

عنوان مقالات

- ارزیابی پیشرفت اکسایش روغن سویا غنی شده با اسانس اندام هوایی چوبیر حین انبارش تسریع شده ۴۰۱
علیرضا همتی - علی گنجلو - کامبیز ورمیرا - ماندانا بی مکر
- بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس گریپ فروت بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا:
یک مطالعه آزمایشگاهی ۴۱۷
حسین زنگانه - فخری شهیدی - سیدعلی مرتضوی - بهروز علیزاده بهبهانی
- بررسی تأثیر امولسیفایر سدیم استئاروئیل-۲-لاکتیلات، آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوریتول بر کیفیت نان
حجیم سبوس‌دار ۴۲۹
پریسا پارسا - مصطفی مظاهری طهرانی - محبت محبی
- ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ریزساختار فرآورده بافت داده شده کینوآ ۴۵۳
الهام قیامی - آرش کوچکی - اناز میلانی
- تولید نانو ذرات ژلاتین به روش حلال‌زدایی برای استفاده در صنایع غذایی ۴۶۵
نگار سلیمانپور تمام - اکرم آریان فر - وحید حکیم زاده - بهاره عمادزاده
- بررسی ویژگی‌های شیمیایی عصاره اتانولی جای سبز و اثر آن بر فعالیت مهارکنندگی و کشندگی آسپرژیلوس نایچر،
بوتریتیس سینه‌را و ریزوپوس استولونیفر (عامل فساد میوه توت‌فرنگی و انگور) ۴۷۹
مصطفی رحمتی جندآباد - بهروز علیزاده بهبهانی - محمد نوشاد
- بررسی میزان املاح معدنی در دانه کنجد و انتقال آن به روغن ارده و کنجد تصفیه ۴۹۳
سمیه خیراتی رونیزی - فاطمه اکرمی مهاجری - حمدالله مشتاقی بروجنی - سارا جام بر سنگ - حسین کیانی - الهام خلیلی صدرآباد
- اندازه‌گیری و مقایسه مقادیر نیترات، نیتريت و عناصر سنگین در برنج برداشت اول و برداشت مجدد ۵۰۳
زینب سلطان تویه - شیوا دهقان آبکنار - نازنین خاکی پور
- اثر پوشش‌های خوراکی کیتوزان و موسیلاژ بامیه بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی خلال‌های سیب‌زمینی سرخ شده ۵۱۳
آزاده فرازمنند - حسین جلالی - علی نجفی
- بررسی تغییرات رنگ و چروکیدگی ورقه‌های سیب خشک‌شده با استفاده از پردازش تصویر ۵۲۹
جواد صفری - سید جعفر هاشمی - آزاده رنجبر ندامانی
- بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی ژل آلونه‌ورا بر پایداری روغن سویا ۵۴۳
مرجان کرمی - لیلا ناطقی - سیمین اسداللهی
- اثر لاکتی پلاتنی باسیلوس پلانتاروم پنیر موتال بر چسبندگی کروموباکتر ساکاراکی به سلول‌های روده‌ای ۵۵۹
سیده سادات فاطمی زاده - محمد باقر حبیبی نجفی - دنیس سندریس نیلسن

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

مهر - آبان ۱۴۰۲

شماره ۴

جلد ۱۹

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)

ifstrj@um.ac.ir

پست الکترونیکی:

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

- ۴۰۱ ارزیابی پیشرفت اکسایش روغن سویا غنی شده با اسانس اندام هوایی چویر حین انبارش تسریع شده
علیرضا همتی - علی گنجلو - کامبیز ورمیرا - ماندانا بی مکر
- ۴۱۷ بررسی ویژگی های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس گریپ فروت بر میکروارگانسیم های بیماری زا: یک مطالعه
آزمایشگاهی
حسین زنگانه - فخری شهیدی - سیدعلی مرتضوی - بهروز علیزاده بهبهانی
- ۴۲۹ بررسی تأثیر امولسیفایر سدیم استئاروئیل-۲-لاکتیلات، آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوریتول بر کیفیت نان حجیم سبوس دار
پریسا پارسا - مصطفی مظاهری طهرانی - محبت محبی
- ۴۵۳ ارزیابی ویژگی های فیزیکوشیمیایی و ریز ساختار فرآورده بافت داده شده کینوا
الهام قیامی - آرش کوچکی - الناز میلانی
- ۴۶۵ تولید نانو ذرات ژلاتین به روش حلال زدایی برای استفاده در صنایع غذایی
نگار سلیمانپور تمام - اکرم آریان فر - وحید حکیم زاده - بهاره عمادزاده
- ۴۷۹ بررسی ویژگی های شیمیایی عصاره اتانولی چای سبز و اثر آن بر فعالیت مهار کنندگی و کشندگی آسپرژیلوس نایجر، بوتریتیس سینه را
و ریزوپوس استولونیفر (عامل فساد میوه توت فرنگی و انگور)
مصطفی رحمتی جنید آباد - بهروز علیزاده بهبهانی - محمد نوشاد
- ۴۹۳ بررسی میزان املاح معدنی در دانه کنجد و انتقال آن به روغن ارده و کنجد تصفیه
سمیه خیراتی رونیزی - فاطمه اکرمی مهاجری - حمدالله مشتاقی بروجنی - سارا جام بر سنگ - حسین کیانی - الهام خلیلی صدرآباد
- ۵۰۳ اندازه گیری و مقایسه مقادیر نیترات، نیتريت و عناصر سنگین در برنج برداشت اول و برداشت مجدد
زینب سلطان تویه - شیوا دهقان آبکنار - نازنین خاکی پور
- ۵۱۳ اثر پوشش های خوراکی کیتوزان و موسیلاژ بامیه بر ویژگی های فیزیکی شیمیایی خلال های سیب زمینی سرخ شده
آزاده فراز مند - حسین جلالی - علی نجفی
- ۵۲۹ بررسی تغییرات رنگ و چروکیدگی ورقه های سیب خشک شده با استفاده از پردازش تصویر
جواد صفری - سید جعفر هاشمی - آزاده رنجبر ندامانی
- ۵۴۳ بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی ژل آلئوئورا بر پایداری روغن سویا
مرجان کرمی - لیلا ناطقی - سیمین اسداللهی
- ۵۵۹ اثر لاکتی پلاتنی باسیلوس پلانتاروم پنیر موتال بر چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به سلول های روده ای
سعیده سادات فاطمی زاده - محمد بافر حبیبی نجفی - دنیس سندریس نیلسن



Evaluation of Oxidation Development of Soybean Oil Enriched with Essential Oil from Aerial Parts of *Ferulago angulata* Boiss during Accelerated Storage

A. Hemmati¹, A. Ganjloo^{2*}, K. Varmira³, M. Bimakr⁴

Received: 2021.04.19

Revised: 2021.07.29

Accepted: 2021.08.28

Available Online: 2021.09.15

How to cite this article:

Hemmati, A., Ganjloo, A., Varmira, K., & Bimakr, M. (2023). Evaluation of oxidation development of soybean oil enriched with essential oil from aerial parts of *Ferulago angulata* Boiss during accelerated storage. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 399-414. (In Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.69813.1033>

Introduction

It is believed that edible oils and fats with high levels of unsaturated fatty acids are susceptible to oxidation. Soybean oil as one of the four important edible oils has high content of polyunsaturated fatty acids and so prone to oxidation. Generally, lipid oxidation leads to deterioration of nutritional quality and organoleptic properties of edible oils and fats as well as accelerate the development or progression of cancer, mutagenesis, carcinogenesis, aging and cardiovascular diseases through the formation of free radicals. Therefore, edible oils and fats fortification with antioxidant compounds in order to protect them against oxidation is essential. In recent years, numerous studies were carried out on exploration of natural and safe antioxidant compounds due to the consumers concerns about potential health risk of synthetic antioxidants, such as butylatedhydroxyanisole (BHA), butylatedhydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroquinone (TBHQ) and propylgallate (PG). In this regard, TBHQ as the most powerful synthetic antioxidant is prohibited as food additive in Japan, Canada and Europe. *Ferulago angulata* Boiss which called chavir or chavil belongs to the family of Apiacea consisting of 35–40 species that 8 species grow in Iran. It was reported that *Ferulago* species are used in folk medicine for their tonic, digestive, sedative, aphrodisiac properties from ancient times. Therefore, in the current study, the oxidation development of soybean oil enriched with *F. angulata* essential oil (EO) during accelerated storage was investigated.

Materials and Methods

EO from freeze dried aerial parts of *F. angulata* was extracted through hydrodistillation using Clevenger type apparatus. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to identify main components of the EO. Total phenolic and flavonoid content of the EO were assessed using Folin-Ciocalteu and aluminium chloride colorimetry methods, respectively. Antioxidant activity of EO was measured through 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and reducing power (RP) tests. Then, the EO of *F. angulata* at three concentrations, i.e. 200 ppm (SO-200), 400 ppm (SO-400), and SO-Mixture (100 ppm TBHQ + 100 ppm EO) were added to soybean oil. The synthetic antioxidant of TBHQ at the concentration of 200 ppm was added as control. The effect of EO from freeze dried aerial parts of *F. angulata* on oxidative stability of soybean oil stored under accelerated conditions at 65 °C for 24 days was evaluated through acidity, peroxide (PV), *p*-anisidine (*p*-An) and TOTOX values.

Results and Discussion

1, 2 and 4- M.Sc of Food Technology and Associate Professors, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran, respectively.

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

3- Associate Professor, Research Center of Oils and Fats, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
DOI: [10.22067/ifstrj.2021.69813.1033](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.69813.1033)

Extraction yield, total phenolic and flavonoid contents of EO of *F. angulata* were 2.5% v/w, 188 mg GAE/g and 70.90 mg QE/g respectively. Furthermore, DPPH free radical scavenging activity and RP were 55.45-13.21% and 3.61-2.72 in the concentration range of 1.6-4.6 mg/ml of EO, respectively. Based on GC-MS analysis, the EO contains 41 natural compounds, representing 96.97% of the total EO. *F. angulata* EO could effectively reduce the acidity, *PV* and *p-An* values. For control sample, the maximum values of acidity, *PV* peroxide, *p-An* and TOTOX were 1.52 mg KOH/g, 10.60 meq O₂/kg, 12.48 and 33.68 respectively after 24 days under accelerated conditions. While these values were 0.085 mg KOH/g, 4.5 meq O₂/kg, 9.16 and 18.16 respectively for the soybean oil containing the lowest concentration of EO of *F. angulata*.

Conclusion

The results confirmed the instability of soybean oil during storage as well as the ability of EO from *F. angulata* for soybean oil protection against oxidation. As a result, EO from aerial parts of *F. angulata* could be suggested as a natural and effective antioxidant to be used instead of TBHQ as a synthetic antioxidant for soybean oil stabilization.

Keywords: Accelerated storage, Essential oil, *Ferulago angulata*, Oxidation stability, Soybean oil

مقاله پژوهشی

ارزیابی پیشرفت اکسایش روغن سویا غنی شده با اسانس اندام هوایی چویر حین انبارش تسریع شده

علیرضا همتی^۱ - علی گنجولو^{۲*} - کامبیز ورمیرا^۳ - ماندانا بی مکر^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۳۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۵/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۶

چکیده

روغن‌های گیاهی خصوصاً روغن سویا به دلیل داشتن مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع مستعد به فساد اکسایشی هستند. در سالیان اخیر استفاده از ضد اکسایندهای طبیعی به دلیل اثرات منفی ضد اکسایندهای مصنوعی مورد توجه قرار گرفته است. لذا پژوهش حاضر با هدف بررسی اثربخشی اسانس اندام هوایی چویر بر پایداری اکسایشی روغن سویا صورت پذیرفت. بدین منظور اندام هوایی چویر به روش انجمادی خشک و اسانس به روش تقطیر آبی استخراج شد. میزان بازده استخراج (۲/۵ درصد حجمی/وزنی)، محتوای ترکیبات فنولی کل (۱۸۸ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم)، فلاونوئیدی کل (۷۰/۹۰ میلی گرم معادل کوئرستین در گرم)، فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (۲۱/۱۳-۵۵/۴۵ درصد) و قدرت احیاء کنندگی (۲/۷۲-۳/۶۱) برای اسانس چویر اندازه‌گیری شدند. در ادامه، پیشرفت اکسایش روغن سویا غنی شده با ۲۰۰، ۴۰۰ پی‌پی‌ام اسانس چویر و مخلوط اسانس چویر و ضد اکساینده سنتزی و مخلوط اسانس چویر و ضد اکساینده سنتزی TBHQ (۱۰۰ پی‌پی‌ام+۱۰۰ پی‌پی‌ام) طی ۲۴ روز نگهداری تحت شرایط تسریع شده در دمای ۶۵ درجه سلسیوس از طریق سنجش شاخص‌های پایداری اکسایش بررسی و با ضد اکساینده سنتزی TBHQ مقایسه گردید. در پایان دوره نگهداری اعداد اسیدی، پراکسید، پارا-آنیزیدین و توتوکس برای نمونه کنترل به ترتیب معادل ۱/۵۲ میلی گرم هیدروکسید پتاسیم بر گرم، ۱۰/۶۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم، ۱۲/۴۸ و ۳۳/۶۸ به دست آمد. با افزودن اسانس اندام هوایی چویر با حداقل غلظت مقادیر این اعداد ۰/۰۸۵ میلی گرم هیدروکسید پتاسیم بر گرم، ۴/۵۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم، ۹/۱۶ و ۱۸/۱۶ بود که در مقایسه با ضد اکساینده سنتزی TBHQ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اسانس اندام هوایی چویر خشک شده به روش انجمادی به خوبی می‌تواند پیشرفت اکسایش روغن سویا را به تاخیر بیاورد. لذا از آن می‌توان به عنوان جایگزین طبیعی ضد اکساینده سنتزی TBHQ استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، انبارش تسریع شده، پایداری اکسایشی، چویر، روغن سویا

مقدمه

۲۰۱۴). اکسایش روغن‌ها علاوه بر ایجاد بد طعمی، کاهش کیفیت و افت ارزش تغذیه‌ای، منجر به ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌گردد که می‌توانند به مولکول‌های زیستی بدن حمله نمایند (Nyam et al., 2013) و با ایجاد آسیب سبب بروز بیماری‌هایی نظیر سرطان، تصلب شرائین، دیابت و پیری زودرس گردند (Kanner et al., 2012). در

روغن‌های گیاهی به عنوان یکی از ترکیبات ارزشمند غذایی به لحاظ تامین انرژی و نقش آنها در سلامتی انسان‌ها به دلیل داشتن مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع حساسیت زیادی به فساد اکسیداتیو حین نگهداری و یا فرایند حرارتی دارند (Chen et al.,

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد فناوری مواد غذایی و دانشیاران گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
(*)- نویسنده مسئول: (Email: aganjloo@znu.ac.ir)

۳- دانشیار مرکز تحقیقات روغن‌ها و چربی‌ها، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

قرار دادند. نتایج نشان داد که افزودن اسانس نعنای فلفلی با غلظت ۸۷۱ پی‌پی‌ام به‌عنوان یک ضد اکساینده طبیعی می‌تواند ویژگی‌های کیفی روغن سویا را طی دوره انبارمانی ۴۵ روزه بهبود بخشد (Keshvari Fard et al., 2020). لذا یافتن منابع طبیعی جدید و غنی از ترکیبات زیست فعال و امکان‌سنجی استفاده از آنها به منظور بهبود ویژگی‌های کیفی مواد غذایی نظیر روغن‌های گیاهی ضروری به نظر می‌رسد.

چویر با نام علمی *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. گیاهی علفی، معطر، چند ساله و متعلق به خانواده چتریان^۴ است (Mozafarian, 1983). این گیاه متشکل از ۳۵-۴۰ گونه است که ۸ گونه از آن در ایران (خصوصاً استان‌های ایلام، کردستان، کرمانشاه و لرستان) رشد می‌کند (Mozafarian, 2008). خصوصیات ضد اکسایشی (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013; Mollaei et al., 2019)، ضد میکروبی و ضد باکتریایی (Taran & Ghasempour, 2018; Moghaddam et al., 2010) این گیاه به اثبات رسیده است. از اسانس اندام هوایی چویر به‌عنوان یک ماده معطر و نگهدارنده قوی در محصولات لبنی و روغن حیوانی استفاده می‌شود (Azarbani et al., 2014). صادقی و همکاران (Sadeghi et al., 2016) در پژوهشی به بررسی تاثیر اسانس چویر خشک شده در دمای محیط بر پایداری روغن سویا پرداختند. در این پژوهش مقدار بازده استخراج اسانس از اندام هوایی چویر خشک شده در دمای محیط ۰/۵ درصد وزنی/وزنی به دست آمد و Cis-Ocimene (۳۰/۱۷ درصد)، α -Pinene (۱۵/۴ درصد)، Trans- β -Ocimene (۵/۷ درصد)، γ -Terpinene (۵/۵۷ درصد)، Germacrene-D (۵/۰۳ درصد)، Limonene (۴/۸۸ درصد)، Bomylyl Acetate (۴/۵۷ درصد)، Myrcene (۳/۶۲ درصد)، Camphene (۲/۴۱ درصد)، Noe-Allo-Ocimene (۱/۸۷ درصد)، β -Phellandrene (۱/۸۴ درصد)، α -Terpinolene (۱/۷ درصد)، Bicyclogermacrene (۱/۲۹ درصد) و δ -Cadinene (۱/۱۸ درصد) ترکیبات شیمیایی غالب بودند. به علاوه آنها دریافتند مخلوط اسانس چویر و ضد اکساینده سنتزی TBHQ (غلظت ۶۰+۶۰ پی‌پی‌ام) و پس از آن اسانس چویر با غلظت ۲۵۰ پی‌پی‌ام بیشترین تاثیر را بر پایداری روغن سویا طی دوره انبارمانی داشتند (Sadeghi et al., 2016). مکان جغرافیایی رویش، شرایط کاشت، داشت و برداشت، روش خشک کردن، روش استخراج اسانس از جمله عواملی بشمار می‌روند که بر مقدار اسانس، ترکیب شیمیایی و در نتیجه کارایی اسانس تاثیرگذار می‌باشد (Hassanpour aghdam et al., 2010). طبق بررسی منابع صورت پذیرفته تاکنون مطالعاتی پیرامون بکارگیری روش

نتیجه اکسایش سبب کاهش مقبولیت روغن‌های گیاهی نزد مصرف کننده می‌گردد که این امر ضرر اقتصادی برای تولید کنندگان به همراه خواهد داشت (Iqbal & Bhanger, 2007). روغن سویا به‌عنوان یکی از پرمصرف‌ترین روغن‌های خوراکی حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع لینولئیک اسید و لینولئیک اسید بوده و از این قایده مستثنی نیست (Kozłowska & Gruczyńska, 2018). ترکیبات ضد اکساینده می‌توانند با به تاخیر انداختن یا ممانعت از پیشرفت اکسایش روغن‌های گیاهی از طریق مهار رادیکال‌های آزاد راه حلی برای این مشکل باشند (Yim et al., 2013).

در سالیان اخیر به دلیل اثبات عوارض نامطلوب ترکیبات ضد اکساینده سنتزی (بوتیل‌ات هیدروکسی آنیزول^۱، بوتیل‌ات هیدروکسی تولوئن^۲، ترشیو بوتیل هیدروکینون^۳ و پروپیل گالات^۴) نظیر احتمال سرطان‌زایی و آسیب‌های کبدی، استفاده از ترکیبات ضد اکساینده طبیعی به‌منظور پایداری روغن‌های گیاهی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Siddhuraju & Becker, 2003; Jeong et al., 2004). عصاره‌های گیاهی که عمدتاً حاوی ترکیبات زیست فعال نظیر ترکیبات فنولی با توانایی مهار رادیکال‌های آزاد هستند گزینه مناسبی جهت جایگزینی ترکیبات ضد اکساینده سنتزی می‌باشند (Pedraza-Chaverri et al., 2008). اسانس‌ها علاوه بر اینکه عامل ایجاد عطر و طعم هستند حاوی ترکیبات شیمیایی گیاهی نظیر هیدروکربن‌های منوترپنی، سزکوئی‌ترین‌ها^۵ و ترپن‌های اکسیژن‌دار هستند که از خود فعالیت ضد اکسایشی بروز می‌دهند (Sadeghi et al., 2016).

در سالیان اخیر پژوهش‌هایی با هدف استفاده از اسانس‌ها که مهم‌ترین روغن‌های فرار استخراجی از گیاهان محسوب می‌شوند به‌عنوان ترکیبات ضد اکساینده طبیعی در روغن‌های گیاهی نظیر روغن آفتابگردان و سویا انجام شده است. در این راستا اقبالیان راد و همکاران (Eghbalian Rad et al., 2018) دریافتند که اسانس آپیشن دناپی می‌تواند جایگزین مناسبی برای ضد اکساینده سنتزی BHT برای افزایش پایداری حرارتی روغن سویا حین سرخ کردن باشد (Eghbalian Rad et al., 2018). قزل سفلو و سیدالنگی (Ghezelsofloo & Sayyed-Alangi, 2017) با بررسی اثر اسانس برگ کرفس کوهی بر پایداری اکسایشی روغن سویا دریافتند که غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام از این اسانس به خوبی می‌تواند اکسایش روغن سویا را کنترل نماید (Ghezelsofloo & Sayyed-Alangi, 2017). کشوری فرد و همکاران (Keshvari Fard et al., 2020) تاثیر به‌کارگیری اسانس نعنای فلفلی را بر پایداری اکسایشی روغن سویا مورد بررسی

4- Propyl gallate (PG)

5- Sesquiterpenes

6- Apiaceae

1- Butylated hydroxyanisole (BHA)

2- Butylated hydroxytoluene (BHT)

3- Tert-Butylhydroquinone (TBHQ)

مدت ۳ ساعت انجام شد. آب‌گیری از اسانس به دست آمده با استفاده از سدیم سولفات بدون آب (Na_2SO_4) صورت پذیرفت. اسانس‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای منفی ۴ درجه سلسیوس و درون ظروف شیشه‌ای تیره در بسته نگهداری گردید (Ghasempour et al., 2007).

شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی اسانس اندام هوایی چوبیر

برای شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس اندام هوایی چوبیر از دستگاه کروماتوگراف گازی مدل 7890B مجهز به آشکارساز طیف‌سنج جرمی مدل 5977A ساخت شرکت Agilent آمریکا و ستون HP5-MS به طول ۶۰ متر و با قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه دمایی ستون با دمای اولیه ۶۰ درجه سلسیوس شروع و به مدت ۵ دقیقه در این دما نگه داشته شد، سپس دمای ستون با شیب ۱۵ درجه سلسیوس بر دقیقه به دمای ۱۸۰ درجه سلسیوس رسید و به مدت ۲ دقیقه در این دما ثابت ماند و در نهایت با شیب ۲۰ درجه سلسیوس بر دقیقه به دمای ۲۸۰ درجه سلسیوس رسید و به مدت ۱۰ دقیقه در این دما ثابت ماند. از گاز هلیوم با درجه خلوص بالا به عنوان گاز حامل استفاده شد. انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی ۷۰ الکترون ولت بود. شناسایی ترکیبات شیمیایی بر اساس مقایسه شاخص بازداري ترکیبات شیمیایی با شاخص‌های موجود در کتابخانه‌های جرمی^۲ نظیر^۳ NIST و (ChemStation data system) WILEY، مراجع علمی معتبر و همچنین طیف نرمال آلکان‌های تزریق شده در شرایط مشابه انجام شد. درصد نسبی هر یک از اجزای تشکیل دهنده اسانس بر اساس سطح زیر منحنی هر یک از پیک‌های به‌دست آمده در مقایسه با سطح کل زیر منحنی محاسبه گردید (Shahbazi et al., 2015).

تعیین محتوای ترکیبات فنولی کل (TPC^۴)

محتوای ترکیبات فنولی کل اسانس اندام هوایی چوبیر به روش رنگ‌سنجی و بر اساس واکنش معرف فولین با گروه‌های هیدروکسی فعال موجود در ترکیبات فنولی ارزیابی شد. بدین منظور ۲۰۰ میکرولیتر از اسانس با ۸۰۰ میکرولیتر از شناساگر فولین-سیکالتیو^۵ (که قبلاً با نسبت یک به ۱۰ با آب دیونیزه شده رقیق شده است) مخلوط شد و پس از افزودن ۲ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد (وزنی-حجمی) حجم مخلوط با استفاده از آب مقطر به ۷ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از دو ساعت نگهداری مخلوط در دمای اتاق و محیط تاریک، میزان جذب در

خشک کردن انجمادی به‌منظور آماده‌سازی اندام هوایی گیاه چوبیر جهت استخراج اسانس و امکان‌سنجی استفاده از آن با هدف افزایش پایداری اکسایشی روغن‌های گیاهی انجام نشده است. لذا هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی تاثیر اسانس اندام هوایی چوبیر خشک شده به روش انجمادی بر پیشرفت اکسایش روغن سویا حین انبارش تحت شرایط تسریع شده در دمای ۶۵ درجه سلسیوس و مقایسه آن با اثر ضد اکساینده سنتزی TBHQ می‌باشد.

مواد و روش‌ها مواد اولیه

اندام هوایی گیاه چوبیر در مرحله گل‌دهی (خرداد- تیر) از کوه‌های شهرستان دالاهو در استان کرمانشاه (۳۴ درجه و ۱۶ دقیقه عرض شمالی، ۴۶ درجه و ۱۴ دقیقه طول شرقی و در ارتفاع ۱۶۵۸ متر از سطح دریا) جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه با آب مقطر شسته شد. روغن سویا تصفیه شده و فاقد هرگونه افزودنی و ترکیب ضد اکسایشی از کارخانه نازگل کرمانشاه تهیه شد. حلال‌ها و مواد شیمیایی با بالاترین درجه خلوص به ترتیب از شرکت‌های مرک آلمان و سیگما-آلدريج آمریکا تهیه شدند.

خشک کردن اندام هوایی چوبیر

به‌منظور منجمد شدن آب آزاد، اندام هوایی چوبیر به مدت ۲۴ ساعت در دمای منفی ۱۸ درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی (CHRIST, Alpha 2-4 LD Plus, Germany) به مدت ۲۴ ساعت و در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس و با فشار خلأ برابر ۰/۰۷۵ بار تا رسیدن به محتوای رطوبت نهایی معادل $8/5 \pm 0/2$ درصد بر پایه وزن تر خشک شد. سپس با استفاده از یک آسیاب خانگی (GOSONIC, Shenzhen, China) پودر شده و به منظور حذف ذرات با اندازه بزرگ و دستیابی به پودری یکنواخت از الک با مش استاندارد ۱۸ (Damavand Test Sieve LTD., Iran) گذرانده و درون کیسه‌های مقاوم به هوا و رطوبت بسته بندی و در دمای منفی ۱۸ درجه سلسیوس تا زمان استخراج اسانس نگهداری شد (Hemmati et al., 2021).

استخراج اسانس اندام هوایی چوبیر به روش تقطیر با آب

استخراج اسانس از پودر خشک اندام هوایی چوبیر به روش تقطیر با آب^۱ در دستگاه کلونجر با رعایت نسبت ۱ به ۱۲ (وزنی/حجمی) به

4- Total phenolic content

5- Folin-Ciocalteu

1- Hydrodistillation

2- MS library

3- National Institute of Standards and Technology

در این رابطه A_0 ، A_1 و A_2 به ترتیب نشان‌دهنده میزان جذب محلول DPPH به تنهایی، میزان جذب اسانس به تنهایی و میزان جذب محلول DPPH و اسانس می‌باشد.

سنجش میزان قدرت احیاء کنندگی (RP^3)

به منظور اندازه‌گیری میزان قدرت احیاء کنندگی اسانس اندام هوایی چویر، ۳ میلی‌لیتر از نمونه اسانس با ۲ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات (۰/۲ مولار، pH ۶/۶) و ۲ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید (۱/۰ درصد وزنی-حجمی) مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (۱۰ درصد وزنی-حجمی) به آن اضافه شد. ۲ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده با ۰/۴ میلی‌لیتر فریک کلراید (۰/۱ درصد وزنی - حجمی) و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در محیط تاریک، میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-نورمرئی (SPECORD 250, Jena, Germany) قرائت شد. میزان جذب بالاتر نشان‌دهنده میزان بالاتری از قدرت احیاء کنندگی است (Oyaizu, 1986).

ارزیابی تأثیر اسانس چویر بر پیشرفت اکسایش روغن

سویا حین انبارش تحت شرایط تسریع شده

اسانس اندام هوایی چویر در دو غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام (so-200) و ۴۰۰ پی‌پی‌ام (so-400) و ضد اکساینده سنتزی TBHQ به میزان ۲۰۰ پی‌پی‌ام (so-TBHQ) به‌طور مجزا به روغن سویا تصفیه شده، بدون هیچ‌گونه ترکیب ضد اکساینده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس افزوده شد. روغن سویا بدون افزودنی به‌عنوان نمونه کنترل و نمونه حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس چویر و ۱۰۰ پی‌پی‌ام TBHQ (so-MIX) جهت بررسی اثرات سینرژیستی و یا آنتاگونیستی دو ضد اکساینده مورد استفاده در نظر گرفته شد. تیمارهای مورد مطالعه در جدول ۱ شرح داده شده است. پس از اینکه روغن سویا با ضد اکساینده‌های مد نظر به‌خوبی مخلوط شد درون بطری‌های ۵۰۰ سی‌سی در بسته پر شد و در آون (K.J 85, Pars Azma, Iran) با دمای ۶۵ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ روز (هر یک روز نگهداری روغن در این دما معادل با یک ماه نگهداری شرایط محیطی عادی است) نگهداری شدند (Iqbal & Bhanger, 2007) و پیشرفت اکسایش در روزهای صفر، ششم، دوازدهم، هجدهم و بیست و چهارم مورد ارزیابی قرار گرفت.

طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-نورمرئی (SPECORD 250, Jena, Germany) قرائت گردید (Singleton & Rossi, 1965). محتوای ترکیبات فنولی کل اسانس با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم معادل گالیک اسید در هر گرم اسانس بیان شد.

تعیین محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل (TFC^1)

برای تعیین محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل اسانس اندام هوایی چویر از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. بدین منظور ۲۵۰ میکرولیتر اسانس با ۷۵ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵ درصد مخلوط و پس از شش دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد به آن اضافه گردید. پس از گذشت پنج دقیقه، ۵۰۰ میکرولیتر سود یک مولار به مخلوط اضافه و حجم محلول به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-نورمرئی (SPECORD 250, Jena, Germany) قرائت شد (Jia et al., 1999). محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم اسانس بیان گردید.

سنجش قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد ۱،۱- دی فنیل-

۲- پیکریل-هیدرازیل ($DPPH^2$)

به‌منظور سنجش قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH ابتدا ۲ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف اسانس (۱/۶، ۳/۲ و ۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به خوبی با ۲ میلی‌لیتر محلول اتانولی DPPH (۰/۱ میلی‌مولار) مخلوط شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک قرار گرفت و میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-نورمرئی (SPECORD 250, Jena, Germany) قرائت شد. توانایی میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بر حسب درصد از طریق رابطه ۱ محاسبه گردید (Xie et al., 2012). قدرت مهار رادیکال‌های آزاد بر اساس IC_{50} یا همان توانایی مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH تعیین گردید. لازم به ذکر است که هر چه مقدار IC_{50} کمتر باشد فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد بیشتر می‌باشد.

$$DPPH \text{ آزاد} (\%) = \frac{1-(A_2-A_1)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

جدول ۱- کد تیمارهای مورد مطالعه در پژوهش حاضر
 Table 1- Code of treatments studied in current research

کد Code	نمونه Sample
Control کنترل	روغن سویا بدون هر گونه افزودنی Soybean oil without any additives
so-200	روغن سویا حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس چویر Soybean oil containing 200 ppm <i>F. angulata</i> essential oil
so-400	روغن سویا حاوی ۴۰۰ پی‌پی‌ام اسانس چویر Soybean oil containing 400 ppm <i>F. angulata</i> essential oil
so-TBHQ	روغن سویا حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام ضد اکساینده سنتزی TBHQ Soybean oil containing 200 ppm synthetic antioxidant TBHQ
so-MIX	روغن سویا حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس چویر و ۱۰۰ پی‌پی‌ام TBHQ Soybean oil containing 100 ppm <i>F. angulata</i> essential oil and 100 ppm synthetic antioxidant TBHQ

۰/۵ میلی‌لیتر معرف چسب نشاسته اضافه شد و تیتراسیون تا از بین رفتن رنگ آبی ادامه یافت. عدد پراکسید با استفاده از رابطه ۳ محاسبه و بر حسب میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم روغن گزارش شد.

$$PV \left(\frac{meq}{kg} \right) = \frac{V \times N \times 1000}{m} \quad (3)$$

در این رابطه V ، N و m به ترتیب حجم تیوسولفات مصرفی بر حسب میلی‌لیتر، نرمالیت تیوسولفات سدیم و جرم روغن سویا بر حسب گرم می‌باشد.

اندازه‌گیری عدد پارا-آنیزیدین^۲

عدد پارا-آنیزیدین طبق استاندارد AOAC به شماره 18-90 به منظور سنجش محصولات ثانویه اکسایش اندازه‌گیری شد. در ابتدا ۲ گرم نمونه روغن به داخل یک ارلن مایر ۲۵ میلی‌لیتری منتقل شد و با ایزواکتان به حجم رسید. سپس ۵ میلی‌لیتر از محلول فوق با یک میلی‌لیتر محلول پارا-آنیزیدین (۰/۲۵ درصد وزنی- حجمی) تهیه شده در استیک اسید مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در محل تاریک نگهداری شد. در نهایت میزان جذب در طول موج ۳۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-نورمرئی (SPECORD 250, Jena, Germany) قرائت شد. محلول شاهد که حاوی ۵ میلی‌لیتر ایزواکتان بود تحت شرایط مشابه اندازه‌گیری شد. عدد پارا-آنیزیدین با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد (AOAC, 1990).

$$p - AnV = \frac{25 \times (1.2A_s - A_b)}{m} \quad (4)$$

در این رابطه، A_s جذب روغن پس از واکنش با پارا-آنیزیدین، A_b جذب نمونه شاهد و m وزن روغن بر حسب گرم است.

اندازه‌گیری عدد اکسایش کل (TOTOX^۳)

بررسی شاخص‌های پیشرفت اکسایش روغن سویا اندازه‌گیری اسیدیته

به‌منظور بررسی خلوص، تازگی و درجه هیدرولیز، میزان اسیدیته روغن سویا مطابق با استاندارد AOCS به شماره Cd 3d-63 اندازه‌گیری شد (AOCS, 1990). به ۲۰ گرم از نمونه، ۱۲۵ میلی‌لیتر حلال (ایزوپروپیل الکل خالص + تولوئن) خنثی شده با هیدروکسید پتاسیم استاندارد و معرف فنل فتالین اضافه شد. محلول با هیدروکسید پتاسیم ۰/۱ مولار در الکل ایزوپروپیل خالص تیتراژ شده و تیتراسیون تا ایجاد رنگ صورتی کم‌رنگ پایدار به مدت ۳۰ ثانیه ادامه یافت. میزان اسیدیته بر اساس رابطه ۲ محاسبه شد.

$$Acidity \left(\frac{mgKOH}{g} \right) = \frac{(V \times C \times 56.1)}{W} \quad (2)$$

در این رابطه V ، C و W به ترتیب نشان‌دهنده تفاضل هیدرواکسید پتاسیم مصرفی برای تیتراسیون نمونه و شاهد بر حسب میلی‌لیتر، غلظت هیدرواکسید پتاسیم بر حسب مول بر لیتر و وزن نمونه روغن بر حسب گرم می‌باشد.

اندازه‌گیری عدد پراکسید^۱

به‌منظور ارزیابی محصولات اولیه اکسایش، عدد پراکسید به روش یدومتري و مطابق با استاندارد AOCS به شماره Cd 8-53 اندازه‌گیری شد (AOCS, 1990). بدین منظور پس از گرم شدن ۵ گرم از نمونه تا دمای ۴۰ درجه سلسیوس، ۳۰ میلی‌لیتر حلال (۳ قسمت استیک اسید + ۲ قسمت کلروفرم) به آن اضافه گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر یدید پتاسیم اشباع به آن اضافه شد. پس از قرار گرفتن در مکان تاریک، طی یک دقیقه ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر بدان اضافه شد و سپس با تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تا از بین رفتن رنگ زرد ید تیتراژ گردید. در نهایت

3- Total oxidation value (TOTOX)

1- Peroxide value (PV)

 2- *p*-anisidine

عدد توتوکس یا همان اکسایش کل که نشان‌دهنده مجموع محصولات اولیه و ثانویه اکسایش روغن می‌باشد بر اساس رابطه ۵ محاسبه شد (Nyam et al., 2013).

$$\text{TOTOX} = 2PV + p - AnV \quad (5)$$

تجزیه و تحلیل آماری

طراحی آزمایشات پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار صورت پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون توکی^۲ در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار MINITAB نسخه ۱۶ استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ رسم شدند. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام و داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس اندام هوایی چوب خشک شده به روش انجمادی

بازده استخراج اسانس از اندام هوایی چوب خشک شده به روش انجمادی ۲/۵ درصد حجمی/وزنی بود در حالی که صادقی و همکاران (Sadeghi et al., 2016) میزان بازده استخراج اسانس از نمونه خشک شده در دمای محیط را ۰/۵ درصد وزنی/وزنی گزارش نمودند.

اسانس به دست آمده از اندام هوایی چوب خشک شده به روش انجمادی حاوی ۴۱ ترکیب بود که در مجموع ۹۶/۹۷٪ کل اسانس را تشکیل می‌دهند. ترکیبات شیمیایی شناسایی شده و مقادیر آنها در جدول ۲ آورده شده است و با نوع و مقادیر ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس اندام هوایی چوب خشک شده در دمای محیط ارائه شده توسط صادقی و همکاران (Sadeghi et al., 2016) مقایسه شد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود بیشترین ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس اندام هوایی چوب خشک شده به روش انجمادی به ترتیب شامل Trans- β -Ocimene (۲۱/۶۵٪)، Cyclofenchene (۷/۲۳٪)، Bornyl Acetate (۲۰/۱۰٪)، O-Cymene (۸/۸۸٪)، β -Copaene (۳/۲۹٪)، Myrcene (۳/۲۷٪)، 4 α -ol (۲/۷۷٪) و β -Pinene (۲/۵۸٪) می‌باشد. این در حالی است در مطالعه صادقی و همکاران (Sadeghi et al., 2016) به طور کلی ۶۰ ترکیب شیمیایی شناسایی شد که در مجموع ۹۶/۸۴٪ کل اسانس را تشکیل می‌دادند. لازم به ذکر است که ترکیب شیمیایی Cis-Ocimene (۳۰/۱۷٪) عمده

ترین ترکیب شناسایی شده در اسانس چوب خشک شده در دمای محیط بود (Sadeghi et al., 2016). همان‌طور که پیشتر نیز اشاره شده وجود تفاوت در ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس به‌دست آمده از یک گیاه مشابه می‌تواند ناشی از تاثیر مکان جغرافیایی رویش، شرایط کاشت، داشت و برداشت، روش خشک کردن و روش استخراج اسانس باشد (Hassanpour aghdam et al., 2010).

نتایج برخی از مطالعات نشان می‌دهند ترکیباتی نظیر γ -Terpinene، Myrcene، β -Pinene و Bornyl Acetate حتی در غلظت‌های اندک فعالیت ضد اکسایشی قابل قبولی دارند (Song et al., 2011; Hosseini et al., 2001). در این راستا فعالیت ضد باکتریایی Cyclofenchene، O-Cymene، Bornyl Acetate و β -Pinene به اثبات رسیده است (Haznedaroglu et al., 2001; Darderafshi et al., 2014; Shahbazi et al., 2015).

ترکیبات زیست‌فعال نظیر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به‌عنوان جزئی از متابولیت‌های ثانویه گیاهان نیز مسئول بروز ویژگی‌های ضد اکسایشی گیاهان هستند. سنجش محتوای کمی ترکیبات زیست فعال فنولی و فلاونوئیدی کل نشان داد که میزان محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل اسانس اندام هوایی چوب خشک شده به روش انجمادی به ترتیب معادل 188 ± 0.23 میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم اسانس و 70.9 ± 0.09 میلی‌گرم کوئرستین در گرم اسانس می‌باشد. وجود ترکیبات ترپنوئیدی نظیر α -Pinene، Thymol، Trans- β -Ocimene، Terpinene-4-ol، Carvacrol و O-Cymene در اسانس اندام هوایی چوب که از جمله ترکیبات فنولی محسوب می‌شوند به‌عنوان عوامل اصلی ضد اکسایشی به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل قادر به واکنش با رادیکال‌های حاصل از اکسایش روغن‌های گیاهی غیر اشباع بوده و بدین ترتیب با خنثی سازی آنها سبب قطع واکنش‌های زنجیره‌ای و کاهش سرعت اکسایش می‌گردند (Dehghan et al., 2019). در مطالعه‌ای هاشمی و همکاران (Hashemi et al., 2015a) اذعان کردند وجود ترکیبات فنولی متعلق به مونوترپن‌ها نظیر (آلفا و بتا پینن، آلفاتوجن، دلتا ۳ کارن، پارا سیمون و ترپینن ۴ ال) در اسانس گیاه باریجه مسئول بروز فعالیت ضد اکسایشی هستند.

فعالیت ضد اکسایشی اسانس اندام هوایی گیاه چوب خشک شده به روش انجمادی به دو روش سنجش قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و سنجش قدرت احیاء کنندگی اندازه‌گیری گردید. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که فعالیت اسانس چوب در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH وابسته به غلظت است چراکه با افزایش غلظت اسانس از ۱/۶ تا ۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، میزان فعالیت مهار

کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH از ۲۱/۱۳ تا ۵۵/۴۵ درصد افزایش یافت. میزان فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط اسانس اندام هوایی چویر خشک شده به روش انجمادی بر اساس IC₅₀ برابر با ۵/۶۱۴±۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتایج بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که با افزایش غلظت اسانس میزان فعالیت ضد اکسایشی آنها نیز افزایش می‌یابد (Hashemi et al., 2015a, b).

جدول ۲- ترکیب شیمیایی اسانس به دست آمده از اندام هوایی خشک شده چویر به روش انجمادی

Table 2- Chemical composition of the essential oil obtained from the freeze-dried aerial parts of *F. angulata*

Compound ترکیب	FD خشک کردن انجمادی	Ambient Temp. * دمای محیط	Compound ترکیب	FD خشک کردن انجمادی	Ambient Temp. * دمای محیط
<i>Cis</i> -Ocimene	-	30.17	β -Bourbonene	-	0.28
<i>Cyclofenchene</i>	21.65	-	Myroxide	0.45	-
α -Pinene	0.31	15.4	tetrakis (1-methylethylidene)-	0.43	-
<i>Trans</i> - β -Ocimene	20.10	5.70	Linallol	0.44	0.26
γ -Terpinene	2.77	5.57	Neryl (S)-2-methylbutanoate	0.42	-
Germacrene-D	1.38	5.03	β -Cubenone	-	0.23
Limonene	2.92	4.88	α -Amorphene	-	0.22
<i>O</i> -Cymene	8.88	-	Terpinene-4-ol	0.29	0.17
Bornyl Acetate	7.23	4.57	β -Elemene	-	0.16
<i>Trans</i> -Verbenol	3.29	-	α -Cadinol	-	0.15
Myrcene	3.75	3.62	β -Bisabolene	-	0.14
β -Copaene-4 α -ol	3.27	-	Borneol	0.57	0.14
β -Pinene	2.58	-	Epi- α -Cadinol	-	0.13
Camphene	1.69	2.41	<i>Cis</i> -Jasmone	-	0.12
β -Ocimene	1.39	-	γ -Elemene	-	0.11
Noe-Allo-Ocimene	0.60	1.87	Cuparene	-	0.10
β -Phellandrene	-	1.84	α -Cadinene	-	0.10
α -Terpinolene	1.30	1.70	Ledene	-	0.09
Bicyclogermacrene	-	1.29	Thymol	0.18	-
δ -Cadinene	-	1.18	α -Terpineol	0.21	0.09
Verbenone	0.99	-	Tricyclene	-	0.09
δ -3-Carene	-	0.71	Verbenene	-	0.09
Germacrene-B	-	0.63	Palmitic acid	-	0.08
<i>p</i> -Menthane	0.85	-	<i>Trans</i> -Sabinene hydrate	1.93	0.07
<i>p</i> -Cymene	0.51	0.56	α -Muurolene	-	0.07
Viridiflorine	0.82	-	Pinocarvyl Acetate	0.36	0.06
Spathulenol	-	0.54	Iso-Spathulenol	-	0.06
α -Terpinene	-	0.53	α -Humulene	-	0.06
<i>Cis</i> -Verbenol	0.81	-	Butanoic Acid, 3- methyl	-	0.05
β -Cadinene	0.64	-	γ -Curcumen	-	0.05
α -Naginatene	0.57	-	<i>Trans</i> - β -Farnesene	-	0.05
α -Phellandrene	0.93	0.52	α -Cedrene	-	0.04
α -Acorenol	0.49	-	Elemo	-	0.03
α -Thujene	0.40	-	α - Campholeneal	-	0.03
α -Copaene	0.55	0.33	<i>p</i> -Cymene-8-ol	-	0.03
Geranyl Isovalerate	-	0.30	Geraniol	-	0.03
anthenyl <i>Cis</i> -Chrys propionate	0.28	-	Carvacrol	-	0.03
Italicene	0.23	-	α -Cubebene	-	0.03
Methyl Eugenol	0.21	0.30	Myrtenal	-	0.02
<i>Trans</i> -Caryophllene	0.30	0.28	Methyl cyclohexane	-	0.01
Total identified (%)				96.97	96.84

*داده ها بر گرفته از منبع Sadeghi et al., 2016.

*Data adopted from Sadeghi et al., 2016.

فلاونوئیدی از طریق مهار رادیکال‌های آزاد به اثبات رسیده است (Samadloiy et al., 2008). همچنین افزایش فعالیت مهار کنندگی

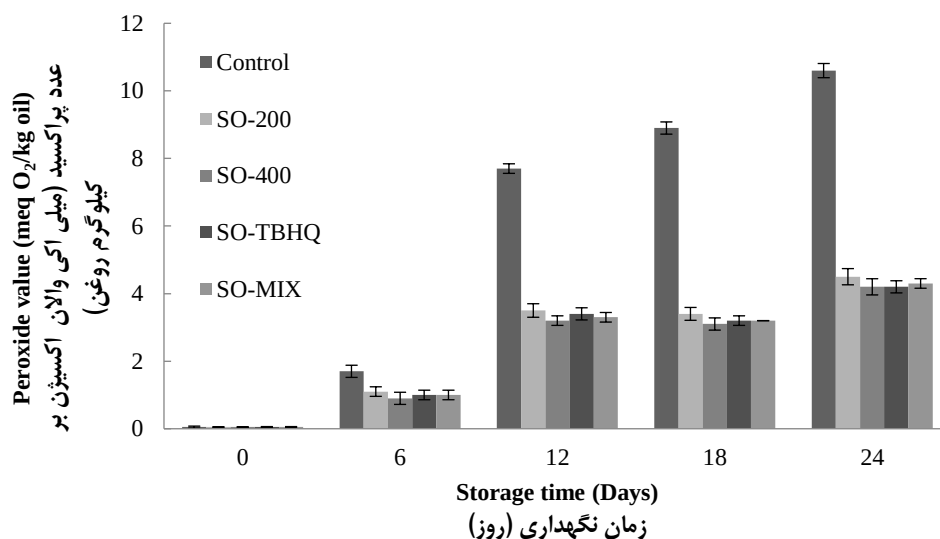
این امر می‌تواند ناشی از تاثیر افزایش میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل باشد چرا که فعالیت ضد اکسایشی ترکیبات فنولی و

so-TBHQ و so-MIX به ترتیب $4/50 \pm 0/40$ ، $4/20 \pm 0/44$ و $4/30 \pm 0/14$ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن بود. در مقایسه با نمونه کنترل افزودن ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام از اسانس اندام هوایی چویر توانست به ترتیب به میزان ۵۷/۵۵ و ۶۰/۳۸ درصد از پیشرفت اکسایش جلوگیری نماید. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در محدوده غلظت اسانس مورد مطالعه هیچ اثر پراکسیدانی مشاهده نگردید که نشان از انتخاب صحیح سطوح غلظت‌های اسانس است. بیشتر اینکه افزودن مخلوط ضد اکساینده طبیعی و سنتزی (so-MIX) توانست به میزان ۵۹/۴۳ درصد از پیشرفت اکسایش روغن سویا جلوگیری نماید و هیچ گونه اثر سینرژیستی و یا آنتاگونیستی مشاهده نگردید. به‌طور کلی ممانعت از وقوع واکنش‌های اولیه اکسایش روغن‌ها توسط ترکیبات زیست‌فعال گیاهی به دلیل توانایی آنها برای اهداء الکترون یا قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط آنها می‌باشد. صادقی و همکاران (Sadeghi et al., 2016) در پژوهش مشابهی عدد پراکسید روغن سویا پایدار شده با اسانس اندام هوایی چویر خشک شده در دمای محیط و در محدوده غلظت ۱۲۵-۵۰۰ پی‌پی‌ام را ۶/۰۶-۷ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم در پایان دوره نگهداری گزارش کردند که در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر اسانس اندام هوایی چویر خشک شده به روش انجمادی کارایی بالاتری در پایداری روغن سویا دارد (Sadeghi et al., 2016). در این راستا دهقان و همکاران (Dehghan et al., 2019) با بررسی اثر افزودن اسانس پوست پرتقال بر پایداری روغن سویا دریافتند که با افزایش غلظت اسانس از ۲ به ۵ درصد میزان عدد پراکسید کاهش یافت. این در حالی بود که با افزایش غلظت اسانس به ۲۰ درصد، با افزایش اثر پراکسیدانی، سرعت اکسایش روغن افزایش یافت (Dehghan et al., 2019). قزل سفلو و سیدالنگی (Ghezelsaflo & Sayyed-Alangi, 2017) در پژوهش مشابهی دریافتند غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس کرفس کوهی کارایی مطلوبی در مهار اکسایش روغن سویا تحت شرایط تسریع شده دارد. کشوری فرد و همکاران (Keshvari Fard et al., 2020) گزارش کردند که افزودن اسانس نعناع فلفلی به روغن سویا تا غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام سبب کاهش عدد پراکسید می‌شود ولی افزایش غلظت به بالاتر از این مقدار نتیجه معکوس داشته و به سبب پراکسیدانی عمل کردن اسانس نعناع فلفلی عدد پراکسید روغن سویا طی دوره نگهداری افزایش یافت (Keshvari Fard et al., 2020).

رادیکال‌های آزاد DPPH با افزایش غلظت اسانس می‌تواند ناشی از افزایش شدت آزادسازی الکترون‌ها یا اتم‌های هیدروژن و انتقال آنها به رادیکال‌های DPPH باشد. میزان فعالیت احیاء کنندگی آهن اسانس چویر وابسته به غلظت و میزان جذب اسانس در طول موج ۷۰۰ نانومتر در محدوده ۲/۷۲-۳/۶۱ به‌دست آمد. روش احیاء آهن مبتنی بر قابلیت الکترون‌دهی یا همان نیروی احیاء کنندگی می‌باشد و این امر که با فعالیت ضد اکسایشی ترکیبات زیست‌فعال در ارتباط است می‌تواند مکانیسم تاثیر ترکیبات زیست‌فعال بر جلوگیری یا به تاخیر انداختن فرایند اکسایش را توجیه نماید (Mohammadi & Arabshahi, Delouee, 2017).

اثر افزودن اسانس چویر بر عدد پراکسید روغن سویا طی مدت نگهداری تحت شرایط تسریع شده

پراکسیدها و هیدروپراکسیدها اولین محصولات فرایند اکسایش روغن‌ها و چربی‌ها هستند که در مراحل انتهایی اکسایش به علت ناپایداری تجزیه شده و سبب تند شدگی^۱ روغن‌ها می‌شوند (Dobarganes & Velasco, 2002). در نتیجه عدد پراکسید بالاتر نشان‌دهنده پایداری اکسایشی کم‌تر است. در مرحله آغاز اکسایش، میزان پراکسیدها و هیدروپراکسیدها اغلب کم است که با آغاز مرحله انتشار میزان آنها افزایش می‌یابد. تاثیر افزودن غلظت‌های مختلف اسانس چویر و ضد اکساینده سنتزی TBHQ بر روی عدد پراکسید روغن سویا حین نگهداری تحت شرایط تسریع شده در شکل ۱ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مورد مطالعه مشاهده نگردید ($p > 0/05$) هر چند اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) تیمارها با نمونه کنترل مشهود بود. بر اساس شکل ۱ وجود یک روند افزایشی در مقادیر عدد پراکسید تمامی نمونه‌ها قابل مشاهده است که این افزایش به علت تشکیل هیدروپراکسیدها به‌عنوان محصولات اولیه اکسایش می‌باشد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود روند افزایش عدد پراکسید حین دوره نگهداری تا روز ششم نگهداری آهسته بود و پس از آن تا روز دوازدهم با شیب تندتری افزایش یافت اما از روز دوازدهم تا پایان دوره نگهداری، عدد پراکسید با شیب ملایم‌تری افزایش یافت. عدد پراکسید روغن سویا در ابتدای دوره نگهداری معادل $0/05 \pm 0/02$ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن بود که پس از ۲۴ روز نگهداری تحت شرایط تسریع شده عدد پراکسید نمونه کنترل به میزان حداکثر $10/6 \pm 0/42$ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن رسید در حالی که عدد پراکسید نمونه‌های so-200، so-400،



شکل ۱- عدد پراکسید روغن سویا حاوی اسانس چویر و ضد اکساینده سنتزی TBHQ نگهداری شده تحت شرایط تسریع شده به مدت ۲۴ روز. Control: روغن سویا بدون هر گونه افزودنی، SO-200: روغن سویا حاوی ۲۰۰ پی پی ام اسانس چویر، SO-400: روغن سویا حاوی ۴۰۰ پی پی ام اسانس چویر، SO-TBHQ: روغن سویا حاوی ۲۰۰ پی پی ام ضد اکساینده سنتزی TBHQ، SO-MIX: روغن سویا حاوی ۱۰۰ پی پی ام اسانس چویر و ۱۰۰ پی پی ام TBHQ

Fig. 1. Peroxide value of soybean oil containing *F. angulata* essential oil and synthetic antioxidant TBHQ stored under accelerated conditions for 24 days

Control: Soybean oil without any additives, so-200: Soybean oil containing 200 ppm *F. angulata* essential oil, so-400: Soybean oil containing 400 ppm *F. angulata* essential oil, so-TBHQ: Soybean oil containing 200 ppm synthetic antioxidant TBHQ, so-MIX: Soybean oil containing 100 ppm *F. angulata* essential oil and 100 ppm TBHQ.

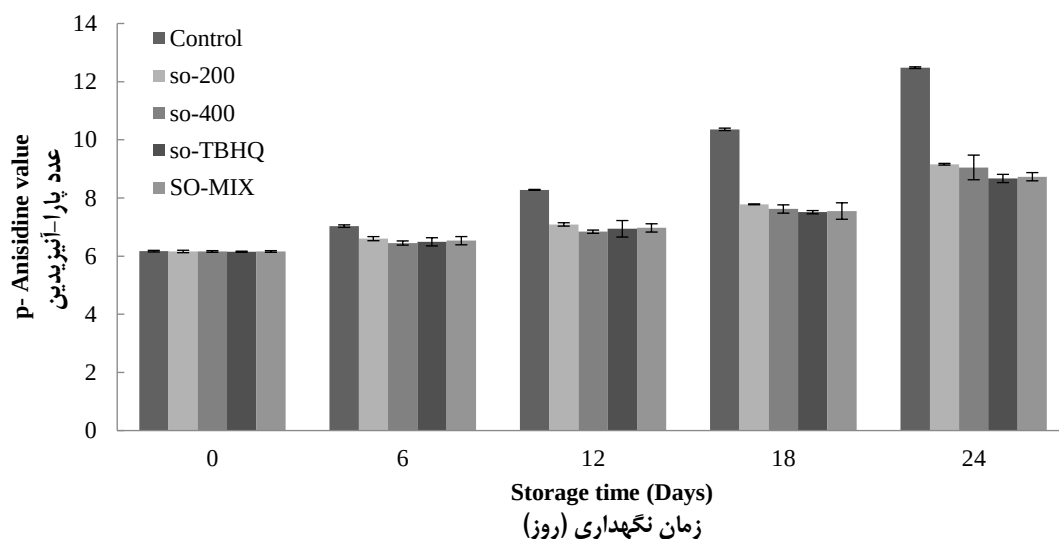
آنیزیدین برای نمونه‌های so-200 و so-400 به ترتیب $9/16 \pm 0/03$ و $9/05 \pm 0/24$ به دست آمد ($p > 0/05$) این در حالی است که عدد پارا-آنیزیدین برای نمونه‌های so-TBHQ و so-MIX به ترتیب $8/67 \pm 0/14$ و $8/73 \pm 0/13$ بود. ضد اکساینده سنتزی TBHQ بیشترین تاثیر را بر جلوگیری از تشکیل محصولات ثانویه اکسایش داشت چرا که این ضد اکساینده سنتزی با داشتن دو گروه پارا-هیدروکسیل براحتی می‌تواند با اهداء اتم‌های هیدروژن به رادیکال‌های آزاد فعال سبب قطع زنجیره واکنش اکسایش رادیکالی شود (Jiang & Wang, 2006). نتایج به دست آمده حاکی از آن است که اسانس اندام هوایی چویر خشک شده به روش انجمادی در جلوگیری از محصولات ثانویه اکسایش نسبت به اسانس اندام هوایی چویر خشک شده در دمای محیط کارآمدتر می‌باشد. صادقی و همکاران (Sadeghi et al., 2016) گزارش کردند که با افزودن اسانس اندام هوایی چویر خشک شده در دمای محیط (محدوده غلظت اسانس ۱۲۵-۵۰۰ پی پی ام) عدد پارا-آنیزیدین روغن سویا در پایان دوره نگهداری حداکثر به میزان حدودی ۲۰/۸۰ درصد نسبت به نمونه کنترل کاهش یافت (Sadeghi et al., 2016). این در حالی است که برای نمونه‌های so-200 و so-400 در مدت زمان مشابه می‌توان به ترتیب به ۲۶/۶۰ و ۲۷/۴۸ درصد کاهش در عدد پارا-آنیزیدین نسبت به نمونه کنترل دست یافت. همچنین مظاهری کله‌رودی و همکاران (Kalahrodi et al.,

اثر افزودن اسانس چویر بر عدد پارا-آنیزیدین روغن سویا طی مدت نگهداری تحت شرایط تسریع شده

ترکیبات شیمیایی اکسیژن‌دار با وزن مولکولی پایین نظیر الکل‌ها، آلدهیدها، اسیدهای چرب آزاد و کتون‌ها از جمله ترکیباتی هستند که از تجزیه پراکسیدها و هیدروپراکسیدها ایجاد می‌شوند (Pizarro et al., 2013). عدد پارا-آنیزیدین به منظور سنجش میزان محصولات ثانویه اکسایش ناشی از تجزیه هیدروپراکسیدها اندازه‌گیری شد (Doleschall et al., 2002). این آزمون بر اساس واکنش‌پذیری پیوند کربونیل آلدهید بر روی گروه آمین پارا-آنیزیدین است که منجر به تشکیل باز شیف می‌شود که حداکثر جذب را در طول موج ۳۵۰ نانومتر خواهد داشت (Ying et al., 2010). بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری، عدد پارا-آنیزیدین نمونه کنترل به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) بیشتر از سایر تیمارها بود. روند تغییرات عدد پارا-آنیزیدین در شکل ۲ نشان داده شده است. تشکیل محصولات ثانویه اکسایش افزایش نگهداری تحت شرایط تسریع شده شبیه نتایج عدد پراکسید افزایش یافت. همان‌طور که ملاحظه می‌شود از روز ۱۲ نگهداری به بعد، عدد پارا-آنیزیدین نمونه کنترل با شدت بیشتری نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت. عدد اولیه پارا-آنیزیدین روغن سویا بدون هیچ گونه ترکیب ضد اکساینده $6/17 \pm 0/02$ بود که در انتهای دوره نگهداری به مقدار $12/48 \pm 0/02$ افزایش یافت. در پایان دوره نگهداری، عدد پارا-

و ۰/۶ میلی گرم در میلی لیتر می توان به حداقل عدد پارا-آنیزیدین حین دوره نگهداری دست یافت (Kalahrodi et al., 2014).

۲۰۱۴ در پژوهشی با هدف بررسی تاثیر افزودن اسانس دانه رازیانه بر پایداری اکسایشی روغن سویا دریافتند که با استفاده از غلظت های ۰/۵



شکل ۲- عدد پارا-آنیزیدین روغن سویا حاوی اسانس چوب و ضد اکساینده سنتزی TBHQ نگهداری شده تحت شرایط تسریع شده به مدت ۲۴ روز

Control: روغن سویا بدون هر گونه افزودنی، so-200: روغن سویا حاوی ۲۰۰ پی پی ام اسانس چوب، so-400: روغن سویا حاوی ۴۰۰ پی پی ام اسانس چوب، so-TBHQ: روغن سویا حاوی ۲۰۰ پی پی ام ضد اکساینده سنتزی TBHQ، so-MIX: روغن سویا حاوی ۱۰۰ پی پی ام اسانس چوب و ۱۰۰ پی پی ام TBHQ

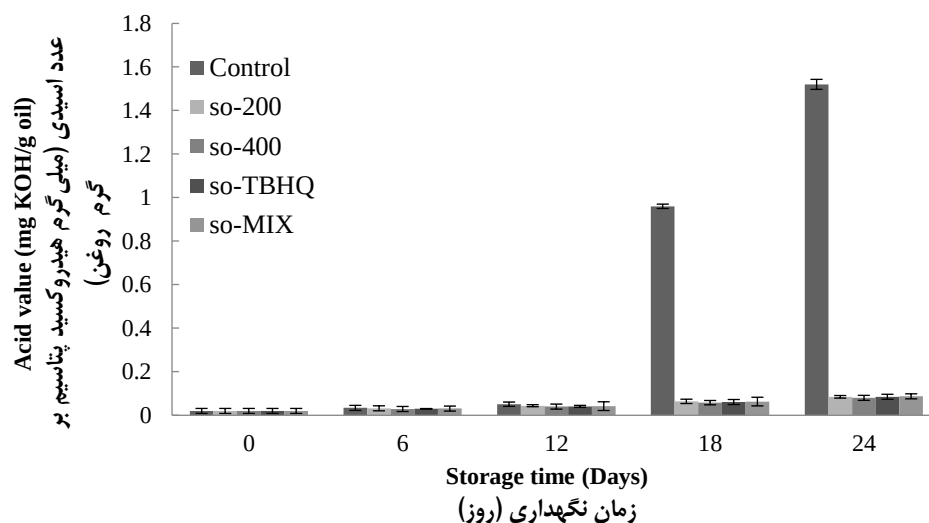
Fig. 2. P-anisidine value of soybean oil containing *F. angulata* essential oil and synthetic antioxidant TBHQ stored under accelerated conditions for 24 days

Control: Soybean oil without any additives, so-200: Soybean oil containing 200 ppm *F. angulata* essential oil, so-400: Soybean oil containing 400 ppm *F. angulata* essential oil, so-TBHQ: Soybean oil containing 200 ppm synthetic antioxidant TBHQ, so-MIX: Soybean oil containing 100 ppm *F. angulata* essential oil and 100 ppm TBHQ.

گرم رسید. افزایش عدد اسیدی به دلیل تبدیل ترکیبات ثانویه ناشی از اکسایش روغن و تبدیل آنها به اسیدهای کربوکسیلیک می باشد. افزودن ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام اسانس اندام هوایی چوب به روغن سویا در پایان دوره نگهداری توانست به ترتیب به میزان ۹۴/۴۱ و ۹۴/۷۴ درصد نسبت به نمونه کنترل از افزایش عدد اسیدی جلوگیری نماید. با توجه به نتایج به دست آمده با افزودن ۲۰۰ پی پی ام اسانس اندام هوایی چوب عدد اسیدی روغن سویا را در پایان دوره نگهداری می توان در حد ضد اکساینده سنتزی TBHQ حفظ کرد. نتایج سایر پژوهش ها حاکی از آن است که با افزودن عصاره گیاه نعناع پالزیوم به روغن کانولا تا غلظت ۸۰۰ پی پی ام (Nasiri Takami et al., 2015) و اسانس نعناع فلفلی به روغن سویا تا غلظت ۸۷۱ پی پی ام، می توان عدد اسیدی را در حد ضد اکساینده های سنتزی حفظ نمود (Keshvari Fard et al., 2020).

اثر افزودن اسانس چوب بر عدد اسیدی روغن سویا طی مدت نگهداری تحت شرایط تسریع شده

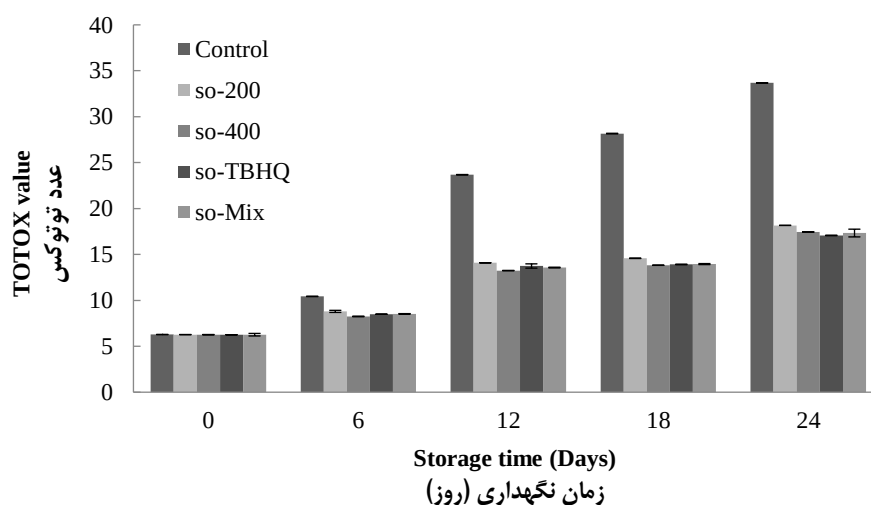
بررسی نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاکی از عدم وجود تفاوت معنی دار بین تیمارهای مورد مطالعه بود ($p > 0.05$) هر چند اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) بین تیمارهای مورد مطالعه با نمونه کنترل وجود داشت. روند تغییرات عدد اسیدی روغن سویا طی مدت نگهداری تحت شرایط تسریع شده در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به شکل ۳ تغییرات قابل ملاحظه ای تا روز ۱۲ نگهداری در عدد اسیدی روغن سویا مشاهده نشد اما از روز ۱۲ به بعد روند تغییرات عدد اسیدی با شدت بیشتری افزایش یافت. این در حالی است که تغییرات عدد اسیدی سایر نمونه های روغن سویا حاوی ضد اکساینده های طبیعی و سنتزی به طور یکسان و با شدت بسیار کمتری افزایش داشت. عدد پراکسید روغن سویا در روز اول نگهداری برابر با 0.2 ± 0.1 میلی گرم هیدروکسید پتاسیم بر گرم بود که در انتهای دوره نگهداری عدد پراکسید نمونه کنترل به 1.52 ± 0.23 میلی گرم هیدروکسید پتاسیم بر



شکل ۳- عدد اسیدی روغن سویا حاوی اسانس چویر و ضد اکساینده سنتزی TBHQ نگهداری شده تحت شرایط تسریع شده به مدت ۲۴ روز
Control: روغن سویا بدون هر گونه افزودنی، so-200: روغن سویا حاوی ۲۰۰ پی پی ام اسانس چویر، so-400: روغن سویا حاوی ۴۰۰ پی پی ام اسانس چویر، so-TBHQ: روغن سویا حاوی ۲۰۰ پی پی ام ضد اکساینده سنتزی TBHQ، so-MIX: روغن سویا حاوی ۱۰۰ پی پی ام اسانس چویر و ۱۰۰ پی پی ام TBHQ

Fig. 3. Acid value of soybean oil containing *F. angulata* essential oil and synthetic antioxidant TBHQ stored under accelerated conditions for 24 days

Control: Soybean oil without any additives, so-200: Soybean oil containing 200 ppm *F. angulata* essential oil, so-400: Soybean oil containing 400 ppm *F. angulata* essential oil, so-TBHQ: Soybean oil containing 200 ppm synthetic antioxidant TBHQ, so-MIX: Soybean oil containing 100 ppm *F. angulata* essential oil and 100 ppm TBHQ.



