳ تا ۱/۸۲ و ۵/۲۱ تا ۶/۸۷ قرار دارد (جدول ۱). نتایج ارائه شده در جدول ۲ حاکی از آن است که آزمون F برای مدل‌های چند جمله‌ای معنی‌دار بود ($p<0.0002$). همان‌طور که در جدول ۲ ملاحظه می‌گردد اثرات خطی، درجه دوم و متقابل تمامی فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری بر مولفه روشنایی داشتند در حالی که فراسنجه جایگزینی ساکارز با استویا تاثیر معنی‌داری بر مولفه‌های قرمزی-سبزی ($p=0.83$) و زردی-آبی ($p=0.22$) نداشت. مدل‌های چند جمله‌ای نهایی به شرح زیر به‌دست آمد:

2021) گزارش کردند که با افزایش میزان غلظت صمغ بومی به و بالنگو در فرمولاسیون دسر شیری کم‌چرب مولفه زردی- آبی کاهش می‌یابد. به علاوه، با افزایش جایگزینی ساکارز با استویا برای مولفه زردی- آبی تغییر معنی‌داری مشاهده نگردید (Karbalaei Amini et al., 2021).

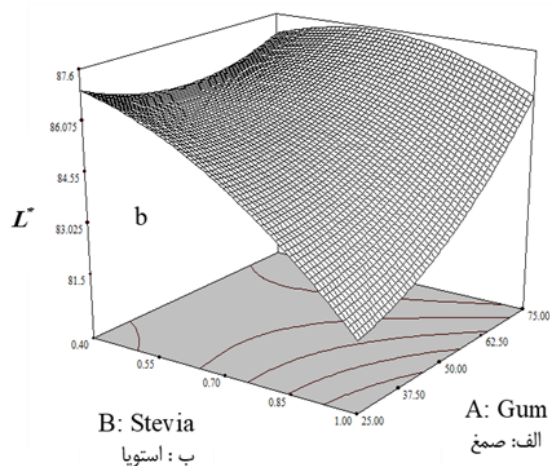
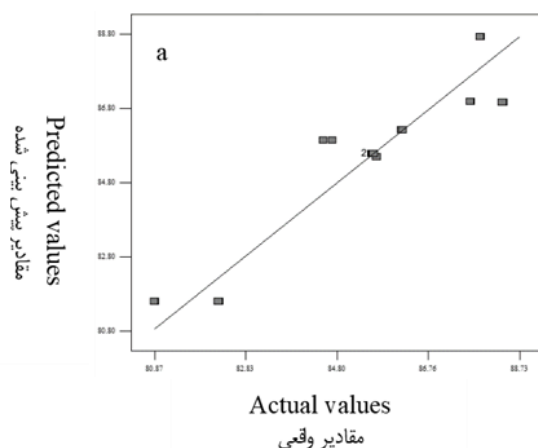
مواد جامد محلول کل

میزان مواد جامد محلول کل دسرهای غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا در محدوده ۶/۴۰ تا ۹/۵۰ درجه بریکس قرار داشت (جدول ۱). براساس جدول ۲، آزمون F برای مدل خطی خطی معنی‌دار بود ($F\text{-value}=28/55$ ، $p<0/0001$). اثرات خطی فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری بر پاسخ داشتند (جدول ۲). مدل چند جمله‌ای نهایی حاصل به شرح زیر بود:

$$(^{\circ}\text{B}) = 7.52 + 0.72A - 0.28B \text{ Total soluble solids}$$

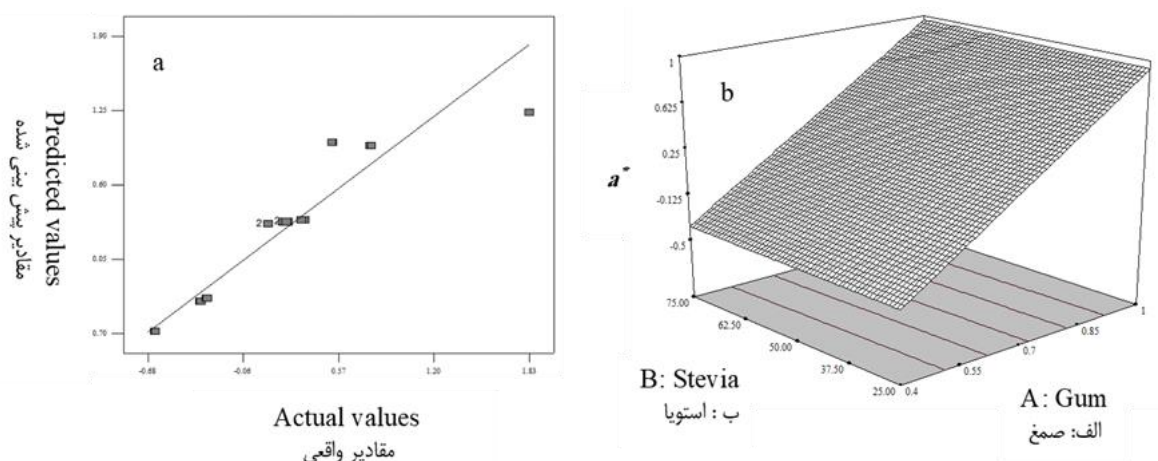
در این معادله، A میزان افزودن صمغ کتیرا (درصد) و B میزان جایگزینی ساکارز با استویا (درصد) بود. دقت و ارتباط بین پاسخ و متغیرهای مستقل توسط ضریب تبیین ($R^2=0/7603$) و ضریب تبیین تعدیل شده ($\text{adj-}R^2=0/7337$) نشان داده شده است. تکرارپذیری و قابلیت اطمینان به مدل توسط مقدار کم ضریب واریانس ($5/45$ درصد) نیز تایید شد. شکل ۶-الف نیز مؤید انطباق مطلوب بین داده‌های تجربی و پیش بینی شده است. تاثیر فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه بر میزان مواد جامد محلول کل دسرهای غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا به صورت سطح-پاسخ سه بعدی در شکل ۶-ب نشان داده شده است.

بعدی به ترتیب در شکل‌های ۳-۵ (ب) نشان داده شده است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهند که مولفه روشنایی با افزایش غلظت صمغ کتیرا کاهش یافت. این در حالی است که با افزایش جایگزینی ساکارز با استویا میزان روشنایی نمونه‌ها افزایش یافت (شکل ۳-ب). کاهش میزان مولفه روشنایی به عبارتی دیگر نمایانگر کاهش شفافیت و افزایش کدوری نمونه‌های حاوی مقادیر بالاتر صمغ کتیرا است. دلیل این امر را می‌توان به کاهش میزان آب آزاد و در نتیجه تغییر زاویه انعکاس نور در اثر افزایش غلظت صمغ کتیرا نسبت داد. در این راستا، کاهش مولفه روشنایی دسر لبنی در اثر افزایش صمغ شاهی (Karajian et al., 2015) و همچنین صمغ‌های بومی به و بالنگو (Karbalaei Amini et al., 2021) گزارش شده است که با نتیجه به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد. از طرفی وقوع برهمکنش بین قندها و پروتئین‌ها نیز با تاثیر بر تفرق نور می‌تواند سبب تغییر در مولفه روشنایی گردد (Yanes et al., 2002). همان‌طور که در شکل ۴- ب ملاحظه می‌شود با افزایش غلظت صمغ کتیرا مولفه قرمزی- سبزی نمونه‌ها افزایش یافت. در مطالعات پیشین نیز افزایش قرمزی دسرهای لبنی با افزایش غلظت صمغ‌های بومی به و بالنگو (Karbalaei Amini et al., 2021) و صمغ شاهی (Karajian et al., 2015) گزارش شده است که تایید کننده نتیجه به‌دست آمده در پژوهش حاضر می‌باشد. لازم به ذکر است که افزایش جایگزینی ساکارز با استویا تاثیر معنی‌داری بر مولفه قرمزی- سبزی نمونه‌ها نداشت. با توجه به شکل ۵- ب می‌توان اذعان نمود که با افزایش غلظت صمغ کتیرا مولفه زردی- آبی نمونه‌ها کاهش یافت. در این راستا، کربلایی امینی و همکاران (Karbalaei Amini et al.,



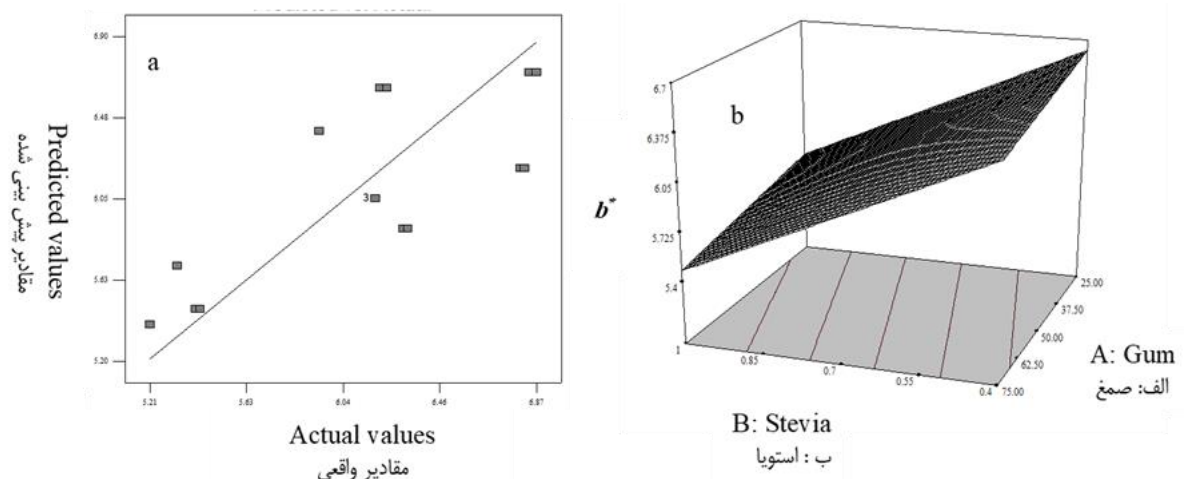
شکل ۳- (الف) کفایت برازش مدل رگرسیونی و (ب) نمودار سطح پاسخ تاثیر افزودن صمغ کتیرا (A; %) و جایگزینی ساکارز با استویا (B; %) بر روشنایی (L^*)

Fig. 3-(a) Goodness of fit and (b) Response surface plot showing the effects of Tragacanth gum (A; %), and stevia substitution (B; %) on lightness (L^*)



شکل ۴- (الف) کفایت برازش مدل رگرسیونی و (ب) نمودار سطح پاسخ تاثیر افزودن صمغ کتیرا (A; %) و جایگزینی ساکارز با استویا (B; %) بر قرمزی-سبزی (a^*)

Fig. 4-(a) Goodness of fit and (b) Response surface plot showing the effects of Tragacanth gum (A; %), and stevia substitution (B; %) on redness-greenness (a^*)

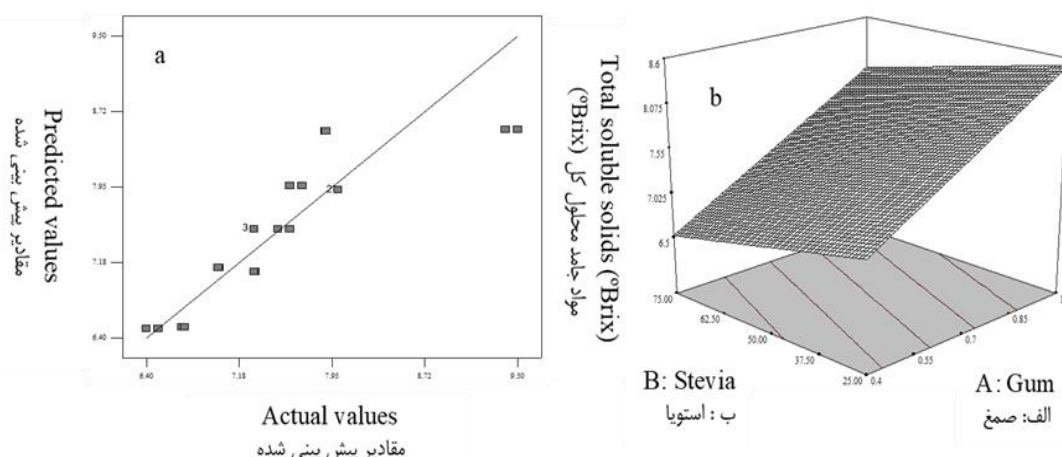


شکل ۵- (الف) کفایت برازش مدل رگرسیونی و (ب) نمودار سطح پاسخ تاثیر افزودن صمغ کتیرا (A; %) و جایگزینی ساکارز با استویا (B; %) بر زردی-آبی (b^*)

Fig. 5-(a) Goodness of fit and (b) Response surface plot showing the effects of Tragacanth gum (A; %), and stevia substitution (B; %) on yellowness-blueness (b^*)

جامد محلول نهایی آن موثر باشد. به علاوه اینکه میزان مواد جامد محلول تاثیر قابل توجهی بر سایر ویژگی‌ها نظیر بافت، ویسکوزیته و آب‌اندازی دارد. اثر منفی استویا به عنوان جایگزین ساکارز در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (Homayouni Rad *et al.*, 2012; Hashemi *et al.*, 2015).

همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش غلظت صمغ کتیرا میزان مواد جامد محلول افزایش می‌یابد. از طرفی با افزایش درصد جایگزینی ساکارز با استویا میزان مواد جامد محلول کاهش یافت. چنین به نظر می‌رسد که میزان افزودنی‌های مورد استفاده در فرمولاسیون دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام می‌تواند در میزان مواد



شکل ۶- (الف) کفایت برازش مدل رگرسیونی و (ب) نمودار سطح پاسخ تاثیر افزودن صمغ کتیرا (A; %) و جایگزینی ساکارز با استویا (B; %) بر مواد جامد محلول کل (°Brix)

Fig. 6- (a) Goodness of fit and (b) Response surface plot showing the effects of Tragacanth gum (A; %), and stevia substitution (B; %) on total soluble solids (°Brix)

آباندازی

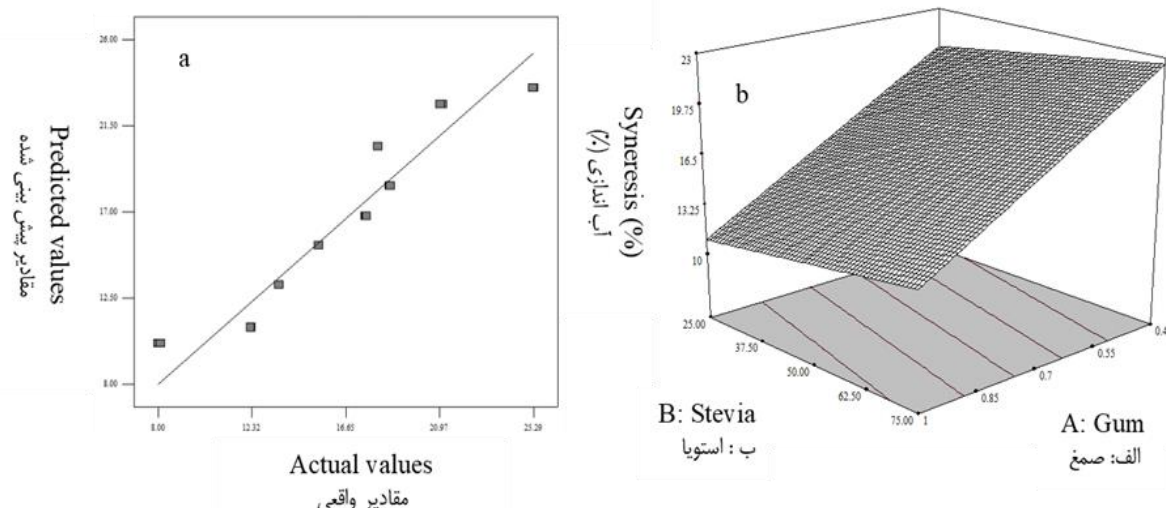
محدوده آباندازی دسر غیرلبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا در محدوده ۸ تا ۲۵/۲۹ درصد قرار داشت (جدول ۱). براساس نتایج ارائه شده در جدول ۲، آزمون F برای مدل خطی معنی دار بود ($F\text{-value}=۹۰/۳۰$ ، $p<۰/۰۰۰۱$). به علاوه، اثرات خطی تمامی فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه تاثیر معنی داری بر پاسخ داشتند. مدل چند جمله‌ای نهایی حاصل به شرح زیر بود:

$$\text{Syneresis} = 16.80 - 4.71A + 1.10B$$

در این معادله، A میزان صمغ کتیرا (درصد) و B میزان جایگزینی ساکارز با استویا (درصد) بود. دقت و ارتباط بین پاسخ و متغیرهای مستقل به وضوح توسط ضریب تبیین ($R^2=۰/۹۰۹۴$) و ضریب تبیین تعدیل شده ($\text{adj-}R^2=۰/۸۹۹۳$) نشان داده شده است. تکرارپذیری و قابلیت اطمینان به مدل توسط مقدار کم ضریب واریانس ($۸/۵۸$) نیز تایید شد. شکل ۷-الف نیز مؤید انطباق مطلوب بین داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده است.

به جدا شدن آب از فراورده غذایی طی تولید یا پس از آن آباندازی اطلاق می‌شود. به‌طور کلی آباندازی فراورده‌های غذایی پدیده‌ای نامطلوب محسوب می‌شود چراکه علاوه بر نامناسب کردن ظاهر فراورده و بالتبع آن کاهش ارزش بصری، سبب افت مواد مغذی و افزایش احتمال وقوع فسادهای میکروبی می‌گردد (Vareltzis et al., 2016). تاثیر فراسنجه‌های مستقل مورد مطالعه بر میزان آباندازی دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا

به صورت سطح-پاسخ سه بعدی در شکل ۷-ب نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش غلظت صمغ کتیرا میزان آباندازی کاهش می‌یابد و این در حالی است که افزایش میزان جایگزینی ساکارز با استویا منجر به افزایش میزان آباندازی دسرهای غیر لبنی بر پایه شیر بادام می‌گردد. همان‌طور که پیشتر نیز اشاره شد صمغ کتیرا با برقراری اتصالات و برهمکنش با پروتئین‌های شیر بادام منجر به کاهش تحرک فاز آبی و ضمن افزایش ویسکوزیته باعث کاهش آباندازی می‌شود (Gómez-Guillén et al., 2011; Morreale et al., 2018). به نظر می‌رسد بخش محلول صمغ کتیرا یا همان تراگانترین باعث افزایش پایداری سیستم و کاهش آباندازی دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام می‌شود (Zhihua et al., 2015). در مطالعات پیشین کاهش میزان آباندازی انواع ماست، دسرهای تخمیری غیر لبنی، دسرهای لبنی کم‌چرب و شیر پسته به ترتیب از طریق افزودن پکتین، ژلاتین، صمغ‌های به و بالنگو و ژلاتین و کتیرا گزارش شده است (Supavitpatana et al., 2008; Gerdabi Targhi et al., 2018; Aarabi et al., 2019; Karbalaie Amini et al., 2021). افزایش میزان آباندازی دسرهای غیر لبنی بر پایه شیر بادام با افزایش میزان جایگزینی ساکارز با استویا را می‌توان به کاهش مواد جامد محلول در فرمولاسیون دسر مرتبط دانست که این امر منجر به کاهش دانسیته و افزایش اندازه حفرات در شبکه پروتئینی در دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام می‌شود.



شکل ۷- (الف) کفایت برازش مدل رگرسیونی و (ب) نمودار سطح پاسخ تاثیر افزودن صمغ کتیرا (A; %) و جایگزینی ساکارز با استویا (B; %) بر آب‌اندازی (%)

Fig. 7-(a) Goodness of fit and (b) Response surface plot showing the effects of Tragacanth gum (A; %), and stevia substitution (B; %) on syneresis (%)

جدول ۲- تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل‌های رگرسیونی برای پاسخ‌های مورد مطالعه

Table 2- Analysis of variance (ANOVA) of the regression models for studied responses

Source منبع	Sum of squares مجموع مربعات	Df درجه آزادی	Mean squares میانگین مربعات	F-value ارزش F	p-value ارزش p
Firmness					
سفتی					
Model مدل	0.012	2	5.79×10^{-3}	185.66	< 0.0001
A-Gum conc. الف- غلظت صمغ	0.010	1	0.010	335.26	< 0.0001
B-Stevia ب- استویا	1.12×10^{-3}	1	1.12×10^{-3}	36.07	< 0.0001
Residual باقیمانده	5.62×10^{-4}	18	3.12×10^{-5}		
Lack-of-Fit عدم برازش	5.53×10^{-4}	6	9.23×10^{-5}	133.28	< 0.0001
Pure Error خطای خالص	8.31×10^{-6}	12	6.92×10^{-7}		
Cor Total کل	0.012	20			
R ² ضریب تبیین	0.9538	Adj-R ² ضریب تبیین تعدیل شده	0.9486	C.V.% ضریب واریانس %	10.47
Viscosity					
ویسکوزیته					
Model مدل	3.29	3	1.10	809.82	< 0.0001
A-Gum conc. الف- غلظت صمغ	3.22	1	3.22	2371.85	< 0.0001
B-Stevia ب- استویا	0.064	1	0.064	47.50	< 0.0001

AB	0.014	1	0.014	10.10	0.0055
Residual	0.023	17	1.35×10^{-3}		
باقیمانده					
<i>Lack-of-Fit</i>	0.023	5	4.58×10^{-3}	502.83	< 0.0001
عدم برازش					
Pure Error	1.09×10^{-4}	12	9.12×10^{-6}		
خطای خالص					
Cor Total	3.32	20			
کل					
R ²	0.9931	Adj-R ²	0.9918	C.V.%	5.00
ضریب تبیین		ضریب تبیین تعدیل شده		ضریب واریانس %	
L*					
Model	91.70	5	18.34	23.11	< 0.0001
مدل					
A-Gum conc.	37.63	1	37.63	47.42	< 0.0001
الف - غلظت صمغ					
B-Stevia	21.07	1	21.07	26.55	0.0001
ب - استویا					
AB	10.72	1	10.72	13.50	0.0023
A ²	8.34	1	8.34	10.50	0.0055
B ²	6.08	1	6.08	7.66	0.0144
Residual	11.91	15	0.79		
باقیمانده					
<i>Lack-of-Fit</i>	11.88	3	3.96	2119.11	< 0.0001
عدم برازش					
Pure Error	0.022	12	1.86×10^{-3}		
خطای خالص					
Cor Total	103.61	20			
کل					
R ²	0.8851	Adj-R ²	0.8468	C.V.%	1.04
ضریب تبیین		ضریب تبیین تعدیل شده		ضریب واریانس %	
a*					
Model	7.36	2	3.68	54.21	< 0.0001
مدل					
A-Gum conc.	7.35	1	7.35	108.38	< 0.0001
الف - غلظت صمغ					
B-Stevia	3.20×10^{-3}	1	3.20×10^{-3}	0.047	0.8303
ب - استویا					
Residual	1.22	18	0.068		
باقیمانده					
<i>Lack-of-Fit</i>	1.22	6	0.20	2913.95	< 0.0001
عدم برازش					
Pure Error	8.37×10^{-4}	12	6.97×10^{-5}		
خطای خالص					
Cor Total	8.58	20			
کل					
R ²	0.8576	Adj-R ²	0.8418	C.V.%	4.42
ضریب تبیین		ضریب تبیین تعدیل شده		ضریب واریانس %	

ادامه جدول ۲-

Continue of Table 2-

Source منبع	Sum of squares مجموع مربعات	Df درجه آزادی	Mean squares میانگین مربعات	F-value ارزش F	p-value ارزش p
b*					
Model مدل	3.66	2	1.83	14.27	0.0002
A-Gum conc. الف - غلظت صمغ	3.46	1	3.46	26.99	< 0.0001
B-Stevia ب - استویا	0.20	1	0.20	1.56	0.2278
Residual باقیمانده	2.31	18	0.13		
Lack-of-Fit عدم برازش	2.31	6	0.38	3061.83	< 0.0001
Pure Error خطای خالص	1.50×10^{-3}	12	1.25×10^{-4}		
Cor Total کل	5.97	20			
R ² ضریب تبیین	0.6133	Adj-R ² ضریب تبیین تعدیل شده	0.5703	C.V.% ضریب واریانس %	5.92
Total soluble solids مواد جامد محلول کل					
Model مدل	9.59	2	4.80	28.55	< 0.0001
A-Gum conc. الف - غلظت صمغ	8.33	1	8.33	49.58	< 0.0001
B-Stevia ب - استویا	1.26	1	1.26	7.51	0.0134
Residual باقیمانده	3.02	18	0.17		
Lack-of-Fit عدم برازش	2.93	6	0.49	61.44	< 0.0001
Pure Error خطای خالص	0.095	12	7.94×10^{-3}		
Cor Total کل	12.62	20			
R ² ضریب تبیین	0.7603	Adj-R ² ضریب تبیین تعدیل شده	0.7337	C.V.% ضریب واریانس %	5.45
Syneresis آب اندازی					
Model مدل	374.83	2	187.41	90.30	< 0.0001
A-Gum conc. الف - غلظت صمغ	355.34	1	355.34	171.22	< 0.0001
B-Stevia ب - استویا	19.49	1	19.49	9.39	0.0067
Residual باقیمانده	37.36	18	2.08		
Lack-of-Fit عدم برازش	37.34	6	6.22	4520.56	< 0.0001
Pure Error خطای خالص	0.017	12	1.37×10^{-3}		
Cor Total کل	412.18	20			
R ² ضریب تبیین	0.9094	Adj-R ² ضریب تبیین تعدیل شده	0.8993	C.V.% ضریب واریانس %	8.58

بهینه‌سازی فرمولاسیون دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام

فرمولاسیون دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام حاوی صمغ کتیرا و استویا با هدف دستیابی به حداکثر سفتی بافت، ویسکوزیته، روشنایی و مواد جامد محلول و به حداقل رساندن قرمزی- سبزی، زردی- آبی و آب‌اندازی از طریق تکنیک عددی بهینه‌سازی گردید. برای دستیابی به اهداف مذکور می‌توان از صمغ کتیرا به میزان ۱ درصد و ۴۵ درصد جایگزینی ساکارز با استویا استفاده نمود. تحت این شرایط میزان سفتی بافت (۰/۰۸ نیوتن)، ویسکوزیته (۱/۲۰ پاسکال.ثانیه)، روشنایی (۸۲/۷۷)، قرمزی- سبزی (۰/۹۵)، زردی- آبی (۵/۶۰)، مواد جامد محلول (۸/۲۹ درجه بریکس) و آب‌اندازی (۱۱/۸۸ درصد) بود. عدم وجود تفاوت چشمگیر بین مقادیر به‌دست آمده از مدل و مشاهدات تجربی (حداقل ۵ تکرار) به خوبی کارایی مدل را اثبات می‌نماید. مقادیر تجربی سفتی بافت (۰/۱۰±۰/۰۳ نیوتن)، ویسکوزیته (۱/۱۵±۰/۲۴ پاسکال.ثانیه)، روشنایی (۸۳/۱۷±۱/۸۱)، قرمزی- سبزی (۰/۸۸±۰/۱۰)، زردی- آبی (۵/۳۶±۰/۸۶)، مواد جامد محلول (۷/۸۶±۰/۹۰ درجه بریکس) و آب‌اندازی (۱۲/۰۸±۱/۰۳ درصد) بود.

ویژگی‌های حسی

نتایج ارزیابی ویژگی‌های حسی دسر غیر لبنی حاوی سطوح بهینه صمغ کتیرا و استویا و نمونه کنترل (فاقد صمغ کتیرا و حاوی ساکارز) در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس امتیازات ارزیابان حسی با افزودن صمغ و جایگزینی استویا به فرمولاسیون دسر غیر لبنی امتیاز ویژگی بافت به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافت. دلیل افزایش امتیاز بافت در نمونه‌های حاوی صمغ کتیرا و استویا را می‌توان به بهبود احساس دهانی دسر در اثر افزودن صمغ مرتبط دانست چرا که عموماً مصرف‌کنندگان بافت خیلی رقیق و یا خیلی غلیظ را

نمی‌پسندند. در این راستا لازم به ذکر است که میزان مواد جامد محلول کل، سفتی بافت و ویسکوزیته نمونه کنترل به ترتیب 6.50 ± 0.35 درجه بریکس، 0.01 ± 0.41 نیوتن و 0.38 ± 0.11 پاسکال.ثانیه بود که به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کمتر از نمونه بهینه می‌باشند. بر اساس نتایج به‌دست آمده ارزیابان حسی نتوانستند تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) در ویژگی‌های رنگ، مزه و عطر و طعم نمونه بهینه و نمونه کنترل قائل شوند. بررسی نتایج مولفه‌های رنگ حاکی از عدم وجود تفاوت معنی‌دار ($p > 0.05$) بین مولفه‌های رنگ نمونه کنترل و بهینه بود به‌طوری‌که برای نمونه کنترل میزان روشنایی (84.88 ± 1.72)، قرمزی- سبزی (0.70 ± 0.13) و زردی- آبی (3.90 ± 0.62) به‌دست آمد. نتایج بررسی ظاهر دسرهای حاکی از آن است که نمونه حاوی صمغ کتیرا و استویا در مقایسه با نمونه کنترل به‌طور معنی‌دار ($p < 0.05$) از امتیاز بالاتری برخوردار است. بالاتر بودن امتیاز ظاهر نمونه حاوی سطوح بهینه صمغ کتیرا و استویا را می‌توان به اثر پایدار کنندگی صمغ کتیرا نسبت داد. نتایج میزان آب‌اندازی نمونه‌ها نیز تایید کننده امتیاز ظاهر بالاتر نمونه بهینه می‌باشد چراکه میزان آب‌اندازی نمونه کنترل (1.02 ± 1.18 درصد) به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) بیشتر از نمونه بهینه (1.08 ± 1.20 درصد) بود. همان‌طور که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود افزودن صمغ کتیرا و جایگزینی استویا در سطوح بهینه سبب افزایش امتیاز پذیرش کلی نسبت به نمونه کنترل شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان اذعان نمود که افزودن صمغ کتیرا سبب بهبود ویژگی‌های حسی دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام می‌شود در حالی‌که با جایگزینی استویا بدون تاثیر منفی بر ویژگی‌های حسی می‌توان به فرآورده‌ای با کالری کاهش یافته دست یافت.

جدول ۳- امتیازات ارزیابی ویژگی‌های حسی دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام با فرمولاسیون بهینه و نمونه کنترل

Table 3- Sensorial properties evaluation scores for optimized and control formulation of non-dairy dessert based on almond milk

Treatment تیمار	Texture بافت	Color رنگ	Appearance ظاهر	Taste مزه	Flavor عطر و طعم	Total acceptance پذیرش کلی
Control (100% Sucrose) کنترل (۱۰۰٪ ساکارز)	2.2±0.56 ^b	3.93±0.79 ^a	3.26±0.70 ^b	4.13±0.35 ^a	3.86±0.74 ^a	3.06±0.45 ^b
Optimized (1% T. gum+45% stevia substitution) بهینه (۱٪ صمغ کتیرا+۴۵٪ جایگزینی استویا)	4.53±0.51 ^a	4.00±0.84 ^a	4.66±0.48 ^a	4.20±0.41 ^a	3.86±0.83 ^a	4.60±0.50 ^a

*Different lowercase superscripts in a column express significant difference between means ($p < 0.05$).

*حروف کوچک متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری

جامد محلول و آب‌اندازی و افزایش مولفه روشنایی گردید اما تاثیر معنی‌داری بر میزان مولفه قرمزی- سبزی نداشت. فرمولاسیون بهینه دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام برای دستیابی به حداکثر سفتی بافت، ویسکوزیته، مولفه روشنایی و مواد جامد محلول و به حداقل رساندن مولفه‌های قرمزی- سبزی، زردی- آبی و آب‌اندازی شامل افزودن صمغ کتیرا به میزان ۱ درصد و جایگزینی استویا به میزان ۴۵ درصد بود. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که علاوه بر قابل اطمینان بودن روش شناسی سطح- پاسخ برای انتخاب شرایط بهینه فرمولاسیون می‌توان با افزودن صمغ کتیرا و استویا یک فراورده جدید با کالری کاهش یافته، فراسودمند و مشتری پسند به بازار مصرف عرضه نمود. برای پژوهش‌های آتی می‌توان غنی‌سازی دسر غیرلبنی بر پایه شیر بادام با ترکیبات زیست فعال و افزایش زمان ماندگاری را در نظر گرفت.