شکل ۴- عدد توتوکس روغن سویا حاوی اسانس چویر و ضد اکساینده سنتزی TBHQ نگهداری شده تحت شرایط تسریع شده به مدت ۲۴ روز
Control: روغن سویا بدون هر گونه افزودنی، so-200: روغن سویا حاوی ۲۰۰ پی پی ام اسانس چویر، so-400: روغن سویا حاوی ۴۰۰ پی پی ام اسانس چویر، so-TBHQ: روغن سویا حاوی ۲۰۰ پی پی ام ضد اکساینده سنتزی TBHQ، so-MIX: روغن سویا حاوی ۱۰۰ پی پی ام اسانس چویر و ۱۰۰ پی پی ام TBHQ

Fig. 4. TOTOX value of soybean oil containing *F. angulata* essential oil and synthetic antioxidant TBHQ stored under accelerated conditions for 24 days

Control: Soybean oil without any additives, so-200: Soybean oil containing 200 ppm *F. angulata* essential oil, so-400: Soybean oil containing 400 ppm *F. angulata* essential oil, so-TBHQ: Soybean oil containing 200 ppm synthetic antioxidant TBHQ, so-MIX: Soybean oil containing 100 ppm *F. angulata* essential oil and 100 ppm TBHQ.

رازیانه می‌توان به بالاترین میزان جلوگیری از تولید محصولات اولیه و ثانویه اکسایش در روغن سویا دست یافت.

نتیجه‌گیری

پایداری اکسایشی روغن‌های گیاهی حاوی مقادیر زیاد اسیدهای چرب غیر اشباع نظیر روغن سویا مشکل است. یافتن جایگزین طبیعی برای ضد اکساینده‌های سنتزی که برای رفع مشکل عدم پایداری روغن‌های غیر اشباع بکار می‌روند از چالش‌های مهم در این زمینه محسوب می‌شود. بر اساس نتایج پژوهش حاضر اسانس اندام هوایی چویر با حداقل غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام توانست با موفقیت پیشرفت اکسایش روغن سویا را حین دوره نگهداری به تأخیر بیاورد. هیچ گونه اثر سینرژیستی و یا آنتاگونیستی با افزودن مخلوط اسانس چویر و ضد اکساینده سنتزی TBHQ بر پایداری اکسایشی روغن سویا مشاهده نگردید. در نتیجه اسانس اندام هوایی چویر خشک شده به روش انجمادی را می‌توان به‌عنوان جایگزین طبیعی ضد اکساینده سنتزی TBHQ برای پایداری‌سازی روغن سویا پیشنهاد نمود.

اثر افزودن اسانس چویر بر عدد توتوکس روغن سویا طی مدت نگهداری تحت شرایط تسریع شده

عدد اکسایش کل یا توتوکس روغن سویا بر اساس عدد پراکسید و عدد پارا-آنیزیدین به‌عنوان محصولات اولیه و ثانویه اکسایش روغن محاسبه شد بنابراین نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده مراحل اولیه و ثانویه اکسایش و یا به عبارتی نشان‌دهنده روند فساد اکسیداتیو در روغن خواهند بود (O'Keefe & Pike, 2010). بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت ($p > 0.05$) هر چند تیمارهای مورد مطالعه با نمونه کنترل اختلاف معنی‌دار داشتند ($p < 0.05$) روند تغییرات عدد توتوکس روغن سویا طی ۲۴ روز نگهداری تحت شرایط تسریع شده در شکل ۴ نشان داده شده است. در پایان دوره نگهداری عدد توتوکس در نمونه کنترل روغن سویا به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) بالاتر از نمونه‌های روغن سویا حاوی ترکیبات ضد اکساینده بود. کاهش عدد توتوکس با افزودن اسانس اندام هوایی چویر می‌تواند به دلیل کارایی آن در به تأخیر انداختن تشکیل هیدروپراکسیدها باشد. مظاهری کله‌رودی و همکاران (Kalahrodi et al., 2014) دریافتند با افزودن ۰/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسانس دانه

منابع

1. Ai-li, J., & Chang-hai, W. (2006). Antioxidant properties of natural components from *Salvia plebeia* on oxidative stability of ascidian oil. *Process Biochemistry*, 41, 1111–1116 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.001>
2. AOCS, Official Methods and Recommended Practices of American Oil Chemists' Society Edited by David Firestone, (1990). Washington, DC, USA.
3. Azarbani, F., Saki, Z., Zareei, A., & Mohammadi, A. (2014). Phenolic content, antibacterial and antioxidant activities of flower, leaf and stem extracts of *ferulago angulata* (schlecht.) boiss. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(10), 123–125.
4. Chen, X.Q., Zhang, Y., Zu, Y.G., Yang, L., Lu, Q., & Wang, W. (2014). Antioxidant effects of rosemary extracts on sunflower oil compared with synthetic antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 385–391. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12311>
5. Darderafshi, M.J., Bahrami, G.H., Sadeghi, E., Khanahmadi, M., Mohammadi, M., & Mohammadi, R. (2014). The effect of *Ferulago angulata* essential oil on *Staphylococcus aureus* during the manufacture and preservation of Iranian white cheese. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 8(4), 13-20. <http://nsft.sbm.ac.ir/article-1-1493-en.html>
6. Dobarganes, M.C., & Velasco, J. (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 420–428. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200207\)104:7<420::AID-EJLT420>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200207)104:7<420::AID-EJLT420>3.0.CO;2-N)
7. Dehghan, B., Esmailzadeh Kenari, R., & Raftani Amiri, Z. (2019). Investigate the antioxidant properties of orange peel essential oil (*Citrus sinensis*) on the stability of soybean oil during storage conditions. *Food Technology and Nutrition*, 16(3), 73-91.
8. Doleschall, F., Kemeny, Z., Recseg, K., & Kovari, K. (2002). A new analytical method to monitor lipid peroxidation during bleaching. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 14–18. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200201\)104:1<14::AID-EJLT14>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200201)104:1<14::AID-EJLT14>3.0.CO;2-J)
9. Eghbalian Rad, M., Sari, A.A., & Daraei Garmakhany, A. (2018). Thermal stability optimization of the Soybean oil affected by *Thymus daenensis* Celak essential oil by use of response surface methodology. *Journal of Food Hygiene*, 8(32), 77-107.
10. Ghasemi Pirbalouti, A., Sedaghat, L., Hamed, B., & Tirgir, F. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of three endemic medicinal plants of Iran. *Bangladesh Journal of Botany*, 42, 327–332. <https://doi.org/10.3329/bjb.v42i2.18038>

11. Ghezelsflo, M., & Sayyed-Alangi, S.Z. (2017). Effect of *Kelussia Odoratissima* Mozaffarian leaves essential oil on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Research*, 26(4), 681-694.
12. Hashemi, Z., Hojjati, M., & Tahanejad, M. (2015a). Evaluation of antioxidant activity of *Ferula gummosa* Boiss essential oil in frying oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 11(5), 631-642.
13. Hashemi, Z., Hojjati, M., & Tahanejad, M. (2015b). Evaluation of antioxidant activity of essential oil from *Citrus aurantium* leaf compared with TBHQ in edible oil. *Innovative Food Technologies*, 2(2), 43-57.
14. Hassanpouraghdam, M.B., Hassani, A., Vojodi, L., & Farsad-Akhtar, N. (2010). Drying method affects essential oil content and composition of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(6), 759-766. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643892>
15. Haznedaroglu, M.Z., Karabay, N.U., & Zeybek, U. (2001). Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia*, 72(7), 829-831. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00335-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00335-5)
16. Hemmati, A., Ganjloo, A., Varmira, K., & Bimakr, M. (2021). Influence of different drying methods on extraction yield, chemical compositions, total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of essential oil from aerial parts of *Ferulago angulata* Boiss. *FSCT*, 18(117), 119-132. <http://fsct.modares.ac.ir/article-7-51504-en.html>
17. Hosseini, N., Salehi Arjmand, H., Malekirad, A.A., & Akramian, M. (2011). Variation in the essential oil content and composition of flowers of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Bioss. populations growing wild in Iran: In 42nd International Symposium on Essential Oils.
18. Iqbal, S., & Bhangar, M.I. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100, 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.049>
19. Jeong, S., Kim, S., Kim, D., Jo, S., Nam, K., Ahn, D., & Lee, S. (2004). Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts of citrus peels. *Food Chemistry*, 52, 3389-3393. <https://doi.org/10.1021/jf049899k>
20. Kanner, J., Gorelik, S., Roman, S., & Kohen, R. (2012). Protection by polyphenols of post prandial human plasma and low density lipoprotein modification: The stomach as a bioreactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8790-8796. <https://doi.org/10.1021/jf300193g>
21. Keshvari Fard, F., Mokhtarian, M., & Tavakolipour, H. (2020). Evaluation of the effects of peppermint essential oil (*Mentha piperita*) on oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 12(1), 81-94. <https://doi.org/10.22069/EJFPP.2020.14431.1463>
22. Kozłowska, M., & Gruczyńska, E. (2018). Comparison of the oxidative stability of soybean and sunflower oils enriched with herbal plant extracts. *Chemical Papers*, 72, 2607-2615. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0516-5>
23. Mazaheri Kalahrodi, M., Bassiri, A., & Jalali, H. (2014). Evaluation of antioxidant properties of essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare*) and its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Iranian Journal of Biosystem Engineering*, 45(2), 131-139. <https://doi.org/10.22059/IJBSE.2014.52641>
24. Moghaddam, M., Mehdizadeh, L., Mirzaei Najafgholi, H., & Ghasemi Pirbalouti, A. (2018). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of seed essential oil of *Ferulago angulata*. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 158-170. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1437626>
25. Mohammadi, A., & Arabshahi-Delouee, S. (2017). Evaluation of active components and antioxidant activity of essential oil of *Boswellia serrata*. *JFST*, 14(63), 107-117. <http://fsct.modares.ac.ir/article-7-100-en.html>
26. Mozafarian, V. (1983). The family of umbelliferae in Iran, key and distribution. Research Institute and Ranglands, Tehran, Iran, 35, 387.
27. Mozafarian V. (2008). *Encyclopedia of Iranian plants*. Tehran, Iran: Farhang Moaser Publisher.
28. Mollaei, S., Sedighi, F., Habibi, B., Hazrati, S., & Asgharian, P. (2019). Extraction of essential oils of *Ferulago angulata* with microwave-assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 137, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.015>
29. Nasiri Takami, S.T. (2015). The antioxidant effect of *mentha pulegium* extracts on the stability of canola oil during storage conditions. *Journal of Applied Environment and Biological Science*, 4(11), 112-117.
30. Nyam, K.L., Wong, M.M., Long, K., & Tan, C.P. (2013). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with kenaf seed extract, roselle seed extract and roselle extract, respectively under accelerated storage. *International Food Research Journal*, 20(2), 695-701.
31. O'Keefe, S.F., & Pike, O.A. (2010). *Fat characterization* In: S.S.Nielsen. (Ed.), Food Analysis (4th ed.). New York, NY, USA: Springer Science and Business Media.
32. Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
33. Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Orozco-Ibarra, M., & Pérez-Rojas, J.M. (2008). Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3227-3239. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.024>

34. Pizarro, C., Esteban-Díez, I., Rodríguez-Tecedor, S., & González-Sáiz, J.M. (2013). Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application of the stepwise orthogonalization of predictors to mid-infrared spectra. *Food Control*, 34, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.025>
35. Ghasempour, H.R., Shirinpour, E., & Heidari, H. (2007). Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of essential oil from seeds and aerial parts of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss gathered in Nevakoh and Shahoo, Zagross Mountain, West of Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(5), 814-817. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.814.817>
36. Sadeghi, E., Mahtabani, A., Etminan, A., & Karami, F. (2016). Stabilization of soybean oil during accelerated storage by essential oil of *ferulago angulata* boiss. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 1199–1204. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2078-7>
37. Samadloiy, H.R., Azizi, M.H., & Barzegar, M. (2008). Physico-chemical quality of seeds of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran and antioxidative activity of their phenolic component, *Journal of Food Scientist Technology*, 45, 190-192.
38. Shahbazi, Y., Shavisi, N., Karami, N., & Kakaei, S. (2015). Chemical composition and *in Vitro* antibacterial activity of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss essential oil. *Pharmaceutical Sciences*, 21, 6-11. <https://doi.org/10.15171/PS.2015.10>
39. Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drum sticktree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Food Chemistry*, 51, 4113–4117. <https://doi.org/10.1021/jf020444+>
40. Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
41. Song, H.S., Ukeda, H., & Sawamura, M. (2001). Antioxidative activities of Citrus peel essential oils and their components against linoleic acid oxidation. *Food Science and Technoogy. Research*, 7, 50–56. <https://doi.org/10.3136/fstr.7.50>
42. Taran, M., Ghasempour, H.R., & Shirinpour, E. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of *ferulago angulata* subsp. *Carduchorum*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 3(1), 10-14.
43. Xie, J.H., Shen, M.Y., Xie, M., Nie, S., Chen, Y., & Li, C. (2012). Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 89, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.068>
44. Yim, H.S., Chye, F.Y., Liow, M.L., & Ho, C.W. (2013). Antioxidant potential of *Pleurotus porrigens* extract and application in sunflower oil during accelerated storage. *Chiang Mai Journal of Science*, 40(1), 34-48.
45. Ying, Z., Lei, Y., Yuangang, Z., Xiaoqiang, C., Fuji, W., & Fang, L. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118, 656–662. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.038>
46. Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)



Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Nanoemulsion of *Citrus paradisi* Essential Oil Against Pathogenic Microorganisms: *In Vitro* Study

H. Zanganeh¹, F. Shahidi², S.A. Mortazavi^{3*}, B. Alizadeh Behbahani⁴

Received: 2021.07.26

Revised: 2021.09.07

Accepted: 2021.09.12

Available Online: 2021.09.15

How to cite this article:

Zanganeh, H., Shahidi, F., Mortazavi, S.A., & Alizadeh Behbahani, B. (2023). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of nanoemulsion of *Citrus paradisi* essential oil against pathogenic microorganisms: *in vitro* study. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 415-425. (In Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.71660.1074>

Introduction

Oxidation reactions and microorganisms' activity are considered as the most important factors affecting the quality of food products. Recently, in the light of the inefficiency of some chemical preservatives against microorganisms and the presence of toxic residues in food products, the use of natural antimicrobials and antioxidants has been increased. Natural antimicrobial compounds have the potential to control microbial contamination and reduce the use of antibiotics. Plant essential oils are natural compounds with the potential to be used as active ingredients in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. Various studies have shown that essential oils have antifungal, antibacterial, antiviral, and antioxidant activity. The essential oils are considered as superb preservatives with various biological functions. Essential oils are generally recognized as safe product (GRAS) which can be used as an alternative to synthetic additives.

Grapefruit (*Citrus paradisi*) peel and fruit contain active ingredients such as acids, flavonoids, vitamin C, and potassium, and its essential oil is composed of terpenic hydrocarbons, such as citral, limonene, citronelal, and geraniol. Although plant essential oils have antimicrobial and antioxidant properties, one of the main problems of these natural compounds is their high volatility and instability. In this context, nanoemulsion formulations are frequently used to increase the stability and efficiency of these biologically active compounds. This study is therefore aimed to nanoemulsify the grapefruit essential oil and evaluate its antioxidant and antimicrobial properties.

Materials and Methods

β -carotene, linoleic acid, ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (USA). Mueller Hinton Broth (MHB) and Mueller Hinton Agar (MHA) were supplied from Merck Co. (Darmstadt, Germany). Grapefruit peel was dried at ambient temperature and then powdered. The obtained powder was then transferred to a Clevenger device containing 750 ml of distilled water to perform the distillation extraction (3 h). The resulting grapefruit essential oil was stored at 4 °C until use. Grapefruit essential oil was prepared using the hydrodistillation method, and then nanoemulsified. The antioxidant activity of the nanoemulsified essential oil was investigated by DPPH and ABTS radical scavenging activity and beta-carotene/linoleic bleaching test. The nanoemulsified essential oil or methanolic (control) was mixed with DPPH solution and the mixture was then stored at ambient temperature for 30 min, in a dark place. The control sample was

1, 2 and 3- Ph.D. Student and Full Professors, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran, respectively.

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

4- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

DOI: [10.22067/ifstrj.2021.71660.1074](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.71660.1074)

prepared by methanol. The absorbance of the samples was measured at 517 nm. To determine the ABTS-RS activity, the nanoemulsified essential oil was briefly charged with methanolic ABTS radical cation solution and the resulting mixture was left at room temperature for 30 min. Afterward, the absorbance was read at 734 nm. A spectrophotometric method was applied to monitor β -carotene/linoleate solution bleaching in the presence of the nanoemulsified essential oil. To do this, the absorbance of the solution was recorded at 490 nm after 120 min against the control sample at time zero and after 120 min. Antibacterial effect of the grapefruit essential oil nanoemulsion was also evaluated against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 23857, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, based on disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration.

Results and Discussions

The results showed that the nanoemulsion of grapefruit essential oil had a remarkable antioxidant effect of 42.27 mg/ml, 33.27 mg/ml and 54.54%, respectively, based on DPPH, ABTS, and beta-carotene-linoleic acid bleaching tests. According to disk diffusion agar and well diffusion agar results, the lowest inhibition zone was related to *E. coli* and the highest inhibition zone was observed in *L. innocua*. The minimum inhibitory concentration for *L. innocua* and *S. aureus* (the most sensitive bacteria) was 25 mg/ml, and *E. coli*, *S. typhi*, and *P. aeruginosa* had the highest inhibitory concentration. Also, the lowest bactericidal concentration was related to *L. innocua* and *S. aureus* bacteria and the highest concentration was observed for *E. coli*, *S. typhi* and *P. aeruginosa*. The nanoemulsified essential oil generally exhibited greater antibacterial activity against Gram-positive species. This could be mainly due to the difference in the cell wall composition of Gram-positive bacteria in comparison to Gram-negative; Gram-positive bacteria have a thicker mucopeptide layer in their cell wall, while Gram-negative bacteria have only a thin layer of mucopeptide and the wall structure is mainly composed of lipoprotein and lipopolysaccharide, thereby leading to a higher resistant to antibacterial agents. According to the results, grapefruit essential oil nanoemulsion can be used as a natural antioxidant and antimicrobial agent to control oxidation reactions and the growth of spoilage and pathogenic microorganisms.

Keywords: Antimicrobial activity, Antioxidant effect, Grapefruit essential oil, Nanoemulsion

مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا: یک مطالعه آزمایشگاهی

حسین زنگانه^۱ - فخری شهیدی^۲ - سیدعلی مرتضوی^{۳*} - بهروز علیزاده بهبهانی^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۱

چکیده

در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت (برحسب درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و رنگبری بتاکاروتن-لینولئیک اسید) و اثر ضد میکروبی آن در برابر باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد *Escherichia coli*، *Salmonella typhi*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Listeria*، *Staphylococcus aureus*، *innocua*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus* و *Streptococcus pyogenes* بر اساس روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار و حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی بررسی گردید. نتایج نشان داد که نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قابل توجه ۴۲/۲۷ میلی گرم در میلی لیتر، ۳۳/۲۷ میلی گرم در میلی لیتر و ۵۴/۵۴ درصد به ترتیب برحسب آزمون‌های مهار رادیکال DPPH، ABTS و رنگبری محلول بتاکاروتن-لینولئیک اسید می‌باشد. با توجه به نتایج، کمترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری *E. coli* و بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد در باکتری *L. innocua* مشاهده گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های *L. innocua* و *S. aureus* (حساس‌ترین باکتری‌ها) برابر با ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بود و باکتری‌هایی مانند *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa* بیشترین غلظت مهارکنندگی (۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) را به خود اختصاص دادند. همچنین کمترین غلظت کشندگی (۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) مربوط به باکتری‌های *L. innocua* و *S. aureus* و بیشترین مقدار آن (بیش از ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) مربوط به *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa* بود. مطابق نتایج، نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت را می‌توان بعنوان ترکیب طبیعی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی جهت کنترل واکنش‌های اکسیداسیون و رشد میکروارگانیسم‌های مولد فساد و پاتوژن استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اثر آنتی‌اکسیدانی، اسانس گریپ‌فروت، فعالیت ضد میکروبی، نانوامولسیون

مقدمه

داده است. ترکیبات ضد میکروبی طبیعی قادر به کنترل آلودگی‌های میکروبی، کاهش میزان استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی و افزایش ماندگاری و تقویت ایمنی سلول‌ها می‌باشند (Noshad et al., 2020). اسانس‌های گیاهی ترکیبات طبیعی می‌باشند که در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی کاربرد گسترده‌ای دارند. در پژوهش‌های مختلف نشان داده شده است که اسانس‌ها دارای فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی،

واکنش‌های اکسیداسیون و فعالیت میکروارگانیسم‌ها از جمله عوامل مهم در کاهش کیفیت مواد غذایی می‌باشند. امروزه عدم تأثیر برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی بر تعدادی از میکروارگانیسم‌ها و وجود بقایای سموم شیمیایی در محصولات غذایی و همچنین اثرات سرطان‌زای این ترکیبات، استفاده از مواد ضد میکروبی طبیعی را افزایش

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادان، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*)- نویسنده مسئول: Email: morteza@um.ac.ir

۴- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

(Masoumi et al., 2016) گزارش کردند که نانوامولسیون‌های آویشن شیرازی می‌تواند به عنوان یک ماده ضد میکروبی در برابر باکتری *Escherichia coli* O157: H7 مطرح شود (Masoumi et al., 2016). در پژوهش قره‌نقده و همکاران (Gharehaghadeh et al., 2017) بیان شده است که نانوامولسیون‌های اسانس مریم‌گلی در مقایسه با اسانس در حالت آزاد بر روی تمامی باکتری‌های مورد مطالعه از جمله *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* و *Moraxella catarrhalis* دارای اثر ضد میکروبی بیشتری می‌باشد (Gharehaghadeh et al., 2017). همچنین گزارش شده است که فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن دناپی در برابر باکتری *E. coli* هنگامی که به نانوامولسیون تبدیل می‌شود، به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد، که به سهولت دسترسی اسانس به سلول‌های باکتری نسبت داده می‌شود (Moghim et al., 2016). با توجه به ترکیبات مؤثره موجود در اسانس گریپ‌فروت و ناپایداری این ترکیبات، در این پژوهش نانوامولسیون اسانس این گیاه تهیه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی DPPH[•]، ABTS^{•+}، بتاکارتن و لینولئیک اسید از شرکت سیگما (آمریکا) و محیط‌های کشت مولر هینتون آگار، مولر هینتون برات، دیسک بلانک و محلول تری‌فنل‌تترازولیم از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند.

سویه‌های میکروبی

باکتری‌های مورد مطالعه در این پژوهش شامل *Escherichia coli* ATCC 25922، *Salmonella typhi* ATCC 6539، *Listeria* ATCC 27853، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Staphylococcus aureus* ATCC 33090، *innocua* ATCC 33090، *Bacillus subtilis* ATCC 25923، *Bacillus cereus* ATCC 14579، *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615، ATCC 23857 و *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 بودند که از مجموعه میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند.

تهیه اسانس گریپ‌فروت

پس از آسیاب ۵۰۰ گرم گریپ‌فروت تازه (مشهد، ایران)، اسانس آن از طریق روش تقطیر با آب در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد با کمک

ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانی بوده که این ویژگی‌ها استفاده از این ترکیبات را به عنوان افزودنی‌های ضد میکروبی به منظور افزایش ماندگاری نوشیدنی‌ها و مواد غذایی افزایش داده است (Ahmadi et al., 2020).

گیاه گریپ‌فروت (*Citrus paradisi*) از خانواده مرکبات می‌باشد که در شمال و جنوب ایران یافت می‌شود. این گیاه همچنین در مجمع الجزایر مالاکا، کالیفرنیا، فلوریدا و هند نیز کشت می‌شود. این درخت دارای تنه‌ای منشعب، برگ‌های ساده، سبز و معطر، گل‌های تقریباً بزرگ، سفید، معطر و میوه‌های کروی آبدار به رنگ زرد یا لیمویی با طعمی ترش و مقداری تلخ می‌باشد. پوست و میوه گریپ‌فروت حاوی ترکیبات فعالی مانند اسیدها، فلاونوئیدها، ویتامین C و پتاسیم بوده و اسانس آن از هیدروکربن‌های ترپنی مانند سیترال، لیمونن، سیترونال و ژرانیول تشکیل شده است (Mesgarpour et al., 2002). در مطالعه یانگ و همکاران (Yang et al., 2010) اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس گریپ‌فروت گزارش شده است. همچنین خاصیت ضد میکروبی اسانس این گیاه در مطالعه آلوز و همکاران (Alves et al., 2015) بررسی و تأیید شده است.

با وجود خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی از مشکلات عمده این ترکیبات طبیعی فراریت بالا و به دنبال آن ناپایداری آن‌ها می‌باشد. از جمله راه‌های مقابله با این مشکل استفاده از فرمولاسیون نانوامولسیون بوده که استفاده از این فناوری منجر به افزایش چشم‌گیر پایداری و کارایی این ترکیبات می‌شود (Heydari & Bagheri, 2018). نانوامولسیون‌ها ذرات با اندازه ۱۰۰-۱۰۰۰ نانومتر می‌باشند که به دو گروه شفاف (ذراتی به اندازه ۲۰۰-۵۰۰ نانومتر) و غیر شفاف (ذراتی تا ۵۰۰ نانومتر) تقسیم می‌شوند. بر اساس درصد وزنی فازهای تشکیل‌دهنده در دو گروه روغن در آب^۱ و آب در روغن^۲ جای می‌گیرند (Poorhasan et al., 2012). نانوامولسیون‌ها دارای پایداری سینتیکی بالایی بوده و از روش‌های مختلف مانند روش خود به خودی و تغییر فاز، هموژنایزر و امواج اولتراسوند جهت تولید آن‌ها استفاده می‌شود (Erfani et al., 2019). نانوامولسیون‌ها به دلیل حل کردن ترکیبات غیرقطبی و ایجاد پیوندهای کوالانسی ترکیبات غیر قطبی بیشتری داشته و با افزایش نسبت سطح به حجم قطرات توانایی بیشتری در ریزپوشانی ترکیبات مؤثر در تولید عطر و طعم را دارا می‌باشند. نانوامولسیون‌ها ابزاری مناسب جهت ریزپوشانی و اثرپذیری ترکیبات ضد باکتری می‌باشند و مکانیسم اثر ضد باکتریایی آن‌ها به عوامل مختلف مانند ماهیت ضد باکتری اسانس مورد استفاده در ساختار آن‌ها بستگی دارد (Javanshir et al., 2020). معصومی و همکاران

3- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

4- 2,2- azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

1- Oil in Water (o/w)

2- Water in Oil (w/o)

روش رنگبری بتاکاروتن-لینولئیک اسید

این روش بر اساس جلوگیری از اکسیداسیون لینولئیک اسید و رنگبری بتاکاروتن با استفاده از رادیکال‌های آزاد که توانایی تولید ترکیبات فرار و هیدروپراکسیدهای کائوچو را دارا هستند، می‌باشد. در این آزمون، نانوامولسیون اسانس گریپ فروت با محلول بتاکاروتن/لینولئیک اسید مخلوط و پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه درصد بازدارندگی طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Noshad et al., 2020):

$$100 = [(AA_{120} - AC_{120}) / (AC_0 - AC_{120})] \times 100 (\%)$$

در این رابطه AA_{120} جذب نانوامولسیون اسانس و AC_{120} جذب نمونه کنترل در زمان صفر می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس

سویه‌های میکروبی لیوفیلیزه به منظور احیاء و تکثیر در شرایط استریل به محیط کشت مولر هینتون براث اضافه شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری صورت پذیرفت. در ادامه، سویه‌های میکروبی روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار جهت بدست آوردن کشت تازه بصورت خطی کشت داده شدند. گرمخانه‌گذاری تحت شرایط فوق تکرار گردید (۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و سوسپانسیون‌های باکتریایی از کشت تازه (۲۴ ساعته) و مطابق با استاندارد نیم مک فارلند (Colony Forming Unit/mL $\times 10^8 \times 1/5$) در سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2019). در نهایت آزمون‌های زیر جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس گریپ فروت انجام شدند.

روش دیسک دیفیوژن آگار

ابتدا دیسک‌های بلانک به مدت ۲۰ دقیقه در نانوامولسیون اسانس (استریل شده به کمک فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون) نگهداری شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون استاندارد باکتری‌ها روی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار کشت سطحی داده شد. در مرحله بعد دیسک‌های آغشته به نانوامولسیون اسانس روی محیط تثبیت گردید. پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. از دیسک بدون آنتی‌بیوتیک و اسانس بعنوان کنترل استفاده گردید (Behbahani et al., 2018).

دستگاه کلونجر استخراج گردید. پس از حذف آب اضافی اسانس استخراج شده با استفاده از Na_2SO_4 خشک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Lou et al., 2017).

تهیه نانوامولسیون‌های اسانس گریپ فروت

نانوامولسیون‌های اسانس گریپ فروت با مخلوط کردن اسانس گریپ فروت با توئین ۸۰ و آب با نسبت‌های ۸۹:۱۰ وزنی/وزنی با استفاده از اولتراسونیک هموژنایزر در مدت ۱۵ دقیقه، دامنه ۷۲ میکرومتر، قدرت ۵۰۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز تهیه گردید (Özogul et al., 2021).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون اسانس

روش مهار رادیکال آزاد DPPH

در ابتدا ۱ میلی‌لیتر نانوامولسیون اسانس یا متانول (بعنوان نمونه کنترل) با ۳ میلی‌لیتر معرف DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای محیط قرار داده شد. سپس جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت گردید. از فرمول زیر جهت محاسبه فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH نانوامولسیون اسانس استفاده شد (Tanavar et al., 2020):

[جذب نمونه کنترل / (جذب نانوامولسیون اسانس - جذب نمونه کنترل $\times 100$)] = فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد

نتایج این آزمون بر حسب IC_{50} (غلظتی از نانوامولسیون اسانس که سبب مهار ۵۰ درصد از رادیکال آزاد DPPH می‌شود) گزارش گردید.

روش مهار رادیکال آزاد ABTS

رادیکال‌های آزاد ABTS از طریق اضافه کردن پتاسیم پرسولفات به محلول آبی ABTS با غلظت ۷ میلی‌مولار و رسیدن غلظت نهایی به ۲/۴۵ میلی‌مولار تهیه شد. سپس محلول به دست آمده به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق و در محلی تاریک نگهداری شد. در مرحله بعد رقیق‌سازی کاتیون رادیکال $ABTS^+$ تا رسیدن به جذب 0.7 ± 0.2 در طول موج ۷۳۴ نانومتر انجام شد. در پایان ۳ میلی‌لیتر از محلول رادیکالی ABTS با ۳۰ میکرولیتر از نانوامولسیون اسانس گریپ فروت مخلوط و پس از ۶ دقیقه جذب نمونه اندازه‌گیری شد. همانند روش مهار رادیکال آزاد DPPH در این روش نیز نتیجه بر حسب IC_{50} گزارش گردید (Majdi et al., 2021).

روش چاهک آگار

۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (معادل نیم مک فارلند) در سطح محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از نانومولسیون تهیه شده در درون چاهک‌های ایجاد شده ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله‌های عدم رشد اطراف چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (Mehrnia et al., 2021).

روش حداقل غلظت مهارکنندگی

پس از تهیه رقت‌های متوالی از نانومولسیون اسانس گریپ‌فروت با استفاده از محیط کشت مولر هینتون برات (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در میلی‌لیتر)، ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک فارلند) اضافه گردید. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر معرف تری فنل تترازولیوم ۰/۵ درصد وزنی/حجمی اضافه و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری انجام شد. در انتها کمترین غلظتی که در آن هیچ‌گونه تغییر رنگی (قرمز تیره یا ارغوانی) مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید (Behbahani et al., 2019).

حداقل غلظت کشندگی

جهت تعیین نتایج این آزمون، از چاهک‌های فاقد رنگ قرمز تیره یا ارغوانی در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی، ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت‌های حاوی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار به صورت سطحی کشت داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اولین غلظت فاقد رشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش گردید (Noshad et al., 2021).

آنالیز آماری

آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شدند. نتایج بصورت "انحراف معیار ± میانگین" گزارش و نتایج بدست آمده با کمک نرم‌افزار SPSS آنالیز گردید. مقایسه میانگین نتایج توسط آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) بررسی شد.

نتایج و بحث

متابولیت‌های گیاهی با مهار یا نابودی رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال اثر محافظتی در برابر آسیب اکسیداتیو نشان می‌دهند.

بنابراین، آنتی‌اکسیدان‌های حاصل از محصولات طبیعی می‌توانند در درمان یا مهار بیماری‌های حاصل از استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرند و تا حدودی یا به طور کامل جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی شوند (Seibert et al., 2019). جدول ۱ نشان می‌دهد که در هر ۳ روش به کار گرفته شده جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانومولسیون گریپ‌فروت، ترکیب از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردار است. به گونه‌ای که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و مهار رادیکال آزاد ABTS بر حسب IC_{50} به ترتیب برابر با ۴۲/۲۷ میلی گرم در میلی لیتر و ۳۳/۲۷ میلی گرم در میلی لیتر و در روش رنگ‌بری بتاکاروتن - لینولئیک اسید برابر با ۵۴/۵۴ درصد می‌باشد. بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی و شیمیایی اسانس گریپ‌فروت نشان داد که این اسانس در روش مهار رادیکال DPPH دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد (Denkova-Kostova et al., 2021). اگرچه تمام ترکیبات موجود در اسانس‌های گیاهی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند، با این حال فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها به طور قابل توجهی متفاوت است، به گونه‌ای که در بین اسانس‌های مورد مطالعه توسط میشارینا و همکاران (Misharina et al., 2008) شامل لیمو، گریپ‌فروت، گشنیز و میخک کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اسانس گریپ‌فروت مشاهده شد. تفاوت در خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی تحت تأثیر شرایط اکولوژی مؤثر در رشد گیاه مانند دما، طول و عرض جغرافیایی، رطوبت، ارتفاع، خاک و اقلیم می‌باشد (Barzegar et al., 2019). نانومولسیون‌ها راهی مناسب جهت رفع مشکل حلالیت پایین اسانس‌های گیاهی می‌باشند و فعالیت آن‌ها به دلیل پخش‌پذیری، پایداری و نفوذ بهتر بهبود می‌یابد (Lou et al., 2017). گزارش شده است که با استفاده از روش‌های مختلف ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی از جمله مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS نانومولسیون‌های اسانس *Citrus limonum* دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مقایسه با اسانس تولیدی می‌باشد (Kaur et al., 2020). مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس خالص گونه‌ای از خانواده مرکبات (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) و نانومولسیون‌های تولیدی از آن با استفاده از روش‌های قدرت احیاء کنندگی آهن و مهار رادیکال DPPH نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای نانومولسیون‌های تولیدی در مقایسه با اسانس بود (Lou et al., 2017). در بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی نانومولسیون‌های اسانس شویید مشخص گردید که نانومولسیون‌های تولیدی دارای پتانسیل خوبی جهت مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS بوده و گزارش شد که نانومولسیون‌های تولیدی توانایی تبدیل به روشی جهت درمان بیماری‌های حاصل از استرس اکسیداتیو را دارا می‌باشند (Tavakkol Afshari et al., 2019).

جدول ۱- نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون اسانس گریپ فروت

Table 1- The results of antioxidant activity of grapefruit essential oil nanoemulsion

Beta-carotene/linoleic acid (%) (%) بتا-کاروتن/لینولئیک اسید	ABTS (IC ₅₀ : mg/ml)	DPPH (IC ₅₀ : mg/ml)
54.54 ± 0.66	33.27 ± 0.64	42.27 ± 0.59

که این باکتری گرم مثبت حساسیت بالایی در برابر نانوامولسیون اسانس گریپ فروت دارد. کمترین و بیشترین قطر هاله‌های عدم رشد در روش چاهک آگار نیز به ترتیب در باکتری‌های *E. coli* و *L. innocua* مشاهده می‌شود. با این حال مقادیر بیشتر قطر هاله‌های عدم رشد در روش چاهک آگار در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن می‌تواند به دلیل تماس مستقیم نانوامولسیون اسانس با باکتری‌ها در روش چاهک آگار و در نتیجه اثر بخشی بیشتر آن باشد. در حالی که در روش دیسک دیفیوژن ترکیب ضد میکروبی پس از گذشتن از سطح دیسک های بلانک اثر خود را روی باکتری‌ها نشان می‌دهد که در این میان فاکتورهایی مانند قطر، ضخامت، دما و زمان غوطه‌وری دیسک بر نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن مؤثر می‌باشد (Behbahani et al., 2018).

ترکیبات ضد میکروبی گیاهی از طریق مکانیسم‌های مختلفی قادر به مهار باکتری‌ها بوده و از این رو در نابودی سوبه‌های میکروبی مقاوم بسیار ارزشمند می‌باشند (Yazdi et al., 2013). نتایج حاصل از آزمون‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار در جدول ۲ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که در هر دو روش قطر هاله بازدارندگی ناشی از نانوامولسیون اسانس گریپ فروت در باکتری *S. aureus* با *S. epidermidis* و در باکتری *B. cereus* با *B. subtilis* فاقد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر می‌باشند، در حالی که در سایر باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود. با توجه به جدول در روش دیسک دیفیوژن آگار کمترین میزان قطر هاله عدم رشد (۷/۳۰ میلی‌متر) مربوط به باکتری *E. coli* بوده که نشان از مقاومت بالای این باکتری گرم منفی در برابر نانوامولسیون تولیدی می‌باشد. همچنین بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد (۱۳/۵۰ میلی‌متر) در باکتری *L. innocua* نشان می‌دهد

جدول ۲- نتایج فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس گریپ فروت بر اساس دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار

Table 2- The results of antimicrobial activity of grapefruit essential oil nanoemulsion based on disc diffusion agar and well diffusion agar methods

Microorganism میکروارگانیسم	Disc diffusion agar (mm) دیسک دیفیوژن آگار (میلی‌متر)	Well diffusion agar (mm) چاهک آگار (میلی‌متر)
<i>E. coli</i>	7.30 ± 0.25 ^e	8.00 ± 0.19 ^e
<i>S. typhi</i>	8.10 ± 0.32 ^{de}	8.30 ± 0.26 ^{de}
<i>P. aeruginosa</i>	9.00 ± 0.41 ^{cd}	9.50 ± 0.50 ^{cd}
<i>L. innocua</i>	13.50 ± 0.52 ^a	13.80 ± 0.57 ^a
<i>S. aureus</i>	11.30 ± 0.27 ^b	12.10 ± 0.39 ^b
<i>B. cereus</i>	9.80 ± 0.45 ^c	10.20 ± 0.47 ^c
<i>B. subtilis</i>	9.60 ± 0.37 ^c	10.00 ± 0.37 ^c
<i>S. pyogenes</i>	10.10 ± 0.46 ^{bc}	10.90 ± 0.55 ^{bc}
<i>S. epidermidis</i>	11.20 ± 0.33 ^b	12.00 ± 0.50 ^b

حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در $p < 0.05$ می‌باشد.

Different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

ضدمیکروبی کمتر عصاره و اسانس‌های گیاهی روی باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با با باکتری‌های گرم مثبت به دلیل وجود غشاهای خارجی اطراف باکتری‌های گرم منفی بوده که منجر به افزایش مقاومت آن‌ها می‌شود. در حقیقت، باکتری‌های گرم منفی دارای ساختار پیچیده لیپوپلی ساکاریدی در غشای بیرونی می‌باشند که سبب کاهش سرعت نفوذ ترکیبات آگریز موجود در اسانس‌ها به داخل سلول می‌شود؛ اما باکتری‌های گرم مثبت دارای لایه موکوپتیدی ساده و با نفوذپذیری بالایی در ساختار غشای خود می‌باشند که منجر به حساسیت بیشتر

حداقل غلظت مهارکنندگی (جدول ۳) برای باکتری‌های *L. innocua* و *S. aureus* (حساس‌ترین باکتری‌ها) برابر با ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و پس از آن باکتری *S. epidermidis* با غلظتی برابر با ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قرار داشت. باکتری‌هایی مانند *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa* بیشترین غلظت مهارکنندگی را به خود اختصاص دادند. همچنین کمترین غلظت کشندگی مربوط به باکتری‌های *L. innocua* و *S. aureus* و بیشترین مقدار آن مربوط به *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa* بود. گزارش شده است که اثر

هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم منفی *P. aeruginosa* و بیشترین میزان آن مربوط به باکتری گرم مثبت *B. subtilis* می باشد (Deng et al., 2020).

آن‌ها نسبت به ترکیبات آبریز می‌گردد (Shahidi et al., 2019a; Deng et al., 2020). دنگ و همکاران (Shahidi et al., 2019b) ترکیبات شیمیایی، فعالیت ضد میکروبی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گریپ‌فروت را بررسی کردند و مشخص گردید که کمترین قطر

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت

Table 3- Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of grapefruit essential oil nanoemulsion

Microorganism میکروارگانیسم	MIC (mg/ml) حداقل غلظت مهارکنندگی	MBC (mg/ml) حداقل غلظت کشندگی
<i>E. coli</i>	200	> 400
<i>S. typhi</i>	200	> 400
<i>P. aeruginosa</i>	200	> 400
<i>L. innocua</i>	25	200
<i>S. aureus</i>	25	200
<i>B. cereus</i>	100	400
<i>B. subtilis</i>	100	400
<i>S. pyogenes</i>	100	400
<i>S. epidermidis</i>	50	400

در برابر باکتری‌های *E. coli*، *B. subtilis* و *S. aureus* می‌باشند که نشان دهنده کاربرد بالقوه آنها در زمینه‌های غذایی و آشامیدنی می‌باشد (Li et al., 2018). فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس لیمو و ۲ غلظت ۱۰ و ۱۰۰ درصد اسانس آن بر روی تعدادی از پاتوژن‌های غذایی و تعدادی از باکتری‌های آلوده‌کننده ماهی با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی نشان داد که نانوامولسیون‌های تولیدی سبب بهبود خاصیت ضد میکروبی می‌شود، بنابراین این نانوامولسیون‌ها می‌توانند به عنوان ترکیب ضد میکروبی طبیعی در جهت کنترل و مهار این گروه از باکتری‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Yazgan et al., 2019).

ترکیبات متعددی در اسانس‌های گیاهی حضور دارند و مکانیسم ضد میکروبی واحدی را نمی‌توان برای اسانس‌ها در نظر گرفت. آبریزی یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آنها است که منجر به نفوذ این ترکیبات به بخش لیپیدی غشای سلولی باکتریایی و میتوکندری و در نهایت اختلال در ساختار آنها می‌گردد. این پدیده سبب نشت یون‌ها و دیگر ترکیبات سلول می‌شود که تداوم آن به خروج مولکول‌های حیاتی سلول و در نهایت تخریب آن منجر می‌گردد. علاوه بر این، ساختار لیپید و بار الکتریکی غشای سلولی نیز بدلیل قابلیت عبور ترکیبات ضد میکروب آبریز از سلول، تحت تأثیر قرار می‌گیرند که کاهش رشد و در نتیجه مرگ سلول را بدنبال دارد (Behbahani et al., 2017).

بررسی ترکیبات شیمیایی و خاصیت ضد میکروبی اسانس پوست گریپ‌فروت با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار نشان داد که اسانس تهیه شده در برابر باکتری‌هایی مانند *S. aureus*، *S. epidermidis* و *E. coli* دارای خاصیت ضد میکروبی با میانگین قطر هاله‌های عدم رشد ۵۳-۱۱ میلی‌متر می‌باشد (Uysal et al., 2011). حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گریپ‌فروت برای باکتری‌های *Lactobacillus plantarum* و *Streptococcus mutans* بیشتر از ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (Filoche et al., 2005). همانگونه که اشاره شد نانوامولسیون‌ها منجر به کاهش محدودیت‌های استفاده از اسانس‌ها می‌شوند، از این رو در پژوهش‌های مختلف از این فناوری جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی گونه‌های مختلف خانواده مرکبات استفاده شده است. اوزگول و همکاران (Özogul et al., 2021) گزارش کردند اگرچه اسانس پوست گریپ‌فروت دارای اثر ضد میکروبی بر روی بیشتر باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد، اما گنجاندن اسانس در سیستم نانوامولسیون سبب افزایش خاصیت باکتریواستاتیک می‌شود (Özogul et al., 2021). بررسی اثر ضد میکروبی نانوامولسیون‌های اسانس‌های تولیدی ۴ گونه از خانواده مرکبات شامل گریپ‌فروت، پرتقال، نارنگی و لیمو بر روی فیله نوعی ماهی قزل‌آلا نشان داد که نانوامولسیون‌های تولیدی سبب افزایش ماندگاری شده و در پایان دوره نگهداری کمترین میزان رشد باکتری در نمونه‌های حاوی نانوامولسیون گریپ‌فروت مشاهده شد (Durmus, 2020). در مقایسه نانوامولسیون‌های اسانس *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* با استفاده از سورفاکتانت‌ها و کوسورفاکتانت‌های مختلف مشخص گردید که تمام نمونه‌های تولیدی دارای خاصیت ضد باکتریایی بالایی

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت دارای فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد قابل توجهی می‌باشد. اثر ضد میکروبی شکل نانوامولسیون این ترکیب زیست فعال در برابر باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد نیز قابل توجه بود و نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت سبب مهار رشد و از بین بردن باکتری‌های *E. coli*, *S. aureus*, *L. innocua*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* و *S. pyogenes* گردید و این اثر وابسته به غلظت اسانس ریزپوشانی شده و نوع باکتری بود. بنابراین، نانوامولسیون بر پایه اسانس گریپ‌فروت قابلیت کاربرد بعنوان عامل آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب طبیعی در برابر باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد در صنایع غذایی را دارا می‌باشد. در این راستا، بررسی اثر

آنتی‌اکسیدانی و همچنین فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت در برابر باکتری‌های مولد فساد و پاتوژن در مواد غذایی مختلف در مطالعات آتی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

مقاله علمی-پژوهشی حاضر مستخرج از رساله دکتری مصوب در گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد با کد ۳/۵۲۶۸۷ می‌باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد به جهت مساعدت‌های مادی و معنوی در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی کنند.

منابع

- Ahmadi, O., & Jafarizadeh Malmiri, H. (2020). Effectiveness of soluble oxygen in preparation of thyme oil nanoemulsion-simulation and characterization. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 19(110), 42-53. (In Persian with English abstract)
- Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., Tabatabaei Yazdi, F., & Mortazavi, S.A. (2019). Antimicrobial effect of *Citrus aurantium* essential oil on some foodborne pathogens and determination of its chemical compounds, total phenol content, total flavonoids content and antioxidant potential. *Food Science and Technology*, 87(16), 291-304.
- Alves, J.A., Mantovani, A.L.L., Martins, M.H.G., Abrao, F., Lucarini, R., Crotti, A.E.M., & Martins, C.H.G. (2015). Antimycobacterial activity of some commercially available plant-derived essential oils. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(2), 353-355. <https://doi.org/10.1007/s10600-015-1281-0>
- Barzegar, H., Mehrnia, M.A., & Alizadeh Behbahani, B. (2019). Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. *Journal of Applied Microbiology in Food Industry*, 4(4), 15-28.
- Behbahani, B.A., & Fooladi, A.A.I. (2018). Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities *Allium* essential oil against the growth of some microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 114, 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.055>
- Behbahani, B.A., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Study of chemical, structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborn pathogens. *Potravarinarstvo*, 13(1).
- Behbahani, B.A., Shahidi, F., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., & Mohebbi, M. (2017). Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 515-526. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.055>
- Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Vasiee, A., & Mortazavi, S.A. (2018). *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microbial Pathogenesis*, 114, 449-452. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.033>
- Deng, W., Liu, K., Cao, S., Sun, J., Zhong, B., & Chun, J. (2020). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties of grapefruit essential oil prepared by molecular distillation. *Molecules*, 25(1), 217. <https://doi.org/10.3390/molecules25010217>
- Denkova-Kostova, R., Teneva, D., Tomova, T., Goranov, B., Denkova, Z., Shopska, V., ... & Hristova-Ivanova, Y. (2021). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 76(5-6), 175-185.
- Durmus, M. (2020). The effects of nanoemulsions based on citrus essential oils (orange, mandarin, grapefruit, and lemon) on the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets at 4±2° C. *Journal of Food Safety*, 40(1), e12718. <https://doi.org/10.1111/jfs.12718>
- Erfani, A., Pirouzifard, M., Almasi, H., & Gheybi, N. (2019). Microencapsulation of cinnamon essential oil Nano emulsion stabilized with β -cyclodextrin and sodium caseinate. *FSCT*, 16(91), 107-117.

13. Filoche, S.K., Soma, K., & Sissons, C.H. (2005). Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(4), 221-225. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00216.x>
14. Gharenaghadeh, S., Samadlouie, H.R., Sowti, M., & Gharenaghadeh, S. (2017). Nano emulsion formulation from essential oil of *Salvia hypoleuca* and investigation of its antimicrobial and physicochemical properties. *Food Science and Technology*, 14(9), 337-348.
15. Heydari, M., & Bagheri, M. (2018). Synthesis, characterization and investigation of properties of nanoemulsion Persian cumin essential oil. *Journal of Advanced Materials and Technologies*, 7(2), 49-56.
16. Javanshir, A., Karimi, E., & Homayouni Tabrizi, M. (2020). Investigation of antioxidant and antibacterial potential of *Ricinus communis* L. nano-emulsions. *Jundishapur Scientific Medical Journal*, 19(1), 1-9. (In Persian with English abstract)
17. Kaur, H., Pancham, P., Kaur, R., Agarwal, S., & Singh, M. (2020). Synthesis and characterization of *Citrus limonum* essential oil based nanoemulsion and its enhanced antioxidant activity with stability for transdermal application. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 11(4), 215-236. <https://doi.org/10.4236/jbnt.2020.114014>
18. Li, Z. H., Cai, M., Liu, Y. S., & Sun, P.L. (2018). Development of finger citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) essential oil loaded nanoemulsion and its antimicrobial activity. *Food Control*, 94, 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.009>
19. Lou, Z., Chen, J., Yu, F., Wang, H., Kou, X., Ma, C., & Zhu, S. (2017). The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. *LWT*, 80, 371-377. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.037>
20. Majdi, B., Mehrnia, M. A., Barzegar, H., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Determination of the structure, chemical composition, antioxidant activity and the cytotoxic effect of Turmeric essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 17(2), 261-271. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2020.39272>
21. Masoumi, V.O., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., & Shahabi, N. (2016). Antimicrobial effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil nanoemulsion against *Escherchia coli* O157:H7. *Studies in Medical Sciences*, 27(7), 608-617.
22. Mehrnia, M.A., Alizadeh Behbahani, B., Barzegar, H., & Tanavar, H. (2021). Sclerorhachis platyrachis essential oil: Antioxidant power, total phenolic and flavonoid content and its antimicrobial activity on some Gram-positive and Gram-negative bacteria "in vitro". *FSCT*, 18(112), 189-198. <https://doi.org/10.52547/fsct.18.03.16>
23. Mesgarpour, B., Adhami, H., & Amanlou, M. (2002). Grapefruit juice effects. *Journal of Medicinal of Plants*, 1(1), 47-62.
24. Misharina, T.A., & Samusenko, A.L. (2008). Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(4), 438-442. <https://doi.org/10.1134/S0003683808040182>
25. Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., & McClements, D.J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*, 194, 410-415. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.139>
26. Noshad, M., Alizadeh behbahani, B., & Dehghani, S. (2020). Evaluation of the effect of aqueous and ethanolic extraction methods on extraction yield, phenolic compounds, and antioxidant and antimicrobial activity of *Stachys schtschegleevii* extract. *Food Science and Technology*, 17(100), 117-125. <https://doi.org/10.52547/fsct.17.100.117>
27. Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Dehghani S. (2020). Improving oxidative and microbial stability of beef by using a bioactive edible coating obtained from Barhang-e-Sagheerseed mucilage and loaded with Avishan-e-Baghi. *Food Science and Technology*, 17(4), 1-3. <https://doi.org/10.52547/fsct.17.101.1>
28. Noshad, M., Alizadeh behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Ebrahimi, M., & Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). In vitro investigation of the antimicrobial activity of Dezfuli orange peel essential oil with and without common antibiotics on some pathogenic bacteria. *Food Science and Technology*, 18(111), 159-167. <https://doi.org/10.52547/fsct.18.111.159>
29. Özogul, Y., Özogul, F., & Kulawik, P. (2021). The antimicrobial effect of grapefruit peel essential oil and its nanoemulsion on fish spoilage bacteria and food-borne pathogens. *LWT*, 136, 110362. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110362>
30. Poorhasan, F., Zokaee, A., & Rahmani, M. (2012). Review on nanoemulsions production and comparison of homogenizers efficiencies. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 11(63), 4-12. (In Persian with English abstract)
31. Seibert, J.B., Rodrigues, I.V., Carneiro, S.P., Amparo, T.R., Lanza, J.S., Frézard, F.J.G., ... & Santos, O.D.H.D. (2019). Seasonality study of essential oil from leaves of *Cymbopogon densiflorus* and nanoemulsion development with antioxidant activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 34(1), 5-14. <https://doi.org/10.1002/ffj.3472>

32. Shahidi, F., Yazdi F, T., Roshanak, S., Behbahani, B.A., Norouzi, N., & Vasiee, A. (2019a). Antimicrobial activity of *Lepidium draba* extract on some pathogenic microorganisms "in vitro". *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*, 24(85), 1-9. (In Persian with English abstract)
33. Shahidi, F., Yazdi, F.T., Behbahani, B.A., Roshanak, S., Norouzi, N., & Vasiee, A. (2019b). Aantibacterial effect of *Tragopogon graminifolius* extract on *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* "in vitro". *Iranian Journal of Infectious Diseases*, 24(84), 1(10). (In Persian with English abstract)
34. Tanavar, H., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M.A. (2020). *Mentha pulegium* essential oil: chemical composition, total phenolic and its cytotoxicity on cell line HT29. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 16(5), 643-653. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v16i5.84722>
35. Tavakkol Afshari, H.S., Homayouni Tabrizi, M., & Ardalan, T. (2019). Evaluation of antioxidant and anticancer effects of nanoemulsions prepared using dill essential oil. *Journal Arak University Medical Science*, 22(4): 40-51. (In Persian with English abstract)
36. Uysal, B., Sozmen, F., Aktas, O., Oksal, B.S., & Kose, E.O. (2011). Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus paradisi* L.) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(7), 1455-1461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02640.x>
37. Yang, S.A., Jeon, S.K., Lee, E.J., Shim, C.H., & Lee, I.S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 24(2), 140-151. <https://doi.org/10.1080/14786410802496598>
38. Yazdi, F.T., & Behbahani, B.A. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4), 56-62.
39. Yazgan, H., Ozogul, Y., & Kuley, E. (2019). Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 306, 108266. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108266>



Evaluation of the Effect of Sodium Stearoyl-2-lactylate Emulsifier, Xylanase Enzyme, and Alcoholic Sugar Sorbitol on the Quality of Wheat Bran Bread

P. Parsa¹, M. Mazaheri Tehrani ^{2*}, M. Mohebbi ³

Received: 2021.11.06

Revised: 2021.12.13

Accepted: 2021.12.27

Available Online: 2022.05.15

How to cite this article:

Parsa, P., Mazaheri Tehrani, M., & Mohebbi, M. (2023). Evaluation of the effect of sodium stearoyl-2-lactylate emulsifier, xylanase enzyme, and alcoholic sugar sorbitol on the quality of wheat bran bread. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 427-450. (In Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.73474.1110>

Introduction

Bran-enriched bread is a source of dietary fibers and other nutritional compounds; However, wheat bran also contains phytic acid, asparagine, a high ratio of insoluble to soluble fiber, insoluble arabinoxylans, and glutathione that cause nutritional and technological problems in the product. Therefore, to produce bran-enriched bread, it is necessary to use pre-processed wheat bran. Despite the modifications made in wheat bran to improve its nutritional and functional properties, wheat bran-rich cereal products have a dark color, rough texture, and small loaf volume. To improve the quality of bran-enriched bread, common additives in the bakery industry such as enzymes, alcoholic sugars, emulsifiers can be used. Xylanase is one of the important classes of hemicellulase enzymes that delays the aggregation of amylose chains, and consequently, bread staling. Moreover, the xylanase enzyme increases the loaf volume by converting water-insoluble arabinoxylans into soluble ones. SSL emulsifier can interact with gliadin protein and prevent its participation in crosslinking bonds, which softens the bread crumbs. Polyols can reduce water activity and improve the softness of bread. Sorbitol is commonly used in starch-based foods to improve their quality by modifying starch gelatinization and retrogradation. So far, no article has been presented on the simultaneous effect of enzyme, alcoholic sugar, and emulsifier improvers on bread enriched with processed wheat bran. In addition, the amount and composition of improvers used in combination with each other can cause various effects on different properties of bread. This study aims to improve the technological, physicochemical, and finally stalling of optimal bread enriched with 15% of pre-processed wheat bran while benefiting from the nutritional properties of wheat bran.

Materials and Methods

In this study, the effect of sodium stearoyl-2-lactylate emulsifier (0-0.8%), xylanase enzyme (0-0.05%), and sorbitol sugar alcohol (0-6%) as improving agents on The physicochemical and technological parameters of bread enriched with 15% pre-processed wheat bran were investigated based on the response surface method in the form of a rotatable central composite design. After that, design-expert software determined the optimum percentage of improvers to achieve the minimum amount of firmness and cohesiveness of bread and the maximum amount of specific volume, moisture of bread crumbs, lightness of bread crust, and solidity of bread pore structure. Finally, optimal and control samples were compared using the Differential Scanning Calorimetry and Scanning Electron Microscopic experiments.

1, 2 and 3- Ph.D. Student and Professors, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, respectively.

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

DOI: [10.22067/ifstrj.2021.73474.1110](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.73474.1110)

Results and Discussion

The experiments showed the bread's firmness under the influence of SSL emulsifier and sorbitol alcoholic sugar and chewiness, by adding SSL emulsifier and xylanase enzyme decreased significantly. All three improvers caused a significant increase in the specific volume of bread. The pore characteristics of bread crumbs, such as solidity and circularity, were significantly improved by adding an SSL emulsifier, and roundness was considerably enhanced by adding sorbitol alcohol. The brightness of bread crust was also increased significantly by the SSL emulsifier and xylanase enzyme. In addition, the Xylanase enzyme improved the moisture content of bread by substantially increasing the moisture content of bread crumbs, and alcoholic sugar and SSL emulsifier with a significant reduction in crust moisture. Moreover, the chewiness of bread on the first day after baking, specific volume, moisture of bread crust on the third day after baking, and the solidity of bread crumbs were significantly improved due to the interaction of SSL emulsifier and sorbitol alcohol. Also, the interaction of the xylanase enzyme and SSL emulsifier improved the specific volume, moisture of the bread crumbs on the first day after baking, the lightness of the bread crust, the pore area fraction, and the circularity of the bread crumbs. Finally, the optimal formula was obtained, including 0.563% of SSL emulsifier, 0.040% of xylanase enzyme, and 2.356% of alcoholic sugar sorbitol. The results showed a significant decrease in enthalpy and an increase in the initial gelatinization temperature in the optimal sample compared to the control ones. Also, a weaker gluten network, more swelling, and amounts of starch granules in the microstructure of sample bread were observed.

Conclusion

In conclusion, SSL emulsifier by interaction with amylose and amylopectin in starch granules, sorbitol alcohol via interacting with water molecules surrounding starch chains or by bonding between starch chains in amorous regions, and xylanase enzyme through reducing rate of crystallization can reduce the gelatinization of starch granules, enthalpy, and finally the retrogradation process of amylopectin and stalling rate of bread with their synergic effects. In this research, we formulate the wheat bran-enriched bread that not only benefits from the nutritional features of wheat bran but also preserves the quality characteristics of bread.

Keywords: Differential Scanning Calorimetry, improving agents, Response Surface Methodology, Scanning Electron Microscopy, Wheat bran enriched-bread.

بررسی تأثیر امولسیفایر سدیم استئاروئیل-۲-لاکتیلات، آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوربیتول بر کیفیت نان حجیم سبوس دار

پریسا پارسا^۱ - مصطفی مظاهری طهرانی^{۲*} - محبت محبی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۹/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۶

چکیده

فرآورده‌های نانوائی غنی شده با سبوس گندم، منبعی سرشار از فیبر می‌باشند، اما وجود ترکیبات ضدتغذیه‌ای نظیر اسید فیتیک در سبوس گندم و به‌علاوه ایجاد اثرات تکنولوژیکی نامطلوب در نان در اثر برهم‌کنش سبوس گندم با ترکیبات ساختار ساز آن، موجب محدودیت مصرف این فرآورده‌ها می‌گردد. لذا در این پژوهش برای تولید نان غنی‌شده قالبی از سبوس پیش‌فرآوری شده گندم، استفاده گردیده است. سپس اثر تغییرهای امولسیفایر سدیم استئاروئیل-۲-لاکتیلات (۰-۰/۸ درصد)، آنزیم زایلاناز (۰-۰/۵ درصد) و قند الکلی سوربیتول (۰-۶ درصد) به‌عنوان مواد بهبوددهنده بر پارامترهای فیزیکوشیمیایی و تکنولوژیکی نان غنی شده با ۱۵ درصد سبوس فرآوری شده گندم براساس روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر بررسی شده است. نتایج آزمایشات نشان داد که ویژگی‌های بافتی همچون سفتی مغز نان، پیوستگی و قابلیت جویدن، حجم مخصوص، روشنایی رنگ پوسته، رطوبت مغز و پوسته نان و ویژگی‌های یکپارچگی، مدور بودن و گردی حفرات مغز نان به‌واسطه اثر مستقل و تقابل هم‌افزای مواد بهبوددهنده به‌طور معنی‌داری بهبود یافتند. در نهایت فرمول بهینه شامل: ۵۶۳/۰ درصد امولسیفایر SSL، ۴۰/۰ درصد آنزیم زایلاناز و ۳۵۶/۲ درصد قند الکلی سوربیتول بدست آمد. نمونه بهینه و نمونه شاهد (فاقد مواد بهبوددهنده) با استفاده از آزمون گرماسنجی روبشی افتراقی و تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مقایسه شدند و نتایج حاکی از کاهش قابل توجه آنتالپی و افزایش دمای اولیه ژلاتیناسیون در نمونه بهینه نسبت به نمونه شاهد بود، به‌علاوه در نمونه نان شاهد شبکه گلوتهی دارای پیوستگی کم‌تری بود و گرانول‌های نشاسته موجود در آن تورم بیشتری نسبت به نمونه بهینه داشتند. لذا باتوجه به نتایج این دو آزمون می‌توان نتیجه گرفت که میزان بیاتی نمونه بهینه تحت اثر هم‌افزای سه ماده بهبوددهنده کمتر از نمونه شاهد است.

واژه‌های کلیدی: روش سطح پاسخ، گرماسنجی روبشی افتراقی، مواد بهبوددهنده، میکروسکوپ الکترونی روبشی، نان غنی شده با سبوس گندم

مقدمه

آسپاراژین، نسبت بالای فیبرهای نامحلول به محلول، آرابینوزایلان‌های نامحلول و گلوکاتینون سبب ایجاد مشکلات تغذیه‌ای و تکنولوژیکی در محصول می‌گردد (Hemery et al., 2007; Khalid et al., 2017; Kumar et al., 2010; Noort et al., 2010). بنابراین به‌منظور تولید نان‌های غنی‌شده، استفاده از سبوس پیش‌فرآوری شده گندم ضروری است. اما در صنعت برای تولید نان‌های حجیم سبوس‌دار از سبوس گندم فرآوری نشده یا آرد کامل استفاده می‌شود که مشکلات تغذیه‌ای ایجاد می‌کنند و یا به‌منظور حفظ ویژگی‌های تکنولوژیکی از درصد پایین سبوس فرآوری شده گندم (زیر ۱۰ درصد) استفاده می‌گردد. همچنین به‌رغم اصلاحاتی که در سبوس گندم جهت بهبود خصوصیات

نان قالبی از انواع نان‌های حجیم است که با استفاده از آرد نول یا مخلوطی از آرد نول و ستاره تولید می‌گردد، لذا به علت درجه استخراج پایین آرد موجود در آن، دارای مقدار اندکی از موادمعدنی، ویتامین‌ها و فیبرهای رژیمی است (Feng et al., 2015). از این‌رو تحقیقات گسترده‌ای به‌منظور تولید نان‌های حجیم غنی شده با منابع مختلفی از فیبرهای رژیمی صورت گرفته است (Mudgil et al., 2016). سبوس گندم محصول جانبی آسیابانی دانه گندم و محتوی ۴۴-۵۰ درصد فیبر رژیمی و منبع غنی از دیگر ترکیبات مغذی است؛ لیکن سبوس گندم خام به‌واسطه دارا بودن ترکیبات ضد تغذیه‌ای مانند اسید فیتیک و

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استادان، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: mmtehrani@um.ac.ir)

به سیستم های مدل محتوی گلوتن و ۱۰ درصد فیبر رژیمی محلول اینولین، موجب افزایش خواص ویسکوالاستیک خمیر، بهبود قابلیت آن در نگهداری حباب های گاز و بنابراین افزایش حجم و کیفیت نان می گردد.

قندهای الکلی به طور معمول در مواد غذایی برپایه نشاسته به منظور بهینه سازی فرایند تولید و بهبود کیفیت آن ها از طریق اصلاح کردن ژلاتیناسیون و رتروگراداسیون نشاسته استفاده می شوند (Tian et al., 2009). پورفرزاد و همکاران (Pourfarzad et al., 2014) گزارش کردند که افزودن سوربیتول به نان بربری غنی شده با سویا باعث کاهش سفتی نان ها پس از گذشت دو روز از زمان نگهداری شد. همچنین رطوبت مغز نان های حاوی سوربیتول پس از مدت زمان نگهداری، به طور قابل ملاحظه ای بالاتر از نمونه شاهد بود. بیشه و کائور (Bhise & Kaur, 2017) نیز دریافتند که افزودن ۴ درصد سوربیتول به نان های حاوی فیبرهای اسفرزه و جو، باعث ایجاد کمترین میزان سفتی در مغز نان ها در مقایسه با نمونه شاهد می گردد.

در پژوهش های پیشین تأثیر آنزیم زایلاناز به تنهایی یا به همراه سایر آنزیم های متداول در صنعت نانوائی، عمدتاً بر کیفیت خمیر و نان های حاصل از آرد کامل گندم بررسی شده است و تحقیقات درخصوص نان های غنی شده با سبوس محدوده بوده است (Both et al., 2020; Da Silva et al., 2016; Ghoshal et al., 2016; Jaekel et al., 2012; Liu et al., 2017; Schoenlechner et al., 2013; Shah et al., 2006). اثر امولسیفایر SSL نیز بیشتر بر خصوصیات مختلف نان های سفید گندم و همچنین در برخی از پژوهش ها، تلفیق این امولسیفایر با آنزیم هایی همچون آلفا-آمیلاز، هیدروکلوئیدها و انواع دیگری از امولسیفایر در نان های حاصل از مخلوطی از آردها و حاوی فیبرهایی مانند اینولین و نشاسته مقاوم مطالعه شده است (Atalay et al., 2013; Bilgiçli et al., 2014; Dudu et al., 2020; Eduardo et al., 2016; Gomes-Ruffi et al., 2012; Gómez et al., 2013; Pourfarzad et al., 2019). اما از قند الکلی سوربیتول نسبت به سایر مواد بهبوددهنده در مطالعات محدودی در رابطه با فرآورده های نانوائی استفاده شده است که این مطالعات نیز به طور عمده درخصوص نان های سفید گندم و بدون گلوتن صورت گرفته است (Ahmad, 2016; Bhise & Kaur, 2014; Borges & Salas-Mellado, 2016; Ding et al., 2019; Pourfarzad et al., 2011; Zhou et al., 2016). اما تاکنون مقاله ای در رابطه با اثر همزمان سه نوع بهبوددهنده آنزیمی، قند الکلی و امولسیفایر بر نان غنی شده با سبوس فرآوری شده گندم، ارائه نشده است. ضمناً میزان و ترکیب مواد بهبوددهنده ای که در تلفیق با یکدیگر استفاده می شوند، می تواند موجب ایجاد اثرات متفاوتی در خصوصیات مختلف نان گردد. مطالعات پژوهشگران نشان داد، علارغم اثرگذاری مثبت آنزیم زایلاناز بر ویژگی هایی

تغذیه ای و عملکردی آن صورت می گیرد؛ فرآورده های غلات با مقادیر بیش از ۱۰ درصد سبوس گندم، دارای بافت، طعم و رنگ نامناسبی هستند که این خصوصیات به صورت تیره شدن رنگ مغز و پوسته نان، کاهش حجم قرص نان، افزایش سفتی بافت و بیاتی نان نمایان می گردند (Bakke & Vickers, 2007; Kiumarsi et al., 2019). به منظور بهبود کیفیت نان های غنی شده با سبوس، می توان از افزودنی متداول در صنعت نانوائی همچون آنزیم ها، قندهای الکلی و امولسیفایرها، استفاده نمود.