پژوهش حاضر با توجه به اهمیت توسعه فراورده‌های غیر لبنی برای افرادی که قادر به مصرف فراورده های لبنی نیستند و همچنین پاسخ به نیازها و تغییر عادات غذایی مصرف کنندگان صورت پذیرفت. در این راستا تاثیر افزودن صمغ کتیرا و استویا به‌عنوان جایگزین ساکارز در فرمولاسیون دسر غیر لبنی بر پایه شیر بادام بررسی و بهینه‌سازی گردید. با توجه به میزان کم چربی شیر بادام (۲/۶۶ درصد) افزودن صمغ کتیرا توانست خصوصیات بافتی ضعیف این دسر غیر لبنی را به‌طور چشمگیری بهبود بخشد. به‌علاوه با افزودن صمغ کتیرا میزان ویسکوزیته، مولفه قرمزی- سبزی و مواد جامد محلول افزایش و در مقابل میزان مولفه روشنایی، مولفه زردی- آبی و آب‌اندازی کاهش یافت. افزایش میزان جایگزینی ساکارز با استویا منجر به کاهش سفتی بافت، ویسکوزیته، مولفه زردی- آبی، مواد

منابع

1. Aarabi, A., Mehraban sangatash M., Karazhyan, R., & Ehtiati A. (2019). Optimization of non-dairy fermented dessert formulations based on almond milk. *Journal of Food Science and Technology (Iran)* 16(94): 113-126.
2. Alirezaee, N., & Barzegar, H. (2017). The effect of inulin and guar hydrocolloids on rheological propertise of pulp and Bread texture by response surface method (RSM). *Iranian Journal of Innovation in Sciences & Technology*, 10(1): 119-129.
3. Alizadeh, M., Azizi-Lalabadi, M., & Kheirouri, S. (2014). Impact of using stevia on physicochemical, sensory, rheology and glycemic index of soft ice cream. *Food and Nutrition Sciences* 5: 390-396. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.54047>.
4. AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th Ed., Published by the Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.
5. Aportela Palacios, A., Sosa Morales, M.E., & Vélez- Ruiz, J.F. (2005). Rheological and physicochemical behavior of fortified yogurt, with fiber and calcium. *Journal of Texture Studies* 36(3): 333-349. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2005.00020.x>.
6. Aranda-Gonzalez, I., Perera-Pacheco, M., Barbosa-Martin, E., & Betancur-Ancona, D. (2016). Replacing sugar with *S. rebaudiana* extracts on the physicochemical and sensory properties of strawberry ice cream. *Ciencia Rural* 46: 604-609. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150505>.
7. Asgari, E., & Goli, M. (2018). Survey on the effect of sucrose replacement with Stevia (*Stevia rebaudiana*) powder and tragacanth gum on physico-chemical, rheological and sensorial properties of apricot nectar. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology (JRIFST)* 7(1): 105-118.
8. Ayar, A., Sert, D., & Akbulut, M. (2009). Effect of salep as a hydrocolloid on storage stability of 'T'ncir Uyutması' dessert. *Food Hydrocolloids* 23: 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.11.014>.
9. Bayarri, S., Chulia, I., & Costell, E. (2010). Comparing λ -carrageenan and an inulin blend as fat replacers in carboxymethyl cellulose dairy desserts. Rheological and sensory aspects. *Food Hydrocolloids* 24(6): 578-587. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.02.004>.
10. Bernat, N., Chafer, M., Rodríguez-García, J., Chiralt, A., & Gonzalez-Martínez, C. (2015). Effect of high pressure homogenisation and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. *LWT - Food Science and Technology* 62: 488-496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.045>.
11. Chen, C.Y., Milbury, P.E., Lapsley, K., & Blumberg, J.B. (2005). Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *Journal of Nutrition* 135(6): 1366-1373. <https://doi.org/10.1093/jn/135.6.1366>.
12. Dhakal, S., Liu, C., Zhang, Y., Roux, K.H., Sathe, S.K., & Balasubramaniam, V.M. (2014). Effect of high pressure processing on the immunoreactivity of almond milk. *Food Research International* 62(215): 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.021>.
13. Faghhih Zadeh Gorji, E., & Sharifi, A. (2020). Study of physicochemical, microbial and rheological properties of gelatin dissert with stevia sweetener. *Journal of Innovation in Food Science and Technology* 11(4): 1-11.

14. Falah Shojaee, M., Sadeghi Mahoonak, A.R., Khomeiri, M., & Ghorbani, M. (2018). Evaluation of antioxidant activity of methanol extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni and investigation of this properties in dairy dessert *EJFPP* 8(2): 69-90.
15. Gerdabi Targhi, S., Aminifar, M., & Moslehishad, M. (2018). Optimization pistachio milk formulation using response surface methodology and evaluation of its viscosity, physicochemical and sensory properties. *Iranian Journal of Food Science and Technology* 15(75): 161-172.
16. Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E., & Montero, M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* 25(8): 1813-1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>.
17. Granato, D., Ribeiro, J.C.B., Castro, I.A., & Masson, M.L. (2010). Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chemistry* 121: 899-906. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.014>.
18. Grundy, M. ML., Grassby, T., Mandalari, G., Waldron, K.W., Butterworth, P.J., Berry, S.E., & Ellis, P.R. (2015). Effect of mastication on lipid bioaccessibility of almonds in a randomized human study and its implications for digestion kinetics, metabolizable energy, and postprandial lipemia. *The American Journal of Clinical Nutrition* 101: 25-33. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.088328>.
19. Hashemi, N., Rabie, H., Tavakolipour, H., & Gazerani, S. (2015). Effect of stevia (*Stevia rebaudiana*) as a substitute for sugar on physicochemical, rheological and sensory properties of dietary saffron syrup saffron. *Agronomy and Technology* 2(4): 303-310.
20. Homayouni Rad, A., Delshadian, Z., Arefhosseini, S.R., Alipour, B., & Asghari Jafarabadi, M. (2012). Effect of inulin and stevia on some physical properties of chocolate milk. *Health Promotion Perspectives* 2(1): 42-47. <https://doi.org/10.5681/hpp.2012.005>.
21. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2012). *Milk and milk products- Milk-base desserts- Specification and test method*, ISIRI no 14681. Karaj: ISIRI.
22. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2006). *Milk and milk products – Determination of titrable acidity and value pH – Test method*, ISIRI no 2852. Karaj: ISIRI.
23. Jalali-khanabadi, B.-A., Mozaffari-Khosravi, H., & Parsaeyan, N. (2010). Effects of almond dietary supplementation on coronary heart disease lipid risk factors and serum lipid oxidation parameters in men with mild hyperlipidemia. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 16: 1279-1283. <https://doi.org/10.1089/acm.2009.0693>.
24. Jenkins, D., Kendell, C., Marchie, A., Josse, A.R., Nguyen, T.H., & Faulkner, D.A. (2008). Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. *Journal of Nutrition* 138: 908-913. <https://doi.org/10.1093/jn/138.5.908>.
25. Jooyandeh, H., Rostamabadi, H., & Goudarzi, M. (2019). Effect of psyllium husk, basil, and cress seed mucilages on rheological behavior of low-fat chocolate dairy dessert. *Journal of Food Research* 29(1): 83-98.
26. Jooyandeh, H., Rostamabadi, H., & Goudarzi, M. (2019). Effect of Zedo and almond gums as fat replacers on flow behavior and organoleptic characteristics of vanilla low-fat dairy dessert. *Journal of Food Technology and Nutrition* 16(2): 15-24.
27. Kamil, A., & Chen, C.Y. (2012). Health benefits of almonds beyond cholesterol reduction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 60(27): 6694-6702. <https://doi.org/10.1021/jf2044795>.
28. Karajian, H., Mehrafza, E., & Daliry, N. (2015). *Evaluation of different concentration of Lepidium sativum gum on physicochemical characteristics and viscosity of dairy dessert*. National Conference on Food Science and Technology.
29. Karbalaee Amini, S.S., Aminifar, M., & Yousefi, S.S. (2021). Evaluation of structural and sensory physicochemical properties of low – fat milky dessert modified with Quince (*Cydonia oblonga*) and Balangu (*Lallemantia*) native gums. *Iranian Journal of Food Science and Technology* 18(111): 131-146.
30. Kennelly, E.J. (2001). Sweet and nonsweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). In: *Stevia, the genus Stevia*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 19(2): 68-85.
31. Li, Y.-t., Chen, M.-s., Deng, L.-z., Liang, Y.-z., Liu, Y.-k., Liu, W., Liu, C.-m. (2021). Whole soybean milk produced by a novel industry-scale microfluidizer system without soaking and filtering. *Journal of Food Engineering* 291: 110228. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110228>.
32. Maghsoudlou, Y., Alami, M., Mashkour, M., & Hashemi Shahraki, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted stabilization and formulation of almond milk. *Journal of Food Processing and Preservation* 40(5): 828-839. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12661>.
33. Mandalari, G., Rigby, N.M., Bisignano, C., Curto, R.B.L., Mulholland, F., Su, M., & Roux, K.H. (2014). Effect of food matrix and processing on release of almond protein during simulated digestion. *LWT- Food Science and Technology* 59: 439-447. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.005>.

34. Mehrabi, Z., & Goli, M. (2018). Production of dairy dessert based on formulation of date syrup, corn starch and gelatin using response surface methodology (RSM). *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 13(3): 115-125.
35. Milani, E., Baghaei, H., & Mortazavi, S.A. (2011). Evaluation of dates syrup and guar gum addition on physicochemical, viscosity & textural properties of low fat orange yog-ice cream. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 7(2): 115-120.
36. Morreale, F., Garzón, R., & Rosell, C.M. (2018). Understanding the role of hydrocolloids viscosity and hydration in developing gluten-free bread. A study with hydroxypropylmethylcellulose. *Food Hydrocolloids* 77: 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.004>.
37. Nateghi, L., Ahmadi, M., & Shahablavasani, A. (2019). Effect of mulberry syrup and basil seed and tragacanth gums on physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of chocolate milk. *Food Engineering Research* 18(66): 87-100.
38. Samavati, V. (2013). Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 95: 588-597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.041>.
39. Sang, S., Cheng, X., Fu, H.-Y., Shieh, D.-E., Bai, N., Lapsley, K., Ho, C.-T. (2002). New type sesquiterpene lactone from almond hulls (*Prunus amygdalus* Batsch). *Tetrahedron Letters* 43: 2547-2549.
40. Sheybani, M., Pourahmad, R., & Eshaghi, M.R. (2018). Effect of sucrose replacement with rebaudioside A and isomalt on viability of probiotic bacteria and physicochemical and sensory properties of kefir ice cream. *Journal of Food Research* 28(4): 143-154.
41. Siriwardhana, S.S.K.W., & Shahidi, F. (2002). Antiradical activity of extracts of almond and its by-products. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79(903): 903-908. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0577-4>.
42. Supavititpatana, P., Wirjanatoro, T.I., Apichartsrangkoon, A., & Raviyan, P. (2008). Addition of gelatin enhanced gelation of corn-milk yogurt. *Food Chemistry* 106(1): 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.058>.
43. Tan, S.Y., & Mattes, R. (2013). Appetitive, dietary and health effects of almonds consumed with meals or as snacks: a randomized, controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* 67: 1205-1214.
44. Tárrega, A., & Costell, E. (2006). Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy dessert. *International Dairy Journal* 16(9): 1104-1112. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.002>.
45. Valencia Flores, D.C., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2013). Comparing the effects of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical, and chemical quality of almond beverages. *Journal of Food Science* 78(2): 199-205.
46. Vareltzis, P., Adamopoulos, K., Stavrakakis, E., Stefanakis, A., & Goula, A.M. (2016). Approaches to minimise yoghurt syneresis in simulated tzatziki sauce preparation. *International Journal of Dairy Technology* 69(2): 191-199. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12238>.
47. Walter, J.M., & Soliah, L. (2010). Objective measures of baked products made with Stevia. *Journal of the American Dietetic Association* 110(9): 54-57. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.06.196>.
48. Wang, X., Ye, A., & Singh, H. (2020). Structural and physicochemical changes in almond milk during *in vitro* gastric digestion: impact on the delivery of protein and lipid. *Food & Function* 11: 4314-4326. <https://doi.org/10.1039/C9FO02465D>.
49. Weiping, W., & Branwell, A. (2000). *Tragacanth and karaya*. PP. In: G.O. Phillips, P.A. Williams editors. Handbook of hydrocolloids. First Edition. Cambridge, Woodhead Publishing Ltd. and Boca Raton, CRC Press LLC.
50. Yanes, M., Duran, L., & Costell, E. (2002). Effect of hydrocolloid type and concentration on behaviour and sensory properties of milk beverages model systems. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* 16(6): 605-611. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00023-1).
51. Zhihua, P., Deeth, H., & Bansal, N. (2015). Effect of polysaccharides with different ionic charge on the rheological, microstructural and textural properties of acid milk gels. *Food Research International* 72: 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.009>.
52. Zomorodi, S., Karimpour Sohragheh, M., & Behmadi, H. (2018). Effect of mung bean flour and tragacanth gum on physicochemical properties and shell color indexes of the cacao sponge cake. *Food Engineering Research* 17(64): 29-40.



Modeling the Ultrasonic Atomization Process of Milk and Powder Production Using Spray Drying Method

A. Heydari^{1*}, M. Goharimanesh², M.R. Gharib³, A. Koochi⁴

Received: 2022.04.24

Revised: 2022.05.29

Accepted: 2022.05.31

Available Online: 2022.05.31

How to cite this article:

Heydari, A., Goharimanesh, M., Gharib, M.R., & Koochi, A. (2023). Modeling the ultrasonic atomization process of milk and powder production using spray drying method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 145-168. (In Persian with English abstract). <http://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.75615.1154>

Introduction

The beneficial use of ultrasonic systems has been proven in many applications. Among them, ultrasonic atomization is widely used in various industries, including food and coating industries. Ultrasonic vibrations of liquids can produce fine droplets called atomized fluid. During the fluid atomization process, droplet size and distribution can be precisely controlled so that the droplets become very small and high-level particle distribution is achieved which can be easily evaporated. This method is widely used in various industries, including food industry (for the production of dried powder products) and coating industry. The key factor that affects droplet size is the frequency and amplitude of the ultrasonic vibrations and the properties of the fluid, including the fluid viscosity and surface tension.

Materials and Methods

Based on a review of literature, it is clear that the modeling of the ultrasonic method for spray dryers and the production of milk powder has not been done so far. In the present work, first, the research background is reviewed and then, using the relationships provided for the ultrasonic atomization of different fluids in the reviewed articles, the effect of ultrasonic vibrations on the atomization and evaporation of milk as a food and the powder production was studied using spray drying process. Then the effects of various oscillation parameters such as frequency, amplitude and also the temperature of the fluid, which affects its viscosity, density and surface tension, on the rate of atomization of the fluid was investigated. In the present work, we first examine the fluid whose range of properties is true in relations. One of the most widely used liquids in the food industry is milk. By examining the viscosity, surface tension and density of the milk and obtaining the dimensionless numbers We , In and Oh , it is determined that the provided relations can also be used for milk. After calculating the diameter of the evaporated particles of milk due to ultrasonic vibrations as well as the evaporation rate, the independent variables of the research can be changed. First, in the constant physical properties of a fluid, we change the frequency and amplitude of ultrasonic oscillations and studied their effect on the produced particle diameter and evaporation rate. In the next step, with the constant frequency and amplitude of ultrasonic oscillations, the effect of changes in fluid properties (temperature change) on the produced particle diameter and evaporation rate was investigated. In the next step the effect of frequency and amplitude of ultrasonic fluctuations as well as changes in fluid properties (temperature change) on the powder diameter produced and the time required for the drying process was investigated. The analysis of all data obtained from the above steps was performed using Matlab software.

Results and Discussion

The main and summary results obtained from the present study are as follows:

- As the amplitude of the vibrations and the temperature of the milk increased, the drying time required for the evaporation of droplets decreased, but the powder diameter and the evaporation rate increased.

1, 2, 3 and 4- Assistant Professors, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Mechanical Engineering, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: a.heydary@torbath.ac.ir)

DOI: [10.22067/IFSTRJ.2022.75615.1154](https://doi.org/10.22067/IFSTRJ.2022.75615.1154)

- As the frequency of vibrations increased, the drying time required for the evaporation of droplets increased, but the powder diameter and the evaporation rate decreased.
- The results showed that quadrupling the amplitude of the vibrations reduces the time required for the droplets to dry by 14.4% and increases the evaporation rate by 62.6%. At a constant temperature of the gas dryer and the milk, changing the frequency from 10 to 40 kHz results in 21.4% increase in the time required for the droplets to dry. Also, with increasing the temperature of the milk from 15 to 30°C, at a constant frequency and amplitude of vibrations, the time required for drying the droplets decreases by 12.4% and the diameter of the particles produced increases by 11.3%.

Conclusion

In this research, the process of ultrasonic assisted evaporation of whole milk and drying and production of milk powder has been modeled mathematically and thermodynamically. The calculation code was written using Mathlab software and after making sure that the solution conditions are in the desired range of equations, the results were presented. In the present work, the effect of the frequency and amplitude of ultrasonic vibrations as well as the initial temperature of milk on the diameter of the evaporated particles, the evaporation rate, the diameter of the powder produced and the time required for the evaporated droplets to dry by ultrasonic method was investigated.

Keywords: Atomization, Oscillation amplitude, Oscillation frequency, Spray drying, Ultrasonic

مقاله پژوهشی

مدلسازی فرآیند اتمیزاسیون التراسونیک شیر و تولید پودر شیر به روش خشک کردن

پاششی

علی حیدری^{۱*} - مسعود گوهری منش^۲ - محمدرضا قریب^۳ - علی کوچی^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۳/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۰

چکیده

استفاده از سیستم‌های التراسونیک در بسیاری از مسائل کاربردی اثبات شده است. از جمله آنها اتمیزاسیون التراسونیک بوده که در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی و پوشش‌دهی کاربرد فراوانی دارد. در پژوهش پیش رو، ابتدا به مرور کارهای انجام شده در این زمینه پرداخته شده و پس از آن با استفاده از روابط ارائه شده برای اتمیزاسیون سیالات مختلف در مقالات بررسی شده، به بررسی تأثیر ارتعاشات التراسونیک بر اتمیزاسیون و تبخیر شیر به عنوان یک ماده غذایی پرداخته و فرآیند خشک شدن آن به روش خشک کن پاششی پیش‌بینی گردید. سپس به بررسی اثر پارامترهای مختلف نوسان از جمله فرکانس، دامنه و همچنین دمای سیال بر نرخ اتمیزه شدن سیال پرداخته شد. نتایج مدلسازی نشان داد که با افزایش دامنه ارتعاشات، زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک کاهش یافته و همچنین قطر پودر تولید شده، قطر ذرات تبخیر شده و نرخ تبخیر به روش التراسونیک افزایش یافت. بطوری که ۴ برابر شدن دامنه ارتعاشات باعث کاهش ۱۴،۴ درصدی زمان لازم برای خشک شدن قطرات و افزایش ۶۲،۶ درصدی نرخ تبخیر شد. همچنین با مدلسازی فرآیند مشخص شد که با افزایش فرکانس ارتعاشات، زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک افزایش یافت. بطوری که در یک دمای ثابت گاز خشک کن و دمای ثابت شیر تغییر فرکانس از ۱۰ به ۴۰ کیلو هرتز منجر به افزایش ۲۱،۴ درصدی زمان لازم برای خشک شدن قطرات شد. همچنین با افزایش دمای شیر از ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد، در یک فرکانس و دامنه ارتعاشات ثابت، زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده ۱۲،۴ درصد کاهش و قطر ذرات تولید شده ۱۱،۳ درصد افزایش داشت.

واژه‌های کلیدی: اتمیزاسیون، التراسونیک، دامنه نوسان، فرکانس نوسان، خشک کردن پاششی

مقدمه

راحتی تبخیر شوند. این روش در صنایع مختلف از جمله در صنایع غذایی برای تولید پودر خشک محصولات و همچنین در صنعت پوشش‌دهی کاربرد فراوانی دارد. عامل کلیدی که بر اندازه قطره تأثیر می‌گذارد، فرکانس و دامنه ارتعاشات اولتراسونیک است. یکی دیگر از مهمترین عوامل تأثیرگذار بر پاشش التراسونیک، خصوصیات سیال از جمله لزجت و کشش سطحی سیال است. مکانیزم‌های مختلف شکل‌گیری قطرات تحت ارتعاشات التراسونیک در شکل ۱ مشاهده

می‌شود. (Broniarz-Press et al., 2015)

ارتعاشات التراسونیک^۵ مایعات می‌تواند آنها را به قطرات بسیار ریزی تبدیل کند که به این فرآیند، اتمیزه‌شدن^۶ سیال گفته می‌شود. در حین فرآیند اتمیزه‌شدن سیال، اندازه قطرات و توزیع آنها را می‌توان دقیقاً کنترل کرد به طوری که قطرات بسیار کوچک شوند. بنابراین توزیع ذرات با سطح تماس بالا با هوا ایجاد شده تا قطرات بتوانند به

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب استادیاران، دانشیار و استادیار گروه مکانیک، دانشگاه تربت

حیدریه، تربت حیدریه، ایران

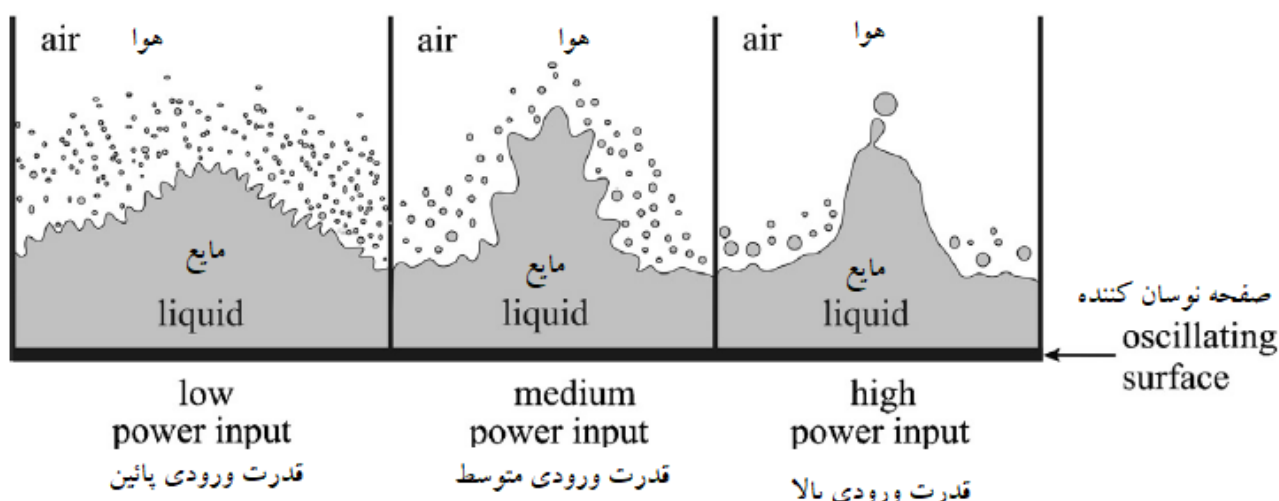
(Email: a.heydari@torbath.ac.ir)

(*)- نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.75615.1154

5- Ultrasonic

6- Atomization



شکل ۱- مکانیزم‌های مختلف شکل‌گیری بخار سیال بر اساس قدرت التراسونیک ورودی (Broniarz-Press *et al.*, 2015)

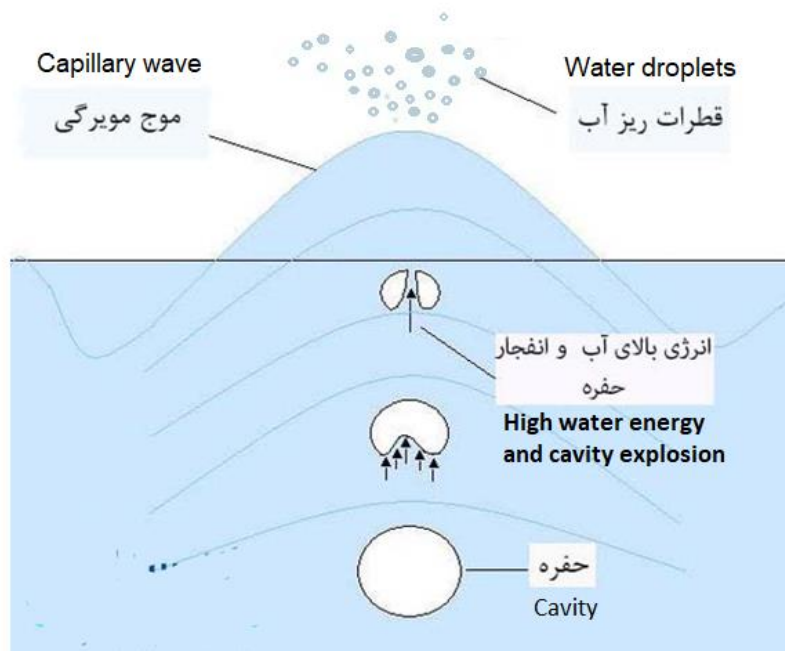
Fig. 1- Different mechanisms of fluid vapor formation based on the input ultrasonic power (Broniarz-Press *et al.*, 2015)

جریان الکتریکی در فرکانس التراسونیک (که در این فرکانس دیگر صدای موج ایجاد شده در آب شنیده نمی‌شود) نوسان می‌کند و منجر به نوسان آب می‌شود. آب هم تلاش می‌کند تا نوسان فرکانس بالای صفحات را دنبال کند. اما به دلیل اینرسی جرم و وزن نسبی نمی‌تواند در همان فرکانس نوسان کند و موج آب با تاخیر در پشت موج دیسک حرکت می‌کند. در نتیجه یک منطقه کم فشار بین آن‌ها ایجاد می‌شود که یک حفره را شکل می‌دهد. حفره می‌تواند خلاء باشد و یا از هوا پر شود. زیرا در آب هوای محلول نیز وجود دارد که با ایجاد ناحیه کم فشار به سمت حفره حرکت می‌کند. این حفره وقتی منفجر می‌شود انرژی زیادی ایجاد می‌کند (Briceño-Gutierrez *et al.* 2015). این مکانیزم در شکل ۲ آمده است.

تقریباً از سال ۲۰۰۰ تحقیقات در زمینه اتمیزه کننده‌های التراسونیک در جهان به طور جدی آغاز شده و تاکنون پیشرفت‌های مهمی داشته است. اغلب کارهای انجام شده با رویکرد استفاده در خشک‌کن‌های پاششی انجام شده است اما در یکی از تحقیقات انجام شده از اتمیزاسیون التراسونیک برای غنی‌سازی اتانول با افزودن نمک‌های مختلف به آن استفاده شده است (Koumei *et al.*, 2009, Kirpalani *et al.*, 2011). تمبلی و همکاران (Tembely *et al.*, 2011) در یک کار تجربی و تحلیلی بر روی مدلی جدید از اتمیزه کننده التراسونیک که میزان اسپری بر اساس مصرف تنظیم می‌شود، مدلی جدید برای تقریب و ارزیابی سایز قطرات پاشش شده ارائه دادند. در این تحقیق نشان داده شده است که مدل پویا نسبت به شرایط کاری و خصوصیات فیزیکی سیال حساس است.

در مورد مایعات خالص فقط خواص فیزیکی بر اتمیزاسیون تأثیر گذار است. اما در محلول‌ها، سایز ذرات جامد و غلظت محلول نیز بر فرآیند اتمیزاسیون تأثیر گذار است. در محلول‌ها سایز ذرات جامد حل شده باید بسیار کوچکتر از اندازه قطر قطرات مایع باشد. در غیر اینصورت اتمیزاسیون باعث جدا شدن جامد و مایع می‌شود. ضمناً غلظت مواد جامد محلول در مایع نباید بیشتر از ۴۰ درصد باشد (Lisboa *et al.*, 2018). فرآیند خشک کردن با خشک‌کن پاششی عبارت است از تبدیل خوراک از حالت مایع (محلول و سوسپانسیون) به ذرات خشک جامد. این فرآیند توسط اسپری کردن محلول در محیطی که گرمای لازم جهت خشک کردن با استفاده از هوای گرم تأمین شده است، انجام می‌گیرد. این سیستم یک فرآیند مدام و پیوسته است و خوراک مورد نظر می‌تواند محلول و یا حتی خمیر یا دوغاب باشد. بر اساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خوراک، محصول به دست آمده پودری متشکل از ذرات منفرد و ذرات به هم پیوسته است. مهمترین ویژگی پودر به دست آمده یکنواختی ذرات آن می‌باشد که باعث به وجود آمدن خصوصیتی نظیر روان بودن، افزایش سرعت حلالیت، مخلوط شدن آسان با دیگر مواد و همچنین سهولت انجام عملیات بعدی بر روی آن می‌شود. خشک کردن با خشک‌کن‌های پاششی یکی از روش‌های کارآمد و جدید جهت خشک کردن محلول‌هاست از خشک‌کن پاششی به صورت وسیع برای خشک کردن محلول‌ها، سوسپانسیون‌ها، امولسیون‌ها و خمیرها در صنایع غذایی، شیمیایی، داروسازی، سرامیک و غیره استفاده می‌گردد (Samborska *et al.* 2022).

تکنولوژی التراسونیک متشکل از یک دیسک سرامیکی پیزوالکتریک است. سرامیک به دلیل پیزوالکتریک بودن در حضور



شکل ۲- نحوه تولید بخار توسط ارتعاشات التراسونیک
Fig. 2- Steam production due to ultrasonic vibrations

مذاب بر روی گوه ارتعاشی ذرات ریز مذاب از روی سطح بلند شده و در هوای سرد اطراف به صورت پودر فلز در آمدند. نتایج نشان داد، در این فرایند افزایش دمای مذاب به عنوان کاهنده لزجت و کشش سطحی مایع می‌تواند نقش تعیین کننده‌ای در تعیین اندازه قطرات جدا شده و سایز پودر تولید شده داشته باشد (Wisutmethangoon et al., 2011). در پژوهشی دیگر رامیستی و همکاران (Ramisetty et al., 2013) با یک آنالیز تصویری به بررسی توزیع ذرات پخش شده به روش اتمیزاسیون التراسونیک پرداختند که در آن تاثیر فرکانس کاری و مشخصات سیال از جمله دبی جریان سیال بررسی شد. از دیگر کاربردهای اتمیزاسیون التراسونیک رطوبت‌گیری از هوای مرطوب بوده به طوری که بوسیله این سیستم، سیال جاذب رطوبت مانند بروماید لیتیم یا آمونیاک، اتمیزه شده و در جریان هوای مرطوب پاشش می‌شود. به علت افزایش سطح تماس سیال جاذب رطوبت و هوای مرطوب راندمان جذب رطوبت بسیار افزایش می‌یابد. (Yang et al., 2014, 2015, 2016; Zhang et al., 2017; Li et al., 2018). اتمیزاسیون محلول‌های پلیمری نیز می‌تواند توسط این روش انجام شود و نشان داده شده است که افزایش ویسکوزیته محلول، باعث جلوگیری از شکل‌گیری قطرات ریزتر می‌شود. از طرف دیگر کاهش کشش سطحی در محلول منجر به تولید قطرات ریزتر می‌شود (Kim et al., 2015).

در کاربردی دیگر می‌توان از اتمیزاسیون التراسونیک در خشک‌کن‌های سرمایشی استفاده کرد. دی‌آدیو و همکاران (D'Addio et al., 2012) نشان دادند که در اندازه پودر تولید شده در این روش غلظت ماده جامد حل شده بی‌تاثیر بوده و فقط اندازه قطره تولید شده موثر است. همچنین تاتار توران و همکاران (Tatar Turan et al., 2015) در کاری دیگر تولید پودر میکروکپسوله از ترکیبات زیست فعال بلوبری را توسط خشک‌کن سرمایشی انجام دادند که در آن عملکرد نازل‌های التراسونیک با نازل‌های معمولی مقایسه شده است. در یک پژوهش دیگر ایزروغلو و همکاران (Isleroglu et al., 2018) در مورد خشک‌کن‌های سرمایشی با نازل التراسونیک به افزایش خلوص یک داروی خاص با این روش پرداخته‌اند، بطوری که اثر فرکانس التراسونیک و دبی جریان بر میزان فعالیت آنزیم و اندازه ذرات تشکیل شده بررسی شده است. جهت تولید پودر بلوبری کار دیگری نیز انجام شد که از خشک‌کن پاششی استفاده شده و محصول تولید شده با روش خشک‌کن تحت خلاء مقایسه شد (Candia-Muñoz et al., 2015). در یک تحلیل عددی نیز پاشش التراسونیک در یک خشک‌کن پاششی شبیه‌سازی شد که همخوانی خوبی با نتایج تجربی داشت (Lebedev et al., 2017).

در پژوهشی دیگر به کمک نوسانات التراسونیک پس از جریان یافتن آلیاژ SAC ۳۰۵ (فلج-Sn)-نقره-(Ag)-مس (Cu)) بصورت

ضایعات، صرفه‌جویی در مواد را نشان می‌دهد. این ویژگی‌ها مهر تأییدی بر سازگاری این روش با محیط زیست است. با توجه به مرور انجام شده بر روی تحقیقات گذشته مشخص گردید که مدلسازی روش التراسونیک برای خشک‌کن‌های پاششی و تولید پودر شیر تاکنون انجام نشده است. لذا در پژوهش حاضر، پس از پیدا کردن معادلات حاکم بر مسئله، به بررسی تأثیر شرایط نوسانات التراسونیک از جمله فرکانس و دامنه ارتعاشات و همچنین دمای سیال بر قطر ذرات تبخیر شده، نرخ تبخیر، قطر پودر بدست آمده و زمان لازم برای خشک شدن قطرات پرداخته می‌شود. بدین منظور معادلات حاکم بر مسئله توسط نرم‌افزار MATLAB نوشته شده و با بکار بردن فرضیات مناسب در سه حالت شبیه سازی انجام می‌شود. متغیرهای مستقل مسئله شامل فرکانس و دامنه نوسان و همچنین دمای شیر است که در حالت اول در یک دامنه نوسان و دمای شیر ثابت مقدار فرکانس نوسان چهار برابر می‌شود. در حالت دوم در یک فرکانس نوسان و دمای شیر ثابت دامنه نوسان چهار برابر می‌شود و در حالت آخر در یک فرکانس و دامنه نوسان ثابت دمای شیر دو برابر می‌شود.