در سال های اخیر، استفاده از آنزیم ها در کاربردهای تجاری بنابر تقاضای مصرف کنندگان برای استفاده از ترکیبات طبیعی در فرآورده های نانوائی افزایش یافته است. آنزیم زایلاناز جزو دسته مهمی از همی سلولازها است که پلی ساکاریدهای غیرنشاسته ای را به قند زایلوز و الیگوساکاریدها هیدرولیز می کنند (Jiang et al., 2019). آنزیم زایلاناز به منظور تثبیت ساختار خمیر، افزایش انعطاف پذیری آن، بهبود مقاومت گلوتن و کاهش رتروگراداسیون نشاسته در صنعت نانوائی استفاده می شود (Altinel & Ünal, 2017b; Yang et al., 2014). پژوهش داسیلوا و همکاران (Da Silva et al., 2016) نشان داد که افزودن آنزیم زایلاناز به نان حاوی آرد کامل گندم، به واسطه تجزیه اجزاء دیواره سلولی، تغییر توزیع آب میان نشاسته، گلوتن و ذرات سبوس در طی مدت زمان نگهداری نان، موجب به تأخیر انداختن رتروگراداسیون نشاسته و در نتیجه روند بیاتی نان می گردد. آلتینل و اونال (Altinel & Ünal, 2017a) نیز بیان کردند که در مخلوطی ۴۰:۶۰ از آرد سفید و آرد کامل گندم، افزودن آنزیم زایلاناز، باعث افزایش حجم نان به واسطه تبدیل آرابینوزایلان های غیر محلول در آب به نوع محلول می گردد که موجب بهبود ظرفیت نگهداری گاز در خمیر می شود.

امولسیفایرها ترکیبات فعال سطحی هستند که نقش آن ها به عنوان افزودنی در صنایع نانوائی، نرم کردن مغز نان و تولید نانی با زمان ماندگاری بالاتر است، که علت آن می تواند به واسطه توانایی این ترکیبات در ایجاد پیوند با پروتئین های گلوتهنی و نشاسته باشد (Colakoglu & Özkaya, 2012). امولسیفایر SSL می تواند با پروتئین گلیادین، برهمکنش ایجاد کرده و مانع از مشارکت آن در تشکیل پیوندهای عرضی گردد، که این امر موجب نرم شدن مغز نان می شود (Van Steertegem et al., 2013). پژوهش های دودو و همکاران (Dudu et al., 2020) نشانگر این امر بود که افزودن امولسیفایر سدیم استئاروئیل-۲-لاکتیلات^۱ به نان های حاصل از آرد مخلوط گندم و کاساوا موجب کاهش رتروگراداسیون آمیلوپکتین در طی مدت زمان نگهداری نان گردید. نتایج مطالعات پورفرزاد و همکاران (Pourfarzad et al., 2019) نیز نشان داد که افزودن امولسیفایر SSL

(Dost & Tokul, 2006). اندازه گیری فیبر خام در سبوس برمبنای جزء باقیمانده از نمونه مورد آزمایش با محلول‌های استاندارد سولفوریک اسید و هیدروکسید سدیم تحت شرایط کنترل شده و نهایتاً تبدیل آن به خاکستر به روش کوره انجام پذیرفت (AOAC, 2000). فیبرهای رژیمی محلول و نامحلول در سبوس با استفاده از روش آنزیمی- وزنی براساس استاندارد AOAC - ۹۹۱/۴۳ مورد آزمون قرار گرفتند (AOAC, 2000). اندازه‌گیری آهن در سبوس با استفاده از دستگاه جذب اتمی در طول موج ۶۴۴ نانومتر صورت گرفت (Kassem & Amin, 2013).

روش تهیه نان حجیم سبوس دار

در ابتدا مواد پودری، آرد و روغن به مدت ۲ دقیقه در همزن اسپیرال (Huger, مدل HG550TMEM) با دور کند با یکدیگر مخلوط شدند، سپس آب به آرامی تا دقیقه ششم به مخلوط اضافه گردیدند و پس از آن ۴ دقیقه انتهایی مخلوط کردن با دور تند همزن انجام شد. پس از اتمام مرحله مخلوط کردن، خمیرها به قطعاتی با وزن ۳۵۰ گرم تقسیم و توزین شده و سپس گرد گردیدند. در مرحله بعد خمیرها در مدت زمان ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد استراحت کردند. سپس رول شده، در داخل قالب آلومینیومی با ابعاد ۹/۵ * ۱۹/۵ * ۵/۵ گذاشته شدند و برای انجام مرحله تخمیر نهایی به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۵ درصد در گرمخانه (Memmert CO₂ Incubator, مدل INCO₂/108، ساخت کشور آلمان) قرار داده شدند. در مرحله پایانی خمیرها به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد در فر پخت نانویی (Sinmag, مدل SM-705E-E)، پخته شدند. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای محیط خنک شده و در بسته‌هایی از جنس پلی‌اتیلن قرار گرفتند (Ghoshal et al., 2013).

اندازه‌گیری رطوبت پوسته و مغز نان

محتوای رطوبت پوسته و مغز نان‌ها در روز اول و سوم پس از پخت براساس روش AOAC اندازه‌گیری شد (AOAC, 2000).

اندازه‌گیری حجم مخصوص نان

اندازه‌گیری حجم نان‌ها ۱ روز پس از پخت و سرد شدن نان‌ها با استفاده از روش جابه جایی دانه ارزن انجام شد و سپس با تقسیم کردن حجم بر وزن نان‌ها، مقدار حجم مخصوص به‌دست آمد (AACC, 2000).

همچون حجم مخصوص در نان‌های حاوی آرد کامل گندم در سایر پژوهش‌ها، افزودن این آنزیم به‌همراه مواد بهبوددهنده دیگر (امولسیفایر داتم و گلوتن) عملکرد آن را تحت الشعاع قرار داده و آنزیم زایلاناز اثر قابل توجهی بر حجم مخصوص نداشته است (Da Silva et al., 2016). اما نتایج مطالعه‌ای دیگر حاکی از این مطلب بود که افزودن آنزیم زایلاناز به‌تنهایی یا در ترکیب با آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و ترانس گلوتامیناز اثر یکسانی بر حجم مخصوص و سفتی بافت نان داشت (Grausgruber et al., 2008).

هدف از این مطالعه ضمن بهره‌مندی از خواص تغذیه‌ای سبوس گندم، بهبود خصوصیات تکنولوژیکی، فیزیکی و شیمیایی و در نهایت بیاتی نان بهینه غنی‌شده با ۱۵ درصد سبوس فراوری شده گندم می‌باشد. لذا به این منظور برای غنی‌سازی نان از سبوس فراوری شده گندم استفاده شد، سپس اثر مستقل و برهمکنش سه نوع بهبوددهنده امولسیفایر SSL، قند الکلی سوربیتول و آنزیم زایلاناز بر ویژگی‌های بافتی، حجم مخصوص، رطوبت، افت وزن، رنگ و ویژگی‌های حفرات مغز نان مطالعه گردید. همچنین، اینکه آیا تقابل این سه نوع ماده بهبوددهنده اثر مثبتی بر ویژگی‌های ذکر شده دارد یا خیر و ترکیب بهینه آن‌ها می‌تواند از طریق تغییر خواص حرارتی و ریزساختار نان بر بیاتی نان غنی شده با ۱۵ درصد سبوس فراوری شده گندم اثر هم‌افزایی مثبت داشته باشد یا خیر، مدنظر بوده است.

مواد و روش‌ها

آرد گندم با درجه استخراج ۷۲ درصد، سبوس گندم فراوری شده (تخمیر شده مرطوب) با اندازه ذرات کمتر از ۵۰۰ میکرون، امولسیفایر SSL، آنزیم زایلاناز و مخمر خشک فعال به‌ترتیب از شرکت‌های آرد طلایی پرند (تهران)، پاپلوت صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد (مشهد)، پارس بهبود آسیا (مشهد)، سیگما (آمریکا) و شرکت خمیر مایه رضوی (فریمان) تهیه شدند. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمون‌ها نیز از شرکت‌های مرک (آلمان) و سیگما (آمریکا) تأمین گردیدند. نمک، شکر، روغن، پودر آب پنیر بدون چربی، بهبوددهنده مخصوص نان حجیم و قند الکلی سوربیتول نیز از بازار محلی خریداری شدند. رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی نمونه‌های آرد و سبوس به‌ترتیب مطابق با روش‌های ۱۹-۴۴، ۱۲-۰۸، ۱۲-۴۶ و ۱۰-۳۰ براساس استاندارد (AOAC, 2000) تعیین گردید. رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر برای آرد گندم به‌ترتیب ۱۲/۳۸ درصد، ۱/۲۳۴ درصد، ۸/۹۸ درصد و ۰/۵۶ درصد بود. اندازه گیری اسید فیتیک در سبوس با استفاده از روش جایگزینی با فلز آهن به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۱ با اندکی تغییرات در طول موج ۶۶۰ نانومتر صورت گرفت

اندازه‌گیری افت وزنی نان

افت وزنی^۱ نان‌ها با وزن کردن چانه‌ها و وزن نان‌های حاصل پس از پخت و سرد کردن از طریق تفریق وزن چانه از وزن نان پس از پخت، تقسیم بر وزن چانه محاسبه شد (Phimolsiripol et al., 2008).

آزمون آنالیز پروفایل بافت نان

ابتدا از نمونه‌های نان برش‌هایی مکعبی شکل با ضخامت ۲/۵ سانتی‌متر تهیه شد. سپس نان‌ها به وسیله دستگاه آنالیز پروفایل بافت با استفاده از پروب آلومینیومی به قطر ۴/۵ سانتی‌متر، با بارگذاری ۵ کیلو-گرم به میزان ۴۰ درصد فشرده گردیدند. سرعت انجام آزمون نیز ۱/۷ میلی‌متر بر ثانیه بود. ویژگی‌هایی همچون سفتی^۲، الاستیسیته^۳، قابلیت جویدن^۴ و پیوستگی^۵ در روز اول و سوم پس از پخت نان بررسی شد (Purhagen et al., 2011).

آزمون گرماسنجی روبشی افتراقی^۶

ابتدا تکه‌هایی به وزن ۲۰ میلی گرم از مرکز هندسی نان‌ها در روزهای اول و سوم پس از پخت تهیه شد. سپس با استفاده از دستگاه (Shimadzu, Japan) DSC-60 و سیستم آنالیز حرارتی TA-60WS، آنتالپی برحسب واحد ژول بر گرم، دمای اولیه و پیک ژلاتیناسیون برحسب درجه سانتیگراد در نمونه‌ها در محدوده دمایی ۲۵ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه محاسبه شد (Shahbazi et al., 2017).

بررسی ریزساختار نان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی^۷

به منظور ارزیابی تأثیر مواد بهبوددهنده بر ریزساختار نان بهینه و شاهد، از SEM استفاده شد. ابتدا نمونه‌های نان به شکل مکعب‌هایی با ضخامت ۵ میلی‌متر برش داده شدند. سپس با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک گردید و در مرحله بعد روی پایه‌های آلومینیومی دستگاه لایه نشانی طلا با استفاده از چسب نصب گردیدند و با لایه‌ای از فلز طلا و پالادیوم پوشش داده شدند. در نهایت از نمونه‌های نان با بزرگ نمایی ۱۰۰۰× عکس‌برداری شد (Sheikholeslami et al., 2021).

پردازش تصاویر نان

تصویربرداری از نمونه‌های نان

تصویر برداری از نمونه‌های نان در اتاقکی با دیوارهای مشکی صورت گرفت. از ۴ عدد لامپ در ردیف اول و آخر به منظور تأمین روشنایی استفاده گردید. تصویربرداری با استفاده از دوربین Canon مدل DS126191 ساخت کشور تایوان انجام شد. فاصله دوربین که بر روی پایه ثابت قرار داشت از نمونه ۲۰ سانتی‌متر بود و تصاویر به فرمت JPG ذخیره شدند.

ارزیابی اندازه و شکل حفرات مغز نان

برای بررسی ویژگی‌های حفرات مغز نان به کمک نرم‌افزار Matlab پس از تبدیل تصویری رنگی ورودی به تصویر خاکستری، یک مقدار آستانه مناسب به منظور باینری کردن تصویر برای آن تعیین شد. سپس تصاویر باینری حاصل را منفی کرده تا نقاط سفید آن به سیاه و بالعکس تبدیل شوند. به این ترتیب حفرات که نقاط تیره تصویر هستند، مقادیر ۱ را به خود اختصاص می‌دهند و به عنوان اشیاء موجود در تصویر شناخته می‌شوند. حال به کمک روش شناسایی اجزاء متصل در تصویر که یکی از تکنیک‌های موجود در حوزه شکل شناسی است، پیکسل‌های مربوط به حفرات تصویر مغز نان را از بقیه پیکسل‌های تصویر جدا کرده و ویژگی‌هایی همچون تعداد حفرات^۸، کسر سطح حفرات^۹، مدور بودن^{۱۰}، گردی^{۱۱} و یکپارچگی^{۱۲} را برای آن‌ها استخراج شدند (Gonzalez & Woods 2008).

ارزیابی رنگ پوسته نان

به منظور ارزیابی رنگ پوسته نان، عکس‌برداری از نمونه‌های نان با استفاده از دوربین دیجیتال صورت گرفت و فاکتورهای L^* ، a^* و b^* به وسیله جعبه ابزار پردازش تصویر نرم‌افزار متلب^{۱۳} محاسبه گردید (Sun, 2016).

- 8- Pore number
- 9- Pore area fraction
- 10- Circularity
- 11- Roundness
- 12- Solidity
- 13-MATLAB

- 1- Weight loss
- 2- Hardness
- 3- Springiness
- 4- Chewiness
- 5- Cohesiveness
- 6- Differential Scanning Calorimetry (DSC)
- 7- Scanning Electron Microscopy (SEM)

جدول ۱- متغیرهای مستقل و مقادیر آن ها در نرم افزار دیزاین اکسپرت

Table 1-Independent variables and their values in Design Expert software

Independent variables	Minimum value	-α	Central point	Maximum value	+α
متغیرهای مستقل	کمترین مقدار	منفی آلفا	نقطه مرکزی	بیشترین مقدار	مثبت آلفا
SSL emulsifier (%) امولسیفایر SSL (برحسب درصد)	0	0.16215	0.4	0.8	0.63784
Xylanase enzyme (%) آنزیم زایلاناز (برحسب درصد)	0	0.01	0.025	0.05	0.039865
Alcoholic sugar sorbitol (%) قند الکلی سوربیتول (برحسب درصد)	0	1.21619	3	6	4/78381

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این پژوهش، مدلسازی رابطه میان مواد بهبود دهنده افزوده شده به فرمولاسیون و پارامترهای فیزیکوشیمیایی و تکنولوژیکی نان و بهینه‌سازی فرمولاسیون نان غنی‌شده با ۱۵ درصد سبوس فرآوری شده گندم با استفاده از نرم افزار دیزاین اکسپرت^۱ (نسخه ۱۲) و در قالب طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر^۲، با سه فاکتور و در ۵ سطح بررسی شد. همچنین پردازش تصاویر به‌وسیله نرم‌افزار متلب (نسخه b ۲۰۱۶) انجام شد و مقایسه میانگین به‌وسیله روش تی-استیودنت در سطح (p<۰/۰۵) صورت گرفت. پاسخ‌های مورد بررسی به‌عنوان متغیر وابسته و سطوح متغیرهای امولسیفایر SSL، آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوربیتول به‌عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شدند. **جدول ۱** سطوح مختلف متغیرهای مستقل ارائه شده توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت و **جداول ۳، ۴ و ۵** مقادیر معنی‌داری اجزاء معادلات درجه دوم و آنالیز آماری آن‌ها را نشان می‌دهند. انتخاب مدل مناسب و بررسی کفایت آن برای برازش پاسخ‌ها با استفاده از شاخص-های معنی‌داری رگرسیون، ضعف برازش^۳، ضریب تبیین^۴، ضریب تبیین اصلاح شده^۵ و ضریب تغییرات^۶ صورت پذیرفت. ضمناً نمونه بهینه با استفاده از روش بهینه‌سازی عددی به‌وسیله نرم‌افزار دیزاین اکسپرت تعیین شد.

بررسی شاخص‌های مدل انتخابی برای پاسخ‌ها

بررسی ها نشان داد که مدل درجه دوم برازش بهتری برای تمامی پاسخ‌ها (حجم مخصوص، افت وزن، رطوبت پوسته و مغز نان، ویژگی‌های بافتی، رنگ پوسته و ویژگی‌های حفرات مغز نان) داشت. معادلات درجه دوم برازش یافته برای هر پاسخ نیز از **معادله ۱ تا ۲۲** در متن ارائه شده‌اند که در این معادلات A، B و C به‌ترتیب نشان دهنده امولسیفایر SSL، آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوربیتول هستند.

نتایج حاصل از **جداول ۳، ۴ و ۵** نیز نشان داد که مدل درجه دوم از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۰۱)، اما آزمون ضعف برازش در مدل‌های درجه دوم پیشنهاد شده، غیرمعنی‌دار بود (p>۰/۰۵). ضمناً برای تمامی پاسخ‌ها ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده بیشتر از ۰/۸۳ و ضریب تغییرات کمتر از ۱۰ بود که این مطلب حاکی از کفایت مدل انتخابی برای برازش داده‌ها می‌باشد.

نتایج و بحث

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سبوس گندم فرآوری شده

در **جدول ۲** نتایج آنالیز ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سبوس فرآوری شده گندم ارائه شده است.

تأثیر مواد بهبود دهنده بر ویژگی‌های بافتی نان

اثر امولسیفایر SSL، آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوربیتول بر ویژگی بافتی شامل سفتی، قابلیت جویدن، الاستیسته و پیوستگی در روز اول و سوم پس از پخت مورد بررسی شد. پارامتر سفتی از دیدگاه مکانیکی حداکثر نیروی لازم برای تغییر شکل ماده غذایی در سیکل اول فشردن است. نتایج **آنالیز جدول ۳ و معادلات ۱ و ۲** نشان می‌دهد که امولسیفایر SSL در حالت مستقل در روزهای اول و سوم پس از پخت و همچنین قند الکلی سوربیتول در روز سوم بر پارامتر سفتی مغز نان اثری منفی و بسیار معنی‌دار داشتند (p<۰/۰۰۰۱). به‌علاوه مطابق با نتایج ارائه شده در **شکل ۱**، با افزایش امولسیفایر SSL و کاهش قند الکلی سوربیتول در حالت متقابل سفتی نان در روز اول پس از پخت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۱). لیکن کاهش متقابل هر دو بهبوددهنده در روز سوم پس از پخت، موجب کاهش این پارامتر گردید (p<۰/۰۱). روند تغییرات

4- R-squared (R2)

5- Adjusted R-squared (Adjusted-R2)

6- Coefficient of Variation (C.V.)

1- Design Expert software

2- Central Composite Rotatable Design (CCRD)

3- Lack of fit

میزان سفتی مغز نان‌ها در روز سوم نسبت به روز اول پس از پخت، افزایشی بود. تیمار شماره ۴ در روز اول پس از پخت کمترین میزان سفتی را دارا بود. کمترین مقدار سفتی مغز نان در روز سوم نیز در تیمار شماره ۲۰ با ۰/۶۳۷۸ درصد امولسیفایر SSL، ۰/۳۹۸۵ درصد آنزیم زایلاناز و ۴/۷۸۳۸ درصد قند الکلی سوربیتول و تیمار شماره ۴ با ترکیب مواد بهبود دهنده شامل: ۰/۶۳۷۸ درصد امولسیفایر SSL،

۰/۱۰۱۳ درصد آنزیم زایلاناز و ۴/۷۸۳۸ درصد قند الکلی سوربیتول مشاهده شد. روند افزایش مقدار سفتی مغز نان در تیمار شماره ۴، در طی مدت ۳ روز از زمان پخت کمتر از سایر تیمارها است. مقدار قند الکلی سوربیتول و امولسیفایر SSL در هر دو تیمار ذکر شده مساوی است که این امر نشان‌دهنده تأثیر قابل ملاحظه این دو بهبوددهنده در روز سوم پس از پخت است.

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سبوس گندم فرآوری شده (میانگین ± انحراف معیار)

Table 2- Physicochemical properties of processed wheat bran (mean ± standard deviation)

Properties ویژگی‌های مورد اندازه‌گیری	Processed wheat bran sample نمونه سبوس فرآوری شده
Crude fiber (%) فیبر خام (برحسب درصد)	10.075±0.085
Soluble fiber (%) فیبر محلول (برحسب درصد)	14.35±0.0150
Insoluble fiber (%) فیبر نامحلول (برحسب درصد)	44.516±0.0160
pH (%) pH (برحسب درصد)	5.403±0.005
Protein (%) پروتئین (برحسب درصد)	15.883±0.015
Fat (%) چربی (برحسب درصد)	7.190±0.020
Ash (%) خاکستر (برحسب درصد)	7.033±0.035
Phytic acid (mg g ⁻¹) اسید فیتیک (برحسب درصد)	14.41±0.410
Iron (mg 100g ⁻¹) آهن (برحسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم)	23.840±0.030

$$\text{Hardness 1} = +2.39 - 0.3175 * A - 0.0749 * B - 0.0786 * C - 0.1474 * AB - 0.2346 * AC + 0.0889 * A^2 - 0.2443 * B^2 - 0.0653C^2 \quad (1)$$

$$\text{Hardness 3} = +2.80 - 0.1634 * A + 0.0199 * B - 0.2144 * C - 0.1728 * AC + 0.1419 * BC - 0.0641B^2 \quad (2)$$

نان بربری غنی شده با آرد سویا، نشان داد که روند افزایش سفتی نان‌های حاوی ۱ و ۵ درصد سوربیتول در مقایسه میان روز اول و دوم از زمان نگهداری، کمتر از نمونه شاهد بود. علت آن می‌تواند اثر پلاستیسایزری سوربیتول بر کاهش میزان پیوندهای عرضی در نشاسته رتروگرید شده، باشد.

قابلیت جویدن نان در روز اول و سوم پس از پخت، تحت اثر مستقل امولسیفایر SSL و آنزیم زایلاناز کاهش معنی‌داری یافت (p<۰/۰۱). ضمن آنکه اثر قند الکلی سوربیتول نیز در روز اول پس از پخت، منفی

مطالعات گومز-راف و همکاران (Gomes-Ruffi et al., 2012) نشان داد که امولسیفایر SSL اثر قابل ملاحظه‌ای بر کاهش پارامتر سفتی نان در زمان ۰، ۶ و ۱۰ روز پس از پخت دارد. این امر نشانگر اثر نرم‌کنندگی این بهبوددهنده در طی زمان نگهداری طولانی مدت است. در واقع امولسیفایر SSL از طریق تشکیل کمپلکس با مولکول‌های نشاسته و کاهش وزن مولکولی آن‌ها، باعث تأخیر در روند بیات شدن نان می‌گردد. همچنین مطالعات پورفرزاد و همکاران (Pourfarzad et al., 2011) درخصوص اثر قند الکلی سوربیتول بر

۰/۶۳۷۸ درصد امولسیفایر SSL، ۰/۳۹۸۶ درصد آنزیم زایلاناز و ۴/۷۸۳۸ درصد قند الکی سوربیتول کمترین میزان قابلیت جویدن را در روزهای اول و سوم پس از پخت داشتند. دو تیمار یاد شده حاوی مقادیر بالای آنزیم زایلاناز می‌باشند که این مطلب بیانگر اثر قابل ملاحظه این ماده در بهبود پارامتر قابلیت جویدن است. اثر مثبت آنزیم زایلاناز بر خصوصیات بافتی نان از جمله قابلیت جویدن، به واسطه توزیع مجدد آب از طریق پنتوزان‌ها به شبکه گلوتهی و محدود کردن تشکیل پیوندهای عرضی میان پروتئین‌های گلوتهی می‌باشد (Ghoshal et al., 2013). مطابق با نتایج بدست آمده در این تحقیق، در پژوهشی که بٹ و همکاران (Both et al., 2020) در خصوص اثر آنزیم زایلاناز بر خصوصیات بافتی نان تولید شده با آرد کامل گندم انجام دادند، کاهش قابل توجهی در پارامتر قابلیت جویدن نان مشاهده کردند.

$$\text{Chewiness 1} = +0.0044 - 0.0006 * A - 0.0003 * B - 0.0003 * C - 0.00003AB + 0.0005 * AC - 0.0008 * BC + 0.0004 * A^2 - 0.0003 * B^2 - 0.0002 \quad (3)$$

$$\text{Chewiness 3} = +0.0056 - 0.0002 * A - 0.0003 * B - 0.0003 * C - 0.0001AB + 0.0002 * BC - 0.0006 * B^2 - 0.0006 * C^2 \quad (4)$$

پژوهش سارابه‌ای و همکاران (Sarabhai et al., 2021) نیز نشان داد که افزودن آنزیم زایلاناز باعث کاهش قابل توجه در پارامتر پیوستگی نان تولید شده با آرد ارزن و آکالیفا، به خصوص در غلظت ۰/۱ درصد آنزیم می‌گردد. آن‌ها بیان داشتند که دیپلمریزاسیون نشاسته و هیدرولیز گلوتهن، مسئول ایجاد این تغییرات در نان است. درمقابل پژوهش شاه و همکاران (Shah et al., 2006) درخصوص اثر آنزیم زایلاناز مشاهده گردید که آنزیم زایلاناز باعث بهبود قابل ملاحظه‌ی پارامتر پیوستگی حاوی آرد کامل گندم می‌شود.

$$\text{Cohesiveness 1} = +0.3148 + 0.0013 * A - 0.0048 * B - 0.0108 * C + 0.0085AC - 0.0020BC - 0.0148 * A^2 + 0.0052 B^2 + 0.0034 C^2 \quad (5)$$

$$\text{Cohesiveness 3} = +0.2735 + 0.0052 * A - 0.0101 * B - 0.0067 * C + 0.0341 * AB - 0.0164 * BC + 0.0060 B^2 - 0.025 * C^2 \quad (6)$$

موجب کاهش بسیار معنی‌دار این پارامتر گردید (p<۰/۰۰۰۱). درضمن بنابر شکل ۱ با افزایش متقابل مقدار آنزیم زایلاناز و قند الکی SSL، الاستیسیته نان در روز سوم پس از پخت افزایش یافت (p<۰/۰۰۱).

و معنی‌دار بود (p<۰/۰۱)، این نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها در جدول ۳ و معادلات ۳ و ۴ است که در ذیل آورده شده‌اند. همچنین تمامی اثرات متقابل و مضاعف متغیر قابلیت جویدن مغز نان در روز اول معنی‌دار بودند (p<۰/۰۱)، اما در روز سوم تنها اثرات متقابل و مضاعف آنزیم زایلاناز و قند الکی سوربیتول معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). بنابر نتایج شکل ۱ افزایش متقابل امولسیفایر SSL و قند الکی باعث کاهش مقدار قابلیت جویدن در روز اول پس از پخت شد. همچنین با افزایش میزان SSL و زایلاناز قابلیت جویدن نان در روز سوم پس از پخت در ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. درضمن باوجود افزایش اندک در مقدار پارامتر قابلیت جویدن در روز سوم نسبت به روز اول، تیمار شماره ۷ با ترکیب مواد بهبود دهنده شامل : ۰/۴ درصد امولسیفایر SSL، ۰/۰۵ درصد آنزیم زایلاناز و ۳ درصد قند الکی سوربیتول و تیمار شماره ۴ با

طبق نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها در جدول ۳ و معادلات ۵ و ۶ اثر آنزیم زایلاناز در روزهای اول و سوم بر پارامتر پیوستگی نان، کاهش معنی‌دار است (p<۰/۰۵). ضمن آنکه اثر مستقل قند سوربیتول در روز اول نیز بر این پارامتر منفی و معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۱). اما با افزایش متقابل مقدار آنزیم زایلاناز و قند الکی سوربیتول در روز سوم پس از پخت، بر طبق شکل ۱ مقدار پیوستگی نان به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۱).

پارامتر الاستیسیته نان در روز اول و سوم پس از پخت بنابر معادلات ۷ و ۸ و آنالیز داده‌ها در جدول ۳، در اثر افزودن امولسیفایر SSL و قند الکی سوربیتول در حالت خطی، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۱). علاوه بر این اثر خطی آنزیم زایلاناز نیز در روز سوم

جدول ۳- مقادیر معنی داری اجزاء معادله درجه دوم و پارامترهای آماری آن‌ها برای ویژگی‌های بافتی نان در روز اول و سوم پس از پخت
Table 3- The significant values of the components of the quadratic equation and their statistical parameters for the textural properties of bread on the first and third day after baking

Source	Hardness (First day)	Hardness (Third day)	Chewiness (First day)	Chewiness (Third day)	Cohesiveness (First day)	Cohesiveness (Third day)	Springiness (First day)	Springiness (Third day)
منبع	سفتی (روز اول)	سفتی (روز سوم)	قابلیت جویدن (روز اول)	قابلیت جویدن (روز سوم)	پیوستگی روز اول	پیوستگی روز سوم	اول الاستیسیته روز	الاستیسیته روز سوم
P-Value (Model)	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****
(مدل)								
P-Value (A)	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	0.0034**	ns	ns	<0.0001****	<0.0001****
P-Value (B)	ns	0.0111*	0.0047**	0.0003*	0.241*	0.0179*	ns	0.0111*
P-Value (C)	ns	<0.0001****	0.0009**	ns	<0.0001****	ns	<0.0001****	<0.0001****
P-Value (AB)	0.0167*	ns	0.0112*	ns	ns	0.0001****	ns	ns
P-Value (AC)	0.0009****	0.0002****	0.0003****	ns	0.0045**	ns	ns	ns
P-Value (BC)	ns	0.0008****	<0.0001****	0.0319*	ns	0.0051**	ns	0.0082**
P-Value (A ²)	0.0433*	ns	0.0003**	ns	<0.0001****	ns	ns	ns
P-Value (B ²)	<0.0001****	0.0196*	0.0045**	<0.0001****	0.0138*	ns	0.0056**	0.0031**
P-Value (C ²)	ns	ns	0.0248*	<0.0001****	ns	0.0001****	ns	0.0123*
P-Value (Lack of Fit)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
(عدم برازش)								
R ²	0.9309	0.9372	0.9618	0.9588	0.9158	0.9210	0.9588	0.9124
ضریب تبیین								
Adjusted-R ²	0.8806	0.9006	0.9274	0.9288	0.8545	0.8636	0.9288	0.8720
ضریب تبیین اصلاح								
C.V.	6.59	3.27	6.37	4.47	6.77	4.83	2	1.70
ضریب تغییرات								

A, B, C, ns, *, **, *** and **** respectively indicate SSL emulsifier, xylanase enzyme, sugar alcohol sorbitol, non-significance, significance at levels ($p < 0.05$), ($p < 0.01$), ($p < 0.001$) and ($p < 0.0001$).

به ترتیب نشان دهنده امولسیفایر SSL، آنزیم زایلاناز، قند الکلی سوربیتول، عدم معنی داری، معنی داری در سطوح ($p < 0.05$)، ($p < 0.01$)، ($p < 0.001$) و ($p < 0.0001$) هستند.

ns, C, B, A

جدول ۴- مقادیر معنی داری اجزاء معادله درجه دوم و پارامترهای آماری آن ها برای رطوبت پوسته و مغز نان، افت وزن و حجم مخصوص
Table 4- The significant values of the components of the quadratic equation and their statistical parameters for bread crust and crumb moisture, weight loss and specific volume

Source	Moisture of crumb (First day)	Moisture of crumb (Third day)	Moisture of Crust (First day)	Moisture of crust (Third day)	Weight loss	Specific volume
منبع	رطوبت مغز نان (روز اول)	رطوبت مغز نان (روز سوم)	رطوبت پوسته نان (روز اول)	رطوبت پوسته نان (روز سوم)	افت وزن	وزن مخصوص
P-Value (Model)	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****
مدل						
P-Value (A)	ns	ns	0.0002***	<0.0001****	ns	0.0139*
P-Value (B)	<0.0001****	ns	0.0027**	ns	ns	<0.0001****
P-Value (C)	ns	<0.0001****	0.0010**	ns	<0.0001****	0.0004***
P-Value (AB)	0.0175*	ns	ns	ns	ns	<0.0001****
P-Value (AC)	0.0035**	0.0110*	ns	<0.0001****	0.0014**	0.0353*
P-Value (BC)	ns	0.0070**	ns	0.0383*	0.0053**	ns
P-Value (A ²)	ns	ns	0.0241*	ns	0.0259*	0.0009***
P-Value (B ²)	0.0001****	0.0002***	0.0010**	0.0299*	ns	<0.0001****
P-Value (C ²)	0.0007***	ns	0.0006*	0.0344*	0.0005***	ns
P-Value (Lack of Fit)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
(عدم برازش)						
R ²	0.9158	0.9210	0.9125	0.9046	0.9286	0.9495
ضریب تبیین						
Adjusted-R ²	0.8545	0.8636	0.8510	0.8489	0.8644	0.9201
ضریب تبیین اصلاح شده						
ضریب تغییرات						

A, B, C, ns, *, **, *** and **** respectively indicate SSL emulsifier, xylanase enzyme, sugar alcohol sorbitol, non-significance, significance at levels (p< 0.05), (p<0.01), (p<0.001) and (p<0.0001).

به ترتیب نشان دهنده امولسیفایر SSL، آنزیم زایلاناز، قند الکی سوربیتول، عدم معنی داری، معنی داری در سطوح (p<0.05)، (p<0.01)، (p<0.001) و (p<0.0001) هستند.

ns, *, **, *** و **** به ترتیب نشان دهنده امولسیفایر SSL، آنزیم زایلاناز، قند الکی سوربیتول، عدم معنی داری، معنی داری در سطوح (p<0.05)، (p<0.01)، (p<0.001) و (p<0.0001) هستند.

جدول ۵ - مقادیر معنی داری اجزاء معادله درجه دوم و پارامترهای آماری آن ها برای رنگ تصویر و ویژگی های حفرات مغز نان
Table 5- Significant values of the components of the quadratic equation and their statistical parameters for the color of the bread image and the pores characteristics of bread crumb

Sourc منبع	Bread crust L*	Bread crust a*	Bread crust b*	Pore number تعداد حفرات مغز نان	Pore area fraction کسر سطح	Roundness گردی	Circularity مدور بودن	Solidity یکپارچگی
P-Value (Model) (مدل)	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****
P-Value (A)								
P-Value (B)	<0.0001****	ns	ns	<0.0001****	0.0005***	0.0011**	0.0063**	0.0006****
P-Value (C)	<0.0001****	0.0003***	<0.0001****	ns	ns	0.0034**	ns	ns
P-Value (AB)	0.0010**	0.0004***	0.0001****	0.0003***	ns	0.0293*	ns	ns
P-Value (AC)	0.0003***	ns	0.0012**	ns	0.0046**	<0.0001****	0.0010**	ns
P-Value (BC)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P-Value (A ²)	ns	0.0081**	0.0051**	ns	ns	0.0284*	0.0023**	0.0011**
P-Value (B ²)	ns	0.0003***	0.002***	0.0119*	<0.0001****	0.0199*	<0.0001****	<0.0001****
P-Value (C ²)	0.0261*	<0.0001****	ns	0.0193*	ns	0.0057**	ns	ns
P-Value (Lack of Fit)	0.0121*	ns	0.0387*	ns	ns	ns	0.0002***	0.0002***
(عدم برازش)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
R ²								
ضریب تبیین	0.9451	0.9071	0.9392	0.9053	0.8965	0.9048	0.9063	0.9208
Adjusted-R ²								
ضریب تبیین اصلاح شده	0.9052	0.8642	0.9038	0.8501	0.8361	0.8493	0.8516	0.8747
C.V.								
ضریب تغییرات	0.7597	3.11	3.42	9.01	9.46	3.40	0.7597	1.71

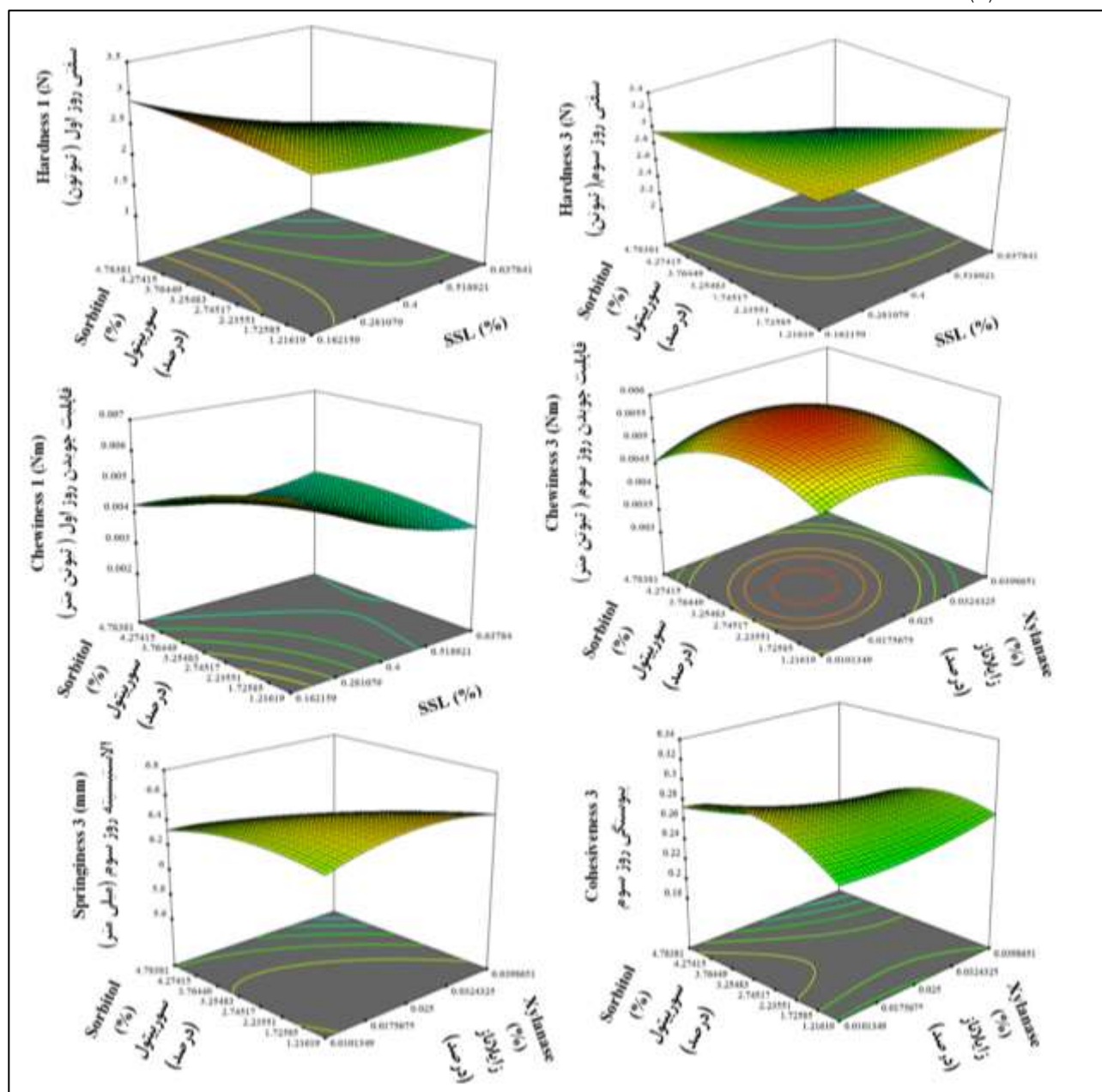
A, B, C, ns, *, **, ***, **** respectively indicate SSL emulsifier, xylanase enzyme, sugar alcohol sorbitol, non-significance, significance at levels (p<0.0001), (p<0.01), (p<0.001) and (p<0.0001).
(p<0.05), (p<0.01), (p<0.001) and (p<0.0001).
(p<0.001), (p<0.01), (p<0.001) and (p<0.0001) respectively indicate SSL emulsifier, xylanase enzyme, sugar alcohol sorbitol, non-significance, significance at levels (p<0.05), (p<0.01), (p<0.001) and (p<0.0001).
(p<0.05), (p<0.01), (p<0.001) and (p<0.0001) respectively indicate SSL emulsifier, xylanase enzyme, sugar alcohol sorbitol, non-significance, significance at levels (p<0.05), (p<0.01), (p<0.001) and (p<0.0001).
(p<0.05), (p<0.01), (p<0.001) and (p<0.0001) respectively indicate SSL emulsifier, xylanase enzyme, sugar alcohol sorbitol, non-significance, significance at levels (p<0.05), (p<0.01), (p<0.001) and (p<0.0001).

$$\text{Springiness 1} = +6.87 - 0.04294 * A + 0.0011 * B - 0.2035 * C + 0.0865AC - 0.1159 * B^2$$

(۷)

$$\text{Springiness 3} = +6.87 - 0.2391 * A - 0.0863 * B - 0.1599 * C - 0.1189BC - 0.1025 * B^2 - 0.0821C^2$$

(۸)



شکل ۱- اثر متقابل متغیرها برای ویژگی‌های بافتی نان در روز اول و سوم پس از پخت

Fig. 1. The interaction of variables for textural properties of bread on the first and third day after baking

به علاوه روند تغییرات الاستیسیته در روز سوم نسبت به روز اول کاهش بود. تیمارهای شماره ۲ و ۱۷ که دارای مقادیر حداقل امولسیفایر SSL و قند الکلی سوربیتول و به ترتیب ۰/۰۱۳ و ۰/۳۹۶۸ درصد آنزیم زایلاناز بودند، بالاترین میزان الاستیسیته را در روزهای اول و سوم داشتند.

آرایینوزایلان‌های محلول حاصل از تجزیه فرم نامحلول به وسیله آنزیم زایلاناز، کشش کمتری نسبت به جذب آب داشته و با افزایش جذب آب در شبکه گلوتن-نشاسته، باعث بهبود الاستیسیته نان می گردند (Ghoshal et al., 2016). در پژوهش شاه و همکاران (Shah et al., 2006) نیز مشخص شد که آنزیم زایلاناز تأثیر چندانی بر پارامتر الاستیسیته نان حاصل از آرد کامل ندارد و حتی کاهش ناچیزی در الاستیسیته نان‌ها قابل مشاهده است.

اثر مواد بهبوددهنده بر حجم مخصوص نان

بنابر نتایج آنالیز داده‌ها در جدول ۴ و معادله ۹، هر سه ماده بهبوددهنده در حالت خطی دارای اثر مثبت معنی‌دار بر پارامتر حجم مخصوص نان بودند ($p < 0.01$). مطابق با شکل ۲ در حالت متقابل نیز افزایش امولسیفایر SSL و آنزیم زایلاناز و همچنین متغیرهای امولسیفایر SSL و قند الکلی سوربیتول منجر به افزایش معنی‌دار این پارامتر گردید ($p < 0.05$). مشابه با نتایج این پژوهش، محققان اثر مثبت هر سه ماده بهبوددهنده را در نان‌های غنی‌شده با فیبر و دیگر انواع

نان‌ها مشاهده کرده‌اند. شونلشنر و همکاران (Schoenlechner et al., 2013) بیان کردند که آنزیم زایلاناز باعث افزایش قابل توجه حجم نان حاوی نسبت برابر آرد ارزن و گندم گردیده است. از جمله مکانیسم‌های تأثیرگذار بر افزایش حجم نان‌های غنی‌شده با فیبر در اثر افزودن آنزیم زایلاناز، تبدیل آرایینوزایلان‌های نامحلول به فرم محلول و تجزیه پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای به ساکاریدهای کوتاه زنجیره می‌باشد که به ترتیب موجب بهبود ظرفیت نگهداری گاز در خمیر و مداخله کمتر در تشکیل شبکه گلوتنی و افزایش حجم مخصوص می گردند (Altinel & Ünal, 2017a; Matsushita et al., 2017). به علاوه دودو و همکاران (Dudu et al., 2020) و آتالای و همکاران (Atalay et al., 2013) دریافتند که امولسیفایر SSL از طریق جذب آب بالا در ماتریکس آرد، سبب تسهیل برقراری پیوندهای عرضی بیشتر میان پروتئین و نشاسته و تشکیل شبکه گلوتنی قوی‌تر با ظرفیت نگهداری گاز بالاتر و حجم بیشتر در نان حاوی آرد مخلوط کاساوا-گندم و نان غنی‌شده با سیوس گندم سیاه و آرد کامل گندم می‌گردد. ژو و همکاران (Zhou et al., 2016) نیز بیان کردند که افزودن قند الکلی سوربیتول در مقادیر کمتر از ۸ درصد، از طریق افزایش هیدراتاسیون شبکه گلوتنی و بهبود قابلیت نگهداری گاز در آن، باعث افزایش حجم مخصوص نان سفید گردید و اضافه کردن مقادیر بالاتر از ۸ درصد موجب کاهش استحکام و قدرت ور آمدن خمیر شد.

$$\text{Specific Volume} = +2.53 + 0.0348 * A + 0.1118 * B + 0.0591 * C - 0.1000 * AB + 0.0375 * AC + 0.0512 * A^2 + 0.0819 * B^2 \quad (9)$$

یافت ($p < 0.05$). امولسیفایر SSL به واسطه ممانعت از هدر رفتن آب موجود در ساختار خمیر، موجب کاهش افت وزن نان می‌گردد (Lakshminarayan et al., 2006). به طور مشابه با نتایج این پژوهش، لویز-تنوریو و همکاران (López-Tenorio et al., 2015) دریافتند که افزایش در میزان امولسیفایر SSL از ۰ تا ۱ درصد، باعث افزایش وزن نان‌ها بلافاصله پس از پخت می‌گردد که این امر مرتبط با ظرفیت جذب آب بالا در این امولسیفایر است. در پژوهشی بیشه و کائور (Bhise & Kaur, 2014) نیز دریافتند که افزودن قند الکلی سوربیتول در مقادیر کم (۲ درصد) به واسطه افزایش ظرفیت جذب آب خمیر، باعث افزایش وزن نان پس از پخت گردیده است.

اثر مواد بهبوددهنده بر افت وزن نان

یکی از مهم‌ترین پدیده‌هایی که در طی فرآیند پخت نان اتفاق می‌افتد، از دست رفتن رطوبت است. اگر در فرآیند پخت نان مقدار رطوبت زیادی از دست برود، فرآورده حاصل وزنی پایین‌تر از حد معمول خواهد داشت. در این پژوهش تیمارهای حاوی دارای کمترین افت وزن بودند. همانطور که در معادله ۱۰، جدول ۴ و شکل ۲ نشان داده شده است، اثر خطی قند الکلی سوربیتول بر افت وزن نان بسیار معنی‌دار و مثبت بود ($p < 0.0001$) و همچنین تقابل این ماده با امولسیفایر SSL حاکی از این امر بود که با افزایش مقدار امولسیفایر SSL و کاهش قند الکلی سوربیتول، مقدار افت وزن نان پس از پخت به صورت معنی‌داری کاهش

$$\text{Weight Loss} = +17.53 - 0.3074 * A + 0.5605 * B + 2.43 * C + 0.5909 * AB + 1.87AC + 1.51 * BC + 0.8310A^2 - 0.5645B^2 - 1.60 * C^2 \quad (10)$$

اثر مواد بهبوددهنده بر رطوبت نان

محتوای رطوبت به طور مستقیم با پارامتر نرمی بافت نان ارتباط دارد. آنالیز داده‌ها در جدول ۴ و معادلات ۱۱ و ۱۲ نشان داد که اثر مستقل آنزیم زایلاناز بر رطوبت مغز نان در روز اول پس از پخت مثبت و بسیار معنی‌دار بود ($p < 0.0001$) و با افزایش مقادیر آنزیم زایلاناز، رطوبت مغز نان در روز اول پس از پخت، افزایش یافت. هم‌طور که در شکل ۲ نمایش داده شده است، اثر متقابل این آنزیم با امولسیفایر SSL نیز در روز اول مثبت و معنی‌دار بود ($p < 0.05$). اما در روز سوم افزایش خطی قند الکلی سوربیتول باعث کاهش بسیار معنی‌دار رطوبت مغز نان گردید ($p < 0.0001$)، درحالی‌که اثر متقابل آنزیم زایلاناز با قند الکلی سوربیتول بر این پارامتر موجب افزایش معنی‌دار آن شد ($p < 0.01$). بررسی محتوای رطوبت مغز نان‌ها در روز سوم نسبت به روز اول، نمایانگر روند کاهشی آن بود. نمونه شماره ۱۷ که دارای کمترین میزان قند الکلی سوربیتول و مقدار بالای آنزیم زایلاناز است، بالاترین میزان محتوای رطوبت در مغز نان در زمان ۳ روز پس از پخت داشت. قند الکلی سوربیتول و امولسیفایر SSL به ترتیب در روز اول و سوم پس از پخت بنابر نتایج آنالیز داده‌ها در جدول ۴ و معادلات ۱۳ و ۱۴، به صورت مستقل باعث کاهش معنی‌دار رطوبت پسته نان گردیدند ($p < 0.01$). در روز سوم پس از پخت، تقابل امولسیفایر SSL و قند الکلی سوربیتول در روز سوم پس از پخت که در شکل ۲ نشان داده شده است، رطوبت پسته نان را به صورت بسیار معنی‌داری کاهش داد ($p < 0.0001$). مقایسه رطوبت نمونه‌های نان در روز اول و سوم نشان داد که مقدار این کمیت نرخ افزایشی دارد. اما امولسیفایر SSL و قند الکلی سوربیتول نقش به سزایی در جلوگیری از مهاجرت رطوبت از مغز

نان به پوسته دارند و تیمارهای شماره ۱۰ با دارا بودن مقادیر ۰/۸ درصد SSL و ۳ درصد سوربیتول و تیمار شماره ۴ که حاوی ۰/۶۳۷۸ درصد SSL و ۴/۷۸ درصد سوربیتول می‌باشند، دارای کمترین میزان رطوبت در پوسته نان در روز سوم بودند.

آنزیم زایلاناز از طریق هیدرولیز همی سلولزها به اجزاء کوچکتر که دارای قابلیت نگهداری آب بالاتری هستند، باعث ممانعت از توزیع مجدد آب بین گلوتن و نشاسته و همچنین نگهداری آب در مغز نان و ممانعت از خروج آن می‌گردد (Ahmad et al., 2014). مشابه با نتایج بدست آمده در این پژوهش در خصوص رطوبت مغز نان، تب و همکاران (Tebben et al., 2020) نیز پس از بررسی تأثیر ۵ آنزیم مختلف از جمله آنزیم زایلاناز را بر رطوبت مغز نان حاصل از آرد کامل گندم دریافتند که محتوای رطوبت نان‌ها پس از افزودن آنزیم زایلاناز، افزایش یافت ولی تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین نمونه شاهد و نمونه حاوی آنزیم مشاهده نشد. وجود گروه‌های هیدروکسیل در ساختار قندهای الکلی که موجب ایجاد ظرفیت بالایی برای اتصال با مولکول‌های آب در آن‌ها می‌گردد، موجب جلوگیری از خروج آب در نمونه در طی مدت زمان نگهداری می‌شود (Ding & Yang, 2021). بنابراین کاهش محتوای رطوبت پسته نان‌ها در اثر افزودن قند الکلی پس از ۳ روز زمان نگهداری را می‌توان به ظرفیت جذب آب بالا در این قندها و ممانعت از خروج آب از مغز نان به پوسته، نسبت داد. پورفرزاد و همکاران (Pourfarzad et al., 2014) نیز دریافتند که امولسیفایر SSL با دارا بودن خاصیت آب دوستی، نسبت به سایر اجزاء نان توانایی برقراری پیوندهای قوی‌تری با مولکول‌های آب دارد و به واسطه ظرفیت نگهداری آب بالا، از خروج آب جلوگیری می‌کند.

$$\text{Crumb Moisture}_1 = +42.71 + 26.20 * A + 0.8990 * B - 0.0889 * C - 0.4959AB - 0.6576 * AC - 0.2665 * A^2 - 0.7470 * B^2 - 0.6184C^2 \quad (11)$$

$$\text{Crumb Moisture}_3 = +0.4090 + 0.1423 * A + 0.0862 * B - 0.7489 * C + 0.3600 * AC - 0.03900 * BC + 0.1571A^2 - 0.4669B^2 - 0.1594 * C^2 \quad (12)$$

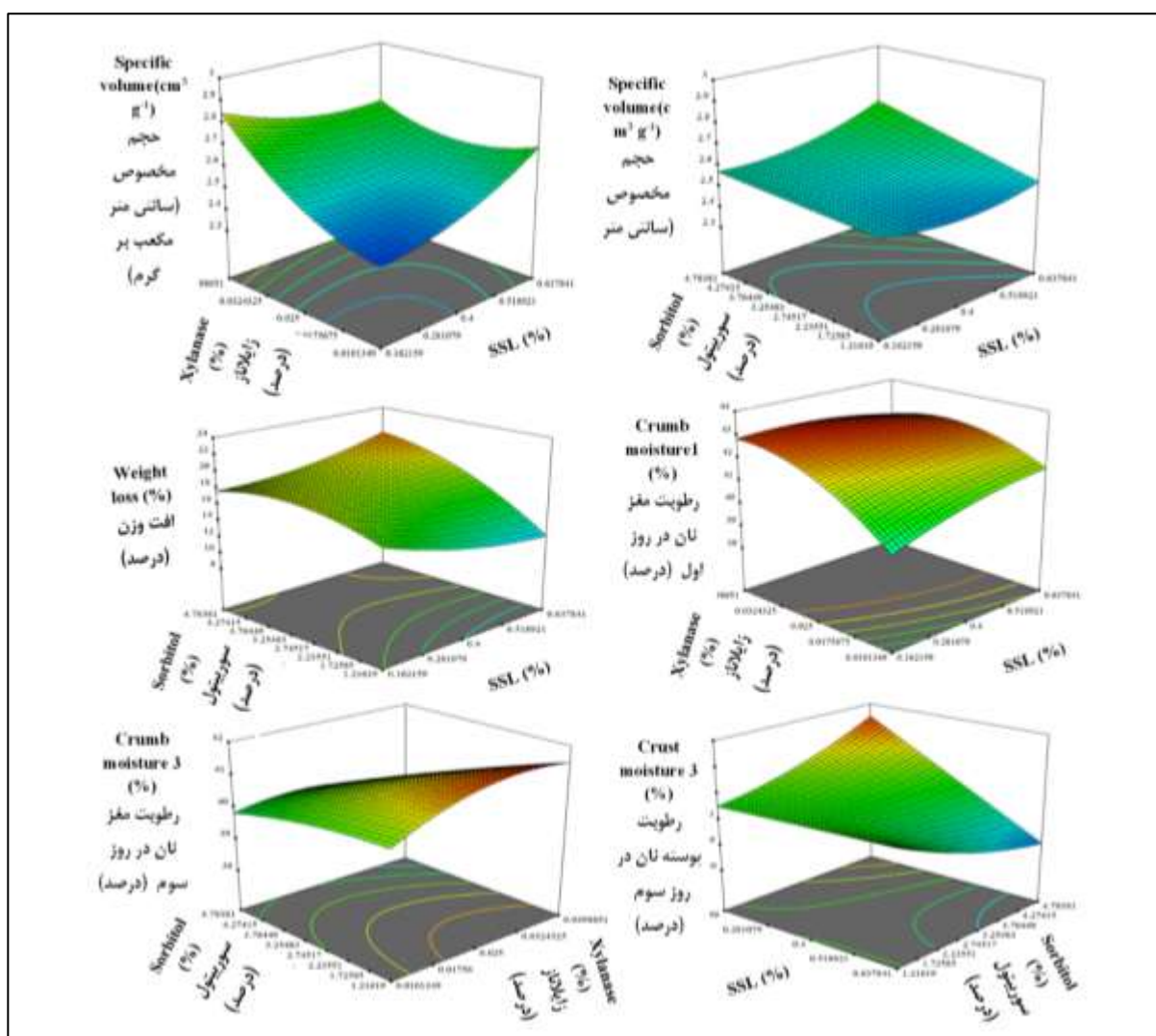
$$\text{Crust Moisture}_1 = +22.24 + 0.9390 * A + 0.6775 * B - 0.7822 * C + 0.03425 * AB + 0.1325 * BC - 0.4477 * A^2 + 0.7614 * B^2 - 0.8198 * C^2 \quad (13)$$

$$\text{Crust Moisture}_3 = +30.31 - 0.8781 * A + 0.2257 * B - 0.0035 * C - 0.9825 * AC - 0.3625 * BC + 0.2842 * B^2 - 0.2755 * C^2 \quad (14)$$

اثر مواد بهبوددهنده بر پارامترهای رنگ پوسته نان

در این پژوهش رنگ پوسته نان، در فضای رنگ CIELAB مورد مطالعه قرار گرفت. پارامتر L^* محدوده روشنایی را از صفر (رنگ سفید) تا ۱۰۰ (رنگ سیاه) مشخص می کند. پژوهش ها نشان می دهد که وجود ذرات سیوس در نان باعث کاهش روشنایی در رنگ آن می گردد (Wijngaard & Arendt, 2006). نتایج حاصل از آنالیز داده ها در جدول ۵، معادله ۱۵ و شکل ۳، بیانگر این نکته بود که افزایش آنزیم

زایلاناز و امولسیفایر SSL در حالت مستقل و همچنین به صورت متقابل موجب افزایش معنی دار پارامتر روشنایی پوسته نان گردید، بررسی های گوشال و همکاران (Ghoshal et al., 2016) نشان داد که آنزیم زایلاناز باعث افزایش پارامتر L^* در پوسته نان حاوی آرد کامل گندم می شود. اما یافته های ماتسوشیتا و همکاران (Matsushita et al., 2017) مغایر با این نتایج بود و با اضافه کردن آنزیم زایلاناز روشنایی پوسته نان به مقدار قابل توجهی کاهش یافت.



شکل ۲- اثر متقابل متغیرها بر پارامترهای حجم مخصوص، افت وزن و رطوبت پوسته و مغز نان

Fig. 2. The interaction effect of variables on the parameters of specific volume, weight loss and moisture of crust and crumb of bread

جذب آب آزاد شده از پنتوزان ها به وسیله شبکه گلوتنی باشد. این امر نشان می دهد که فرآورده های نانوائی با جذب آب بالاتر دارای پارامتر

مقدار بالاتر پارامتر L^* در نان حاوی آنزیم زایلاناز ممکن است بواسطه توانایی این آنزیم در تبدیل آرابینوزایلان ها از فرم نامحلول به محلول و

نتایج بیشه و کاتور (Bhise & Kaur, 2017) با نتایج این پژوهش تطابق نداشت و افزودن قند الکلی سوربیتول منجر به افزایش قابل توجه پارامتر روشنایی پوسته نان گردید که علت آن را عدم شرکت قندهای الکلی در واکنش مایلارد و برهمکنش با آمینواسیدها عنوان می‌کنند.

$$\text{Crust } L^* = +80.89 + 1.51 * A + 1.06 * B - 0.7404 * C - 1.14AB + 0.3084 * AC - 0.2759 * A^2 + 0.4180 * B^2 + 0.4881C^2$$

(۱۵)

پژوهش افزودن آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوربیتول با افزایش پارامتر b^* موجب افزایش زردی و همچنین آنزیم زایلاناز با کاهش پارامتر a^* منجر به کاهش قرمزی گردیدند که باعث بهبود کیفیت رنگ نان شد. مطالعات احمد (Ahmad, 2016)، در رابطه با اثر قند الکلی سوربیتول بر نان نتایج متفاوتی را نشان داد و کاهش قابل ملاحظه‌ای در پارامتر-های a^* و b^* با افزودن قند الکلی سوربیتول در پوسته نان بدون گلوتن مشاهده گردید. نتایج پژوهش گوشال و همکاران (Ghoshal et al., 2016) و ماتسوشیتا و همکاران (Matsushita et al., 2017) حاکی از کاهش قابل ملاحظه در پارامترهای a^* و b^* پوسته نان تولید شده با آرد کامل در اثر افزودن آنزیم زایلاناز بود که در مورد پارامتر a^* با نتایج این پژوهش همخوانی داشت.

$$\text{Crust } a^* = -5.59 - 0.0041 * A - 0.2263 * B + 0.2225 * C - 0.1909 * BC - 0.2247A^2 - 0.2876 * B^2$$

(۱۶)

$$\text{Crust } b^* = +21.05 - 0.1712 * A - 1.80 * B + 1.08 * C - 1.06 * AB - 0.8537 * BC - 0.9545 * A^2 + 0.4304 * C^2$$

(۱۷)

پورفرزاد و همکاران (Pourfarzad et al., 2014) به نتایج مشابهی در رابطه با اثر مستقل منفی امولسیفایر SSL بر تخلخل نان بربری دست یافتند. اما مطالعه دودو و همکاران (Dudu et al., 2020) درخصوص اثر افزودن امولسیفایر SSL به نان حاوی مخلوط آردکاساوا و گندم نتایج نشان داد که این بهبوددهنده باعث افزایش تعداد حفرات، تخلخل و سطح حفرات مغز نان گردید که این امر منطبق با جذب آب بالا به وسیله امولسیفایر SSL و بهبود خصوصیات مرتبط با پایداری خمیر و افزایش ظرفیت نگهداری گاز در آن می‌باشد.

$$\text{Pore Area Fraction} = +0.0484 - 0.0172 * A - 0.0054 * B + 0.0062 * C + 0.0165 * AB + 0.0040 * AC + 0.0269 * A^2 - 0.0059 * C^2$$

(۱۸)

روشنایی بالاتری هستند (Niu et al., 2017). امولسیفایر SSL نیز باتوجه به ظرفیت جذب آب بالا و افزایش جذب آب در خمیر، با رقیق سازی آمینواسیدها و قندها موجب افزایش پارامتر روشنایی پوسته نان غنی شده با لوبین و نان بربری گردید (Bilgiçli et al., 2014; Pourfarzad et al., 2012). اما درخصوص اثر قند الکلی سوربیتول

در فضای CIELAB پارامتر a^* محدوده روشنایی را از ۶۰+ (رنگ قرمز) تا ۶۰- (رنگ سبز) و پارامتر b^* محدوده روشنایی را از ۶۰+ (رنگ زرد) تا ۶۰- (رنگ آبی) مشخص می‌کند. برطبق معادله ۱۶ و آنالیز داده‌ها در جدول ۵، اثر مستقل آنزیم زایلاناز بر پارامتر a^* رنگ پوسته نان کاهنده بود ($p < 0.01$). ضمن آنکه افزایش قند الکلی سوربیتول موجب افزایش خطی معنی‌دار پارامتر a^* در پوسته نان گردید ($p < 0.01$). اثر متقابل آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوربیتول نیز بر پوسته نان که در شکل ۳ ارائه شده است، بر این پارامتر افزایش‌دهنده بود ($p < 0.01$). نتایج معادله ۱۷ و آنالیز داده‌ها در جدول ۵، حاکی از این مطلب بود که افزایش خطی آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوربیتول موجب افزایش معنی‌دار پارامتر b^* در پوسته نان گردید ($p < 0.05$). غنی‌سازی نان با ذرات سیوس گندم، منجر به کاهش رنگ زرد و ایجاد رنگ قرمز مایل به خاکستری در پوسته نان می‌شود (Ghoshal et al., 2013). در این

اثر مواد بهبوددهنده بر ویژگی‌های حفرات مغز نان

در این مطالعه اثر مواد بهبوددهنده بر تعداد حفرات، کسر سطح حفرات، مدور بودن، گردی و پیکپاچگی حفرات مغز نان مورد بررسی قرار گرفت. تعداد حفرات و کسر سطح حفرات مغز نان برطبق معادلات ۱۸ و ۱۹ و آنالیز داده‌ها که در جدول ۵ ارائه شده است، با افزایش خطی امولسیفایر SSL کاهش معنی‌داری یافت ($p < 0.001$). لیکن تقابل امولسیفایر SSL با آنزیم زایلاناز که در شکل ۳ نمایش داده شده است، نشانگر افزایش معنی‌دار کسر سطح حفرات مغز نان می‌باشد ($p < 0.01$).

$$\text{Pore Number} = +287.95 - 64.2 * A - 3.17 * B - 39.52 * C + 14.50AB - 18.75 * AC + 22.25 * A^2 + 20.30 * B^2 \quad (۱۹)$$

شاهی و زانتان بر نان انجام شد، ناجی-طیسی و محبی (Naji-Tabasi & Mohebbi, 2015) به این نتیجه دست یافتند که نانی که دارای ساختاری با حفرات دایره‌ای شکل است، پایداری مورفولوژیکی بالاتری دارد. بنابراین اثر مثبت امولسیفایر SSL بر پارامتر مدور بودن در این پژوهش، باعث افزایش پایداری ساختار حفرات مغز نان می‌گردد. به‌طور مشابه در پژوهش صورت گرفته در رابطه با اثر امولسیفایر SSL بر ساختار حفرات مغز نان بربری مشخص شد که افزودن امولسیفایر SSL تا میزان ۲ درصد باعث افزایش پارامتر مدور بودن حفرات مغز نان می‌گردد (Pourfarzad et al., 2012).

پارامتر مدور بودن نشان‌دهنده این مطلب است که شکل یک حفره تا چه میزان به شکل دایره نزدیک است و اگر مقدار این پارامتر در حفرات تصویر یک باشد، آن حفرات دایره کامل هستند و در صورتی که مقدار صفر در این پارامتر نشان دهنده کشیدگی حفره است. اثر مستقل متغیر امولسیفایر SSL، بر ویژگی مدور بودن حفرات مغز نان بنابر نتایج آنالیز داده‌ها در **جدول ۵** و **معادله ۲۰**، به‌صورت معنی‌داری مثبت بود ($p < 0.01$) و افزایش این متغیر منجر به افزایش این ویژگی گردید. به‌علاوه اثر متقابل این امولسیفایر و آنزیم زایلاناز نیز سبب افزایش بسیار معنی‌دار ($p < 0.001$) این ویژگی گردید که در **شکل ۳** نشان داده شده است. در پژوهشی که در رابطه با افزودن صمغ دانه

$$\text{Circularity} = +0.3743 + 0.0193 * A - 0.0080 * B + 0.0019 * C - 0.0332AB - 0.0294 * BC - 0.0398 * A^2 - 0.0291 * C^2 \quad (۲۰)$$

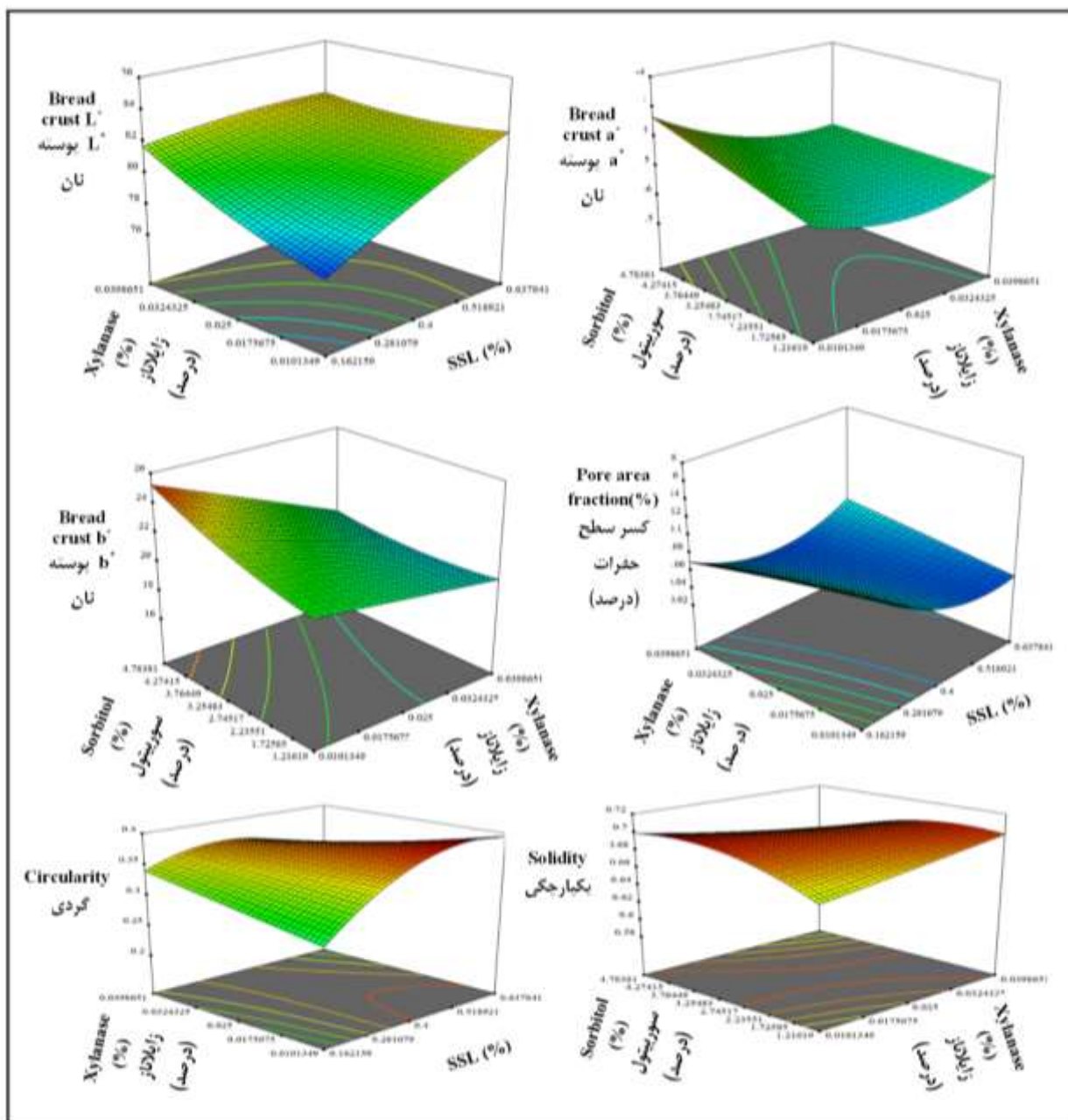
معنی‌داری افزایش می‌دهد ($p < 0.01$). مطابق با نتایج به دست آمده در این پژوهش در رابطه با اثر مثبت خطی امولسیفایر SSL بر پارامتر یکپارچگی حفرات مغز نان، پژوهش محققان نشان داد که افزودن هیدروکلئید به نان باعث شکل‌گیری حفراتی با شکل معمول‌تر و پارامتر یکپارچگی بالاتر می‌گردد (Naji-Tabasi & Mohebbi, 2015).