روش تحلیل مسئله

معادلات مدلسازی تبخیر التراسونیک

مطالعات مربوط به اتمیزاسیون بر روی سطوح ارتعاشی به سال ۱۸۳۰ برمی‌گردد، زمانی که فارادی (Faraday, 1831) کشف کرد که دوره امواج ارتعاشی که بر روی یک لایه مایع روی سطح ارتعاشی تشکیل می‌شود، دو برابر دوره ارتعاش محرک است. رایلی (Rayleigh, 1833) یک رابطه بر اساس طول موج مویرگی، فرکانس ارتعاش، کشش سطحی مایع معرفی کرد و نشان داد که کشش سطحی یک مایع را می‌توان از روی طول موج مویرگی مشاهده شده بر روی سطح مایع ارتعاشی تعیین کرد. بعداً لانگ (Lang, 1962) میانگین قطر قطرات تولید شده از تاج امواج مویرگی را برای سیالات کاری مختلف از جمله آب، روغن و موم‌های مذاب در فرکانس‌های ارتعاش اجباری ۱۰ تا ۸۰۰ کیلوهرتز پیش‌بینی کرد و و یک رابطه بین قطر متوسط قطرات پرتاب شده (D) و طول موج مویرگی (λ) که با معادله زیر نشان داده شده است ارائه کرد:

$$D_{droplet} = 0.34 \left(\frac{8\pi\sigma}{\rho f^2} \right) \quad (1)$$

که در آن σ کشش سطحی و f فرکانس تحریک است. پسکین و همکاران (Peskin et al., 1963) وابستگی متوسط قطر قطرات را به دامنه ارتعاش اجباری و ضخامت لایه مایع موجود در سطح ارتعاشی

تحقیقات پژوهشی دیگری نیز در زمینه تأثیر پارامترهای نوسان و خواص فیزیکی سیال بر اتمیزاسیون التراسونیک انجام شده است. در یک پژوهش تأثیر ویسکوزیته برشی و کششی سیال نیوتنی و غیر-نیوتنی بر اتمیزاسیون التراسونیک آنها بررسی شد و نشان داده شد که تأثیر زیادی بر فرآیند اتمیزاسیون التراسونیک آنها دارد (Broniarz-Press et al., 2015). کیم و همکاران (Kim et al., 2015) در یک پژوهش تجربی دیگر، تأثیر فرکانسهای مختلف نوسان بر اندازه ذرات رطوبت تولید شده به کمک اتمیزه کننده التراسونیک را بررسی کردند و رابطه‌ای بین سایز ذرات تولید شده و فرکانس نوسان ارائه دادند. در یک پژوهش تئوری-تجربی توسط بریسو گوترش و همکاران (Briceño-Gutierrez et al., 2015)، تحلیل تئوری جهت پیش‌بینی رفتار سیال در اتمیزاسیون التراسونیک ارائه شد که در مقایسه با نتایج تجربی نشان داد در این تحلیل، تا فرکانس ۲۲ kHz نتایج با هم همخوانی داشت و در فرکانس‌های بالاتر این تحلیل تئوری با نتایج تجربی انحراف پیدا کرد. دینامیک قطرات اتمیزه شده نیز چالش مهمی است که توسط دیپو و همکاران (Deepu et al., 2018) مورد بررسی قرار گرفت و رژیم‌های مختلف در زمان‌های مختلف اتمیزاسیون یک سیال به صورت تجربی ارائه شد. نتایج نشان داد که که دینامیک اتمیزاسیون وابسته به برهم‌کنش بین مکانیسم تجزیه موج موینگی و تعادل بین نیروهای اینرسی و لزجی سیال است. در آخرین تحقیقات انجام شده در این زمینه ضیایی و همکاران (Ziaee et al., 2020) یک رویکرد منطقی برای خشک کردن اسپری بیوداروها با در نظر گرفتن تولید حرارت از نازل اولتراسونیک بدست آوردند و نشان دادند تولید حرارت از نازل اولتراسونیک برای خشک کردن اسپری لیزوزیم^۱ مضر است. همچنین گراسمیرجر و همکاران (Grasmeijer et al., 2019) به شناسایی مراحل حیاتی پایداری پروتئین در طول خشک کردن اسپری با استفاده از دو نوع نازل مختلف التراسونیک و دو سیالی پرداختند. آنها نشان دادند نوع و پیکربندی نازل مورد استفاده برای خشک کردن اسپری، تعیین‌کننده‌های مهمی برای حفظ پایداری پروتئین هستند، و امکان خنک کردن نازل دو سیال مزیت مهمی نسبت به نازل التراسونیک در فرآیند خشک کردن با اسپری پروتئین‌ها دارد. اما نازل التراسونیک منجر به هزینه اولیه کمتری برای ساخت دستگاه خشک کن اسپری می‌شود. در یک مقاله مروری نایدو و همکاران (Naidu et al., 2022) به بررسی کاربردهای جدید اتمیزه کردن اولتراسونیک در ساخت مواد شیمیایی ریز، داروسازی و تجهیزات پزشکی پرداخته‌اند. با توجه به نتایج آنها استفاده از امواج التراسونیک در کاربردهای اتمیزه کردن مزایای قابل توجهی مانند نیاز به انرژی کم، تولید بدون

$$\left[1 + \left(\frac{\pi\sigma}{\rho f^2} \right)^{-0.2} (N_{We})^{0.154} (N_{Oh})^{-0.11} (N_{In})^{-0.033} \right]$$

معادله فوق برای محدوده متغیرها به صورت زیر صادق بوده و دقت آن $R^2=0.91$ است.

$$\begin{aligned} f &= 20-130 \text{ kHz}, & \rho &= 912-1151 \text{ kg/m}^3, \\ \sigma &= 0.029-0.073 \text{ N/m}, \\ Oh &= 2.71-161.64, & We &= 14.8-571, \\ In &= 3.65 \times 10^{-13}-1.92 \times 10^{-09} \end{aligned}$$

لازم به توضیح است که برای اینکه مایع با استفاده از ارتعاشات التراسونیک به قطرات ریز شکسته شود، لازم است که دامنه ارتعاشات نیز از یک مقدار آستانه بیشتر باشد. این مقدار آستانه از رابطه زیر بدست می‌آید (Rajan et al., 2001).

$$A_{m,crit} = \frac{2\mu}{\rho} \left(\frac{\rho}{\pi\sigma f} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (8)$$

اگر دامنه ارتعاشات زیر این مقدار باشد اتمیزاسیونی اتفاق نمی‌افتد و روابط فوق هیچ کدام صادق نیست. به عنوان مثال دامنه ارتعاش بحرانی برای مایع مذاب آلومینیوم ۴۰ میکرون برآورد شده است. اگر نرخ جریان مایع کمتر از Q_{crit} باشد، باید با حذف عدد وبر اصلاح شده، روابط محدود شود.

$$Q_{crit} = \frac{\sigma}{f\rho} \quad (9)$$

این حداقل نرخ جریانی است که برای مقادیر بیش از آن، تأثیر نرخ جریان توسط روابط ارائه شده پیش‌بینی می‌شود. حداکثر نرخ جریان برای این روابط که قابل اعمال است، نرخ جابجایی حجمی سطح ارتعاشی است که از حاصل ضرب فرکانس، دامنه و مساحت سطح ارتعاشی به دست می‌آید. هنگامی که سرعت جریان مایع از نرخ جابجایی بیشتر شود، در اثر گرانش چکه می‌کند و قطرات بزرگ‌تری ایجاد می‌شود.

مطالعه کردند و رابطه زیر را برای پیش‌بینی قطر قطرات تولید شده ارائه دادند:

$$\frac{D_{droplet}}{\pi A_m} = \left[\left(\frac{2\sigma}{\rho\omega_0^2 A_m^3} \right) 2 \tanh \left(\frac{\pi A_m}{d_p} \right) \left(\frac{l}{A_m} \right) \right]^{\frac{1}{3}} \quad (2)$$

که در آن ω_0 فرکانس نوسان نوک اتمایزر، A_m دامنه نوک و l ضخامت فیلم مایع است. راجان و همکاران (Rajan et al., 2001) یک رابطه بر اساس اعداد بدون بعد مانند عدد وبر (N_{We})، عدد اونسورج (N_{Oh}) و عدد شدت (N_{In}) پیشنهاد کردند:

$$D_{droplet} = \left(\frac{\pi\sigma}{\rho f^2} \right)^{\frac{1}{3}} \times$$

$$\left[1 + A(N_{We})^{0.22} (N_{Oh})^{0.166} (N_{In})^{-0.0277} \right] \quad (3)$$

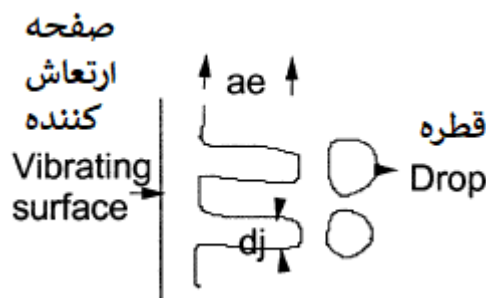
$$N_{We} = \frac{fQ\rho}{\sigma} \quad (4)$$

$$N_{Oh} = \frac{\sigma\mu}{\rho A_m^2 f} \quad (5)$$

$$N_{In} = \frac{f^2 A_m^4}{CQ} \quad (6)$$

که در روابط فوق Q و C به ترتیب سرعت جریان حجمی و سرعت صوت در محیط مایع است. رامیستی و همکاران (Ramisetty et al., 2013) با اعمال یک سری آزمایشات تجربی به روابط زیر رسیدند:

$$D_{droplet} = 0.0015 \left(\frac{\pi\sigma}{\rho f^2} \right)^{\frac{1}{3}} \times \quad (7)$$



شکل ۳- ارتباط بین قطرات جدا شده و قطر جت امواج مویرگی (Rajan et al., 2001)

Fig. 3- Relation between separated droplets and capillary wave jet diameter (Rajan et al., 2001)

$$\omega_{out} = \omega_{in} + \frac{\dot{m}_v}{\dot{m}_{dry air}} \quad (15)$$

برای ایجاد معادله نرخ تبخیر آب از قطرات محصول، ملاحظات لازم است. ابتدا باید در نظر گرفت که سرعت نسبی بین قطره و گاز خشک کن را می توان نادیده گرفت و در نتیجه مکانیسم تبخیر در گاز را کد رخ می دهد، بنابراین عدد ناسلت (Nu) برابر با ۲ است. ثانیاً، فقط دوره نرخ تبخیر ثابت در نظر گرفته می شود. در طول این دوره، سرعت انقباض قطره را می توان با جریان جرمی خروجی از قطره برابر فرض کرد. با داشتن رطوبت مخصوص خروجی می توان دمای حباب خشک خروجی را از رابطه ۱۶ بدست آورد و از رابطه ۱۷ نیز زمان فرآیند خشک کردن قطرات بدست آمده از اتمایزر التراسونیک را محاسبه نمود (Lisboa et al., 2018):

$$\begin{aligned} (C_p T_1 + \omega_1 h_{g1}) + (\omega_2 - \omega_1) h_{f2} = \\ (C_p T_2 + \omega_2 h_{g2}) \end{aligned} \quad (16)$$

$$t = \frac{\rho \Delta H_{vap}}{2 \times k_{gas} (T_{dbout} - T_{wb})} \times (D_{droplet}^2 - D_{particle}^2) \quad (17)$$

در این رابطه T_{dbout} دمای حباب خشک گاز خشک کننده بوده که برابر میانگین دمای حباب خشک ورودی و خروجی در نظر گرفته می شود. همچنین T_{wb} دمای حباب تر فرآیند بوده که از رابطه ۱۸ محاسبه خواهد شد (Lisboa et al., 2018). همچنین k_{gas} ضریب رسانش گاز خشک کننده و ΔH_{vap} گرمای نهان تبخیر آب می باشد.

$$T_{wb} = T_{in} + \frac{(\omega_2 - \omega_1) \Delta H_{vap}}{C_p} \quad (18)$$

خصوصیات فیزیکی شیر

برای محاسبه ویسکوزیته و چگالی شیر می توان از رابطه زیر که توسط بخشی و همکاران (Bakshi et al., 1984) بر حسب دمای شیر و درصد چربی آن ارائه شده است استفاده کرد:

$$\ln(\mu) = \frac{2721.5}{T} + 0.1F - 8.9 \quad (19)$$

$$\begin{aligned} \rho = 0.3T - 0.03T^2 \\ -0.7F - 0.01F^2 + 1034.5 \end{aligned} \quad (20)$$

ارتباط بین d_j (قطر جت امواج مویرگی) و d_p (قطر قطرات ایجاد شده) که در شکل ۳ نشان داده شده است توسط رایلی و والزل^۱ به صورت زیر ارائه شده است (Walze 1993; Rajan et al., 2001):

$$Rayleigh \longrightarrow d_j = 0.53 D_{droplet} \quad (10)$$

$$Walzel \longrightarrow d_j = \frac{D_{droplet}}{1.68 \left[2 + 0.6 \frac{\mu}{\rho f A_m^2} \right]^{\frac{1}{6}}} \quad (11)$$

با توجه به روابط فوق، مقدار نرخ جریان حجمی قطرات خارج شده از مایع توسط ارتعاشات التراسونیک تابعی از فرکانس و دامنه ارتعاش و چگالی، کشش سطحی و لزجت سیال به صورت زیر تعریف می شود (Rajan et al., 2001):

$$Q_s = \frac{\frac{\pi}{6} D_{droplet}^3 (f A_m)}{k \left(\frac{\rho f^2}{\pi \sigma} \right)^{0.66} \left(\frac{\pi}{4} d_j^2 \right) \frac{2\mu}{\rho} \left(\frac{\rho}{\pi \sigma f} \right)^{\frac{1}{3}}} \quad (12)$$

که در رابطه فوق، برای روابط رایلی و والزل مقدار ثابت k به ترتیب ۰،۳ و ۰،۱ می باشد.

معادلات مدلسازی خشک کردن پاششی

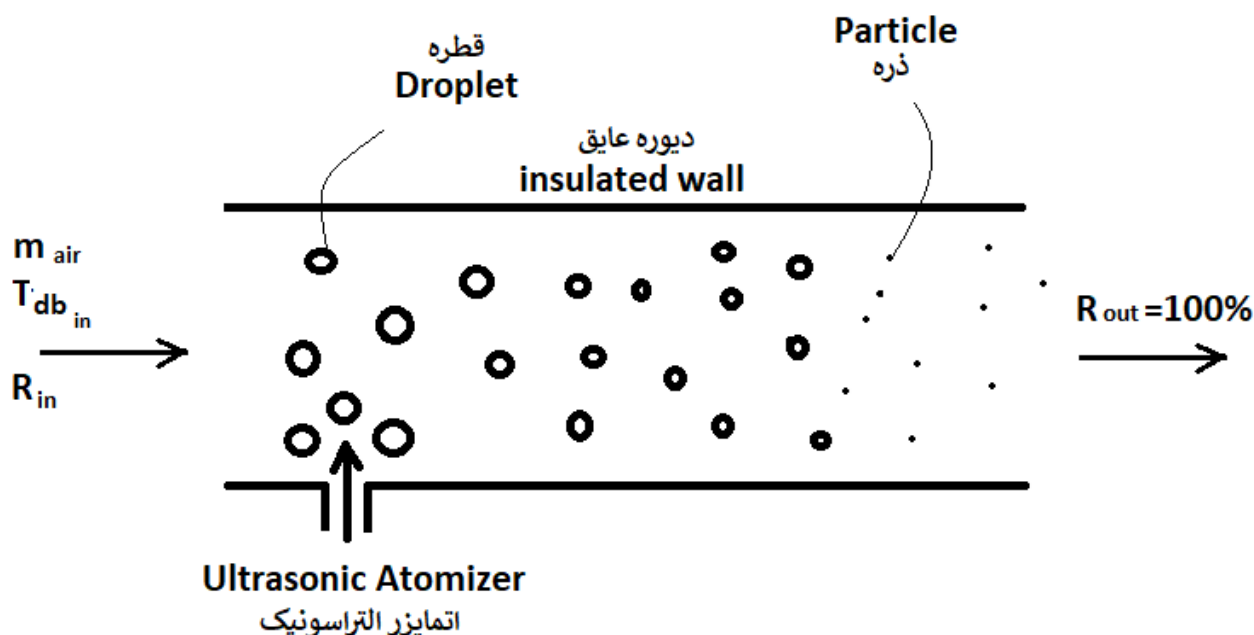
پس از آنکه ذرات مایع در اتمایزر التراسونیک به ذرات بخار تبدیل شد، فرآیند خشک کردن آغاز می شود. قطر نهایی پودر تولید شده (قطره خشک شده) از رابطه زیر بدست می آید (Vehring, 2008).

$$D_{particle} \cong D_{droplet} \sqrt[3]{\left(\frac{C}{\rho} \right)_{particle}} \quad (13)$$

همچنین با فرض اشباع بودن جریان خروجی و معلوم بودن دما و رطوبت هوای ورودی می توان دمای خروجی و سپس زمان لازم برای تبخیر را بصورت زیر بدست آورد. با فرض یک فرآیند اشباع آدیاباتیک که در شکل زیر نشان داده شده است داریم:

در فرآیند نشان داده شده در شکل ۴ با داشتن دبی جریان تبخیر شده و غلظت مایع ورودی می توان جرم بخار آب اضافه شده به جریان را بدست آورد. با داشتن دمای حباب خشک ورودی و رطوبت نسبی هوای ورودی، مقدار رطوبت مخصوص ورودی قابل محاسبه است. با فرض رطوبت نسبی ۱۰۰٪ در خروجی (فرآیند اشباع آدیاباتیک) می توان با نوشتن اصل بقای جرم و اضافه کردن جرم آب تبخیر شده به رطوبت مخصوص ورودی، رطوبت مخصوص خروجی را بصورت زیر بدست آورد:

$$\dot{m}_v = Q_s \times (1 - C) \times \rho_{water} \quad (14)$$



شکل ۴- فرآیند خشک کردن قطرات بدست آمده از اتمایزر التراسونیک (اشباع آدیاباتیک)
Fig. 4- Drying process of droplets obtained from ultrasonic atomizer (adiabatic saturation)

- در محاسبات فرض می‌شود بخار اطراف مایع حالت اشباع داشته باشد.
- فرض می‌شود فرآیند اتمیزه شدن از زمان دیده شدن اغتشاشات سطح شروع و تا هنگام دیدن آخرین ذرات بخار ادامه داشته باشد.
- دیواره‌های کانال تبخیر کاملاً عایق فرض شده و اتلاف حرارتی به خارج از سیستم نداریم.
- فرآیند خشک کردن قطرات بخار شیر بوجود آمده بصورت اشباع آدیاباتیک فرض می‌شود.
- دمای هوای خشک‌کننده ورودی ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد فرض می‌شود.
- رطوبت نسبی ورودی ۵٪ فرض می‌شوند که برای دمای ۱۸۰ درجه ماکزیمم مقدار آن حدود ۱۰ درصد است.
- غلظت شیر (مقدار ماده جامد حل شده در آن) ۰/۰۲ gr/ml فرض می‌شود.
- آنتالپی تبخیر شیر معادل آب در دمای ۲۵ درجه و برابر ۲۴۵۰ kJ/kg فرض می‌شود.
- ضریب رسانش هوا برابر ۰/۰۲۵ W/mK فرض می‌شود.
- چگالی پودر شیر برابر ۱/۳ g/cm³ در نظر گرفته می‌شود. (Berlin et al., 1963)

که در این رابطه T دمای شیر بر حسب کلوین و F درصد چربی شیر می‌باشد و لزجت بدست آمده برحسب سانتی پوز و چگالی بدست آمده برحسب کیلوگرم بر متر مکعب خواهد بود. برای سه نوع شیرمختلف (۱) شیر بدون چربی، (۲) شیر هموژنایز شده، (۳) شیرکامل، به ترتیب سه رابطه زیر برای محاسبه کشش سطحی شیر توسط واتسون (Watson 1965) ارائه شده است:

$$\sigma = 74.25 - 0.5941T + 0.003185T^2 \quad (21)$$

$$\sigma = 76.73 - 0.7054T + 0.003574T^2 \quad (22)$$

$$\sigma = 77.92 - 0.7953T + 0.004004T^2 \quad (23)$$

در این رابطه دما بر حسب $^{\circ}\text{F}$ جایگذاری شده و σ کشش سطحی شیر بر حسب $\frac{\text{dynes}}{\text{cm}}$ بدست می‌آید.

فرضیات و شرایط مرزی جریان خشک سازی

- پس از مدلسازی فرآیند اتمیزاسیون التراسونیک شیر، فرآیند خشک‌سازی آن آغاز خواهد شد. فرآیند خشک‌سازی در این مسئله مطابق شکل ۴ بصورت یک فرآیند اشباع آدیاباتیک فرض می‌شود که شرایط زیر در آن برقرار است.
- در صورت استفاده از ذرات حل شده جامد در مایع، سایز آنها باید بسیار کوچکتر از قطرات ایجاد شده باشد و غلظت آن در مایع بیشتر از ۴۰ درصد نباشد.

- شیر در نظر گرفته شده شیر کامل با درصد چربی ۳/۲۵٪ است.

نحوه مدل سازی و حل مسئله

در کار حاضر ابتدا به بررسی مایعی که محدوده خواص آن در روابط (خصوصاً رابطه ۷) صادق است پرداخته می شود. یکی از پر کاربردترین مایعاتی که در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می گیرد شیر است. با بررسی ویسکوزیته، کشش سطحی و چگالی شیر و بدست آوردن اعداد بدون بعد Oh ، We و In مشخص می شود که برای شیر نیز می توان از رابطه ۷ استفاده کرد. پس از محاسبه قطر ذرات تبخیر شده شیر در اثر ارتعاشات التراسونیک و همچنین نرخ تبخیر می توان متغیرهای مستقل تحقیق را تغییر داد. ابتدا در خواص فیزیکی ثابت سیال، به تغییر فرکانس و دامنه نوسانات التراسونیک و تأثیر آنها بر قطر ذرات تولیدی و نرخ تبخیر پرداخته می شود. در مرحله بعد با ثابت بودن فرکانس و دامنه نوسانات التراسونیک تأثیر تغییرات خواص سیال (تغییر دما) بر قطر ذرات تولیدی و نرخ تبخیر بررسی می شود. در مرحله بعد وارد فرآیند خشک سازی پاششی شده و با فرض فرآیند اشباع آدیاباتیک تأثیر فرکانس و دامنه نوسانات التراسونیک و همچنین تغییرات خواص سیال (تغییر دما و درصد چربی شیر) بر قطر پودر تولید شده و زمان لازم برای فرآیند خشک کردن بررسی می شود. تمامی مراحل فوق توسط نرم افزار MATHLAB انجام می شود.

نتایج و بحث

در این بخش به بررسی نتایج مدل سازی پرداخته می شود. بدین صورت که ابتدا تأثیر فرکانس ارتعاشات بر مواردی چون قطر قطرات تولیدی، نرخ تبخیر، قطر پودر تولیدی و زمان خشک شدن قطرات در دماهای مختلف شیر و همچنین دامنه های ارتعاشات متفاوت بررسی می شود. در قسمت دوم به بررسی تأثیر دامنه ارتعاشات بر مواردی چون قطر قطرات تولیدی، نرخ تبخیر، قطر پودر تولیدی و زمان خشک شدن قطرات در دماهای مختلف شیر و همچنین فرکانس های ارتعاشات متفاوت پرداخته می شود. برای آنکه اعداد بدون بعد In ، We و Oh در محدوده مورد نظر رابطه ۷ (جهت اطمینان از صحت محاسبات) باقی بمانند در دو بخش مجزا به تغییر متغیرها پرداخته می شود.

- تغییر فرکانس ارتعاشات از ۱۰ کیلو هرتز به ۴۰ کیلو هرتز در دمای ثابت گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی گراد و دمای ثابت شیر برابر ۱۵ درجه سانتی گراد و دامنه ارتعاشات ثابت برابر ۲ میکرون

- تغییر دامنه ارتعاشات از ۱ میکرون به ۴ میکرون در دمای ثابت گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی گراد و دمای ثابت شیر برابر ۲۰ درجه سانتی گراد و فرکانس ارتعاشات برابر ۱۵ کیلوهرتز

تأثیر فرکانس ارتعاشات

در شکل ۵ تأثیر فرکانس های مختلف در دامنه های ارتعاشات متفاوت بر قطر قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک بررسی شده است. در این حالت دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی گراد و دمای شیر برابر ۱۵ درجه سانتی گراد در نظر گرفته می شود. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش فرکانس ارتعاشات قطر قطرات تولید شده به روش التراسونیک کاهش می یابد. بدین صورت که در حالتی که دامنه ارتعاشات ۲ میکرون است، افزایش فرکانس از ۱۰ کیلو هرتز به ۴۰ کیلو هرتز باعث کاهش ۱۸ درصدی قطر ذرات تبخیر شده می شود. دلیل آن بر می گردد به افزایش سرعت جت ایجاد شده بر روی تاج موج های مویرگی و زودتر جدا شدن آنها از سطح مایع که منجر به قطرهای کوچکتر می شود. در ضمن در یک فرکانس ثابت با افزایش دامنه ارتعاشات قطر قطرات تولید شده افزایش می یابد. بطوری که افزایش ۵۲ درصدی در دامنه ارتعاشات باعث افزایش ۸/۲ درصدی در قطر ذرات تبخیر شده می شود. به نظر می رسد که با افزایش دامنه ارتعاشات طول جت ایجاد شده از تاج موج های مویرگی بیشتر شده و هنگام جدا شدن جت از سطح مایع حجم بیشتری از مایع داخل خود جای داده و منجر به افزایش قطر قطرات ایجاد شده می شود.

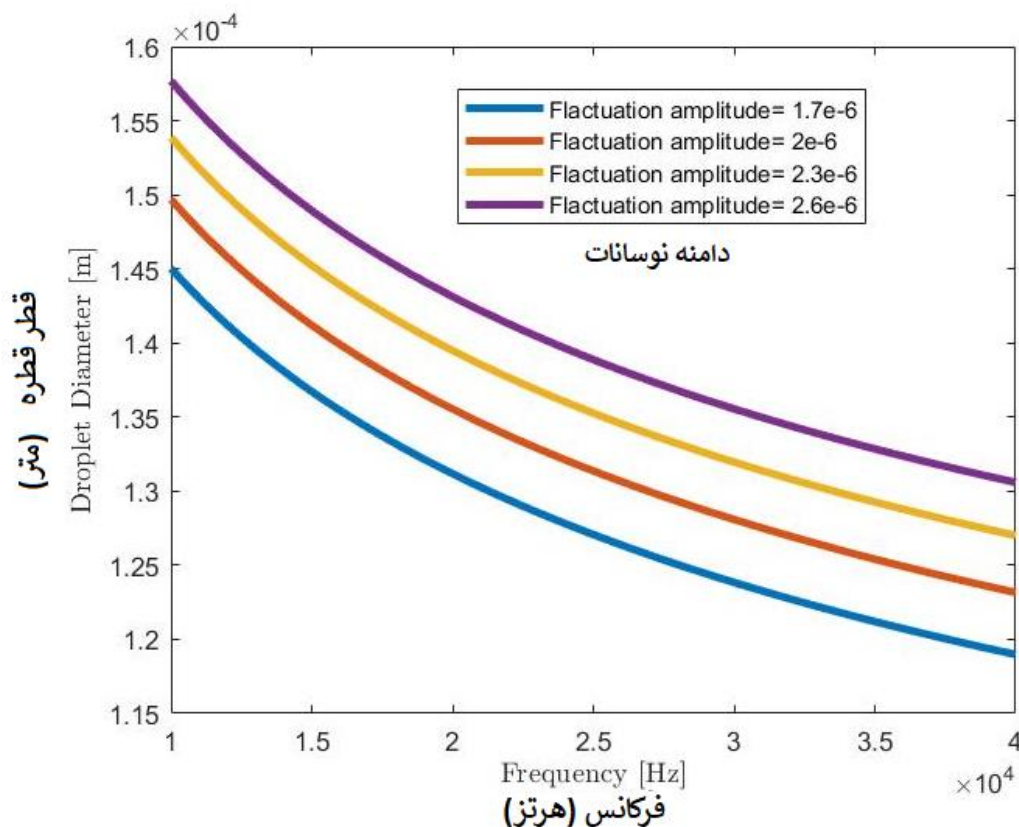
شکل ۶ قطر قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در فرکانس های مختلف و در دماهای شیر متفاوت را نشان می دهد که در آن دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی گراد و دامنه ارتعاشات برابر ۲ میکرون است. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش دمای شیر قطر ذرات تبخیر شده نیز بیشتر می شود. بطوری که با افزایش دمای شیر از ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد قطر ذرات تولید شده ۱۱/۳ درصد افزایش داشته است. افزایش دما باعث کاهش ویسکوزیته و کشش سطحی سیال شده و این امر منجر به کاهش نیروهای مقاوم به ایجاد قطره و به تبع آن جدا شدن راحت تر قطرات از روی سطح مایع می شود.

در شکل ۷ تأثیر فرکانس های مختلف در دامنه های ارتعاشات متفاوت بر نرخ تبخیر به روش التراسونیک بررسی شده است. در این حالت دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی گراد و دمای شیر برابر ۱۵ درجه سانتی گراد در نظر گرفته می شود. با توجه به این نمودار مشخص است با افزایش فرکانس ارتعاشات نرخ تبخیر به روش

دمای شیر برابر ۱۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته می‌شود. با توجه به این نمودار مشخص است با افزایش فرکانس ارتعاشات قطر پودر تولید شده به روش التراسونیک کاهش می‌یابد. بدین صورت که در حالتی که دامنه ارتعاشات ۲ میکرون است، افزایش فرکانس از ۱۰ کیلو هرتز به ۴۰ کیلو هرتز باعث کاهش ۱۷/۲ درصدی قطر پودر تولید شده می‌شود. دلیل آن بر می‌گردد به کاهش قطر ذرات تبخیر شده و به تبع آن کاهش قطر پودر تولید شده. **شکل ۱۰** قطر پودر تولید شده به روش التراسونیک در فرکانس‌های مختلف و در دماهای شیر متفاوت را نشان می‌دهد که در آن دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دامنه ارتعاشات برابر ۲ میکرون است. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش دمای شیر قطر پودر تولید شده نیز بیشتر می‌شود. بطوری‌که با افزایش دمای شیر از ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قطر پودر تولید شده ۱۱٫۵ درصد افزایش داشته است. دلیل آن افزایش قطر ذرات تولید شده با افزایش دمای شیر و به تبع آن افزایش قطر پودر تولید شده می‌باشد.

التراسونیک کاهش می‌یابد. بدین صورت که در حالتی که دامنه ارتعاشات ۲ میکرون است، افزایش فرکانس از ۱۰ کیلو هرتز به ۴۰ کیلو هرتز باعث کاهش ۴۴ درصدی نرخ تبخیر می‌شود. دلیل آن بر می‌گردد به کاهش قطر ذرات تبخیر شده و به تبع آن کاهش حجم و نرخ تبخیر. **شکل ۸** نرخ تبخیر به روش التراسونیک در فرکانس‌های مختلف و در دماهای شیر متفاوت را نشان می‌دهد که در آن دمای گاز خشک‌کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دامنه ارتعاشات برابر ۲ میکرون است. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش دمای شیر نرخ تبخیر نیز بیشتر می‌شود. بطوری‌که با افزایش دمای شیر از ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد نرخ تبخیر ۳۴/۸ درصد افزایش داشته است. دلیل آن کاهش نیروهای ویسکوزیته و کشش سطحی با افزایش دما و تبخیر سطحی راحت‌تر مایع است.

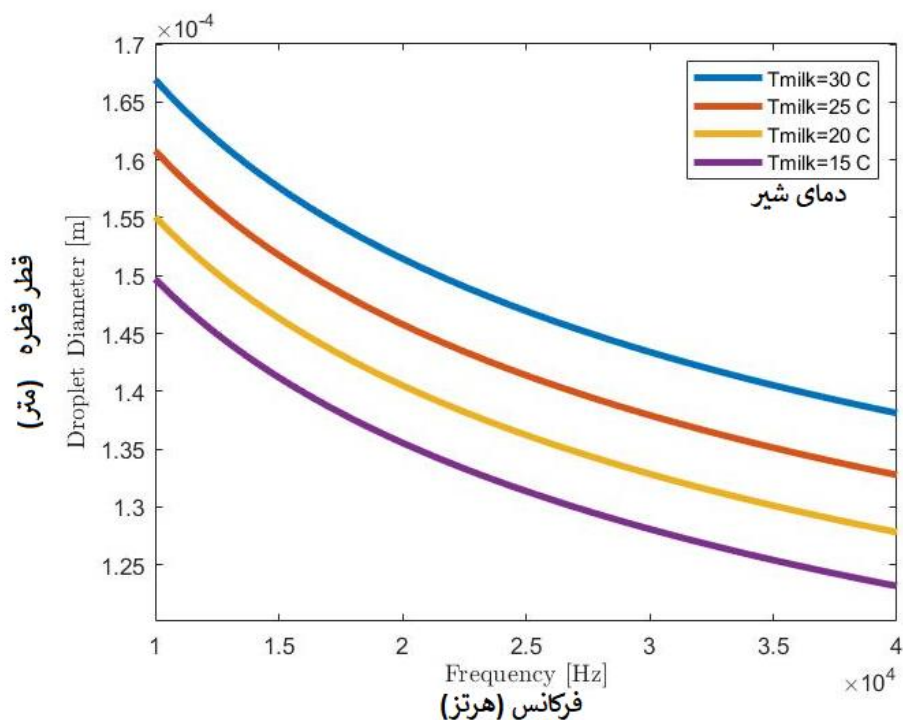
در **شکل ۹** تأثیر فرکانس‌های مختلف در دامنه‌های ارتعاشات متفاوت بر قطر پودر تولید شده به روش التراسونیک بررسی شده است. در این حالت دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و



شکل ۵- قطر قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در فرکانس‌های مختلف و در دامنه‌های ارتعاشات متفاوت

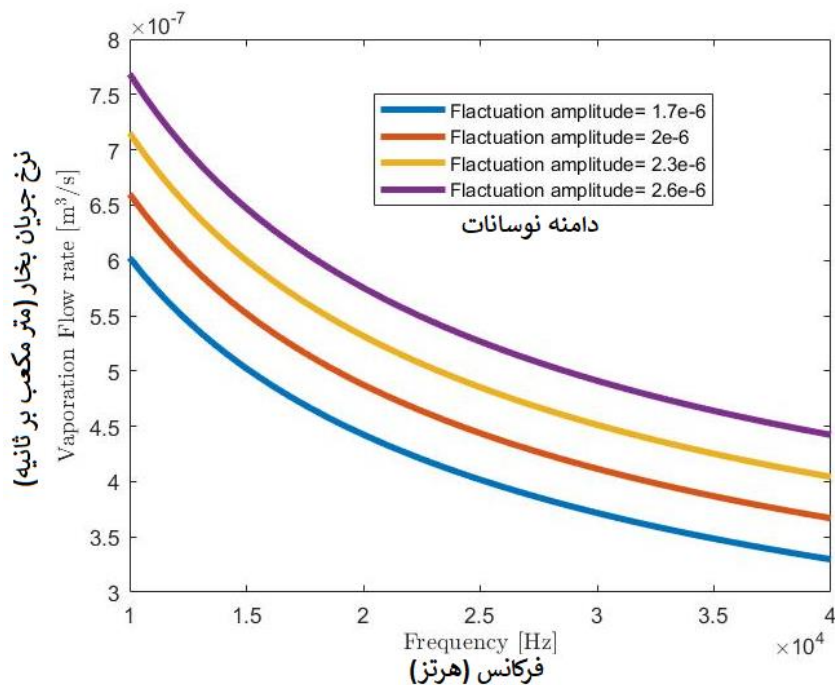
(دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۱۵ درجه سانتی‌گراد)

Fig. 5- Diameter of ultrasonic evaporated droplets at different frequencies and in different vibration amplitudes (Dryer gas temperature is 100 ° C and milk temperature is 15 ° C)



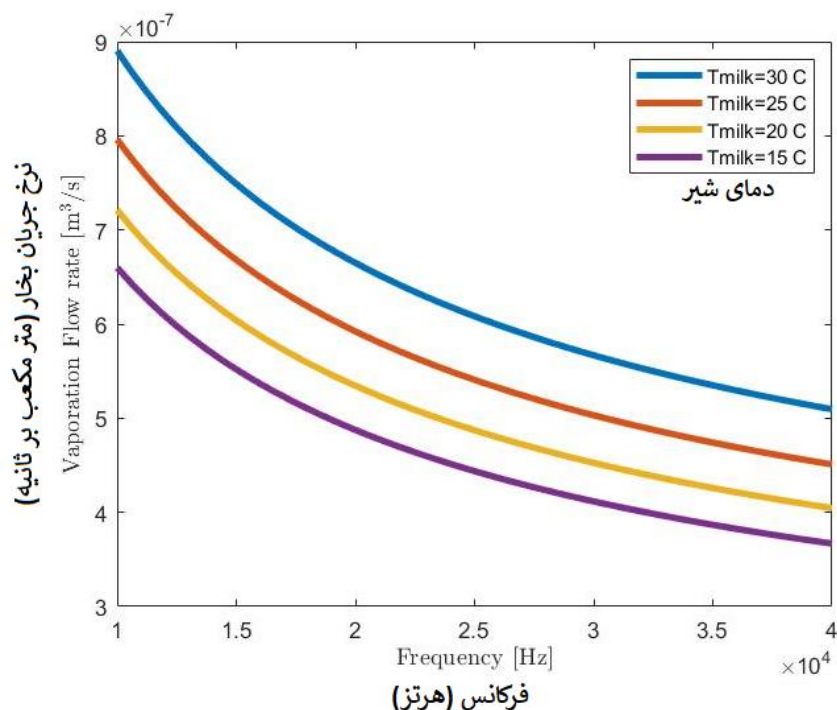
شکل ۶- قطر قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در فرکانس‌های مختلف و در دماهای شیر متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دامنه ارتعاشات برابر ۲ میکرون)

Fig. 6- Diameter of ultrasonic evaporated droplets at different frequencies and at different milk temperatures
(Dryer gas temperature equal to 100 ° C and vibration amplitude equal to 2 microns)



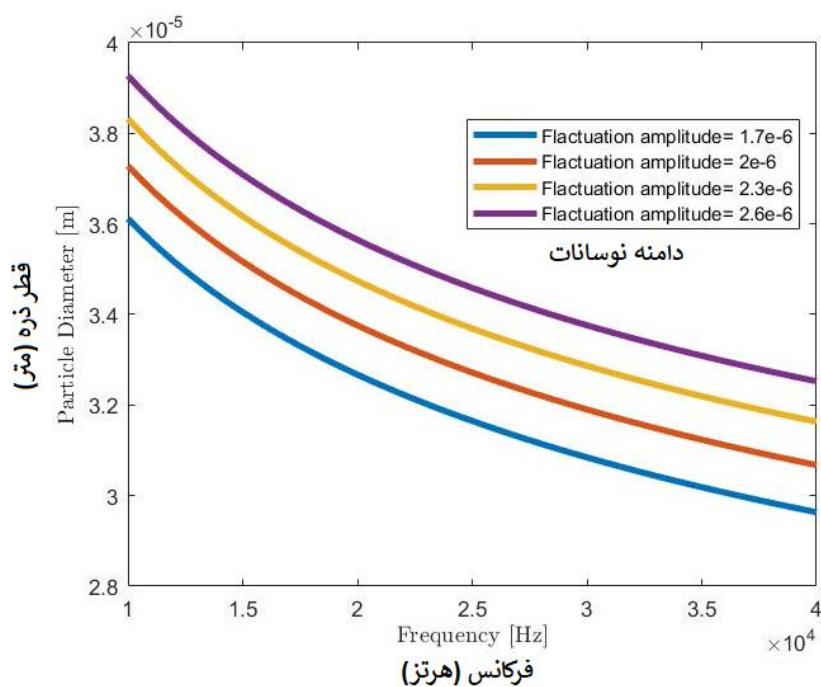
شکل ۷- نرخ تبخیر به روش التراسونیک در فرکانس‌های مختلف و در دامنه‌های ارتعاشات متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۱۵ درجه سانتی‌گراد)

Fig. 7- Ultrasonic evaporation rate at different frequencies and in different vibration amplitudes
(Dryer gas temperature is 100 ° C and milk temperature is 15 ° C)



شکل ۸- نرخ تبخیر به روش التراسونیک در فرکانس‌های مختلف و در دماهای شیر متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دامنه ارتعاشات برابر ۲ میکرون)

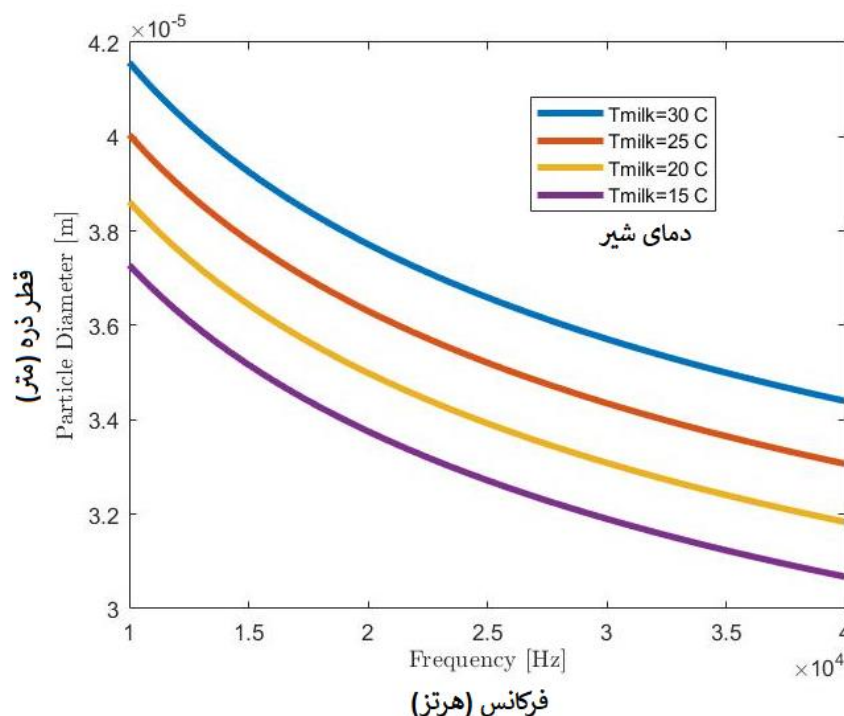
Fig. 8- Ultrasonic evaporation rate at different frequencies and at different milk temperatures (Dryer gas temperature equals to 100 ° C and vibration amplitude equals to 2 microns)



شکل ۹- قطر پودر تولید شده پس از تبخیر به روش التراسونیک و خشک شدن در فرکانس‌های مختلف و در دامنه‌های ارتعاشات متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۱۵ درجه سانتی‌گراد)

Fig. 9- The diameter of the produced powder after ultrasonic evaporation and drying at different frequencies and in different amplitude vibrations

(Dryer gas temperature is 100 ° C and milk temperature is 15 ° C)

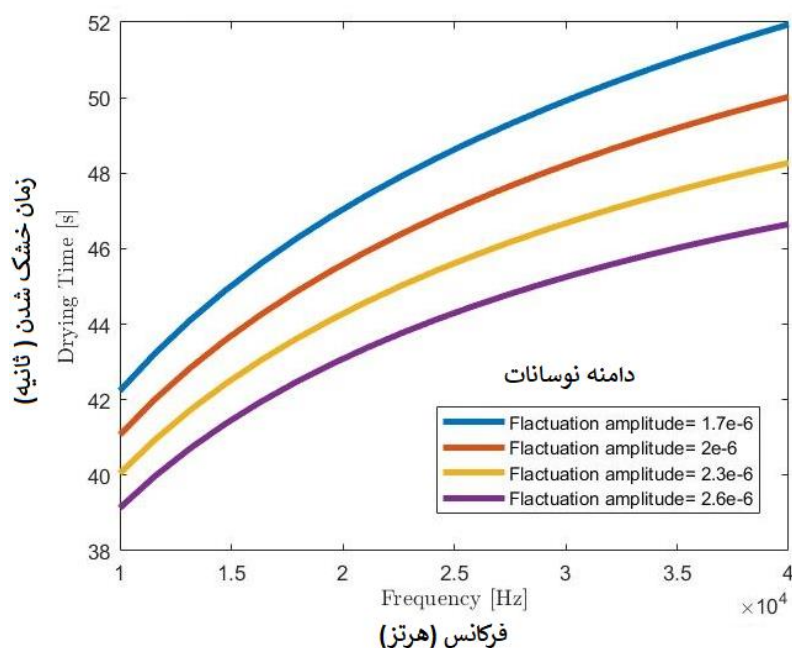


شکل ۱۰- قطر پودر تولید شده پس از تبخیر به روش التراسونیک و خشک شدن در فرکانسهای مختلف و در دماهای شیر متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتیگراد و دامنه ارتعاشات برابر ۲ میکرون)

Fig. 10- The diameter of the produced powder after ultrasonic evaporation and drying at different frequencies and at different milk temperatures (Drying gas temperature equals to 100 ° C and vibration amplitude equals to 2 microns)

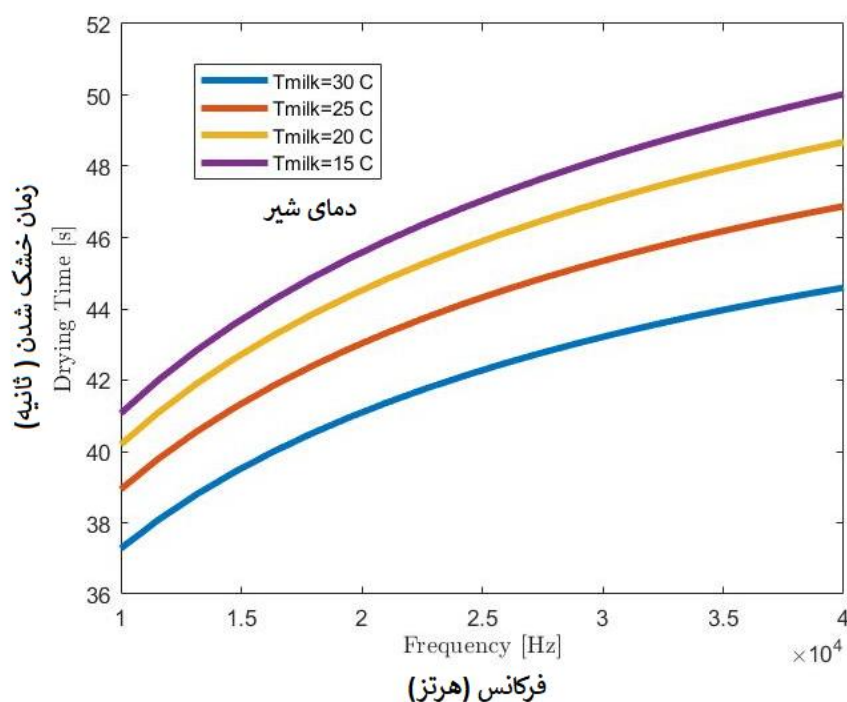
به روش التراسونیک در فرکانسهای مختلف و در دماهای شیر متفاوت را نشان می‌دهد که در آن دمای گاز خشک‌کن برابر ۱۰۰ درجه سانتیگراد و دامنه ارتعاشات برابر ۲ میکرون است. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش دمای شیر زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده کاهش می‌یابد. بطوری‌که در فرکانس ۴۰ کیلو هرتز با افزایش دمای شیر از ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتی-گراد زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده ۱۲/۴ درصد کاهش داشته است. دلیل آن از دو منظر قابل بررسی است. اولاً افزایش دمای شیر باعث می‌شود اختلاف دمای اولیه مایع و دمای حباب تر کمتر شده و زمان کمتری صرف افزایش دمای مایع برای شروع تبخیر شود. ثانیاً با توجه به اینکه افزایش دمای شیر باعث افزایش نرخ تبخیر و محتوی رطوبت خروجی می‌شود T_{wb} و زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده طبق روابط ۱۷ و ۱۸ کاهش می‌یابد.

در شکل ۱۱ تأثیر فرکانسهای مختلف در دامنه‌های ارتعاشات متفاوت بر زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک بررسی شده است. در این حالت دمای گاز خشک‌کن برابر ۱۰۰ درجه سانتیگراد و دمای شیر برابر ۱۵ درجه سانتیگراد در نظر گرفته می‌شود. با توجه به این نمودار مشخص است با افزایش فرکانس ارتعاشات زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک افزایش می‌یابد. بدین صورت که در حالتی که دامنه ارتعاشات ۲ میکرون است، افزایش فرکانس از ۱۰ کیلو هرتز به ۴۰ کیلو هرتز باعث افزایش ۲۱/۴ درصدی زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده می‌شود. دلیل آن بر می‌گردد به اینکه با افزایش فرکانس نوسان و کاهش نرخ تبخیر مقدار محتوی رطوبت و رطوبت مطلق در خروجی کاهش یافته و طبق روابط ۱۷ و ۱۸ منجر به افزایش T_{wb} و زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده می‌شود. شکل ۱۲ زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده



شکل ۱۱- زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در فرکانس‌های مختلف و در دامنه‌های ارتعاشات متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۱۵ درجه سانتی‌گراد)

Fig. 11- Time required for drying the ultrasonic evaporated droplets to dry at different frequencies and in different vibration amplitudes (Dryer gas temperature of 100 °C and milk temperature of 15 °C)



شکل ۱۲- زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در فرکانس‌های مختلف و در دماهای شیر متفاوت (دامنه ارتعاشات برابر ۲ میکرون و دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد)

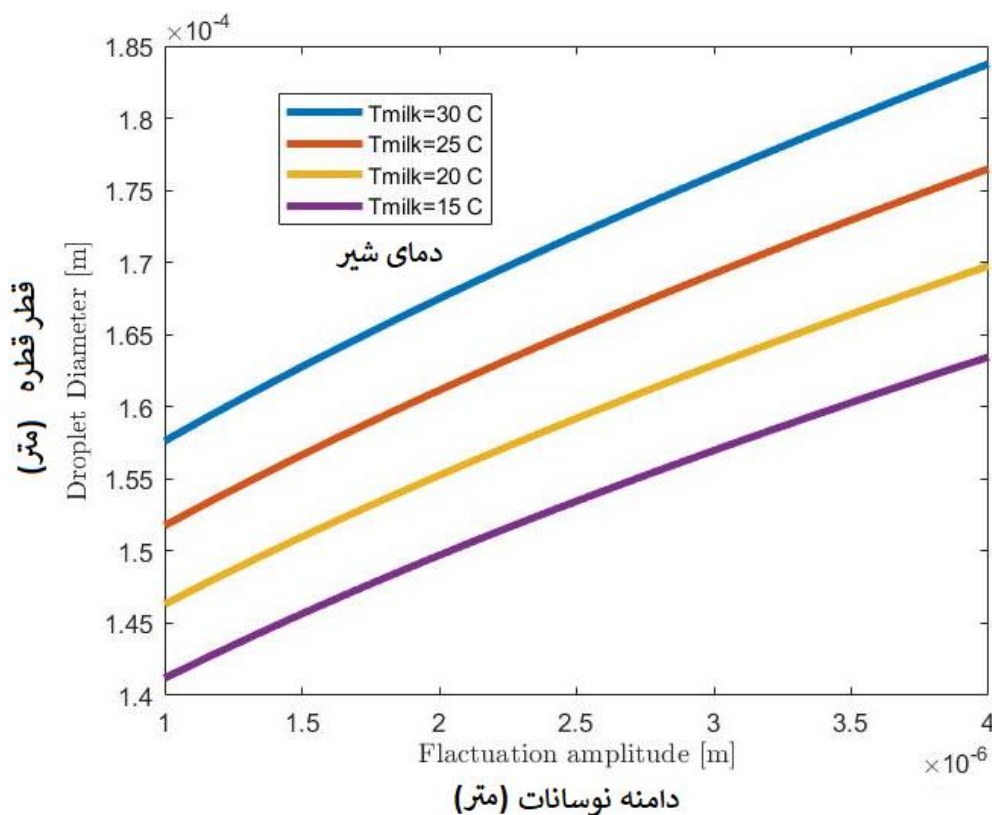
Fig. 12- Time required for drying the ultrasonic evaporated droplets at different frequencies and at different valve temperatures (Vibration amplitude equals to 2 microns and dryer gas temperature equals to 100 °C)

تأثیر دامنه ارتعاشات

در شکل ۱۳ تأثیر دامنه ارتعاشات در دماهای شیر متفاوت بر قطر قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک بررسی شده است. در این حالت دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی گراد و و فرکانس ارتعاشات برابر ۱۵ کیلوهرتز در نظر گرفته می شود. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش دامنه ارتعاشات قطر قطرات تولید شده به روش التراسونیک افزایش می یابد. بدین صورت که در دمای شیر ۳۰ درجه سانتی گراد افزایش دامنه ارتعاشات از ۱ میکرون به ۴ میکرون باعث افزایش ۱۵/۸ درصدی قطر ذرات تبخیر شده می شود. دلیل آن بر می گردد به افزایش طول جت ایجاد شده بر روی تاج

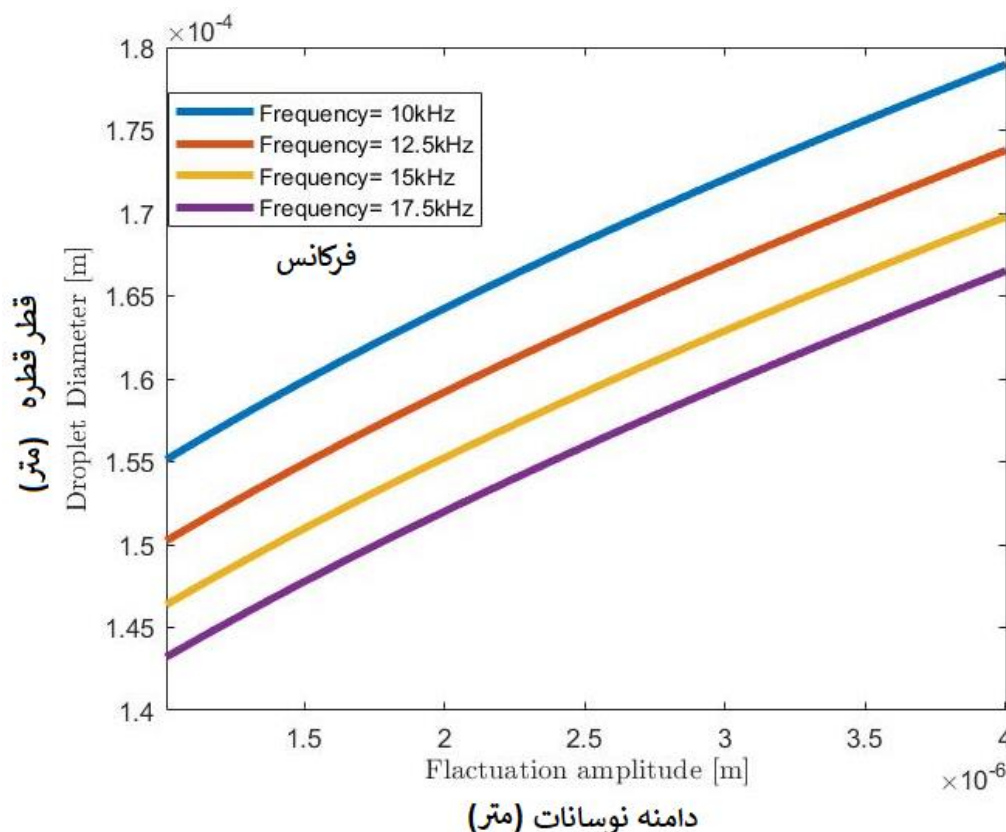
موجهای مویرگی و افزایش حجم ذرات جدا شده از سطح که منجر به افزایش قطر ذرات می شود.

شکل ۱۴ قطر قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در دامنه ارتعاشات مختلف و در فرکانسهای ارتعاشات متفاوت را نشان می دهد که در آن دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی گراد و دمای شیر برابر ۲۰ درجه سانتی گراد است. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش فرکانس ارتعاشات قطر ذرات تبخیر شده کمتر می شود که در بخش قبل به جزئیات و دلایل آن پرداخته شده است.



شکل ۱۳- قطر قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در دامنه های ارتعاشات مختلف و در دمای شیر متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی گراد و فرکانسهای برابر ۱۵ کیلوهرتز)

Fig. 13- Diameter of ultrasonic evaporated droplets at different vibration amplitudes and at different milk temperatures (Dryer gas temperature equals to 100 ° C and frequencies equals to 15 kHz)



شکل ۱۴- قطر قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در دامنه‌های ارتعاشات مختلف و در فرکانس‌های متفاوت

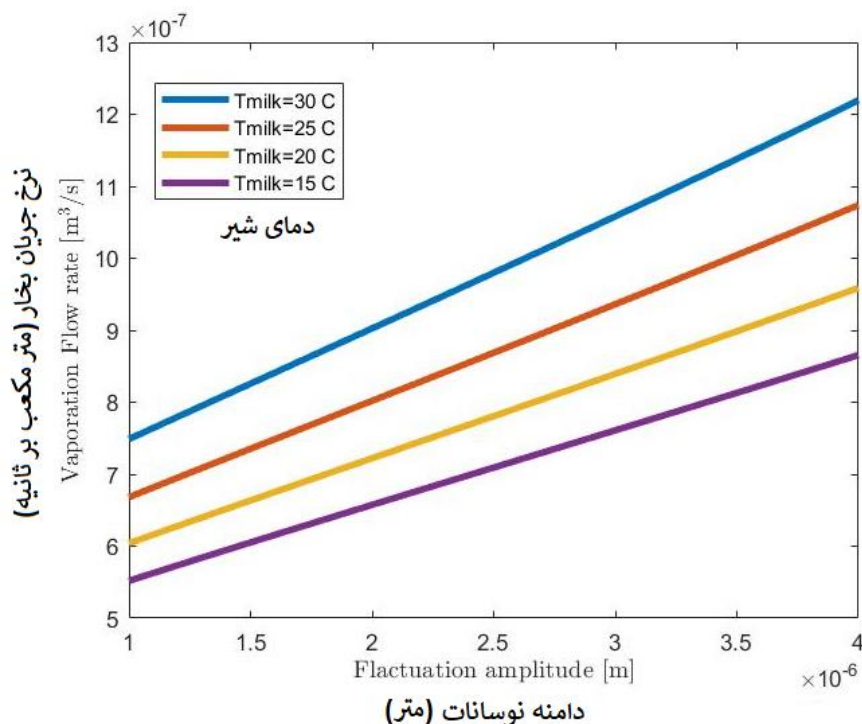
(دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۲۰ درجه سانتی‌گراد)

Fig. 14- Diameter of ultrasonic evaporated droplets at different vibration amplitudes and at different frequencies
(Dryer gas temperature is 100 °C and milk temperature is 20 °C)

افزایش نرخ تبخیر با افزایش دامنه ارتعاشات بزرگتر شدن قطرات در فرکانس ثابت است. با توجه به فرکانس ارتعاشات ثابت سرعت جت ثابت بوده اما با افزایش دامنه ارتعاشات حجم جت زیاد شده و این منجر به افزایش نرخ تبخیر می‌شود.

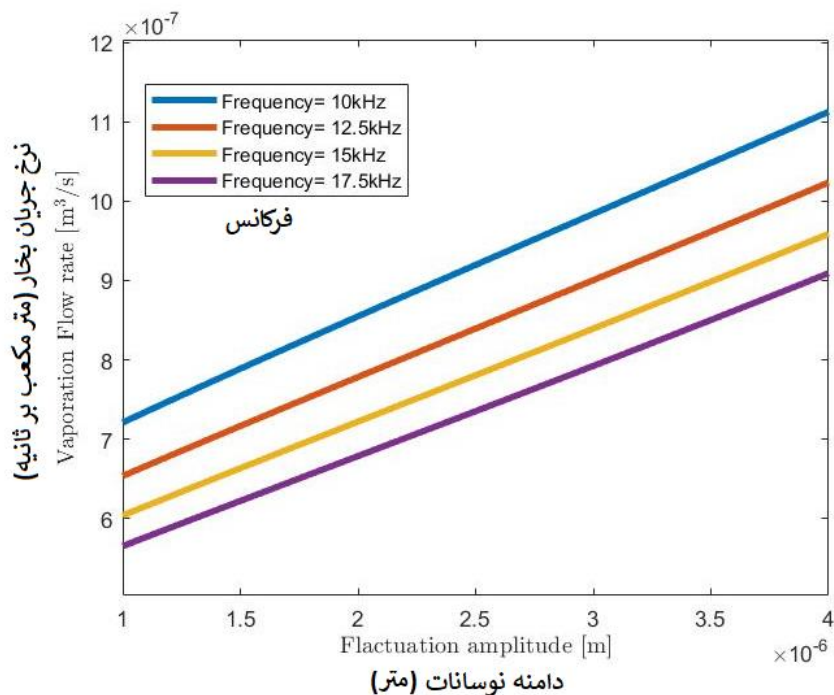
شکل ۱۶ نرخ تبخیر به روش التراسونیک در دامنه ارتعاشات مختلف و در فرکانس‌های ارتعاشات متفاوت را نشان می‌دهد که در آن دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۲۰ درجه سانتی‌گراد است. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش فرکانس ارتعاشات نرخ تبخیر کمتر می‌شود که در بخش قبل به جزئیات و دلایل آن پرداخته شده است.

در شکل ۱۵ تأثیر دامنه ارتعاشات در دماهای شیر متفاوت بر نرخ تبخیر به روش التراسونیک بررسی شده است. در این حالت دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ارتعاشات برابر ۱۵ کیلوهرتز در نظر گرفته می‌شود. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش دامنه ارتعاشات نرخ تبخیر به روش التراسونیک افزایش می‌یابد. بدین صورت که در دمای شیر ۲۰ درجه سانتی‌گراد افزایش دامنه ارتعاشات از ۱ میکرون به ۴ میکرون باعث افزایش ۵۶/۳ درصدی نرخ تبخیر می‌شود. نکته دیگر اینکه با افزایش دمای شیر شیب افزایشی نرخ تبخیر نیز بیشتر می‌شود بطوری که در دمای شیر ۳۰ درجه سانتی‌گراد افزایش دامنه ارتعاشات از ۱ میکرون به ۴ میکرون باعث افزایش ۶۲/۶ درصدی نرخ تبخیر می‌شود. دلیل



شکل ۱۵- نرخ تبخیر به روش التراسونیک در دامنه‌های ارتعاشات مختلف و در دماهای شیر متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ارتعاشات برابر ۱۵ کیلوهرتز)

Fig. 15- Ultrasonic evaporation rate at different vibration amplitudes and at different milk temperatures (Dryer gas temperature equals to 100 ° C and vibration frequency equals to 15 kHz)



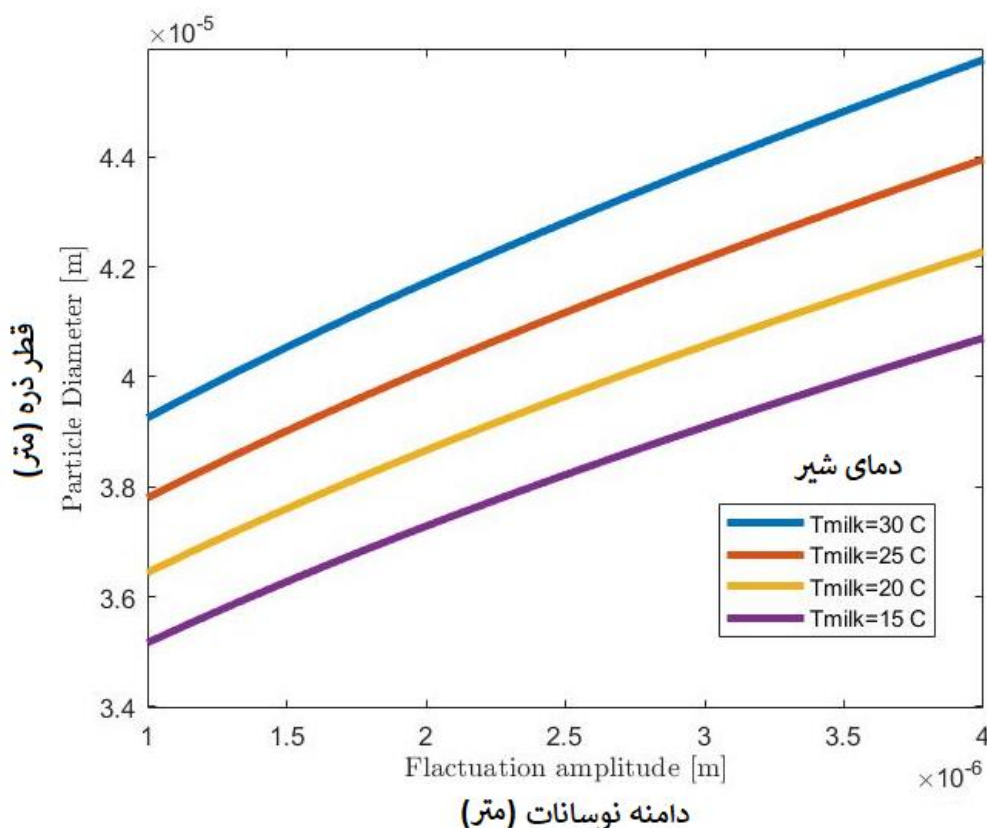
شکل ۱۶- نرخ تبخیر به روش التراسونیک در دامنه‌ها و فرکانس‌های ارتعاشات مختلف (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۲۰ درجه سانتی‌گراد)

Fig. 16- Ultrasonic evaporation rate at different amplitudes and frequencies of vibrations (Dryer gas temperature is 100 ° C and milk temperature is 20 ° C)

ارتعاشات قطر ذرات جدا شده از سطح مایع بیشتر شده و با توجه به حجم بیشتر ماده جامد در آن قطر پودر تولیدی نیز افزایش خواهد یافت.