بهینه‌سازی

در نرم افزار دیزاین اکسپرت می‌توان بهینه‌سازی را در راستای رساندن یک پاسخ یا ترکیبی از دو یا چند پاسخ به یک میزان مشخص، حداقل یا حداکثر انجام داد. در این پژوهش نیز هدف دستیابی به ترکیب بهینه‌ای از مواد بهبوددهنده در راستای دستیابی به حداقل مقدار سفتی مغز نان و حداکثر میزان پیوستگی، حجم مخصوص، رطوبت مغز نان، پارامترهای روشنایی رنگ پوسته و یکپارچگی حفرات مغز نان بود. درصد بهینه مواد بهبود دهنده به‌وسیله نرم‌افزار دیزاین اکسپرت، با میزان مطلوبیت ۰/۷۰۴ به‌ترتیب برای امولسیفایر SSL، آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوربیتول ۰/۵۶۳، ۰/۴۰ و ۲/۳۵۶ به‌دست آمد.

پارامتر گردی نشان می‌دهد که شکل یک حفره تا چه میزان متفاوت از شکل یک دایره است و حفرات گرد دارای مقدار گردی برابر با عدد یک هستند. برطبق **معادله ۲۱** و آنالیز داده‌ها در **جدول ۵**، افزایش متغیر قند الکلی سوربیتول منجر به افزایش معنی‌دار ویژگی گردی حفرات مغز نان شد ($p < 0.05$). اما افزایش امولسیفایر SSL و آنزیم زایلاناز باعث کاهش معنی‌دار این ویژگی گردید ($p < 0.01$). مشابه با پارامتر مدور بودن، هرچه یک حفره گردتر باشد، بافت نان دارای ساختار مورفولوژیکی پایدارتری است (Naji-Tabasi & Mohebbi, 2015). بنابراین در این پژوهش با افزایش میزان قند الکلی سوربیتول در فرمولاسیون نان غنی شده با سیوس، ساختار مورفولوژیکی نان بهبود می‌یابد. پارامتر یکپارچگی نشان دهنده ثبات و پایداری بافت مغز نان است. زمانی که مقدار پارامتر یکپارچگی برابر با عدد ۱ است، نشان دهنده آن است که حفرات به شکل جامد می‌باشند و مقادیر کمتر از یک نشانگر یک شکل غیرمعمول در حفرات است. براساس **معادله ۲۲** و داده‌ها در **جدول ۵**، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش مقادیر امولسیفایر SSL باعث افزایش معنی‌دار ویژگی یکپارچگی حفرات مغز نان گردید ($p < 0.01$). ضمناً همانطور که در **شکل ۳** قابل مشاهده است، تقابل امولسیفایر SSL و قند الکلی سوربیتول مقادیر این ویژگی را به‌طور

$$\text{Roundness} = +0.3693 - 0.1435 * A - 0.1221 * B + 0.0831 * C - 0.0130 * AB + 0.3202 * AB + 0.1093 * BC + 0.0874 * A^2 - 0.1093 * B^2 \quad (۲۱)$$



شکل ۳- اثر متقابل متغیرها برای رنگ تصویر و ویژگی‌های حفرات مغز نان

Fig. 3. The interaction effect of variables for the color of the bread image and the pore characteristics of bread crumb

$$\text{Solidity} = +69.69 + 0.0143 * A - 0.0018 * B - 0.0014 * C - 0.0063AC - 0.0171 * BC - 0.0262 * A^2 - 0.0158 * C^2$$

(۲۲)

همانطور که در جدول ۶ نشان داده شده است، دمای اولیه ژلاتیناسیون در روز اول پس از پخت به‌طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از

ارزیابی خصوصیات حرارتی نمونه بهینه و شاهد

نمونه شاهد است ($p < 0.05$). آنتالپی ژلاتیناسیون نیز در روز اول و سوم پس از پخت در نمونه بهینه به طور قابل توجهی در مقایسه با نمونه‌ی شاهد پایین‌تر می‌باشد ($p < 0.05$). محققان دریافتند که افزودن آنزیم زایلاناز با کاهش نرخ تشکیل و توسعه ساختارهای کریستالی و در نتیجه فرآیند کریستالیزاسیون نشاسته، موجب کم شدن آنتالپی ژلاتیناسیون در نان حجیم حاوی آرد کامل گندم می‌گردد (Ghoshal *et al.*, 2017). همچنین قندهای الکلی همچون سوربیتول قادرند که میان زنجیره‌های نشاسته در نواحی آمورف پیوندهای هیدروژنی برقرار کنند و از این طریق باعث محدود کردن تورم نشاسته و افزایش دمای ژلاتیناسیون گردند (Ding & Yang, 2021). مطالعه پژوهشگران در

مورد اثر امولسیفایر SSL بر خصوصیات گرمایی نشاسته نشان داد که امولسیفایر SSL باعث کاهش مقادیر آنتالپی در طی فرآیند ژلاتیناسیون می‌گردد. کاهش آنتالپی ژلاتیناسیون به وسیله امولسیفایر مرتبط با برهمکنش میان بخش هیدروفوب امولسیفایر و مارپیچ آمیلوز در مولکول نشاسته است. همچنین این امر می‌تواند بنا به برقراری پیوند بین بخش هیدروفیل امولسیفایر با آمیلوپکتین به واسطه‌ی پیوند هیدروژنی باشد. در نتیجه برقراری این پیوندها آب در دسترس گرانول‌های نشاسته کم می‌گردد که باعث کاهش آنتالپی ژلاتیناسیون می‌شود (Gómez *et al.*, 2013).

جدول ۶- خصوصیات حرارتی نمونه بهینه و شاهد (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

Table 6- Thermal properties of optimal and control samples (mean $\pm$ standard deviation)

Samples	Initial gelatinization temperature on the first day (°C) دمای اولیه ژلاتیناسیون در روز اول	Gelatinization peak temperature on the first day (°C) دمای پیک ژلاتیناسیون در روز اول	Gelatinization enthalpy on the first day (J g ⁻¹) آنتالپی ژلاتیناسیون در روز اول	Initial gelatinization temperature on the third day (°C) دمای اولیه ژلاتیناسیون در روز سوم	Gelatinization peak temperature on the third day (°C) دمای پیک ژلاتیناسیون در روز سوم	Gelatinization enthalpy on the third day (J g ⁻¹) آنتالپی ژلاتیناسیون در روز سوم
Optimal sample نمونه بهینه	81.22 $\pm$ 3.035 ^b	101.34 $\pm$ 3 ^a	58.10 $\pm$ 3.005 ^a	66.10 $\pm$ 3.02 ^a	101.33 $\pm$ 3.05 ^a	113.16 $\pm$ 3.01 ^a
Control sample نمونه شاهد	71.16 $\pm$ 3.01 ^a	98.26 $\pm$ 3.035 ^a	163.26 $\pm$ 3.035 ^b	64 $\pm$ 3 ^a	96 $\pm$ 3 ^a	211.33 $\pm$ 3.51 ^b

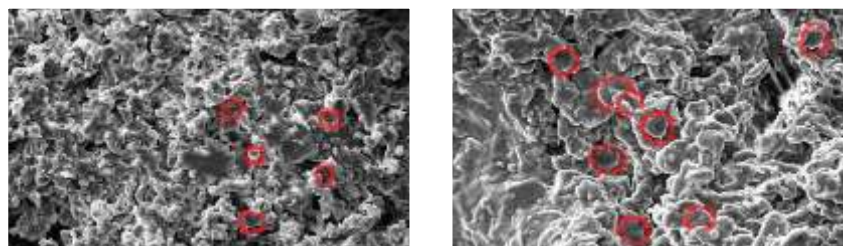
وجود اعداد با حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین دو نمونه است ($p < 0.05$).

The presence of numbers with the same letters in each column indicates that there is no significant difference between the two samples ($p < 0.05$).

ارزیابی تصاویر SEM بافت مغز نان نمونه بهینه و نان شاهد

ارزیابی تصاویر حاصل از شکل ۴ نشان می‌دهد که نان بهینه دارای شبکه گلوتنی متراکم‌تری نسبت به نمونه شاهد است و میان اجزاء شبکه گلوتنی برهمکنش‌های بیشتری مشاهده می‌شود. اما در نان شاهد (نمونه فاقد مواد بهبوددهنده) شبکه گلوتنی دارای پیوستگی کم‌تری است و گرانول‌های نشاسته موجود در آن تورم بیشتری نسبت به نمونه بهینه دارند که باتوجه به نتایج آزمون DSC، می‌توان گفت که مقادیر بیشتر نشاسته در دسترس و تورم بیشتر آن‌ها موجب افزایش ژلاتیناسیون و در نتیجه رتروداسیون بیشتر در نان شاهد می‌گردد.

امولسیفایر SSL از طریق ایجاد برهمکنش با آمیلوز در گرانول‌های نشاسته و برقراری پیوند با شبکه گلوتنی باعث افزایش برهمکنش نشاسته-پروتئین، توسعه ساختاری فشرده‌تر در بافت محصول گردیده است (Van Steertegem *et al.*, 2013). همچنین امولسیفایر SSL و قند الکلی سوربیتول می‌توانند از طریق برقراری پیوند با مولکول‌های نشاسته و تغییر خصوصیات جذب آب در گرانول‌های نشاسته، باعث کاهش تورم در آن‌ها گردند (Ding *et al.*, 2019). آنزیم زایلاناز نیز باعث ایجاد شبکه گلوتنی غیرمنقطع می‌شود که گرانول‌های نشاسته را به شکل بهتری در خود محصور ساخته است (Ghoshal *et al.*, 2017).



شکل ۴- تصاویر SEM نمونه‌های بهینه و شاهد به ترتیب از چپ به راست

(دایره‌های قرمز نشان دهنده گرانول‌های نشاسته هستند).

Fig. 4. SEM images of optimal and control samples from left to right respectively (Red circles represent starch granules).

نتیجه‌گیری

اول پس از پخت، روشنایی پوسته، کسر سطح حفرات و مدور بودن مغز نانوا اثر متقابل آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوربیتول بر پارامتر پیوستگی در روز سوم پس از پخت به میزان قابل ملاحظه‌ای موجب بهبود این پارامترها گردید که این مطلب نشان دهنده اثر هم‌افزای این سه ماده بهبوددهنده در بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی و تکنولوژیکی نان می‌باشد.

در نهایت نمونه بهینه و شاهد از نظر خصوصیات حرارتی و ریزساختار نان مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج آزمون DSC حاکی از کاهش قابل توجه مقادیر آنتالپی در روز اول و سوم پس از پخت و افزایش دمای اولیه واکنش در نمونه بهینه نسبت به نمونه شاهد بود. همچنین آنالیز تصاویر SEM نشان‌دهنده وجود گرانول‌های نشاسته در دسترس با تورم بیشتر در نمونه شاهد بود، اما در ریزساختار نمونه بهینه متراکم‌تر و میزان گرانول‌های نشاسته در دسترس و تورم آن‌ها کمتر بود. امولسیفایر SSL از طریق برهمکنش با بخش‌های آمیلوز و آمیلوپکتین در گرانول‌های نشاسته، قند الکلی سوربیتول به واسطه برقراری برهمکنش با مولکول‌های آب احاطه‌کننده زنجیره‌های نشاسته و یا برقراری پیوند میان زنجیره‌های نشاسته در نواحی آمورف و آنزیم زایلاناز بنابر کاهش نرخ تشکیل ساختارهای کریستالی می‌توانند به صورت هم‌افزایی موجب کاهش ژلاتیناسیون گرانول‌های نشاسته، آنتالپی و در نتیجه فرآیند رتروگراداسیون آمیلوپکتین و بیاتی نان گردند. در نتیجه نمونه‌ای بهینه با خواص تغذیه‌ای و کیفیت مناسب بدست آمد.

در این پژوهش به منظور تولید نانی با خواص تغذیه‌ای و کیفیت مطلوب، به بررسی تأثیر ترکیب مواد بهبوددهنده امولسیفایر SSL، آنزیم زایلاناز و قند الکلی سوربیتول بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، تکنولوژیکی نان قالبی غنی شده با ۱۵ درصد سیوس فراوری شده گندم و نهایتاً خواص حرارتی و ریزساختار نمونه بهینه با استفاده از روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر پرداختیم. نتایج آزمایشات نشان داد که سفتی مغز نان تحت تأثیر امولسیفایر SSL و قند الکلی سوربیتول و قابلیت جویدن با افزودن امولسیفایر SSL و آنزیم زایلاناز، به طور معنی‌داری کاهش یافتند. هر سه ماده بهبوددهنده موجب افزایش معنی‌دار حجم مخصوص نان گردیدند. ویژگی‌های مرتبط با حفرات مغز نان همچون یکپارچگی و مدور بودن در اثر افزودن امولسیفایر SSL و ویژگی گردی با اضافه کردن قند الکلی سوربیتول به طور معنی‌داری بهبود یافتند. روشنایی پوسته نان نیز به وسیله امولسیفایر SSL و آنزیم زایلاناز به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. آنزیم زایلاناز و دو ماده قند الکلی و امولسیفایر SSL نیز به ترتیب باعث بهبود معنی‌دار رطوبت مغز و پوسته نان گردید. به علاوه اثر متقابل امولسیفایر SSL و قند الکلی سوربیتول بر پارامترهای قابلیت جویدن نان در روز اول پس از پخت، حجم مخصوص و یکپارچگی مغز نان و همچنین اثر متقابل آنزیم زایلاناز و امولسیفایر SSL بر پارامترهای حجم مخصوص، قابلیت جویدن در روز سوم، رطوبت مغز نان در روز

منابع

1. AACC, I. (2000). *Approved Methods of the AACC*. Association of Cereal Chemists, St. Paul.
2. Ahmad, A. (2016). *Optimization of gluten free bread formulation by adding xanthan gum, Potato starch and sorbitol using response surface methodology*. Pp. 607–15 in The National Conference for Postgraduate Research.
3. AOAC. (2000). *Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC INTERNATIONAL, Maryland, USA(2003).
4. Burak, A., & Sezgin Ünal, S. (2017a). The effects of amyloglucosidase, glucose oxidase and hemicellulase utilization on the rheological behaviour of dough and quality characteristics of bread. *International Journal of Food Engineering*, 13(2). <https://doi.org/10.1515/ijfe-2016-0066>.
5. Burak, A., & Sezgin Ünal, S. (2017b). The effects of certain enzymes on the rheology of dough and the quality characteristics of bread prepared from wheat meal. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1628–37. <http://doi.org/10.1007/s13197-017-2594-8>.

6. Bakke, A., & Vickers, Z. (2007). Consumer liking of refined and whole wheat breads. *Journal of Food Science*, 72(7), 473–80. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00440.x>
7. Suresh, B., & Kaur, A. (2014). Baking quality, sensory properties and shelf life of bread with Polyols. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2054–61. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1256-3>.
8. Suresh, B., & Kaur, A. (2017). Synergistic effect of polyols and fibres on baking, sensory and textural quality of bread with improved shelf life. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 1–12. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.001>
9. Bilgiçli, N., Demir, M.K., & Yilmaz, C. (2014). Influence of some additives on dough and bread properties of a wheat-lupin flour blend. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 6(2), 167–73. <https://doi.org/10.3920/QAS2012.0193>
10. Borges, V.C., & Salas-Mellado, M.M. (2016). Influence of α -amilase, trehalose, sorbitol, and polysorbate 80 on the quality of gluten-free bread. *International Food Research Journal*, 23(5), 1973–79.
11. Both, J., Biduski, B., Gómez, M., Elita Bertolin, T., Tereza Friedrich, M., & Carlos Gutkoski, L. (2020). Micronized whole wheat flour and xylanase application: dough properties and bread quality. *Journal of Food Science and Technology*, 56(10), 3902–12. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04851-2>
12. Colakoglu, Abdullah S., & Hazim, Ö. (2012). Potential use of exogenous lipases for DATEM replacement to modify the rheological and thermal properties of wheat flour dough. *Journal of Cereal Science*, 55(3), 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.02.001>
13. Ding, Sh., Peng, B., Li, Y., & Yang, J. (2019). Evaluation of specific volume, texture, thermal features, water mobility, and inhibitory effect of staling in wheat bread affected by maltitol. *Food Chemistry*, 283, 123–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.045>
14. Ding, Sh., & Yang, J. (2021). The effects of sugar alcohols on rheological properties, functionalities, and texture in baked products – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 111(March), 670–79. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.009>
15. Dost, K., & Tokul, O. (2006). Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 558(1–2), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.035>
16. Driss, D., Bhiri, F., Siela, M., Bessess, S., Chaabouni, S., & Ghorbel, R. (2013). Improvement of breadmaking quality by xylanase GH11 from *Penicillium occitanis* Pol6. *Journal of Texture Studies*, 44(1), 75–84. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2012.00367.x>
17. Dudu, Olayemi E., Ying Ma, Aminat Adelekan, Ajibola B. Oyedeji, Samson A. Oyeyinka, & Jessica W. Ogungbemi. (2020). Bread-making potential of heat-moisture treated cassava flour-additive complexes. *Lwt*, 130(April), 109477. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109477>
18. Eduardo, M., Svanberg, U., & Ahrné, L. (2016). Effect of hydrocolloids and emulsifiers on the shelf-life of composite cassava-maize-wheat bread after storage. *Food Science and Nutrition*, 4(4), 636–44. <https://doi.org/10.1002/fsn3.326>.
19. Ferng, L., Liou, Ch., Yeh, R., & Hsin, Sh. (2015). Food hydrocolloids physicochemical property and glycemic response of chiffon cakes with different rice Fl Ours. *Food Hydrocolloids*, 53, 172–79. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.020>
20. Ghoshal, G., Shivhare, U.S., & Banerjee, U.C. (2013). Effect of xylanase on quality attributes of whole-wheat bread. *Journal of Food Quality*, 36(3), 172–80. <https://doi.org/10.1111/jfq.12034>
21. Ghoshal, G., Shivhare, U.S., & Banerjee, U.C. (2016). Thermo-mechanical and micro-structural properties of xylanase containing whole wheat bread. *Food Science and Human Wellness*, 5(4), 219–29. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.09.001>
22. Ghoshal, G., Shivhare, U.S., & Banerjee, U.C. (2017). Rheological properties and microstructure of xylanase containing whole wheat bread dough. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 1928–37. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2627-3>
23. Gomes, R., Rodrigues, C., Henrique da Cunha, R., Lopes Almeida, E., Kil Chang, Y., & Joy Steel, C. (2012). Effect of the emulsifier sodium stearoyl lactylate and of the enzyme maltogenic amylase on the quality of pan bread during storage.” *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.014>
24. Gómez, Analía V., Buchner, D., C. Tadini, C., C. Añón, M., & C. Puppo, M. (2013). Emulsifiers: effects on quality of fibre-enriched wheat bread. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1228–39. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0772-7>
25. Gonzalez, Rafael C., & Richard E. Woods. (2008). *Digital Image Processing Third Edition Pearson*.
26. Grausgruber, H., Miesenberger, S., Schoenlechner, R., & Vollmann, J. (2008). Influence of dough improvers on whole-grain bread quality of einkorn wheat. *Acta Alimentaria*, 37(3), 379–90.

- <https://doi.org/10.1556/AAlim.2008.0009>
27. Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., & Abecassis, J. (2007). Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 327–47. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.09.008>
 28. Leandra Zafalon, J., Batista da Silva, C., Joy Steel, C., & Kil Chang, Y. (2012). Influence of xylanase addition on the characteristics of loaf bread prepared with white flour or whole grain wheat flour. *Food Science and Technology*, 32(4), 844–49. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000116>
 29. Jiang, Y., Yimeng Zh., Yifan Zh., Sizhou Q., Yun D., & Yanyun, Zh. (2019). Effect of dietary fiber-rich fractions on texture, thermal, water distribution, and gluten properties of frozen dough during storage. *Food Chemistry*, 297(January), 124902. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.176>
 30. Kassem, Mohammed A., & Alaa S.A. (2013). Spectrophotometric determination of iron in environmental and food samples using solid phase extraction. *Food Chemistry*, 141(3), 1941–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.038>
 31. Khalid, Khairunizah H., Jae-bom, O., & Simsek, S. (2017). Whole wheat bread: effect of bran fractions on dough and end-product quality. *Journal of Cereal Science*, 78, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.03.011>
 32. Kiumarsi, M., Shahbazi, M., Yeganehzad, S., Majchrzak, D., Lieleg, O., & Winkeljann, B. (2019). Relation between structural, mechanical and sensory properties of gluten-free bread as affected by modified dietary fibers. *Food Chemistry*, 277, 664–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.015>
 33. Kumar, V., Amit K. Sinha, Harinder P. S. Makkar, & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 120(4), 945–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052APA>
 34. Lakshminarayan, Sudha M., Rathinam, V., & KrishnaRau, L. (2006). Effect of maltodextrin and emulsifiers on the viscosity of cake batter and on the quality of cakes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(5), 706–12. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2400>
 35. Liu, W., Anne Brennan, M., Serventi, L., & Stephen Brennan, Ch. (2017). Effect of cellulase, xylanase and α -amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran. *Food Chemistry*, 234, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.160>
 36. López-Tenorio, Julián Alfredo, Eduardo Rodríguez-Sandoval, & Uriel Sepúlveda-Valencia, J. (2015). The influence of different emulsifiers on the physical and textural characteristics of gluten-free cheese bread. *Journal of Texture Studies*, 46(4), 227–39. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12121>
 37. Mahmut Hayali, A., Bilgiçli, N., Elgün, A., & Kürşat Demir, M. (2013). Effects of buckwheat (*Fagopyrum Esculentum* Moench) milling products, transglutaminase and sodium stearyl-2-lactylate on bread properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00607.x>
 38. Matsushita, K., Marvin Santiago, D., Noda, T., Tsuboi, K., Kawakami, S., & Yamauchi, H. (2017). The bread making qualities of bread dough supplemented with whole wheat flour and treated with enzymes. *Food Science and Technology Research*, 23(3), 403–10. <https://doi.org/10.3136/fstr.23.403>
 39. Mudgil, D., Barak, Sh., & Khatkar, B.S. (2016). Optimization of textural properties of noodles with soluble fiber, dough mixing time and different water levels. *Journal of Cereal Science*, 69(5), 104–10. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.02.015>
 40. 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), 110–19. <https://doi.org/10.1007/s11694-014-9216-1>
 41. Niu, Meng, G. Hou, G., Kindelspire, J., Krishnan, P., & Zhao, S. (2017). Microstructural, textural, and sensory properties of whole-wheat noodle modified by enzymes and emulsifiers. *Food Chemistry*, 223, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.021>
 42. Noort, M., Daan van Haaster, W.J., Hemery, Y., A. Schols, H., & J. Hamer, R. (2010). The effect of particle size of wheat bran fractions on bread quality—evidence for fibre–protein interactions. *Journal of Cereal Science*, 52(1), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.03.003>
 43. Phimolsiripol, Y., Siripatrawan, U., Tulyathan, V., & J. Cleland, D. (2008). Effects of freezing and temperature fluctuations during frozen storage on frozen dough and bread quality. *Journal of Food Engineering*, 84(1), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.016>
 44. Pourfarzad, A., Ahmadian, Z., & Tavassoli-Kafrani, M.H. (2019). The effect of sodium stearyl lactylate on structural changes of wheat gluten in a model system fortified with inulin: Investigation with fourier transform infrared spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 17(December 2018), 100175. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2018.12.001>
 45. Pourfarzad, A., Hosseini, M., & Khodaparast, H. (2014). Optimization of a Noveli improver gel formulation for barbari flat bread using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2344–56.

- <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0778-9>
46. Pourfarzad, A., Haddad Khodaparast, M.H., Karimi, M., Mortazavi, S.A., Ghiafeh Davoodi, M., Hematian Sourki, A., & Razavizadegan Jahromi, S.H. (2011). Effect of polyols on shelf-life and quality of flat bread fortified with soy flour. *Journal of Food Process Engineering*, 34(5), 1435–48. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00541.x>
 47. Pourfarzad, A., Mohebbi, M., & Mazaheri-Tehrani, M. (2012). Interrelationship between image, dough and barbari bread characteristics; use of image analysis to predict rheology, quality and shelf life. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(7), 1354–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.2980.x>
 48. Purhagen Jeanette, K., Malin Sjö, E., & Eliasson, A. (2011). Food hydrocolloids starch affecting anti-staling agents and their function in freestanding and pan-baked bread. *Food Hydrocolloids*, 25(7), 1656–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.03.004>
 49. Sarabhai, S., Tamilselvan, T., & Prabhasankar, P. (2021). Role of enzymes for improvement in gluten-free foxtail millet bread: It's effect on quality, textural, rheological and pasting properties." *Lwt*, 137, 110365. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110365>
 50. Schoenlechner, R., Szatmari, M., Bagdi, A., & Tömösközi, S. (2013). Optimisation of bread quality produced from wheat and proso millet (*Panicum miliaceum* L.) by adding emulsifiers, transglutaminase and xylanase. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 361–66. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.020>
 51. Shah, Amita R., Shah, R.K., & Madamwar, D. (2006). Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. *Bioresource Technology*, 97(16), 2047–53. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.006>
 52. Shahbazi, M., Rajabzadeh, Gh., & Sotoodeh, Sh. (2017). Functional characteristics, wettability properties and cytotoxic effect of starch film incorporated with multi-walled and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.031>
 53. Sheikholeslami, Z., Mahfouzi, M., Karimi, M., & Ghiafehdavoodi, M. (2021). modification of dough characteristics and baking quality based on whole wheat flour by enzymes and emulsifiers supplementation. *LWT - Food Science and Technology*, 139(3), 110794. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110794>
 54. Silva, D., Batista, C., Lopes Almeida, E., & Kil Chang, Y. (2016). Interaction between xylanase, glucose oxidase and ascorbic acid on the technological quality of whole wheat bread. *Food Technology*, 46(12), 2249–56. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151587>
 55. Van Steertegem, B., Pareyt, B., Brijs, K., & A. Delcour, J. (2013). Impact of mixing time and sodium stearyl lactylate on gluten polymerization during baking of wheat flour dough. *Food Chemistry*, 141(4), 4179–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.017>
 56. Sun, D. (2016). *Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation*. Academic Press.
 57. Lauren, T., Chen, G., Tilley, M., & Li, Y. (2020). Individual Effects of Enzymes and Vital Wheat Gluten on Whole Wheat Dough and Bread Properties. *Journal of Food Science*, 85(12), 4201–8. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15517>
 58. Yaoqi, T., Xu, X., Li, Y., Jin, Zh., Chen, H., & Wang, H. (2009). Effect of β -cyclodextrin on the long-term retrogradation of rice starch. *European Food Research and Technology*, 228(5), 743–48. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0985-9>
 59. Wijngaard, H.H., & Arendt, E.K. (2006). Buckwheat. *Cereal Chemistry*, 83(4), 391–401. <https://doi.org/10.1094/CC-83-0391>
 60. Tianyi, Y., Bai, Y., Wu, F., Yang, N., Zhang, Y., Bashari, M., Jin, Zh., & Xu, X. (2014). Combined effects of glucose oxidase, papain and xylanase on browning inhibition and characteristics of fresh whole wheat dough. *Journal of Cereal Science*, 60(1), 249–54. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.04.002>
 61. Chong Fei, Z., Qian, P., Meng, J., Ming Gao, Sh., & Rong Lu, R. (2016). Effect of glycerol and sorbitol on the properties of dough and white bread. *Cereal Chemistry*, 93(2), 196–200. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-04-15-0087-R>
 62. Zulfiqar, A., Sadiq Butt, M., Ahmed, A., Riaz, Syed Mubashar Sabir, M., Farooq, U., & Ur Rehman, F. (2014). Effect of *Aspergillus niger* xylanase on dough characteristics and bread quality attributes. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2445–53. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0734-8>



Evaluation of Physicochemical and Microstructure Properties of Expanded Quinoa

E. Ghiami¹, A. Koocheki², E. Milani^{3*}

Received: 2022.01.24

Revised: 2022.02.28

Accepted: 2022.03.08

Available Online: 2022.05.15

How to cite this article:

Ghiami, E., Koocheki, A., & Milani, E. (2023). Evaluation of physicochemical and microstructure properties of expanded quinoa. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 451-462. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74911.1139>

Introduction

Quinoa, which is known as the mother grain, has higher protein content than common cereals and possesses a large lysine content. Quinoa is composed mainly of carbohydrates (60-75%), of which 10-13% is dietary fiber. Quinoa also has a slightly higher protein content (12-16%) compared with cereal grains and fat content (5-9%) that is rich in unsaturated fatty acids. Quinoa seeds contain similar or slightly higher amounts of bioactive compounds such as polyphenols (2.7-3.8 g/kg). Moreover, quinoa is gluten-free, thus providing the ability to enhance the selection of gluten-free products for consumers with celiac disease, but this type of characteristic is challenging to development of bakery products from quinoa with desirable physicochemical properties. Processing of cereal grains and pseudo-cereals into products that deliver a nutritive value to consumers represents a considerable opportunity for large scale food processing. There have been some reported studies on roasting, extrusion, steam pre-conditioning and pearling of quinoa for further uses. Extrusion cooking is a promising technology for improvement of functional properties of quinoa flour. The Evaluation of physicochemical properties and microstructure of Expanded quinoa as affected by extrusion conditions was the main goal of this project.

Material and Methods

In this study, a parallel twin-screw extruder (Jinan Saxin, China) with die diameter of 3 mm was applied. The effects of extrusion process parameters including feed moisture content (14 and 16%) and die temperature (130, 150 and 170 °C) on final moisture content, bulk density, water absorption index (WAI), color parameters L^* (lightness), a^* (redness), b^* (yellowness), hardness, and microstructure of Expanded quinoa were studied. Extrusion was carried out using a co-rotating twin screw extruder with L/D ratio of 10:1 and die diameter of 4 mm. The feed rate of flour and the screw speed were set at 40 kg/h and 200 rpm, respectively. The physicochemical properties were measured using standard methods. The hardness measurement was performed by a texture analyzer. The cylinder steel probe (2 mm diameter) was set to move at a speed of 1 mm/s. The samples were punctured by the probe to a distance of 10 mm. The color parameters of the samples were determined by the Hunterlab machine. The morphology of samples was assessed using a scanning electron microscopy (SEM).

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

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

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

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.74911.1139](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74911.1139)

Results and Discussion

A comprehensive study on impacts of extrusion processing conditions on quinoa flour was conducted. The effect of process variables on the physicochemical attributes of the extrudates was observed. the expanded quinoa with higher feed moisture content had greater moisture and those extruded at higher die temperatures showed lower moisture content ($p<0.05$). Moisture can reduce the shear force as a plasticizer and increase the amount of moisture absorption of the product. While increasing the die temperature, the effect of shear force on starch dextrification increases and reduces moisture absorption ($p<0.05$). WAI was significantly influenced by extrusion variables. In fact, feed moisture content and die temperature both positively changed the WAI of quinoa flour so that all extruded samples had significantly higher WAI than the untreated sample ($p<0.05$). Moreover, the sample with the higher feed moisture content (24%) treated at the highest extrusion temperature (170 °C) showed the largest and lowest water absorption and Hardness respectively ($p<0.05$). Another important feature of expanded quinoa is the lightness index, the results revealed that extrusion cooking caused a reduction in L^* and enhancements in a^* and b^* . While changes in color parameters were more pronounced at more severe die temperature, higher feed moisture content counteracted the effects of cooking temperature on the color of the products. As expected from changes in the abovementioned color parameters, the sample with lower feed moisture content (16%) treated at the highest extrusion temperature (170 °C) experienced the greatest color change (ΔE). The texture profile analysis (TPA) indicated that higher feed moisture content yielded extrudates with harder texture whereas, extrusion at higher temperature resulted in lower hardness. The scanning electron micrographs showed that the native quinoa flour encompassed both small- and large-sized starch granules while the extruded sample mainly consisted of disaggregated particles. Furthermore, extrusion cooking of samples with higher feed moisture content caused formation of more uniform starch aggregates with smoother surfaces.

Keywords: Extrusion, Functional properties, Gluten free, Quinoa

مقاله پژوهشی

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ریزساختار فرآورده بافت داده شده کینوا^۱

الهام قیامی^۱ - آرش کوچکی^۲ - الناز میلانی^{۳*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۲/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۷

چکیده

آرد کینوا منبعی سرشار از اسیدآمینه‌های ضروری، فیبر غذایی، ویتامین‌های گروه ب، آلفاتوکروفرول و املاحی نظیر آهن و مس بوده و جایگزین مناسبی برای توسعه فرآورده‌های بدون گلوتن و بر پایه برنج می‌باشد. بدین منظور اصلاح برخی ویژگی‌های آرد کینوا با فرایندهای مختلف می‌تواند در جهت بهبود کیفیت و توسعه این قبیل فرآورده‌ها مؤثر باشد. این پژوهش با هدف تأثیر شرایط فرایند اکستروژن شامل رطوبت اولیه خوراک (۱۶ و ۲۴ درصد) و دمای پخت (۱۳۰، ۱۵۰ و ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد) بر ویژگی‌های رطوبت، دانسیته توده، شاخص جذب آب، پارامترهای رنگ، سفتی بافت، و ریزساختار فرآورده بافت داده شده کینوا، مورد بررسی قرار گرفت. مطابق نتایج، افزایش همزمان رطوبت خوراک و دمای فرایند منجر به کاهش معنی دار رطوبت نهایی فرآورده بافت داده شده کینوا شد ($p < 0.05$). نمونه فرایند شده در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ورودی ۱۶ درصد دارای کمترین میزان دانسیته بود. شاخص جذب آب کلیه نمونه‌های اکستروژن شده بیشتر از نمونه شاهد بود و این پدیده با افزایش رطوبت اولیه خوراک و دمای پخت، بطرز معنی‌داری تشدید شد ($p < 0.05$). فرایند اکستروژن با کاهش معنی‌دار پارامتر L^* و افزایش پارامترهای a^* و b^* همراه بود ($p < 0.05$). در حالی که افزایش دمای فرایند منجر به افزایش تغییرات پارامترهای رنگ شد. افزایش رطوبت خوراک ورودی سبب افزایش سفتی بافت فرآورده گردید اما همزمان با افزایش دمای پخت؛ سفتی بافت کاهش یافت چنان‌که کمترین میزان سفتی ۸/۵۹ نیوتن گزارش شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روشی تجمعات بزرگ‌تر گرانول‌های نشاسته در نمونه‌های اکستروژن شده در مقایسه با نمونه شاهد را نشان دادند که با افزایش رطوبت خوراک ورودی، ظاهری یکنواخت‌تر و صاف‌تر به خود گرفتند. در مجموع می‌توان دریافت کاربرد اکستروژن به عنوان فناوری پیش پخت، روشی مطلوب برای بهبود ویژگی‌های عملکردی و تکنولوژیکی آرد کینوا و توسعه فرآورده‌های بدون گلوتن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکستروژن، فرآورده فاقد گلوتن، کینوا، ویژگی‌های عملکردی

مقدمه

بدون گلوتن می‌تواند راهکار افزایش کیفیت این قبیل فرآورده‌ها باشد. آرد گندم پر مصرف‌ترین آرد مورد استفاده در صنایع پخت می‌باشد. با این حال، افرادی که از عارضه عدم تحمل گلوتن یا سلیاک رنج می‌برند، قادر به مصرف فرآورده‌های تولیدی از آرد گندم نیستند (El Khoury *et al.*, 2018). از جایگزین‌های جذاب گندم، کینوا می‌باشد.

استراتژی تنوع فرآورده‌های غذایی سالم و مغذی سبب افزایش جهانی نرخ فروش سالانه گردیده است. تولید چنین فرآورده‌هایی منجر به انجام پژوهش‌های وسیعی با محوریت بهبود کیفیت آنها شده است. معرفی منابع ارزان قیمت جایگزین برنج و یا بهبود خصوصیات آردهای

۱ و ۲- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

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

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

(Alandia et al., 2020). کینوا (*Chenopodium quinoa*) گیاهی یکساله از دسته گیاهان دولپه‌ای است و به دلیل سازگاری بالای آن با شرایط سخت آب و هوایی، در بسیاری از نقاط دنیا قابل کشت است (El-Sohaimy et al., 2019). دانه کینوا منبع غنی از فیبرهای تغذیه‌ای، آلفا توکوفرول‌ها و ترکیبات فنلی، ویتامین‌های گروه B، و مواد معدنی مانند آهن، مس، منگنز و پتاسیم، اسیدهای چرب امگا-۶ و ویتامین E بوده و پروتئین آن بیش از دو برابر غلاتی مانند ذرت و برنج است و برخلاف گندم که از فقر اسید آمینه‌هایی مانند لیزین رنج می‌برد، از تعادل مناسبی از اسیدهای آمینه ضروری برخوردار است (El-Sohaimy et al., 2019; El Hazzam et al., 2020; Xu et al., 2019). علی‌رغم تمامی جذابیت‌های تغذیه‌ای یادشده، به دلیل نبود گلوتن در ترکیب کینوا و نقش بی بدیل آن در شکل‌گیری ساختار و بافت فرآورده‌های نانوبی، محصولات تولیدی از آرد کینوا از پذیرش بالایی بین مصرف‌کنندگان برخوردار نمی‌باشند (Cannas et al., 2020). بدین منظور، از تیمارهای فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی برای اصلاح توانایی پایین آردهای فاقد گلوتن در جذب آب و ایجاد شبکه سه‌بعدی پروتئینی و همچنین بهبود ویژگی‌های ناخوشایند حسی فرآورده‌های تولیدی از آنها مانند رنگ نامطلوب و سفتی زیاد استفاده شده است (El Khoury et al., 2018). در این میان، تیمارهای فیزیکی به دلیلی مزایایی همچون هزینه کم و پذیرش بالا نزد مصرف‌کنندگان (به دلیل عدم استفاده از ترکیبات شیمیایی سنتزی)، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند (Huang et al., 2020). فرایند هیدروترمال اکستروژن در میان تیمارهای فیزیکی مزایای بهتری در اصلاح ویژگی‌های فرآورده با راندمان بالا در زمان کوتاه دارد (Otondi et al., 2020). پخت اکستروژن بواسطه طیف متنوع محصولات به یکی از مشهورترین فرآیندهای کاربردی و اقتصادی در نیم قرن اخیر تبدیل شده است (Liu et al., 2017). فرایند اکستروژن پخت، به صورت مداوم است و با تلفیق انرژی مکانیکی (نیروی برشی) و حرارتی، منجر به پیش‌ژلاتینه‌شدن نشاسته، واسرشته‌شدن پروتئین، تخریب جزئی یا کلی ساختار بلوری و تشکیل کمپلکس‌های نشاسته-چربی و پروتئین-چربی می‌شود (Ma et al., 2019). تغییرات ساختاری ایجاد شده در آرد می‌تواند به گونه رضایت‌بخشی باعث بهبود جذب آب، حجم ویژه، ظرفیت جذب آب و ویسکوزیته خمیر شود (Ma et al., 2019). میزان تغییرات ساختاری و عملکردی محصول اکستروژده وابسته به شرایط فرایند اکستروژن از جمله دمای پخت، میزان رطوبت، نرخ خوراک‌دهی به اکستروژر، سرعت چرخش مارپیچ آن و ... می‌باشد (Huang et al., 2020; Morteza Jafari et al., 2017). در پژوهشی در مورد بررسی تاثیر رطوبت خوراک و دمای پخت بر ویژگی‌های عملکردی و ساختاری آرد سورگوم نشان دادند که فرایند اکستروژن با تغییر در ویژگی‌های ژلاتینه‌شدن نشاسته منجر به کاهش

دانسیته و افزایش توانایی جذب آب آن شد. تاکنون پژوهش‌های مختلفی در خصوص اکستروژن آرد کامل غلات و یا ترکیب آنها انجام گرفته اما مطابق بررسی انجام شده پژوهش‌های محدودی در زمینه اکستروژن آرد کامل کینوا انجام شده است؛ در این ارتباط کوالسکی و همکاران (Kowalski et al., 2016) ویژگی فیزیکی‌شیمیایی کینوا رقم چیلی را تحت تاثیر شرایط مختلف فرایند شامل سرعت چرخش، دما و رطوبت خوراک ورودی اکستروژر، براین اساس با افزایش دمای پخت تا ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد میزان روشنایی، ساپونین و ترکیبات فنولی کاهش یافت. درصد انبساط این رقم کینوا در مقایسه با شرایط یکسان برای آرد گندم و ذرت کمتر بود از این رو رقم پیشنهادی، برای کاربرد به عنوان فرآورده پف داده نمی‌باشد. از این رو مطالعه رفتار آرد کینوا تحت تاثیر شرایط مختلف فرایند هیدرو ترمال نظیر پخت اکستروژن با رویکرد بهبود ویژگی‌های تکنولوژیکی و عملکردی آن و همچنین معرفی فرآورده‌های غذایی متنوع پیش پخت از کینوا به بازار مصرف از اهداف انجام مطالعه حاضر، قلمداد گردید.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه و پخت اکستروژن

دانه کینوا بوسیله آسیاب آزمایشگاهی، پودر شد و برای دستیابی به آردی با دانه‌بندی یکنواخت، از الک با مش ۵۰ عبور داده شد. پس از تنظیم رطوبت آرد کینوا به ۱۶ یا ۲۴ درصد به کمک روش مربع پیرسون، تیمار پخت اکستروژن در سه دمای متفاوت ۱۳۰، ۱۵۰ و ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد بوسیله اکستروژر دومارپیچ (مدل DS56، شرکت Jinan Saxin، چین) با قطر ۴ میلی‌متر و سرعت چرخش ماردون ۱۵۰ دور در دقیقه و دبی ۱۵۰ کیلو در ساعت انجام شد.

رطوبت

رطوبت نمونه‌ها بوسیله روش خشک‌کردن در آون، در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت، اندازه‌گیری شد (AOAC, 1990).

دانسیته توده

دانسیته توده نمونه‌های حجیم‌شده با روش جابجایی دانه‌های ارزن بر اساس استاندارد AOCC (2000) به شماره ۱۰-۰۵ محاسبه شد.

شاخص جذب آب

جهت اندازه‌گیری ضریب جذب آب میزان مقدار ۰/۵ تا ۱ گرم از نمونه به فالکونی که از قبل توزین شده اضافه شد. مقدار ۱۰ mL آب مقطر به نمونه اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط همزده شد. در مرحله بعد، مخلوط حاصل در سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm به

بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی فرآورده بافت داده شده کینوا از طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل استفاده شد. تمام آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. به منظور مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. در طراحی آزمایش، آنالیز نتایج و برازش منحنی‌ها از نرم‌افزار SPSS و EXCEL استفاده شد.

نتایج و بحث

رطوبت

فرآورده‌های اکستروژن شده رطوبت پایینی دارند و این عامل ماندگاری بالای این محصولات می‌باشد (O'Shea et al., 2014). میزان رطوبت از دست رفته به فشار بخار ایجاد شده و محتوای رطوبتی اولیه محصول بستگی دارد. اثر متغیرهای فرایند بر تغییر رطوبت معنی دار بود ($p < 0.05$). بطوری که محدوده تغییرات رطوبت نمونه‌ها ۴/۹-۹/۲۵ درصد گزارش شد. بیشترین میزان رطوبت فرآورده بافت داده شده به نمونه‌های با رطوبت خوراک ورودی بالا (۲۴ درصد) و کم‌ترین میزان به نمونه‌های با رطوبت خوراک ورودی پایین (۱۶ درصد) تعلق داشت (شکل ۱). نتایج مشابهی نیز توسط عصاره و همکاران (Asare et al., 2012) در فرآورده حجیم بر پایه آرد برنج- بادام زمینی گزارش شده است. تعدادی از محققین اعمال فرایند اکستروژن در دما و سرعت چرخش ماریچ بالا را سبب وقوع تغییرات ساختاری در پروتئین و در نهایت کاهش رطوبت محصول دانسته‌اند. با توجه به زمان توقف یکسان نمونه‌ها در اکستروژن، هر چه رطوبت اولیه بیشتر باشد، رطوبت نهایی آن پس از پخت اکستروژن نیز بالاتر است؛ افزایش رطوبت سبب کاهش دمای خمیر مذاب در حین عبور از هلیس گشته و ویسکوزیته خمیر کاهش یافته و همزمان با خروج محصول با رطوبت بالاتر خارج می‌گردد (O'Shea et al., 2014). همانگونه که در شکل ۱ نیز می‌توان دید، رطوبت نهایی محصول بدست آمده از اکستروژن آرد کینوا با رطوبت اولیه ۲۴ درصد در دمای اکستروژن ۱۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد به گونه معنی‌داری بیشتر از نمونه شاهد (آرد کینوا اکستروژن نشده) بود. افزایش رطوبت سبب کاهش دمای محفظه می‌شود. دمای پایین فرایند سبب کاهش ژلاتیناسیون و متعاقباً کاهش مصرف آب در این مرحله و افزایش رطوبت در فرآورده بافت داده شده گردید. پس از آن، با بالا رفتن دما، تبخیر بیشتر آب در این دماها اتفاق می‌افتد که در نتیجه آن رطوبت نهایی کاهش می‌یابد. در تحقیق صورت گرفته توسط اردمه و همکاران (Ardameh et al., 2019) در ارتباط با بررسی شرایط فرایند اکستروژن بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اسنک بر پایه مغز گردو و بلغور، گزارش شد که افزایش میزان رطوبت اولیه سبب افزایش مقدار رطوبت نهایی پس از اکستروژن و پخت ماده غذایی شده است. افزایش دمای اکستروژن سبب شد تا رطوبت نهایی اکستروژن بدست‌آمده در

مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت مایع رویی از مخلوط جدا و ماده ژل بجا مانده توزین شد. میزان شاخص جذب آب از نسبت وزن ژل باقیمانده به وزن نمونه خشک محاسبه و در واحد گرم بر گرم گزارش شد (Ardameh et al., 2019).

مولفه‌های سنجش رنگ

پارامترهای رنگی با استفاده از دستگاه هانتربل (مدل colorFlex EZ، شرکت HunterLab، ایالات متحده) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور، نمونه آرد شده در ظرف مخصوص دستگاه ریخته شد تا سطح آن کاملاً پوشانده شود و پس از قرار دادن محفظه تاریک بر روی ظرف، پارامترهای رنگی در فضای $L^*a^*b^*$ CIE اندازه‌گیری شدند. پارامترهای رنگ شامل L^* نشان‌دهنده روشنایی رنگ (۰ سیاه، ۱۰۰ سفید)، a^* نمایانگر رنگ سبز-قرمز (۱۲۰-، ۱۲۰+)، b^* شاخص رنگ آبی-زرد (۱۲۰-، ۱۲۰+) و ΔE نشان‌دهنده تغییر رنگ می‌باشند. شاخص تغییر رنگ از معادله (۱) محاسبه شد:

$$E = \sqrt{(L^* - L^*)^2 + (a^* - a^*)^2 + (b^* - b^*)^2} \quad (1)$$

در این رابطه، پارامترهای با پانویس °، شاخص‌های رنگی نمونه تیمار نشده می‌باشند (Cannas et al., 2020).

بافت‌سنجی

سختی با استفاده از دستگاه بافت‌سنج (مدل TA-Plus، شرکت Ametek Lloyd Instruments، ایالات متحده) و بکارگیری پروب استوانه‌ای ۲ میلی‌متری مورد ارزیابی قرار گرفت. پروب دستگاه با سرعت ۱ میلی‌متر بر ثانیه با load cell ۱۰۰ نیوتن، نمونه‌ها را تا ۷۰ درصد قطر اولیه تحت فشار قرار دادند و بیشترین نیروی تراکمی به عنوان سختی گزارش شد (Jafari et al., 2017).

ریزساختار

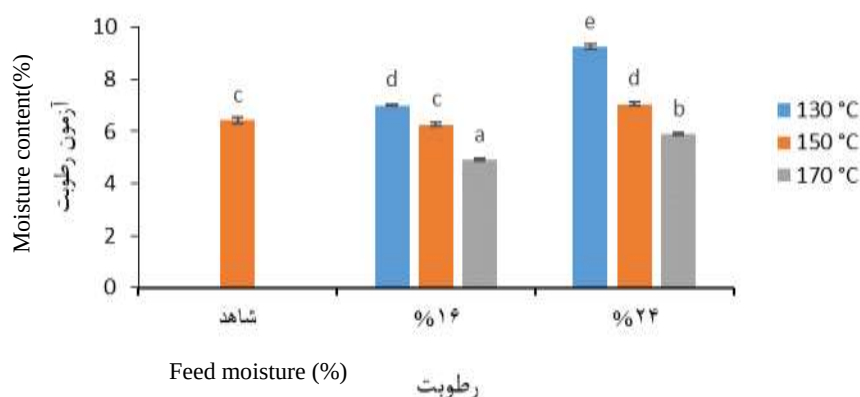
ریزساختار فرآورده حجیم‌شده آرد کینوا با استفاده از میکروسکوپ الکترونیرویشی (مدل VP 1450، شرکت LEO، آلمان) اندازه‌گیری شد. نمونه‌های آسیاب‌شده بوسیله چسب دولایه بر پایه‌های آلومینیومی نصب شده و پس از پوشش‌دهی با لایه‌ای از طلا، در ولتاژ شتاب‌دهنده ۲۰ کیلوولت، عکس‌برداری شدند (Mahasukhonthachat et al., 2010).

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش به منظور بررسی اثر تیمارهای رطوبت در دو سطح ۱۶ و ۲۴ درصد، دما در سه سطح (۱۳۰، ۱۵۰ و ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد)

رطوبت از ماتریس و در نهایت کاهش محتوای رطوبتی فراورده بافت داده شده گردید. در تحقیق صورت گرفته توسط کوالسکی و همکاران (Kowalski et al., 2016) و شریفی و همکاران (۱۳۹۴) چنین رفتاری برای کینوا اکستروژن شده و بلغور ذرت فرآوری شده مشاهده شد.

دمای ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به صورت معنی‌داری کمتر از نمونه شاهد شود. تاثیر کاهشی و معنی‌دار دمای ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد در ارتباط با نمونه‌های با درصد رطوبت اولیه ۱۶ درصد نیز مشاهده شد؛ بروز پدیده دکسترینه شدن نشاسته همگام با کاهش سهم ژلاتیناسیون سبب خروج



شکل ۱- اثر دما و رطوبت خوراک بر میزان رطوبت نمونه‌های فرآورده کینوا حجیم‌شده

حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

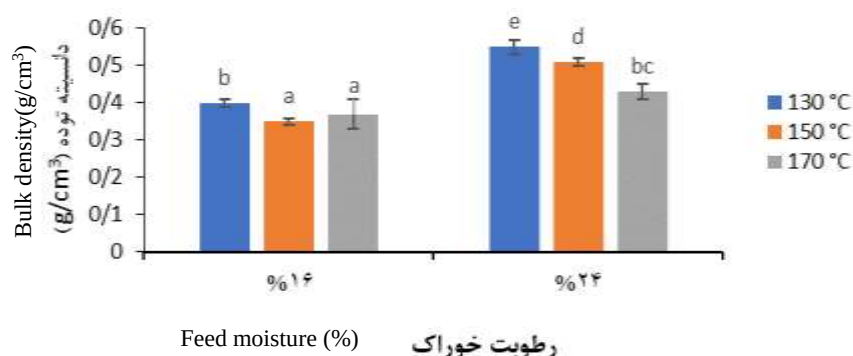
Fig. 1. The effect of die temperature and feed moisture on final moisture content of extruded quinoa product
Different English letters indicate statistically significant differences at the 95% confidence level.

(al., 2014) در تحقیقات به عمل آمده گزارش شده کاهش دانسیته در برنج اکستروژن شده با افزایش دما و سرعت ماریچ، احتمالاً به واسطه ژلاتینه شدن نشاسته است. هنگامی که ژلاتینه شدن مواد نشاسته‌ای افزایش می‌یابد، حجم محصول نیز افزایش یافته که دانسیته پایینی را در نمونه سبب می‌شود. جعفری و همکاران (Jafari et al., 2017) نیز در بررسی تاثیر اکستروژن بر آرد سورگوم نیز به نتایج مشابهی دست یافتند و کمترین دانسیته را در نمونه تیمار شده با بالاترین دما و کمترین میزان رطوبت گزارش کردند. افزایش دمای پخت اکستروژن تا ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد در رطوبت اولیه ۱۶ درصد، باعث افزایش چشمگیر دانسیته توده شد. افزایش دما و کاهش رطوبت اولیه سبب کم‌رنگ‌تر شدن نقش آب در ژلاتینه شدن و اثر نرم‌کنندگی خمیر توسط آب می‌شود. بنابراین با افزایش دمای اکستروژن تا ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۱۶ درصد بدلیل تاثیر بیشتر اعمال نیروی برشی در دمای بالا، دکسترینه شدن و تخریب ماتریس نشاسته صورت گرفته و با تخریب دیواره سلول‌های هوایی خروج رطوبت و کاهش انبساط شوندگی فراورده نهایی رخ داده است (Liu et al., 2017). از آنجا که شدت تغییرات انبساط شوندگی رفتار عکس با دانسیته دارد، افزایش دانسیته در این نمونه مشاهده شد.

دانسیته توده

دانسیته توده شاخصی در مورد تغییرات ساختاری یک ماده در طی فرایند اکستروژن می‌باشد. مطابق نتایج جدول آنالیز واریانس تغییرات رطوبت و دمای پخت بر روند تغییرات دانسیته معنی‌دار بود ($p < 0.05$). نمودار ستونی تغییرات دانسیته توده با دمای اکستروژن برای نمونه‌های آرد کینوا در دو درصد رطوبت خوراک ۱۶ و ۲۴ در شکل ۲ ارائه شده است. دانسیته توده نمونه‌های فرآورده کینوا حجیم‌شده در محدوده ۰/۳۴ تا ۰/۶۲ گرم بر سانتی‌متر مکعب بود. دامنه دانسیته فرآورده‌های حجیم‌شده معمولاً بین ۰/۱۱۷ تا ۰/۵۰۷ گرم بر سانتی‌متر مکعب متغیر است ولی هر چه دانسیته فرآورده حجیم‌شده کمتر باشد مطلوب‌تر است (Doğan & Karwe, 2003).

کمترین میزان دانسیته مربوط به کمترین رطوبت در بالاترین دما یعنی رطوبت ۱۶ درصد و دمای ۱۵۰°C بود در حالی که بیشترین مقدار آن در تیمار بالاترین رطوبت و کمترین دما یعنی تیمار رطوبت ۲۴ درصد و دمای ۱۳۰°C به دست آمد. وابستگی دانسیته به رطوبت آرد ورودی به دلیل تاثیر آب بر الاستیسیته مواد بر پایه نشاسته می‌باشد. افزایش رطوبت خوراک ممکن است از طریق نرم کردن (پلاستیکی شدن) ماده مذاب درون اکستروژن سبب کاهش الاستیسیته خمیر شود. نرم شدن ماده مذاب درون اکستروژن به واسطه حضور آب می‌تواند ناشی از کاهش انرژی مکانیکی ویژه و افزایش درجه ژلاتینه شدن باشد که خود، کاهش در دانسیته نهایی فرآورده کینوا حجیم‌شده را در پی داشت (Dura et



شکل ۲- اثر دما و رطوبت خوراک بر میزان دانسیته توده نمونه‌های فرآورده کینوا حجیم‌شده

حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

Fig. 2. The effect of die temperature and feed moisture on bulk density of extruded quinoa product
Different English letters indicate statistically significant differences at the 95% confidence level.

واسطه اثر نرم‌کنندگی‌اش سبب کاهش تخریب گرانول‌های نشاسته شده و شاخص جذب آب را افزایش می‌دهد. آلووی و همکاران (Aluwi et al., 2016) نیز در بررسی تاثیر برخی از پارامترهای فرآیند اکستروژن بر ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی فرآورده حجیم‌شده از آرد بدست‌آمده از گونه‌های مختلف کینوا گزارش کردند که به طور کلی، افزایش رطوبت خوراک منجر به بهبود شاخص جذب آب محصول می‌شود. برای نمونه‌های با محتوای رطوبت پایین، سطح ذرات نسبتاً صاف است و از تخلخل کمی برخوردار هستند ولی با افزایش دمای قالب و محتوای رطوبت اولیه در خوراک، تخلخل محصولات به دست آمده از پخت اکستروژن بیشتر شده و آب بیشتری توسط آن‌ها درون این خلل و فرج‌ها قابل جذب و نگهداری است (Jafari et al., 2017). در واقع، اعمال همزمان نیروی برشی و حرارتی طی فرآیند اکستروژن، باعث ژلاتیناسیون نشاسته، افزایش فیبرهای محلول، افزایش دنا‌توراسیون پروتئین‌ها و در پی آن افزایش گروه‌های با ویژگی‌های آب دوستی می‌شود که همگی افزایش توانایی جذب آب آرد فرآیندشده را به همراه دارند (Ma et al., 2019). لازم به ذکر است که شاخص جذب آب نمونه‌های فرآورده کینوا حجیم‌شده در محدوده ۴/۱۶ تا ۵/۷۲ گرم بر گرم قرار داشت (جدول ۱). در پژوهش مشابهی در این زمینه، شاخص جذب آب فرآورده کینوا حجیم‌شده در محدوده ۲/۳۵ تا ۳/۰۵ گزارش شد (Kowalski et al., 2016).

شاخص جذب آب

این شاخص بیانگر میزان آب جذب شده توسط گرانول‌های نشاسته است و به عنوان معرف ژلاتینه شدن می‌باشد. شاخص جذب آب با حجم نشاسته رابطه مستقیم دارد و میزان تجزیه هیدرولیکی نشاسته را نشان می‌دهد (Lazou & Krokida, 2011). به طور کلی هرچقدر زنجیره‌های آمیلوز و آمیلوپکتین نشاسته کمتر آسیب دیده باشند و گروه‌های هیدروفیل بیشتری در سطح خارجی مولکول قرار گیرند، امکان اتصالات با آب افزایش و در نتیجه میزان جذب آب افزایش می‌یابد (Ji et al., 2004; Lazou & Krokida, 2011). نتایج بررسی تاثیر متغیرهای فرآیند اکستروژن بر شاخص جذب آب آرد کینوا در جدول ۱ ارائه شده است. شاخص جذب آب تمام نمونه‌های حجیم‌شده در مقایسه با نمونه شاهد به گونه معنی‌داری ($p < 0.05$) بالاتر بود که نشان می‌دهد که درجه ژلاتینه شدن در اثر پخت اکستروژن افزایش یافته است. یافته‌ها همچنین نشان دادند که افزایش همزمان دما و رطوبت باعث افزایش شاخص جذب آب اکسترودهای کینوا شدند و از این رو، بیشترین میزان جذب آب برای نمونه حجیم‌شده در دمای ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۲۴ درصد مشاهده شد. پخت اکستروژن سبب کاهش بلورینگی آرد کینوا می‌شود و همین موضوع عامل افزایش میزان جذب آب آرد است. به عبارتی، افزایش محتوای رطوبت خوراک به

جدول ۱- شاخص جذب آب فرآورده کینوای حجیم شده

Table 1- Water absorption index of extruded quinoa product		
Die temperature (°C)	Feed moisture (%)	Water absorption index (g/g)
دما	رطوبت	شاخص جذب آب
Control sample	-	2.42 ± 0.10 ^e
130	16	4.46 ± 0.20 ^c
	24	4.98 ± 0.08 ^{ab}
150	16	4.80 ± 0.20 ^b
	24	4.96 ± 0.03 ^{ab}
170	16	4.17 ± 0.01 ^d
	24	5.07 ± 0.10 ^a

حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

Different English letters indicate statistically significant differences at the 95% confidence level.

سنجش مولفه های رنگی

با توجه به جدول ۲ تغییرات شاخص های L^* (روشنایی=۱۰۰ تا سیاهی=۰)، a^* (قرمزی=۶۰+ تا سبزی=۶۰-) و b^* (زردی=۶۰+ تا آبی=۶۰-) تعیین شده است. به طور کلی بازه تغییرات شاخص های L^* (۸۳/۰۵-۶۳/۷۵)، a^* (۰/۵-۵۲/۴۳) و b^* (۱۴/۳-۲۷/۷) تعیین شد. مطابق نتایج با افزایش دمای نمونه ها شاخص روشنایی (L^*) کاهش و شاخص قرمزی (a^*) افزایش یافت $p < 0.05$ ؛ که دلیل آن افزایش واکنش مایلارد در دماهای بالا می باشد. تغییرات L^* طی فرآیند اکستروژن، اطلاعات مهمی در رابطه با درجه قهوه ای شدن، واکنش مایلارد و همچنین تخریب رنگدانه ارائه می دهد (Ji et al., 2004). نتایج به دست آمده نشان داد؛ دمای اکستروژن و میزان رطوبت اولیه تاثیر قابل ملاحظه ای بر پارامترهای رنگی آرد کینوا اکستروژده داشتند. در واقع، تمامی نمونه های اکستروژده از پارامتر L^* کمتر و a^* و b^* بیشتری نسبت به نمونه شاهد برخوردار بودند که این امر با افزایش دمای فرآیند اکستروژن تشدید شد. با افزایش دما، سرعت اکسیداسیون رنگدانه های موجود در آرد افزایش و در نتیجه روشنایی محصول نهایی کاهش می یابد (Lazou & Krokida, 2011). در حرارت بالا، امکان انجام واکنش کاراملیزاسیون که عامل تیرگی رنگ و کاهش روشنی بسیاری از محصولات غذایی حرارت دیده می باشد نیز افزایش می یابد. از دیگر عوامل احتمالی دخیل در کاهش پارامتر روشنایی محصول می توان به واکنش قهوه ای شدن غیرآنزیمی یا مایلارد اشاره کرد که انجام آن در آرد کینوا به دلیل دارا بودن اسیدآمین و قند، کاملاً محتمل می باشد. این در حالی بود که افزایش رطوبت خوراک ورودی در تمامی دماهای اکستروژن، منجر به تخفیف اثر کاهشی فرآیند بر L^* و اثر افزایشی آن بر a^* و b^* شد (جدول ۲). تاثیر افزایش رطوبت خوراک ورودی از ۱۶ به ۲۴ درصد در دمای ۱۷۰ درجه سانتی گراد بسیار مشهود بود به گونه ای که پارامترهای رنگی

نمونه حاوی ۲۴ درصد رطوبت، مشابه با نمونه شاهد بودند. چنین مشاهداتی توسط گولاتی و همکاران (Gulati et al., 2016) نیز برای فرآورده گندم حجیم شده گزارش شده است. شارما و همکاران (Sharma et al., 2015)، عنوان داشتند که در رطوبت بالای خوراک ورودی، لیزین به عنوان فعالترین اسید آمینه کمتر در دسترس قرار دارد، در نتیجه سرعت واکنش قهوه ای شدن کاهش و پارامتر L^* نمونه حجیم شده افزایش می یابد. با توجه به حضور قابل توجه اسیدآمین لیزین در کینوا، فرضیه یادشده در مورد پژوهش حاضر نیز قابل تعمیم است (El-Sohaimy et al., 2019). در رطوبت بالا بخشی از گرما صرف تبخیر آب موجود در نمونه شده و در نتیجه از سرعت اکسیداسیون رنگدانه های موجود در آرد کاسته می شود (De Pilli et al., 2008). بر اساس روند تغییرات پارامترهای رنگی عنوان شده، شاخص تغییر رنگ با افزایش دما افزایش و با افزایش رطوبت کاهش یافت به گونه ای که نمونه اکستروژده در بالاترین دما (۱۷۰ درجه سانتی گراد) و کمترین رطوبت (۱۶ درصد)، متحمل بیشترین تغییر رنگ شد.

سختی بافت

سختی فرآورده غذایی اکستروژده به میزان انبساط و ساختار سلول های محصول بستگی دارد. سختی، بیشترین نیروی مورد نیاز پروب برای نفوذ به داخل نمونه می باشد. هر چقدر میزان بیشینه نیرو بیشتر باشد، میزان سختی نیز بیشتر است. سختی و یا تردی محصولات با توجه به درک حسی انسان از فرآورده های اکستروژده سنجیده می شود. خصوصیات حسی به دسته های مختلفی تقسیم می شوند و عوامل مختلفی از جمله اجزای تشکیل دهنده، رطوبت، دمای اکستروژن، میزان انبساط، میزان تخلخل و... بر روی خصوصیات ارگانولپتیکی اثر دارند. سختی نمونه ها با توجه به حداکثر نیرو در حین پایین آمدن پروب دستگاه تعیین می شود.

جدول ۲- نتایج آزمون تغییر رنگ و هانتربل
 Table 2- Results of color change and Hunter-lab test

Die temperature (°C) دما	Feed moisture (%) رطوبت	L* شاخص روشنایی رنگ	a* شاخص رنگ سبز-قرمز	b* شاخص رنگ آبی-زرد	ΔE تغییر رنگ
Control sample	-	83.05±0.11 ^a	-0.52±0.01 ^e	14.79±0.11 ^e	-
130	16	74.78±0.01 ^b	2.69±0.01 ^c	24.68±0.01 ^d	0.13±0.004 ^c
	24	63.75±0.02 ^e	1.20±0.01 ^d	24.65±0.02 ^d	0.10±0.004 ^d
150	16	72.44±0.02 ^c	3.25±0.04 ^b	25.76±0.02 ^c	0.15±0.005 ^b
	24	70.12±0.02 ^d	2.59±0.20 ^c	25.92±0.02 ^b	0.12±0.006 ^c
170	16	63.32±0.02 ^f	5.43±0.01 ^a	27.00±0.01 ^a	0.25±0.004 ^a
	24	83.05±0.11 ^a	-0.52±0.01 ^e	14.79±0.11 ^e	0.04±0.01 ^e

حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

Different English letters indicate statistically significant differences at the 95% confidence level.

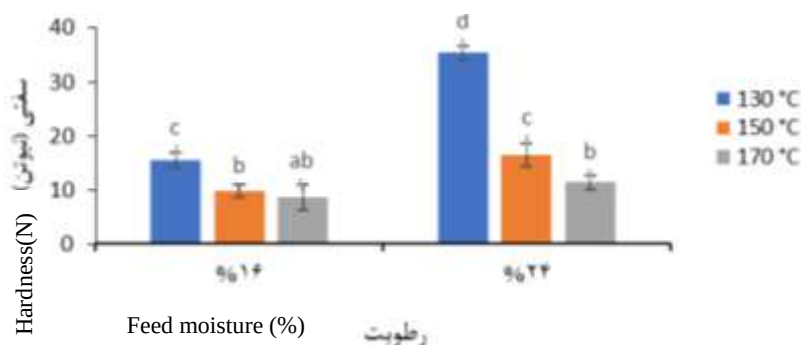
سختی نمونه، بیشتر برای محصول اکستروژن شده سورگوم (Jadhav et al., 2013) و ذرت (Mazumder et al., 2007) نیز گزارش شده است. منگ و همکاران (Meng et al., 2010) نیز مشاهده کردند که افزایش دمای اکستروژن (۱۵۰-۱۷۰ درجه سانتی‌گراد)، کاهش سفتی اسنک بر پایه اکستروژن آرد نخود را به همراه داشت. گفتنی است که در این پژوهش، میزان سفتی فرآورده حجیم‌شده کینوا بین ۶/۴۷ تا ۳۵/۳۸ نیوتن متغیر بود. در این ارتباط، تاورنا و همکاران (Taverna et al., 2012) دامنه ۸/۵۳ تا ۱۹/۹۱ نیوتن را برای فرآورده حجیم‌شده آرد کینوا و کاساوا گزارش کردند که با توجه به تفاوت ترکیب خوراک آنها با پژوهش جاری، تفاوت مشاهده شده قابل توجیه است.

ریزساختار

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی آرد کینوا تیمارنشده در مقایسه با همتای اکستروژن‌شده آن در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ورودی خوراک ۱۶ و ۲۴ درصد در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطور که در شکل می‌توان دید، ذرات نشاسته به صورت چند ضلعی و اشکال نامنظم بودند. مهسوخونتاجات و همکاران (Mahasukhonthachat et al., 2010). مورفولوژی چند ضلعی نامنظم و کروی را برای گرانول‌های نشاسته در آرد سورگوم گزارش کردند. نمونه شاهد دارای هر دو نوع ذرات بزرگ و کوچک بود و پخت اکستروژن آرد کینوا سبب تشکیل ذرات بزرگ‌تر تفکیک شده از هم شد. دورا و همکاران (Dura et al., 2014) بر این باور بودند که آمیلوز نشسته کرده از نشاسته در طی فرآیند پخت اکستروژن به عنوان یک عامل چسبنده عمل نموده و سبب اتصال ذرات کوچک و بزرگ به هم و تشکیل ذرات بزرگ‌تر می‌شود. در تصاویر میکروسکوپی، حضور بخش‌های پروتئینی در کنار گرانول‌های نشاسته محرز است که این امر در گزارش مربوط به پخت اکستروژن آرد سورگوم (Mahasukhonthachat et al., 2010) نیز مشاهده شده است.

میزان سختی فرآورده حجیم‌شده آرد کینوا در شرایط دمایی و رطوبتی متفاوت در شکل ۳ ارائه شده است. افزایش دما در هر دو سطح رطوبت مورد بررسی، کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) سختی بافت را به همراه داشت. ولی در سوی دیگر، افزایش رطوبت در هر یک از دماهای مورد بررسی، منجر به افزایش معنی‌دار سختی شد. بر این اساس، نمونه اکستروژن‌شده در بالاترین دما (۱۷۰ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت کمتر (۱۶ درصد)، از کمترین سختی و نمونه اکستروژن‌شده در پایین‌ترین دما (۱۳۰ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت بیشتر (۲۴ درصد)، از بالاترین سختی برخوردار بودند. همچنین لازم به ذکر است که سختی نمونه اکستروژن‌شده در رطوبت ۱۶ درصد و دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد و نمونه تیمارنشده در رطوبت ۲۴ درصد و دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، مشابه هم بودند. عدم تفاوت معنی‌دار آماری سختی، برای نمونه اکستروژن‌شده در رطوبت ۱۶ درصد و دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و نمونه تیمارنشده در رطوبت ۲۴ درصد و دمای ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد نیز مشاهده شد. تاثیر افزایش رطوبت خوراک ورودی بر سفتی و تاثیر کاهشی دما اکستروژن بر آن را می‌توان از نقطه نظر تاثیر این دو پارامتر بر فرآیند ژلاتیناسیون نشاسته به عنوان اصلی‌ترین عامل انبساط فرآورده‌های اکستروژن‌شده مورد بررسی قرار داد (Aluwi et al., 2016).

افزایش دما طی فرآیند اکستروژن، باعث کاهش ویسکوزیته خمیر و افزایش فشار بخار آب و همچنین کاهش ضخامت دیواره حباب‌های هوایی شده و رشد حباب‌ها بهتر و راحت‌تر اتفاق افتاده در نتیجه میزان سختی بافت کاهش می‌یابد. نتایج مشابهی از یانیتیس و همکاران (۲۰۰۹)، لطفی و همکاران (۲۰۲۰)، دینگ و همکاران (۲۰۰۶)، آلتان و همکاران (۲۰۰۸)، پترای و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شد. حال آنکه، رطوبت بالاتر خوراک، کاهش حجیم‌شدن نمونه‌ها و افزایش سختی را به همراه داشته است. کارو و دوگان و (Karwe & Doğan, 2003) نیز عنوان داشتند که افزایش رطوبت خوراک، کاهش انبساط آرد کینوا را در نتیجه فرآیند اکستروژن در پی داشت. تاثیر افزایش رطوبت بر



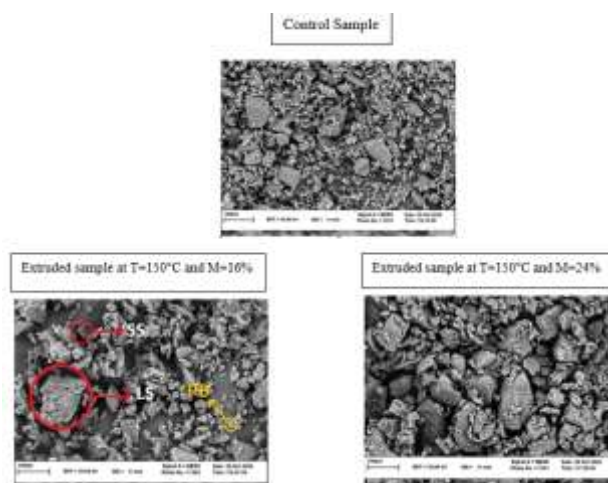
شکل ۳- اثر دما و رطوبت خوراک بر میزان سختی بافت اسنک تولیدی از نمونه‌های آرد کینوا حجیم‌شده
حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

Fig. 3. The effect of die temperature and feed moisture on the texture hardness of snacks produced from extruded quinoa flour samples

Different English letters indicate statistically significant differences at the 95% confidence level.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان دادند که متغیرهای فرآیند اکستروژن تأثیر چشمگیری بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ریزساختار آرد کینوا داشتند ($p < 0.05$). بر پایه این یافته‌ها، نمونه‌های اکستروژده شده در دمای بالاتر و یا رطوبت کمتر خوراک، از رطوبت نهایی کمتری برخوردار بودند ولی افزایش هر دو متغیر فرآیند، افزایش شاخص جذب آب فرآورده اکستروژده را به همراه داشت. در ارتباط با پارامترهای رنگ و سفتی، متغیرهای فرآیند، تأثیر دوگانه‌ای را نشان دادند. به عبارت دیگر، در حالی که افزایش دمای اکستروژن، کاهش سفتی و روشنایی ظاهر (افزایش تیرگی) نمونه‌ها را به همراه داشت، افزایش رطوبت خوراک ورودی باعث سفتی بیشتر نمونه شد و از کاهش روشنایی نمونه در اثر حرارت کاست. همچنین لازم به ذکر است که فرآورده حجیم‌شده کینوا نسبت به آرد اکستروژده نشده آن (نمونه شاهد)، از توانایی جذب آب به مراتب بالاتری برخوردار بود ولی در عین حال، ظاهری تیره‌تر پیدا کرد که البته با توجه به اینکه معمولاً چنین فرآورده‌هایی با رنگ‌های خوراکی پوشش داده می‌شوند، این امر تأثیری در پذیرش مصرف کنندگان نخواهد داشت. بررسی ریزساختار نمونه‌ها نشان داد که فرآیند اکستروژن منجر به تشکیل ذرات بزرگتر و جداازهم شد که در رطوبت بالاتر خوراک اولیه، از ظاهری صاف‌تر و یکنواخت‌تر برخوردار بودند. مطابق نتایج با در نظر گرفتن شرایط مطلوب شامل منظور کردن بیشترین میزان جذب آب، دانسیته توده و روشنایی رنگ و کمترین میزان سفتی بافت تیمار با ۲۴ درصد رطوبت ورودی و اعمال دمای ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان نمونه مطلوب جهت فرایندهای بعدی معرفی گردید.



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی آرد کینوا تیمارنشده و اکستروژده شده در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد در دو رطوبت ۱۶ و ۲۴ درصد (SS: ذرات نشاسته کوچک LS: ذرات بزرگ نشاسته و PB: بخش پروتئینی)

Fig. 4. Electron microscope images of quinoa flour untreated and extruded at 150°C in two feed moisture levels of 16 and 24% (SS: small starch particles, LS: large starch particles and PB: protein part)

در هنگام اعمال شرایط اکستروژن شدید، اغلب بخش‌های پروتئینی به دلیل افزایش نیروهای برشی ناپدید شدند. در خوراک ورودی با رطوبت بالا به دلیل اثر نرم‌کنندگی آب، تخریب ناشی از تنش کاهش می‌یابد و از این رو بخش‌های پروتئینی قابل مشاهده هستند. با افزایش دمای اکستروژن، نشت آمیلوز موجب اتصال سطوح خارجی ذرات به همدیگر و در نهایت سبب ایجاد سطحی صاف‌تر و یکنواخت‌تر شد. چنین مشاهداتی توسط دورا و همکاران (Dura et al., 2014) و جعفری و همکاران (Jafari et al., 2017) نیز گزارش شده است.

1. AACC. (2000). Approved methods of the American association of cereal chemists. 54-21.
2. AOAC International. (1990). *Official Methods of Analysis of AOAC*. AOAC International, Gaithersberg, MD.
3. Alandia, G., Rodriguez, J.P., Jacobsen, S.E., Bazile, D., & Condori, B. (2020). Global expansion of quinoa and challenges for the Andean region. *Global Food Security*, 26(September), 100429. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2020.100429>
4. Aluwi, N.A., Gu, B.J., Dhumal, G.S., Medina-Meza, I.G., Murphy, K.M., & Ganjyal, G.M. (2016). Impacts of scarification and degermination on the expansion characteristics of select Quinoa varieties during extrusion processing. *Journal of Food Science*, 81(12), E2939–E2949. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13512>
5. Ardameh, L., Beiraghi-Toosi, S., & Golimovahed, G. (2019). *Effect of extrusion and formulation conditions on physicochemical characteristics of snack based on walnut and corn grits*. <https://doi.org/10.22104/jift.2019.3505.1841>
6. Asare, E.K., Sefa-Dedeh, S., Afoakwa, E.O., Sakyi-Dawson, E., & Budu, A.S. (2012). Extrusion cooking of rice-groundnut-cowpea mixtures - effects of extruder characteristics on nutritive value and physico-functional properties of extrudates using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(5), 465–476. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00605.x>
7. Cannas, M., Pulina, S., Conte, P., Del Caro, A., Urgeghe, P.P., Piga, A., & Fadda, C. (2020). Effect of substitution of rice flour with quinoa flour on the chemical-physical, nutritional, volatile and sensory parameters of gluten-free ladyfinger biscuits. *Foods*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/foods9060808>
8. De Pilli, T., Jouppila, K., Ikonen, J., Kansikas, J., Derossi, A., & Severini, C. (2008). Study on formation of starch-lipid complexes during extrusion-cooking of almond flour. *Journal of Food Engineering*, 87(4), 495–504. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.12.028>
9. Doğan, H., & Karwe, M.V. (2003). Physicochemical properties of quinoa extrudates. *Food Science and Technology International*, 9(2), 101–114. <https://doi.org/10.1177/1082013203009002006>
10. Dura, A., Błaszczak, W., & Rosell, C.M. (2014). Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 837–845. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.013>
11. El-Sohaimy, S.A., Shehata, M.G., Mehany, T., & Zeitoun, M.A. (2019). Nutritional, physicochemical, and sensorial evaluation of flat bread supplemented with Quinoa flour. *International Journal of Food Science*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4686727>
12. El Hazzam, K., Hafsa, J., Sobeh, M., Mhada, M., Taourirte, M., Kacimi, K.E.L., & Yasri, A. (2020). An insight into saponins from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd): A review. *Molecules*, 25(5), 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules25051059>
13. El Khoury, D., Balfour-Ducharme, S., & Joye, I.J. (2018). A review on the gluten-free diet: Technological and nutritional challenges. *Nutrients*, 10(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/nu10101410>
14. Gulati, P., Weier, S.A., Santra, D., Subbiah, J., & Rose, D.J. (2016). Effects of feed moisture and extruder screw speed and temperature on physical characteristics and antioxidant activity of extruded proso millet (*Panicum miliaceum*) flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 114–122. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12974>
15. Huang, S., Roman, L., Martinez, M.M., & Bohrer, B.M. (2020). Modification of physicochemical properties of breadfruit flour using different twin-screw extrusion conditions and its application in soy protein gels. *Foods*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/foods9081071>
16. Jadhav, M.V., & Annature, U.S. (2013). Effect of extrusion process parameters and particle size of sorghum flour on expanded snacks prepared using different varieties of sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*. B, 3(2B), 71.
17. Jafari, M., Koocheki, A., & Milani, E. (2017). *Effect of extrusion variable on physicochemical properties of extruded sorghum*. 1–12. <http://fsct.modares.ac.ir/article-1547-7-fa.html>
18. Jafari, M., Koocheki, A., & Milani, E. (2017). Effect of extrusion cooking on chemical structure, morphology, crystallinity and thermal properties of sorghum flour extrudates. *Journal of Cereal Science*, 75, 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.05.005>
19. Ji, Y., Ao, Z., Han, J.A., Jane, J.L., & BeMiller, J.N. (2004). Waxy maize starch subpopulations with different gelatinization temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 57(2), 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.017>
20. Kowalski, J., Medina, Meza Ilce Gabriela Bhim, B.T., Kevin, M.M., & Girish, M.G. (2016). *Extrusion processing characteristics of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) var. Cherry Vanilla*.
21. Lazou, A., & Krokida, M. (2011). Thermal characterisation of corn-lentil extruded snacks. *Food Chemistry*, 127(4), 1625–1633. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.029>

22. Liu, Y., Chen, J., Luo, S., Li, C., Ye, J., Liu, C., & Gilbert, R. G. (2017). Physicochemical and structural properties of pregelatinized starch prepared by improved extrusion cooking technology. *Carbohydrate Polymers*, 175, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.084>
23. Ma, J., Kaori, F., Ma, L., Gao, M., Dong, C., Wang, J., & Luan, G. (2019). The effects of extruded black rice flour on rheological and structural properties of wheat-based dough and bread quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1729–1740. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14062>
24. Mahasukhonthachat, K., Sopade, P.A., & Gidley, M.J. (2010). Kinetics of starch digestion and functional properties of twin-screw extruded sorghum. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.02.008>
25. Mazumder, P., Roopa, B.S., & Bhattacharya, S. (2007). Textural attributes of a model snack food at different moisture contents. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 511–516. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.011>
26. Meng, X., Threinen, D., Hansen, M., & Driedger, D. (2010). Effects of extrusion conditions on system parameters and physical properties of a chickpea flour-based snack. *Food Research International*, 43(2), 650–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.016>
27. O'Shea, N., Arendt, E., & Gallagher, E. (2014). Enhancing an extruded puffed snack by optimising die head temperature, screw speed and apple pomace inclusion. *Food and Bioprocess Technology*, 7(6), 1767–1782. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1181-x>
28. Otondi, E.A., Nduko, J.M., & Omwamba, M. (2020). Physico-chemical properties of extruded cassava-chia seed instant flour. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2(July), 100058. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100058>
29. Sharma, S., Singh, N., & Singh, B. (2015). Effect of extrusion on morphology, structural, functional properties and in vitro digestibility of corn, field pea and kidney bean starches. *Starch/Stärke*, 67(9–10), 721–728. <https://doi.org/10.1002/star.201500021>
30. Taverna, L.G., Leonel, M., & Mischon, M.M. (2012). Changes in physical properties of extruded sour cassava starch and quinoa flour blend snacks. *Food Science and Technology*, 32(4), 826–834. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000113>
31. Xu, X., Luo, Z., Yang, Q., Xiao, Z., & Lu, X. (2019). Effect of quinoa flour on baking performance, antioxidant properties and digestibility of wheat bread. *Food Chemistry*, 294(December 2018), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.037>



Production of Gelatin Nanoparticles by Solvent Dissolution Method for Use as Food-grade

N. Soleimanpoor Tamam¹, A. Arianfar^{2*}, V. Hakimzadeh³, B. Emadzadeh⁴

Received: 2022.02.05

Revised: 2022.06.23

Accepted: 2022.09.11

Available Online: 2022.09.11

How to cite this article:

Soleimanpoor Tamam, N., Arianfar, A., Hakimzadeh, V., & Emadzadeh, B. (2023). Production of gelatin nanoparticles by solvent dissolution method for use as food- grade. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 463-476. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74716.1137>

Introduction

Gelatin is one of the most widely used colloidal proteins, which has unique hydrocolloidal property. Gelatin is derived from collagen by changing the thermal nature. This product is widely used in food, pharmaceutical, biomedical, cosmetic and photography industries. Global gelatin demand for food and non-food products is increasing. Two important properties of nanoparticles are: Increasing the surface-to-volume ratio of nanoparticles causes the atoms on the surface to have a much greater effect on their properties than the atoms within the particle volume. The effects of quantum size, which is the second feature. Methods for preparing nanoparticles from natural macromolecules: In general, two major methods for making protein nanoparticles have been reported Emulsion-solvent evaporation method and sedimentation or phase separation method in aqueous medium. Numerous methods have been reported for the preparation of nanoparticles from natural macromolecules. The first method is based on emulsification and the second method is based on phase separation in aqueous medium. In the first method, due to the instability of the emulsion, it is not possible to prepare nanoparticles smaller than 500 nm with a narrow particle size distribution. Therefore, coagulation method or anti-solvent method which is based on phase separation was proposed to prepare nanoparticles from natural macromolecules.

Materials and Methods

Type B (cow) gelatin was purchased from processing company with Bloom 260-240 food and pharmaceutical Iran solvent gelatin solution of 25% aqueous acetate glutaraldehyde from Iran Neutron Company. Two-stage anti-solvent method was used to produce gelatin nanoparticles. Then, to form nanoparticles, acetone was added dropwise while stirring until the dissolved acetone begins to change color and eventually turns white, which indicates the formation of nanoparticles. Finally, glutaraldehyde solution was added for cross-linking and finally centrifuged.

Results and Discussion

The results showed that with increasing gelatin concentration, nanoparticle size and PDI increased significantly. According to the announced results, the solvent has a direct effect on the size. Therefore, the best mixing speed is determined to achieve the smallest particle size. Zeta potential is the best indicator for determining the electrical status of the particle surface and a factor for the stability of the potential of the colloidal system because it indicates the amount of charge accumulation in the immobile layer and the intensity of adsorption of opposite ions on the particle surface. If all the particles in the suspension are negatively or positively charged, the particles tend to repel each other and do not tend to accumulate. The tendency of co-particles to repel each other is directly related to the zeta potential. Fabricated gelatin nanoparticles have a stable structure, and are heat resistant. These nanoparticles are ready to be used to accept a variety of aromatic substances, compounds with high antioxidant properties, a variety of vitamins and heat-sensitive substances.

1, 2 and 3- Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
(*- Corresponding Author Email: a_aria_1443@yahoo.com)

4- Associate Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Iran
DOI: [10.22067/ifstrj.2022.74716.1137](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74716.1137)

Conclusion

The results of this study showed that the optimal conditions for the production of a particle of 88.6 nm at 40 ° C, the volume of acetone consumption was 15 ml, concentration 200 mg and speed 1000 rpm, and the morphology of gelatin nanoparticles have resistant, spherical polymer structure and mesh with a smooth surface that can be clearly seen under an electron microscope.

Keywords: Gelatin, Nanoparticle, Optimization, Two-step desolvation method

مقاله پژوهشی

تولید نانو ذرات ژلاتین به روش حلال زدایی برای استفاده در صنایع غذایی

نگار سلیمانپور تمام^۱ - اکرم آریان فر^{۲*} - وحید حکیم زاده^۳ - بهاره عمادزاده^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۴/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۰

چکیده

ژلاتین یک پلیمر طبیعی است که به طور گسترده در تولید نانو ذرات و در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد در ایجاد ژل، کپسول، قوام‌دهندگی، پایدارکنندگی و امولسیفایری مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه، از ژلاتین تیپ B (گاوی) با بلوم ۲۶۰-۲۴۰ و روش ضد حلال دو مرحله‌ای استفاده شد و در ادامه برای تشکیل نانو ذرات استون به صورت قطره‌ای و در حین هم زدن اضافه گردید تا محلول شروع به تغییر رنگ و در نهایت به رنگ سفید درآید که نشان‌دهنده تشکیل شدن نانو ذرات است. در انتها محلول گلاتارآلدئید جهت اتصالات عرضی اضافه و سانتیفریژ شد. همچنین غلظت بهینه ژلاتین، مقدار بهینه از استون مصرفی، و همچنین دما و سرعت مطلوب هم زدن برای تولید نانو ذرات، مشخص گردید. یافته‌های این پژوهش نشان داد که شرایط بهینه برای تولید ذراتی با میانگین اندازه ۸۸/۶ نانومتر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، حجم مصرفی استون ۱۵ میلی‌لیتر، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و سرعت هم زدن ۱۰۰۰ rpm است. در ادامه نتایج حاصل از آزمون‌های طیف‌سنجی مادون قرمز، پراش اشعه ایکس، پتانسیل زتا، آنالیز وزن‌سنجی حرارتی و بررسی مورفولوژی میکروسکوپ‌های الکترونی نشان داد نانو ذرات ژلاتین ساخته شده تحت این شرایط به شکل کروی با سطحی صاف بوده که از شبکه پلیمری منسجم و اسکلت مقاومی نسبت به حرارت برخوردار هستند.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، روش ضد حلال دومارحله‌ای، ژلاتین، نانو ذرات

مقدمه

امروزه ریزپوشانی ترکیبات حساس به حرارت، اسید، آنزیم‌های بزاق و معده و همچنین استرس‌های ناشی از فراوری محصولات غذایی و دارویی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. پلیمرهای سنتزی و طبیعی متنوعی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند؛ که در این میان پلیمرهای طبیعی به دلیل منشأ طبیعی و غیر سمی بودن آن‌ها، به طور چشمگیری مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Kaintura, 2015). یکی از متنوع‌ترین بیوپلیمرهای طبیعی در صنایع دارویی و غذایی ژلاتین است (Eskandari et al., 2020). ژلاتین به دلیل طبیعی بودن، زیست تخریب‌پذیری، دسترسی آسان و هزینه کم آن مورد توجه بسیاری از

پژوهشگران در زمینه ریزپوشانی قرار گرفته است (Azarmi et al., 2006).

در مطالعه‌ای (Kommareddy et al., 2007) به منابع جدیدی از حیوانات مانند دوزیستان دست یافتند که برای تولید ژلاتین مورد استفاده قرار گرفته‌اند. عملکرد و خواص ژلاتین‌های مختلف متفاوت هستند فرایندهای تولید آن‌ها شامل پیش‌تصفیه و شرایط استخراج، صاف و خشک شدن در نظر گرفته می‌شود تا کیفیت نهایی ژلاتین را تحت تأثیر قرار دهد. با توجه به خواص مختلف مولکولی و عملکردی، ژلاتین‌های مختلف برای کاربردهای خاص با مقاصد مختلف استفاده می‌شوند.

۱، ۲ و ۳- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
(*)- نویسنده مسئول: (Email: a_aria_1443@yahoo.com)

۴- دانشیار گروه نانوفناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، ایران

این پروتئین از هیدرولیز جزئی کلاژن به دست می‌آید و به دو نوع کاتیونی (ژلاتین نوع A) و آنیونی (ژلاتین نوع B) در دسترس می‌باشد (Gmir, 2012).

نتایج پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که نانو ذرات در مقایسه با میکروذرات، از قابلیت جذب مواد مغذی، ویتامین‌ها و مواد آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار است و همچنین در سیستم‌های تحویل دارو، اثر بخشی نانو ذرات بیشتر می‌باشد (Nejat et al., 2006; Khan et al., 2017).

برای تهیه نانو ذرات از پلیمرهای طبیعی دو روش بر مبنای امولسیون‌سازی و جداسازی فاز در محیط آبی وجود دارد. در اولین روش محلول آبی آلبومین در دمای اتاق در یک روغن گیاهی مانند روغن پنبه‌دانه امولسیونه گردیده و توسط هموژنایزر با فشار بالا و یا توسط امواج اولتراسونیک هموژنیزه می‌گردد. سپس امولسیون تشکیل‌شده قطره‌قطره به داخل مقدار زیاد روغن از پیش حرارت داده‌شده در حال هم زدن افزوده می‌شود. سپس سرد شده و به‌منظور حذف روغن، نانوذرات چندین بار توسط حلال آلی مانند اتانل، استن و یا اتر شستشو داده می‌شوند. این روش به دلیل ناپایداری امولسیون، امکان تولید نانوذرات کوچکتر از ۵۰۰ نانومتر وجود ندارد (Lohcharoenkal et al., 2014).

روش دوم که روش ضد حلال نام دارد و مبتنی بر جداسازی فاز می‌باشد، نانو ذرات در محیط آبی توسط روند جداسازی فاز تشکیل‌شده و متعاقباً توسط اتصالات عرضی نظیر گلو تار آلدهید یا فرمالدهید پایدار می‌گردد. در این روش، نانو ذرات با افزودن یک عامل دسولواته کننده نظیر نمک طعام یا اتانل به محلول پروتئین پس از اضافه کردن اتصالات عرضی نظیر گلو تار آلدهید تهیه می‌گردند (Lohcharoenkal et al., 1997; Li et al., 2014).

علاوه بر روش‌های فوق، روش‌های دیگری نیز برای آماده‌سازی نانو ذرات ژلاتینی بکار گرفته می‌شود که از جمله می‌توان به میکرو امولسیون، نانورسوب و خودآرایی اشاره کرد. در روش میکروامولسیون که یک روش جدید و مؤثر برای آماده‌سازی نانو ذرات ژلاتین به شمار می‌آید، محلول آبی ژلاتینی به محلول سورفکتانت و N-هگزان اضافه می‌شود و سپس گلو تار آلدهید برای شبکه‌ای کردن نانو ذرات اضافه‌شده و در نهایت تبخیر N-هگزان برای بازیابی نانو ذرات انجام می‌شود. سورفکتانت زمانی که در حلال غیر قطبی مثل N-هگزان حل می‌شود به شکل میسل، جایی که سر آب‌گریز سورفکتانت به سمت توده حلال و سر آب‌دوست دور از توده حلال در داخل یک هسته آبی محلول آبی ژلاتین و عامل اتصال شده و عرضی قرار می‌گیرد. اندازه هسته داخلی آبی میسل‌ها در ابعاد نانومتری و در حدود ۵-۵۰ nm است. مزیت استفاده از نوع سیستم میکروامولسیون برای تشکیل نانوذرات این است که اندازه نانوذرات می‌تواند توسط تبدیل اندازه هسته آبی میسل‌ها

کنترل شود (Gupta et al., 2004). نانو رسوب همچنین به‌عنوان روش جایگزینی حلال شناخته می‌شود. این روش شامل رسوب نانوذرات شکل‌گرفته از یک حلال آلی و نفوذ حلال آلی به محیط آبی در حضور یک سورفکتانت است. در این روش، آب به‌عنوان فاز حلال شامل ژلاتین و دارو به‌صورت آرام‌آرام به اتانول به‌عنوان فاز ضد حلال شامل پلوکزامر به‌عنوان پایدارکننده اضافه می‌شود و سپس گلو تار آلدهید عامل اتصال‌دهنده عرضی به نانو ذرات اضافه می‌شود. این روش قادر است نانو ذرات کوچک با توزیع یکنواخت تولید کند (Khan et al., 2013). نانو ذرات ژلاتین می‌توانند از طریق خودآرایی مولکول‌های ژلاتین از طریق اصلاح شیمیایی و مخلوط کردن ساده تشکیل شوند. در اصلاح شیمیایی، ژلاتین آب‌دوست با مولکول آب‌گریز بطور شیمیایی برای تشکیل یک پلیمر دوگانه دوست ترکیب می‌شود. ژلاتین اصلاح شده به صورت آب‌گریز قادر به تغییر ساختاری به شکل آبی به شکل میسل مانند نانوکره به صورت خودآرایی است، بطوری‌که بخش آب‌گریز به سمت داخل جمع شده و تشکیل هسته آب‌گریز با پوسته آب‌دوست می‌دهد (Fung et al., 2007). در مخلوط کردن ساده ژلاتین و محلول دارو به صورت مستقیم مخلوط شده و تشکیل نانو ذرات خودآرا را می‌دهند. با استفاده از این روش، نانو ذرات ژلاتینی حاوی ترکیبات چای ساخته می‌شوند که عمدتاً در اینجا پیوند هیدروژنی مسئول تشکیل این نانوذرات است. همچنین برای تشکیل نانوذرات با این روش برهم‌کنش‌های آب‌گریز نیز در نظر گرفته می‌شود. مشخص شده است که پروتئین با ساختار سوم فشرده، محل‌های آب‌گریز کمتری ایجاد می‌کند که برهم‌کنش با مولکول‌های تانن محدود می‌شود. با این حال، ژلاتین یک پروتئین غنی از پرولین است؛ از این رو، محل‌های بیشتری برای برهم‌کنش با مولکول تانن با میل بالا فراهم می‌کند (Zheng et al., 2011).

روش دوم جهت تهیه نانو ذرات از ماکرو مولکول‌های طبیعی پیشنهاد می‌شود (Narayanan et al., 2013). هدف ما در این پژوهش تولید نانوذرات ژلاتین با روش ضد حلال بوده و سپس جهت بهینه کردن اندازه ذرات، عوامل مختلفی مانند غلظت ژلاتین، حجم استون مصرفی، دما و همچنین سرعت هم زدن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ژلاتین تیپ B (گاوی) با بلوم ۲۶۰-۲۴۰ از شرکت فراوری غذایی و دارویی ژلاتین حلال ایران و محلول گلو تار آلدهید ۲۵ درصد آبی و استون از شرکت نوترون ایران تهیه گردید.

تهیه نانو ذرات

سنجش پتانسیل زتا

به منظور تعیین پتانسیل زتا نانو ذرات از دستگاه تفرق نور پویا مدل (Zetasizer- ZS, Malvern, UK) استفاده شد. بدین منظور ذرات در ۴ میلی لیتر آب دیونیزه پخش و در دستگاه قرار داده شد تا اطلاعات لازم ثبت گردد.

تعیین مورفولوژی نانو ذرات

مورفولوژی نانو ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (EM3200 KYKY) ساخت کشور آلمان ارزیابی شد. بدین منظور ابتدا محلول نانو ذرات ژلاتین توسط سانتریفیوژ از حلالش جداسازی شد و سپس نانو ذرات رسوب کرده به مدت ۰۱ دقیقه در نیتروژن مایع غوطه ور شده و منجمد شد سپس توسط دستگاه خشک کن انجمادی خشک و لایه‌ی بسیار نازکی از طلا به عنوان پوشش هادی روی نمونه‌ها نشانداده شد و سپس سطح نمونه مورد مطالعه قرار داده شد (Nejat et al., 2017). همچنین تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی با استفاده از AUTOPROBE cp (park scientific Instrument) ثبت شد. نمونه‌ها با چکاندن یک قطره از هر محلول بر روی یک صفحه میکا و خشکاندن آن در دمای محیط آماده‌سازی شدند (Nejat et al., 2017).

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب زمان انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و با نرم افزار SAS انجام گرفت. تمامی آزمون‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

اثر غلظت ژلاتین بر روی اندازه ذرات

هدف این پژوهش تولید نانو ذرات ژلاتین با توزیع اندازه یکنواخت است و بررسی پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهد که اندازه ذره تحت تأثیر غلظت ماده می‌باشد (Nejat et al., 2017). به همین دلیل، غلظتی از ژلاتین که کمترین شاخص بس‌پاشیدگی را ایجاد نماید به عنوان غلظت مطلوب در نظر گرفته شد. از سوی دیگر، نتایج پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهند که اندازه‌ی ذرات یکی از مهم‌ترین ویژگی‌ها برای رهایش طعم در تولید محصولات نانو درون‌پوشانی شده است و میزان رهایش طعم در مواد غذایی به اندازه ذرات و توزیع اندازه آن‌ها بستگی دارد (Nejat et al., 2017). تأثیر غلظت ژلاتین بر روی اندازه ذره و PDI ارزیابی گردید و نتایج در جدول ۱ قابل مشاهده است.

به منظور تولید نانو ذرات ژلاتین، از روش ضد حلال دومرحله‌ای استفاده گردید. در ابتدا ۲۰۰-۵۰۰ میلی گرم ژلاتین در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر در شرایط دمایی ۱ ± ۴۰ درجه سانتی گراد به وسیله همزن حل شد تا یک محلول شفاف به دست آید. سپس ۱۰ میلی لیتر استون به محلول ژلاتین اضافه گردید تا ژلاتین با وزن مولکولی بالا رسوب کند؛ سپس سوپرناتانت سفید جداسازی شد و به ژلاتین با وزن مولکولی بالا ۱۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده گردید. pH محلول ژلاتینی با افزودن اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار بر روی ۲/۵ تنظیم شد. در مرحله بعد، ۳۰ میلی لیتر استون به صورت قطره‌ای و در حین هم زدن اضافه شد تا محلول به رنگ سفید درآید که نشان‌دهنده تشکیل شدن نانو ذرات بود. در انتها ۱۰۰ میلی لیتر محلول گلو تار آلدهید جهت ایجاد اتصالات عرضی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (Luo et al., 2012; Nejat et al., 2017).

سنجش اندازه ذره

سنجش اندازه ذره با دستگاه پخش نور دینامیک SZ-100z (Dynamic Light Scattering, HORIBA) انجام شد. قطر مؤثر به عنوان اندازه ذره گزارش گردید. برای سنجش دامنه پراکندگی ذرات در مخلوط نیز فاکتور بس‌پاشیدگی در نظر گرفته شد. آزمایش‌ها در زاویه پخش ۹۰ درجه و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد (Hosseini et al., 2013).

طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)

در این طرح پژوهشی طیف FT-IR نانو ذرات با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Tensor 27 ساخت شرکت Bruker آلمان با استفاده از قرص KBr ثبت شد.

پراش اشعه ایکس (XRD)

ساختار و اندازه نانو ذرات تهیه شده با استفاده از پراش سنج اشعه ایکس D500 ساخت شرکت Siemens آلمان با تابش KαCu در محدوده ۲θ، ۱۰ تا ۶۰ درجه ثبت گردید.

آنالیز حرارتی وزن سنجی (TGA)

پایداری حرارتی نانو ذرات سنتز شده توسط آنالیز حرارتی وزن سنجی (TGA) ساخت شرکت ADVANCE RIKO ژاپن اندازه‌گیری شده است.

اثر pH بر بار سطحی نانو ذرات ژلاتین

برای اندازه‌گیری pH ذرات از دستگاه pH متر (Metrohm 828، ساخت کشور سوئیس) استفاده گردید.

جدول ۱- اثر غلظت ژلاتین بر اندازه ذره

Table 1- Effect of gelatin concentration on nanoparticles size

غلظت ژلاتین Concentration of Gelatin (mg)	اندازه ذره Particle size (nm)	شاخص بس پاشیدگی Polydispersity index (PDI)
200	222.7 ^d ± 2.83	0.111 ^d ± 0.02
300	259.7 ^c ± 2.75	0.204 ^c ± 0.03
400	321.1 ^b ± 2.76	0.323 ^b ± 0.02
500	362.3 ^a ± 2.69	0.346 ^a ± 0.03

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین حاصل از سه تکرار، ارائه می‌شوند.

داده‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، تفاوت معناداری در $p \leq 0.05$ نشان می‌دهند.

Data are presented as mean values ± standard deviation.

Data with different superscript letter show statistical difference at $p \leq 0.05$.

Polydispersity index یا شاخص بس پاشیدگی شاخصی است

که توزیع جمعیت اندازه نانو ذرات را نشان می‌دهد؛ هر چه این شاخص پایین‌تر باشد، توزیع اندازه ذرات کوچک‌تر است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود با افزایش غلظت ژلاتین، اندازه نانو ذرات و PDI به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. این نتایج با نتایج ارائه شده توسط محققین پیشین مبنی بر اثر غلظت بر اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی مطابقت دارد (Nejat *et al.*, 2017; Elzoghby, 2013). جهان‌شاهی و همکاران (Jahanshahi *et al.*, 2008) طی مطالعاتی با روش ضد حلال و با استفاده از ژلاتین به تولید نانو ذرات پرداختند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد با افزایش غلظت ژلاتین، اندازه و PDI نانوذرات تولید شده نیز افزایش می‌یابد. آن‌ها این مشاهده را با ویژگی تشکیل ژل در ژلاتین مرتبط دانستند (Jahanshahi *et al.*, 2008). در این مرحله با توجه به اندازه ذره ۲۲۲/۷ نانومتر و PDI برابر ۰/۱۱۱، مطلوب‌ترین غلظت ژلاتین مصرفی برابر ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مدنظر قرار گرفت.

تأثیر حجم استون مصرفی بر اندازه ذرات

تأثیر حجم استون مورد استفاده بر روی اندازه ذره و PDI آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۲ تأثیر مقادیر استون مصرفی بر روی اندازه ذره را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود اثر حلال تأثیر مستقیم بر روی اندازه نهایی ذرات دارد. به‌طور کلی محققین نشان داده اند نانوذراتی که به جای اتانول با استون به‌عنوان ضد حلال تهیه شده‌اند، PDI و همچنین اندازه ذره‌ی کوچک‌تری داشتند. با افزایش حجم استون اندازه ذره و همچنین PDI نیز افزایش یافته است (Azarmi *et al.*, 2006). با توجه به نتایج جدول ۲، حجم مناسب استون مصرفی برای تولید نانوذرات، ۱۵ میلی‌لیتر بود که نتیجه آن، دستیابی به اندازه ذره ۲۰۶/۳ نانومتر با PDI ۰/۰۸۱ بود. از این مقدار حجم استون در مرحله بعد استفاده شد.

جدول ۲- اثر استون مصرفی بر اندازه ذره

Table 2- Effect of volume of acetone consumed on nanoparticles size

استون مصرفی Acetone consumable (ml)	اندازه ذره Particle size (nm)	شاخص بس پاشیدگی Polydispersity index (PDI)
15	206 ^c ± 3.03	0.081 ^d ± 0.003
20	214 ^b ± 4.29	0.090 ^c ± 0.004
25	218 ^{ab} ± 3.36	0.101 ^d ± 0.002
30	226 ^a ± 2.83	0.112 ^a ± 0.01

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین حاصل از سه تکرار، ارائه می‌شوند.

داده‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، تفاوت معناداری در $p \leq 0.05$ نشان می‌دهند.

Data are presented as mean values ± standard deviation.

Data with different superscript letter show statistical difference at $p \leq 0.05$.

تأثیر دما بر روی اندازه ذرات

با توجه به اینکه ماده مورد استفاده یعنی ژلاتین، ترکیبی پروتئینی است، لذا انجام آزمون‌های پایداری در برابر حرارت ضروری به نظر می‌رسد؛ زیرا در ترکیبات پروتئینی، دما یکی از عوامل موثر بر اندازه ذرات است. مطابق **جدول ۳**، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان کمترین و مطلوب‌ترین دما برای تولید نانوذرات تعیین شد و در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت. دما تأثیر معنی‌داری بر روی اندازه ذرات داشت به‌طوری‌که با افزایش دما، اندازه و PDI ذرات افزایش یافت. ارزیابی‌ها نشان دادند که تولید نانو ذره در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد غیرممکن

بود چراکه ژلاتین در این دما ژل بسیار ویسکوزی را تشکیل می‌دهد. وقتی که دما افزایش می‌یابد ساختار هلیکس سه‌تایی شروع به باز شدن می‌کند و هم‌زمان ویسکوزیته نیز کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد زنجیره‌ها به‌اندازه مطلوب و کافی باز می‌شوند و اضافه کردن استون به‌عنوان ضد حلال در این دما نسبت به دماهای بالاتر منجر به رسوب بهتر ماکرو مولکول‌ها می‌شود (Elzoghby, 2013; Nejat et al., 2017). برای درک بیشتر این موضوع باید به بررسی خواص ژلاتینی، ژلاتین پرداخت (Jahanshahi, 2008).

جدول ۳- اثر دما بر اندازه ذره

Table 3- Effect of temperature on nanoparticles size

دما Temperature (°C)	اندازه ذره Particle size (nm)	شاخص بس‌پاشیدگی Polydispersity index (PDI)
40	201.3 ^b ± 3.04	0.080 ^c ± 0.003
50	232.3 ^a ± 5.37	0.142 ^b ± 0.004
60	240.3 ^a ± 7.64	0.185 ^a ± 0.006

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین حاصل از سه تکرار، ارائه می‌شوند.

داده‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، تفاوت معناداری در $p \leq 0.05$ نشان می‌دهند.

Data are presented as mean values ± standard deviation.

Data with different superscript letter show statistical difference at $p \leq 0.05$.

تأثیر سرعت هم زدن بر اندازه ذرات

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در **جدول ۴**، سرعت هم زدن، از عوامل موثر بر اندازه ذره می‌باشد. بنابراین در این تحقیق جهت تعیین کوچک‌ترین اندازه ذرات ژلاتینی بهترین سرعت هم زدن تعیین شد. داده‌های به‌دست‌آمده در **جدول ۴** نشان می‌دهند سرعت هم زدن بر روی اندازه و PDI ذرات تأثیر معنی‌داری داشت و با افزایش سرعت هم

زدن اندازه و PDI ذرات به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. کوچک‌ترین اندازه ذره (۸۸/۶ نانومتر) با سرعت هم زدن ۱۰۰۰ rpm به دست آمد که به‌عنوان بهینه سرعت هم زدن برای تولید نانو ذرات ژلاتین در نظر گرفته شد. نتایج سایر مطالعات نیز نشان داده است که با افزایش سرعت هم زدن، اندازه ذره به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد و نانو ذرات بزرگ‌تر در سرعت هم زدن پایین‌تری تشکیل می‌شوند (Gomathi et al., 2017).

جدول ۴- اثر سرعت هم زدن بر اندازه ذره

Table 4- Effect of stirring speed on nanoparticles size

سرعت هم‌زنی Stirring speed (rpm)	اندازه ذره Particle size (nm)	شاخص بس‌پاشیدگی Polydispersity index (PDI)
800	169.4 ^a ± 4.20	0.066 ^a ± 0.003
900	113.7 ^b ± 5.02	0.069 ^b ± 0.004
1000	88.6 ^c ± 3.53	0.043 ^c ± 0.006

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین حاصل از سه تکرار، ارائه می‌شوند.

داده‌هایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند، تفاوت معناداری در $p \leq 0.05$ نشان می‌دهند.

Data are presented as mean values ± standard deviation.

Data with different superscript letter show statistical difference at $p \leq 0.05$.

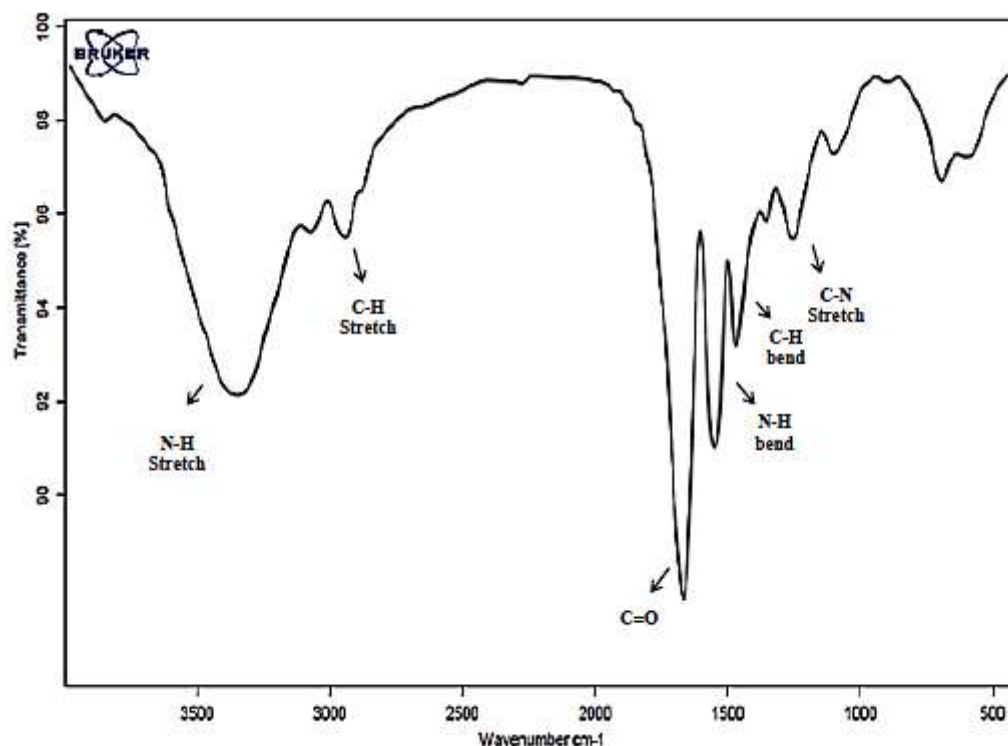
بررسی ویژگی‌های نانو ذره ژلاتینی تهیه شده تحت شرایط مطلوب

در ادامه بررسی، نمونه نانو ذره ژلاتین تهیه شده به روش حلال زدایی که تحت شرایط مطلوب تعیین شده در مرحله قبل، تهیه شده بود مورد مطالعه بیشتر قرار گرفت.

طیف FT-IR

برای اثبات ساختار شیمیایی نانوذرات ژلاتینی از دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، پیک پهن موجود در 3354 cm^{-1} مربوط به گروه آمینی شامل ارتعاشات کششی N-H می‌باشد. پیک موجود در 2943 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوند CH و پیک موجود در 1650 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات

خمشی پیوندهای CH می‌باشد. پیک‌های مربوط به پیوندهای آمیدی شامل ارتعاش کششی C=O در 1652 cm^{-1} ، ارتعاش خمشی N=H جفت‌شده با ارتعاش کششی پیوند C-N در 1533 cm^{-1} ظاهر شدند (Ishikawa et al., 2012). نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که پیک‌های ظاهرشده در طول‌موج‌های 1230 cm^{-1} و 1331 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای C-N بوده که از واکنش گروه‌های آلدهیدی (-CHO) اتصالات عرضی با گروه‌های آمینی ژلاتین ایجاد شدند. پیک‌های ظاهرشده در طول‌موج‌های 872 cm^{-1} و 669 cm^{-1} مربوط به ساختار اسکلتی ژلاتین می‌باشد (Kaintura; Nguyen et al., 2010; Wan et al., 2000). همچنین وان و همکاران (et al., 2015) دریافتند، مقدار گروه‌های C=O در طول فرآیند اتصال عرضی بدون تغییر باقی می‌ماند.



شکل ۱- طیف FT-IR نانوذرات ژلاتین
Fig. 1. Spectrum FT-IR Gelatin nanoparticles

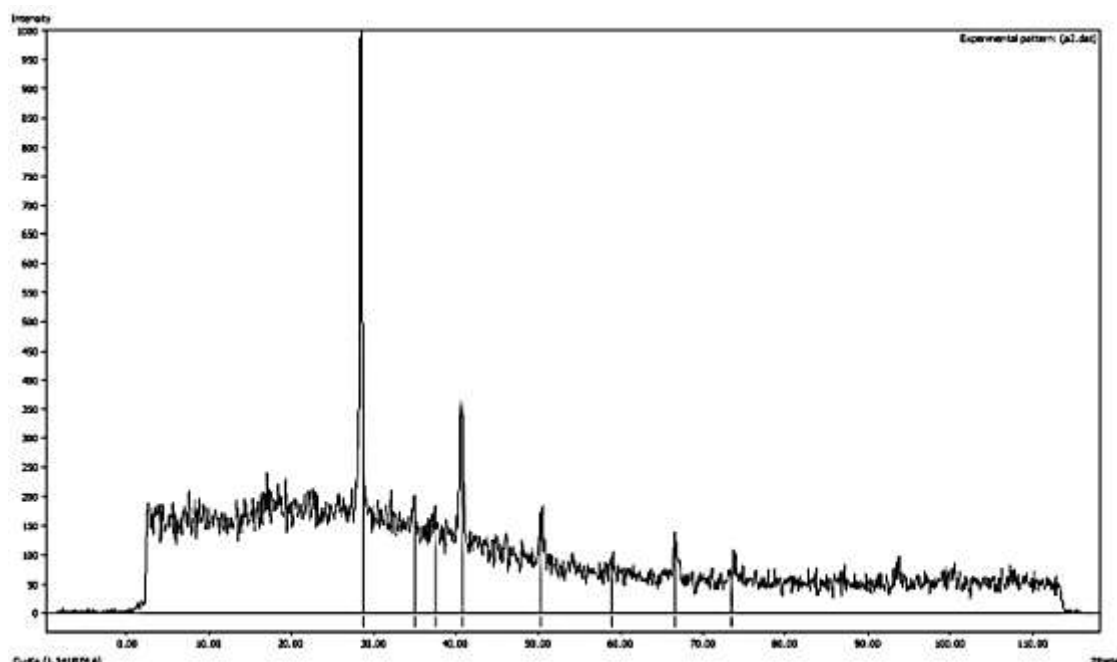
بررسی الگوی XRD

الگوی پراش اشعه X به‌منظور درک ویژگی‌های ساختاری ژلاتین مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت، فازهای آمورف (بدون شبکه کریستالی) با این روش شناسایی نمی‌شوند. ژلاتین یک قله XRD کریستالی گسترده را در محدوده 2θ بین 60° - 10° درجه در شکل ۲ نشان می‌دهد.

شدت این قله مربوط به افزایش ساختار کریستالی مارپیچ سه‌گانه کلاژن بازسازی‌شده در ژلاتین می‌باشد. نتایج به‌وضوح نشان می‌دهد که شدت پیک درنتیجه کاتیون‌سازی افزایش می‌یابد که خود به دلیل افزایش میزان پیوندهای هیدروژنی ژلاتین و اثر پروتونه شدن گروه‌های آمینه اولیه می‌باشد. پیک پهن در محدوده 25° - 15° - 20° در طیف XRD نانو

کیتوزان پرداختند، آن‌ها نیز دریافتند عرض پیک پراش اشعه ایکس به اندازه کریستال مرتبط است، پیک پهن شده معمولاً از کریستال ناقص ناشی می‌شود.

ذرات ژلاتینی به صفحات شبکه پلیمری آن‌ها مربوط می‌شود (Jalaja *et al.*, 2015)، که پهن بودن این پیک‌ها نشانگر آمورف بودن یا کریستالیت کم آن‌ها می‌باشد (Yang *et al.*, 2015). در پژوهشی مشابه (Gomathi *et al.*, 2017) به بررسی خصوصیات نانو ذرات

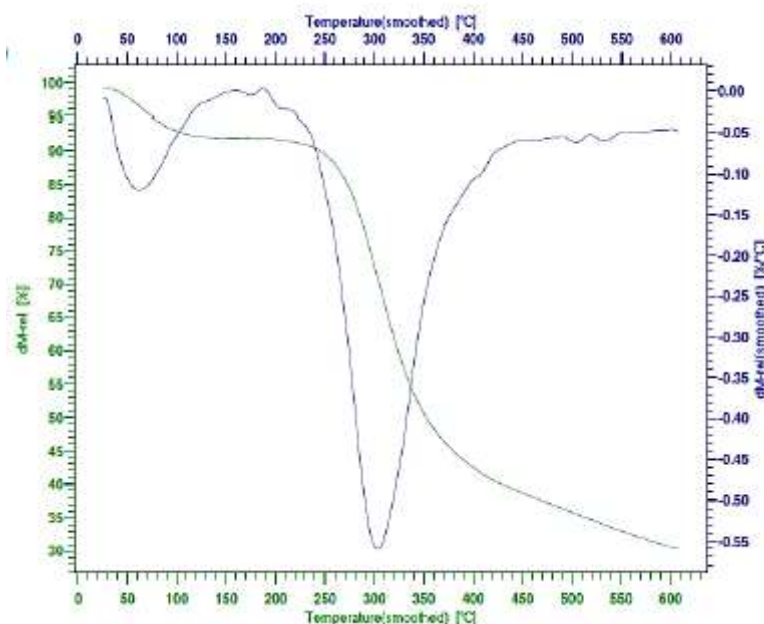


شکل ۲- الگوی XRD نانو ذرات ژلاتین
Fig 2. Pattern XRD Gelatin nanoparticles

که در تمام مراحل تهیه نانوذرات، مقدار عامل سازنده اتصالات عرضی و زمان حرارت‌دهی یکسان است. با توجه به نتایج به دست آمده و بررسی مطالعات محققان دمای شروع تخریب نانوذرات ژلاتین ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد. در این منحنی‌ها اولین مرحله تخریب در محدوده دمایی ۵۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد اتفاق می‌افتد که مربوط به از دست دادن مولکول‌های آب جذب‌شده به سطح نانوذرات می‌باشد (Gomathi *et al.*, 2017). این امر ماهیت آب‌دوست ژلاتین را ثابت می‌کند، خواص هیدراتاسیون ژلاتین به ساختار اولیه و فوق مولکولی بستگی دارد و حضور آب ترکیبی نیز تأثیر زیادی بر ماهیت چندشکلی کلی ماکرو مولکول‌ها دارد (Rejinold *et al.*, 2011). دومین مرحله تخریب در محدوده دمایی ۲۵۰ تا ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد می‌تواند مربوط به تخریب پلیمر باشد که می‌تواند به فرآیند پیچیده‌ای از جمله کم‌آبی حلقه آنهیدرو گلوکوزیدی نسبت داده شود (Devika *et al.*, 2006; Alavijeh *et al.*, 2017).

آنالیز وزن‌سنجی حرارتی

از آنالیز وزن‌سنجی حرارتی، برای اندازه‌گیری جرم نمونه به‌عنوان تابعی از دما استفاده می‌شود. اندازه‌گیری پیوسته افت وزنی در اثر تجزیه یا از دست دادن آب و افزایش وزن به دلیل جذب یا اکسید شدن با استفاده از این دستگاه انجام می‌شود. برخلاف اندازه‌گیری جرمی توسط ترازوی شیمیایی، زمان اندازه‌گیری برای TGA بسیار طولانی است. به همین دلیل پایداری و خواص ضد ارتعاش باید در نظر گرفته شوند. محور افقی، همواره دما را با مقیاس درجه سانتی‌گراد و محور عمودی درصد تغییر وزن را نشان می‌دهد. دماهای آغاز و پایان هر رویداد حرارتی، در منحنی‌ها TGA وابسته به شرایط انجام آزمایش هستند. شکل ۳ بیانگر منحنی‌های وزن‌سنجی حرارتی TGA و مشتق وزن سنجی حرارتی DTG نانو ذرات ژلاتین می‌باشد که شامل تغییرات کاهشی وزن نانوذرات با افزایش دما می‌باشد. استحکام ساختار نانوذرات به عوامل مختلفی مانند مقدار عامل سازنده اتصالات عرضی، زمان حرارت‌دهی، نوع و ترکیب مواد مورد استفاده بستگی دارد. به این دلیل

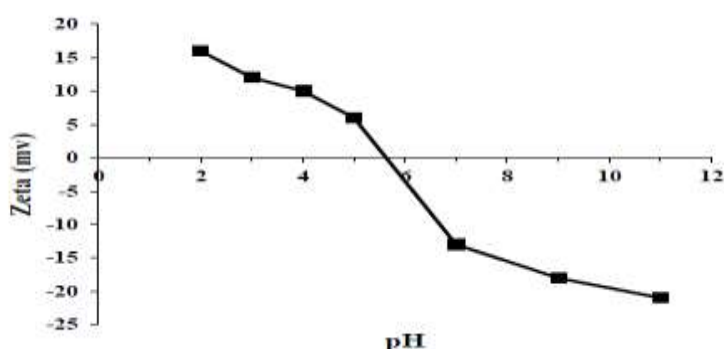


شکل ۳- نمودارهای وزن سنجی (TGA-DTG) نانوذرات ژلاتین
Fig. 3. Weighting charts (TGA-DTG) gelatin nanoparticles

و شدت جذب یون‌های مخالف بر روی سطح ذره است. اگر همه ذرات داخل سوسپانسیون دارای بار یکسان باشند، ذرات تمایل به دفع یکدیگر دارند؛ بنابراین تمایل ذرات هم‌بار به دفع یکدیگر رابطه مستقیمی با پتانسیل زتا دارد (Jones, 2010). نتایج حاصل در شکل ۴ تأییدکننده این مطلب است که پروتئین‌ها دارای بار منفی در بالای نقطه ایزوالکتریک خود و بار مثبت زیر این pH هستند (pH ایزوالکتریک نانوذرات ژلاتین حدود ۴/۶ است).

آنالیز پتانسیل زتا

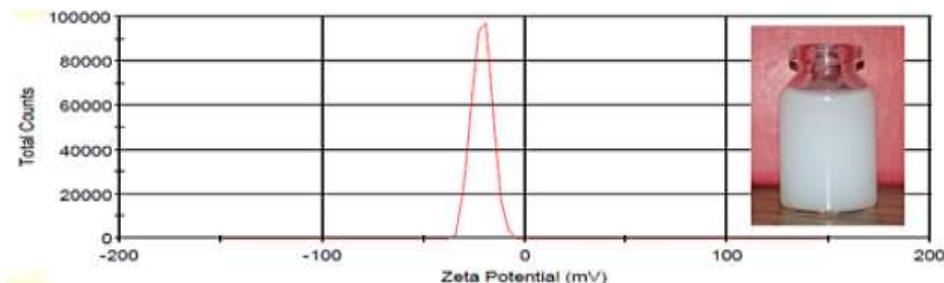
اندازه‌گیری پتانسیل زتا، با روش پراکنش نور لیزری، جهت بررسی پایداری ساختار نانوذرات انجام گرفته است. در یک سیستم کلوئیدی، بار موجود در سطح ذرات موجود در سیال، پتانسیل زتا نامیده می‌شود. پتانسیل زتا شاخصی جهت تعیین وضعیت الکتریکی سطح ذرات و عامل ثبات بالقوه‌ی سامانه کلوئیدی است؛ زیرا نشان‌دهنده میزان تجمع بار



شکل ۴- اثر pH محیط در بار سطحی نانو ذرات ژلاتین
Fig 4. Effect of pH environment in the surface charge of gelatin nanoparticles

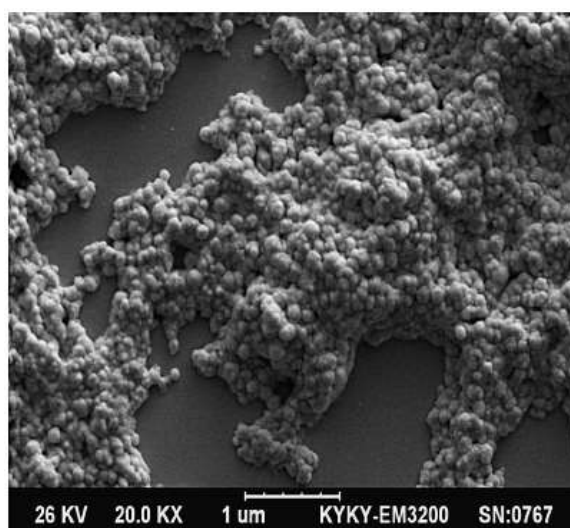
مقطر اندازه گیری شد که همان طور که در شکل ۵ مشاهده می کنید، پتانسیل زتا برابر با -21 میلی ولت به دست آمده است که نشان دهنده دانسیته کافی از بار منفی بر سطح می باشد و منجر به پایداری کلوئیدی نانوذرات تولید شده می شود (Kirby, 2004).

به طور کلی، مرز پایداری و ناپایداری سوسپانسیون را می توان بر حسب پتانسیل زتا تعیین نمود. ذراتی که پتانسیل زتای آن ها از $+30$ میلی ولت بیشتر و یا از -30 میلی ولت کمتر باشد، پایدار هستند (Shutava, 2009). پتانسیل زتای نانوذرات سنتز شده در حلال آب

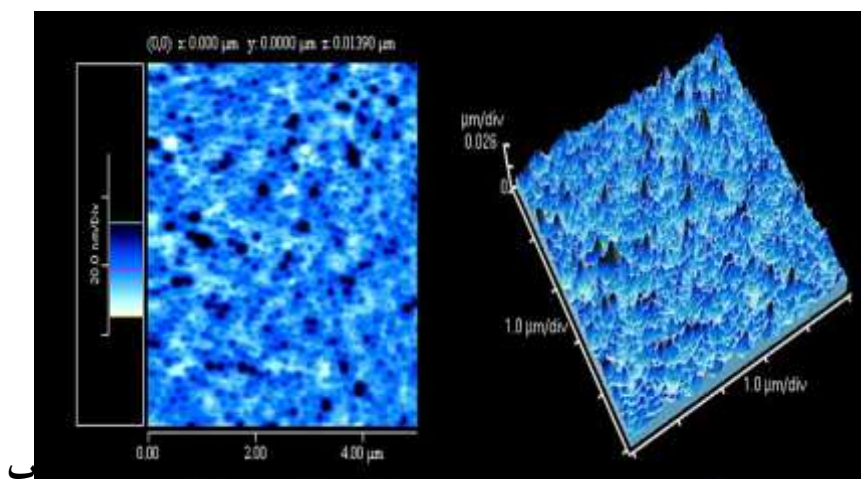


شکل ۵- نمودار پتانسیل زتا نانوذرات ژلاتین

Fig 5. Zeta potential chart of gelatin nanoparticles



الف



ب

شکل ۶- تصاویر SEM و AFM نانو ذرات ژلاتین

Fig 6. SEM and AFM images of gelatin nanoparticles

بررسی مورفولوژی

نتیجه گیری

مورفولوژی نانو ذرات تولیدشده تحت شرایط مطلوب تعیین شده در بخش نخست این بررسی، توسط دو روش میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی در شکل ۶ نشان داده شده است. شکل نانوذرات ژلاتین به صورت کروی با سطحی صاف می باشد که به طور جداگانه یا خوشه های پراکنده شده اند. این مشاهده با نتایج تحقیقات سایر محققین مطابقت داشت. نتایج آن ها نشان می دهد که هیچ گونه ناهمگنی در سطح ذرات دیده نمی شود و ذرات به صورت یکنواخت می باشند (Jahanshahi, 2008; Nejat et al., 2017).

تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ AFM در شکل ۶ (ب)، نشان داده شد. همان طور که در این تصاویر مشخص است، نانوذرات ژلاتینی دارای شکل کاملاً کروی و اندازه ذرات یکنواخت هستند. این عکس به وضوح نشان می دهد که هیچ ترک مویی یا ناهمگونی روی سطح نانوذرات ظاهر نشده است (Khan et al., 2013).

منابع

- Alavijeh, R., Shokrollahi, P., & Barzin, J. (2017). A thermally and water activated shape memory gelatin physical hydrogel, with a gel point above the physiological temperature, for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(12), 2302-2314. <https://doi.org/10.1039/C7TB00014F>
- Azarmi, S., Abrams, D., Huang, Y., McQuarrie, S., Roa, W., Chen, H., Löbenberg, R., Miller, G.G., & Finlay, W.H. (2006). Optimization of a twostep desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells. *Journal Pharmacy Science*, 9(1), 124-132. <https://doi.org/10.7939/R3J96097M>
- Devika, R.B., & Varsha, B.P. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note, *AAPS Pharm. Science Technology*, 7, 1-6. <https://doi.org/10.1208/pt070250>
- Elzoghby, O. (2013). Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research, *Journal Control Release*, 172(3), 1075-1091.
- Eskandari, Z., & Jafarpour, A. (2020). A comparative study on physio-chemical properties of recovered gelatin from beluga (*Huso huso*) fish skin by enzymatic and chemical methods, *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 16, 157-170. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v16i1.76991>
- Fung, S.Y., Yang, H., & Chen, P. (2007). Formation of colloidal suspension of hydrophobic compounds with an amphiphilic self-assembling peptide, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55(2), 200-211. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.12.002>
- GMIA, G.H. (2012). *Gelatin Manufacturers Institute of America*, New York.
- Gomathi, T., Prasad, P.S., Sudha, P.N., & Anil, S. (2017). Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles, *International Journal of Biological Macromolecules*, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.057>
- Gupta, A.K., Gupta, M.S., Yarwood, J., & Curtis, A.S.G. (2004). Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts, *Journal of Controlled Release*, 95(2), 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.11.006>
- Hosseini, S.M., Emam-Djomeh, H.Z., Razavi, S.H., Saboury, A.A., Moosavi-Movahedi, A.A., & Atri, Meeren, M.S. (2013). Food Hydrocolloids b -Lactoglobulin e sodium alginate interaction as affected by polysaccharide depolymerization using high intensity ultrasound, *FOOHYD*, 32(2), 235-244. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.002>

هدف این پژوهش تولید نانوذرات ژلاتین با روش ضد حلال و بهینه کردن اندازه ذرات تولید شده از نظر عواملی مانند غلظت ژلاتین، حجم استون مصرفی، دما و سرعت هم زدن می باشد. طبق نتایج حاصل از این پژوهش، شرایط مطلوب برای تولید ذره با اندازه ۸۸/۶ نانومتر، مصرف ۱۵ میلی لیتر استون در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر و سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه می باشد. در ادامه خصوصیات و ساختار نانوذرات تهیه شده با استفاده از تکنیک های FT-IR، پراش اشعه ایکس (XRD)، آنالیز حرارتی وزن سنجی (TGA)، پتانسیل زتا و مورفولوژی نانوذرات با میکروسکوپ های الکترونی (SEM, AFM) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که نانوذرات ژلاتین ساخته شده دارای اسکلت و شبکه پلیمری مقاوم، به صورت کروی دارای سطح صافی است که با میکروسکوپ الکترونی به وضوح قابل مشاهده است. این نانوذرات، پتانسیل استفاده برای پذیرش انواع مواد معطر، ترکیبات دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بالا، انواع ویتامین ها و مواد حساس به حرارت را دارا می باشد.

11. Ishikawa, H., Nakamura, Y., Jo, J., & Tabata, Y. (2012). Gelatin nanospheres incorporating siRNA for controlled intracellular release, *Biomaterials*, 33(35), 9097-104. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.032>
12. Iida, H., Takayanagi, K., Nakanishi, T., & Osaka, T. (2007). Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis, *Journal of Colloid and Interface Science*, 314(1), 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.05.047>
13. Jahanshahi, M., Sanati, M.H., Minuchehr, Z., Hajizadeh, S., & Babaei, Z. (2008). *Controlled fabrication of gelatin nanoparticles as drug carriers*, Nanotechnol. Its Appl. First Sharjah Int. Conf., 228, pp. 228-232. <https://doi.org/10.1063/1.2776720>
14. Jalaja, K., Naskar, D., Kundu, S.C., & James, N.R. (2015). Fabrication of cationized gelatin nanofibers by electrospinning for tissue regeneration. *Rsc Advances*, 5(109), 89521-89530. <https://doi.org/10.1039/C5RA10384C>
15. Jones, O., Decker, E.A., & McClements, D.J. (2010). Thermal analysis of β-lactoglobulin complexes with pectins. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.001>
16. Kirby, B.J., & Hasselbrink, E.F. (2004). Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations, *Electrophoresis*, 25(2), 187-202. <https://doi.org/10.1002/elps.200305754>
17. Kaintura, R., Sharma, P., Singh, S., Rawat, K., & Solanki, P. (2015). Gelatin nanoparticles as a drug delivery system for proteins, *Journal of Nanomedicine Research*, 2, 00018. or carrageenan for production of stable biopolymer particles, *Food Hydrocolloids*, 24(2), 239-248. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9287-3>
18. Khan, S.A., & Schneider, M. (2013). Improvement of nanoprecipitation technique for preparation of gelatin nanoparticles and potential macromolecular drug loading, *Macromolecular Bioscience*, 13(4), 455-463. <http://doi.org/10.1002/mabi.201200382>
19. Kommareddy, S., Shenoy, D.B., & Amiji, M.M. (2007). Gelatin nanoparticles and their biofunctionalization, *Nanotechnologies Lifesci* no. september. <https://doi.org/10.1002/9783527610419.ntls0011>
20. Lohcharoenkal, W., Wang, L., Wang, Y., Chen, C., & Rojanasakul, Y. (2014). Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therap Wang, y, *BioMed research international*. <https://doi.org/10.1155/2014/180549>
21. Li, J., Li, K., Wang, N., & Wu, X.S. (1997). A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(8), 891-895.
22. Luo, Y., Teng, Z., & Wang, Q. (2012). Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
23. Ma, Y., Zheng, Y., Zeng, X., Jiang, L., Chen, H., Liu, R., Huang, L., & Mei., L. (2011). Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on PCL-Tween 80 copolymer for cancer treatment, *International Journal of Nanomedicine*, 6(2679), e88. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25251>
24. Nejat, H., Rabiee, M., Tahriri, M., Jazayeri, H.E., Rajadas, J., Ye, H., Cui, Z., & Tayebi, L. (2017). Preparation and characterization of cardamom extract-loaded gelatin nanoparticles as effective targeted drug delivery system to treat glioblastoma. *Reactive and Functional Polymers*, 120, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.09.008>
25. Narayanan, D., Koyakutty, G.M.G, L. H, M., Nair, S., & Menon, D. (2013). Poly-(ethylene glycol) modified gelatin nanoparticles for sustained delivery of the anti-inflammatory drug Ibuprofen-Sodium: An in vitro and in vivo analysis, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(6), 818-828. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.02.001>
26. Nguyen, T.H., & Lee, B.T. (2010). Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers, *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 3(12), 11-17. <https://doi.org/10.4236/jbise.2010.312145>
27. Rejinold, N.S., Muthunarayanan, M., Muthuchelian, K., Chennazhi, K.P., Nair., S.V., & Jayakumar, R. (2011). Saponin-loaded chitosan nanoparticles and their cytotoxicity to cancer cell lines in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 84, 407-416.
28. Shutava, T.G., Balkundi, S.S., Vangala, P., Steffan, J.J., Bigelow, R.L., Cardelli, J.A., O'Neal, D.P., & Lvov, Y.M. (2009). Layer-by-layer-coated gelatin nanoparticles as a vehicle for delivery of natural polyphenols, *Journal American Chemical Society*, 3(7), 1877-1885. <https://doi.org/10.1021/nn900451a>
29. Yang, L., Jian, W., Qiu, L., Jian, X., Zuo, D., Wang, D., & Yang, L. (2015). One pot synthesis of highly luminescent polyethylene glycol anchored carbon dots functionalized with a nuclear localization signal peptide for cell nucleus imaging, *Nanoscale*, 7(14), 6104-6113. <https://doi.org/10.1039/C5NR01080B>

30. Y, W., W, Z., L, Y., G.X, C. (2000). Preparation and characterization of gelatin gel with a gradient structure. *Polymer International*, 49, 1600-1603.
[https://doi.org/10.1002/1097-0126\(200012\)49:12<1600::AID-PI554>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0126(200012)49:12<1600::AID-PI554>3.0.CO;2-K)



Investigation of Chemical Properties of Green Tea Ethanolic Extract and Its Inhibitory and Lethal Effects on *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* (Causing Rot in Strawberry and Grapes)

M. Rahmati-Joneidabad^{1*}, B. Alizadeh Behbahani², M. Noshad³

Received: 2022.04.19

Revised: 2022.05.08

Accepted: 2022.05.11

Available Online: 2022.05.15

How to cite this article:

Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2023). Investigation of chemical properties of green tea ethanolic extract and its inhibitory and lethal effects on *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* (causing rot in strawberry and grapes). *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 477-489. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76184.1163>

Introduction

Strawberry and grapes are generally infected with pathogenic fungi (e.g., *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifera*, etc.). Synthetic fungicides are commonly used as the first line of defense against post-harvest pathogens on packaging lines. However, disposal of toxic waste is a costly process and the hazardous waste causes serious environmental problems. In addition, fungal pathogens have shown a worrying trend of resistance to these fungicides, thus shortening the shelf life of products. Compounds that can be equally effective in controlling pathogens, but preventing or minimizing the waste problems will be inevitable. The large volume of internationally processed agricultural products, as well as the increasing demand for organically produced fruits, emphasizes the need to replace synthetic fungicides with safer and biodegradable alternatives. Natural plant-derived products effectively meet this criterion and have great potential to influence modern agricultural research. Catechins and other polyphenols in green tea show strong antioxidant activity. Also, the antimicrobial activity of green tea extract against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* has been reported. Therefore, the present study was performed to prepare the ethanolic extract of green tea and to determine the content of total phenol, total flavonoids, antioxidant activity, and its antifungal effect against *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizopus stolonifer* (causing rot in strawberry and grapes).