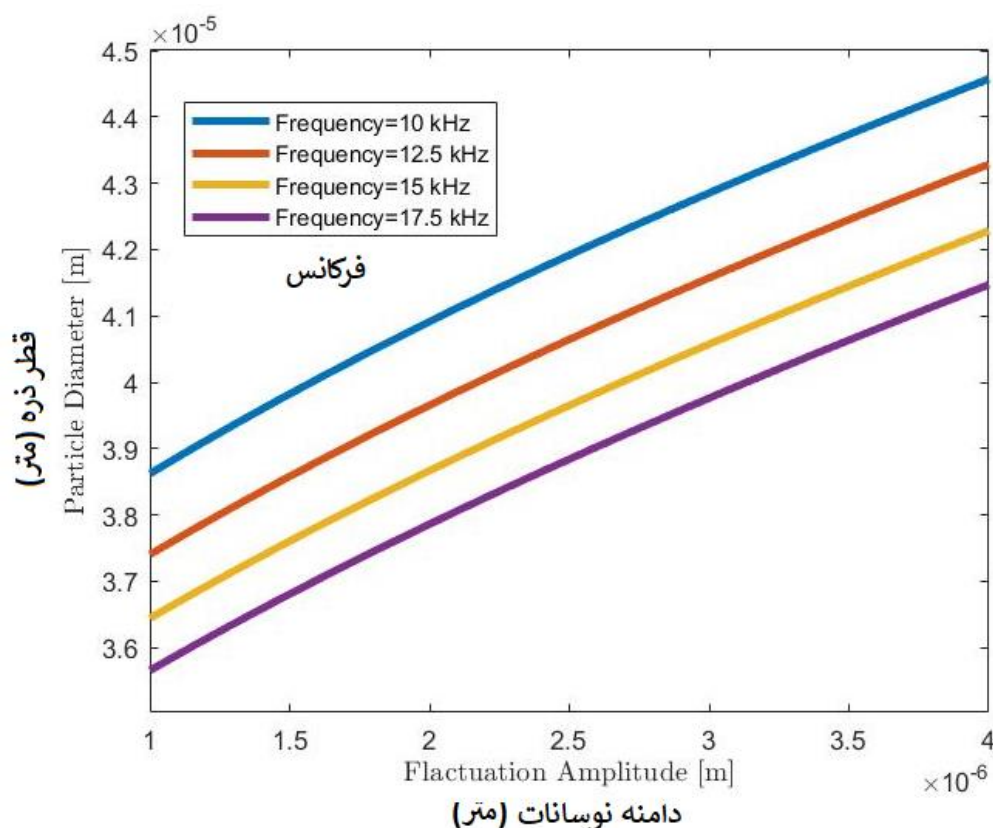
شکل ۱۸ قطر پودر تولید شده به روش التراسونیک در دامنه ارتعاشات مختلف و در فرکانس‌های ارتعاشات متفاوت را نشان می‌دهد که در آن دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۲۰ درجه سانتی‌گراد است. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش فرکانس ارتعاشات قطر پودر تولید شده کمتر می‌شود که در بخش قبل به جزئیات و دلایل آن پرداخته شده است.

در **شکل ۱۷** تأثیر دامنه ارتعاشات در دماهای شیر متفاوت بر قطر پودر تولید شده به روش التراسونیک بررسی شده است. در این حالت دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ارتعاشات برابر ۱۵ کیلوهرتز در نظر گرفته می‌شود. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش دامنه ارتعاشات قطر پودر تولید شده به روش التراسونیک افزایش می‌یابد. بدین صورت که در دمای شیر ۱۵ درجه سانتی‌گراد افزایش دامنه ارتعاشات از ۱ میکرون به ۴ میکرون باعث افزایش ۱۵٫۶ درصدی قطر پودر تولید شده می‌شود. دلیل افزایش قطر پودر تولید شده این است که با افزایش دامنه



شکل ۱۷- قطر پودر تولید شده پس از تبخیر به روش التراسونیک و خشک شدن در دامنه ارتعاشات مختلف و در دماهای شیر متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ارتعاشات برابر ۱۵ کیلوهرتز)

Fig. 17- The diameter of the produced powder after ultrasonic evaporation and drying in different vibration amplitudes and at different milk temperatures (Dryer gas temperature equals to 100 ° C and vibration frequency equals to 15 kHz)

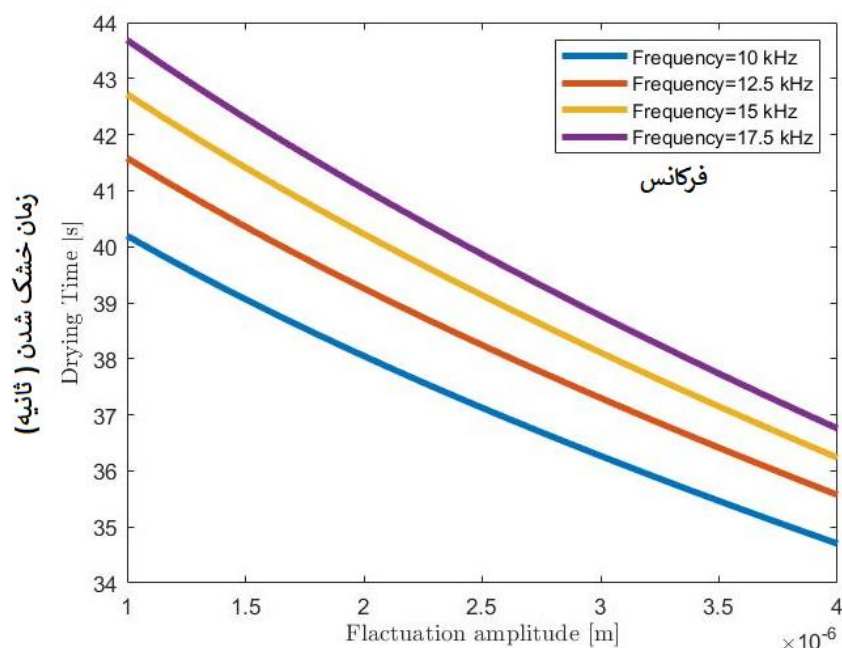


شکل ۱۸- قطر پودر تولید شده پس از تبخیر به روش التراسونیک و خشک شدن در دامنه و فرکانس ارتعاشات مختلف (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۲۰ درجه سانتی‌گراد)

Fig. 18- Diameter of produced powder after ultrasonic evaporation and drying at different amplitudes and frequencies of vibrations (Dryer gas temperature is 100 ° C and milk temperature is 20 ° C)

نرخ تبخیر مقدار محتوی رطوبت و رطوبت مطلق در خروجی افزایش یافته و طبق روابط ۱۷ و ۱۸ منجر به کاهش T_{wb} و زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده می‌شود. شکل ۲۰ زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در دامنه ارتعاشات مختلف و در دمای شیر متفاوت را نشان می‌دهد که در آن دمای گاز خشک‌کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ارتعاشات برابر ۱۵ کیلوهرتز است. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش دمای شیر زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده کمتر می‌شود که در بخش قبل به جزئیات و دلایل آن پرداخته شده است.

در شکل ۱۹ تأثیر دامنه ارتعاشات در فرکانس‌های ارتعاشات مختلف بر زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک بررسی شده است. در این حالت دمای گاز خشک‌کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۲۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته می‌شود. همانطور که از این نمودار مشخص است با افزایش دامنه ارتعاشات زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک کاهش می‌یابد. بدین صورت که در فرکانس ارتعاشات برابر ۱۵ کیلوهرتز افزایش دامنه ارتعاشات از ۱ میکرون به ۴ میکرون باعث کاهش ۱۴/۴ درصدی زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده تولید شده می‌شود. دلیل کاهش زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده با افزایش دامنه ارتعاشات و افزایش

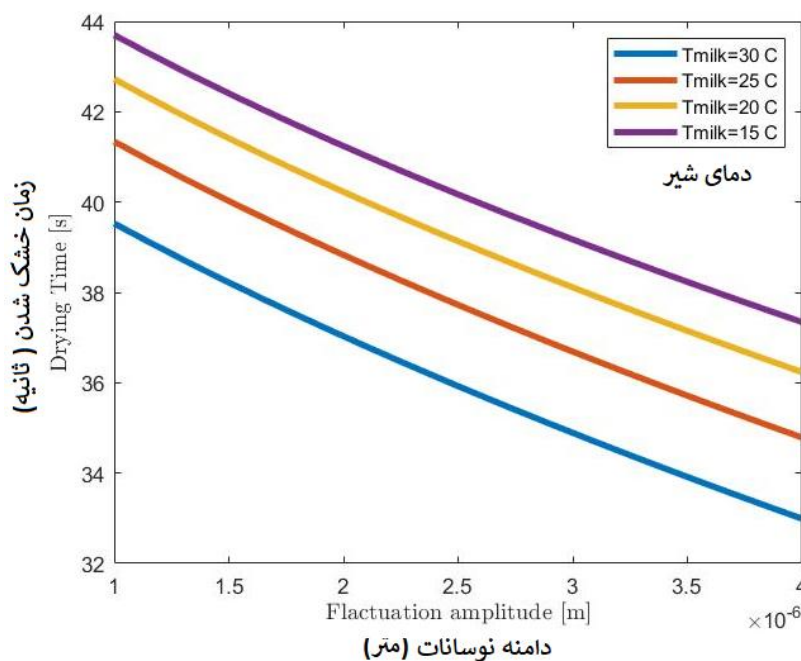


دامنه نوسانات (متر)

شکل ۱۹- زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در فرکانس‌های مختلف و در دامنه‌های ارتعاشات متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شیر برابر ۲۰ درجه سانتی‌گراد)

Fig. 19- Time required for drying the ultrasonic evaporated droplets at different frequencies and in different vibration amplitudes

(Dryer gas temperature equals to 100 ° C and valve temperature equals to 20 ° C)



دامنه نوسانات (متر)

شکل ۲۰- زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک در دامنه‌های ارتعاشات و در دمای شیر متفاوت (دمای گاز خشک کن برابر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ارتعاشات برابر ۱۵ کیلو هرتز)

Fig. 20- Time required for drying the ultrasonic evaporated droplets at vibration amplitudes and at different milk temperatures

(Drying gas temperature equals to 100 ° C and vibration frequency equals to 15 kHz)

جدول ۱- خلاصه نتایج شبیه سازی
Table 1- Summary of simulation results

متغیر مستقل (Variable)	درصد تغییرات (Percent of variation)			
	زمان خشک شدن (Drying time)	قطر پودر (Powder diameter)	نرخ تبخیر (Evaporation rate)	قطر ذرات بخار (Diameter of steam particles)
فرکانس نوسان (Vib. frequency)	+21.4%	-17.2%	-44%	-18%
دامنه نوسان (Vib. Amplitude)	-14.4%	+15.6%	+56.3%	+15.8%
دمای شیر (Milk Temperature)	-12.4%	+11.5%	+34.8%	+11.3%

- خلاصه ای از درصد تغییرات پارامترهای مختلف با تغییر متغیرهای مستقل مسئله در **جدول ۱** آمده است. در این جدول فرکانس نوسان از ۱۰ کیلوهرتز به ۴۰ کیلوهرتز، دامنه نوسان از ۱ میکرون به ۴ میکرون و دمای شیر از ۱۵ درجه سانتی گراد به ۳۰ درجه سانتی گراد رسیده است و درصد تغییرات قطر ذرات تبخیر شده، نرخ تبخیر، قطر پودر بدست آمده و زمان خشک شدن ارائه شده است.

نتیجه گیری

- در این پژوهش فرآیند تبخیر التراسونیک شیر کامل و سپس خشک سازی و تولید پودر شیر بصورت ریاضی و ترمودینامیکی مدلسازی شده است. بطوری که پس از بررسی کارهای انجام شده در این زمینه و استخراج روابط و معادلات حاکم، کد محاسباتی به کمک نرم افزار MATLAB نوشته شد و پس از اطمینان از اینکه شرایط حل در محدوده مورد نظر معادلات ارائه شده هستند به ارائه نتایج پرداخته شد. در کار حاضر تأثیر فرکانس و دامنه ارتعاشات التراسونیک و همچنین دمای اولیه شیر بر قطر ذرات تبخیر شده، نرخ تبخیر، قطر پودر تولید شده و زمان لازم برای خشک شدن قطرات تبخیر شده به روش التراسونیک بررسی شده است. اهم و خلاصه نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر در ادامه آمده است:

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده به شماره ابلاغیه UTH:1399/2/1372 از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه تربت-حیدریه می باشد که بدین وسیله تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Arun, B.S., Mariappan, V., & Maisotsenko, V. (2020). Experimental study on combined low temperature regeneration of liquid desiccant and evaporative cooling by ultrasonic atomization, *International Journal of Refrigeration* 112: 100-09. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2019.11.023>.
2. Bakshi, A.S., & Smith, D.E. (1984). Effect of fat content and temperature on viscosity in relation to pumping requirements of fluid milk products, *Journal of Dairy Science* 67(6): 1157-1160. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81417-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81417-4).
3. Berlin, E., & Pallansch, M.J. (1963). Influence of drying methods on density and porosity of milk powder granules, *Journal of Dairy Science* 46(8): 780-784. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(63\)89148-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(63)89148-1).

4. Briceño-Gutierrez, D., Salinas-Barrera, V., Vargas-Hernández, Y., Gaete-Garretón, L., & Zanelli-Iglesias, C. (2015). On the ultrasonic atomization of liquids, *Physics Procedia* 63: 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2015.03.006>.
5. Broniarz-Press, L., Sosnowski, T.R., Matuszak, M., Ochowiak, M., & Jabłczyńska, K. (2015). The effect of shear and extensional viscosities on atomization of Newtonian and non-Newtonian fluids in ultrasonic inhaler, *International Journal of Pharmaceutics* 485: 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.02.065>.
6. Candia-Muñoz, N., Ramirez-Bunster, M., Vargas-Hernández, Y., & Gaete-Garretón, L. (2015). Ultrasonic spray drying vs high vacuum and microwaves technology for blueberries, *Physics Procedia* 70: 867-71. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2015.08.178>.
7. D'Addio, S.M., John G.C., Chi Lip Kwok Ph., Robert, K., Prud, H., & Hak-Kim, C. 2012. Constant size, variable density aerosol particles by ultrasonic spray freeze drying, *International Journal of Pharmaceutics* 427: 185-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.048>.
8. Deepu, P., Chang P., & Moghaddam, S. (2018). Dynamics of ultrasonic atomization of droplets, *Experimental Thermal and Fluid Science* 92: 243-47. <https://doi.org/10.1016/j.expthermflusci.2017.11.021>.
9. Faraday, M. (1831). On the forms and states assumed by fluids in contact with vibrating elastic surfaces, *Phil. Trans. R. Soc. London* 52: 319-340.
10. Grasmeijer, N. (2019). Identifying critical process steps to protein stability during spray drying using a vibrating mesh or a two-fluid nozzle, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 128: 152-157. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.027>.
11. Koumei, H., Takenaka, N., Nanzai, B., Okitsu, K., Bandow, H., & Maeda, Y. (2009). Influence of adding salt on ultrasonic atomization in an ethanol-water solution, *Ultrasonics Sonochemistry* 16: 150-54. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.07.002>.
12. Isleroglu, H., Turker, I., Tokatli, M., & Koc, B. (2018). Ultrasonic spray-freeze drying of partially purified microbial transglutaminase, *Food and Bioprocess Processing* 111: 153-64. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.08.003>.
13. Kim, H., Jaegun, L., & You-Yeon, W. (2015). A simple derivation of the critical condition for the ultrasonic atomization of polymer solutions, *Ultrasonics* 61: 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2015.04.007>.
14. Kirpalani, D.M., & Suzuki, K. (2011). Ethanol enrichment from ethanol-water mixtures using high frequency ultrasonic atomization, *Ultrasonics Sonochemistry* 18: 1012-17. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.05.013>.
15. Kudo, T., Kazuhiko, S., Sankoda, K., Norikazu, N., & Nii, S. (2017). Effect of ultrasonic frequency on size distributions of nanosized mist generated by ultrasonic atomization, *Ultrasonics Sonochemistry* 37: 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.019>.
16. Lang, R.J. (1962). Ultrasonic atomization of liquids, *Journal Acoust. Soc. Am.* 34: 6-8.
17. Lebedev, E., Gordienko, M., Troyankin, A., & Menshutina, N. (2017). CFD Simulation of spray drying with ultrasonic dispersion in Antonio Espuña, Moisès Graells and Luis Puigjaner (eds.), *Computer Aided Chemical Engineering* (Elsevier). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63965-3.50006-4>.
18. Li, W., Pan, Y., Yao, Y., & Dong, M., (2018). Modeling and parametric study of the ultrasonic atomization regeneration of desiccant solution, *International Journal of Heat and Mass Transfer* 127: 687-702. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2018.07.001>.
19. Lisboa, H.M., Duarte, M.E., & Cavalcanti-Mata, M.E. (2018). Modeling of food drying processes in industrial spray dryers, *Food and Bioprocess Processing* 107: 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.09.006>.
20. Naidu, H., Kahraman, O., & Feng, H. (2022). Novel applications of ultrasonic atomization in the manufacturing of fine chemicals, pharmaceuticals, and medical devices, *Ultrasonics Sonochemistry* 86: 105984. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105984>.
21. Peskin, R.L., & Raco, R.J. (1963). Ultrasonic atomization of liquids, *Journal Acoust. Soc. Am.* 35: 1378-1381.
22. Rajan, R., & Pandit, A.B. (2001). Correlations to predict droplet size in ultrasonic atomization, *Ultrasonics* 39: 235-255. [https://doi.org/10.1016/S0041-624X\(01\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0041-624X(01)00054-3).
23. Ramisetty, K.A., Pandit, A.B., & Gogate, P.R. (2013). Investigations into ultrasound induced atomization, *Ultrasonics Sonochemistry* 20: 254-64. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.05.001>.
24. Rayleigh, L. (1883). On the crispaton of fluid resting upon a vibrating support, *Phil. Mag.* 15: 50-58.
25. Samborska, K. (2022). Innovations in spray drying process for food and pharma industries, *Journal of Food Engineering* 321: 110960. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.110960>.

26. Tatar Turan, F., Cengiz, A., & Kahyaoglu, T. (2015). Evaluation of ultrasonic nozzle with spray-drying as a novel method for the microencapsulation of blueberry's bioactive compounds, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 32: 136-45. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.011>.
27. Tembely, M., Lecot, C., & Soucemarianadin, A. (2011). Prediction and evolution of drop-size distribution for a new ultrasonic atomizer, *Applied Thermal Engineering* 31: 656-67. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2010.09.027>.
28. Vehring, R. (2008). Pharmaceutical particle engineering via spray drying, *Pharmaceutical Research* 25(5): 999-1022.
29. Walzel, P. (1993). Liquid atomisation, *International Chemical Engineering* 33: 46-60.
30. Watson, P.D. (1956). *Effect of variations in fat and temperature on the surface tension of various milks*, Fifty-first Annual Meeting, American Dairy Science Association, Storrs, Connecticut, June 19-21.
31. Wisutmethangoon, S., Plookphol, T., & Sungkhaphaitoon, P. (2011). Production of SAC305 powder by ultrasonic atomization, *Powder Technology* 209: 105-11. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.02.016>.
32. Yang, Z., Lin, B., Zhang, K., & Lian, Z. (2015). Experimental study on mass transfer performances of the ultrasonic atomization liquid desiccant dehumidification system, *Energy and Buildings* 93: 126-36. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2015.02.035>.
33. Yang, Z., Zhang, K., Yunho, M., & Lian, Z. (2016). Performance investigation on the ultrasonic atomization liquid desiccant regeneration system, *Applied Energy* 171: 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.03.008>.
34. Yang, Z., Zhang, K., Yunho, M., & Lian, Z. (2014). Improvement of the ultrasonic atomization liquid desiccant dehumidification system, *Energy and Buildings* 85: 145-54. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2014.09.033>.
35. Yao, Ye., Wei, L., & Yixiong, H. (2020). Modeling and performance investigation on the counter-flow ultrasonic atomization liquid desiccant regenerator, *Applied Thermal Engineering* 165: 14573. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2019.114573>.
36. Ziaee, A. (2020). A rational approach towards spray drying of biopharmaceuticals: The case of lysozyme, *Powder Technology* 366: 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.02.057>.
37. Zhang, K., Yang, Z., Lian, Z., & Li, X. (2017). Simulation on regeneration performance for the ultrasonic atomization liquid desiccant system, *Procedia Engineering* 205: 2925-32. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.10.101>.



Production and Evaluation of Nanoliposomes Loaded with *Capparis spinosa* Extract

M. Salamatian¹, Y. Zahedi^{ID2*}, R. Shaddel³

Received: 2022.05.01

Revised: 2022.07.27

Accepted: 2022.08.01

Available Online: 2022.08.01

How to cite this article:

Salamatian, M., Zahedi, Y., & Shaddel, R. (2023). Production and evaluation of nanoliposomes loaded with *Capparis spinosa* extract. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 169-180. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76151.1162>

Introduction

Capparis spinosa is a perennial herb from the *Capparidaceae* family that is mainly distributed in arid and semi-arid regions. Its fruits are oval shaped, approximately 3 cm long, greenish in color with red pulp. *Capparis spinosa* extract is a rich source of phenolic compounds. The instability of phenolic compounds in the environmental conditions as well as their bitter or astringent taste has created challenges for the use of these compounds in the food industry. Encapsulation is a method that can positively affect bioaccessibility and bioavailability as it ensures the coating of the active component and its targeted delivery to a specific part of the digestive tract and controlled release. Encapsulation using nanoliposomes seems to be an appropriate technique to overcome these issues. Nanoliposomes are the nanometric version of liposomes. Liposomes are spherical particles composed of lipid molecules (mainly phospholipids) that tend to accumulate in polar solvents such as water in the form of bilayer membranes. Encapsulation with liposomes is an effective way to preserve the intrinsic properties of bioactive compounds during storage and production of foods fortified with them, as well as a physicochemical barrier against prooxidant agents such as free radicals, oxygen and UV.

Materials and Methods

Materials: *Capparis spinosa* fruits, were collected from subtropical regions of Ilam province (Iran). Folin ciocalteu, gallic acid and tween 80 from Merck (Germany), cholesterol and phosphatidylcholine from Sigma- Aldrich (Germany) were obtained.

Methods: The extract was obtained from *capparis spinosa* fruit powder using ultrasonic bath (Backer, vCLEAN 1-L6, Iran). The phenolic content was measured by folin ciocalteu method. Nanoliposomes containing *capparis spinosa* extract were prepared in ratios of 60- 0, 50- 10, 40- 20 and 30- 30 w/w lecithin- cholesterol. Then, particle size, PI and zeta potential were measured by DLS (Horiba, Japan) at 25 °C. After calculating the encapsulation efficiency using its corresponding equation, the investigation of possible reactions between *capparis spinosa* extract and phospholipids was performed using FTIR at a frequency of 400- 4000 cm⁻¹. In order to observe shape and morphology of nanoliposomes loaded with *capparis spinosa* extract by field emission scanning electron microscopy (FESEM), a drop of sample was poured on the laboratory slide, dried at ambient temperature and then, the sample was coated with gold layer using an ion sputtering device. The stability of the samples was evaluated by visual observation of phase separation and the release rate of phenolic compounds encapsulated in nanoliposomes at ambient temperature over a period of 60 days.

Results and Discussion

1, 2 and 3- Former M.Sc Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: Y_zahedi@uma.ac.ir)

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.76151.1162](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76151.1162)

The amount of phenolic extract was 6.328 mg of GAE/g dry sample. The average particle size (Z- Average) was in the range of 95.05 to 164.25 nm. Increasing the cholesterol concentration resulted in enhancement of particle size of nanoliposomes. The particle size distribution was in an acceptable range of 0.3 to 0.5 ($PI \leq 0.5$). The PI of the cholesterol-free nanoliposomes was maximum and significantly higher than that of the others. Addition of cholesterol increased zeta potential from -60.40 to -68.55. Higher zeta potential values indicate a higher and long term stability of the particles. Also, cholesterol led to an increase of encapsulation efficiency (EE). The stability of phenolic compounds loaded in nanoliposomes was affected by cholesterol during storage time via reducing fluidity and permeability of liposomal membrane. Presence of cholesterol also inhibited the membrane rupture and any changes into it. Results of FTIR showed interactions between wall constituents of nanoliposome and *capparis spinosa* extract, and confirmed successful loading of the extract within nanoliposomes. Images of FESEM were in agreement with DLS results regarding particle size and particle size distribution.

Conclusion

This study indicate that the nanoliposomes have potential applications in improvement of the shelf life of nutraceuticals, stability of cosmetic materials and drug delivery systems. The phenolic compounds of encapsulated extract showed good stability within two months of storage at room temperature. The results showed that the problem of instability of phenolic compounds, which leads to their limited commercial application, can be solved by encapsulation.

Keywords: Nanoliposome, Nutraceutical, Phenolic compounds

مقاله پژوهشی

تولید و ارزیابی نانولیپوزوم‌های حامل عصاره هندوانه کوهی

معصومه سلامتیان^۱ - یونس زاهدی^{۲*} - رضوان شاددل^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۵/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۱۰

چکیده

عصاره هندوانه کوهی سرشار از ترکیبات فنولی است که استفاده از آن بدلیل ناپایداری ترکیبات مذکور در شرایط محیطی و همچنین طعم تلخ یا گس آن‌ها در مواد غذایی محدود شده است. روش‌های ریزپوشانی مانند استفاده از نانولیپوزوم‌ها یکی از ساده‌ترین راهکارهای موجود است. در این پژوهش پس از استخراج عصاره هندوانه کوهی به کمک امواج اولتراسوند و تعیین میزان ترکیبات فنولی آن (۶/۳۲۸ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم وزن خشک)، نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره هندوانه کوهی در نسبت‌های وزنی ۶۰-، ۵۰-، ۴۰- و ۳۰- لستین - کلسترول تهیه شدند. سپس آزمون‌های تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا جهت تعیین خصوصیات آن‌ها انجام شد. پس از تعیین کارایی ریزپوشانی، آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) جهت بررسی واکنش‌های احتمالی عصاره هندوانه کوهی و فسفولیپید انجام گردید. شکل و اندازه نانولیپوزوم‌های با نسبت وزنی ۶۰- لستین - کلسترول بارگذاری شده با عصاره هندوانه کوهی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) مشاهده گردید. پایداری نمونه‌ها از طریق محاسبه میزان رهايش ترکیبات فنولی محصور شده در نانولیپوزوم‌ها در دمای محیط و در یک دوره ۶۰ روزه مورد بررسی قرار گرفت. میانگین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات برای نسبت‌های مختلف به ترتیب در محدوده ۱۶۴/۲۵ - ۹۵/۰۵ نانومتر و ۰/۵۱ - ۰/۳۲ به دست آمد. میزان پتانسیل زتا نیز در محدوده ۶۰/۴۰- تا ۶۸/۵۵- قرار گرفت. ترکیبات فنولی پس از ۶۰ روز در نانولیپوزوم‌های با نسبت وزنی ۶۰- لستین - کلسترول ۷۲/۴۵٪ و در نانولیپوزوم‌های با نسبت وزنی ۵۰- لستین - کلسترول ۷۳/۸۷٪ پایداری داشتند. نتایج نشان داد که مشکل ناپایداری ترکیبات فنولی که منجر به کاربرد محدود تجاری آن‌ها می‌شود با ریزپوشانی قابل برطرف شدن است.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنولی، غذا-دارو، نانولیپوزوم

مقدمه

هندوانه کوهی بیضی شکل و طول آن‌ها تقریباً ۳ سانتی متر می‌باشد. رنگ پوسته میوه سبز و داخل میوه قرمز و پر از دانه‌های کوچک و لزج است. میوه‌ها سرشار از کلسیم، پتاسیم، سدیم، روی، مس، منگنز و آهن هستند. همچنین پوست و عصاره آبی میوه دارای فعالیت‌های ضد التهابی و ضد قارچی می‌باشد و نیز عصاره میوه در موش‌ها اثر ضد قندخون نشان داده است. دیابت و عوارض قلبی - عروقی با مصرف میوه‌های خشک هندوانه کوهی بهبود (Anwar et al., 2016; Ghani et al., 2017)؛). هندوانه کوهی از منابع غنی از ویتامین‌ها، مواد معدنی ضروری و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است (Anwar et al., 2016). حساسیت و ناپایداری پلی فنول‌ها به شرایط محیطی همچنین طعم تلخ یا گس آن‌ها، استفاده از این ترکیبات در محصولات غذایی و دارویی مختلف را با چالش‌های بسیاری مواجه

هندوانه کوهی با نام علمی *Capparis spinosa* غنی از ترکیبات فنولی می‌باشد که این ترکیبات مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آیند (Khanavi et al., 2020). رشد این گیاه در کمبود مواد مغذی و مقاومت آن به شرایط سخت، خاک‌های شور، گرما و آفتاب شدید، سبب پراکندگی گسترده آن در ایران شده است (2016; Anwar et al., Akhavan Moghanloo et al., 2019). میوه‌های

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
(Email: Y_zahedi@uma.ac.ir)
(*)- نویسنده مسئول:
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.76151.1162

نامطلوب ترکیبات غذا-دارو با ترکیبات موجود در ماتریکس غذایی جلوگیری به عمل می‌آید (Ghanbari et al., 2016). هدف از این تحقیق استخراج مواد زیست فعال هندوانه کوهی و نانوریزپوشانی آن‌ها با استفاده از نانولیپوزوم و سپس بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات حاصله است.

مواد و روش‌ها

مواد

میوه‌های بالغ هندوانه کوهی در اواسط تابستان از مناطق نیمه گرمسیری استان ایلام جمع‌آوری و تا زمان استفاده در درامای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل ۱). اتانول ۹۶٪ و استیک اسید گلاسیال از شرکت مجلی، کربنات سدیم از شرکت آروین شیمی دلتا، فولین سیوکالچو، گالیک اسید و توین ۸۰ از شرکت مرک آلمان، کلسترول و فسفاتیدیل کولین سویا از شرکت سیگما آلدْرِیج آلمان تهیه گردید.



شکل ۱- نمایی از میوه هندوانه کوهی استفاده شده

Fig. 1- The used *capparis spinosa* fruit picture

محیط تاریک و دمای اتاق ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) نگهداری گردید تا عصاره‌گیری انجام شود. روز بعد فیلتراسیون با استفاده از کاغذ صافی انجام گرفت. سپس تحت فشار کاهش یافته و دمای 45°C توسط روتاری اوپراتور (Ika مدل RV 05 basic، آلمان) حلال، بازیابی و از عصاره جدا شد. عصاره حاصل برای تبخیر باقیمانده حلال و خشک شدن به مدت ۴۸ ساعت در 40°C نگهداری شد و سپس به فریز درایر (ZiRBUS مدل Vaco 5، آلمان) انتقال داده شد تا فرآیند خشک شدن تکمیل گردد.

اندازه‌گیری بازده استخراج عصاره هندوانه کوهی

با تقسیم کردن وزن عصاره خشک به دست آمده بر وزن ماده اولیه، بازده استخراج عصاره محاسبه شد.

کرده است. یکی از راه‌های اصلی به حداقل رساندن این معایب، ریزپوشانی این ترکیبات می‌باشد (Nemati and Gharehkhani, 2018). فناوری نانولیپوزوم یکی از کاربردی‌ترین سیستم‌های ریزپوشانی و رهایش کنترل شده می‌باشد که از آنتی اکسیدان‌ها محافظت کرده و دسترسی زیستی به آن‌ها را افزایش می‌دهد. نانولیپوزوم‌ها نسخه نانومتری لیپوزوم‌ها هستند که از یک یا چند لایه لیپیدی و یا فسفولیپیدی تشکیل شده‌اند. از مزیت‌های سیستم‌های لیپوزومی در مقایسه با سایر روش‌های محصورسازی این است که آن‌ها از ترکیباتی تشکیل شده‌اند که برای سلامتی ما مفید می‌باشند. تحقیقات صورت گرفته در مورد عملکرد بیولوژیکی فسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها مزیت‌های سلامت بخشی از جمله محافظت از کبد، بهبود حافظه و ممانعت از جذب کلسترول را شناسایی کرده‌اند (Mozafari et al., 2008). ریز پوشانی مواد غذا- دارو در حامل‌های لیپیدی، منجر به افزایش قابلیت زیست فراهمی مواد فعال، رهایش کنترل شده و دقیق آن‌ها، حفظ پایداری آن‌ها در برابر شرایط مختلف محیطی و حالایت مواد فعال آبریز در محیط آبی می‌شود (Ghanbarzadeh et al., 2016a). همچنین از برهم‌کنش‌های

روش‌ها

تهیه پودر میوه هندوانه کوهی

میوه‌های هندوانه کوهی توسط خشک کن انجمادی (Christ مدل ALPHA 1-4 LD، آلمان) در دمای -48 تا -51 درجه سانتی‌گراد و فشار 0.11 میلی‌بار خشک شدند و سپس توسط دستگاه آسیاب بصورت پودر درآمدند.

عصاره‌گیری

پودر میوه هندوانه کوهی با اتانول ۹۶٪ (نسبت ۱:۲۰) ترکیب شده و جهت افزایش میزان استخراج درون حمام اولتراسونیک (Backer مدل vCLEAN 1- L6، ایران) با دمای 30°C در دو مدت زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه و با فرکانس ۴۰ کیلو هرتز قرار داده شد. سپس به مدت ۲ ساعت روی شیکر قرار داده شده و در طول شب در

به ۵۰ با آب دیونیزه رقیق شده و اندازه‌گیری برای تمام نمونه‌ها در دو تکرار و در دمای °C ۲۵ انجام گرفت.

بازده ریزپوشانی ترکیبات فنولی (EE)^۲

بازده ریزپوشانی با ترکیبی از روش‌های ذکر شده توسط توکلی و همکاران (Tavakoli et al., 2018) و سقاشیرپور (Saghashirpour, 2014) تعیین شد. بدین منظور ۱۰ میلی لیتر از محلول نانولیپوزومی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (Hettich مدل universal centrifuge، آلمان). پس از جداسازی مایع رویی لیپوزوم‌ها، با نسبت ۲ به ۱ با کلروفرم ۰/۱ نرمال ورتکس شد تا غشای لیپوزومی شکسته شود و ترکیبات فنولی آزاد گردند. سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میلی‌متری فیلتراسیون انجام شد و میزان ترکیبات فنولی کپسوله شده و آزاد با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد کارایی ریزپوشانی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید:

$$(1) \quad 100 \times \frac{\text{میزان ترکیبات فنولی کپسوله شده در لیپوزوم}}{\text{میزان ترکیبات فنولی موجود در کل محلول لیپوزومی}} = \text{درصد ریزپوشانی}$$

پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزوم‌های حامل عصاره

هندوانه کوهی طی ۶۰ روز نگهداری

ترکیبات فنولی آزاد و لیپوزومی (پس از تخریب دیواره لیپوزومی) در طی ۶۰ روز نگهداری در دمای °C ۲۵ و در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و با روز اول مقایسه شد تا تاثیر ساختار لیپوزوم بر پایداری شیمیایی تعیین گردد.

طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)^۳

طیف سنجی مادون قرمز برای بررسی واکنش‌های احتمالی عصاره هندوانه کوهی-فسفولیپید در دامنه طول موج 4000 cm^{-1} - ۴۰۰ و برای هر کدام از مواد دیواره شامل فسفاتیدیل کولین و کلسترول همچنین برای نمونه‌های فریز درای شده عصاره هندوانه کوهی، محلول لیپوزومی هندوانه کوهی و محلول لیپوزومی فاقد عصاره هندوانه کوهی (نانولیپوزوم های خالی) با نسبت‌های لستین-کلسترول ۶۰-۰ و ۱۰-۵۰ انجام گردید.

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی عصاره هندوانه کوهی

به منظور اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولی از روش فولین-سیوکالچو استفاده شد. پس از تهیه محلول آبی عصاره در غلظت ۲۵۰۰ ppm، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰٪ فولین سیوکالچو مطابق روش کسا و همکاران (Kossah et al., 2011) مخلوط شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول ۷/۵٪ کربنات سدیم به آن افزوده شد و پس از فویل پیچی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (BEL PHOTONICS مدل UV-M51، ایتالیا) خوانده شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد. منحنی استاندارد بر اساس گالیک اسید ترسیم شد و میزان ترکیبات فنولی برحسب میلی گرم گالیک اسید در هر گرم هندوانه کوهی تعیین شد.

آماده‌سازی نانولیپوزوم‌های حامل عصاره هندوانه کوهی

نانولیپوزوم‌های حامل عصاره هندوانه کوهی در نسبت‌های وزنی ۶۰-۵۰، ۴۰-۲۰ و ۳۰-۳۰ لستین-کلسترول تهیه شدند. بدین منظور پس از تهیه بافر سدیم استات ۲۵۰ میلی‌مولار و تنظیم pH آن روی ۳/۵، مقادیر مختلف لستین در بافر تحت حرارت ملایم روی همزن مغناطیسی هیتردار (آلفا مدل D500، ایران) به مدت ۲ ساعت هم زده شد و یک شب در یخچال نگهداری شد تا به خوبی هیدراته گردد. سپس به نسبت ۱۰ میلی‌لیتر بافر استفاده شده ۲۵ میلی‌گرم عصاره، ۲۰ میلی‌گرم امولسیفایر توئین ۸۰ جهت بهبود پایداری سیستم لیپوزومی و نسبت‌های ذکر شده از کلسترول، به لستین هیدراته شده افزوده شد. مخلوط حاصل توسط همزن مغناطیسی هیتردار هم زده شد و پس از اختلاط کامل، جهت کاهش اندازه ذرات تا مقیاس نانو توسط هموژنایزر (Ika مدل T25 digital، آلمان) به مدت ۵ دقیقه با ۲۰ هزار دور در دقیقه در دمای بالاتر از دمای انتقال فاز فسفاتیدیل کولین سویا که °C ۵۲ می‌باشد، هموژن گردید و پس از آن، ۵ دقیقه (۱۵ ثانیه روشن و ۵ ثانیه خاموش) در حمام اولتراسونیک با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز تحت امواج اولتراسوند قرار گرفت.

ارزیابی نانولیپوزوم‌های حامل هندوانه کوهی

اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا

اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های هندوانه کوهی توسط دستگاه DLS^۱ اندازه‌گیری شد. برای این منظور نمونه‌ها به نسبت ۱

2- Encapsulation Efficiency

3- Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

1- Dynamic Light Scattering

میکروسکوپ الکترونی FESEM^۱

ویژگی‌های سطحی و مورفولوژی لیپوزوم‌های دارای نسبت لستین - کلسترول ۶۰-۰ در ساختار خود توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (MIRA3 FEG-SEM، Tescan، چک) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور یک قطره از محلول لیپوزومی روی لام آزمایشگاهی قرار گرفت و به مدت یک ساعت در دمای محیط خشک شد. سپس توسط دستگاه اسپاترینگ با لایه‌ای از طلا پوشانده شد و تصویر برداری توسط میکروسکوپ الکترونی انجام شد (Yu, 2012).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن ($p < 0.05$) با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام شد. برای بررسی پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزوم‌ها طی دوره نگهداری، داده‌ها بصورت تکرار در زمان و مقایسه میانگین آن‌ها با روش آزمون LSD صورت گرفت. نمودارها به کمک نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ ترسیم شد.

نتایج و بحث

بازده استخراج عصاره هندوانه کوهی

در این پژوهش جهت افزایش میزان استخراج عصاره هندوانه کوهی از حمام اولتراسونیک با دمای ۳۰ °C و دو مدت زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه بهره گرفته شد و با راندمان استخراج بدون استفاده از اولتراسوند مقایسه شد. بیشترین بازده استخراج عصاره در هنگام اعمال ۶۰ دقیقه اولتراسوند به دست آمد که برابر با $0.55 \pm 0.12/39\%$ بود. بازده استخراج به دست آمده در هنگام اعمال ۳۰ دقیقه اولتراسوند $0.91 \pm 0.10/5$ و در صورت عدم استفاده از اولتراسوند $0.14 \pm 0.06/6\%$ بود که هر دو مدت زمان اعمال اولتراسوند در مقایسه با استخراج بدون اولتراسوند افزایش بیش از ۱/۵ برابری در میزان بازده استخراج نشان دادند. افزایش استخراج توسط اولتراسوند به پدیده کاویتاسیون^۲ نسبت داده شده است.

میزان ترکیبات فنولی عصاره هندوانه کوهی

میزان فنول کل برای عصاره هندوانه کوهی $6/328$ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم وزن خشک ($632/8$ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) محاسبه شد. میزان فنول کل هندوانه کوهی می‌تواند بسته به شرایط جغرافیایی، مرحله رشد گیاه و بخش‌های

مختلف گیاه متفاوت باشد. میزان فنول کل و کربوهیدرات‌ها در طی رسیدن میوه هندوانه کوهی افزایش می‌یابد (Sharafi et al., 2017). در پژوهشی میزان فنول کل هندوانه کوهی ۳۷ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک گزارش گردید (Aliyazicioglu et al., 2013). آرار و همکاران (Arrar et al., 2013) میزان ترکیبات فنولی عصاره آبی میوه‌ها را ۷ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم گزارش کردند. در بررسی میزان ترکیبات فنولی بخش‌های خوراکی هندوانه کوهی توسط بویار و همکاران (Bhoyar et al., 2018)، میزان ترکیبات فنولی میوه‌ها $4/07$ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم وزن خشک گزارش گردید. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، میوه هندوانه کوهی مقادیر مناسبی از ترکیبات فنولی دارد؛ از این رو نیاز به تحقیقات بیشتری جهت استفاده از آن در مدل‌های غذایی وجود دارد تا بتوان آن را جهت غنی‌سازی فراورده‌های غذایی به صنعت غذا معرفی نمود.

ویژگی‌های نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره هندوانه کوهی

اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا

نتایج حاصل از DLS در جدول ۱ ارائه شده است. اندازه ذرات به صورت Z-average که مقدار میانگین وزنی قطر ذرات می‌باشد برای نسبت‌های مختلف لستین - کلسترول در محدوده $95/05-164/25$ نانومتر قرار گرفت. همانگونه که مشاهده می‌شود اضافه شدن کلسترول به ساختار لیپوزومی افزایش اندازه ذرات را در پی داشت و با افزایش غلظت این ماده، افزایش اندازه ذرات تشدید گردید. کلسترول می‌تواند پیوستگی مولکول‌های آبگریز غشاء دولایه‌ای را از طریق یکی از این مکانیسم‌ها کاهش دهد: ۱- کلسترول با مولکول‌های فسفولیپید برای تصاحب فضای لیپوفیل در غشای لیپیدی رقابت می‌کند (Fang et al., 2001). ۲- کلسترول با کاهش انعطاف‌پذیری غشاء دو لایه‌ای سبب به هم پیوستن مولکول‌های لیپوفیل به غشاء لیپیدی می‌شود (Mohammed et al., 2004). مالپروس و همکاران (Malheiros et al., 2012) به نتیجه مشابهی دست یافتند؛ آنها عنوان کردند که افزودن کلسترول سبب افزایش قطر وزیکول‌ها در لیپوزوم‌های حاوی نایسین گردید.

همچنین، در تولید نانولیپوزوم‌های اسانس باریجه، افزودن کلسترول به ساختار لیپوزومی اندازه ذرات را افزایش داد (Najaf et al., 2019). به علاوه در پژوهشی روی لیپوزوم‌های تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک افزودن کلسترول منجر به سفتی ساختار لیپوزومی و افزایش اندازه ذرات شد (Tseng et al., 2007). نتایج متفاوتی در مورد اثر کلسترول بر اندازه ذرات لیپوزومی گزارش شده است؛ قنبرزاده و همکاران (Ghanbarzadeh et al., 2017).

مشاهده نمودند افزودن کلسترول به ساختار لستینی نانولیپوزوم سبب کاهش اندازه ذرات از ۷۲ به ۶۳ نانومتر گردید.

(2016b) در تهیه نانولیپوزوم‌های ویتامین A پالمیتات گزارش نمودند که افزودن کلسترول اثر معنی داری بر اندازه ذرات نداشته است. بر خلاف این یافته‌ها ویریاروج و همکاران (Viriya-roj *et al.*, 2009)

جدول ۱- اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتای محلول لیپوزومی حاوی عصاره هندوانه کوهی تهیه شده با نسبت‌های مختلف لستین و کلسترول

Table 1- Average particle size, particle size distribution and zeta potential of liposomes loaded with *Capparis spinosa* fruit extract, and prepared with various quantities of lecithin and cholesterol

Lecithin: cholesterol (w:w)	Z- Average (nm)	Polydispersity index (PI)	Zeta potential (mv)
نسبت لستین و کلسترول (وزنی/وزنی)	میانگین وزنی قطر ذرات (نانومتر)	شاخص پراکندگی ذرات	پتانسیل زتا (میلی ولت)
60 : 0	95.05 ± 5.30 ^c	0.517 ± 0.06 ^a	-60.40 ± 0.42 ^b
50 : 10	118.5 ± 0.28 ^b	0.329 ± 0.02 ^b	-63.05 ± 2.75 ^b
40 : 20	130.05 ± 5.58 ^b	0.382 ± 0.02 ^b	-68.55 ± 0.35 ^a
30 : 30	164.25 ± 14.49 ^a	0.364 ± 0.05 ^b	-68.45 ± 1.20 ^a

میانگین‌های با حروف کوچک متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌دار دارند ($p < 0.05$).

Different small letters in each column indicate significant difference at $p < 0.05$.

بازده ریزپوشانی (EE) عصاره هندوانه کوهی

بازده ریزپوشانی نشان دهنده پتانسیل مواد دیواره در به دام انداختن و همچنین میزان ماندگاری مواد محصور شده درون ریز-پوشینه‌ها می‌باشد (Soleimanifard *et al.*, 2018). بازده ریزپوشانی عصاره هندوانه کوهی برای نسبت ۶۰-۰ لستین- کلسترول ۸۹/۳۵٪ و برای نسبت ۵۰-۱۰ لستین- کلسترول ۹۵/۷۵٪ به دست آمد. از آنجایی که فضای آبدوست لیپوزوم‌ها بیشتر از فضای آبگریز آن‌هاست درصد بالای ریزپوشانی در هر دو نسبت می‌تواند به دلیل بیشتر بودن بخش هیدروفیل عصاره و اتصال آن به سطح داخلی و خارجی نانولیپوزوم‌ها و همچنین قرار گرفتن در فاز آبی داخلی نانولیپوزوم‌ها باشد. بیشتر بودن بازده ریزپوشانی نمونه دارای کلسترول می‌تواند به دلیل تاثیر کلسترول بر کاهش سیالیت غشا باشد. در مطابقت با نتیجه این تحقیق، فن و همکاران (Fan *et al.*, 2008) بیان داشتند که کلسترول تا غلظت‌های مشخصی به دلیل تاثیر بر کاهش سیالیت غشا سبب افزایش پایداری غشا و افزایش بازده ریزپوشانی می‌گردد ولی اگر غلظت کلسترول بیش از حد افزایش یابد با گسستن غشای لیپوزومی بازده ریزپوشانی را کاهش می‌دهد. در مغایرت با یافته‌های پژوهش حاضر، لاریدی و همکاران (Laridi *et al.*, 2003) در پی تولید لیپوزوم‌های نایسین Z به این نتیجه رسیدند که افزایش کلسترول سبب کاهش کارایی درون پوشانی گردید.

پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزوم‌های حامل هندوانه

کوهی طی ۶۰ روز نگهداری

پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزوم‌ها با توجه به میزان کاهش ترکیبات فنولی محصور شده در نانولیپوزوم‌های با نسبت ۶۰-۰ و ۱۰-

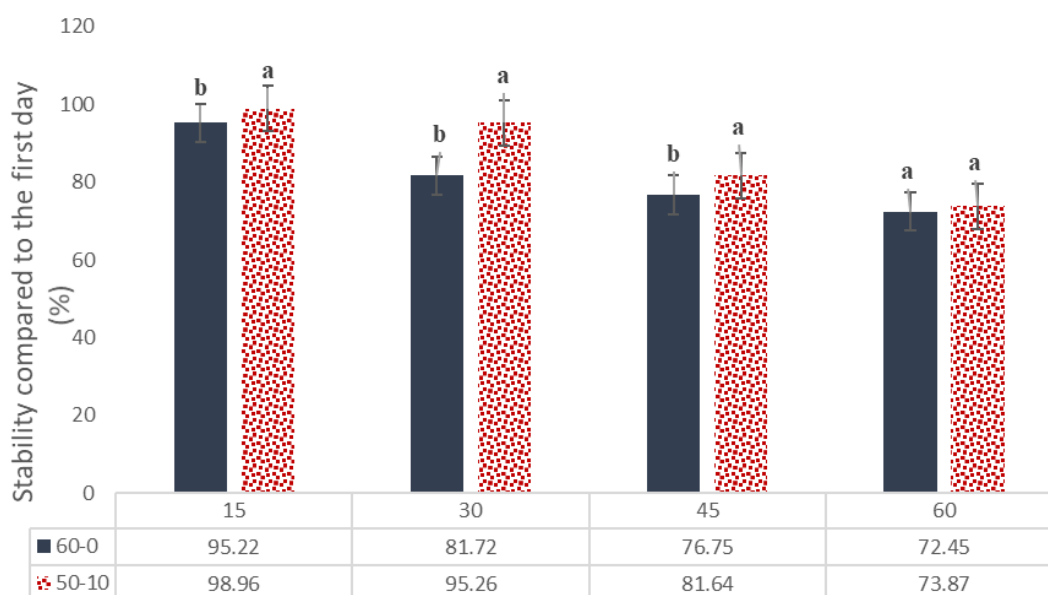
از عواملی که نقش مهمی در برهمکنش‌های الکترواستاتیکی و پایداری سیستم‌های ریزپوشانی دارد، پتانسیل زتا می‌باشد. به طور کلی، اگر پتانسیل زتای کل سیستم کلوتیدی بالاتر از ± 30 میلی ولت باشد، ذرات از نظر دافعه الکترواستاتیکی پایدار هستند (Lu *et al.*, 2011). در این پژوهش با افزودن کلسترول پتانسیل زتا نیز افزایش نشان داد. در حقیقت کلسترول با سفت نمودن ساختار غشا و افزایش پتانسیل زتا و دفع الکترواستاتیک بین ذرات، سبب پایداری لیپوزوم‌ها می‌گردد (Liu, 2000). در دیگر مطالعات انجام شده نیز نتایج مشابهی به دست آمده است. محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2013) در تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D3 بیان کردند که با افزایش مقدار کلسترول، پتانسیل زتا بطور تدریجی افزایش یافت.

PI برای نسبت‌های مختلف لستین- کلسترول در محدوده ۰/۵۱- ۰/۳۲ قرار گرفت. با اضافه شدن کلسترول به غشای نانولیپوزوم هرچند قطر ذرات افزایش پیدا کرد ولی تاثیر مثبتی روی PI ایجاد کرد و باعث کاهش اختلاف اندازه و یکدست‌تر شدن اندازه ریزپوشینه‌ها گردید. اگر مقدار $PI \leq 0.1$ باشد نمایانگر بالاترین کیفیت توزیع، $PI \leq 0.3$ به عنوان مقدار بهینه و $PI \leq 0.5$ مقدار قابل قبول می‌باشد (Shah *et al.*, 2014). با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، PI در دامنه قابل قبول قرار داشت.

در این پژوهش، نانولیپوزوم‌های با نسبت ۶۰-۰ لستین- کلسترول که کوچکترین اندازه ذرات را دارا بودند و نانولیپوزوم‌های با نسبت ۵۰-۱۰ لستین- کلسترول که در بین نانولیپوزوم‌های دارای کلسترول، اندازه ذرات کوچکتری ایجاد کرده بودند برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شدند.

فنولی محصور شده در طی زمان، بیانگر کاهش میزان پایداری بود. نتایج در شکل ۲ آورده شده است.

۵۰ لستین- کلسترول طی نگهداری در دمای °C ۲۵ به مدت زمانهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز بررسی شد. کاهش میزان ترکیبات



شکل ۲- پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزومهای حامل هندوانه کوهی با نسبت ۶۰-۰ و ۵۰-۱۰ لستین- کلسترول طی ۶۰ روز نگهداری در دمای محیط

حروف ناهمسان، نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح احتمال $p < 0.05$ در همان روز اندازه گیری می باشد.

Fig. 2. Phenolic compounds stability in nanoliposomes loaded with *capparis spinosa* extract prepared in ratios of 60- 0, 50- 10 lecithin- cholesterol during 60 days storage in ambient temperature
Different letters indicate significant difference at $p > 0.05$ at the measurement day.

افزایش نشت ترکیبات فنولی به بیرون از وزیکولها شود (Lu et al., 2011). در واقع دما با تاثیر بر تبدیل فاز ساختار دو لایه ای لیپیدی از حالت ژل به کریستال مایع، سبب نقص در چیدمان غشاء و تجزیه شیمیایی فسفولیپیدهای غشا می گردد (Bhatia et al., 2004). در مطالعه صورت گرفته روی نانولیپوزومهای حامل ویتامین E و C توسط سقاشیرپور (Saghashirpour, 2014)، حدود ۶۲٪ از ویتامین E نانوریزپوشانی شده طی ۶۰ روز نگهداری در دمای اتاق آزاد شد؛ این مقدار در دمای °C ۴ حدود ۳۹٪ بود.

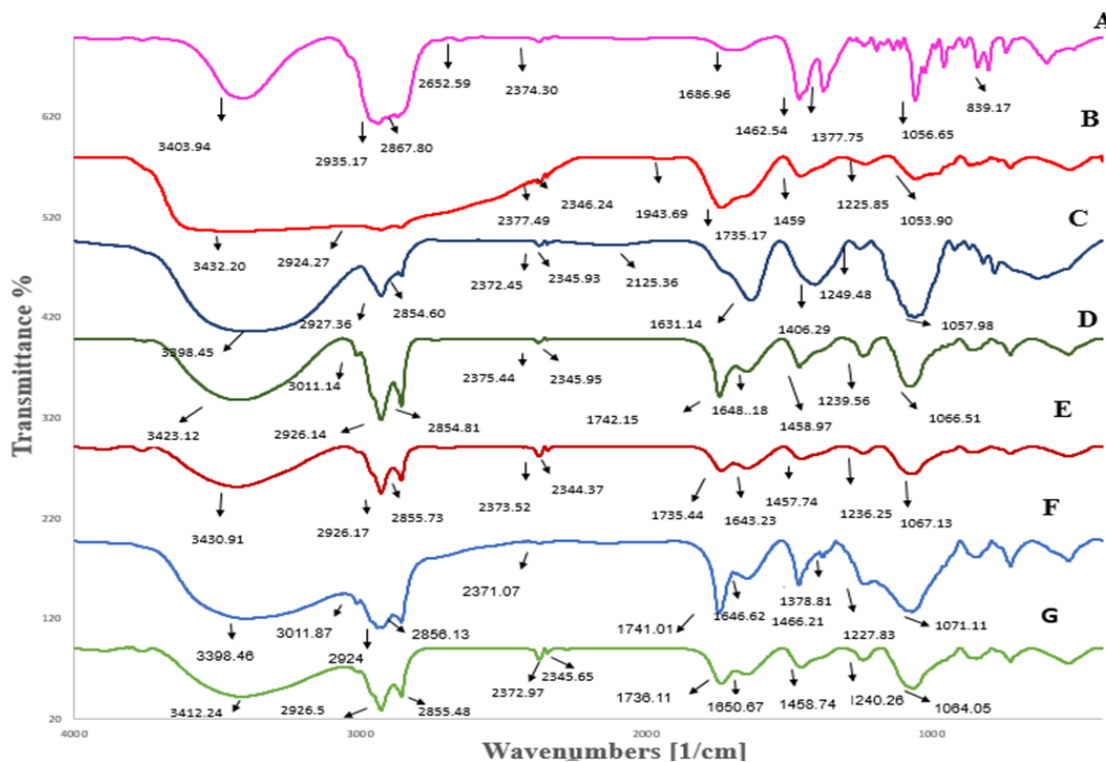
طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

نتایج FTIR در شکل ۳ آمده است. در کلسترول پیکهای ۱۱۹۱/۶۱، ۱۳۷۷/۷۵، ۱۴۶۲/۵۴، ۱۶۸۵/۹۶، ۲۹۳۵/۱۷، ۳۴۰۳/۹۴، ۱۰۵۶/۶۵ و ۸۳۹/۱۷ cm^{-1} به ترتیب مربوط به پیوند کششی OH، ارتعاشات کششی نامتقارن CH_2 و CH_3 ، پیوند $\text{C}=\text{C}$ ، ارتعاشات کششی متقارن CH_2 و CH_3 ، $\text{C}-\text{H}$ و $\text{C}-\text{C}$ کششی، تغییر شکل حلقه کلسترول و $\text{C}-\text{C}-\text{C}$ کششی می باشد (Gupta, 2014). همچنین در فسفاتیدیل کولین پیکهای ۳۴۳۲/۲۰،

نتایج نشان داد تا روز ۴۵ نگهداری، پایداری ترکیبات فنولی در نانولیپوزوم دارای کلسترول (۵۰-۱۰) به طور معنی داری بیشتر از نانولیپوزوم فاقد کلسترول (۶۰-۰) بود ($p < 0.05$) ولی پس از آن تفاوت معنی داری در درصد پایداری نمونه ها مشاهده نشد ($p > 0.05$). علت این پدیده به حضور کلسترول نسبت داده شده است. در حقیقت کلسترول، سیالیت و نفوذپذیری غشای لیپوزومی را کاهش داده و سبب افزایش ماندگاری ماده ریزپوشانی شده می گردد. در حضور کلسترول به علت ایجاد پیوند با گروه کولین فسفولیپید و پر شدن فضاهای به وجود آمده توسط زنجیره های آسیل فسفاتیدیل کولین، وزیکولهای فسفاتیدیل کولین ساختار محکم تر و در نتیجه پایداری بیشتری خواهند داشت (Mohammadi, 2013). همانگونه که در شکل نیز مشخص است میزان پایداری ترکیبات فنولی برای هر دو نسبت لستین- کلسترول در طول زمان روند کاهشی داشته است که رهايش ماده فعال در طی زمان می تواند به دلیل تخریب دیواره نانولیپوزومها در اثر اکسیداسیون فسفولیپید و تراوا بودن غشاء دیواره لیپوزوم باشد (Saghashirpour, 2014). همچنین، افزایش سیالیت غشای لیپیدی به دلیل نگهداری در دمای °C ۲۵ ممکن است سبب

برهمکنش بین عصاره و مواد دیواره نانولیپوزوم می‌باشد. همچنین با ورود عصاره به نانولیپوزوم‌های دارای نسبت ۵۰-۱۰ لستین-کلیسترول، در اکثر پیک‌های جذب، افزایش شدت و در برخی پیک‌ها جابجایی مشاهده گردید؛ از جمله پیک های ۱۴۵۸/۷۴، ۱۲۴۰/۲۶ و ۱۰۶۴/۰۵ cm^{-1} که به ترتیب به نواحی ۱۴۶۶/۲۴، ۱۲۷۷/۸۳ و ۱۰۷۱/۱۱ cm^{-1} جابجایی داشتند. همچنین در نانولیپوزوم دارای نسبت ۵۰-۱۰ لستین-کلیسترول حامل عصاره هندوانه کوهی، پیک-های جدید ۳۰۱۱/۸۷ و ۱۳۷۸/۸۱ cm^{-1} ایجاد و پیک ۲۳۴۵/۶۵ cm^{-1} موجود در طیف نانولیپوزوم‌های خالی حذف گردید که تغییرات ایجاد شده احتمالاً^۱ می‌تواند در نتیجه برهمکنش بین مواد دیواره نانولیپوزوم و عصاره هندوانه کوهی و تابیدی بر بارگذاری موفقیت‌آمیز عصاره هندوانه کوهی در نانولیپوزوم‌ها باشد.

۲۹۲۴/۲۷، ۱۷۳۵/۱۷، ۱۲۲۵/۸۵ و ۱۰۵۳/۹۰ cm^{-1} به ترتیب به ارتعاشات OH، ارتعاشات کششی نامتقارن CH₂، گروه کربونیل (C=O)، PO₂⁻ نامتقارن و C-O در C-O-PO₂⁻ مربوط می‌باشند (Mohan, 2020). در مورد عصاره هندوانه کوهی، با توجه به نتایج نادیانته و همکاران (Nadiyanto et al., 2019) و فو و همکاران (Fu et al., 2007)، به نظر می‌رسد پیک‌های ۳۳۹۸/۴۵، ۱۶۳۱/۱۴ و ۱۰۵۷/۹۸ cm^{-1} به ترتیب مربوط به گروه NH₂، پیوندهای غیر اشباع حلقه‌های آروماتیک و اتر می‌باشند. در مقایسه نانولیپوزوم‌های خالی با نانولیپوزوم‌های بارگیری شده توسط عصاره هندوانه کوهی، با ورود عصاره به نانولیپوزوم‌های دارای نسبت ۶۰-۰ لستین-کلیسترول در دیواره، اکثر پیک‌های جذبی افزایش شدت جذب نشان دادند. همچنین در نمونه ۶۰-۰، پیک جدید ۳۰۱۱/۱۴ cm^{-1} مشاهده گردید که در نانولیپوزوم‌های خالی و همچنین عصاره هندوانه کوهی چنین پیکی مشاهده نشد که احتمالاً^۱ نشان دهنده ایجاد پیوند جدید در اثر



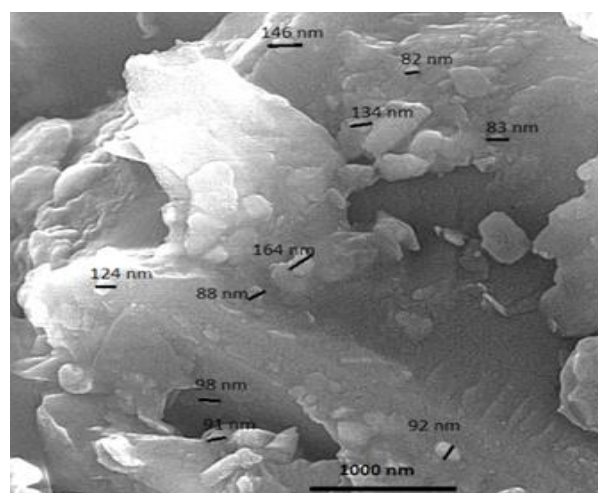
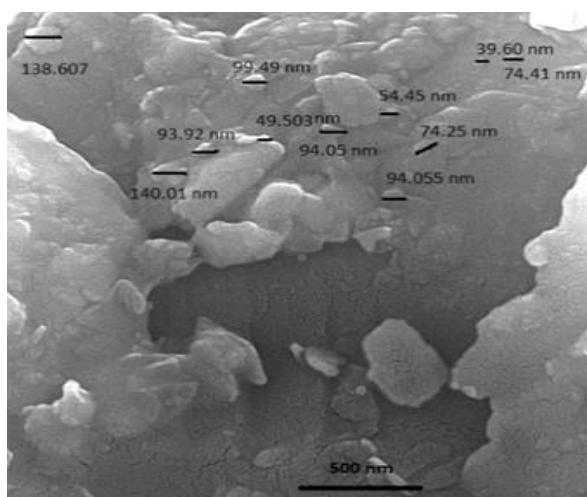
شکل ۳- نتایج آنالیز FTIR. (A= کلیسترول =B فسفاتیدیل کولین =C عصاره هندوانه کوهی =D نانولیپوزوم‌های با نسبت ۶۰-۰ لستین-کلیسترول حاوی عصاره هندوانه کوهی، E= نانولیپوزوم‌های با نسبت ۶۰-۰ لستین-کلیسترول فاقد عصاره هندوانه کوهی =F نانولیپوزوم‌های با نسبت ۵۰-۱۰ لستین-کلیسترول حاوی عصاره هندوانه کوهی =G نانولیپوزوم‌های با نسبت ۵۰-۱۰ لستین-کلیسترول فاقد عصاره هندوانه کوهی)

Fig. 3- FTIR, (A= cholesterol, B= phosphatidyl choline, C= *Capparis spinosa* extract, D= *Capparis spinosa* loaded nanoliposomes prepared in ratio of 60- 0 lecithin- cholesterol, E= blank nanoliposomes prepared in ratio of 60- 0 lecithin- cholesterol, F= *Capparis spinosa* loaded nanoliposomes prepared in ratio of 50- 10 lecithin- cholesterol, G= blank nanoliposomes prepared in ratio of 50- 10 lecithin- cholesterol)

آنالیز تصاویر FESEM

که در تصویر مشخص است اندازه اکثر ذرات در دامنه قابل قبول و کمتر از ۱۵۰ نانومتر بود. پراکندگی ذرات مشاهده شده نیز در تایید نتایج اندازه‌گیری PI توسط DLS مبنی بر قرار گرفتن در محدوده پراکندگی قابل قبول می‌باشد. تصاویر مربوطه وجود ذرات نانولیپوزومی کروی و تقریباً "بیضوی" را نشان داد.

تصویر FESEM برای نمونه دارای نسبت ۶۰-۰-۰ لستین-کلیسترول که کوچکترین اندازه ذرات را در بین نانولیپوزوم‌های تهیه شده دارد، تهیه شد. شکل ۳ تصاویر مربوط به آنالیز FESEM را در دو بزرگنمایی ۳۰ هزار و ۵۰ هزار نشان می‌دهد. این تصاویر نتایج حاصل از DLS در رابطه با اندازه نانولیپوزوم‌ها را تایید کرد. همانگونه



شکل ۴- تصاویر آنالیز FESEM برای نانولیپوزوم دارای نسبت ۶۰-۰-۰ لستین-کلیسترول حاوی عصاره هندوانه کوهی

Fig. 4- FESEM images of the *Capparis spinosa* loaded nanoliposomes prepared in ratio of 60- 0 lecithin- cholesterol

شده پس از دو ماه نگهداری در دمای محیط پایداری خوبی از خود نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که مشکل ناپایداری ترکیبات فنولی که منجر به کاربرد محدود تجاری آن‌ها می‌شود با ریزپوشانی قابل برطرف شدن است و نانوذرات لیپوزومی می‌توانند به عنوان بستری مناسب برای ایجاد پایداری و افزایش دسترسی زیستی مواد زیست فعال برای کاربرد در زمینه های تغذیه و پزشکی معرفی شوند.

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، نانولیپوزوم‌های عصاره هندوانه کوهی در محدوده اندازه ذرات ۱۶۵-۹۵ نانومتر با موفقیت تولید شدند. اضافه شدن کلیسترول به ساختار لیپوزومی، هر چند افزایش در اندازه ذرات را در پی داشت اما از طریق افزایش پتانسیل زتا، سبب افزایش دافعه و پایداری الکترواستاتیکی نانولیپوزوم‌ها گردید و همچنین بازده ریزپوشانی را افزایش داد. ترکیبات فنولی هندوانه کوهی ریزپوشینه

منابع

1. Akhavan Moghanloo, S., Ghanbari, E., & Taghipour, P. (2019). *Evaluation of chemical composition and properties of capparis spinosa and its effect on treatment of various diseases*. 2nd international & 6th national confrence on organic va. conventional agriculture, Ardebil, Iran.
2. Aliyazicioglu, R., Eyupoglu, O. E., Sahin, H., Yildiz, O., & Baltas, N. (2013). Phenolic components, antioxidant activity, and mineral analysis of *Capparis spinosa* L. *African Journal of Biotechnology* 12(47): 6643-6649. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13241>.
3. Anwar, F., Muhammad, G., Hussain, M.A., Zengin, G., Alkharfy, K.M., Ashraf, M., & Gilani, A.H. (2016). *Capparis spinosa* L.: A plant with high potential for development of functional foods and nutraceuticals/pharmaceuticals. *International Journal of Pharmacology* 12(3): 201-219. <https://doi.org/10.3923/ijp.2016.201.219>.
4. Arrar, L., Benaidane, N., Krache, I., Charef, N., Khennouf, S., & Baghiani, A. (2013). Comparison between polyphenol contents and antioxidant activities of different parts of *Capparis spinosa* L. *Pharmacognosy Communications* 3(2): 70. <https://doi.org/10.5530/pc.2013.2.14>.