Materials and Methods

Fresh green tea leaves were dried at room temperature and then powdered. Then, ethanol (70%) was added to the powdered leaves (solvent to powder ratio of 10:1 v/w) and the mixture was refluxed for 120 min. The resulting mixture was filtered through a filter paper and then concentrated under vacuum and finally dried in an oven.

Total phenol content (by Folin-Ciocalteu reagent at 756 nm), total flavonoid content (spectrophotometrically at 510 nm), antioxidant activity (by DPPH and ABTS radical scavenging methods), and antifungal effect (by disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum fungicidal concentration) of the extract were evaluated.

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

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

2 and 3- Associate Professors, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.76184.1163](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76184.1163)

Results and Discussion

The extract contained 175.60 mg GAE /g total phenol and 47.53 mg QE/g total flavonoids and its antioxidant activity using DPPH and ABTS free radical assays was 78.89% and 86.57%, respectively. The results of antifungal activity showed that the diameter of the growth inhibition zone increased significantly with increasing the concentration of the extract, and *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* were the most sensitive and resistant fungal strains to the extract, respectively. The minimum fungicidal concentrations for the strains of *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* were 64 and 512 mg/ml, respectively.

Conclusion

The results of the present study showed that the ethanolic extract of green tea could be considered as potential source of natural antioxidant and antifungal agents. The presence of phenolic and flavonoid compounds may be responsible for the antifungal and antioxidant effects of the extract. However, due to the fact that this study was performed with the crude extract of green tea, it is difficult to identify compounds responsible for antifungal and antioxidant activity. On this point, only the separation of the components of the extract allows the detection of antifungal and antioxidant compounds. This study provides a basis for further researches, in particular the use of these antioxidants and antifungal compounds. Green tea extract is especially suitable for products with high sensitivity to lipid oxidation and infection with molds.

Keywords: Antifungal activity, Antioxidant activity, Bioactive extract, Green tea, Natural preservative

مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی‌های شیمیایی عصاره اتانولی چای سبز و اثر آن بر فعالیت مهارکنندگی و کشندگی آسپرژیلوس نایجر، بوتریتیس سینه‌را و ریزوپوس استولونیفر (عامل فساد میوه توت فرنگی و انگور)

مصطفی رحمتی جنیدآباد^{ID*} - بهروز علیزاده بهبهانی^{ID²} - محمد نوشاد^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۱

چکیده

در طول چند دهه گذشته، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی و عصاره‌های گیاهی به دلیل نگرانی در مورد اثرات نامطلوب بهداشتی احتمالی ناشی از استفاده از نگهدارنده‌های مصنوعی مورد توجه قرار گرفته است. عصاره چای سبز، منبع طبیعی آنتی‌اکسیدان، نه تنها برای افزایش طعم، بلکه برای افزایش ماندگاری محصولات مختلف غذایی مورد استفاده قرار گرفته است. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی عصاره چای سبز صورت پذیرفت. برای این منظور، عصاره چای سبز با کمک حلال اتانول استخراج گردید و محتوای فنول کل، فلاونوئید کل، اثر آنتی‌اکسیدانی (بر اساس روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS) و فعالیت ضد قارچی آن در برابر سویه‌های قارچی عامل فساد میوه توت‌فرنگی و انگور (آسپرژیلوس نایجر، بوتریتیس سینه‌را و ریزوپوس استولونیفر) مطابق روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی گردید. عصاره حاوی ۱۷۵/۶۰ mg GAE/g و ۴۷/۵۳ mg QE/g فلاونوئید کل بود و فعالیت مهارکنندگی آن در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ۷۸/۸۹ و ۸۶/۵۷ درصد بود. نتایج فعالیت ضد قارچی نشان داد که قطر هاله عدم رشد بطور معنی‌داری با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد و بوتریتیس سینه‌را و ریزوپوس استولونیفر به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی نسبت به عصاره بودند. حداقل غلظت کشندگی برای سویه‌های بوتریتیس سینه‌را و ریزوپوس استولونیفر به ترتیب ۶۴ و ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره اتانولی چای سبز را می‌توان به منظور افزایش زمان ماندگاری محصولات غذایی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: چای سبز، عصاره زیست فعال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد قارچی، نگهدارنده طبیعی

مقدمه

چین، مکزیک، ترکیه و اسپانیا کشورهایی هستند که بیشترین تولید توت‌فرنگی را دارند (Baena et al., 2022). در ایران سالانه بیش از ۲۰۰۰۰ تن توت‌فرنگی تولید می‌شود. استان‌های کردستان و گلستان به ترتیب با ۲۰۰۰ و ۵۰۰ هکتار دو منطقه اصلی تولید هستند

توت‌فرنگی به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی عالی و مزایای بالقوه سلامتی، یک میوه محبوب و غذای کاربردی است و ارزش اقتصادی و تغذیه‌ای بالایی دارد (Tang et al., 2020). ایالات متحده آمریکا،

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

۲ و ۳- دانشجویان، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

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

(Tehranifar & Sarsaefi, 2000). توسعه قارچ‌ها در طول حمل و نقل پس از برداشت و ذخیره‌سازی محصولات باغی می‌تواند خسارات اقتصادی زیادی ایجاد کند. از جمله این قارچ‌ها، *بوتریتیس سینه‌را* است که احتمالاً شایع‌ترین و گسترده‌ترین علت بیماری‌های میوه‌ها، سبزی‌ها و محصولات زراعی در سراسر جهان است. برخی از جدی‌ترین بیماری‌های ناشی از *بوتریتیس* شامل کپک خاکستری توت‌فرنگی است (Marquenie et al., 2002).

انگور با تولید سالانه حدود ۶۷/۵ میلیون تن به عنوان یکی از بزرگ‌ترین محصولات میوه تولیدی جهان شناخته می‌شود و طبق گزارش فائو (۲۰۱۴)، ایران دهمین تولیدکننده انگور در جهان است. انگور با تولید سالانه ۲۰۵۶۸۹ تن در رتبه دوم محصولات باغی ایران قرار دارد (Mohseni et al., 2018). انگور سرشار از مواد معدنی، ویتامین‌ها، کربوهیدرات‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها است. اگرچه انگور دارای فواید بسیار زیادی است، اما به دلایل مختلفی مانند تغییر رنگ ساقه، کاهش سفتی، خشک شدن، ریزش حبه، پوسیدگی قارچی و غیره، ماندگاری آن را کاهش داده است. در زنجیره بازاریابی انگور، پوسیدگی قارچی به عنوان عاملی بالقوه برای ایجاد خسارات اقتصادی هنگفت شناسایی شده است. تخمین زده شده است که ۱۰ تا ۴۰ درصد از کل تولید انگور به دلیل این پوسیدگی قارچی پس از برداشت از بین می‌رود. پوسیدگی قارچی عمدتاً به دلیل عفونت توسط قارچ‌های نهفته و ساکن یا عفونت میوه از طریق زخم‌ها در هنگام برداشت و حمل و نقل ایجاد می‌شود. مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زا پس از برداشت گزارش شده از میوه انگور عبارت‌اند از *آسپرژیلوس کاربونا‌ریوس*^۱، *آسپرژیلوس نایجر*^۲، *بوتریتیس سینه‌را*^۳، *پنی‌سیلیوم اکپان‌سوم*^۴، *ریزوپوس استولونی‌فر*^۵، *آلترناریا آلترناتا*^۶ و غیره (Solairaj et al., 2020).

قارچ‌کش‌های مصنوعی مانند ایمازالیل^۷، تیابندازول^۸، پیریمتانیل^۹، پروکلوراز^{۱۰} و گوازاتین^{۱۱} عموماً به عنوان اولین خط دفاعی در برابر پاتوژن‌های پس از برداشت روی خطوط بسته‌بندی استفاده می‌شوند. محلول‌های غوطه‌ور مانند ایمازالیل که در مخازن بزرگی با حجم حداقل ۱۵۰۰ لیتر تهیه می‌شوند، برای چند روز قبل از دفع باقی‌مانده نگهداری می‌شوند. دفع زباله‌های سمی فرایندی پرهزینه است و زباله‌های خطرناک مشکلات زیست‌محیطی جدی ایجاد می‌کند. علاوه بر این، پاتوژن‌های قارچی روند نگران‌کننده‌ای از مقاومت در برابر این قارچ‌کش‌ها را نشان داده‌اند و در نتیجه طول عمر محصولات را کوتاه

می‌کند. ترکیباتی که می‌توانند کارایی برابری در کنترل پاتوژن داشته باشند، اما از مشکلات دفع جلوگیری کرده یا به حداقل برسانند، بسیار ارزشمند خواهند بود. حجم زیادی از محصولات کشاورزی که سالانه در سطح بین‌المللی تیمار می‌شوند، و همچنین افزایش تقاضا برای میوه‌های تولید شده ارگانیک، بر نیاز به جایگزینی قارچ‌کش‌های مصنوعی با جایگزین‌های ایمن‌تر و زیست‌تخریب‌پذیر تأکید دارد (du Plooy et al., 2009).

محصولات طبیعی مشتق شده از گیاهان به طور مؤثر این معیار را برآورده می‌کنند و پتانسیل بسیار زیادی برای تأثیرگذاری بر پژوهش‌های کشاورزی مدرن دارند. استفاده از آفت‌کش‌های گیاهی در حال حاضر به عنوان یکی از ابزارهای اصلی برای محافظت از محصولات کشاورزی و فراورده‌های آن‌ها و محیط‌زیست در برابر آفت‌کش‌ها در حال ظهور است. مواد گیاهی سریع‌تر از اکثر آفت‌کش‌های شیمیایی تخریب می‌شوند و اکثر آفت‌کش‌های گیاهی معمولاً در عرض چند روز و گاهی حتی در عرض چند ساعت تجزیه می‌شوند (Al-Samarrai et al., 2012). وجود ترکیبات فیتوشیمیایی مانند استروئید، تانن، فلاونوئید، آلکالوئید و ساپونین برای فعالیت ضد میکروبی در عصاره گیاهان گزارش شده است (Persaud et al., 2019).

قدمت چای (*Camellia sinensis*) در چین به چندین هزار سال قبل باز می‌گردد. دو نوع عمده چای وجود دارد، چای سیاه و چای سبز، و هر دو حاوی کافئین (۱-۵ درصد) هستند و مقادیر کمی از آلکالوئیدهای گزانتین نیز وجود دارد. چای همچنین حاوی مقادیر زیادی تانن یا مواد فنولیک (۵ تا ۲۷ درصد) متشکل از کاتچین (فلاوانول) و واحدهای اسید گالیک است که در چای سبز بیشتر از چای سیاه است. به طور کلی، برگ‌های تازه چای سبز حاوی ۳۶ درصد پلی‌فنول هستند که در میان آن‌ها کاتچین‌ها غالب هستند. خواص دارویی چای در درجه اول به دلیل آلکالوئیدهای آن (کافئین) و کاتچین است که به چهار ترکیب اصلی ایپی‌کاتچین، ایپی‌کاتچین گالات، ایپی‌گالوکاتچین، ایپی‌گالوکاتچین گالات و چهار ترکیب ثانویه کاتچین، کاتچین گالات، گالوکاتچین و گالوکاتچین گالات تقسیم می‌شود. ایپی‌گالوکاتچین گالات، کاتچین غالب موجود در برگ‌های چای سبز (۴۸ تا ۵۵ درصد از کل پلی‌فنول‌ها) است (Ho et al., 1997; Perva-Uzunalić et al., 2006). کاتچین‌ها و سایر پلی‌فنول‌های موجود در چای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی از خود نشان می‌دهند (Dufresne &

7- Imazalil
8- Thiabendazole
9- Pyrimethanil
10- Prochloraz
11- Guazatine

1- *Aspergillus carbonarius*
2- *Aspergillus niger*
3- *Botrytis cinerea*
4- *Penicillium expansum*
5- *Rhizopus stolonifer*
6- *Alternaria alternata*

فلاونوئید کل

محتوای فلاونوئید کل عصاره بر اساس روش ساکی و همکاران (Saki et al., 2019) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، نمونه (۰/۵ میلی لیتر) با ۳۰۰ میکرولیتر محلول NaNO_2 (۲۰:۱ وزنی/حجمی) مخلوط، محلول حاصل به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در مرحله بعد، ۳۰۰ میکرولیتر محلول AlCl_3 (۱۰:۱ وزنی/حجمی)، ۲ میلی لیتر NaOH (۱ مولار) و آب مقطر (۱/۹ میلی لیتر) اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه همزده شد. جذب محلول در ۵۱۰ نانومتر ثبت گردید و میزان فلاونوئید کل عصاره به صورت میلی گرم معادل کوئرستین (QE) در هر گرم از عصاره (mg QE/g) گزارش شد (Saki et al., 2019).

مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت مهار رادیکال DPPH مطابق روش یانگ و همکاران (Yang et al., 2009) با اندکی اصلاح تعیین شد. در این روش، ۰/۸ میلی لیتر از محلول ۰/۰۰۱ مول در لیتر DPPH در متانول با ۲/۴ میلی لیتر از نمونه آزمایش محلول در متانول مخلوط شد. سپس مخلوط به شدت همزده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری گردید. جذب محلول (OD_1) در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد حاوی همان مقدار متانول و رادیکال DPPH تهیه و در طول موج یکسان (OD_0) اندازه‌گیری شد. فعالیت مهار DPPH طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{(\text{OD}_0 - \text{OD}_1)}{\text{OD}_1} \right] \times 100$$

مهار رادیکال آزاد ABTS

روش نوشاد و همکاران (Noshad et al., 2021) با تغییرات جزئی برای تعیین فعالیت مهار رادیکال ABTS عصاره استفاده شد. به طور خلاصه، حجم یکسان از محلول ۷ میلی مولار ABTS و ۲/۴۵ میلی مولار $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ با هم مخلوط شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت در شرایط تاریک نگهداری شد. محلول کاتیونی رادیکال ABTS به دست آمده سپس با متانول رقیق شد تا به جذب 0.7 ± 0.2 در ۷۳۴ نانومتر برسد. پس از آن، عصاره (۰/۱ میلی لیتر) با محلول رادیکال ABTS (۳/۹ میلی لیتر) مخلوط شد و محلول به دست آمده به مدت ۶ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب آن در ۷۳۴ نانومتر (OD_1) در برابر نمونه شاهد اندازه‌گیری شد (متانول؛ OD_0). فعالیت مهار ABTS طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{(\text{OD}_0 - \text{OD}_1)}{\text{OD}_1} \right] \times 100$$

(Farnworth, 2001). علاوه بر این، چای سبز دارای خواص ضد پیری، ضد آلزایمر، ضد پارکینسون، ضد سکنه و ضد سرطان می‌باشد (Namita et al., 2012). همچنین، فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز در برابر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* گزارش شده است (Gupta & Kumar, 2017).

بنابراین، مطالعه حاضر به منظور استخراج عصاره اتانولی چای سبز و تعیین محتوای فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضد قارچی آن در برابر *اسپریژیلوس نایجر*، *بوتریتیس سینه‌را* و *ریزوپوس استولونیفر* (عوامل فساد میوه توت‌فرنگی و انگور) صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، ۲،۲-آزینو-بیس(۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) (ABTS) کوئرستین و اسید گالیک از شرکت سیگما آلد ریچ (آمریکا) خریداری شد. محیط‌های میکروبی شامل سابورود دکستروز آگار و سابورود دکستروز براث از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه دارای درجه آزمایشگاهی بودند.

استخراج عصاره چای سبز

از روش یانگ و همکاران (Yang et al., 2009) با تغییرات مورد نیاز جهت استخراج عصاره برگ چای سبز استفاده گردید. برگ‌های تازه چای سبز در دمای اتاق خشک و سپس پودر شدند. در ادامه، حلال اتانول (۷۰ درصد) به پودر گیاه اضافه شد (نسبت حلال به پودر معادل ۱۰ به ۱ حجمی/وزنی) و مخلوط به مدت ۱۲۰ دقیقه رفلکس گردید. مخلوط حاصل توسط کاغذ صافی فیلتر شد و سپس تحت خلأ تغلیظ و در نهایت توسط آون خشک گردید (Yang et al., 2009).

فنول کل

محتوای فنول کل عصاره مطابق روش احمد و همکاران (Ahmed et al., 2019) با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. عصاره (۰/۲ میلی لیتر) یا اسید گالیک (۰/۲ میلی لیتر؛ ۰-۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر) با ۲/۵ میلی لیتر معرف ۱۰ درصد فولین سیوکالتو مخلوط شد. سپس Na_2CO_3 (۲ میلی لیتر؛ ۷/۵ درصد) اضافه شد و محلول به مدت ۱ ساعت در دمای محیط نگهداری گردید. جذب محلول در ۷۵۶ نانومتر خوانده شد و میزان فنول کل عصاره محاسبه و به صورت میلی گرم معادل اسید گالیک (GAE) در هر گرم عصاره (mg GAE/g) بیان شد (Ahmed et al., 2019).

فعالیت ضد قارچی

دیسک دیفیوژن آگار

غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره توسط فیلتر سر سرنگی (۰/۲۲ میکرون) استریل شد. در ادامه، دیسک‌های بلانک به مدت ۲۰ دقیقه در عصاره اتانولی برگ چای سبز غوطه رو شدند. سپس سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند روی محیط کشت سابورود دکستروز آگار کشت داده شد. دیسک‌های بلانک آغشته به عصاره بر روی محیط کشت قرار داده شدند و پس از آن، محیط کشت حاوی سویه‌های میکروبی و عصاره در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری و بعنوان فعالیت ضد قارچی عصاره گزارش گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2013a; Alizadeh Behbahani et al., 2013b).

چاهک آگار

در این روش، چندین چاهک بر روی سطح محیط کشت سابورود دکستروز آگار از طریق یک پیپت پاستور استریل ایجاد شد. پس از آن، ۲۰ میکرولیتر عصاره با غلظت‌های مختلف (۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میلی گرم در میلی لیتر) در چاهک‌ها ریخته شد. در مرحله بعد، پلیت‌هایی که قبلاً با گونه‌های قارچی آغشته شده بودند، بر اساس شرایط بیان شده برای روش دیسک دیفیوژن آگار گرمخانه‌گذاری شدند. اثر ضد قارچی عصاره برگ چای سبز از طریق اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها و برحسب میلی متر گزارش گردید (Alizadeh Behbahani et al., 2014; Kiasi et al., 2020).

حداقل غلظت مهارکنندگی

برای این منظور، ابتدا غلظت‌های مختلف عصاره (۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶ و ۵۱۲ میلی گرم در میلی لیتر) تهیه و سپس ۵ میلی لیتر از هر غلظت به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی در لوله‌های آزمایش اضافه گردید. بعد از گرمخانه‌گذاری لوله‌های آزمایش به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، رشد سویه‌های قارچی بصورت بصری و با مشاهده کدورت محیط بررسی شد. غلظتی از عصاره که سبب جلوگیری از رشد سویه‌ها (عدم ایجاد کدورت) در لوله آزمایش گردید به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی آن گزارش شد (Rahmati-Alizadeh Behbahani et al., 2021; Alizadeh Behbahani et al., 2016a; Alizadeh Behbahani et al., 2016b).

حداقل غلظت کشندگی

از لوله‌های آزمایش فاقد کدورت در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره استفاده گردید. بطور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از

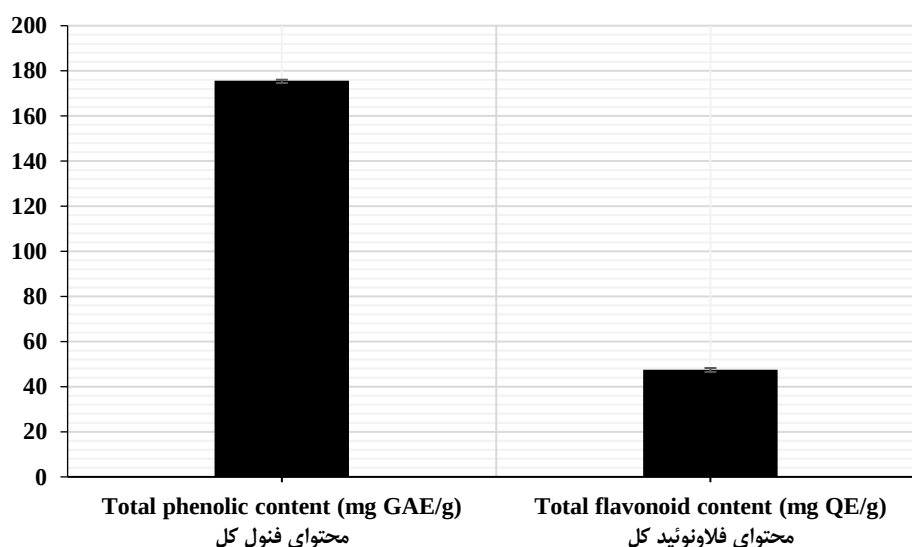
محیط کشت درون لوله آزمایش برداشته و روی سطح محیط کشت سابورود دکستروز آگار کشت داده شد. در ادامه، محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس غلظتی از عصاره که سبب جلوگیری از رشد سویه‌های قارچی شد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی برگ چای سبز گزارش گردید (Rahmati-Joneidabad & Alizadeh Behbahani, 2021; Alghooneh et al., 2015; Yeganegi et al., 2018).

آنالیز آماری

آزمون‌های این مطالعه در سه نوبت تکرار گردید. داده‌های حاصل بر پایه آنالیز واریانس یک‌طرفه با کمک نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p < 0.05$) جهت تعیین اختلاف بین میانگین نتایج استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج بررسی میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره اتانولی برگ چای سبز نشان داد که عصاره غنی از ترکیبات فنولی (mg GAE/g 0.46 ± 0.175) و فلاونوئیدی (mg QE/g 0.73 ± 0.475) است (شکل ۱). در راستای این پژوهش، Xi و همکاران (۲۰۱۲)، میزان فنول کل عصاره آبی چای سبز را 3.7 g GAE/l - 5.15 گزارش نمودند (Xi et al., 2012). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که عصاره چای سبز دارای 2.83 mg GAE/l محتوای فنول کل می‌باشد (Almajano et al., 2008). علاوه بر این، میزان فنول کل معادل 173.16 mg GAE/g در عصاره اتانولی چای سبز توسط سایر محققین گزارش شده است (Bharti & Singh, 2020). فلاونوئیدهای موجود در چای فلاوانول‌ها و فلاونول‌ها هستند. کاتچین‌های چای از نظر ساختاری عمدتاً فلاوانول هستند و ۲۰ تا ۳۰ درصد وزن خشک چای سبز را تشکیل می‌دهند. کاتچین‌های اصلی در برگ‌های تازه چای و چای سبز عبارت‌اند از اپی‌گالوکاتچین گالات، اپی‌گالوکاتچین، اپی‌کاتچین گالات و اپی‌کاتچین. فلاونول‌های اصلی موجود در برگ چای کوئرستین، کامپفرول و میریستین هستند (Wang et al., 2000). با این حال، میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌های گیاهی به شرایط استخراج و حلال مورد استفاده برای استخراج نیز بستگی دارد (Alizadeh Behbahani et al., 2021; Ebrahimi et al., 2020). از آنجایی که عصاره چای سبز منبع قابل توجهی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است، می‌توان آن را برای افزایش پایداری اکسایشی محصولات غذایی مختلف در نظر گرفت.

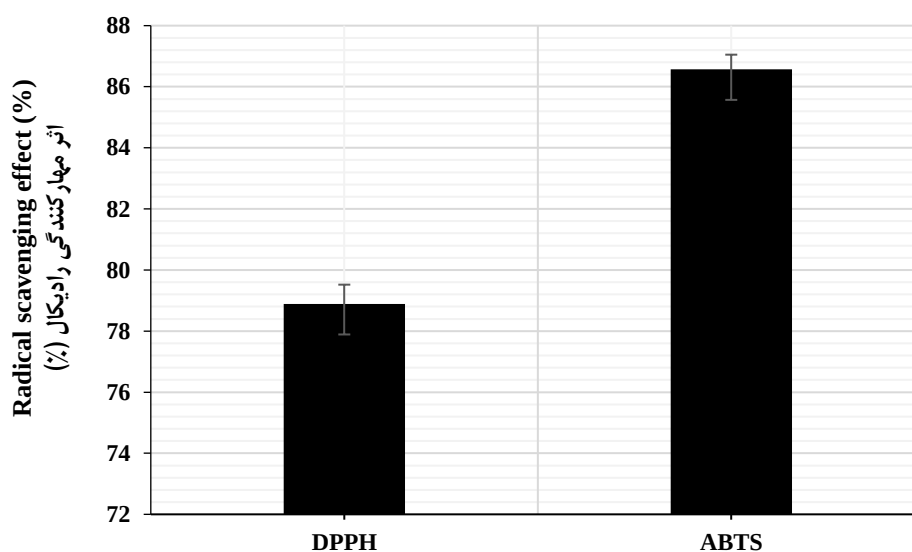


شکل ۱- محتوای فنول و فلاونوئید کل عصاره اتانولی برگ چای سبز
Fig. 1. Total phenol and flavonoid contents of green tea ethanolic extract

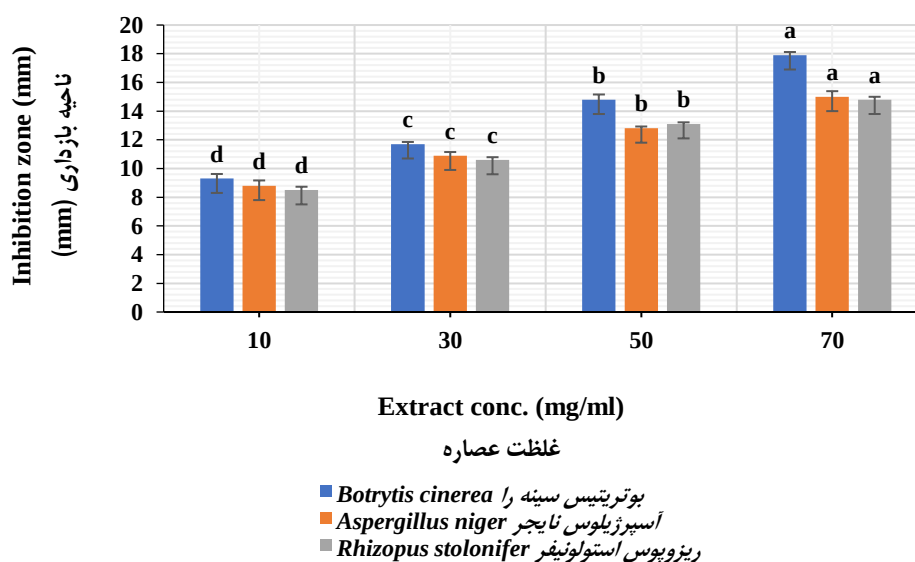
هیدروکسیل ساختار شیمیایی نسبت داده می‌شود که رادیکال‌های آزاد لیپیدی را مهار و خنثی می‌کنند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پلی‌فنول‌ها و کاتچین‌های چای اهداء کنندگان استثنایی الکترون و جاذب‌های مؤثر گونه‌های اکسیژن فعال فیزیولوژیکی مرتبط در شرایط آزمایشگاهی هستند (Camargo et al., 2016; Sabaghi et al., 2015; Senanayake, 2013).

نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی چای سبز بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار در شکل ۳ ارائه شده است. رشد تمامی سویه‌های قارچی در حضور عصاره چای سبز بطور مؤثری متوقف گردید. افزایش غلظت عصاره از ۱۰ به ۷۰ میلی گرم در میلی لیتر سبب افزایش قطر هاله عدم رشد از ۸/۸۷ میلی متر به ۱۵/۹ میلی متر گردید ($p < 0.05$). علاوه بر این، سویه‌های بوتریتیس سینه‌را و ریزوپوس/استولونیفر به ترتیب با بالاترین و کمترین قطر هاله عدم رشد، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی نسبت به عصاره بودند.

شکل ۲، نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ چای سبز را نشان می‌دهد. عصاره بطور مؤثری قادر به مهار رادیکال آزاد DPPH (78.89 ± 0.63 درصد) و ABTS (86.57 ± 0.48 درصد) بود. یکی از مکانیسم‌های اثر آنتی‌اکسیدانی (که اعتقاد بر این است که در فعالیت کاتچین‌های چای مهم است) مهار رادیکال‌های آزاد و در نتیجه مهار اکسیداسیون است. این مکانیسم همچنین توضیحی برای فعالیت ضد میکروبی در سلول‌ها و غشاء سلولی است (Frei & Higdon, 2003). اثر آنتی‌اکسیدانی بستگی به واریته چای دارد و محتوای اپی‌گالوکاتچین گالات بسیار مهم است. چای سبز دارای سطوح بالایی از اپی‌گالوکاتچین گالات و اپی‌گالوکاتچین هستند، اما محتوای چای سیاه بسیار کمتر است (Katalinic et al., 2006). توانایی آنتی‌اکسیدانی کاتچین‌ها، ارزیابی شده با روش DPPH، به این صورت گزارش شده است: اپی‌گالوکاتچین گالات < اپی‌کاتچین گالات < اپی‌گالوکاتچین < اپی‌کاتچین (Katalinic et al., 2006; Luczaj & Skrzydlewska, 2005). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌های چای سبز در درجه اول به ترکیب حلقه‌های آروماتیک و گروه‌های



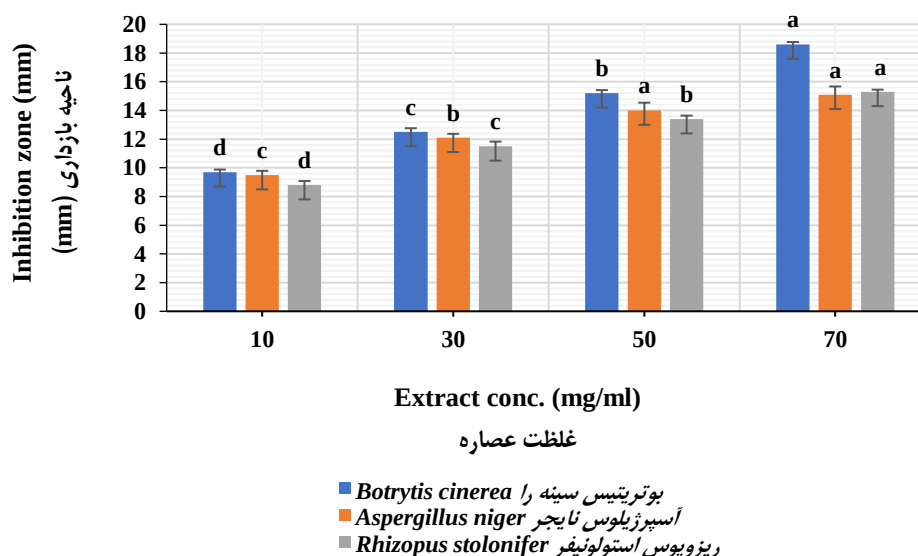
شکل ۲- فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی برگ چای سبز
Fig. 2. Antioxidant activity of green tea ethanolic extract



شکل ۳- فعالیت ضد قارچی عصاره اتانولی برگ چای سبز بر پایه روش دیسک دیفیوژن آگار
Fig. 3. Antifungal activity of green tea ethanolic extract, based on disk diffusion agar method

چاهک آگار حدود ۶/۵ درصد بزرگتر از قطر هاله عدم رشد در آزمون دیسک دیفیوژن آگار بود. این حالت عمدتاً ناشی از این حقیقت است که عصاره در این روش در تماس مستقیم با میکروارگانیسمها است، درحالی که عصاره در روش دیسک دیفیوژن آگار بایستی از سطوح دیسک به محیط پخش شود تا اثر ضد میکروبی خود را نشان دهد (Alizadeh Behbahani et al., 2021; Alizadeh Behbahani et al., 2019; Barzegar et al., 2020; Hojjati & Alizadeh Behbahani, 2021).

شکل ۴، اثر ضد قارچی عصاره چای سبز بر پایه روش چاهک آگار را نشان می دهد. بطور مشابه، افزایش غلظت عصاره (۱۰ به ۷۰ میلی گرم در میلی لیتر) سبب افزایش معنی دار قطر هاله عدم رشد (۹/۷۳ به ۱۶/۳۳ میلی متر) گردید. بطور کلی، بوتریتیس سینه را حساس ترین و ریزوپوس/استولونیفر مقاوم ترین سویه های قارچی در برابر عصاره اتانولی برگ چای سبز بودند. علاوه بر این، نتایج قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار بزرگتر از روش دیسک دیفیوژن آگار بودند. بطوریکه در غلظت ۷۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره، قطر هاله عدم رشد در آزمون



شکل ۴- فعالیت ضد قارچی عصاره اتانولی برگ چای سبز بر پایه روش چاهک آگار
 Fig. 4. Antifungal activity of green tea ethanolic extract, based on well diffusion agar method

جدول ۱- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره اتانولی چای سبز به روش ماکرودیلوشن براث بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

Table 1- The results of minimum inhibitory concentration (MIC) of green tea ethanolic extract on microorganisms tested, based on microdilution broth method

Microorganism میکروارگانیسم	Extract concentration (mg/ml) غلظت عصاره								Control
	4	8	16	32	64	128	256	512	
<i>Botrytis cinerea</i> بوتریتیس سینه‌را	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> آسپرژیلوس نایجر	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus stolonifera</i> ریزوپوس استولونیفر	+	+	+	+	+	-	-	-	-

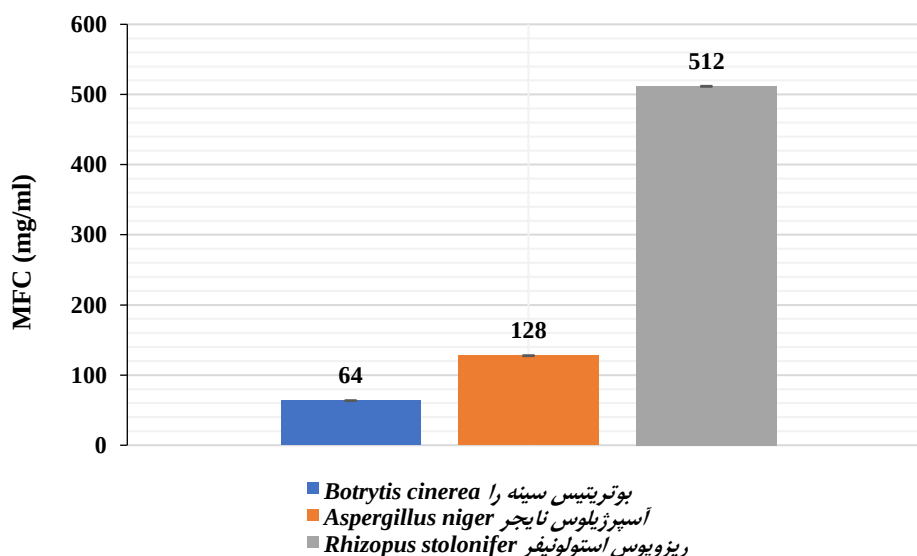
+: Grown; -: Not grown

و حساس‌ترین سویه‌های قارچی نسبت به عصاره اتانولی برگ چای سبز بودند.

ایکسی و همکاران (Xi et al., 2012) نشان دادند که عصاره آبی چای سبز می‌تواند جمعیت پنج سویه از ویبریو پاراهمولیتیکوس را از 10^4 CFU/ml به سطوح غیر قابل تشخیص ($< 1 \log$ CFU/ml) کاهش دهد و نتایج این محققین نشان داد که اثر ضد میکروبی به میزان فنول کل در عصاره چای بستگی دارد (Xi et al., 2012). مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که اپی‌گالوکاتچین گالات ترکیبی است که عمدتاً به فعالیت ضد میکروبی کمک می‌کند (Almajano et al., 2008; Chou et al., 1999; Si et al., 2006; Taguri et al., 2004).

نتایج آزمون ضد میکروبی عصاره اتانولی چای سبز در برابر سویه‌های قارچی بر اساس روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد در جدول ۱ گزارش شده است. مطابق نتایج، غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره تأثیری بر رشد سویه‌های قارچی نشان نداد، اما افزایش غلظت عصاره سبب جلوگیری از رشد سویه‌های قارچی گردید. بطوریکه به استثناء رشد ریزوپوس استولونیفر در حضور غلظت‌های ۴-۶۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تمامی سویه‌های قارچی در حضور غلظت‌های بالای عصاره قادر به رشد نبودند.

نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی در راستای یافته‌های سایر آزمون‌های ضد میکروبی بود (شکل ۵). قارچ ریزوپوس استولونیفر با حداقل غلظت کشندگی ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و بوتریتیس سینه‌را با حداقل غلظت کشندگی ۶۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب مقاوم‌ترین



شکل ۵- فعالیت ضد قارچی عصاره اتانولی برگ چای سبز بر پایه روش حداقل کشندگی

Fig. 5. Antifungal activity of green tea ethanolic extract, based on minimum fungicidal concentration method

کاتچین، عوامل اصلی فعالیت ضد میکروبی/قارچی عصاره چای سبز هستند (Koech et al., 2013; Sabaghi et al., 2015).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتانولی چای سبز ممکن است منبع بالقوه آنتی اکسیدان های طبیعی و عوامل ضد قارچی باشد. وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی ممکن است مسئول اثر ضد قارچی عصاره باشد. با این حال، با توجه به اینکه مطالعات با عصاره خام انجام شده است، شناسایی ترکیبات مسئول فعالیت ضد قارچی و آنتی اکسیدانی دشوار است. در این مورد، تنها جداسازی اجزای تشکیل دهنده عصاره، امکان آشکارسازی ترکیب ضد قارچی و آنتی اکسیدانی را فراهم می کند. نتایج حاضر مبنایی برای تحقیقات بیشتر، به ویژه استفاده از این آنتی اکسیدان ها و ترکیبات ضد قارچی فراهم می کند. عصاره چای سبز به ویژه برای محصولات با حساسیت بالا نسبت به اکسیداسیون لیپیدی و کپک زدگی مناسب است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۱۴۰۰/۳۱ می باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی به عنوان نگهدارنده در غذا پتانسیل بالایی دارد زیرا مصرف کنندگان مواد غذایی بدون افزودنی، تازه تر و طعم طبیعی تر را درخواست می کنند. با این حال، حفظ ایمنی میکروبیولوژیکی و به حداقل رساندن تعداد میکروارگانیسم های ناشی از مواد غذایی ضروری است. در این رابطه، مطالعاتی وجود دارد که نشان می دهد عصاره چای به عنوان مهارکننده عوامل بیماری زای غذایی از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیسانتری، ویبریو کلرا، کمپیلوباکتر ژرونی، لیستریا مونوسیتوژنز و غیره عمل می کند (Negi et al., 2003; Taguri et al., 2004). با این حال، تمام کاتچین های عصاره چای دارای فعالیت ضد باکتریایی نیستند. برخی از محققین دریافته اند که عصاره چای سبز در برابر *شریشیا کلی* مؤثر نیست، اگرچه که اپی گالوکاتچین گالات در غلظت ۱۰-۱۰۰ میکرومولار رشد *شریشیا کلی* را تقریباً ۵۰ درصد کاهش می دهد (Nazer et al., 2005). در مطالعه ای دیگر مشخص گردید که بیشترین فعالیت ضد میکروبی مربوط به بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی و کمتر به محتوای پلی فنول کل است. به همین دلیل می توان ادعا کرد که همه پلی فنول های چای دارای اثرات ضد میکروبی نیستند (Almajano et al., 2008). در این راستا، گزارش شده است که اپی گالوکاتچین گالات و اپی گالوکاتچین دارای بالاترین قدرت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی هستند (Gramza & Korcza, 2005). فعالیت ضد میکروبی/قارچی عصاره چای سبز با محتوای کاتچین مرتبط است و گزارش شده است که بخش های هیدروکسیل در موقعیت ۳، ۴ و ۵ روی حلقه B در مولکول های

منابع

1. Ahmed, A.F., Attia, F.A., Liu, Z., Li, C., Wei, J., & Kang, W. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.07.004>
2. Alghooneh, A., Alizadeh Behbahani, B., Noorbakhsh, H., & Tabatabaei Yazdi, F. (2015). Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Frankfurter sausage containing *Satureja bachtiarica* extracts. *Microbial Pathogenesis*, 85, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.06.003>
3. Alizade Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Heidari Sureshjani, M., Mortazavi, A., & Tabatabaei Yazdi, F. (2014). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Satureja bachtiarica* extracts "in vitro". *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*, 19(64), 13-19.
4. Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaei Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food Science & Nutrition*, 9(5), 2458-2467. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2186>
5. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 875-883.
6. Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F.T., & Mohebbi, M. (2013a). Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus" in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(7), 1652-1658.
7. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S.A., Zendeboodi, F., Gholian, M.M., & Vasiee, A. (2013b). Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". *Journal of Paramedical Sciences*, 4(3), 89-99.
8. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Noorbakhsh, H., Riazi, F., Jajarmi, A., & Tabatabaei Yazdi, F. (2016b). Study of the antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of *Myrtus communis* on pathogenic strains causing infection. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 18(2), e5989.
9. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Riazi, F. (2016a). Antifungal effect of the aqueous and ethanolic *Avicennia marina* extracts on *Alternaria citri* and *Penicillium digitatum*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 18(2), e5992.
10. Almajano, M.P., Carbo, R., Jiménez, J.A.L., & Gordon, M.H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108(1), 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.040>
11. Al-Samarrai, G., Singh, H., & Syarhabil, M. (2012). Evaluating eco-friendly botanicals (natural plant extracts) as alternatives to synthetic fungicides. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(4), 673-676.
12. Baena, R., Araujo, E.S., Souza, J.P., Bischoff, A.M., Zarbin, P.H., Zawadneak, M.A., & Cuquel, F.L. (2022). Ripening stages and volatile compounds present in strawberry fruits are involved in the oviposition choice of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Crop Protection*, 153, 105883. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105883>
13. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M.A. (2020). Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. *Food Science and Biotechnology*, 29(5), 717-728. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00715-4>
14. Bharti, R., & Singh, B. (2020). Green tea (*Camellia assamica*) extract as an antioxidant additive to enhance the oxidation stability of biodiesel synthesized from waste cooking oil. *Fuel*, 262, 1, 16658. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116658>
15. Camargo, L., Pedroso, L., Vendrame, S., Mainardes, R., & Khalil, N. (2016). Antioxidant and antifungal activities of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves obtained by different forms of production. *Brazilian Journal of Biology*, 76, 428-434.
16. Chou, C.-C., Lin, L.-L., & Chung, K.-T. (1999). Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *International Journal of Food Microbiology*, 48(2), 125-130. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00034-3)
17. du Plooy, W., Regnier, T., & Combrinck, S. (2009). Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. *Postharvest Biology and Technology*, 53(3), 117-122. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.04.005>
18. Dufresne, C.J., & Farnworth, E.R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(7), 404-421. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00155-3)

19. Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Alizadeh behbahani, B., & Noshad, M. (2020). Antimicrobial potential of *Cordia myxa* fruit on pathogenic bacteria: A study "in vitro" laboratory conditions. *Food Science and Technology*, 17(101), 71-80.
20. Frei, B., & Higdon, J.V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *The Journal of nutrition*, 133(10), 3275S-3284S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.10.3275S>
21. Gramza, A., & Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology*, 16(8), 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.004>
22. Gupta, D., & Kumar, M. (2017). Evaluation of in vitro antimicrobial potential and GC-MS analysis of *Camellia sinensis* and *Terminalia arjuna*. *Biotechnology Reports*, 13, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.11.002>
23. Ho, C., Chen, C., Wanasundara, U., & Shahidi, F. (1997). Natural antioxidants from tea. *Natural Antioxidants*, 213-223.
24. Hojjati, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Evaluation of the effect of aqueous and methanolic extraction methods on the antioxidant and antimicrobial characteristics of *Allium jesdianum* extract: in vitro study. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 17(1), 83-91. <https://doi.org/10.22067/iftstrj.v17i1.85992>
25. Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94(4), 550-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>
26. Kiarsi, Z., Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). In vitro antimicrobial effects of *Myristica fragrans* essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 40(3), e12782. <https://doi.org/10.1111/jfs.12782>
27. Koech, K., Wachira, F.N., Ngure, R., Orina, I., Wanyoko, J., Bii, C., & Karori, S. (2013). Antifungal activity of crude tea extracts. *African Journal of Agricultural Research*, 8(19), 2086-2089.
28. Luczaj, W., & Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine*, 40(6), 910-918. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2004.10.014>
29. Marquenie, D., Michiels, C., Geeraerd, A., Schenk, A., Soontjens, C., Van Impe, J., & Nicolai, B. (2002). Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3), 187-196. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00648-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00648-1)
30. Mohseni, P., Borghei, A.M., & Khanali, M. (2018). Coupled life cycle assessment and data envelopment analysis for mitigation of environmental impacts and enhancement of energy efficiency in grape production. *Journal of Cleaner Production*, 197, 937-947. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.243>
31. Namita, P., Mukesh, R., & Vijay, K.J. (2012). *Camellia sinensis* (green tea): a review. *Global Journal of Pharmacology*, 6(2), 52-59.
32. Nazer, A., Kobilinsky, A., Tholozan, J.-L., & Dubois-Brissonnet, F. (2005). Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microbiology*, 22(5), 391-398. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.10.003>
33. Negi, P., Jayaprakasha, G., & Jena, B. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80(3), 393-397. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00279-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00279-0)
34. Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Hemmati Kaykha, M.E., & Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). Utilization of *Plantago major* seed mucilage containing *Citrus limon* essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1625-1639. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2137>
35. Persaud, R., Khan, A., Isaac, W.-A., Ganpat, W., & Saravanakumar, D. (2019). Plant extracts, bioagents and new generation fungicides in the control of rice sheath blight in Guyana. *Crop Protection*, 119, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.01.008>
36. Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich, B., Otto, F., & Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, 96(4), 597-605. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.015>
37. Rahmati-Joneidabad, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Identification of chemical compounds, antioxidant potential, and antifungal activity of *Thymus daenensis* essential oil against spoilage fungi causing apple rot. *Iranian Food Science and Technology Research*, 17(5), 691-700. <https://doi.org/10.22067/iftstrj.v18i1.87595>
38. Rahmati-Joneidabad, M., Alizade Behbahani, B., & Noshad, M. (2021). Antifungal effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizopus stolonifer* causing strawberry's rot and mold. *Food Science and Technology*, 18(115), 171-180. <https://doi.org/10.52547/fsct.18.115.13>
39. Sabaghi, M., Maghsoudlou, Y., Khomeiri, M., & Ziaifar, A.M. (2015). Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 224-228. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.025>

40. Saki, A., Mozafari, H., Asl, K. K., Sani, B., & Mirza, M. (2019). Plant yield, antioxidant capacity and essential oil quality of *Satureja mutica* supplied with cattle manure and wheat straw in different plant densities. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 50(21), 2683-2693. <https://doi.org/10.1080/00103624.2019.1670835>
41. Senanayake, S.N. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications—A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1529-1541. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.011>
42. Si, W., Gong, J., Tsao, R., Kalab, M., Yang, R., & Yin, Y. (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, 1125(2), 204-210. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.061>
43. Solairaj, D., Legrand, N.N.G., Yang, Q., & Zhang, H. (2020). Isolation of pathogenic fungi causing postharvest decay in table grapes and in vivo biocontrol activity of selected yeasts against them. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 110, 101478. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101478>
44. Taguri, T., Tanaka, T., & Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(12), 1965-1969.
45. Tang, Y., Ma, X., Li, M., & Wang, Y. (2020). The effect of temperature and light on strawberry production in a solar greenhouse. *Solar Energy*, 195, 318-328. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2019.11.070>
46. Tehranifar, A., & Sarsaefi, M. (2000). *Strawberry growing in Iran*. IV International Strawberry Symposium 567.
47. Wang, H., Provan, G.J., & Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 11(4-5), 152-160. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00061-3)
48. Xi, D., Liu, C., & Su, Y.-C. (2012). Effects of green tea extract on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and increasing shelf life of oyster meats. *Food Control*, 25(1), 368-373. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.002>
49. Yang, Z., Tu, Y., Baldermann, S., Dong, F., Xu, Y., & Watanabe, N. (2009). Isolation and identification of compounds from the ethanolic extract of flowers of the tea (*Camellia sinensis*) plant and their contribution to the antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 42(8), 1439-1443. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.017>
50. Yeganegi, M., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S.A., Asili, J., Alizadeh Behbahani, B., & Beigbabaei, A. (2018). *Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial Pathogenesis*, 116, 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.014>



The Mineral Content of Sesame Seed and Its Transition to Ardeh and Refined Sesame Oil

S. Kheirati Rounizi¹, F. Akrami Mohajeri², H. Moshtaghi Broujeni³, S. Jambarsang⁴, H. Kiani⁵, E. Khalili Sadrabad^{6*}

Received: 2022.04.25

Revised: 2022.07.19

Accepted: 2022.09.19

Available Online: 2022.09.19

How to cite this article:

Kheirati Rounizi, S., Akrami Mohajeri, F., Moshtaghi Broujeni, H., Jambarsang, S., Kiani, H., & Khalili Sadrabad, E. (2023). The mineral content of sesame seed and its transition to ardeh and refined sesame oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 491-499. (In Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76047.1161>

Background and objective

It was shown that contamination of agricultural pasturage with fertilizers, application of sewage and effluents in irrigation, use of pesticides and air pollution have led to the entrance of chemical contaminants, including metals, into plants. On the other hand, food processing is (handling, processing, transportation) considered as an important way of food contamination. Vegetable oils are essential in human dietary which is introduced as crucial sources of energy, fat soluble vitamins, and essential fatty acids. *Sesamum indicum* L., known as sesame seed, has been cultivated in Asian countries from ancient times as vegetable oil for cooking and seasoning ingredients. In recent years, the sesame oil has been considered due to its high antioxidant activities and nutritional properties. Due to the use of sesame seeds extracted oil in two form of ardeh oil and sesame oil, the amounts of mineral elements (phosphorus, potassium, iron, nickel, cobalt, manganese, calcium and magnesium) in sesame seeds and its extracted oils (ardeh oil and refined sesame oil) were investigated.

Materials and Methods

In order to determine the mineral concentration, refined sesame oil and ardeh oils were prepared from an imported sesame seed. In order to prepare the sesame oil, sesame seeds were put into a cold presser and the oil was extracted under low pressure. The Ardeh oil was prepared by adding water to sesame paste in the ratio of 2.2:10 and oil was separated by centrifugation. The sesame seeds and oil samples (refined sesame oil and ardeh oils) were digested by microwave digestion method in presence of 5 ml 65% nitric acid and 2 ml of hydrogen peroxide (H₂O₂). The digested samples were then filtered through 0.45 µm filter membrane. Then, the concentrations of phosphorus, potassium, iron, nickel, cobalt, manganese, calcium and magnesium in sesame seeds, ardeh oil and refined sesame oil were examined using Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy (ICP – OES).

Results

In the present study, the limit of detection (LOD) for each studied mineral elements were determined as nickel: 4 mg/kg, magnesium: 0.00066 mg/kg, manganese: 0.000134 mg/kg, phosphorus: 0.384 mg/kg, cobalt: 0.594 µg / kg, iron:

1, 2 and 6- M.Sc. Graduated, Associate Professor and Assistant Professor, Research Center for Food Hygiene and Safety, Department of Food Hygiene and Safety, School of Public Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: Khalili.elham@ssu.ac.ir)

3- Professor, Department of Food Hygiene and Quality control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

4- Associate Professor, Center for Healthcare Data Modeling, Departments of Biostatistics and Epidemiology, School of PublicHealth, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

5- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.76047.1161](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76047.1161)

0.000797 mg/kg, potassium: 0.00394 mg/kg, calcium 0.005 mg/kg. According to the results, the highest amounts of mineral elements were detected in sesame seeds. The achieved results showed that the method of sesame oil extraction can reduce the mineral elements in the final sesame oils. The amounts of mineral elements in sesame seeds were estimated as $P > Ca > K > Mg > Fe > Mn > Co > Ni$. The pattern of mineral elements in Ardeh oil was reported as $P > Fe > K > Co > Mg > Ni > Mn > Ca$. The reduction pattern was reported as $P > K > Fe > Ni > Co > Mn > Ca > Mg$ in refined sesame oil. As can be seen the order of mineral elements was changed in two oil samples and sesame seed. It was shown that except for K and Ca, all mineral elements in ardeh oil were higher than refined sesame oil. As can be seen, the refining process was effectively reduced the metals in oil samples. On the other hand, high amount of mineral elements in sesame seed in comparison to extracted oils could be attributed to lack of processing methods which are present in oil production in both methods.

Conclusion

It should be considered that presence of different metals in vegetable oils could facilitate the oil deterioration and oxidization as well as oil shelf life reduction. Since the most of the sesame lots in Iran are imported, it is necessary to monitor the amount of mineral elements.

Keywords: Ardeh oil, Mineral elements, Sesame oil, Sesame seed

مقاله پژوهشی

بررسی میزان املاح معدنی در دانه کنجد و انتقال آن به روغن ارده و کنجد تصفیه

سمیه خیراتی رونیزی^۱ - فاطمه اکرمی مهاجری^۲ - حمدالله مشتاقی بروجنی^۳ - سارا جام بر سنگ^۳ - حسین کیانی^۴ - الهام

خلیلی صدرآباد^{۵*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۴/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۸

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از روغن کنجد به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا و خواص تغذیه‌ای مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به استفاده از روغن استحصالی از دانه کنجد به دو صورت روغن ارده و روغن کنجد، در مطالعه حاضر مقادیر عناصر معدنی در دانه کنجد و روغن استحصالی از آن (روغن ارده و کنجد تصفیه) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین مواد معدنی، نمونه روغن ارده و روغن کنجد تصفیه از یک نوع دانه کنجد وارداتی تهیه شد. نمونه‌ها با استفاده از هضم به روش مایکروویو در حضور ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ و ۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه هضم شد. نمونه‌های هضم شده از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شد. سپس غلظت فسفر، پتاسیم، آهن، نیکل، کبالت، منگنز، کلسیم و منیزیم در دانه کنجد، روغن ارده و روغن کنجد تصفیه شده هضم شده با استفاده از دستگاه ICP-OES (طیف‌سنج پلاسمای جفت القایی) مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر میزان حد تشخیص برای عناصر مورد بررسی شامل منیزیم: ۰/۰۰۰۶۶، منگنز: ۰/۰۰۰۱۳۴، فسفر: ۰/۳۸۴، آهن: ۰/۰۰۰۷۹۷، پتاسیم: ۰/۰۰۳۹۴، کلسیم: ۰/۰۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم، نیکل: ۴ و کبالت: ۰/۵۹۴ میکروگرم بر کیلوگرم بود. براساس نتایج بدست آمده بالاترین مقادیر عناصر معدنی در دانه کنجد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد روغن کنجد از دانه کنجد منجر به کاهش عناصر معدنی در روغن استحصالی شده است. مقادیر مواد معدنی در دانه کنجد به صورت فسفر < کلسیم < پتاسیم < منیزیم < آهن < منگنز < کبالت < نیکل تخمین زده شد. دیده شد که به استثنای پتاسیم و کلسیم، میزان تمامی عناصر معدنی در روغن ارده بالاتر از روغن کنجد تصفیه شده تخمین زده شد. همچنین مقادیر آهن و نیکل در تمامی نمونه‌های مورد بررسی بالاتر از حد مجاز تخمین شده شد. از آنجایی که بیشتر کنجدهای ایران وارداتی است، به منظور حفظ سلامت مصرف‌کنندگان نظارت بر میزان مواد معدنی ضروری است.

واژه‌های کلیدی: روغن ارده، روغن کنجد، کنجد، عناصر معدنی

مقدمه

بسیاری از پروسه‌های بیوشیمیایی دارای اهمیت هستند (Ghazani et al., 2013). کنجد گیاهی از خانواده Pedaliacea بوده که روغن استحصالی از آن یکی از منحصربه‌فردترین و قدیمی‌ترین روغن‌ها محسوب می‌شود (Rahimi et al., 2020). روغن استحصالی از دانه

چربی‌ها و روغن‌ها حاوی مواد مغذی ضروری برای انسان هستند. در میان بسیاری از عملکردهای متعدد، چربی‌ها منابع انرژی، حامل ویتامین‌های محلول در چربی و اسیدهای چرب ضروری بوده و در

۱، ۲ و ۶- به ترتیب دانش‌آموخته، دانشیار و استادیار، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

(*) نویسنده مسئول: (Email: khalili.elham@ssu.ac.ir)

۳- استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات مدل سازی داده‌های سلامت، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۵- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

روغن شده و در نتیجه در روغن به حالت معلق وجود داشته باشند (De Leonardis et al., 2000).

عناصر ضروری همانند مس، روی، آهن، منگنز و نیکل در غلظت های پایین برای بدن ضروری هستند و چنانچه مقادیر این مواد از حد قابل قبول تجاوز کند می تواند اثرات نامطلوب ایجاد کند. بنابراین تازگی، قابلیت ذخیره سازی، کیفیت روغن و مشکلات بهداشتی روغن می تواند از طریق تعیین مقادیر عناصر ضروری مشخص گردد (Ramezani et al., 2021). از آنجا که در سال های اخیر تمایل مردم به مصرف روغن های خام و بدون تصفیه بیشتر شده است، بنابراین بررسی کیفیت و سلامت این روغن ها می تواند در نیل به اهداف بهداشتی جامعه مؤثر بوده و به طور مستقیم بر سلامت افراد تأثیر مثبت داشته باشد. از طرف دیگر مصرف روغن کنجد استحصال شده از ارده نیز در سبد غذایی خانوارهای ایرانی در سال های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته و ارائه تفاوت های علمی و منطقی در انتخاب بین این روغن ها موضوع مهمی در بین خانواده ها می باشد. بنابراین، هدف تحقیق حاضر، بررسی مقادیر مواد معدنی نیکل، منیزیم، منگنز، فسفر، کبالت، آهن، پتاسیم و کلسیم در دانه کنجد و روغن استحصالی به صورت ارده و کنجد تصفیه شده است.

مواد و روش ها

تجهیزات و مواد مورد نیاز: دانه کنجد، آب دیونیزه (دوبار تقطیر)، اسید نیتریک غلیظ (۶۵ درصد)، آب اکسیژنه، دستگاه هضم مایکروویو، فیلتر سر سرنگی، دستگاه ICP-OES.

تهیه نمونه روغن ارده: ابتدا دانه کنجد بوجاری شده و سپس در آب خیسانده و بعد از گذشت مدتی که رطوبت در سطح پوست یکنواخت شد، کنجدها وارد دستگاه پوست کنی و سپس در حوض های آب نمک ریخته شدند. در نهایت کنجد در دستگاهی برشته و آماده ورود به آسیاب شدند. در دستگاه آسیاب کنجدهای بو داده شده، له شده و به شکل ارده درآمدند. سپس به ازای صد کیلوگرم ارده حدود ۲۲ لیتر آب نیم گرم به داخل مخلوط کن اضافه و حدود یک ساعت اختلاط انجام گردید. سوسپانسیون جامد در آب ارده شکسته و روغن جدا و با استفاده از پرس، روغن جداسازی شد (INSO, 2016).

تهیه روغن کنجد: کنجدها در ابتدا بوجاری و سپس وارد دستگاه کلدپرس گردیدند. در این دستگاه روغن کنجد تحت فشار وارده و در درجه حرارت پایین استخراج و تصفیه شد (INSO, 2014).

هضم نمونه ها با دستگاه مایکروویو: روغن ارده و روغن کنجد تصفیه شده جمع آوری شده و به منظور هضم نمونه ها، ۰/۵ گرم نمونه روغن هموژن درون ظرف تفلونی مخصوص مایکروویو ریخته شد. ظرف حاوی نمونه در زیر هود قرار داده شده و سپس ۵ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ و ۲ میلی لیتر آب اکسیژنه بر روی آن افزوده شد. در ادامه

کنجد علاوه بر استفاده خوراکی، دارای مصارف صنعتی و دارویی هم می باشد. علاوه بر این، برای این روغن ها اثرات مفیدی همچون کاهش کلسترول و فشار خون، محافظت کننده کبد، ضد سرطان گزارش شده است (Tenyang et al., 2017). در حال حاضر، در ایران استخراج روغن از دانه کنجد به دو روش سنتی و صنعتی انجام می گیرد. روش مرسوم برای استخراج روغن از دانه کنجد در صنعت، روش پرس سرد می باشد که همان فشردن دانه روغنی بدون اعمال حرارت می باشد. روغن حاصل از پرس سرد عاری از هرگونه افزودنی و یا نگهدارنده های شیمیایی بوده و می تواند حاوی بیشترین میزان مواد تغذیه ای مفید همچون ویتامین E و اسیدهای چرب غیراشباع باشد (Martínez et al., 2017). در روش سنتی، معمولاً از ارده برای تولید روغن کنجد استفاده می کنند. ارده فرآورده ای است مایع که پس از طی مراحل پوست گیری، بو دادن و آسیاب کردن دانه کنجد، به دست می آید. در این روش ارده با آب نیمه گرم مخلوط شده و روغن از ارده جدا می شود. در انتها با استفاده از پرس سعی می شود حداکثر روغن استخراج شود (INSO, 2016). مراحل مختلف فراوری دانه های روغنی و فرایندهای تصفیه همگی سبب ایجاد تغییراتی در روغن استحصالی شده که این تغییرات در مواردی منجر به بهبود کیفیت و در مواردی نیز ممکن است کاهش کیفیت محصول را به همراه داشته باشد (Kheirati Rounizi et al., 2021). اکسیداسیون چربی یکی از عمده ترین مشکلات صنعت روغن است که می تواند بر روی زمان ماندگاری محصول تأثیر منفی داشته باشد. اکسیداسیون روغن تحت تأثیر عوامل متعددی همانند میزان اسیدهای چرب غیر اشباع، فعالیت آنزیمی، ترکیبات معدنی (مواد معدنی و فلزات) و حضور آنتی اکسیدان های طبیعی است (Tenyang et al., 2017). مطالعات متعددی نشان داده است که نحوه فرآوری دانه کنجد و همچنین نحوه تهیه روغن از دانه کنجد می تواند بر خصوصیات محصول نهایی مؤثر باشد (Makinde & Akinoso, 2013, Tenyang et al., 2017). همانطور که بیان شد، یکی از عوامل مهم در کیفیت محصول نهایی، مقادیر ترکیبات مواد معدنی در روغن می باشد. امروزه در جوامع صنعتی، حضور فلزات یکی از مسائل بهداشتی و زیست محیطی را تشکیل می دهد. حضور فلزات در روغن های گیاهی علاوه بر خاک، کود و آب مورد استفاده در کشاورزی، از طریق آلودگی در طول تکنیک های زراعی تولید و جمع آوری دانه ها، در طی فرایند استخراج و تیمار روغن و همچنین سیستم ها و مواد بسته بندی و ذخیره سازی هم رخ می دهد (Farzin & Moassesi, 2014, Pehlivan et al., 2008). همچنین ممکن است فلزات در طول فرایند تولید (در عملیات رنگ بری، تصفیه و بی بوسازی) و همچنین از طریق تجهیزات فلزی مورد استفاده در طی فرآوری، وارد

فرآیندهای استخراج (رنگبری و تصفیه و بی‌بو کردن) و تیمار روغن، همچنین آلودگی تجهیزات فرآوری، بسته‌بندی و ذخیره‌سازی ممکن است به فلزات آلوده شوند.

در مطالعه حاضر میزان حد تشخیص یا LOD^۱ برای عناصر مورد مطالعه شامل نیکل: ۴ میکروگرم بر کیلوگرم، منیزیم: ۰/۰۰۰۶۶ میلی گرم بر کیلوگرم، منگنز: ۰/۰۰۰۱۳۴ میلی گرم بر کیلوگرم، فسفر: ۰/۳۸۴ میلی گرم بر کیلوگرم، کبالت: ۰/۵۹۴ میکروگرم بر کیلوگرم، آهن: ۰/۰۰۷۹۷ میلی گرم بر کیلوگرم، پتاسیم: ۰/۰۰۳۹۴ میلی گرم بر کیلوگرم، کلسیم: ۰/۰۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم بود. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، میزان املاح مختلف در دانه کنجد بیشتر از روغن ارده و تصفیه شده بوده و این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار ($p < 0.05$) می‌باشد. بیشترین میزان ماده معدنی به مقدار ۱۵۰۶۰/۹ میلی گرم بر کیلوگرم مربوط به فسفر در دانه کنجد بوده و کمترین میزان املاح مربوط به منیزیم در روغن تصفیه شده و کلسیم در روغن ارده و روغن کنجد است که کمتر از LOD دستگاه تخمین زده شده است. به استثنای پتاسیم و کلسیم، میزان تمامی عناصر معدنی در روغن ارده بالاتر از روغن کنجد تصفیه شده تخمین زده شد.

مقادیر مواد معدنی در دانه کنجد به صورت فسفر < کلسیم < پتاسیم < منیزیم < آهن < منگنز < کبالت < نیکل تخمین زده شد. در مطالعه تیانگ و همکاران (Tenyang et al., 2017) بیشترین میزان ماده معدنی در نمونه‌های دانه کنجد را کلسیم و سپس پتاسیم، فسفر و منیزیم گزارش شد. در تحقیق انزیکو و همکاران (Nzikou JM, 2010) بیشترین مواد معدنی در دانه کنجد خام به ترتیب پتاسیم، فسفر، منیزیم، کلسیم و سدیم گزارش شد. در مطالعه الیمنی و همکاران (Saudy, 2013) کلسیم، فسفر و آهن گزارش شد. در تحقیق محمد و همکاران (Mohammed & Hassan, 2018) بیان شد که در مناطق جغرافیایی مختلف پتاسیم، کلسیم، فسفر، منیزیم، منگنز و آهن ترکیبات معدنی اصلی در کنجد است. همانطور که مشاهده می‌شود، در مطالعه حاضر، بیشترین میزان مواد معدنی در دانه کنجد است.

دانه کنجد منبع خوبی از مواد معدنی نظیر کلسیم، فسفر، پتاسیم و آهن است. دانه‌های کنجد حاوی ۴ تا ۶ درصد مواد معدنی بوده که از این میان مقدار ۱ درصد آن کلسیم و ۷ درصد فسفر می‌باشد. کلسیم در دانه کنجد، بیشتر در پوست دانه وجود داشته و با پوست‌گیری از دست می‌رود (Mbaebie et al., 2010). در مطالعه حاضر، میزان کلسیم در نمونه‌های روغن ارده و روغن کنجد کمتر از دانه کنجد تخمین زده شد. این کاهش در روغن ارده می‌تواند به از دست رفتن کلسیم در طی پوست‌گیری نسبت داده شود. دیده‌شده است که صمغ‌زدایی آنزیمی

نمونه‌ها جهت انجام عمل هضم داخل مایکروویو قرار داده شد. برنامه هضم نمونه‌های مایکروویو به صورت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد اعمال گردید. پس از عملیات هضم، محلول حاصل در لوله‌های فالكون اسیدوآش شده ریخته و با استفاده از آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس جهت تزریق به دستگاه ICP-OES (طیف‌سنج پلاسمای جفت القایی) انتقال داده شد (Zhu et al., 2011, Kheirati Rounizi et al., 2021).

قرائت عناصر معدنی با ICP-OES: نمونه‌های هضم شده از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شد و سپس به دستگاه ICP-OES تزریق شد تا بر اساس میزان جذب نوری در طول موج‌های مختلف مقادیر فلزات را اندازه‌گیری نماید (Khalili Sadrabad et al., 2018).

آنالیز داده‌ها: داده‌ها پس از جمع‌آوری وارد نرم‌افزار SPSS شده و با استفاده از شاخص‌های توصیفی، میانگین، میانه، انحراف معیار و دامنه تغییرات توصیف شد. برای بررسی تأثیر روش‌های روغن‌گیری بر کاهش و افزایش هر یک از متغیرهای مورد بررسی از آنالیز کوواریانس ANCOVA استفاده شد.

نتایج و بحث

حضور مواد معدنی برای فعالیت تعدادی از آنزیم‌ها به منظور بهبود عملکرد بیولوژیکی بدن، ضروری هستند. پایداری زندگی به توانایی بدن برای ایجاد تعادل بین مواد معدنی مختلف وابسته است (Ozkan & Kulak, 2013). حضور فلزات در روغن‌های خوراکی شاخصی مهم در تعیین کیفیت روغن می‌باشد. روغن‌های گیاهی ممکن است حاوی یون‌های فلزی همچون آهن، مس، روی و سرب باشند که می‌توانند به عنوان پیش‌اکسیدان عمل کنند (Szydłowska-Czeraniak et al., 2013, Ramezani & Rezaei, 2018). بنابراین، حضور بیش از حد مواد معدنی در روغن تهیه شده از گیاهان می‌تواند منجر به تسریع واکنش‌های اکسیداتیو در روغن شده و علاوه بر کاهش کیفیت روغن، بر روی سلامت مصرف‌کننده اثر مضر داشته باشد (Sedaghat Boroujeni et al., 2017). گیاهان در طی رشد در خاک، آبیاری با پساب کارخانجات، آلودگی در تکنیک‌های زراعی تولید و جمع‌آوری دانه‌هایی می‌توانند فلزات سنگین و مواد معدنی را جذب کنند. اهمیت آلودگی دانه‌های روغنی به فلزات می‌تواند به دلیل کاربرد خوراکی مستقیم، استفاده در فرمول‌های غذایی و انتقال به روغن‌های خوراکی باشد. روغن‌های حاصل از گیاهان علاوه بر موارد ذکرشده، در طول

زو و همکاران (Zhu et al., 2011)، مقادیر فلزات مس، روی، آهن، منگنز، کادمیوم، نیکل، سرب و آرسنیک را در نه نوع روغن گیاهی مصرفی در چین بررسی نمودند.

بهترین نوع فرآوری موجود برای کاهش میزان فسفر روغن‌های گیاهی به کمتر از ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم است (Lamas et al., 2014). مقادیر پتاسیم، منیزیوم، فسفر، آهن، مس، روی و منگنز در دانه کنجد خام به ترتیب ۵۲۵/۹، ۳۴۹/۹، ۵۱۶، ۱۱/۳۹، ۲/۱۵، ۸/۸۷، ۳/۴۶ میلی گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک تخمین زده شد (Elleuch et al., 2007).

جدول ۱- میانگین مواد معدنی در کنجد، روغن ارده و کنجد تصفیه شده برحسب mg/kg
Table 1- concentration of mineral elements in sesame seed, Ardeh and refined sesame oil (mg/kg)

مواد معدنی Mineral elements	دانه کنجد Sesame seed	روغن ارده Ardeh oil	روغن کنجد تصفیه Refined sesame oil
(Mg) منیزیوم	3331.5 ± 36.9 ^a	3.03 ± 0.4 ^b	>0.00066 ^c
(Mn) منگنز	26.3 ± 3.6 ^a	0.3 ± 0.1 ^b	0.32 ± 0.05 ^b
(P) فسفر	15060.9 ± 877.4 ^a	60.42 ± 4.9 ^b	40.15 ± 3.01 ^c
(Ni) نیکل	4.82 ± 0.24 ^a	2.95 ± 0.86 ^b	2.73 ± 0.23 ^b
(K) پتاسیم	8921.8 ± 149.6 ^a	6.4 ± 1.04 ^b	13.15 ± 2.18 ^c
(Fe) آهن	109.9 ± 35.11 ^a	15.4 ± 1.4 ^b	7.8 ± 2.1 ^c
(Co) کیالت	24.71 ± 8.87 ^a	3.38 ± 0.5 ^b	1.68 ± 0.47 ^c
(Ca) کلسیم	9663.37 ± 28.35 ^a	> 0.005 ^b	> 0.005 ^b

LOD: نیکل: ۴ ppb، منیزیوم: ۰/۰۰۰۶۶ ppm، منگنز: ۰/۰۰۰۱۳۴ ppm، فسفر: ۰/۳۸۴ ppm، کیالت: ۰/۵۹۴ ppb، آهن: ۰/۰۰۰۷۹۷ ppm، پتاسیم: ۰/۰۰۳۹۴ ppm، کلسیم: ۰/۰۰۵ ppm

LOD: Ni: 4 ppb, Mg: 0.00066 ppm, Mn: 0.000134 ppm, P: 0.384 ppm, Co: 0.594 ppb, Fe: 0.000797 ppm, K: 0.00394 ppm, Ca: 0.005 ppm.

حروف نامتشابه در هر ردیف بیان کننده معنی داری در سطح ۵ درصد است.

Different letters in each row indicated the significantly at 0.05 level.

عصبی لازم است (Sani et al., 2013). در مطالعه حاضر، میزان منگنز در دانه کنجد ۲۶/۳ میلی گرم بر کیلوگرم تخمین زده شد که این میزان در روغن کنجد و روغن ارده به شدت کاهش یافته است.

آهن از آلاینده‌های معمول روغن محسوب می‌شوند که نقشی مهمی در تسریع تنزل کیفیت روغن دارد (Lamas et al., 2016). آهن از عناصر ضروری است که در صورت بالا رفتن از حد مجاز استاندارد می‌تواند منجر به اختلال در سیستم فیزیولوژیکی بدن شود (Abu-Almaaly, 2019). در مطالعه حاضر میزان آهن در نمونه‌های کنجد، روغن ارده و روغن کنجد تصفیه به ترتیب ۱۰۹/۹، ۱۵/۴ و ۷/۸ میلی گرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد. براساس استاندارد سازمان کدکس میزان مجاز آهن در روغن‌های گیاهی ۱/۵ و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب در روغن تصفیه و روغن خام تخمین زده شده است (Commission, 1999). همانطور که مشاهده می‌شود، مقادیر آهن در نمونه‌های روغن در مطالعه حاضر بالاتر از حد مجاز تعیین شده توسط سازمان کدکس تخمین زده شد. برخلاف نتایج حاصل، میزان آهن در نمونه‌های دانه

مقادیر فلزات مس، روی، آهن، منگنز، نیکل، سرب و آرسنیک در روغن کنجد مورد بررسی در مطالعه این محققان به ترتیب در محدوده ۰/۰۲۸ تا ۰/۳۹، ۰/۷۸۹ تا ۰/۸۸۳، ۳۷/۹ تا ۳۸/۵، ۰/۱۷۱ تا ۰/۱۸۴/۱۸۴ تا ۰/۰۷۵، ۰/۰۱۴ تا ۰/۰۱۸ و ۰/۰۱۵ تا ۰/۰۱۹ میلی گرم در کیلوگرم و کادمیوم ۵/۲۷ تا ۵/۴۴ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش شد (Zhu et al., 2011). سعید و همکاران (Saeed et al., 2015) به بررسی خصوصیات شیمیایی چند گونه مختلف کنجد پرداختند. مقادیر فلزات و عناصر معدنی انواع کنجد در مطالعه این محققان به میزان کلسیم: ۴۵۱/۶۷ تا ۷۰۳/۳۳، آهن: ۲/۱۶ تا ۷/۵۳، منیزیوم: ۳۶۶/۶ تا ۵۶۶/۶، روی: ۰/۵۶ تا ۰/۷۶، فسفر: ۴۷۴۲/۷ تا ۶۱۹۶/۷ و پتاسیم: ۴۲/۵۰ تا ۵۳/۶۶ میلی گرم بر کیلوگرم گزارش شد (Saeed et al., 2015).

منگنز کواکتور بسیاری از آنزیم‌ها در بدن همانند آرژیناز، پپرواز کربوکسیلاز، سوپراکسید دیس موتاز، پپتیداز و ایزوسیترات دهیدروژناز است که برای تشکیل استخوان، عملکرد درست تولید مثل و سیستم

مختلف استخراج در پایداری روغن پرداخته بود، مقادیر فلزات مس و آهن در نمونه‌های روغن حاصل از پرس (دانه کامل کنجد) به ترتیب ۰/۰۶ و ۱/۱ میلی گرم در کیلوگرم تخمین زده شد. مقادیر مس و آهن در مطالعه حاضر بسیار بالاتر از مطالعه کمال الدین و همکاران (۱۹۹۵) اندازه‌گیری شد. مقدار سرب، مس، روی، کادمیوم در دانه کنجد به ترتیب در محدوده ۰/۵ تا ۱/۹، ۵/۳ تا ۳/۸، ۲۰/۴ تا ۲۶/۲ و ۰/۴ تا ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم گزارش شد. آنجلووا و همکاران (Angelova et al., 2005) به بررسی تجمع فلزات سنگین و توزیع آن‌ها در دانه‌های روغنی رشد یافته در فاصله ۰/۵ تا ۱۵/۵ کیلومتری منبع آلودگی پرداختند. در این مطالعه دانه کلزا و آفتابگردان و روغن‌های حاصل از آن‌ها از نظر حضور فلزات مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که در طی فراوری دانه کلزا و آفتابگردان برای تهیه روغن مقادیر زیادی از فلزات از دانه به روغن منتقل نمی‌شود (Angelova et al., 2005). مقادیر فلزات کلسیم، آهن، پتاسیم، منیزیم و روی در روغن کنجد به ترتیب ۰/۲، ۱۴/۸، کمتر از ۰/۳، ۳/۷، ۳/۱ میلی گرم بر کیلوگرم ارزیابی شد (Cindric et al., 2007). نتایج نشان دادند که آب‌وهوا بر روی محتوا و ترکیبات شیمیایی روغن کنجد مؤثر است (Mohammed et al., 2018). بیان شده است که یون‌های فلزی در روغن می‌توانند به صورت کمپلکس‌های احاطه شده توسط پروتئین‌ها، فسفولیپیدها، لیپیدها یا حامل‌های غیرلیپیدی یا به صورت جامدات معلق در روغن باشند. بنابراین در طی انجام فرآیند تصفیه روغن، رسوب فسفولیپیدها می‌تواند همزمان منجر به حذف کمپلکس‌های فلزی شود (Szydłowska-Czerniak et al., 2013). در بررسی حاضر، الگوی تغییر فلزات پتاسیم و منگنز در روغن‌های تولیدی مشابه با هم و به صورت روغن کنجد تصفیه بیشتر از روغن ارده بود.

نتیجه‌گیری

حضور یون‌های فلزی در روغن‌های خوراکی شاخصی مهم در تعیین کیفیت روغن می‌باشد. یون‌های فلزی می‌توانند تجزیه هیدروپروکسیدها را به رادیکال‌های آزاد و ترکیبات ثانویه اکسیداسیون (آلدهیدها، کتون‌ها، اسیدها و اپوکسیدها) کاتالیز کنند. بنابراین این فلزات می‌توانند پروسه اکسیداسیون زنجیره اسیدهای چرب را تسریع کرده و در نتیجه روی ماندگاری و ارزش تغذیه‌ای روغن بدست آمده اثر منفی داشته باشند. همانطور که بررسی حاضر نشان داد، در میان مواد معدنی مورد بررسی، فسفر بیشترین ترکیب معدنی موجود در دانه کنجد، روغن ارده و روغن کنجد تصفیه تخمین زده شد. روغن کنجد تصفیه شده نسبت به دانه کنجد و روغن ارده حاوی مقادیر کمتری مواد معدنی (به استثنای پتاسیم و منگنز) بود. در مطالعه حاضر مقادیر آهن و نیکل به ترتیب بالاتر از حد مجاز تعیین شده توسط سازمان کدکس و

کنجد در مطالعه ابوالمعالی در محدوده مجاز گزارش گردید (Abu-Almaaly, 2019). حضور آهن در روغن به دلیل وجود طبیعی آهن در دانه‌های روغنی به صورت متصل با فسفولیپیدها و دیگر ترکیبات معدنی و همچنین احتمال آلودگی از طریق تجهیزات فلزی است (Lamas et al., 2016).

نیکل از دیگر فلزاتی است که می‌تواند سبب ایجاد آلرژی در افراد حساس شود. برخی عناصر همانند مس، روی، آهن، نیکل، منیزیم، منگنز و کلسیم در مقادیر کم برای بقای موجودات زنده لازم است. این فلزات در غلظت‌های بالا می‌توانند سمی باشند. اگرچه حضور مقادیر اندک فلزات سنگین در روغن‌های گیاهی، باعث تنزل کیفیت روغن‌ها می‌شود (Farzin & Moassesi, 2014). مقدار مجاز نیکل در روغن و محصولات روغنی بر اساس استاندارد چین ۱ میلی گرم بر کیلوگرم تخمین زده شده است (China, 2014). براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، مقادیر نیکل در نمونه‌های روغن ارده و کنجد تصفیه بالاتر از حد مجاز استاندارد چین گزارش شد.

الگوی مواد معدنی در روغن ارده به صورت فسفر < آهن < پتاسیم < کبالت < منیزیم < نیکل < منگنز < کلسیم بود. میزان مواد معدنی در روغن کنجد تصفیه بر طبق روند فسفر < پتاسیم < آهن < نیکل < کبالت < منگنز < کلسیم گزارش شد. در بررسی ثانی و همکاران بیشترین مواد معدنی اندازه‌گیری شده در نمونه‌های روغن دانه کنجد سفید به ترتیب به صورت آهن، روی، پتاسیم، سدیم، مس و منگنز گزارش شد (Sani et al., 2013). الگوی کاهش میزان فلزات کبالت، آهن، نیکل و فسفر در روغن‌های مورد مطالعه به صورت روغن کنجد تصفیه کمتر از روغن ارده گزارش شد. بنابراین می‌توان گفت که فرآیند تصفیه کارایی مناسبی در کاهش این مواد داشته است. در این مطالعه فراوان‌ترین ماده معدنی در روغن کنجد، کلسیم گزارش شد که در محدوده ۳/۰۲ تا ۹/۶۶ میلی گرم در کیلوگرم بود. محدوده ترکیبات معدنی فسفر، منیزیم، منگنز، پتاسیم، آهن، روی، مس و کادمیوم در روغن کنجد به ترتیب ۱/۱۴-۳/۹۴، ۰/۸۱-۴/۷۴، ۰/۰۱-۰/۱۲، ۰/۸۲-۴/۲۵، ۰/۰۴-۰/۲۵، ۰/۰۱-۰/۰۲، ۰/۱۵-۰/۳۹ و ۰/۰۱-۰/۱۱ اندازه‌گیری گردید. در مطالعه لاماس و همکاران (Lamas et al., 2014) مقدار فلزات فسفر، آهن، مس، کلسیم و منیزیم در روغن آفتابگردان خام به ترتیب ۴۷۴/۷، ۸/۳۷، ۳/۴۱، ۹۵/۳۴ و ۱۰۵/۰۴ میلی گرم بر کیلوگرم تخمین زده شد. نتایج تحقیق حاضر تا حدودی با گزارش‌های محققان دیگر همخوانی دارد و وجود تفاوت‌های اندک در مقادیر اندازه‌گیری شده را می‌توان به اختلاف‌های ژنتیکی سویه‌های کنجد و همچنین شرایط منطقه‌ای رشد دانه کنجد (شرایط خاک، آب‌وهوا) نسبت داد. در مطالعه کمال الدین و همکاران (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1995) که به بررسی تأثیر پوست‌گیری و روش‌های

اداره استاندارد چین اندازه‌گیری شد. باید توجه داشت از آنجا که دانه کنجد قادر به تجمع فلزات می‌باشد، بنابراین بررسی شرایط و خاک منطقه‌ای که کنجد در آن کشت شده از نظر حضور آلاینده‌ها و بررسی کیفیت کنجدهای وارداتی، پیش از تهیه روغن الزامی است. همچنین قابل ذکر است که در سال‌های اخیر، تمایل مردم به مصرف روغن استحصالی از کنجد به صورت خام یا روغن ارده بیشتر شده است، بنابراین اطلاع‌رسانی به مردم جهت انتخاب صحیح روغن برای مصرف ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد به خاطر حمایت‌های مالی و آزمایشگاه بهداشت و ایمنی مواد غذایی جهت همکاری اعلام می‌دارند.

منابع

1. Abu-Almaaly, R.A. (2019). Estimate the contamination by some heavy metals in sesame seeds and Rashi product that available in local markets. *Plant Archives*, 19, 3217-3222.
2. Angelova, V., Ivanova, R., & Ivanov, K. (2005). Heavy metal accumulation and distribution in oil crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35, 2551-2566. <https://doi.org/10.1081/LCSS-200030368>
3. China, S.O. (2014). China's Maximum Levels for Contaminants in Foods.
4. Cindric, I.J., Zeiner, M., & Steffan, I. (2007). Trace elemental characterization of edible oils by ICP-AES and GFAAS. *Microchemical Journal*, 85, 136-139. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2006.04.011>
5. Commission, C.A. (1999). SECTION 2. *Codex standards for fats and oils from vegetable sources*.
6. De Leonardis, A., Macciola, V., & De Felice, M. (2000). Copper and iron determination in edible vegetable oils by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction with diluted nitric acid. *International Journal of Food Science & Technology*, 35, 371-375. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00389.x>
7. Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C., & Attia, H. (2007). Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chemistry*, 103, 641-650. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.008>
8. Farzin, L., & Moassesi, M.E. (2014). Determination of metal contents in edible vegetable oils produced in Iran using microwave-assisted acid digestion. *Journal of Applied Chemical Research*, 8, 35-43.
9. Ghazani, S.M., García-Llatas, G., & Marangoni, A.G. (2013). Minor constituents in canola oil processed by traditional and minimal refining methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90, 743-756.
10. INSO. (2014). *Edible fats and oils – Refined Sesame oil-Specifications and Test methods*. Iranian National Standardization Organization, 2nd. Revision.
11. INSO. (2016). *Tahini - Specifications and test methods*. Iranian National Standardization Organization, 2nd. Revision.
12. Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L.-Å. (1995). The effects of extraction methods on sesame oil stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 967-969.
13. Khalili Sadrabad, E., Moshtaghi Boroujeni, H., & Heydari, A. (2018). Heavy metal accumulation in soybeans cultivated in Iran, 2015-2016. *Journal of Nutrition and Food Security*, 3, 27-32. <http://jnfs.ssu.ac.ir/article-1-126-en.html>
14. Kheirati Rounizi, S., Akrami Mohajeri, F., Moshtaghi Broujeni, H., Pourramezani, F., Jambarsang, S., Kiani, H. & Khalili Sadrabad, E. (2021). The chemical composition and heavy metal content of sesame oil produced by different methods: A risk assessment study. *Food Science & Nutrition*, 9: 2886-2893 <https://doi.org/10.1002/fsn3.2245>
15. Lamas, D.L., Constenla, D.T., & Raab, D. (2016). Effect of degumming process on physicochemical properties of sunflower oil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 138-143. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.03.007>
16. Lamas, D.L., Crapiste, G.H., & Constenla, D.T. (2014). Changes in quality and composition of sunflower oil during enzymatic degumming process. *LWT-Food Science and Technology*, 58, 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.024>
17. Makinde, F., & Akinoso, R. (2013). Nutrient composition and effect of processing treatments on anti nutritional factors of Nigerian sesame (*Sesamum indicum* Linn) cultivars. *International Food Research Journal*, 20.
18. Martínez, M.L., Bordón, M.G., Lallana, R.L., Ribotta, P.D., & Maestri, D.M. (2017). Optimization of sesame oil extraction by screw-pressing at low temperature. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 1113-1121. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1885-4>
19. Mbaebie, B., Omosun, G., Uti, A., & Oyedemi, S. (2010). Chemical composition of *Sesamum indicum* L. (Sesame) grown in Southeastern Nigeria and the physicochemical properties of the seed oil. *Seed Science and Biotechnology*, 4, 69-72.

20. Mohammed, F., Abdulwali, N., Guillaume, D., Tenyang, N., Ponka, R., Al-Gadabi, K., Bchitou, R., Abdullah, A.H., & Naji, K.M. (2018). Chemical composition and mineralogical residence of sesame oil from plants grown in different Yemeni environments. *Microchemical Journal*, 140, 269-277. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.011>
21. Mohammed, N.A., & Hassan, S. (2011). Physico-chemical analysis and mineral composition of some sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) grown in the Gizan area of Saudi Arabia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 270-274.
22. Nzikou Jm, M.-T. M., Ndangui, Cb., Pambou-Tobi, Np., Kimbonguila, A., Loumouamou, B., Silou, Th., & Desobry, S. (2010). Characterization of seeds and oil of sesame (*Sesamum indicum* L.) and the kinetics of degradation of the oil during heating. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, 10, 227-32.
23. Ozkan, A., & Kulak, M. (2013). Effects of water stress on growth, oil yield, fatty acid composition and mineral content of *Sesamum indicum*. *Journal Animal Plant Science*, 23, 1686-90.
24. Pehlivan, E., Arslan, G., Gode, F., Altun, T., & Özcan, M.M. (2008). Determination of some inorganic metals in edible vegetable oils by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). *Grasas y Aceites*, 59(2), 239-44. <https://doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i3.514>
25. Rahimi, M., Gharachorloo, M., & Ghavami, M. (2020). Determination of some antinutritional factors and heavy metals in sesame oil, raw and peeled sesame (*Sesamum indicum* L.) seed of two varieties cultivated in Iran. *Food Science and Technology*, 17(16), 181-189. <http://fsct.modares.ac.ir/article-7-33625-en.html>
26. Ramezani, M., Hashemi, M., Varidi, M., & Rezaie, M. (2021). Health risk assessment and determination of heavy metals in sesame oils. *Journal of Nutrition, Fasting and Health*, 9, 342-352. <https://doi.org/10.22038/JNFH.2021.61727.1365>
27. Ramezani, M., & Rezaei, M. (2018). Physicochemical properties, heavy metals and aflatoxin in sesame oil: A review study. *Journal of Nutrition, Fasting and Health*, 6, 45-51. <https://doi.org/10.22038/jnfh.2018.33801.1128>
28. Saeed, F., Qamar, A., Nadeem, M. T., Ahmed, R. S., Arshad, M.S., & Afzaal, M. (2015). Nutritional composition and fatty acid profile of some promising sesame cultivars. *Pak. Journal Food Science*, 25, 98-103.
29. Sani, I., Sule, F. A., Warra, A. A., Bello, F., Fakai, I.M., & Abdulhamid, A. (2013). Phytochemicals and mineral elements composition of white *Sesamum indicum* L. seed oil. *International Journal of Traditional and Natural Medicines*, 2, 130.
30. Sedaghatboroujeni, L., Hojjatoleslami, M., & Gharachorloo, M. (2017). The effect of purification process on heavy metals in soyabean oil. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 15, 35-44.
31. Szydłowska-Czerniak, A., Trokowski, K., Karlovits, G.R., & Szłyk, E. (2013). Spectroscopic determination of metals in palm oils from different stages of the technological process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2276-2283. <https://doi.org/10.1021/jf305094s>
32. Tenyang, N., Ponka, R., Tiencheu, B., Djikeng, F.T., Azmeera, T., Karuna, M.S., Prasad, R.B., & Womeni, H.M. (2017). Effects of boiling and roasting on proximate composition, lipid oxidation, fatty acid profile and mineral content of two sesame varieties commercialized and consumed in Far-North Region of Cameroon. *Food Chemistry*, 221, 1308-1316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.025>
33. Zhu, F., Fan, W., Wang, X., Qu, L., & Yao, S. (2011). Health risk assessment of eight heavy metals in nine varieties of edible vegetable oils consumed in China. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 3081-3085. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.09.019>



Measurement and Comparison of Nitrate, Nitrite and Toxic Elements in First Harvest and Re-harvest Rice

Z. Soltan Touye¹, Sh. Dehghan Abkenar^{2*}, N. Khakipour³

Received: 2022.04.26

Revised: 2023.01.29

Accepted: 2023.02.04

Available Online: 2023.02.08

How to cite this article:

Soltan Touye, Z., Dehghan Abkenar, Sh., & Khakipour, N. (2023). Measurement and comparison of nitrate, nitrite and toxic elements in first harvest and re-harvest rice. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 501-510. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.75970.1160>

Introduction

Rice as a staple food, especially in Asian countries, can be a major source of heavy metals. Heavy metals also enter the soils where crops grow naturally and / or through human activities. Metals are absorbed and accumulated in the edible parts of the plant and enter the food chain. Toxic metals, which are present in nature due to industrialization, have polluted the environment, including soil, air, water and food, and have adverse effects on human health through food chains. The Codex Organization has set maximum levels for these elements in various cereals to protect trade and health. Nitrate and nitrite are naturally present in soil, water and food. But today, foods have higher levels of nitrate and nitrite. Excessive use of nitrogen fertilizers to achieve higher yields and improper disposal of human and animal wastes may lead to nitrate accumulation in agricultural products. Very few studies have been performed on the measurement of heavy metal and nitrogen indices in replanted rice. The aim of this study was to measure the amounts of heavy metals (lead, cadmium and arsenic) and the amounts of nitrate and nitrite in first harvest rice and re-harvest rice and compare it with the standard values of the World Health Organization.

Methods and Materials

In this study, a total of 18 rice samples were prepared from three selected farms in the first and second cultivation times and the amount of nitrite, nitrate and heavy metals lead, cadmium, arsenic and mercury were evaluated.

Results and Discussion

The results showed that in all farms in the second crop the concentration of lead decreased significantly ($P < 0.05$). The concentration of lead in all treatments of the first crop Has been more than allowed and in the second cultivation, the treatment of field number one and two, is more than allowed ($P < 0.05$). The concentration of cadmium in all treatments is within the allowable range and in the second crop compared to the first crop of fields number one and three has a significant decrease and in field number two has increased significantly ($P < 0.05$). The highest amount of cadmium is related to field treatments number three. The highest amount of arsenic was observed in the first crop of farm number one and it is more than the allowable limit and in other treatments the amount of arsenic was less than the allowable level and in all three farms the concentration of arsenic in the second crop was significantly reduced compared to the first crop. Regarding mercury, in fields number one and two, with the change of cultivation, the amount of mercury increased significantly and in field number three, there was a significant decrease ($P < 0.05$). Mercury concentration is less than the allowable limit only in the second culture sample of farm number three. Nitrite and nitrate concentrations were also low in all treatments and were considered zero. Experiments showed the amount of nitrite and nitrate in all samples to be negligible and undetectable. Due to the fact that the detection limit of the method (LOQ) used to measure nitrate and nitrite is 100 ppb, the amount of nitrate and nitrite in all samples can be less than 100 ppb. The permissible level of nitrate

1, 2 and 3- M.Sc. Graduated, Associate Professor and Assistan Professor of Department of Agriculture and Chemistry of Savadkooh Branch, Islamic Azad University, Savadkooh, Iran, Respectively.

(*- Corresponding Author Email: Dehghan54@yahoo.com)

DOI: [10.22067/ifstrj.2023.75970.1160](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.75970.1160)

in food products and rice grains is set at 50 mg/kg according to national standard 16596. The results of the samples showed that all 18 samples had lower amounts of nitrate than the allowable limit. Therefore, rice samples prepared from the first and second crops, their nitrate content is less than the allowable limit and have a complete degree of health.

Conclusion

According to the results obtained, all rice cultivated in the first and second crops have some arsenic, cadmium and lead, but the amount measured in some samples is less and in others, more than specified in the national standard of Iran. their consumption may be dangerous for consumers. These results also indicate that due to the stability of the field and plant type, there is a positive and significant relationship between the amount of heavy metals studied in rice and the time of cultivation, and this requires further studies on heavy metal contamination in the region. Take place. Therefore, with the conducted studies, it can be concluded that there are concerns in the consumption of rice cultivated in the city of Mazandaran province, in terms of the possibility of endangering the health of consumers.

Keywords: First harvest, Heavy metals, Rice, Re-harvest, Nitrate, Nitrite

مقاله پژوهشی

اندازه‌گیری و مقایسه مقادیر نیترات، نیتريت و عناصر سنگین در برنج برداشت اول و برداشت مجدد

زینب سلطان تویه^۱ - شیوا دهقان آبکنار^{۲*} - نازنین خاکی پور^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۱/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۵

چکیده

فلزات سمی محیط زیست را آلوده کرده و از طریق زنجیره‌های غذایی اثرات نامطلوبی بر سلامتی انسان باقی می‌گذارند. امروزه مواد غذایی دارای مقادیر بیشتری نیترات و نیتريت هستند. در این تحقیق از سه مزرعه انتخابی در دو زمان کشت اول و دوم ۱۸ نمونه برنج تهیه شده و میزان نیتريت، نیترات و فلزات سنگین سرب، کادمیوم، آرسنیک و جیوه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد غلظت سرب در تمامی تیمارهای کشت اول بیش از حد مجاز بوده‌است و در کشت دوم تیمار مزرعه شماره یک و دو بیش از حد مجاز می‌باشند. میزان سرب در کشت اول در زمین شماره یک، ۴۰۰ ppb بوده و اگرچه در کشت دوم به میزان ۳۰۰ ppb رسیده، ولی همچنان بالاتر از حد مجاز می‌باشد. غلظت این عنصر در کشت اول زمین شماره دو از ۴۷۰ ppb به ۴۲۱ ppb در کشت دوم رسید و در زمین شماره سه، از ۱۶۲ ppb به ۵۷ ppb در کشت دوم رسید. غلظت کادمیوم در تمامی تیمارها در حد مجاز می‌باشد و در کشت دوم، در مزارع شماره یک و سه کاهش و در مزرعه شماره دو افزایش معنی‌دار یافته‌است. میزان کادمیوم در زمین شماره یک، از ۳۰ ppb به ۱۷ ppb، در زمین شماره دو، از ۱۵ ppb به ۲۰ ppb و در زمین شماره ۳، از ۴۵ ppb به ۳۷ ppb رسیده‌است. مقدار آرسنیک در کشت اول مزرعه شماره یک ۱۵۸ ppb و بیشتر از حد مجاز می‌باشد و در کشت دوم زمین شماره یک، به ۱۱۵ ppb کاهش یافته‌است. در زمین شماره دو، مقدار آرسنیک کمتر از حد مجاز بوده و ۸۸ ppb گزارش شده‌است و در کشت دوم این مقدار به ۵۸ ppb رسیده‌است و در زمین شماره سه، مقدار آرسنیک، از ۸۲ ppb به ۷۲ ppb کاهش یافته‌است. در خصوص جیوه در مزرعه شماره یک در کشت اول مقدار جیوه ۲۱ ppb بوده، که در کشت دوم به ۴۰ ppb افزایش یافته‌است. در مزرعه شماره دو، مقدار جیوه از ۳۳ ppb به ۳۶ ppb در کشت دوم افزایش یافته و در مزرعه شماره سه کاهش معنی‌داری داشته‌است، به صورتی که میزان جیوه از ۲۵ ppb به ۱۲ ppb کاهش یافت. غلظت نیتريت و نیترات نیز در تمامی تیمارها ناچیز بوده‌است. با توجه به نتایج به دست آمده تمامی برنج‌های کشت شده در کشت اول و کشت دوم دارای مقداری آرسنیک، کادمیوم و سرب هستند. میزان اندازه‌گیری شده در برخی نمونه‌ها بیشتر از حد تعیین شده در استاندارد ملی ایران است و مصرف آنها می‌تواند برای مصرف‌کنندگان خطرناک باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت اول برنج، کشت مجدد، فلزات سنگین، نیترات، نیتريت

مقدمه

زیاد آرسنیک (As)، سرب (Pb) و کادمیوم (Cd) می‌تواند عامل ایجاد بیماری‌های مختلفی باشد (Kim et al., 2015). قرار گرفتن انسان در معرض این فلزات سمی می‌تواند از طریق شغل، آلودگی هوا یا رژیم غذایی رخ دهد. قرار گرفتن در معرض رژیم غذایی حاوی عناصر سنگین، رایج‌ترین مسیری است که از طریق آن این فلزات سمی وارد

فلزات سمی که وجود آنها در طبیعت، ناشی از صنعتی شدن است، محیط‌زیست شامل خاک، هوا، آب و غذا را آلوده کرده‌اند و از طریق زنجیره‌های غذایی اثرات نامطلوبی بر سلامتی انسان باقی می‌گذارند (Tchounwou et al., 2012). قرار گرفتن در معرض سطوح کم و

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه کشاورزی و شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سوادکوه، سوادکوه، ایران

(Email: dehghan54@yahoo.com)

(*) - نویسنده مسئول:

سرطان‌زا در محصولات غذایی شود. انسان در معرض طیف وسیعی از ترکیبات نیتروزامین از رژیم غذایی، سیگار کشیدن، محل کار و آب آشامیدنی است که منبع اصلی تجمع این ترکیب می‌باشند. سبزیجات و آب آشامیدنی منابع اصلی دریافت نیتريت و نیترات هستند (تقریباً ۸۰ درصد) و سایر منابع سهم کمتری در رژیم غذایی دارند (Atefi & Mahmoudzadeh, 2021). مطالعات متعددی در بررسی غلظت عناصر سنگین و مطالعات محدودی بر میزان نیترات و نیتريت موجود در نمونه‌های برنج در نقاط مختلف دنیا انجام گرفته‌است. رضایی و همکاران (Rezaei et al., 2021) در مطالعه‌ای بر روی برنج‌های کشت شده در استان هرمزگان و نمونه برنج‌های پاکستانی و هندی موجود در بازار، انجام دادند، گزارش کردند غلظت کادمیم، آرسنیک و سرب در برنج‌های محلی، پایین‌تر از نمونه‌های خارجی موجود در بازار بود. در تحقیقی که کورموکر و همکاران (Kormoker et al., 2021) بر روی برنج‌های کشت شده در بنگلادش انجام دادند، گزارش کردند غلظت کروم، سرب، آرسنیک و کادمیم در نمونه‌های برنج مطالعه شده، از استانداردهای فائو و سازمان بهداشت جهانی بالاتر بود. در گزارشی که وهاجی و همکاران (Vahaji et al., 2020) منتشر کردند، برنج‌های کشت شده در قسمت‌های مختلف استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت. آنها گزارش کردند غلظت عناصر سنگین سرب، کادمیم، کروم و نیکل در بخش‌های مختلف متفاوت بوده، اما غلظت تمامی عناصر پایین‌تر از استانداردهای فائو و سازمان بهداشت جهانی بود. در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۸ در منطقه ابرج استان فارس توسط نوذری انجام شد، میزان عناصر سرب، کادمیم و نیتروژن در برنج اندازه‌گیری شد. نوذری (Nozari, 2018) گزارش کرد میزان کادمیم و سرب در خاک و دانه برنج، کمتر از میزان استاندارد ملی کشاورزی است که بیانگر فقدان آلودگی به سرب و کادمیم در برنج تولید شده است. از طرف دیگر میزان نیتروژن در خاک و دانه برنج، بالاتر از حد استاندارد ملی کشاورزی است که نشان دهنده آلودگی خاک به نیترات و تجمع بیش از حد آن، در برنج تولید شده در این منطقه است (Nozari, 2018). شیرزاد و خاکی‌پور (Shirzad & Khakipour, 2021) در مطالعه‌ای بر روی برنج عنبربو در منطقه خوزستان انجام دادند، گزارش کردند میزان آلودگی برنج عنبربو به فلزات سنگین، پایین‌تر از حدود استاندارد سازمان بهداشت جهانیست و مصرف آن بلا مانع می‌باشد. در سال‌های اخیر افزایش تقاضا و قیمت برنج از یک‌سو و کاهش روزافزون زمین‌های کشاورزی از سوی دیگر، موجب رغبت کشاورزان به کشت مجدد برنج در شالیزارهای استان مازندران گردیده‌است (Nouri et al., 2014). اما مطالعات بسیار کمی بر اندازه‌گیری شاخص فلزات سنگین و نیتروژن در برنج کشت مجدد صورت گرفته‌است. هدف از این مطالعه، اندازه‌گیری مقادیر فلزات سنگین (سرب، کادمیم و آرسنیک) و مقادیر

بدن انسان می‌شود (Deng et al., 2019). برنج پس از گندم پرمصرف‌ترین غلات در سطح جهان به‌ویژه در کشورهای آسیایی به شمار می‌رود. در ایران برنج بعد از گندم دومین محصول پرمصرف می‌باشد (Amirahmadi et al., 2015). غلاتی مانند برنج، ذرت، گندم، لوبیا، جو دوسر، عدس و نخود بخش عمده‌ای از رژیم غذایی روزانه هستند که کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و سایر مواد مغذی را برای مردم سراسر جهان فراهم می‌کنند. این غلات و حبوبات ممکن است حاوی فلزات سمی باشند که بدن انسان می‌تواند از طریق بلع در معرض آنها قرارگیرد. در طی تحقیقات متعدد ثابت شده که برنج فلزات بیشتری نسبت به سایر غلات انباشته می‌کند (Khanam et al., 2020). این امر به دلایل متعددی نظیر نزدیکی زمین‌های کشت برنج به مناطق شهری و صنعتی، کودهای فسفره، فاکتورهای خاکی، عملیات آبیاری و شرایط اکسیداسیون و احیا در شالیزارها می‌باشد (Meharg et al., 2013). بنابراین، به عنوان یک غذای اصلی به‌ویژه در کشورهای آسیایی، می‌تواند منبع اصلی دریافت فلزات سمی باشد (Meharg et al., 2013). فلزات سمی هم به‌طور طبیعی و/یا از طریق فعالیت‌های انسانی وارد خاک‌هایی می‌شوند که محصولات در آن رشد می‌کنند (Wuana & Okieimen, 2011). فلزات، جذب شده و در قسمت‌های خوراکی گیاه جمع می‌شوند و وارد زنجیره غذایی می‌گردند. سازمان کدکس حداکثر سطوح مجاز برای این عناصر را در غلات مختلف برای محافظت از تجارت و سلامت تعیین کرده‌است (Codex, 2014). حد مجاز کادمیم در برنج براساس استاندارد تعیین‌شده توسط کمیته تخصصی مشترک FAO/WHO در مورد افزودنی‌های غذایی Joint FAO/WHO (Expert Committee on Food Additives JECFA) می‌باشد 0.2 mg kg^{-1} (WHO, 2004) و براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۲۹۶۸ معادل 0.06 mg kg^{-1} می‌باشد. این استاندارد حداکثر مقدار مجاز سرب و آرسنیک را در برنج معادل 0.15 mg kg^{-1} اعلام کرده‌است (ISIRI, 2010). به‌دلیل نیاز روزانه به تغذیه، ارزیابی قرارگرفتن در معرض فلزات سمی از طریق مصرف غلات اصلی و حبوبات نیاز به توجه دارد (Tatahmentan et al., 2020).

نیترات و نیتريت به طور طبیعی در خاک، آب و غذاها وجود دارند. اما امروزه مواد غذایی دارای مقادیر بیشتری نیترات و نیتريت هستند. زیرا کاربرد زیاد کودهای نیتروژن‌دار برای دستیابی به عملکرد بیشتر و دفع نادرست فضولات انسانی و حیوانی ممکن است، منجر به تجمع نیترات در محصولات کشاورزی شود (Bian et al., 2020). نیترات و نیتريت به‌عنوان افزودنی‌های غذایی نیز استفاده می‌شوند. علاوه بر این تجمع نیتريت و نیترات به دلیل فعالیت میکروارگانیسم‌ها بر روی ترکیبات آلی نیتروژن نیز رخ می‌دهد (Sivasinthujah et al., 2014). واکنش‌های نیترات و نیتريت ممکن است باعث ایجاد نیتروزآمین

نیترات و نیتريت، در برنج برداشت اول و برنج برداشت مجدد و مقایسه آن با مقادیر استاندارد سازمان بهداشت جهانی بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از سه مزرعه انتخابی در جنوب غربی شهرستان بابل، در دو زمان کشت اول (تیرماه ۱۳۹۸) و دوم (آبان ماه ۱۳۹۸) مجموعاً شش نمونه برنج با در نظر گرفتن سه تکرار به ازای هر نمونه، تهیه گردید. مزرعه شماره ۱ در مجاورت جاده قدیم آمل به بابل، مزرعه شماره ۲ در فاصله کوتاهی از این مزرعه و مزرعه شماره ۳، در مرکز روستای مجاور در میان سایر شالیزارها واقع شده است. برنج‌های مورد نظر پس از نمونه‌برداری به آزمایشگاه دانشگاه تهران منتقل شد و فلزات سنگین آرسنیک، سرب و کادمیوم و جیوه و نیترات و نیتريت در آنها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

آماده‌سازی نمونه برنج جهت اندازه‌گیری عناصر سنگین

مقدار ۲۰ گرم از نمونه را با ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم، داخل یک کروزه، وزن کرده و به منظور خشک کردن نمونه، کروزه روی هیتر و در محدوده دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. برای انجام عمل خاکسترسازی کروزه را داخل کوره با دمای اولیه ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و به تدریج دمای کوره با سرعت تغییر دمای ۵۰ درجه سلسیوس در هر ساعت، تا دمای حداکثر 500 ± 50 درجه سلسیوس افزایش داده و کروزه‌ها حداقل به مدت ۸ ساعت در این دما قرار داده شدند. مرحله خنک کردن کروزه و مرطوب کردن با آب و مجدداً قرار گرفتن داخل کوره تا تبدیل کامل نمونه به خاکستر (به رنگ سفید مایل به خاکستری) تکرار شد. بعد از تبدیل کامل نمونه به خاکستر، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۶ مولار داخل کروزه اضافه شده، بطوری‌که تمام محتویات خاکستر داخل کروزه، به اسید اضافه شده آغشته گشت. سپس با قراردادن کروزه روی حمام آب یا هیتر، اسید اضافه شده تبخیر گردید. به منظور حل نمودن محتویات باقی‌مانده داخل کروزه، مقدار ۳۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۰/۱ مولار به داخل کروزه اضافه شد، بطوریکه تمام محتویات به اسید آغشته شد. پس از آن با قراردادن یک عدد شیشه ساعت، روی کروزه پوشانده شده و تا مدت ۱ الی ۲ ساعت در این حالت قرار گرفت. برای اندازه‌گیری عناصر سرب، کادمیم، جیوه و آرسنیک، از دستگاه طیف سنج نشری پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES) مدل 730-ES ساخت شرکت Varian ایالات متحده آمریکا استفاده شد. محلول‌های استاندارد جهت رسم منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظت‌های ۱۰ ppb تا ۱۰۰ ppb تهیه شدند.

آماده‌سازی نمونه برنج جهت اندازه‌گیری نیترات و نیتريت بعد از تهیه نمونه‌ها و انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌های برنج با آب دیونیزه شسته شد و در دمای اتاق خشک گردید. پس از آسیاب شدن، از الک ۰/۳ میلی‌متر عبور داده و آماده تجزیه شدند. جهت انجام عمل استخراج یون نیترات و نیتريت، به ۱۰ گرم از نمونه، ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه ۳۵ درجه سلسیوس اضافه گردید. پس از آن با قراردادن یک عدد شیشه ساعت، روی بشر پوشانده شده و تا مدت ۱ الی ۲ ساعت در این حالت قرار گرفت. سپس با وسیله‌ای نظیر میله شیشه‌ای، محلول داخل بشر به هم زده شد تا محتویات داخل بشر کاملاً یکنواخت شوند. در این مرحله چند میکرولیتر از محلول بالای نمونه به دستگاه کروماتوگرافی یونی کمپانی واترز Waters IC-Pak Anion HR Column, 4.6 ستون کروماتوگرافی با ستون Waters IC-Pak Anion HR Column, 4.6 x 75 mm - WAT026765 به دست آمد و یون‌های جدا شده توسط یک آشکارساز هدایت‌سنجی شناسایی شدند. هدایت الکتریکی آنیون‌های جداسازی شده، اندازه‌گیری شده و مقدار آنها، با اندازه‌گیری سطح زیر پیک بدست آمد. حجم تزریق نمونه، ۱۰۰ میکرولیتر بوده و از محلول $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ به عنوان محلول شوینده استفاده گردید. محلول شستشو قبل از استفاده گاززدایی گردید. دمای ستون بر روی ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت جریان ۰/۲ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید.

آنالیز داده‌ها با استفاده از جداول تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین در سطح اطمینان ۹۵ درصد با آزمون دانکن انجام شد و کلیه نتایج بر اساس میانگین ۳ تکرار ارائه شد. کلیه جداول و نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

بررسی میزان فلزات سنگین در نمونه‌های برنج

جدول آنالیز واریانس مربوط به فلزات سنگین سرب، کادمیم، آرسنیک و جیوه در کشت‌های اول و دوم برنج در سه زمین کشاورزی مختلف در جدول ۱ ارائه شده و سطوح معناداری تیمارها نیز برای هر فلز سنگین مشخص گردیده است.

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌کنید از نظر آماری، مقادیر تمام فلزات سنگین سرب، کادمیم، آرسنیک و جیوه در محصول برنج تحت تأثیر شرایط زمین کشاورزی و نوع کشت اول و دوم می‌باشند. همچنین اثر متقابل آنها در سطح احتمال پنج درصد معنادار شده است که نشان می‌دهد نوع کشت و زمین کشاورزی بطور همزمان در مقادیر فلزات سنگین موثر بوده است.

جدول ۱- میانگین مربعات میزان فلزات سنگین تحت تأثیر زمین کشاورزی و نوع کشت در محصول برنج

Table 1- Average squares of heavy metals affected by agricultural land and type of cultivation in rice crop

منابع تغییرات Source of changes	درجه آزادی Degree freedom	آرسنیک (As)	کادمیم (Cd)	سرب (Pb)	جیوه (Hg)
زمین کشاورزی (Land)	2	7588.5*	894.5*	86797.0*	416.0*
نوع کشت (Type of cultivation)	1	3444.5*	128.0*	14280.0*	40.5*
زمین کشاورزی * نوع کشت (Land* Type of cultivation)	2	414.5*	129.5*	113535.0*	384.0*
خطا (Error)	12	6.27	0.73	9.0	1.568
ضریب تغییرات (%) (Coefficient of variance)	----	10.19	12.41	11.79	12.37

* : اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد ($F_{(2,12,0.05)} = 3.89$ و $F_{(1,12,0.05)} = 4.75$) $P \leq 0.05$

** : اختلاف معنادار در سطح ۱ درصد ($F_{(2,12,0.01)} = 6.93$ و $F_{(1,12,0.01)} = 9.33$) $P \leq 0.01$

دوم غلظت سرب کاهش معنی‌داری می‌یابد اگرچه در مزرعه شماره یک و دو، همچنان بالاتر از حد مجاز می‌باشد ($P < 0.05$). منشا سرب در زمینهای کشاورزی می‌تواند گازوئیل حاوی تترائیل سرب، کودهای شیمیایی، آفت‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و اضافه کردن لجن فاضلاب به خاک باشد (Davis et al., 1993). نزدیکی مزارع مورد مطالعه به جاده آمل - بابل می‌تواند از دلایل اصلی بالا بودن میزان سرب در آن باشد. به خاطر پتانسیل سمیت و مصرف بالای جهانی، سرب بعد از آرسنیک در زمره سمی‌ترین فلزات سنگین قرار می‌گیرد (ATSDR, 2003). سرب موجود در خاک، به‌راحتی توسط ریشه جذب شده و وارد بخش‌های خوراکی گیاه شده و در نهایت به زنجیره غذایی وارد می‌شود (Khanam et al., 2020). در حالت طبیعی، آرسنیک در کانی‌ها در ترکیب با گوگرد و سایر فلزات وجود دارد (States, 2015). استفاده از آب‌های زیرزمینی آلوده به آرسنیک برای آبیاری، استخراج نامتوازن معادن، کودهای شیمیایی حاوی آرسنیک بطور معنی‌داری میزان آرسنیک را در خاک‌های کشاورزی بالا می‌برد (Punshon et al., 2017). نتایج ارزیابی نمونه‌های برنج نشان داد که تمام نمونه‌ها به جز یک نمونه، کمتر از حد مجاز آرسنیک دارند. بیشترین مقدار آرسنیک در کشت اول مزرعه شماره یک مشاهده شده و اندکی بیشتر از حد مجاز می‌باشد و در سایر تیمارها مقدار آرسنیک کمتر از حد مجاز بوده و در هر سه مزرعه غلظت آرسنیک در کشت دوم کاهش معنی‌داری نسبت به کشت اول داشته‌است ($P < 0.05$). حد مجاز استاندارد برای فلزات سرب و آرسنیک ۱۵۰ ppb بر اساس استاندارد شماره ۱۲۹۶۸ ذکر شده است.

در ادامه آزمون مقایسه بین میانگین‌ها در اثرات ساده نشان می‌دهد که مقادیر فلزات سنگین در محصول برنج در نوع زمین کشاورزی و نیز نوع کشت کاملاً متفاوت است. به طوری که معمولاً بالاترین مقادیر فلزات سنگین در محصولات زمین کشاورزی ۱ و کمترین مقادیر آنان در زمین کشاورزی ۳ بوده است و نیز در کشت اول مقادیر سرب و جیوه نسبت به کشت دوم پائین‌تر می‌باشد و مقادیر کادمیم و آرسنیک در کشت اول بیشتر از کشت دوم است.

مقایسه میزان فلزات سنگین موجود در نمونه‌های برنج با حد استاندارد

در جدول ۲ مقدار فلزات سنگین موجود در کشت اول و دوم برنج با حد مجاز استاندارد مقایسه گردید تا استنباط شود که از نظر آماری تفاوت معناداری بین مقدار فلزات سنگین موجود در برنج و حد مجاز استاندارد وجود دارد یا خیر. آزمون مربوطه با استفاده از آزمون t تک نمونه‌ای صورت گرفته و حد مجاز استاندارد برای فلزات سرب و آرسنیک ۱۵۰ ppb و برای کادمیم ۶۰ ppb تعیین شده است (ISIRI, 2010). حد مجاز استاندارد برای جیوه در استاندارد ملی ایران ذکر نشده اما سازمان کدکس این حد را برای جیوه ۳۰ ppb ذکر کرده است (FAO/WHO, 2014).

فلزات سنگینی نظیر آرسنیک، جیوه، سلنیم، سرب و کادمیم بطور طبیعی در خاک‌های شالیزار یافت می‌شوند (Khanam et al., 2020). نتایج ارزیابی نشان داد که در ۸۳ درصد نمونه‌ها، میزان سرب بیش از حد مجاز می‌باشد که نیاز به توجه و بررسی بیشتری دارد. در خصوص بررسی اختلاف مقدار فلز سنگین سرب بین تیمارهای مختلف اعم از مزرعه و زمان کشت، نتایج بیانگر آنست که در تمامی مزارع، در کشت

جدول ۲- بررسی میانگین غلظت فلزات سنگین سرب، کادمیم، آرسنیک و جیوه در برنج با حد مجاز استاندارد

Table 2- Evaluation of average of heavy metals lead, Arsenic, Cadmium and Mercury in rice with standard allowable limit

نوع زمین و نوع کشت برنج Cultivation and Land	حد مجاز استاندارد Standard limit (ppb) (Pb, As)	حد مجاز استاندارد Standard limit (ppb) (Cd)	حد مجاز استاندارد Standard limit (ppb) (Hg)	میانگین و انحراف معیار (Mean± SD) Pb	میانگین و انحراف معیار (Mean± SD) As	میانگین و انحراف معیار (Mean± SD) Cd	میانگین و انحراف معیار (Mean± SD) Hg
زمین ۱-کشت اول First Cultivation-Land1	150	60	30	400.3*±0.9	158±0.0	30.0±0.8	21.1±0.6
زمین ۱-کشت دوم Second cultivation-Land1	150	60	30	300.0*±0.8	115.4±0.2	17.0±0.6	40.1±0.2
زمین ۲-کشت اول First Cultivation-Land2	150	60	30	470*±1.3	88.2±0.3	15.0±0.6	33.1±0.8
زمین ۲-کشت دوم Second cultivation-Land1	150	60	30	421.0*±4.1	58.1±0.2	20.0±0.9	36.1±0.0
زمین ۳-کشت اول First Cultivation-Land1	150	60	30	162.0*±1.9	82.1±0.6	45.1±0.1	25.0±0.9
زمین ۳-کشت دوم Second cultivation-Land1	150	60	30	57.0±0.9	72.1±0.3	37.1±0.0	12.0±0.6

بدن هر فرد در هفته می‌باشد (WHO, 2004). حد قابل قبول جیوه در خاک بر اساس استانداردهای سازمان کدکس، ۳۰ ppb می‌باشد (FAO/WHO, 2014). جیوه بطور طبیعی به‌وسیله فعالیت‌های آتشفشانی و سایر فعالیت‌های حرارتی زمین، در محیط، آزاد می‌گردد (Pirrone et al., 2010). فعالیت‌های ناشی از انسان نظیر معدن‌کاری، ذوب فلزات و استفاده از سوخت‌های فسیلی، بطور متوسط ۳۰ درصد از کل جیوه روی زمین را شامل می‌شود (Selin, 2009). میزان سمیت جیوه در خاک تا حدود زیادی به فرم شیمیایی آن وابسته است. جیوه توسط باکتری‌ها به متیل جیوه تبدیل می‌شود که سمی‌ترین شکل آن به شمار می‌رود (Nies, 2003). یکی از ریسک‌های اصلی سلامتی، دریافت متیل جیوه توسط انسان‌ها از طریق برنج است (Rotenberg et al., 2012). در مناطقی که آلوده به جیوه باشند، برنج می‌تواند منبع اولیه متیل جیوه باشد (Zhang et al., 2010). در مزارع شماره یک و دو با تغییر کشت، مقدار جیوه افزایش معنی‌داری یافته است و در مزرعه شماره سه کاهش معنی‌داری در این شاخص دیده می‌شود. بیشترین مقدار جیوه در تیمار کشت دوم مزرعه شماره ۱ مشاهده شده است

کادمیم به ندرت به‌عنوان یک فلز خالص در طبیعت یافت می‌شود، اما اغلب در ترکیب با سولفید روی در کانی‌های معدنی دیده می‌شود. در خاک‌های کشاورزی از طریق هوا یا آب آبیاری وارد می‌شود (Kikuchi et al., 2007). کودهای فسفره، لجن فاضلاب، زه‌آب معادن و مصرف سوخت‌های فسیلی از دلایل وجود کادمیم در خاک‌ها می‌باشند (Roberts, 2014). با ارزیابی نمونه‌ها مشخص شد مقدار کادمیم در همه نمونه‌ها کمتر از حد مجاز می‌باشد. بنابراین تمام نمونه‌ها از نظر سمیت کادمیم، از درجه سلامتی مناسبی برخوردار می‌باشند. در مزارع شماره یک و سه در کشت دوم مقدار فلز سنگین کادمیم کاهش معنی‌داری نسبت به کشت اول یافته و در زمین شماره دو با تغییر کشت مقدار کادمیم افزایش معنی‌دار یافته است ($P < 0.05$). بیشترین غلظت کادمیم نیز مربوط به تیمارهای مزرعه شماره سه می‌باشد. حد مجاز استاندارد برای کادمیم ۶۰ ppb بر اساس استاندارد شماره ۱۲۹۶۸ ذکر شده‌است. کمیته مشترک WHO و FAO میزان عناصر سنگین در مواد غذایی، که PTWI نامیده می‌شود را در برنج تعیین کرده‌است که برای جیوه ۵ میکروگرم بر کیلوگرم به ازاء وزن

(*al., 2010*) مقدار جیوه را صفر اعلام نمودند و این نتایج، مغایر با یافته های این تحقیق می باشد ($P < 0.05$).

بررسی میزان نیتريت و نیترات در نمونه های برنج

آزمایشات انجام شده مقدار نیتريت و نیترات را در تمامی نمونه ها ناچیز و غیرقابل تشخیص نشان داد. با توجه به اینکه حد قابل اندازه گیری^۱ (LOQ) به کار برده شده جهت اندازه گیری نیترات و نیتريت ۱۰۰ ppb محاسبه شده است، می توان مقدار نیترات و نیتريت را در همه نمونه ها کمتر از ۱۰۰ ppb اعلام کرد. میزان حد مجاز نیترات در محصولات غذایی و دانه برنج بر اساس استاندارد ملی ۱۶۵۹۶ مقدار ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم تعیین شده است. نتایج بررسی نمونه ها نشان داد که تمامی ۱۸ نمونه دارای مقادیر کمتری از نیترات نسبت به حد مجاز تعیین شده اند. بنابراین نمونه های برنج تهیه شده از محصول کشت اول و دوم، مقدار نیترات آنها کمتر از حد مجاز بوده و از درجه سلامت کامل برخوردار می باشند. این نتیجه بیانگر این است که اگر چه در برخی از مزارع به ویژه در برداشت مجدد، مقدار مصرف کود اوره بیشتر از مقدار توصیه شده بود، اما میزان جذب آن در دانه برنج و تبدیل به نیترات که به عنوان یک ماده سمی قلمداد می شود، موثر نبود. این نتیجه می تواند نشان دهنده این موضوع باشد که مصرف زیاد کود اوره منجر به تلفات زیاد کود از طریق تصعید و یا آبشویی شده و یا احتمالاً باعث افزایش مقدار نیترات در خاک، آب های زیر زمینی و یا کاه می گردد که نیاز به بررسی های تکمیلی در این خصوص می باشد. در مورد نیترات و نیتريت اندازه گیری شده در نمونه های برنج، همانطور که گفته شد با توجه به بررسی های بعمل آمده هیچ یک از تیمارهای مورد بررسی دارای مقادیر قابل تشخیص از این ترکیبات نبوده اند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده تمامی برنج های کشت شده در کشت اول و کشت دوم دارای مقداری آرسنیک، کادمیوم، سرب و جیوه هستند ولی میزان اندازه گیری شده در برخی نمونه ها کمتر و در برخی دیگر، بیشتر از حد تعیین شده در استاندارد ملی ایران است و ممکن است مصرف آنها برای مصرف کنندگان خطرناک باشد. همچنین این نتایج نشان دهنده آن است که با توجه به ثابت بودن مزرعه و نوع گیاه ارتباط مثبت و معنی داری بین میزان فلزات سنگین مورد بررسی در برنج و زمان کشت وجود دارد و بررسی های بیشتری بر روی آلودگی های منطقه به فلزات سنگین مورد نیاز است. بنابراین نگرانی هایی در مصرف برنج های کشت شده در شهرستان مورد مطالعه در استان مازندران، از نظر احتمال به خطراتادن سلامت مصرف کنندگان وجود دارد. همچنین

($P < 0.05$). غلظت جیوه تنها در تیمار کشت دوم مزرعه شماره سه کمتر از حد مجاز می باشد. در مجموع می توان گفت با توجه به سطوح معناداری آزمون، تفاوت معناداری بین مقادیر فلز سنگین کادمیوم با حد مجاز استاندارد، هم در کشت اول و هم در کشت دوم مشاهده شده است. در مورد فلز سنگین آرسنیک می توان بیان نمود که در کشت اول زمین کشاورزی شماره ۱ مقدار این فلز در محصول برنج از حد مجاز فراتر رفته و در بقیه موارد زیر حد مجاز بوده و از مقدار حد مجاز استاندارد خارج نشده است. اما در مورد فلزات سنگین سرب و جیوه فقط کشت دوم محصول برنج در زمین کشاورزی شماره ۳ زیر حد مجاز استاندارد بوده و در بقیه موارد خارج از حد مجاز استاندارد بوده است ($P < 0.05$). در مطالعه ای که اکبری و چراغی (Akbari & Cheraghi, 2019) در سال ۱۳۹۸ بر روی برنج های عرضه شده در شهرستان همدان انجام دادند، گزارش کردند که از ده نوع محصول برنج موجود در بازار، غلظت سرب در تمامی نمونه ها بیش از حد مجاز بود. چائو و همکاران (Cao *et al.*, 2010) میزان سرب را در برنج رشد کرده در شهر جیانگسو کشور چین اندازه گیری کردند و میزان این فلز را در نمونه برنج مورد بررسی ۰/۰۵۴ ppm گزارش کردند. این تحقیق با یافته های شکرزاده (Shokrzadeh, 2012) مطابقت دارد. در مطالعه ای که فرهمندفر و همکاران (Farahmandfar *et al.*, 2019) در سال ۱۳۹۷ بر روی برنج های استان مازندران انجام دادند گزارش کردند میزان کادمیم در ۱۵ درصد نمونه ها بیش از حد مجاز بود. چائو و همکاران (Cao *et al.*, 2010) غلظت میانگین کادمیم را ۰/۰۱۴ ppm در برنج در جیانگسوی چین گزارش کردند. این مقدار پایین تر از ماکزیمم غلظت قابل تحمل در چین بود، این نتایج با یافته های شکرزاده (Shokrzadeh, 2012) مطابقت ندارد و این محققین مقدار کادمیم بیش از حد مجاز در برنج ها را اثبات نمودند. آرسنیک فلز دیگری است که به علت خطرات آن برای سلامت انسان در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده گویای این مطلب است که میزان این فلز در تمامی برنج های مورد مطالعه کمتر از حد تعیین شده در استاندارد ملی است و مصرف آنها بلا مانع است ($P < 0.05$). یافته های این تحقیق با نتایج کلاه کج و همکاران (Kolahkaj *et al.*, 2017) مغایرت دارد.

میزان و فرم جیوه در برنج می تواند تحت تأثیر کودها و سایر افزودنی های خاک قرار گیرد. مطالعاتی به منظور بررسی اثر مصرف ۲۴ ساله کودهای شیمیایی و افزودنی های آلی بر جیوه کل و متیل جیوه و جابه جایی آنها در خاک، گیاهان و دانه برنج انجام شد. تمام تیمارها نشان دهنده غلظت قابل توجه بالای متیل جیوه در دانه نسبت به تیمارهای شاهد بودند (Tang *et al.*, 2017). کرباسی و همکاران (Karbasi *et*

می‌توان دریافت با تغییر زمان کاشت، میزان این فلزات در محصولات رشد یافته تغییر پیدا می‌کند. برای کنترل آلودگی و جلوگیری از ورود آن به محصولات کشاورزی پیشنهاد می‌شود بررسی‌های زیست‌محیطی در خاک و محصولات کشاورزی منطقه به طور مستمر انجام گرفته و غلظت آلاینده‌های فلزی در خاک و محصولات کشاورزی به‌طور سالیانه تعیین گردد.

منابع

1. Akbari, Sh., & Cheraghi, M. (2019). Investigation of the concentration of heavy metals zinc, lead and cadmium in rice offered in the consumer market of Hamadan. *Journal of Environmental Science and Technology*, 21(8), 13-22. <https://doi.org/10.22034/jest.2020.16352.3260>
2. Amirahmadi, N., Abdpoor, A., Bagheri, A., & Keyvanbehjoo, F. (2015). *Study and comparison between farm and rice production using two management systems*. 3th National Congress on Organic and Conventional, Ardebil, Iran. (In Persian)
3. Atefi, M., & Mahmoudzadeh, M. (2021). Determination of nitrate and nitrite in agricultural crops distributed in northeast of Iran. *Human, Health and Halal Metrics*, 2(2), 18-24. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=901033>
4. ATSDR, (2003). Agency for Toxic Substances and Disease Registry of the U.S. Department of Health and Human Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>.
5. Bosque, M.A., Schuhmacher, M., Domino, J.L., & Lobet, J.M. (1990). Concentration of Lead and Cadmium in edible in vegetable from Tarragona province Spain. *Science of the Total Environment*, 95, 61-67.
6. Bian, Zh., Wang, Y., Zhang, X., Li., T., Grundy, S., Yang, Q., & Cheng, R. (2020). A review of environment effects on nitrate accumulation in leafy vegetables grown in controlled environments. *Foods Review*.
7. Cao, H., Chen, J., Zhang, J., Zhang, H., Qiao, L., & Men, Y. (2010). Heavy metals in rice and garden vegetables and their risks to inhabitants in the vicinity of an industrial zone in Jiangsu, China. *Journal of Environmental Sciences*, 22, 1792-1799.
8. Codex Alimentarius, Commission. (2014). Report of the Eighth Session of the Codex Committee on Contaminants in Foods. In Proceedings of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission 37th Session, Geneva, Switzerland, December 2014. [Google Scholar]
9. Davis, J.M., Elias, R.W., & Grant, L.D. (1993). Current issues in human lead exposure and regulation of lead. *Neurotoxicology*, 14, 2-3, 15-27.
10. Deng, F., Yu, M., Martinoia, E., & Song, W.Y. (2019). Ideal cereals with lower arsenic and cadmium by accurately enhancing vacuolar sequestration capacity. *Frontiers in Genetics*, 10, 322. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00322>
11. Farahmandfar, R., Esna Ashari, M., Rashidai Abandansari S., & Maghsoudloo E. (2019). Investigation of mycotoxins and heavy metals in rice samples of Mazandaran province by HPLC and atomic absorption spectroscopy. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 15(84), 231-242.
12. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Food & Feed-Maximum limit of heavy metals ISIRI. No.12968. 1st. Edition, Karaj: ISIRI; 2010. (In Persian)
13. Karbasi, M., Karbasi, E., Saremi, A., & Ghorbani zade Kharazi, H. (2010). Determination of heavy metals concentration in drinking water resources of Aleshtar in 2009. *Yafte*, 12(1).
14. Khanam, R., Kumar, A., Nayak, A.K., Shahid, Md., Tripathi, R., Vijayakumar, S., Bhaduri, D., Kumar, U., Mohanty, S., & Panneerselvam, P. (2020). Metal(Loid)s (as, Hg, Se, Pb and Cd) in Paddy Soil: Bioavailability and Potential Risk to Human Health. *Science of the Total Environment*, 699, 134330.
15. Kikuchi, T., Okazaki, M., Toyota, K., Motobayashi, T., & Kato, M. (2007). The input-output balance of cadmium in a paddy field of Tokyo. *Chemosphere*, 67, 920-927. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.018>
16. Kim, H.S., Kim, Y.J., & Seo, Y.R. (2015). An overview of carcinogenic heavy metal: molecular toxicity mechanism and prevention. *Journal of Cancer Prevention*, 20, 232-240. <https://doi.org/10.15430/JCP.2015.20.4.232>
17. Kolah Kaj, M., Bataleboui, P., Manipour, H. & Modiri, S. (2016). Investigation of arsenic concentration in rice samples and human input dose in Midwood region, Khuzestan. *Journal of Health and Environment, Scientific Research Quarterly*.
18. Kormoker, T., Porshad, R., Islam, M.D.S, Tusher, T.R., Uddin, M., Khadka, S., Chandra, K. & Sayeed, A. (2021). Presence of toxic metals in rice with human health hazards in Tangail district of Bangladesh. *International Journal of Environmental Health Research*. <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1724271>
19. Meharg, A.A., Norton, G., Deacon, C. Williams, P. Adomako, E.E., Price, A., Zhu, Y., Li, G., Zhao, F.J., & McGrath, S. (2013). Variation in rice cadmium related to human exposure. *Environmental Science & Technology*, 47, 5613-5618.
20. Nies, D.H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 313-339.