5. Bhatia, A., Kumar, R., & Katore, O.P. (2004). Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7(2): 252-259.
6. Bhoyar, M.S., Mishra, G.P., Naik, P.K., & Singh, S.B. (2018). Evaluation of antioxidant capacities and total polyphenols in various edible parts of *Capparis spinosa* L. collected from trans-Himalayas. *Defence Life Science Journal* 3: 30-36. <https://doi.org/10.14429/dlsj.3.12570>.
7. Fan, M., Xu, S., Xia, S., & Zhang, X. (2008). Preparation of salidroside nano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. *European Food Research and Technology* 227(1): 167-174. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0706-9>.
8. Fang, J.Y., Hong, C.T., Chiu, W.T., & Wang, Y.Y. (2001). Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *International Journal of Pharmaceutics* 219(1-2): 61-72. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00627-5](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00627-5).
9. Fu, X.P., Aisa, H.A., Abdurahim, M., Yili, A., Aripova, S.F., & Tashkhodzhaev, B. (2007). Chemical composition of *Capparis spinosa* fruit. *Chemistry of Natural Compounds* 43(2): 181-183. <https://doi.org/10.3390/nu10020116>.
10. Ghanbari, M., Saeedi, M., & Mortazavian, A. (2016). Nutraceuticals and functional foods production. *Journal of Clinical Excellence* 5(1).
11. Ghanbarzadeh, B., Bashiri, S., Hamishekar, H., & Dehghannya, J. (2016a). The study of the colloidal properties of nano liposomes containing beta-carotene produced by thermal method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 12(5): 609-619. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v12i5.41745>.
12. Ghanbarzadeh, B., Pezeshky, A., Hamishekar, H., & Moghadam, M. (2016b). Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 12(2): 261-275. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i2.38396>.
13. Ghani, A., Salehi, S., & Mohtashami, S. (2017). Antioxidant activity, phenolics content and total flavonoids of caper fruit (*Caparis spinosa*) at different maturity stages. *Research Journal of Pharmacognosy* 4: 83-83.
14. Gupta, U., Singh, V.K., Kumar, V., & Khajuria, Y. (2014). Spectroscopic studies of cholesterol: fourier transform infra-red and vibrational frequency analysis. *Materials Focus* 3(3): 211-217. <https://doi.org/10.1166/mat.2014.1161>.
15. Khanavi, M., Ara, L., Khavassi, N., & Hajimehdipoor, H. (2020). *Capparis spinosa*: a comparative study of raw and processed fruits. *Journal of Medicinal Plants* 19(73): 91-99. <https://doi.org/10.29252/jmp.1.73.91>.
16. Kossah, R., Zhang, H., & Chen, W. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit extract. *Food Control* 22(1): 128-132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.06.002>.
17. Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R.O., Vuillemand, J.C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal* 13(4): 325-336. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00194-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00194-2).
18. Liu, D.Z., Chen, W.Y., Tasi, L.M., & Yang, S.P. (2000). Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 172(1-3): 57-67. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00560-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00560-4).
19. Lu, Q., Li, D.-C., & Jiang, J.-G. (2011). Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Food Chemistry* 59(24): 13004–13011. <https://doi.org/10.1021/jf203194w>.
20. Malheiros, P.D.S., Sant Anna, V., Barbosa, M.D.S., Brandelli, A., & Franco, B.D.G.D.M. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food Microbiology* 156(3): 272-277. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.004>.
21. Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., & Hamishehkar, H. (2014). Formulation of nanoliposomes containing vitamin D3 to enrich a model beverage. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 4(Suppl 2): 569–575. <https://doi.org/10.5681/apb.2014.084>.
22. Mohammadi, M., Jahadi, M., Ehsani, M.R., & Khosravi-Darani, K. (2013). Application of liposome nano carrier in cheese production and ripening. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology* 7(4): 25-34.
23. Mohammed, A.R., Weston, N., Coombes, A.G.A., Fitzgerald, M., & Perrie, Y. (2004). Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics* 285(1-2): 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.010>.
24. Mohan, V., Naske, C.D., Britten, C.N., Karimi, L., & Walters, K.B. (2020). Hydroxide-catalyzed cleavage of selective ester bonds in phosphatidylcholine: An FTIR study. *Vibrational Spectroscopy* 109: 103055. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103055>.
25. Mozafari, M.R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G.G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties* 11(4): 833-844. <https://doi.org/10.1080/10942910701648115>.

26. Najafi, M., Arianmehr, A., & Mohammadi Sani, A. (2019). Encapsulation of Barije essential oil in nanoliposomal system and evaluation of its physical and antimicrobial properties. *Innovative Food Technologies* 7(1): 71-83. <http://dx.doi.org/10.22104/JIFT.2019.3573.1859>.
27. Nandiyanto, A.B.D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology* 4(1): 97-118. <https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806>.
28. Nemati, R., & Gharekhani, M. (2018). *Evaluation of different methods in microencapsulation of bioactive antioxidant compounds*. 2nd international & 5th national congress of food science and technology of Iran, Sari.
29. Saghashirpour, S. (2014). *Production of nanoliposomes for simultaneous encapsulation of vitamin E and vitamin C by thermal method (Mozafari)*. MSc. Thesis. Tabriz University.
30. Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (2014). Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. *Journal of Physical Science* 25(1).
31. Sharafi, Z., Ghani, A., Salehi, S., & Mohtashami, S. (2017). Antioxidant activity, phenolics content and total flavonoids of caper fruit (*Caparis spinosa*) at different maturity stages. *Research Journal of Pharmacognosy* 4(Supplement): 83-83.
32. Soleimanifard, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Azizi, KH., & Sepahvand, A. (2018). Optimization of Khorramabad Olive leaf extract extraction and investigating the physical properties of nano-structured lipid carriers containing it. *Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 13(3): 81-92.
33. Tavakoli, H., Hosseini, O., Jafari, S.M., & Katouzian, I. (2018). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of yogurt enriched by olive leaf phenolics within nanoliposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(35). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02759>.
34. Tseng, L.P., Liang, H.J., Chung, T.W., Huang, Y.Y., & Liu, D.Z. (2007). Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *Journal of Medical and Biological Engineering* 27(1): 29-34.
35. Viriyaroj, A., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U., & Opanasopit, P. (2009). Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharmaceutical Development and Technology* 14(6): 665-671. <https://doi.org/10.3109/10837450902911937>.
36. Yu, D.G., Yang, J.H., Wang, X., & Tian, F. (2012). Liposomes self assembled from electrosprayed composite microparticles. *Nanotechnology* 23(10). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/10/105606>.



Optimization of Antioxidant Peptides Production from Tryptic Hydrolysis of Pomegranate Seed Protein

M. Rahimipناه¹, A. Sadeghi Mahoonak^{ID 2*}, M. Ghorbani³, H. Shahiri Tabarestani⁴, M. Nabimeybodi⁵

Received: 2022.05.20

Revised: 2022.06.10

Accepted: 2022.06.15

Available Online: 2022.06.15

How to cite this article:

Rahimipناه, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Shahiri Tabarestani, H., & Nabimeybodi, M. (2023). Optimization of antioxidant peptides production from tryptic hydrolysis of pomegranate seed protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 19(1): 181-194. (In Persian with English abstract). <http://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76797.1174>.

Introduction

High levels of free radicals can damage biomolecules and eventually cause oxidative stress. Bioactive peptides produced during enzymatic hydrolysis keep high health properties, such as antioxidant properties. The production of antioxidant peptides has received much attention as a new generation of natural antioxidants. Plants are one of the most abundant sources of biopolymers, especially protein. As long as the protein structure is intact, its amino acid sequence is inactive; however, during proteolysis, fermentation, and gastrointestinal digestion, these amino acids are released as oligopeptides ordinarily with less than 20 amino acids and below 10 kDa in molecular weight. These peptides are more digestible and can exhibit specific bioactive properties such as antioxidant properties. In this regard, the use of food waste containing protein to produce bioactive peptides and increase their value has received increasing attention. Enzymatic hydrolysis can increase their functional properties by converting proteins into peptides without affecting their nutritional value. Pomegranate seed protein is a by-product of the pomegranate seed oil industry and can be a good source of bioactive peptides with antioxidant properties. According to our knowledge, there isn't any data about the enzymatic hydrolysis of pomegranate seed protein for antioxidant peptides production. In this study, the optimal conditions for enzymatic hydrolysis of pomegranate seed protein with trypsin using the response surface method and the effect of hydrolysis on protein structure were investigated.

Materials and Methods

In this study, the protein was extracted from pomegranate seed, and using trypsin the optimization of enzymatic hydrolysis conditions of protein was determined by Face-Centered Central Composite design, which is one of the response surface design methods. The effect of independent variables including temperature (30 to 45 °C), time (30 to 180 minutes), and enzyme to substrate ratio (1 to 3 w/w) on DPPH free radical scavenging activity and Fe⁺³ reducing power as responses, was evaluated. Validation tests were performed for confirmation of the proposed values by software and the degree of hydrolysis of the samples was determined. In the next step, the unhydrolyzed and hydrolyzed protein was evaluated for molecular weight distribution and their surface hydrophobicity was compared. Finally, scanning electron microscopy images were used to confirm the hydrolysis process.

Results and Discussion

Under optimal conditions obtained from the response surface method (temperature: 37.6 °C, time: 136.55 minutes, and enzyme to substrate ratio: 2.2%), trypsin-derived hydrolyzate, showed DPPH free radical scavenging power: 87±0.89% and Fe⁺³ reduction power: 0.293±0.44. Under these conditions, the degree of hydrolysis was equal to 30.1±1%. The optimum conditions of hydrolysis were validated by RSM. The increase in the surface hydrophobicity of

1, 2, 3 and 4- Ph.D Student, Professor, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.

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

5- Assistant Professor, Traditional Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Shahid Sadooghi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.76797.1174](http://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76797.1174)

the protein after the hydrolysis process indicated the unfolding of the pomegranate seed protein chain and the exposure of its structure during the reaction. The electrophoretic profile of denatured pomegranate seed protein showed smaller peptide bands and lower band intensity, along with losing some of the peptide fractions after hydrolysis. so the efficacy of trypsin at cleaving the protein was confirmed. Evaluation of images obtained by scanning electron microscopy showed that unhydrolyzed protein had complex structures comprised of random sheets of different sizes and shapes and the protein degraded into small fragments and looser structure with many folds after enzyme hydrolysis, resulting in smaller particles compared with untreated samples with the same SEM parameters

Conclusion

Considering the consumer's tendency toward functional foods and present concerns about the application of synthetic additives and according to the results, the hydrolyzed pomegranate seed protein prepared by trypsin shows good antioxidant capacity. In addition, there will be a reduction in waste generated by the pomegranate processing industry. Further studies will need for the isolation and identification of the specific peptides and amino acid sequences and the evaluation of their possible incorporation in food matrices.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, Pomegranate seed, Scanning electron microscopy (SEM), SDS-PAGE electrophoresis, Surface hydrophobicity

مقاله پژوهشی

تعیین شرایط بهینه تولید پپتیدهای ضد اکسایش حاصل از هیدرولیز تریپتیکی پروتئین هسته انار

مریم رحیمی پناه^۱ - علیرضا صادقی ماهونک^{۲*} - محمد قربانی^۳ - هدی شهری طبرستانی^۴ - محسن نبی میدی^۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۳۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۳/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۵

چکیده

این مطالعه به بررسی شرایط بهینه برای هیدرولیز آنزیمی پروتئین هسته انار با استفاده از روش سطح پاسخ و تاثیر هیدرولیز بر ساختار پروتئین می‌پردازد. در ابتدا استخراج ایزوله پروتئین صورت گرفت، سپس بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز پروتئین با استفاده از آنزیم تریپسین و طرح مرکب مرکزی تعیین شد. تاثیر متغیرهای مستقل شامل دما (۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۳۰ تا ۱۸۰ دقیقه) و نسبت آنزیم به سوبسترا (۱ تا ۳ درصد وزنی/وزنی) بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی یون فریک به عنوان پاسخ‌های این روش مورد ارزیابی قرار گرفتند. در شرایط بهینه به دست آمده از روش سطح پاسخ (دما: ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد، زمان: ۱۳۶/۵۵ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا: ۲/۲ درصد)، هیدرولیزهای مشتق شده، از قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (به میزان 87 ± 0.89 درصد) و توان کاهندگی یون فریک (به میزان 0.293 ± 0.044) برخوردار بودند. در این شرایط، درجه هیدرولیز پروتئین برابر با 30.1 ± 1 درصد بود. افزایش در میزان آبگریزی سطحی پروتئین پس از فرایند هیدرولیز نشان‌دهنده باز شدن زنجیر پروتئینی هسته انار و آشکار شدن ساختار آن در طی واکنش بود. با استفاده از روش الکتروفورز، وجود پپتیدهایی با وزن مولکولی کم (کمتر از ۱۱ کیلودالتون) تایید شد. ارزیابی تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان‌دهنده باز شدن ساختار پروتئین و تولید قطعات کوچک‌تر در پی اعمال تیمار آنزیمی بود. طبق نتایج به‌دست آمده پروتئین هیدرولیز شده هسته انار توسط آنزیم تریپسین از قابلیت ضد اکسایشی مناسبی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: آبگریزی سطحی، الکتروفورز، میکروسکوپ الکترونی روبشی، هسته انار، هیدرولیز آنزیمی

مقدمه

آن غیرفعال هستند ولی طی پروتئولیز، تخمیر و هضم معده-روده‌ای، این آمینواسیدها به‌صورت پپتیدهای کوتاه زنجیر با کمتر از ۲۰ آمینواسید و وزن مولکولی حداکثر ۲۰ کیلو دالتون، آزاد می‌شوند (Aluko, 2015). پپتیدهای با وزن مولکولی کم نسبت به پروتئین‌ها، هضم پذیری راحت‌تر و زیست دسترسی بیشتری برای انواع عملکردهای بیولوژیکی بدن انسان دارند و بطور کلی فعالیت زیستی بیشتری نسبت به پروتئین اصلی نشان می‌دهند. هیدرولیز شده‌های پروتئینی، فعالیت‌های زیستی مختلفی مانند خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابت، ضد پرفشاری خون، ضد میکروبی، ضد التهاب، کاهش کلسترول خون، شلاته کننده فلزات، ضدسرطان، افزایش رشد و بهبود ایمنی را نشان داده‌اند. هیدرولیز آنزیمی یکی از راه‌های بهبود ویژگی‌های عملکردی بدون ایجاد اثر منفی بر ارزش تغذیه‌ای

پروتئین یک ترکیب مغذی مهم و منبع اسیدهای آمینه ضروری است. علاوه بر ویژگی‌های تغذیه‌ای اساسی، بعضی از پروتئین‌ها می‌توانند با آزادسازی پپتیدهای زیست فعال داخل توالی خود، اثرات سلامتی‌بخش بیشتری داشته باشند (Chalamaiah et al., 2017). تا زمانی که ساختار پروتئین دست نخورده باشد، توالی آمینواسیدهای

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری استاد، دانشیار و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

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

۵- استادیار مرکز تحقیقات علوم دارویی و داروسازی سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

DOI: 10.22067/ifstrj.2022.76797.1174

است، تایید شد. فتحتی و همکاران (Fathi et al., 2022) شرایط بهینه هیدرولیز آنزیمی پروتئین تفاله زیتون با آنزیم تریپسین را تعیین کردند و نشان دادند این آنزیم در تولید هیدرولیزات با خاصیت ضداکسایش موثر است.

انار با نام علمی *Punica granatum L.* در سطح وسیعی در خاورمیانه بخصوص ایران کاشت می‌شود. ایران تقریباً ۴۷ درصد کل انار دنیا را تولید می‌کند (Derakhshan et al., 2018). دانه آبگیری شده (هسته) انار، محصول جانبی فرآورده‌های انار است و حدود ۲۰/۵۵-۹/۴۴ درصد وزن کل میوه را به خود اختصاص می‌دهد (Tehranifar et al., 2010). پروتئین هسته انار غنی از اسیدهای آمینه ضروری است. بنابراین، پروتئین هسته انار می‌تواند به عنوان منبع پروتئینی برای تغذیه انسان استفاده شود (Talekar et al., 2018).

تولید هیدرولیزهای پروتئینی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی منجر به ارتقای ارزش محصولات جانبی حاصل از فرآوری استخراج روغن هسته انار می‌شوند. براساس اطلاعات موجود، تاکنون تحقیقی در زمینه هیدرولیز پروتئین هسته انار توسط پروتئاز صورت نگرفته است؛ لذا در این تحقیق سعی می‌شود شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین هسته انار جهت تولید پپتیدهایی با بیشترین اثر مهارکنندگی رادیکال DPPH و احیا کنندگی یون فریک توسط آنزیم تریپسین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کنجاله هسته انار حاصل از صنایع تولید روغن با روش پرس سرد از شرکت نیری ارگانیک یزد خریداری شد. آنزیم تریپسین پانکراتیک خوک با فعالیت ۱۵۰۰ واحد در میلی گرم از شرکت سیگما-آلدریج خریداری شد. کلیه مواد شیمیایی از برندهای معتبر تهیه شدند و از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

تهیه پودر بدون چربی از کنجاله هسته انار

در ابتدا کنجاله‌ها توسط آسیاب الکتریکی به پودر تبدیل و از الک با مش ۳۵ عبور داده شدند. پودر کنجاله هسته انار به منظور جداسازی کامل چربی موجود در آن، با حلال هگزان با خلوص بیش از ۹۵ درصد به نسبت ۱:۳ وزنی-حجمی مخلوط و به مدت ۳ ساعت با استفاده از شیکر همزده و چربی‌گیری شد. سپس هگزان جدا شد و پودر چربی‌گیری شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق خشک شد. در نهایت آرد چربی‌گیری شده تا مرحله استخراج پروتئین در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Singh et al., 2018).

پروتئین‌هاست. همچنین، تهیه پپتید می‌تواند در تبدیل پروتئین‌های غذایی بدون کاربرد و حاصل از فرایند، به محصولات ارزشمند، که بسیار مورد علاقه شرکت‌های غذایی می‌باشد کمک کند (Hall et al., 2018; Xie et al., Chalamaiah et al., 2017; 2019).

رادیکال‌های آزاد در بسیاری از سیستم‌های بیولوژیکی و شیمیایی تولید می‌شوند. میزان زیاد رادیکال‌های آزاد می‌تواند به مولکول‌های زیستی آسیب رسانند و در نهایت باعث استرس اکسیداتیو شوند. انواع بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی و پیشرفت فرایند پیری با استرس اکسیداتیو ارتباط دارند. به دلیل اثرات مضر رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در بدن، پیشگیری از این واکنش‌ها ضروری است. برخی از آنتی‌اکسیدانی‌های سنتزی مورد استفاده، اثرات جانبی نامطلوبی بر بدن دارند. بنابراین، تحقیقات بر شناسایی و استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از منابع طبیعی با پتانسیل بالای عملکردی متمرکز شده است (Kim et al., 2018; Nourmohammadi et al., 2017).

پژوهش‌های زیادی در زمینه استفاده از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی موجود در هیدرولیزهای پروتئینی و یا پپتیدهای حاصل از منابع گیاهی انجام شده است. نورمحمدی و همکاران (Nourmohammadi et al., 2017) با بررسی شرایط بهینه هیدرولیز کنسانتره پروتئینی دانه کدو توسط تریپسین، گزارش کردند که پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو از قابلیت ضداکسایشی و شلاته‌کنندگی مناسبی برخوردار است. در پژوهشی که توسط مشگینفر و همکاران (Meshginfar et al., 2018) انجام شد، اثر هیدرولیز آنزیمی پروتئین هسته گوجه فرنگی را بر عملکرد و خصوصیات فیزیکوشیمیایی هیدرولیز شده‌ها بررسی گردید و نتایج نشان داد هیدرولیز آنزیمی منجر به تولید پپتیدهای با خاصیت ضداکسایش و دیگر خصوصیات عملکردی می‌شود. ژئی و همکاران (Xie et al., 2019) بیان کردند که در بین هیدرولیز شده‌های پروتئین دانه ماش اجزاء کمتر از ۳ کیلودالتون که غنی از آمینواسیدهای آروماتیک و آب گریز است، نسبت به بقیه اجزاء دارای بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند. در تحقیق دیگری رنجبر ندامانی و همکاران (Ranjbar Nadamani et al., 2020) شرایط بهینه هیدرولیز آنزیمی پروتئین نخود کاجان را به روش سطح پاسخ تعیین کردند و نشان داده شد که می‌توان از پروتئین‌های هیدرولیز شده نخود کاجان به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و منبع آمینواسیدهای ضروری استفاده کرد. در یک بررسی ملوف و همکاران (Maluf et al., 2020) شرایط بهینه هیدرولیز آنزیمی پروتئین موجود در ضایعات حاصل از جگر خوک، به روش سطح پاسخ را تعیین کردند و سپس با تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE وجود پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۱۴ کیلودالتون که نشان دهنده تشکیل ترکیبات فعال زیستی

تعیین الگوی حالیت پروتئین کنجاله هسته انار بر اساس pH

در این پژوهش استخراج پروتئین به روش حالیت قلیایی و ترسیب اسیدی صورت گرفت. به منظور استخراج بیشترین میزان پروتئین، الگوی حالیت پروتئین کنجاله هسته انار در pH های مختلف بررسی شد (Nioi et al., 2012). به منظور تعیین الگوی حالیت، سوسپانسیون‌هایی از کنجاله چربی‌گیری شده در آب مقطر با نسبت ۱:۲۰ (وزنی/حجمی) تهیه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت یک ساعت در دمای اتاق مخلوط، سپس pH سوسپانسیون توسط هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک یک نرمال در ۱۰ سطح (۱-۱۰) تنظیم و به مدت ۶۰ دقیقه در pH ثابت مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد، سوپرناتانت حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس میزان پروتئین موجود در سوپرناتانت، به روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی استفاده شد.

تولید ایزوله پروتئین هسته انار

پودر هسته انار چربی‌گیری شده به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر مخلوط و میزان قلیائیت آن با افزودن محلول هیدروکسید سدیم ۱ نرمال به pH حداکثر حالیت رسانده و مخلوط به مدت ۱ ساعت همزده شد. سپس این مخلوط سانتریفیوژ شد (۱۵ دقیقه) و سوپرناتانت توسط اسید کلریدریک ۱ مولار تا pH ایزوالکتریک پروتئین هسته انار اسیدی گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط همزده و مجدد سانتریفیوژ شد. پروتئین‌های رسوب کرده از بخش مایع جدا و با آب مقطر دو بار شسته شدند. کنسانتره پروتئینی حاصل جمع آوری و توسط خشک کن انجمادی خشک گردیدند و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Houde et al., 2018).

تهیه پروتئین هیدرولیز شده

پروتئین استخراج شده هسته انار به طور دقیق در ارلن‌های حجمی توزین و با بافر پتاسیم فسفات (۲۰ میلی‌مولار، pH=8) سوسپانسیون ۵٪ وزنی حجمی تهیه و امکان هیدراته شدن کامل آن در حین همزدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط فراهم گردد. طبق طرح آماری، پس از رسیدن دمای انکوباتور شیکردار به دمای مورد نظر نمونه‌ها درون انکوباتور قرار داده شده و پس از ثابت شدن دما، آنزیم تریپسین به محلول اضافه شد و هیدرولیز در شرایط هم‌زدن مداوم (۲۰۰ rpm) انجام گردید. پس از اتمام فرآیند هیدرولیز،

غیرفعال کردن واکنش و آنزیم از طریق اعمال حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه توسط حمام آب گرم صورت گرفت. پس از آن محلول تا دمای محیط خنک گردید. سپس محلول هیدرولیز شده تحت نیروی گریز از مرکز با دور ۶۵۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و مایع رویی به عنوان ترکیب هیدرولیز شده‌ی پروتئینی جمع‌آوری و جهت انجام آزمون‌های بعدی با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی به مدت ۴۸ ساعت، در فشار ۰/۱۷ میلی پاسکال و دمای ۵۷- درجه سانتی‌گراد خشک گردید (Nourmohammadi et al., 2017).

طراحی آزمایش به منظور بهینه سازی شرایط استخراج

با هدف دستیابی به شرایط بهینه هیدرولیز از نرم‌افزار Design Expert و روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی استفاده شد. فاکتورهای موثر بر فرآیند هیدرولیز توسط آنزیم تریپسین شامل دما (X_1)، زمان (X_2) و نسبت آنزیم به سوبسترا (X_3) به عنوان متغیرهای مستقل در سه سطح (۱، ۰، -۱) و دو متغیر وابسته یعنی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH (Y_1) و قدرت کاهندگی یون فریک (Y_2) بودند. محدوده و دامنه فاکتورهای مورد بررسی بر پایه نتایج اولیه آزمایشگاهی به دست آمده، انتخاب شدند. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ نشان داده شده است.

۲۰ تیمار تصادفی توسط نرم‌افزار انتخاب شد. مدل رگرسیونی به منظور پیش‌بینی پاسخ‌های به صورت زیر ارائه شد:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{معادله ۱})$$

در این معادله، Y نشان دهنده متغیر وابسته است، β_0 مقدار ثابت و β_i ، β_{ii} و β_{ij} به ترتیب اثرات خطی، درجه دوم و اثرات متقابل می‌باشد و X_i و X_j متغیرهای مستقل را نشان می‌دهند. تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس داده‌های آزمایشی به تعیین معنی‌داری آزمون‌های آماری شرایط مدل و نیز ترسیم نمودارها و بهینه‌سازی، توسط نرم‌افزار صورت پذیرفت.

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

در این آزمون ۱ میلی‌لیتر از نمونه (غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH (۱ میلی‌مولار در اتانول ۹۵٪) مخلوط شد. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مخلوط و ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد و در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH از رابطه‌ی زیر محاسبه شد (Xie et al., 2019):

$$(\%) = \left(\frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \right) \times 100 \quad (۲)$$

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح انتخاب شده برای آن‌ها توسط روش آماری سطح پاسخ

Table 1- Independent variables and their levels used in the RSM

متغیر مستقل Independent variables	نماد Symbol	سطوح متغیرها Coded Variable Levels		
		-α (-1)	0	+α (+1)
دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)	X ₁	30	37.5	45
زمان (دقیقه) Time (min)	X ₂	30	105	180
نسبت آنزیم به سوبسترا (درصد وزنی/وزنی) Enzyme to Substrate Ratio (%w/w)	X ₃	1	2	3

اندازه‌گیری قدرت کاهندگی یون فریک

در این روش، ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH = 6.6) و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم فری سیانید (۱٪ وزنی/حجمی) مخلوط شد. مخلوط در دمای ۵۰ درجه برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد و بعد از رسیدن به دمای اتاق، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تری کلرو استیک اسید (۱۰٪ وزنی/حجمی) به مخلوط اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰g سانتریفوژ شد. در نهایت، ۱ میلی‌لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر محلول فریک کلراید (۰/۱٪ وزنی/حجمی) مخلوط شد و جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در محیط تاریک خوانده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاءکنندگی است (Mirzapor et al., 2016).

تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز براساس میزان نیتروژن محلول در تری کلرواستیک اسید انجام گرفت (Xie et al., 2019). بطور خلاصه ۱۰ میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ مخلوط و پس از سانتریفوژ شدن (۵ دقیقه، ۱۵۰۰g)، نیتروژن محلول در سوپرناتانت (N₁) و نیتروژن کل (N₀) به روش بردفورد اندازه‌گیری گردید.

$$(3) \quad \text{درصد نیتروژن محلول در تری کلرواستیک اسید} = (N_1/N_0) \times 100$$

توزیع وزن مولکولی

اندازه مولکولی پروتئین هسته انار و هیدرولیز شده‌های آن با استفاده از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE با ژل آکریل آمید ۱۵٪ بررسی گردید (Laemmli, 1970). در این روش نمونه‌ها (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۳۰ میکرولیتر بافر (بافر تریس pH = ۶/۸ با غلظت ۵۰ میلی‌مول بر لیتر، سدیم دودسیل فسفات ۴٪، بروموفنول

تعیین میزان آبگریزی سطحی

برای تعیین میزان آبگریزی سطحی ۶ میکرولیتر از پروپ فلورسنت 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) با غلظت ۸ میلی‌مولار و ۳۰۰ میکرولیتر نمونه (پروتئین هسته انار و هیدرولیز شده‌های آن) دارای محدوده غلظت ۰/۰۵ تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (محلول در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و pH=7)، در پلیت ۹۶ خانه مشکی با یکدیگر مخلوط شدند. پلیت به مدت ۳ دقیقه به آرامی تکان داده شد. سپس، شدت فلورسانس نسبی نمونه‌ها در ۳۶۰ و ۴۶۰ نانومتر به ترتیب به عنوان طول موج‌های تهییج و نشر با استفاده از خوانشگر میکروپلیت Synergy™ HTX BioTek Instruments (Inc. ارزیابی و ثبت شد. شیب اولیه منحنی شدت نشر در مقابل غلظت نمونه (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از طریق رگرسیون خطی محاسبه و به عنوان شاخص آبگریزی سطحی ارائه گردید (Kato & Nakai, 1980).

ریخت‌شناسی سطحی

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FEI ESEM QUANTA 200) ساختار پروتئین‌های هسته انار، قبل و پس از

فرآیند هیدرولیز آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. همه نمونه‌ها با لایه‌ای منفرد از طلا پوشانیده شدند. تصاویر نمونه‌ها با میکروسکوپ روبشی در ولتاژ شتاب‌دهنده ۲۰ کیلو ولت و با بزرگنمایی ۲۰۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت (Islam et al., 2021).

نتایج و بحث

حلالیت پروتئین هسته انار بر اساس pH

بر پایه نتایج به دست آمده از این مطالعه، در کنسانتره پروتئینی حاصل از هسته انار، کمترین میزان حلالیت پروتئین‌ها در $pH = 4/4$ است و با افزایش قلیائیت، حلالیت پروتئین افزایش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های محققان که محدوده $pH = 4-5$ را برای اکثر پروتئین‌های گیاهی محدوده ایزوالکتریک دانستند، مطابقت دارد. با توجه به اینکه افزایش مقدار pH جهت استخراج پروتئین، ممکن است که به اسیدآمینه‌های ضروری موجود در ساختار پروتئین صدمه بزند و سبب کاهش قابلیت هضم و ارزش زیستی پروتئین شود، استخراج پروتئین از هسته انار در $pH = 10$ صورت پذیرفت (Gerzhova et al., 2016; Olivares-Galván et al., 2020).

بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی با روش سطح پاسخ

ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت کاهندگی یون فریک به عنوان شاخص‌هایی جهت تأیید فعالیت ضد اکسندگی صورت گرفت. با توجه به نقاط تعریف شده توسط طرح آماری مورد استفاده، آزمون‌های مربوطه انجام شد. نتایج مربوط به هر تیمار در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که مدل آماری پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار با ضریب همبستگی مناسب بصورت معنی‌داری ($p < 0.01$) جهت پیش‌بینی اثر هر یک از متغیرهای واکنش بر میزان پاسخ مناسب قابل کاربرد است.

ضرایب رگرسیون روابط بین پاسخ‌ها و پارامترهای هیدرولیز را نشان می‌دهد و بیانگر رابطه درجه دوم متغیرها با میزان پاسخ است. شاخص عدم تطبیق مدل جهت برازش معادله مربوطه معنی‌دار نشد و بیانگر توانایی این رگرسیون خطی در پیش‌بینی میزان مناسب پاسخ می‌باشد.

جدول ۲- سطوح متغیرهای مستقل طرح مرکب مرکزی و پاسخ‌های هر تیمار

Table 2- Levels of independent variables for Central composite design and its responses

شماره تیمار Run	متغیرهای مستقل Independent variables			متغیرهای وابسته Dependent variables	
	دما Temperature °C	زمان Time min	نسبت آنزیم به سوبسترا E/S ratio %w/w	فعالیت مهارکنندگی DPPH DPPH scavenging power	قدرت کاهندگی یون فریک Ferric reducing power
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	45	30	1	86	0.17
2	30	180	1	86.1	0.176
3	37.5	105	2	87.1	0.243
4	30	30	1	86	0.166
5	37.5	105	2	87.4	0.291
6	37.5	30	2	87	0.282
7	45	180	3	86.7	0.19
8	37.5	105	2	87.4	0.293
9	37.5	105	2	87.3	0.284
10	37.5	105	2	87.3	0.289
11	30	105	2	86.5	0.207
12	30	30	3	86.4	0.19
13	37.5	105	3	87.1	0.26
14	45	180	1	87	0.153
15	37.5	105	1	87.1	0.265
16	45	105	2	86.3	0.191
17	37.5	105	2	87.2	0.28
18	45	30	3	85.8	0.201
19	30	180	3	86.9	0.145
20	37.5	180	2	87.2	0.255

جدول ۳- تجزیه و تحلیل واریانس مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ
Table 3- Analysis of variance (ANOVA) of response surface quadratic model

منبع Source	فعالیت مهارکنندگی DPPH DPPH scavenging power Y1			قدرت کاهندگی یون فریک Ferric reducing power Y2		
	مقدار F F Value	مقدار P P Value	ضریب رگرسیون Regression coefficient	مقدار F F Value	مقدار P P Value	ضریب رگرسیون Regression coefficient
مدل Model	21.75	< 0.0001		20.24	< 0.0001	
زمان Time X_1	0.040	0.8460	-0.010	0.16	0.6945	+ 0.0021
دما Temperature X_2	28.97	0.0003	+0.27	3.00	0.1138	-0.009
نسبت آنزیم به سوبسترا E/S ratio X_3	1.95	0.1931	+0.070	1.16	0.3062	+ 0.0056
دما × زمان Temperature × Time X_1X_2	8.40	0.0159	+0.16	0.023	0.8832	+ 0.0008
نسبت آنزیم به سوبسترا × زمان E/S ratio × Time X_1X_3	14.36	0.0035	-0.21	2.61	0.1375	+0.0093
نسبت آنزیم به سوبسترا × دما E/S ratio × Temperature X_2X_3	0.45	0.5188	+0.038	1.11	0.3163	-0.00612
(زمان) ^۲ (Time) ² X_1^2	63.73	< 0.0001	-0.76	64.58	< 0.0001	-0.080
(دما) ^۲ (Temperature) ² X_2^2	0.44	0.5209	-0.064	1.04	0.3323	-0.0100
(نسبت آنزیم به سوبسترا) ^۲ (E/S ratio) ² X_3^2	0.44	0.5209	-0.064	2.64	0.1353	-0.0161
عدم برازش Lack of Fit	2.68	0.1514		0.54	0.7448	
ضریب تبیین R-Squared	0.9514			0.9480		
ضریب تبیین تعدیل شده Adj R-Squared	0.9077			0.9011		
C.V. %	0.18			7.25		

اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قدرت ضداکسایش

با توجه به مدل، نمودارهای سه بعدی با تغییر دو متغیر مستقل و ثابت نگه داشتن متغیر مستقل دیگر در نقطه مرکزی توسط نرم افزار ترسیم شدند و در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

جهت بررسی تاثیر دما بعنوان یکی از متغیرهای مستقل، در شکل ۱، a که اثر متقابل دما و زمان و b که اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH را نشان

ضرایب تغییرات کمتر از ۱۰ درصد به دست آمد که به معنای قابلیت تکرارپذیری مدل‌ها بود، بطوری که می‌توان از آن‌ها در جهت بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی استفاده کرد. ضریب تبیین بالا، معنادار نبودن ضریب عدم برازش مدل و در نهایت ضریب تبیین تعدیل شده متمایل به ۱ نشان‌دهنده صحت و اعتبار مدل‌های پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار در جهت تفسیر رابطه بین متغیرهای مستقل و پاسخ‌ها است.

همچنین تاثیر نسبت آنزیم به سوبسترا بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (شکل ۱ b,c) و بر قدرت کاهندگی یون فریک (شکل ۱ d,f) بررسی شد و نشان داده شد که این متغیر تا میزان ۲/۲ درصد (وزنی/وزنی)، سبب تولید هیدرولیز شده‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر شد. در این مورد باید اشاره شود که افزایش غلظت آنزیم منجر به افزایش میزان دسترسی مکان‌های فعال آنزیم به زنجیره پروتئینی شده و سبب تجزیه سریع‌تر پروتئین و شکسته شدن پیوندهای پپتیدی آن می‌شود (Kurozawa et al., 2008). در ادامه مشاهده شد که با افزایش بیشتر از ۲/۲ درصد نسبت آنزیم به سوبسترا (وزنی/وزنی)، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی از افزایش معناداری برخوردار نشد. چنین حالتی می‌تواند ناشی از هیدرولیز بیش از حد باشد که احتمال تماس بین آنزیم و مولکول‌های سوبسترا را کاهش می‌دهد و در نهایت سرعت هیدرولیز را کاهش می‌دهد و به فاز ثابتی می‌رسد که هیچ هیدرولیز ظاهری انجام نمی‌شود (Singh et al., 2018). نتایج مشابهی از پژوهش‌های پیشین بر روی فرآیند هیدرولیز آنزیمی پروتئین نخود کاجان (Ranjbar Nadamani et al., 2020) و پروتئین جگر (Maluf et al., 2020) به دست آمده است.

اعتبارسنجی مدل

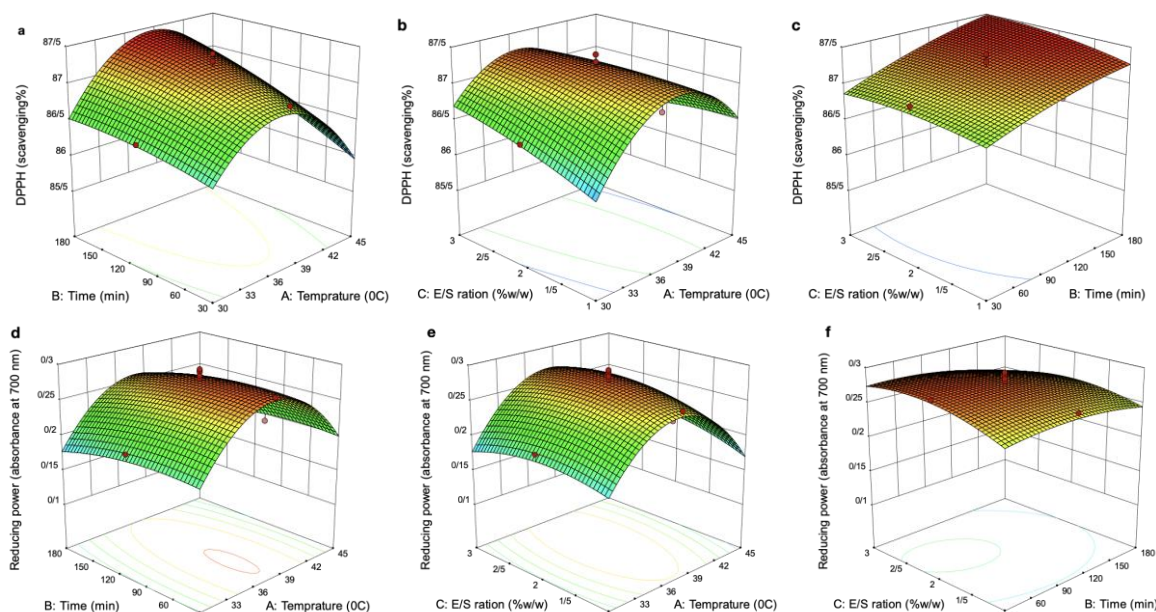
شرایط بهینه توسط نرم‌افزار Design Expert به دست آمد و بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده هسته انار در دمای ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد با زمان واکنش ۱۳۶/۵۵ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای ۲/۲ درصد (وزنی/وزنی) به دست آمد. مدل چند جمله‌ای مقادیر بهینه فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و توان احیای آهن را در شرایط پیشنهادی پیش بینی نمودند. به منظور تایید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، آزمایش‌های اضافی در شرایط پیش بینی شده توسط مدل اجرا گردید (در سه تکرار). نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۴ نشان داده شده است. پاسخ پیش بینی شده مدل مطابقت نزدیکی با داده‌های آزمایشی داشت. بنابراین، شرایط بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی از هسته انار توسط روش سطح پاسخ تایید شد.

درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز شاخصی مهم در کنترل و ارزیابی میزان پیشرفت واکنش هیدرولیز پروتئین است و به طول زنجیر پروتئینی و میزان شکسته شدن پیوند پپتیدی بستگی دارد. به علاوه، درجه هیدرولیز با ساختار یا اندازه پپتید متناسب است و بر ایجاد توالی خاص اسیدهای آمینه، فعالیت زیستی و همچنین طعم پپتیدها تاثیر می‌گذارد (Cotabarren et al., 2019; Fathi Akbarbaglu et al., 2019; et al., 2022).

می‌دهند و نیز e و d که به ترتیب اثر متقابل دما و زمان و اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت کاهندگی یون فریک توسط هیدرولیز شده‌های پروتئین هسته انار را نشان می‌دهند، بررسی شدند. نتایج حاکی از تاثیر معنادار دما بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده هسته انار بود. نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف نیز نشان‌دهنده تاثیر دما بر واکنش هیدرولیز آنزیمی هستند. دمای بهینه فعالیت آنزیم بسته به نوع سوبسترا مختلف خواهد بود. از فاکتورهای موثر بر سرعت هیدرولیز آنزیمی می‌توان به پایداری آنزیم، در دسترس بودن سوبسترا و نیز تشکیل محصولات جانبی حاصل از هیدرولیز اشاره نمود (Singh et al., 2018). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که دمای بهینه انجام فرآیند هیدرولیز آنزیمی تریپسین در شرایط بیان شده، ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد است. کاهش فعالیت ضد اکسایش در دمای پایین‌تر از ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد می‌تواند به دلیل هیدرولیز ناقص پروتئین‌ها باشد. بطور کلی، با افزایش دما به سبب در معرض قرارگیری پیوندهای پپتیدی و افزایش سطح تماس آنزیم تریپسین با آن‌ها سرعت هیدرولیز و در نتیجه فعالیت ضد اکسایش بیشتر می‌شود. کاهش فعالیت ضد اکسایش در دمای بالاتر از ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد می‌تواند ناشی از دناتوره شدن حرارتی پروتئین‌ها و از دست رفتن فعالیت مطلوب آنزیم باشد (Islam et al., 2021; Singh et al., 2018; Wang & Shahidi, 2018). پژوهش‌های زیادی در این زمینه انجام شده است و در بیشتر این تحقیقات از دمای ۳۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین یاد شده است (Fathi et al., 2022; Jahanbani et al., 2016; Mirzapour et al., 2016; Zang et al., 2019).

به منظور بررسی تاثیر زمان فرایند هیدرولیز بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، شکل ۱ a و c و بر قدرت کاهندگی یون فریک نمودارهای d و f که به ترتیب تاثیر متقابل زمان و دما و تاثیر متقابل زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا را نشان می‌دهند، بررسی شدند. بررسی‌ها نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیز، فعالیت مهارکنندگی رادیکال و توان کاهندگی یون فریک تا زمان ۱۳۶/۵۵ دقیقه افزایش داشته و سپس روند کاهشی به خود گرفت. این نتایج مشابهت زیادی با نتایج تحقیقات محققان دیگر در زمینه واکنش‌های هیدرولیز دارد. در تفسیر این موضوع بایستی که به این نکته اشاره نمود که با افزایش زمان هیدرولیز، پروتئین به پپتیدهای دارای خواص آنتی‌اکسیدانی تبدیل می‌شود و خاصیت آنتی‌اکسیدانی به طور مشخص افزایش می‌یابد ولی با افزایش بیش از حد زمان، این پپتیدها به پپتیدهای کوچکتر آبدوست هیدرولیز می‌شوند و این پپتیدها از توانایی کمتری در مهار رادیکال‌های آزاد آگزیز برخوردارند (Singh et al., 2018; Hamzeh et al., 2019).



شکل ۱- نمودار سطح پاسخ متغیرهای مستقل بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (a, b, c) و قدرت احیا فریک (d, e, f)
Fig. 1- Response surface plots of independent variables on DPPH scavenging power (a, b, c) and on Reducing Power (d, e, f)

جدول ۴- داده‌های آزمایشی و پیش‌بینی شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط بهینه متغیرهای مستقل (۳ تکرار)

Table 4- Experimental and corresponding predicted values for Antioxidant activity using optimum values of independent variables (n = 3)

آنزیم Enzyme	دما Temperature °C	زمان Time min	نسبت آنزیم به سوبسترا E/S ratio %w/w	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH DPPH scavenging power		قدرت احیای آهن Ferric reducing power	
				پیش‌بینی شده Predicted		پیش‌بینی شده Predicted	
				آزمایشی Experimental		آزمایشی Experimental	
تریپسین Trypsin	48.8	136.55	2.2	87.35 ^a	87 ± 0.89 ^a	0.273 ^b	0.273 ^b

میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارد.

بررسی الگوهای توزیع وزن مولکولی با استفاده از الکتروفورز

با استفاده از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE، توزیع وزن مولکولی در پروتئین هسته انار و هیدرولیز شده‌های آن بررسی گردید. الگوی الکتروفورز پروتئین دناتوره شده هسته انار وجود باندهایی در محدوده ۱۵ تا ۷۵ کیلودالتون را نشان داد. بیشتر این باندها ترکیباتی با وزن مولکولی بالاتر از ۲۰ کیلودالتون هستند و دو باند قوی در محدوده ۲۰ تا ۲۵ کیلودالتون و ۳۵ تا ۴۸ کیلو دالتون هم شناسایی شدند (شکل ۲). پدیدارشدن باندهای پپتیدی با وزن مولکولی پائین و کمتر شدن شدت باندها و از بین بعضی از باندهای پپتیدی نشان از تاثیر آنزیم تریپسین بر پروتئین داشت. بررسی الگوی الکتروفورز پروتئین هیدرولیز شده، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۱۱

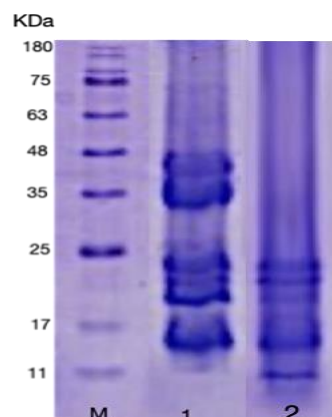
درجه هیدرولیز با الگوی شکست پیوند و ویژگی‌های آنزیم مورد استفاده در فرآیند هیدرولیز ارزیابی و تعیین می‌شود. فرآیند هیدرولیز معمولاً زمانی روی می‌دهد که آنزیم هیدرولیزکننده به پیوندهای قابل شکست در زنجیره پروتئینی دسترسی داشته باشد. همچنین میزان گرایش آنزیم به سوبسترا، شکل و ساختار مکان‌های فعال سوبسترا و نیز نحوه جهت‌گیری پیوند پپتیدی در تعیین میزان هیدرولیز و درجه آن موثر است (Mirzapour et al., 2016). نتایج حاصل از هیدرولیز پروتئین هسته انار، درجه هیدرولیز 30.1 ± 1 درصد را نشان دادند. در طی فرآیند هیدرولیز پروتئین سبوس برنج توسط آلکالاز (Singh et al., 2018) و پروتئین بذر کتان با استفاده از تریپسین (Akbarbaglu et al., 2019) توسط نتایج مشابهی حاصل شد.

مطالعه حاضر از ترکیب (ANS) به عنوان پروب و از شدت شیب خطی فلورسنس در مقابل غلظت پروتئین به عنوان شاخص آبریزی سطحی استفاده شد.

شکل ۳ نشان می‌دهد که شیب خط آبریزی پروتئین هسته انار از شیب خط آبریزی پروتئین هیدرولیز شده بیشتر است و بیانگر این است که فرآیند هیدرولیز آنزیمی توانست به طور معناداری منجر به افزایش آبریزی سطحی نمونه‌ها و افزایش قرار گرفتن زنجیره‌های آبریز در سطح مولکول شود.

نتایج مشابهی از تاثیر هیدرولیز آنزیمی بر آبریزی پروتئین هسته گوجه (Meshginfar et al., 2019) و پروتئین گردو (Jin et al., 2020) مشاهده شد. پروتئین هسته انار آبریزی کمی دارد. زیرا دارای پروتئین‌های دست‌نخورده و درهم پیچیده است. در چنین زنجیره پروتئینی، قسمت‌های آبریز در مرکز و هسته زنجیره قرار گرفته‌اند و بدین شکل به پایداری ساختار کمک می‌نمایند. هیدرولیز آنزیمی می‌تواند با در دسترس قرار دادن گروه‌های پنهان شده در مرکز ساختار، بر آبریزی سطحی تاثیرگذار باشد. در نتیجه، زمانی که زنجیره‌های پلی‌پپتیدی طی فرآیند هیدرولیز آنزیمی شکسته شوند، اسیدهای آمینه غیرقطبی در معرض محیط قرار گرفته و سبب افزایش میزان آبریزی خواهند شد. همچنین هنگامی که اسیدهای آمینه بازی و اسیدی آبدوست در کنار یکدیگر قرار بگیرند، قادرند یکدیگر را به شکل الکترواستاتیکی خنثی نمایند و این فرآیند نیز در نهایت منجر به افزایش آبریزی می‌شود. به علاوه، تصور می‌شود که توان پپتیدها در حذف رادیکال‌های آزاد با افزایش میزان آبریزی افزایش یابد (Zang et al., 2019; Jin et al., 2020). نتایج حاصل از این بررسی نیز نشان داد که هیدرولیزهای پروتئینی از آبریزی و قدرت ضد اکسایش بیشتری در مقایسه با پروتئین دست‌نخورده برخوردارند.

کیلودالتون را نشان داد. لازم به ذکر است که این روش قادر به شناسایی و جداسازی پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۱۱ کیلودالتون نبود. پژوهش‌گران دیگر نیز به نتایج مشابه دست یافتند که نشان از توانایی هیدرولیز پروتئین با آنزیم تریپسین و تولید پپتیدهای کوچک بود (Singh et al., Mirzapour et al., 2016; Zang et al., 2019).

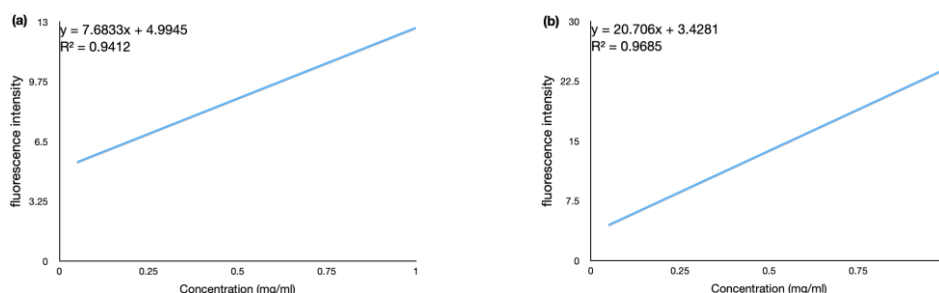


شکل ۲- الگوی الکتروفورز M: مارکر، 1: پروتئین هیدرولیز نشده 2: هیدرولیز شده‌ها

Fig. 2- The electrophoretic profiles of SDS-PAGE 1: Marker, 2: intact protein, 3: Protein hydrolysate

آبریزی سطحی

آبریزی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای موثر در حالیت مولکول‌های پروتئین در یک محلول است که در جریان واکنش‌های هیدرولیز آنزیمی به دلیل باز شدن مولکول و تغییر قرارگیری و دسترسی گروه‌های هیدروفوب در سطح مولکول مقدار آن تغییر خواهد کرد. در این رابطه استفاده از یک پروب فلورسنس جهت اتصال به گروه‌های آبریز سطحی در اندازه‌گیری این ویژگی کاربرد دارد. در

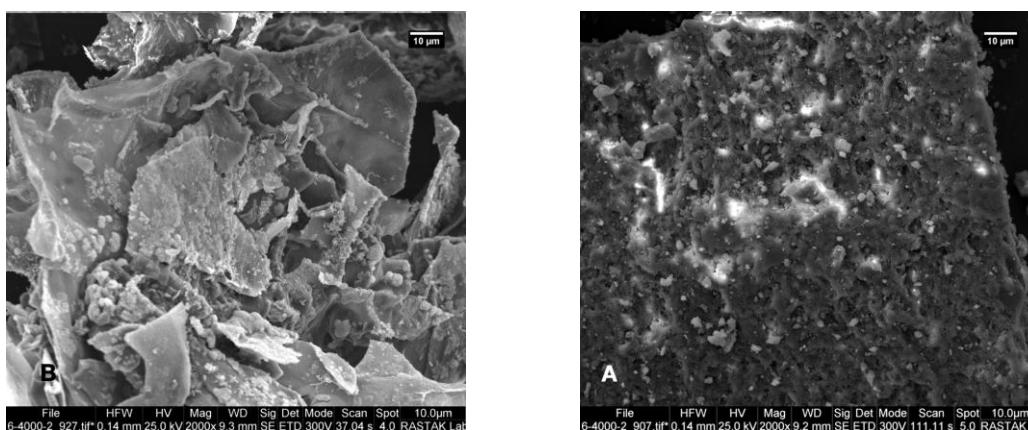


شکل ۳- شاخص آبریزی سطحی براساس شدت فلورسنس در مقابل غلظت‌های متفاوت (a) پروتئین هیدرولیز نشده (b) هیدرولیز شده‌ها
Fig. 3- Surface hydrophobic index determined as relative fluorescence intensity versus different concentrations. (a) Unhydrolyzed protein. (b) hydrolysate.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

در شکل ۴ تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی از دو نمونه هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده دیده می‌شود. پروتئین هسته انار دارای ساختارهای پیچیده است که این ساختارها بعد از فرآیند هیدرولیز آنزیمی به قطعاتی کوچک و ساختاری بازتر همراه با چین‌های زیاد تبدیل می‌شود. نتایج به دست آمده از این مطالعه

مطابق با سایر نتایج پژوهش‌های مشابه است که در آن‌ها تاکید شده که پروتئین به بخش‌های کوچکتری در طی فرآیند هیدرولیز آنزیمی تبدیل شده و در نتیجه ابعاد ذرات هیدرولیزهای آن هم پس از تیمار آنزیمی بسیار کاهش خواهد یافت (Jin et al., Islam et al., 2021).



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از پروتئین هسته انار (A) و هیدرولیز شده‌های آن (B)
Fig. 4- Scanning electron microscope of pomegranate seed protein (A) and its hydrolysates (B)

نتیجه‌گیری

در این بررسی، هیدرولیز آنزیمی کنسانتره پروتئین هسته انار با استفاده از آنزیم تریپسین انجام شد. اثر متغیرهای مستقل بر فعالیت ضد اکسایش توضیح داده شد. شرایط بهینه در جهت هیدرولیز پروتئین‌های هسته انار عبارتند از: دمای ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد، زمان انکوباسیون ۱۳۶/۵۵ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۲ درصد (وزنی/وزنی) برای آنزیم تریپسین که به شکل تجربی (آزمایشگاهی) هم تایید شد. درجه هیدرولیز در جهت تولید هیدرولیزهای پروتئینی تریپسین 30.1 ± 1 درصد برآورد شد. تراکم بیشتری از پپتیدهایی با

وزن مولکولی کم (کمتر از ۱۱ کیلو دالتون) پس از گسست زنجیره‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا مشاهده شد. به کمک تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، تجزیه پروتئین به قطعات کوچک‌تر تایید شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فرآیند هیدرولیز قادر به تولید پپتیدهای زیست‌فعال با خواص ضد اکسایشی و آبگریزی سطحی بالاتری است. بررسی‌های بیشتری باید در جهت جداسازی و شناسایی پپتیدها و ارزیابی احتمال کاربرد آن‌ها در مواد غذایی انجام شود.

منابع

1. Akbarbaglu, Z., Mahdi Jafari, S., Sarabandi, K., Mohammadi, M., Khakbaz Heshmati, M., & Pezeshki, A. (2019). Influence of spray drying encapsulation on the retention of antioxidant properties and microstructure of flaxseed protein hydrolysates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 178: 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.038>.
2. Aluko, R.E. (2015). Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Current Opinion in Food Science* 4: 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.002>.
3. Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2017). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins : a review. *Food Chemistry* 245: 205–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087>.
4. Cotabarren, J., Rosso, A.M., Tellechea, M., García-, J., Rivera, J.L., & Obregón, W.D. (2019). Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain. *Food Chemistry* 274: 848–856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.061>.

5. Derakhshan, Z., Ferrante, M., Tadi, M., Ansari, F., Heydari, A., & Hosseini, M.S. (2018). Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.023>.
6. Fathi, M., Hosseini, F.S., & Rashidi, L. (2022). Optimized enzymatic hydrolysis of olive pomace proteins using response surface methodology. *Applied Food Biotechnology* 9(2): 79–90. <https://doi.org/10.22037/afb.v9i2.36192>.
7. Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M., & Aider, M. (2016). Study of total dry matter and protein extraction from canola meal as affected by the pH, salt addition and use of zeta-potential/turbidimetry analysis to optimize the extraction conditions. *Food Chemistry* 201: 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.074>.
8. Hall, F., Johnson, P.E., Liceaga, A., & Johnson, P.E. (2018). Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Gryllodes sigillatus*) protein. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.058>.
9. Hamzeh, A., Rezaei, M., Khodabandeh, S., Motamedzadegan, A., Noruzinia, M., & Regenstein, J. Mac. (2019). Optimization of antioxidant peptides production from the mantle of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) using RSM and fractionation. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 28(4): 392–401. <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1594480>.
10. Houde, M., Khodaei, N., Benkerroum, N., & Karboune, S. (2018). Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. *Food Chemistry* 254: 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.156>.
11. Islam, M.S., Hongxin, W., Admassu, H., Noman, A., Ma, C., & An wei, F. (2021). Degree of hydrolysis, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates from Grass Turtle (*Chinemys reevesii*) as influenced by enzymatic hydrolysis conditions. *Food Science and Nutrition* 9(8): 4031–4047. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1903>.
12. Jahanbani, R., Ghaffari, S.M., Salami, M., Vahdati, K., Sepehri, H., & Sarvestani, N.N. (2016). Antioxidant and anticancer activities of walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates using different proteases. *Plant Foods for Human Nutrition* 71(4): 402–409. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0576-z>.
13. Jin, F., Wang, Y., Tang, H., Regenstein, J.M., & Wang, F. (2020). Limited hydrolysis of dehulled walnut (*Juglans regia* L.) proteins using trypsin: Functional properties and structural characteristics. *Lwt* 133(35): 110035. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110035>.
14. Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe. *Biochimica et Biophysica Acta* 624: 13–20.
15. Kim, S.S., Ahn, C.B., Moon, S.W., & Je, J.Y. (2018). Purification and antioxidant activities of peptides from sea squirt (*Halocynthia roretzi*) protein hydrolysates using pepsin hydrolysis. *Food Bioscience* 25: 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.010>.
16. Kurozawa, L.E., Park, K.J., & Hubinger, M.D. (2008). Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. *Journal of Food Science* 73(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00765.x>.
17. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
18. Maluf, J.U., Fiorese, M.L., Maestre, K.L., Dos Passos, F.R., Finkler, J.K., Fleck, J.F., & Borba, C.E. (2020). Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. *Journal of Food Process Engineering* 43(4). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13370>.
19. Meshginfar, N., Sadeghi, A., Farah, M., Tsopmo, A., Mahoonak, A.S., Hosseini, F., & Tsopmo, A. (2019). Physicochemical, antioxidant, calcium binding, and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of hydrolyzed tomato seed proteins. *Journal of Food Biochemistry* 43(2): 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12721>.
20. Mirzapour, M., Rezaei, K., Sentandreu, M.A., & Moosavi-movahedi, A.A. (2016). In vitro antioxidant activities of hydrolysates obtained from Iranian wild almond (*Amygdalus scoparia*) protein by several enzymes. *International Journal of Food Sciences and Technology* 51: 609–616. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12996>.
21. Nioi, C., Kapel, R., Rondags, E., & Marc, I. (2012). Selective extraction, structural characterisation and antifungal activity assessment of napins from an industrial rapeseed meal. *Food Chemistry* 134(4): 2149–2155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.017>.
22. Nourmohammadi, E., Sadeghimahoonak, A., Ghorbani, M., Alami, M., & Sadeghi, M. (2017). The optimization of the production of anti-oxidative peptides from enzymatic hydrolysis of Pumpkin seed protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 13(1): 14–26. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i0.45423>.
23. Olivares-Galván, S., Marina, M.L., & García, M.C. (2020). Extraction and characterization of antioxidant peptides from fruit residues. *Foods* 9(8): 1018. <https://doi.org/10.3390/FOODS9081018>.
24. Ranjbar Nadamani, E., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Jakobson, S., & Khorri, V. (2020). Optimization of *Cajanus cajan*'s antioxidant and nutritional characteristics during hydrolysis process by pepsin using response

- surface method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 15(5): 583–596. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v15i4.76968>.
25. Singh, T.P., Siddiqi, R.A., & Sogi, D.S. (2018). Statistical optimization of enzymatic hydrolysis of rice bran protein concentrate for enhanced hydrolysate production by papain. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.014>.
26. Talekar, S., Patti, A.F., Singh, R., Vijayraghavan, R., & Arora, A. (2018). From waste to wealth : High recovery of nutraceuticals from pomegranate seed waste using a green extraction process. *Industrial Crops & Products* 112: 790–802. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.023>.
27. Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., & Reza, M. (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 126(2): 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.001>.
28. Wang, D., & Shahidi, F. (2018). Protein hydrolysate from turkey meat and optimization of its antioxidant potential by response surface methodology. *Poultry Science* 97(5): 1824–1831. <https://doi.org/10.3382/ps/pex457>.
29. Xie, J., Du, M., Shen, M., Wu, T., & Lin, L. (2019). Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiate*). *Food Chemistry* 270(235): 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.103>.
30. Zang, X., Yue, C., Wang, Y., Shao, M., & Yu, G. (2019). Effect of limited enzymatic hydrolysis on the structure and emulsifying properties of rice bran protein. *Journal of Cereal Science* 85: 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.09.001>.

Contents

Study of the Functional Properties and the Retrogradation Behavior of Native Wheat Starch in the Presence of Cress Seed Gum and Sucrose	1
Sh. Taziki Shams-abadi, S.M.A. Razavi	
Dietetic Sesame Paste Cream Using Sucrose Replacers (Isomalt, Rebaudioside a, Erythritol)	17
E. Dehghan, B. Mohammadi	
Evaluation of Prickly Pear's Pulp Powder (<i>Opuntia stricta</i>) on Physicochemical Properties of Raw and Cooked Analogue Burgers	31
P. Shahiri Tabrestani, M. Kashiri, Y. Maghsoudlou, H. Shahiri-Tabarestani, M. Ghorbani	
Encapsulated Limonene based Multi-layer Electrostatic Adsorption and Evaluate Its Release under Simulated Oral Conditions	43
M. Khalilian-Movahhed, M. Mohebbi, Ch. Sinding	
Evaluation of Behavior and Modeling of Curcumin Release from Liposomes under Simulated Gastrointestinal Laboratory Conditions	57
S.F. Mousavi Baygi, A. Koocheki, B. Ghorani, M. Mohebbi	
Identification of Functional Groups, Total Phenol and Flavonoids Contents, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Black Pepper (<i>Piper nigrum</i> L.) Aqueous Extract and Its Interactions with Chloramphenicol and Amphotericin B	79
E. Safari, H. Barzegar, H. Jooyandeh, B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad	
The Effect of Chitosan Edible Coating on Physicochemical Properties and Enzymatic Activity of Grape Fruit Cultivar Fakhri in Cold Storage Conditions	95
M. Shokri- M. Rahmati-Joneidabad- M. Heidari- M. Rasouli- A. Zare	
Addition of Reducing Agents, Vitamin C and Citric Acid during Wheat Conditioning and their Effects on the Quality Characteristics of the Corresponding Flour and Dough	107
M. Seydhosseinzadeh, M. Hosseini, M. Shahedi, M. Kadivar	
Optimization of Non-dairy Dessert Formulation based on Almond Milk Containing Tragacanth Gum and Stevia Sweetener	125
F. Hadidi, A. Ganjloo, M.H. Fakoor	
Modeling the Ultrasonic Atomization Process of Milk and Powder Production Using Spray Drying Method	145
A. Heydari, M. Goharimanesh, M.R. Gharib, A. Koochi	
Production and Evaluation of Nanoliposomes Loaded with <i>Capparis spinosa</i> Extract	169
M. Salamatian, Y. Zahedi, R. Shaddel	
Optimization of Antioxidant Peptides Production from Tryptic Hydrolysis of Pomegranate Seed Protein	181
M. Rahimipanah, A. Sadeghi Mahoonak, M. Ghorbani, H. Shahiri Tabarestani, M. Nabimeybodi	

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Vol. 19

No. 1

2023

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.



Vol.19

No.1

2023

Iranian Food Science and Technology Research Journal



ISSN:1735-4161

Contents

- Study of the Functional Properties and the Retrogradation Behavior of Native Wheat Starch in the Presence of Cress Seed Gum and Sucrose..... 1**
Sh. Taziki Shams-abadi, S.M.A. Razavi
- Dietetic Sesame Paste Cream Using Sucrose Replacers (Isomalt, Rebaudioside a, Erythritol) 17**
E. Dehghan, B. Mohammadi
- Evaluation of Prickly Pear's Pulp Powder (*Opuntia stricta*) on Physicochemical Properties of Raw and Cooked Analogue Burgers 31**
P. Shahiri Tabrestani, M. Kashiri, Y. Maghsoudlou, H. Shahiri-Tabarestani, M. Ghorbani
- Encapsulated Limonene based Multi-layer Electrostatic Adsorption and Evaluate Its Release under Simulated Oral Conditions..... 43**
M. Khalilian-Movahhed, M. Mohebbi, Ch. Sinding
- Evaluation of Behavior and Modeling of Curcumin Release from Liposomes under Simulated Gastrointestinal Laboratory Conditions..... 57**
S.F. Mousavi Baygi, A. Koocheki, B. Ghorani, M. Mohebbi
- Identification of Functional Groups, Total Phenol and Flavonoids Contents, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Aqueous Extract and Its Interactions with Chloramphenicol and Amphotericin B 79**
E. Safari, H. Barzegar, H. Jooyandeh, B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad
- The Effect of Chitosan Edible Coating on Physicochemical Properties and Enzymatic Activity of Grape Fruit Cultivar Fakhri in Cold Storage Conditions 95**
M. Shokri- M. Rahmati-Joneidabad- M. Heidari- M. Rasouli- A. Zare
- Addition of Reducing Agents, Vitamin C and Citric Acid during Wheat Conditioning and their Effects on the Quality Characteristics of the Corresponding Flour and Dough 107**
M. Seydhosseinzadeh, M. Hosseini, M. Shahedi, M. Kadivar
- Optimization of Non-dairy Dessert Formulation based on Almond Milk Containing Tragacanth Gum and Stevia Sweetener..... 125**
F. Hadidi, A. Ganjloo, M.H. Fakoor
- Modeling the Ultrasonic Atomization Process of Milk and Powder Production Using Spray Drying Method 145**
A. Heydari, M. Goharimanesh, M.R. Gharib, A. Koochi
- Production and Evaluation of Nanoliposomes Loaded with *Capparis spinosa* Extract 169**
M. Salamatian, Y. Zahedi, R. Shaddel
- Optimization of Antioxidant Peptides Production from Tryptic Hydrolysis of Pomegranate Seed Protein 181**
M. Rahimipناه, A. Sadeghi Mahoonak, M. Ghorbani, H. Shahiri Tabarestani, M. Nabimeybodi