21. Nouri, M. Z., Gholami, M., Mousavi, S.A.A. & Hosseini, S.S. (2014). *Study of rice replanting in Mazandaran and comparison of crop indices of rice cultivars in two cultivations*. The First International Congress and the Thirteenth National Congress of Agronomy and Plant Breeding. 26-28 August.
22. Nozari, H. (2019). Investigation of cadmium, lead and nitrogen in rice in Abarj Fars region. *Iranian Journal of Agriculture and Plant Breeding*, 15(1), 15-28.
23. Pirrone, N., Cinnirella, S., Feng, X., Finkelman, R., Friedli, H., Leaner, J., Mason, R., Mukherjee, A., Stracher, G., & Streets, D. (2010). Global mercury emission to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10, 5951-5964.
24. Punshon, T., Jackson, B.P., Meharg, A.A., Warczack, T., Scheckel, K., & Gueriot, M.L. (2017). Understanding arsenic dynamics in agronomic systems to predict and prevent uptake by crop plants. *Science of the Total Environment*, 581-582, 209-220.
25. Rezaei, L., Alipour, V., Sharafi, P., Ghaffari, H., Nematollahi, A., Pesarakloo, V., & Fakhri, Y. (2021). Concentration of Cadmium, Arsenic and Lead in rice (*Oryza sativa*) and probabilistic health risk assessment: A case study in Hormozgan province, Iran. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 8(2), 67-75. <https://doi.org/10.34172/EHEM.2021.10>
26. Roberts, T.L. (2014). Cadmium and phosphorous fertilizers: the issues and the science. *Procedia Engineering*, 83, 52-59.
27. Rothenberg, S.E., Feng, X., Zhou, W., Tu, M., Jin, B., & You, J. (2012). Environment and genotype controls on mercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) cultivated along a contamination gradient in Guizhou, China. *Science of the Total Environment*, 426(1), 272-280.
28. Selin, N.E. (2009). Global biogeochemical cycling of mercury: a review. *Annual Review of Environment and Resources*, 34, 43.
29. Shirzad, B., & Khakipour, N. (2021). Investigation of heavy metal, lead, cadmium and arsenic contamination in high-consumption Anbarbo rice samples in some areas of Khuzestan province. *Journal of Food Science and Nutrition*, 19(1), 45-54. <https://doi.org/10.30495/jftn.2021.19175>
30. Shokrzadeh, M., Rokni, A., & Galstvan, M. (2013). Lead, cadmium and chromium concentration in irrigation supply of Tarom rice in central cities of Mazandaran-Iran. *Journal of Mazandaran University of Medical Science*, 23(98), 234-242.
31. Sivasinthujah, P., Srikanan, R., Thavaranjit, A.C., Velauthamurthy, K., Tharmila, C.J., Abiman, P., & Iyngaran, P. (2014). Contents of nitrate, nitrite and the occurrence of bacteria in fermented cooked parboiled rice and their potential ingestion in the diet. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4(4), 56-61.
32. States, J.C. (2015). *Arsenic: Exposure Sources, Health Risks, and Mechanisms of Toxicity*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey (Chapter 2).
33. Tang, W., Dang, F., Evans, D., Zhong, H., & Xiao, L. (2017). Understanding reduced inorganic mercury accumulation in rice following selenium application: selenium application routes, speciation and doses. *Chemosphere*, 169, 369-376.
34. Tatab Mentan, M., Nyachoti, S., Scott, L., Phan, N., Okwori, F. O., Felemban, N., & Godebo, T.R. (2020). Toxic and essential elements in rice and other grains from the United States and other countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(21), 8128. <https://doi.org/10.3390/ijerph17218128>
35. Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., & Sutton D.J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Supply Chain Management*, 101, 64-133.
36. Vahaji, N., Tayefe, M., & Sadeghi, M. (2020). Comparison of the concentration of heavy elements and their weekly absorption in consumed rice planted in different regions of Guilan province. *Ebnesima*, 21(4), 51-58.
37. WHO. (2004). Joint FAO/WHO Expert Standards. Programme Codex Alimentations Commission. Geneva, Switzerland available in the: <http://www.who.int>.
38. Wuana, R.A., & Okieimen, F.E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for remediation. *International Scholarly Research Notices*. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>
39. Zhang, H., Feng, X., Larssen, T., Shang, L., & Li, P. (2010). Bioaccumulation of methylmercury versus inorganic mercury in rice (*Oryza sativa* L.) grain. *Environmental Science & Technology*, 44, 4499-4504.



The Effect of Chitosan and Okra Mucilage Edible Coatings on the Physico-chemical Properties of Fried Potato Strips

A. Farazmand¹, H. Jalali², A. Najafi^{3*}

Received: 2022.07.03

Revised: 2022.10.16

Accepted: 2022.10.25

Available Online: 2022.10.26

How to cite this article:

Farazmand, A., Jalali, H., & Najafi, A. (2023). The effect of chitosan and okra mucilage edible coatings on the physico-chemical properties of fried potato strips. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 511-525. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.77486.1187>

Introduction

Potato strips are one of the most widely consumed products, and due to their high oil content, they have caused public health concerns. Therefore, efforts to reduce oil absorption can alleviate these concerns to some extent. Edible coating is an effective way to reduce oil uptake, because the oil absorption is a surface phenomenon. Edible coatings should adhere well to the surface of the product and provide a uniform and complete coverage for the product. Preventing the migration of oxygen, carbon dioxide, aromas, oils, moisture, improving the appearance of food and mechanical properties. In this study, the possibility of reducing oil absorption in French fries was investigated using okra mucilage and chitosan as edible coatings.

Material and Methods

The okra was washed and then cut into about 1 cm pieces and poured into containers with lids. Then water in a ratio of 2:1 weight of okra was added to the container and completely covered its surface. The okra were refrigerated for 72 hours until the mucilage was completely extracted. Then the mucilage was smoothed. This solution was considered as 100% mucilage solution. To prepare a 50% solution of okra mucilage, 100% solution was mixed with an equal amount of distilled water and filtered. To produce a solution of 0.75 and 1.5% of chitosan, 7.5 and 15 g of chitosan powder was dissolved in 1000 ml of 1% acetic acid and then adjusted to pH 5. Then 5 g of glycerol was added as a plasticizer. The potato slices were first blanched in 0.5% calcium chloride solution at 90°C for 5 minutes. Then, they were immersed in coating solutions at 60°C for 5 minutes. After coating, the potato strips were fried at 180°C using a fryer and then various characteristics including coating percentage, oil absorption, and moisture content, texture firmness, peroxide value, acid number, color indices and sensory properties were examined. Design Expert 8.0.7.1 software was used to analyze the results and to draw the curves.

Results and Discussion

The results showed that the increasing the amount of chitosan led to better coating formation in comparison with okra. The highest coverage was observed in the concentration of 1.2% chitosan and 0% okra mucilage (2.38%) and the lowest was observed in the control sample (0.11%). It was also observed that with increasing the concentration of chitosan and okra mucilage, the amount of oil absorption decreases. However, the amount of oil absorption in high concentrations of okra mucilage increased slightly. The highest oil uptake in the control sample was 20% and the lowest was observed

1, 2 and 3- M.Sc and Assistant Professors, Department of Food Science and Technology, Damghan branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran, respectively.

(* - Corresponding Author Email: Ali.Najafi@iau.ac.ir)

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.77486.1187](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.77486.1187)

in the sample of fried strips covered with 41% okra mucilage and 1.5% chitosan at 15.44%. The obtained model of oxidation index was not significant. The effect of okra mucilage and chitosan concentration on the texture of the samples ($p < 0.05$) and the color indices of a^* ($p < 0.01$) and L^* ($p < 0.05$) were significant. For sensory attributes, the highest and the lowest taste score was observed for samples coated with 100% okra mucilage and 0.75% chitosan and samples coated with 18% okra mucilage and 0% chitosan respectively.

Conclusion

The aim of this project was to reduce the oil absorption of fried potato strips by coating them with chitosan and okra mucilage. Optimization to minimize the consumption of okra and chitosan mucilage showed that coating with 74% okra and 0.89% chitosan is suitable for coating potato slices. The desirability of this optimization was 71%, which is a reasonable percentage.

Keywords: Chitosan, Edible coatings, Oil uptake, Okra mucilage, Potato

مقاله پژوهشی

اثر پوشش‌های خوراکی کیتوزان و موسیلاژ بامیه بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی خلال‌های سیب‌زمینی سرخ شده

آزاده فرازمنند^۱ - حسین جلالی^۲ - علی نجفی^{۳*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۳

چکیده

سیب‌زمینی سرخ‌شده از محصولاتی است که مصرف بالایی دارد و به دلیل داشتن روغن زیاد نگرانی‌هایی را از لحاظ سلامت عمومی به وجود آورده است. در این تحقیق امکان کاهش جذب روغن در سیب‌زمینی سرخ‌شده با استفاده از موسیلاژ بامیه و کیتوزان به عنوان پوشش خوراکی بررسی شد. بدین منظور موسیلاژ بامیه با غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ و کیتوزان با غلظت‌های ۰، ۷۵ و ۱ درصد مورد استفاده قرار گرفت. غلظت‌های صفر به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. پس از پوشش‌دهی، خلال‌های سیب‌زمینی سرخ‌شده و درصد پوشش‌دهی، میزان جذب روغن، مقدار رطوبت، سفتی بافت، عدد پراکسید، عدد اسیدی، شاخص‌های رنگ و ویژگی‌های حسی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کیتوزان باعث افزایش پوشش‌دهی و بامیه سبب کاهش آن گردید. بیشترین پوشش‌دهی در غلظت ۱/۲ درصد کیتوزان و صفر درصد موسیلاژ بامیه (۲/۳۸ درصد) و کمترین آن در نمونه شاهد (۰/۱۱ درصد) مشاهده گردید. همچنین مشاهده شد که با افزایش غلظت کیتوزان و موسیلاژ بامیه جذب روغن کاهش یافت، ولی جذب روغن در غلظت‌های بالای موسیلاژ بامیه کمی افزایش یافت. بیشترین و کمترین جذب روغن به ترتیب در نمونه شاهد (۲۰/۶ درصد) و نمونه پوشش‌دهی شده با ۴۱ درصد موسیلاژ بامیه و ۱/۵ درصد کیتوزان (۱۵/۴۴ درصد) مشاهده شد. در مورد عدد پراکسید و عدد اسیدی مدل‌های به دست آمده معنی‌دار نبودند. اثر غلظت موسیلاژ بامیه و کیتوزان بر بافت نمونه‌ها و شاخص‌های رنگ معنی‌دار بود. در نهایت پس از بهینه‌یابی، غلظت ۷۴ درصد بامیه و ۰/۸۹ درصد کیتوزان به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: پوشش‌خوراکی، جذب روغن، کیتوزان، سیب‌زمینی، موسیلاژ بامیه

مقدمه

هایی است که به دلیل جذب زیاد روغن در حین فرآیند، کالری زیادی وارد بدن می‌کند. تمایل رو به افزایش مصرف کنندگان به میان‌وعده‌های غذایی کم‌کالری باعث رو آوردن به فرآیندهایی به منظور کاهش میزان جذب روغن ضمن حفظ کیفیت محصول شده است (Bouchon et al., 2015).

سرخ کردن عمیق یک روش قدیمی است که ماده غذایی با غوطه ور شدن در روغن داغ پخته می‌شود (Juaniz et al., 2016). طی سرخ کردن عمیق، استفاده از دمای بالا منجر به تبخیر آب و خارج شدن آن از سطح ماده غذایی می‌شود، در نتیجه روغن احاطه کننده ماده غذایی به داخل بافت آن نفوذ کرده و جایگزین آب تبخیر شده می‌گردد (Van Koerten et al., 2015). از مهمترین سازوکارهای مؤثر در جذب

امروزه تمایل جامعه به مصرف غذاهای آماده رو به افزایش است. از سوی دیگر افزایش بیماری‌هایی مانند چاقی، دیابت و بیماری‌های قلبی عروقی، باعث ایجاد نگرانی‌هایی از لحاظ بهداشت و سلامت عمومی گردیده است. یکی از عوامل بروز این مشکلات و بیماری‌ها، بالا بودن مقدار چربی در رژیم غذایی افراد و خطرات ناشی از پلیمریزاسیون روغن‌ها در حین فرآیند است. بنابراین، خطامشی کلی صنعت غذا به سمت تولید محصولات عاری از چربی یا کم‌چربی با دارا بودن عطر و طعم مشابه با محصول طبیعی می‌باشد (Daraei Garmakhany et al., 2011). سیب‌زمینی سرخ شده یکی از فرآورده

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

(*) - نویسنده مسئول: (Email: Ali.Najafi@iaui.ac.ir)

ویسکوز عصاره بامیه است و از لحاظ تکنولوژیکی اهمیت قابل توجهی در مواد غذایی و دارویی دارد (Kpodo et al., 2017).

کیتوزان یک پلی ساکارید با وزن مولکولی بالا و محصول دایستیلایسون کیتین است. بسیاری از محققان به دلیل خواص ضد میکروبی، ضد قارچی، زیست سازگاری، خاصیت ژله ای شدن و قوام دهنده گی و غیرسمی بودن آن را در فرمولاسیون پوشش ها یا فیلم های خوراکی استفاده کرده اند (Kumar et al., 2013; Ziaolhagh & Kanani, 2021). فیلم های کیتوزان نفوذپذیری کمی نسبت به اکسیژن و رطوبت دارند؛ بنابراین مانع بسیار خوبی برای گازها و بخار آب می باشند. از کاربردهای دیگر این ماده در بسته بندی های مواد غذایی، اثر آنتی اکسیدانی آن است که با جذب فلزاتی که کاتالیزور واکنش اکسیداسیون چربی هستند مانع از اکسیداسیون می شوند (Li et al., 1994; Darmadji & Izumimoto, 1996).

مِلما (Mellema, 2003) نشان داد که پوشش های خوراکی روش مناسبی برای کاهش جذب روغن در هنگام سرخ کردن می باشند. از پوشش خوراکی کیتوزان برای کاهش جذب روغن در بادمجان سرخ شده استفاده شده است (Nasirvand & Javadi, 2018). از جمله هیدروکلوئیدهایی که به عنوان پوشش برای جذب کمتر روغن در سیب زمینی مورد استفاده قرار گرفته اند، می توان به هیدروکسی پروپیل متیل سلولز، متیل سلولز، پکتین ها، آلژینات ها، کاراگینان، صمغ دانه خرنوب^۳، و صمغ ژلان^۴ (Varela & Fiszman, 2013)، صمغ بادام کوهی^۵ و ژلاتین (Eslampour & Hosseini, 2017)، پکتین و کربوکسی-متیل سلولز (Daraei Garmakhany et al., 2021)، موسیلاژ بامیه و صمغ کربوکسی متیل سلولز (Ashrafi Yorganloo & Gheybi, 2019) اشاره کرد.

در این تحقیق برای کاهش میزان جذب روغن، از پوشش دهی سیب زمینی با موسیلاژ بامیه و کیتوزان قبل از سرخ کردن عمیق استفاده می شود. اهداف این تحقیق شامل تعیین ویژگی های حسی و فیزیکوشیمیایی خلال سیب زمینی سرخ شده پوشش دهی شده با درصدهای مختلف موسیلاژ بامیه و کیتوزان و تعیین فرمولاسیون مناسب پوشش حاوی هیدروکلوئید کیتوزان و موسیلاژ بامیه برای کاهش جذب روغن خلال سیب زمینی می باشند.

مواد و روش ها

آماده سازی موسیلاژ بامیه

روغن می توان به جایگزینی آب، اثر فاز سرد شدن^۱ و عوامل فعال در سطح اشاره کرد (Sabbaghi et al., 2015). در سازوکار اول حفره های نسبتاً بزرگی در اثر تبخیر آب در محصول سرخ شده ایجاد می شود که روغن جایگزین آب در این حفره ها می شود. سازوکار دوم مربوط به روغنی است که هنگام خارج کردن غذا از سرخ کن جذب غذا می شود. در این مرحله، ویژگی های سطح محصول و ویسکوزیته روغن نقش اساسی دارند. تشکیل عوامل فعال سطحی نقش زیادی در توجیه افزایش جذب روغن ندارد (Dana & Saguy, 2006). از ترکیبات هیدروکلوئیدی می توان در فرمولاسیون محصولات خمیری و همچنین به صورت پوشش خوراکی در سایر محصولات جهت کاهش جذب روغن استفاده کرد (Sabbaghi, 2021). برای تولید پوشش های خوراکی از پلی ساکاریدها، پروتئین ها، چربی ها و ترکیبی از این مواد استفاده می شود (Yadegari et al., 2017). پوشش ها به صورت مستقیم روی غذا استفاده می شود و همان جا شکل خاص خود را می گیرد (Debeaufort & Voilley, 2009). پوشش های خوراکی بایستی به خوبی به سطح محصول مورد نظر چسبیده و پوشش یکنواخت و کاملی را برای محصول فراهم نمایند. جلوگیری از مهاجرت اکسیژن، دی اکسید کربن، آروماها، روغن، رطوبت، بهبود ظاهر ماده غذایی، بهبود ویژگی های مکانیکی، حامل مکمل های تغذیه ای و افزودنی های غذایی مورد نظر از جمله اهداف استفاده از این پوشش ها هستند (Zimoch- & korzycka et al., 2015).

بامیه با نام علمی *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench متعلق به خانواده مالوآسه^۲ است. این گیاه یک ساله بومی آفریقا است و در کشورهای مختلف جهان به ویژه در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری، گرم و معتدل کشت می شود. بامیه منبع غنی از مواد معدنی، ویتامین ها، پروتئین، فیبرهای غذایی، کلسیم و مواد شیمیایی فعال زیستی است. بامیه با توجه به فعالیت های بیولوژیکی مختلف خود دارای سلامتی مختلفی است (Amirabbasi et al., 2021). غلاف بدون دانه بامیه فاقد چربی است و حاوی مقادیر زیادی فیبر غذایی، عمدتاً شامل پلی ساکاریدهای پکتیکی و مقدار کمی پلی ساکاریدهای همی سلولزی از جمله زایلوجلکان و گلوکورونوکیسلان است. پلی ساکاریدهای غلاف بدون دانه بامیه یک بافت ویسکوز لزج ایجاد می کنند (Xu et al., 2020). ظرفیت امولسیون بالایی عصاره بامیه به پروتئین ها (Alba et al., 2013) و بافت غلیظ و لزج آن به پلی ساکاریدهای آن نسبت داده می شود (Georgiadis et al., 2011; Kontogiorgos et al., 2012). پکتین هیدروکلوئید مسئول بافت

4- Gellan gum
5- Bitter Almond Gum

1- phase-Cooling
2- Malvaceae
3- Locust bean gum

بامیه (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) مورد استفاده از بازار محلی خریداری شدند. بامیه‌ها پس از خریداری شسته شده و سر و دم آن‌ها جدا گردید. سپس در اندازه‌های حدود یک سانتی‌متری برش زده شده و داخل ظروف درب‌دار ریخته شدند. آب به میزان حدود دو برابر وزن بامیه‌ها اضافه شد. مدت ۷۲ ساعت بامیه‌ها داخل یخچال نگهداری شدند تا موسیلاژ کاملاً استخراج شود. سپس موسیلاژ صاف شد. این محلول به عنوان محلول ۱۰۰ درصد موسیلاژ در نظر گرفته شد. برای تهیه محلول ۵۰ درصد موسیلاژ بامیه، محلول ۱۰۰ درصد با مقدار مساوی آب مقطر مخلوط و صاف گردید. موسیلاژ بامیه صاف شده تا زمان اعمال تیمارها داخل یخچال در دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آماده‌سازی محلول کیتوزان

برای تولید محلول ۰/۷۵ و ۱/۵ درصد پوشش خوراکی کیتوزان، مقدار ۷/۵ و ۱۵ گرم پودر کیتوزان در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۱ درصد به کمک هم‌زن مغناطیسی (Karazma، ایران) در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به طور کامل حل شد و بعد از آن با سود ۱ نرمال تا pH برابر ۵ خنثی شد. سپس مقدار ۵ گرم گلیسرول به عنوان پلاستیسایزر اضافه شد و تا زمان اعمال تیمارها در یخچال نگهداری گردید (Nasirvand and Javadi, 2018).

روش پوشش‌دهی سیب‌زمینی‌ها

سیب‌زمینی رقم مجنی (*Solanum tuberosum*) از بازار محلی تهیه شد. سیب‌زمینی‌ها پس از پوست‌گیری به طول حدود ۳ سانتی‌متر و ضخامت ۰/۵ سانتی‌متر با یک چاقوی تیز برش زده شدند. خلال‌های برش خورده تا قبل از اعمال تیمار پوشش‌دهی داخل آب سرد قرار داده شدند تا از تغییر رنگ آن‌ها جلوگیری شود. خلال‌ها ابتدا در محلول کلرید کلسیم ۰/۵ درصد با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بلانچ شدند. سپس آبکش شده و پس از خشک شدن رطوبت سطحی، برای مدت ۵ دقیقه داخل محلول‌های پوششی با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شدند (Ashrafi Yorganloo & Gheybi, 2019). نمونه‌ها به مدت سه دقیقه روی صافی قرار گرفتند تا محلول اضافی آن‌ها جدا شود. سپس جهت خشک شدن رطوبت سطحی، نمونه‌ها به مدت ۹۰ ثانیه داخل آون (Froilabo، فرانسه) با دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

روش سرخ کردن سیب‌زمینی‌های پوشش‌دهی شده

سیب‌زمینی‌ها پس از پوشش‌دهی با محلول‌های کیتوزان و موسیلاژ بامیه داخل سرخ‌کن خانگی (Tefal، فرانسه) به مدت ۷ دقیقه در دمای حدود ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد سرخ شدند. زمان و دمای سرخ کردن با

توجه به آزمایشات اولیه به دست آمدند. در دما و زمان بالاتر رنگ محصول تیره و در کمتر از این مقادیر سیب‌زمینی‌ها حالت خام داشتند. بعد از سرخ شدن، نمونه‌ها برای ۱۵ دقیقه روی صافی قرار داده شدند تا روغن اضافی آن‌ها جدا شود. پس از جدا شدن روغن اضافی و سرد شدن، نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات داخل کیسه‌های پلاستیکی پلی‌اتیلنی در حضور گاز ازت بسته‌بندی شدند (Taghavi et al., 2018).

تعیین مقدار رطوبت

برای اندازه‌گیری مقدار رطوبت حدود ۵ گرم از نمونه‌ها توسط ترازوی دیجیتالی (Sartorius) با دقت ۰/۰۰۱ وزن شده و در آون (TakAzma، ایران) با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. هر نیم ساعت یکبار، نمونه‌ها از آون خارج شده و پس از سرد شدن در دسیکاتور، توزین شده و مجدداً در آون قرار داده شدند. این کار تا زمانی انجام گرفت، که وزن نمونه‌ها در دو توزین متوالی یکسان باقی ماند. مقدار رطوبت نمونه‌های سیب‌زمینی، بر حسب درصد، از طریق رابطه محاسبه گردید:

$$Moisture = \frac{M1 - M2}{M0} \quad (1)$$

که در آن، M1 وزن ظرف و نمونه قبل از خشک کردن (بر حسب گرم)، M2 وزن ظرف و نمونه بعد از خشک کردن (بر حسب گرم) و M0 وزن نمونه اولیه (بر حسب گرم) می‌باشند (Jafari et al., 2019).

مقدار جذب روغن

برای اندازه‌گیری مقدار جذب روغن یا میزان چربی از روش سوکسله (Jerhardt، آلمان) استفاده شد. به این منظور حدود ۵ گرم از نمونه را توزین نموده و چربی با استفاده از حلال ان-هگزان به مدت ۶ ساعت استخراج گردید (Shakouri et al., 2021).

عدد پراکسید و عدد اسیدی

عدد پراکسید به روش لی و عدد اسیدی به روش تیتراسیون اندازه‌گیری شدند (Parvneh, 2007).

آزمون حسی

برای انجام آزمون حسی از روش محصول‌گرا (امتیازدهی شدت یک ویژگی) و با امتیازبندی هدونیک پنج نقطه‌ای استفاده شد. برای این کار از ۱۵ نفر ارزیاب آموزش دیده استفاده شد. از ارزیاب‌ها خواسته شد تا نمونه‌های خلال سرخ‌شده سیب‌زمینی را مصرف کرده و از لحاظ رنگ، طعم و بو به آن‌ها امتیازی بین ۱ تا ۵ بدهند. امتیاز یک برای نمونه‌های بسیار نامطلوب و امتیاز ۵ برای نمونه‌های بسیار مطلوب در نظر گرفته شد (Sabbaghi et al., 2019).

شاخص‌های رنگ

به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های رنگ از تجزیه و تحلیل تصویر استفاده شد. بدین منظور با کمک یک اسکنر مدل ColorPage-HR7X Slim Genius تصاویر با وضوح ۳۰۰ dpi از نمونه‌ها تهیه شد. سپس تصاویر در داخل نرم افزار ImageJ نسخه ۱/۵۰ قرار گرفته و استفاده از پلاگین تبدیل فضای رنگ^۱ شاخص‌های قرمز-سبز، زرد-آبی و روشنایی محاسبه شدند (Sabbaghi et al., 2018). شاخص روشنایی (L^*) معرف میزان روشنی نمونه است و بین صفر (سیاه) تا ۱۰۰ (سفید) متغیر است. شاخص قرمز-سبز (a^*) میزان نزدیکی رنگ نمونه به رنگ‌های سبز و قرمز را نشان می‌دهد و در دامنه بین ۱۲۰- (سبز) و ۱۲۰+ (قرمز) قرار دارد. شاخص زرد-آبی (b^*) نیز میزان نزدیکی رنگ نمونه به رنگ‌های آبی و زرد نشان داده و دامنه آن از ۱۲۰- (آبی) تا ۱۲۰+ (زرد) متغیر است (Ziaolhagh et al., 2017; Abramoff et al., 2005). میزان تغییرات کلی رنگ نسبت به سیب زمینی خام (E) از رابطه ۲ به‌دست آمد. a_0^* ، b_0^* و L_0^* به ترتیب میزان روشنایی، قرمزی و زردی سیب‌زمینی‌ها قبل از فرایند سرخ کردن می‌باشند.

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

تعیین سفتی

به‌منظور تعیین میزان سفتی هر نمونه از دستگاه پنترومتر دستی (مدل FT011 ساخت ایتالیا) که بر حسب کیلوگرم درجه‌بندی شده بود استفاده گردید. به این ترتیب که پروب دستگاه تا خط نشانه موجود بر روی آن (حدود ۵ میلی‌متر) داخل بافت خلال‌های سیب‌زمینی فرو برده شده و مقدار نیروی وارده (بر حسب گرم) در محل نشانه خوانده شد و میانگین ۶ تکرار به‌عنوان شاخصی از سفتی گزارش گردید (Sabbaghi et al., 2017).

درصد پوشش‌دهی

درصد پوشش‌دهی از اختلاف وزن بین نمونه‌های پوشش‌دهی شده و بدون پوشش مطابق با رابطه ۳ محاسبه شد.

$$Coverage = \frac{C-I}{I} \times 100 \quad (3)$$

که در این رابطه C وزن نمونه‌های خام پوشش‌دهی شده (گرم) و I وزن اولیه نمونه‌های بدون پوشش (گرم) است (Taghavi et al., 2018).

تیمارها و طرح آماری

تیمارهای مورد استفاده شامل موسیلاژ بامیه در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ درصد) و محلول کیتوزان در سه سطح (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵) درصد بود. سطح صفر پوشش‌ها به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد و سطح بالای پوشش‌ها با توجه به آزمایشات اولیه به‌دست آمد. برای تجزیه و تحلیل واریانس و تعیین بهترین شرایط پوشش‌دهی، از روش سطح پاسخ در قالب طرح آزمایشی مرکب مرکزی^۲ با ۵ تکرار در نقطه مرکزی با کمک نرم‌افزار Design Expert 8.0.7.1 استفاده شد. نمودارها نیز با کمک همین نرم‌افزار رسم شدند.

نتایج و بحث

درصد پوشش‌دهی

جدول ۱ مدل‌های ارائه شده برای ویژگی‌های مختلف خلال‌های سیب‌زمینی سرخ‌شده را بر حسب مقادیر واقعی نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است مدل پیش‌بینی شده برای درصد پوشش‌دهی کیتوزان و موسیلاژ بامیه مدل درجه سوم کاهش یافته با ضریب تبیین ۰/۹۲ بود ($p < 0.01$). اثر غلظت‌های مختلف موسیلاژ بامیه و کیتوزان ($p < 0.01$) و همچنین اثر متقابل غلظت موسیلاژ بامیه در توان دوم غلظت کیتوزان ($p < 0.05$) معنی‌دار بود.

با افزایش غلظت موسیلاژ بامیه درصد پوشش‌دهی آن نیز کاهش یافت، به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ درصد موسیلاژ بامیه میزان پوشش دهی تنها ۰/۵ درصد بود. در مورد کیتوزان با افزایش غلظت آن میزان پوشش‌دهی افزایش یافت و در غلظت ۱/۵ درصد کیتوزان میزان پوشش‌دهی ۱/۸۷ درصد بود. دلیل آن را می‌توان به افزایش ویسکوزیته محلول کیتوزان با افزایش غلظت نسبت داد. **شکل ۱** اثر متقابل غلظت‌های مختلف بامیه و کیتوزان بر درصد پوشش‌دهی خلال‌های سیب‌زمینی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است موسیلاژ بامیه و کیتوزان بر یکدیگر اثر هم‌افزایی داشتند، به‌این معنی که بیشترین پوشش‌دهی در غلظت ۱/۲ درصد کیتوزان و صفر درصد موسیلاژ بامیه (۲/۳۸ درصد) و کمترین آن در نمونه شاهد یعنی غلظت صفر کیتوزان و موسیلاژ بامیه (۰/۱۱ درصد) مشاهده گردید. در مورد درصد پوشش دهی دو هیدروکلوئید CMC و موسیلاژ بامیه نیز، هم‌راستا با نتایج ما نشان داده شده است که درصد پوشش‌دهی ایجاد شده توسط موسیلاژ بامیه کمتر از پوشش‌دهی CMC بوده و این دو هیدروکلوئید نیز با یکدیگر اثر هم‌افزایی داشته‌اند (Ashrafi Yorganloo & Gheybi, 2019).

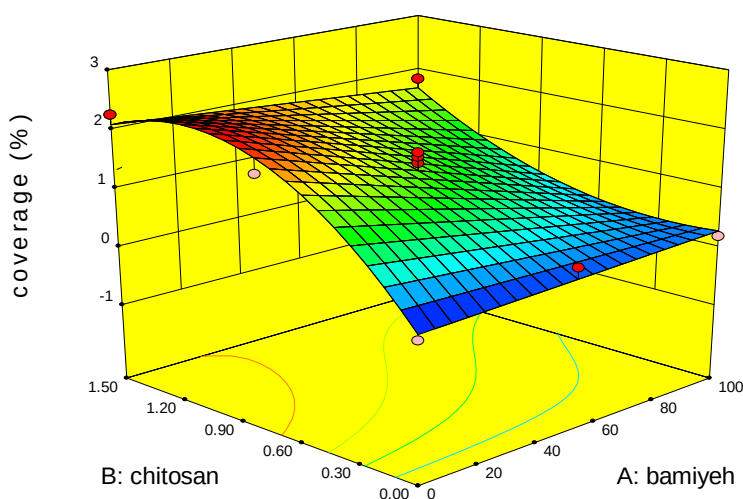
جدول ۱- مدل‌های به‌دست آمده برای ویژگی‌های مختلف خلال‌های سیب‌زمینی سرخ شده

Table 1- Obtained models for different characteristics of fried potato slices

ویژگی Property	مدل Model
پوشش‌دهی (%) Coating (%)	$C=0.095+0.00202A+4.13B-0.045AB-1.86B^2+0.027AB^2$
میزان جذب روغن (%) Oil Uptake (%)	$O=20.63-0.095A-1.549B+0.029AB+0.0006A^2-0.79B^2$
محتوی رطوبت (%) Moisture content (%)	$M=56.63+0.082A+3.075B$
سفتی بافت Stiffness	$S=1.82-0.00538A-0.04B+0.0052AB$
a*	$a=-3.29+0.02A+5.96B-0.2AB-0.000157A^2+0.00145A^2B$
L*	$L=68.69-0.18A-0.32B+0.23AB+0.00158A^2-0.00202A^2B$
شدت تغییرات رنگ ΔE	$\Delta E=15.38-0.21A+17.45B-0.33AB+0.00167A^2-11.84B^2+0.2AB^2$
امتیاز طعم Flavor score	$F=3.82-0.00497A+2.56B-0.01AB+0.00014A^2-1.149B^2$
امتیاز بافت Texture score	$T=4.83-0.024A+1.04B-0.0033AB+0.000251A^2-0.659B^2$

در مدل‌های ارائه شده، A غلظت موسیلاژ بامیه و B غلظت کیتوزان بر حسب درصد می‌باشند.

In the presented models, A is the concentration of okra mucilage and B is the concentration of chitosan in percentage terms



شکل ۱- اثر متقابل غلظت‌های مختلف بامیه و کیتوزان بر درصد پوشش‌دهی خلال‌های سیب‌زمینی

Fig. 1. Interaction effect of okra and chitosan concentrations on the coating percentage of potato slices

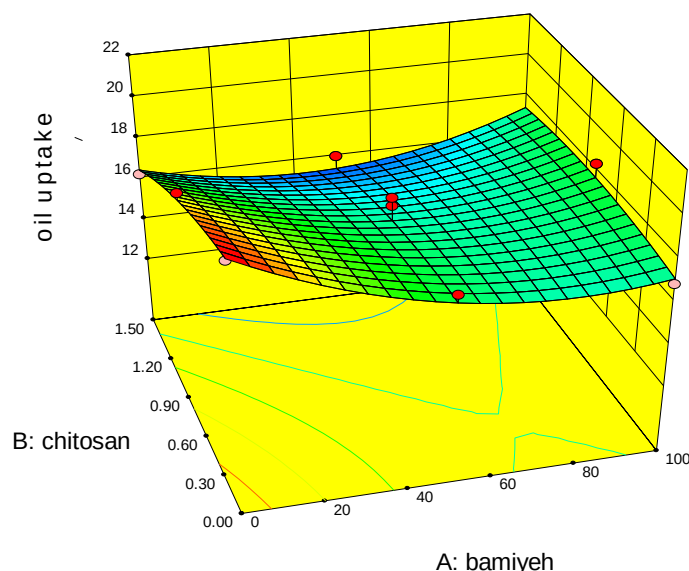
میزان جذب روغن

مدل پیش‌بینی شده برای درصد جذب روغن خلال‌های سیب‌زمینی سرخ شده پوشش‌دهی شده یک مدل درجه دوم با ضریب تبیین 0.74 بود (جدول ۱). با افزایش غلظت کیتوزان درصد جذب روغن خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی کاهش یافت به‌طوری‌که کمترین میزان جذب در غلظت $1/5$ درصد به مقدار $15/46$ درصد مشاهده شد، ولی در مورد موسیلاژ بامیه، با افزایش غلظت آن تا حدود 55 درصد میزان جذب روغن تا $16/81$ درصد کاهش و با افزایش بیشتر آن تا 100 درصد میزان جذب روغن خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی کمی افزایش یافت. شکل

۲ اثر متقابل غلظت موسیلاژ بامیه و کیتوزان بر درصد جذب روغن خلال‌های سرخ شده سیب‌زمینی را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود غلظت موسیلاژ بامیه و غلظت کیتوزان بر هم اثر هم افزایی^۲ داشته و بیشترین جذب روغن در نمونه شاهد ($20/6$ درصد) و کمترین آن در نمونه خلال سرخ شده سیب‌زمینی پوشش‌دهی شده با 41 درصد موسیلاژ بامیه و $1/5$ درصد کیتوزان ($15/46$ درصد) مشاهده گردید ($p < 0.05$). این امر به‌دلیل تأثیر پوشش‌دهی بر کاهش از دست رفتن آب و تأثیر بر مکانیسم جذب روغن در اثر جایگزینی آب می‌باشد. یکی دیگر از دلایل تأثیر پوشش‌دهی بر جذب روغن اثر آن بر لوله‌های

موبینه سطح محصول و کاهش جذب روغن در مرحله فاز سرد شدن است. پوشش با انسداد منافذ سطحی موجب کاهش عمق نفوذ روغن در مرحله سرد شدن تحت تأثیر فشار موئینگی می‌گردد. همچنین

پوشش‌دهی بر خروج رطوبت و در نتیجه ضریب انتقال حرارت جابه-جایی مؤثر است که روی خصوصیات کیفی تأثیر می‌گذارد (Sabbaghi et al., 2015).



شکل ۲- اثر متقابل غلظت موسیلاژ بامیه و کیتوزان بر درصد جذب روغن خلال‌های سرخ شده سیب‌زمینی
Fig. 2. Interaction effect of okra and chitosan concentrations on the oil absorption of potato slices

درصد رطوبت

مدل پیش‌بینی شده برای درصد رطوبت خلال‌های سیب‌زمینی سرخ شده پوشش‌دهی شده یک مدل خطی با ضریب تبیین ۰/۵ بود (جدول ۱). در این مورد تنها اثر غلظت‌های مختلف موسیلاژ بامیه در سطح آماری ۹۵ درصد ($p < 0.05$) معنی‌دار بود. شکل ۳ اثر غلظت‌های مختلف موسیلاژ بامیه بر مقدار رطوبت خلال‌های سرخ شده سیب‌زمینی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت موسیلاژ بامیه درصد رطوبت باقی‌مانده در خلال‌های سرخ شده سیب-زمینی نیز افزایش یافته است. به‌طوری که بیشترین مقدار رطوبت در غلظت ۱۰۰ درصد موسیلاژ بامیه به میزان ۶۷/۱۶ درصد بود. در طی فرایند سرخ کردن روغن جایگزین آب می‌شود. با افزایش غلظت پوشش‌خوراکی رطوبت کمتری از محصول خارج می‌شود که یک دلیل آن می‌تواند ایجاد پیوند بین هیدروکلوئید و آب باشد (Karimi & Esmaeilzadeh Kenari, 2015). در اینجا اثر موسیلاژ بامیه نسبت به کیتوزان در جلوگیری از خروج رطوبت بیشتر بوده است که احتمالاً دلیل آن بیشتر بودن پیوندهای بین آب و صمغ در بامیه نسبت به کیتوزان است. خروج رطوبت کمتر از محصول به بستر سرخ کردن باعث می‌شود تا واکنش‌های هیدرولیز روغن که در حضور آب تشدید می‌یابند کمتر شود و این امر در افزایش عمر مفید روغن نیز مؤثر خواهد بود. اشرفی یورقانلو و غیبی (Ashrafi Yorganloo & Gheybi,

2019) برخلاف نتایج تحقیق جاری نشان دادند که اثر موسیلاژ بامیه در جلوگیری از کاهش رطوبت خلال سیب‌زمینی سرخ شده کمتر از CMC از می‌باشد که آن را به کمتر بودن نفوذپذیری پوشش حاصل از CMC نسبت به موسیلاژ بامیه ربط دادند.

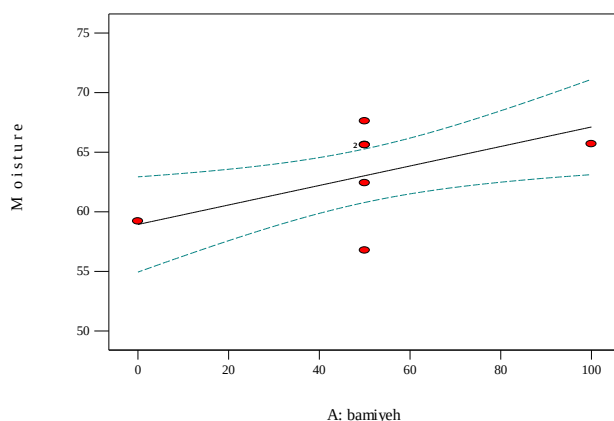
عدد پراکسید

مدل پیش‌بینی شده برای عدد پراکسید خلال‌های سیب‌زمینی سرخ شده پوشش‌دهی شده معنی‌دار نبود ولی اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوزان و موسیلاژ بامیه و اثر توان دوم غلظت کیتوزان در سطح آماری ۹۵ درصد ($p < 0.05$) معنی‌دار بود. شکل ۴ اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوزان و موسیلاژ بامیه بر عدد پراکسید خلال‌های سرخ شده سیب‌زمینی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود کمترین میزان عدد پراکسید در غلظت ۰/۳ درصد کیتوزان (۲۱/۱۸ میلی‌اکی والان بر گرم نمونه) و بیشترین عدد پراکسید در غلظت ۱/۵ درصد کیتوزان (۳۳/۸۱ میلی‌اکی‌والان بر گرم نمونه) بود. پوشش‌های خوراکی با ایجاد یک سد از تماس هوا با روغن موجود در محصول سرخ شده جلوگیری کرده و لذا عدد پراکسید را کاهش می‌دهند. علاوه بر این باعث کاهش جذب روغن می‌شوند که خود می‌تواند موجب محدود شدن تغییرات عدد پراکسید شود. همچنین با وجود پوشش در سطح ماده غذایی سرخ شده خروج رطوبت به حداقل رسیده یا کنترل می‌شود

عوامل اکسیداسیون طی نگهداری می‌گردد (Dana & Saguy, 2006).

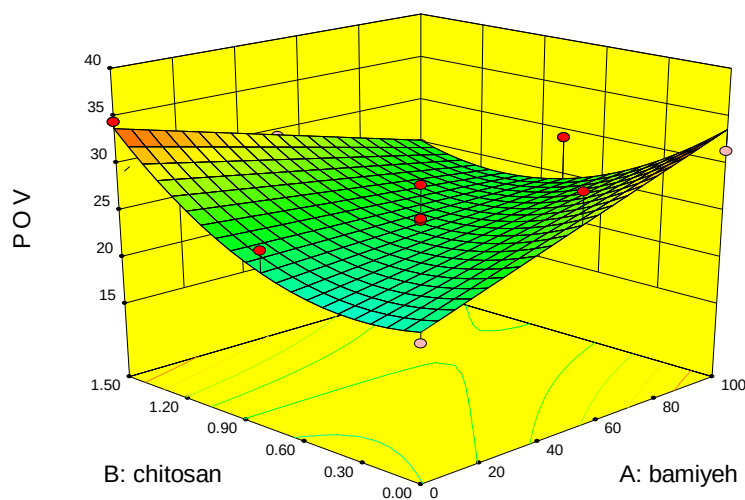
در همین راستا، نصیروند و جوادی (Nasirvand & Javadi, 2018) بیان کردند که پوشش‌دهی بادمجان با کیتوزان عدد پراکسید بادمجان‌های سرخ شده را کاهش می‌دهد. در بررسی آن‌ها اثر غلظت ۱ درصد کیتوزان بیشتر از اثر غلظت ۱/۵ درصد بود.

و این امر موجب کاهش واکنش‌های هیدرولیز و پلیمریزاسیون و جلوگیری از تولید عوامل فعال در سطح در روغن می‌گردد. در نتیجه از افزایش ویسکوزیته روغن جلوگیری می‌شود. عدم پلیمریزاسیون و جلوگیری از افزایش ویسکوزیته موجب افزایش زاویه تماسی شده و کشش بین سطحی (در سطح تماس روغن و هوا در محصول متخلخل) را کاهش داده و در نهایت با کاهش جذب روغن و حفظ کیفیت روغن موجب کاهش عوامل اکسیداسیون در محصول یا محدود شدن تولید



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف موسیلاژ بامیه بر مقدار رطوبت خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی
خطچین‌های رنگی (----) نشان‌دهنده نوار اطمینان در سطح ۹۵ درصد می‌باشند.

Fig. 3. Effect of okra and chitosan concentrations on the moisture content of potato slices
The colored dashed lines (----) indicate the confidence bar at the 95 level



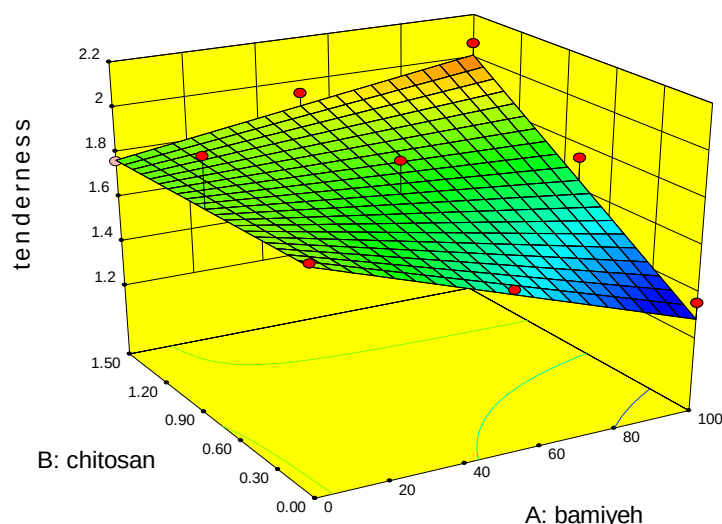
شکل ۴- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوزان و موسیلاژ بامیه بر عدد پراکسید (میلی‌اکی‌والان بر گرم) خلال‌های سیب‌زمینی
Fig. 4. Interaction effect of okra and chitosan concentrations on the peroxide value (meq/g) of potato slices

عدد اسیدی

اثر هیچ یک از عوامل بر مقدار عدد اسیدی خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی معنی‌دار نبود. برخلاف نتایج این تحقیق، نصیروند و جواد (Nasirvand & Javadi, 2018) نشان دادند که پوشش‌دهی بادمجان با کیتوزان سبب افزایش اسیدیته بادمجان‌های سرخ شده می‌شود و دلیل آن را به بالاتر بودن رطوبت نمونه‌ها پوشش‌دهی شده نسبت دادند. در رطوبت بالاتر هیدرولیز تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها بیشتر شده و در نتیجه مقدار اسیدهای چرب آزاد افزایش می‌یابد.

سفتی بافت

مدل پیش‌بینی شده برای سفتی بافت خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی یک مدل خطی با اثرات متقابل و با ضریب تبیین ۰/۶ بود. شکل ۵ اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوزان و موسیلاژ بامیه بر میزان سفتی خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی را نشان می‌دهد در غلظت‌های



شکل ۵- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوزان و موسیلاژ بامیه بر میزان سفتی (کیلوگرم) خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی

Fig. 5. Interaction effect of okra and chitosan concentrations on the stiffness (kg) of potato slices

شاخص‌های رنگ

شاخص‌های رنگ شامل شاخص زردی (b^*)، قرمزی (a^*)، روشنایی (L^*) و میزان تغییر رنگ خلال‌های سیب‌زمینی سرخ‌شده نسبت به خام (ΔE) می‌باشند. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف کیتوزان و موسیلاژ بامیه تأثیر معنی‌داری بر شاخص زردی نمونه‌ها نداشتند، ولی شاخص قرمزی و روشنایی و همچنین شدت تغییر

بالای بامیه و پایین کیتوزان سفتی بافت کم (ناحیه آبی در شکل ۵) و در غلظت‌های بالای کیتوزان و بامیه (ناحیه قرمز در شکل ۵) سفتی بافت زیاد بود، به‌طوری‌که کمترین سفتی در غلظت ۱۰۰ درصد بامیه و صفر درصد کیتوزان ($1/29$ کیلوگرم) و بیشترین آن در غلظت ۱۰۰ درصد بامیه و $1/5$ درصد کیتوزان ($2/01$ کیلوگرم) مشاهده شد. افزایش سفتی بافت در حضور پوشش‌های خوراکی را می‌توان به ایجاد لایه مقاوم در سطح سیب‌زمینی توسط کیتوزان نسبت داد که سبب کاهش جذب روغن نیز می‌شود. همچنین اثر هم‌افزایی کیتوزان و موسیلاژ بامیه باعث ایجاد لایه مقاوم شده و در اثر ایجاد پیوند بین آن‌ها سفتی بافت بیشتر شد. این نتیجه با نتایج به‌دست آمده توسط اشرفی یورقانلو و غیبی (Ashrafi Yorganloo & Gheybi, 2019) که از صمغ CMC و موسیلاژ بامیه برای پوشش‌دهی خلال سیب‌زمینی استفاده کرده بودند و قلعه‌شاهی و همکاران (Ghaleshahi et al., 2015) که از صمغ CMC، زانتان و ریحان برای پوشش‌دهی سیب‌زمینی استفاده کرده بودند مطابقت دارد.

رنگ نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار گرفتند. مدل‌های پیش-بینی شده برای شاخص a^* ، L^* و ΔE بر حسب مقادیر واقعی جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

غلظت موسیلاژ بامیه و اثر متقابل غلظت موسیلاژ بامیه و کیتوزان بر شاخص a^* نمونه‌ها در سطح آماری ۹۹ درصد معنی‌دار بودند. با افزایش غلظت موسیلاژ بامیه تا حدود ۶۰ درصد شاخص a^* یا میزان قرمزی نیز به تدریج کاهش یافت که می‌تواند به کاهش تولید رنگدانه‌های واکنش مایلارد ارتباط داده شود. وجود پوشش خوراکی

نمونه پوشش‌دهی شده با صفر درصد موسیلاژ بامیه و ۰/۷۵ درصد کیتوزان (۲۱/۸) و کمترین آن در نمونه پوشش‌دهی شده با ۱۰۰ درصد موسیلاژ بامیه و ۱/۵ درصد کیتوزان (۵/۷۵) مشاهده شد (شکل ۶-ج).

ویژگی‌های حسی

در مورد ویژگی‌های حسی اثر هیچ‌یک از عوامل بر امتیاز رنگ و امتیاز بوی نمونه‌ها معنی‌دار نبود. مدل پیش‌بینی شده برای امتیاز طعم نمونه‌ها یک مدل درجه دوم با ضریب تبیین ۰/۷۸ بود (جدول ۱) و تنها اثر توان دوم کیتوزان ($p < 0.01$) و اثر متقابل غلظت‌های موسیلاژ بامیه و کیتوزان بر امتیاز طعم معنی‌دار بود ($p < 0.05$).

امتیاز مربوط به طعم نمونه‌ها با افزایش غلظت کیتوزان تا ۰/۸۳ درصد افزایش یافت (امتیاز ۴/۸۵) و بعد از آن شروع به کاهش کرد. دلیل کاهش امتیاز طعم در غلظت‌های بالاتر کیتوزان این است که در این غلظت‌ها به علت جذب کمتر روغن، طعم و بوی روغنی که در طعم محصول تأثیر زیادی دارد کاهش می‌یابد. بیشترین امتیاز مربوط به طعم برای نمونه‌های پوشش‌دهی شده با ۱۰۰ درصد موسیلاژ بامیه و ۰/۷۵ درصد کیتوزان (۵/۲۶) و کمترین آن مربوط به نمونه‌های پوشش‌دهی شده با ۱۸ درصد موسیلاژ بامیه و صفر درصد کیتوزان (۳/۷۹) بود (شکل ۷).

در مورد ارزیابی حسی بافت نیز مدل پیش‌بینی شده مدل درجه دوم با ضریب تبیین ۰/۷۶ بود (جدول ۱) که تنها اثر توان دوم غلظت موسیلاژ بامیه ($p < 0.05$) و اثر توان دوم غلظت کیتوزان ($p < 0.05$) معنی‌دار بودند. با افزایش غلظت موسیلاژ بامیه تا ۵۰ درصد امتیاز بافت نمونه‌ها کاهش یافته و بعد از آن افزایش یافت. امتیاز بافت نمونه‌ها با افزایش غلظت کیتوزان تا حدود ۰/۵۵ درصد افزایش و بعد از آن کاهش یافت.

در مورد پذیرش کلی، مدل پیش‌بینی شده معنی‌دار نبود، ولی اثر توان دوم غلظت موسیلاژ و کیتوزان معنی‌دار بودند ($p < 0.05$). امتیاز مربوط به پذیرش کلی تا غلظت ۵۰ درصد موسیلاژ بامیه کاهش و بعد از آن افزایش یافت. با افزایش غلظت کیتوزان تا ۰/۷۵ درصد امتیاز پذیرش کلی افزایش و بعد از آن کاهش یافت.

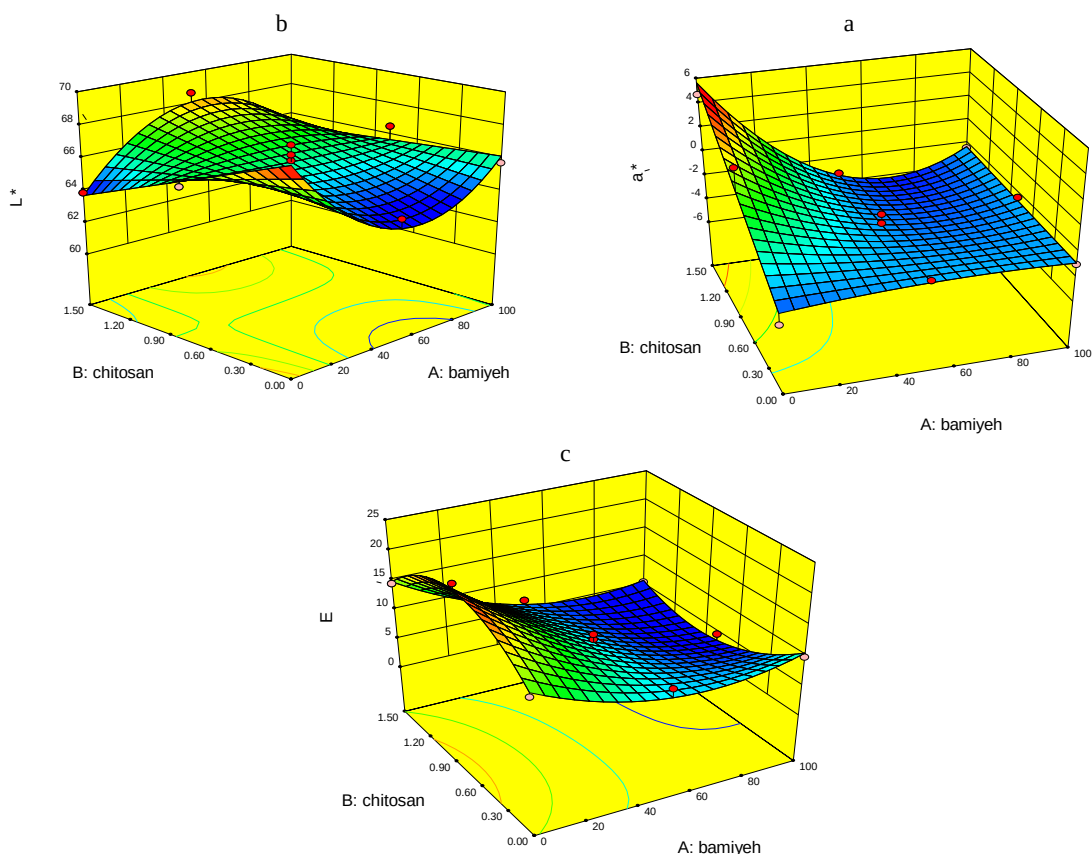
باعث حفظ رطوبت محصول شده و واکنش‌های قهوه‌ای شدن مایلارد در محصول کم می‌شود که این امر منجر به کاهش شاخص قرمزی به دلیل کاهش تولید رنگدانه ملانوییدین می‌گردد (Sabbaghi et al., 2016). اشرفی یورقانلو و غیبی (Ashrafi Yorganloo & Gheybi, 2019) نیز مطابق با نتایج ما نشان دادند که در غلظت بالای موسیلاژ بامیه طیف رنگ سبز نمونه‌های سیب‌زمینی افزایش می‌یابد و در CMC باعث افزایش طیف رنگ قرمز می‌شود. خضری پورعرب و همکاران (Khezripourarab et al., 2017) نیز نشان دادند که پوشش‌خوراکی مالتودکسترین سبب افزایش قرمزی خلال‌های سیب‌زمینی سرخ شده می‌شود.

در مورد اثر متقابل غلظت‌های مختلف موسیلاژ بامیه و کیتوزان بیشترین میزان a^* در غلظت‌های بالای کیتوزان و پایین موسیلاژ بامیه (ناحیه قرمز در شکل ۶-الف) و کمترین آن در ناحیه آبی (شکل ۶-الف) مشاهده شد. بیشترین a^* در غلظت ۱/۵ درصد کیتوزان و صفر درصد موسیلاژ بامیه (۵/۵۵) و کمترین آن در غلظت ۱/۵ درصد کیتوزان و ۷۱ درصد موسیلاژ بامیه (۴/۱۲-) مشاهده شد.

در تحقیق جاری اثر غلظت‌های بامیه و کیتوزان بر شاخص b^* (زردی) معنی‌دار نبود، ولی برخلاف نتایج این تحقیق، اشرفی یورقانلو و غیبی (Ashrafi Yorganloo & Gheybi, 2019) نشان دادند که پوشش‌دهی خلال سیب‌زمینی با افزایش غلظت بامیه و CMC میزان زردی نمونه‌ها افزایش می‌یابد. ترابی و همکاران (Torabi et al., 2017) نیز نشان دادند که با افزایش غلظت سویا و صمغ عربی پوشش دهی چیپس سیب‌زمینی بر میزان زردی نمونه‌ها افزوده می‌شود.

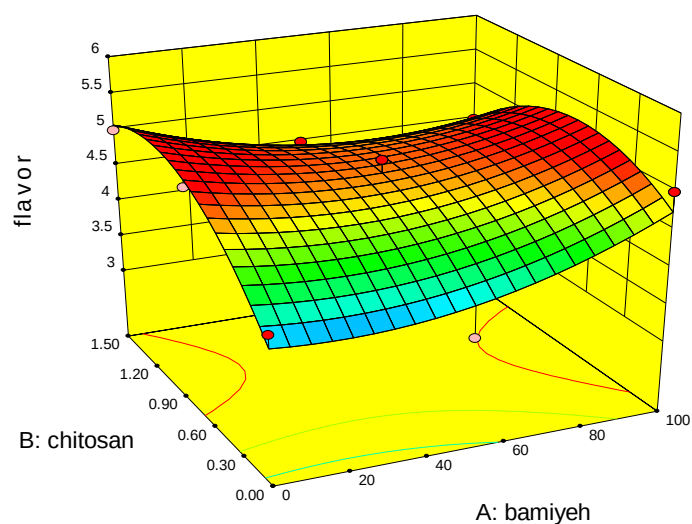
مدل به‌دست آمده برای میزان روشنایی (L^*) نمونه‌ها یک مدل درجه سوم کاهش یافته با ضریب تبیین ۰/۷۸ بود (جدول ۱). همان گونه که در شکل ۶-ب مشاهده می‌شود بیشترین روشنایی در نمونه‌ها مربوط به نمونه شاهد؛ یعنی صفر درصد کیتوزان و صفر درصد موسیلاژ بامیه (۶۸/۵۴) و کمترین روشنایی در نمونه‌های با صفر درصد کیتوزان و ۵۹ درصد موسیلاژ بامیه مشاهده شد (۶۳/۳۷). دلیل کاهش میزان روشنایی محصول با افزایش غلظت کیتوزان و بامیه می‌تواند با توجه به حرارت سرخ کردن و ماهیت کربوهیدراتی این دو صمغ، افزایش واکنش‌های میلارد باشد. این نتایج با نتایج اشرفی یورقانلو و غیبی (Ashrafi Yorganloo & Gheybi, 2019) در مورد صمغ‌های بامیه و CMC و اسماعیل‌پور و حسینی (Eslampour & Hosseini, 2017) در مورد صمغ بادام کوهی و ژلاتین مطابقت داشت.

در مورد میزان تغییر رنگ (ΔE) خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی های پوشش‌دهی شده نسبت به خلال‌های سیب‌زمینی خام مشاهده شد که مدل درجه سوم کاهش یافته پیشنه‌ادی با ضریب تبیین ۰/۹۵ معنی‌دار بود (جدول ۱). بررسی‌ها نشان داد که بیشترین تغییر رنگ در



شکل ۶- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوزان و موسیلاژ بامیه بر (الف) شاخص قرمزی (a^*)، (ب) شاخص روشنایی (L^*) و (ج) شدت تغییر رنگ (ΔE) خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی

Fig. 6. Interaction effect of okra and chitosan concentrations on the (a) redness (a^*), (b) lightness (L^*) and color changes intensity (ΔE) of potato slices



شکل ۷- اثر متقابل غلظت‌های مختلف کیتوزان و موسیلاژ بامیه بر امتیاز طعم خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی

Fig. 7. Interaction effect of okra and chitosan concentrations on the taste (scores) of potato strips

به منظور مشخص کردن بهترین شرایط برای پوشش‌دهی خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی بهینه‌یابی عددی با کمک نرم‌افزار دیزاین اکسپرت صورت گرفت. بهینه‌یابی به‌منظور حداقل کردن مصرف موسیلاژ بامیه و کیتوزان صورت گرفت به‌طوری‌که خلال‌های سرخ‌شده سیب‌زمینی بیشترین پوشش را داشته و کمترین مقدار جذب روغن، عدد پراکسید، عدد اسیدی و تغییر رنگ و بیشترین مقدار رطوبت، امتیاز طعم و بافت را داشته باشند. بر این اساس پوشش‌دهی با ۷۴ درصد بامیه و ۰/۸۹ درصد کیتوزان به‌عنوان روش بهینه برای پوشش‌دهی خلال‌های سیب‌زمینی به‌دست آمد. درصد مطلوبیت این بهینه‌یابی ۷۱ درصد بود که درصد معقولی می‌باشد.

میزان جذب روغن توسط غذاهای سرخ‌شده مختلف یکی از موضوعات تغذیه‌ای جدی در سلامت انسان می‌باشد. در این پروژه اثر دو هیدروکلوئید موسیلاژ بامیه و کیتوزان بر میزان جذب روغن مورد بررسی قرار گرفت، درحالی‌که در کشور گیاهان مختلفی وجود دارند که اثرات صمغ یا موسیلاژ آن‌ها هنوز مورد بررسی قرار نگرفته است.

نصیروند و جوادی (Nasirvand & Javadi, 2018) در بررسی خود روی بادمجان سرخ شده نشان دادند که ویژگی‌های حسی بادمجان سرخ شده پوشش‌دهی شده با کیتوزان مشابه نمونه شاهد بوده و با نمونه فاقد پوشش اختلاف معنی‌داری ندارد. اشرفی یورقانلو و غیبی (Ashrafi Yorganloo & Gheybi, 2019) نیز تفاوت معنی‌داری بین ویژگی‌های حسی نمونه‌های سیب‌زمینی پوشش‌دهی شده با بامیه و CMC پیدا نکردند. حجتی و همکاران (Hojjati et al., 2020) از هیدروکلوئیدهای مختلف برای پوشش‌دهی فالافل سرخ شده استفاده کردند و نشان دادند که با افزایش میزان صمغ از امتیاز طعم فالافل‌ها کاسته می‌شود. آن‌ها در مورد امتیاز بافت و پذیرش کلی فالافل‌های پوشش‌دهی شده نیز نشان دادند که با افزایش میزان هیدروکلوئیدها تردی بافت نمونه‌ها و پذیرش کلی آن‌ها بیشتر می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این پروژه نشان داد که با استفاده از ترکیب مناسب هیدروکلوئیدهای کیتوزان و موسیلاژ بامیه می‌توان جذب روغن در خلال‌های سیب‌زمینی را کاهش داد.

منابع

1. Abramoff, M.D., Magalhães, P.J., & Ram, S.J. (2005). *Image processing with ImageJ Part II. Biophotonics International*, 11(7): 36-43.
2. Alba, K., Ritzoulis, C., Georgiadis, N., & Kontogiorgos, V. (2013). Okra extracts as emulsifiers for acidic emulsions. *Journal of Food Research International*, 54, 1730-1737. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.051>
3. Amirabbasi, S., Elhamirad, A.H., Saeediasl, M.R., Armin, M., & Ziaolhagh, S.H.R. (2021). Optimization of polyphenolic compounds extraction methods from Okra stem. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 717-734. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00641-8>
4. Ashrafi Yorganloo, R., & Gheybi, N. (2019). Effect of okra mucilage and cmc on the oil uptake and physicochemical properties of french fries during deep-fat frying. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 50(1), 203-211. <https://doi.org/10.22059/ijbse.2018.263603.665083>
5. Bouchon, P., Aguilera, J.M., & Pyle, D.L. (2015). Structure oilabsorption relationships during deep-fat frying. *Journal of Food Science*, 68, 2711-2716. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05793.x>
6. Dana, D., & Saguy, I.S. (2006). Mechanism of oil uptake during deep-fat frying and the surfactant effect-theory and myth. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128, 267-27. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.013>
7. Daraei Garmakhany, A., Aghajani, N., & Kashiri, M. (2011). Use of hydrocolloids as edible covers to produce low fat French fries. *Latin American Applied Research*, 41, 211-216.
8. Daraei Garmakhany, A., Aghajani, N., & Dalvi-Isfahan, M. (2021). Optimization of the effect of pectin and carboxymethyl cellulose gums on oil uptake, textural properties and color changes of French fries using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*. 18(116), 39-53. <https://dx.doi.org/10.52547/fsct.18.116.39>
9. Darmadji, P., & Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, 38, 243-254. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90114-7](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90114-7)
10. Debeaufort, F., & Voilley, A. (2009). Lipid-based edible films and coatings. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. 135-168.
11. Eslampour, A., & Hosseini, E. (2017). The effects of coating with bitter almond gum and gelatin on the oil uptake reduction, physical and sensorial properties of deep-fried potato slices. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 12(4), 95-102.

12. Georgiadis, N., Ritzoulis, C., Sioura, G., Kornezou, P., Vasiliadou, C., & Tsiptsias, C. (2011). Contribution of okra extracts to the stability and rheology of oil-in-water emulsions. *Journal of Food Hydrocolloids*, 25, 991-999. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.014>
13. Ghaleshahi, A.Z., Farhoosh, R., & Razavi, S.M.A. (2015). Effect of Basil seed hydrocolloid on the oil uptake and physical properties of potato strips during deep-fat frying. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 11(4), 309-308. <https://doi.org/10.22067/IFSTRJ.V1394I11.38747>
14. Hojjati, M., Mehrnia, M.A., Kakaaghazadeh, A., & Fegghi, S. (2020). Effects of edible hydrocolloids on quality characteristics of the fried falafels emphasize on decreases in oil uptakes. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 14(4), 77-88.
15. Jafari, N., Ziaolhagh, S.H.R., & Nafchi, A.R.M. (2019). Study on the effect of osmotic pretreatment on the quality of air-dried potato sticks using response surface methodology. *Iranian Food Science & Technology Research Journal*, 15(2), 355-367.
16. Juaniz, I., Zocco, C., Mouro, V., Cid, C., & Pena, P. (2016). The Effect of frying process on furan content in foods and assessment of furan exposure of Spanish population. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 549-555. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.061>
17. Karimi, N., & Esmaeilzadeh Kenari, R. (2015). Functionality of Coatings with Salep and Basil Seed Gum for Deep Fried Potato Strips. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2762-9>
18. Khezripourarab, M., Hojjati, M., & Samavati, V. (2017). Effect of maltodextrin coating on properties of french fries using response surface methodology. *Iranian Journal of Food Science and Technology*. 13(60):25-36.
19. Kontogiorgos, V., Margelou, I., Georgiadis, N., & Ritzoulis, C. (2012). Rheological characterization of okra pectins. *Journal of Food Hydrocolloids*, 29, 356-362. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.003>
20. Kpodo, F.M., Agbenorhevi, J.K., Alba, K., Bingham, R.J., Oduro, I.N., Morris, G.A., & Kontogiorgos, V. (2017). Pectin isolation and characterization from six okra genotypes, *Food Hydrocolloids*, 72, 323-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.014>
21. Kumar, D., Tony, D., Kumar, A., Kumar, K., Rao, B., & Nadendla, R. (2013). A review on *Abelmoschus esculentus* (Okra). *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 3, 120-132.
22. Li, X. (1996). The use of chitosan to increase the stability of calcium alginate beads with entrapped yeast cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 23, 269-272.
23. Mellema, M. (2003). Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. *Trends in Food Science & Technology*, 14(9), 364-373. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(03\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(03)00050-5)
24. Nasirvand, L., & Javadi, A. (2018). Effect of chitosan edible coatings on reduce oil uptake in fried eggplant. *Journal of Food Research*, 28(2), 59-68.
25. Sabbaghi, H., Ziaifar, A.M., Sadeghi Mahoonak, A., Kashani-Nejad, M., & Mirzaee, H. (2015). Estimation of convective heat transfer coefficient as function of the water loss rate during frying process. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 11(4), 473-484.
26. Sabbaghi, H., Ziaifar, A.M., Sadeghi, A.R., Kashaninejad, M., & Mirzaei, H. (2016). Kinetic modeling of color changes in french fries during frying process. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 14(1), 65-76.
27. Sabbaghi, H., Ziaifar, A.M., & Kashani-Nejad, M. (2017). Mechanical study for texture degradation of potato strip during frying process. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 13(1), 92-104.
28. Sabbaghi, H., Ziaifar, A.M., & Kashani-Nejad, M. (2018). Fractional conversion modeling of color changes in apple during simultaneous dry-blanching and dehydration process using intermittent infrared irradiation. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 14(2), 383-397.
29. Sabbaghi, H., Ziaifar, A.M., & Kashaninejad, M. (2019). Design of fuzzy system for sensory evaluation of dried apple slices using infrared radiation. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 50(1), 77-89.
30. Sabbaghi, H. (2021). Application of hydrocolloid compounds (xanthan and carboxymethylcellulose) in doughnut formulation for reducing oil uptake. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 17(5), 919-940.
31. Shakouri, S., Tavakolipour, H., Ziaolhagh, S.H.R., & Mortazavi, S.M. (2021). The effect of Blanching, packaging and storage period on moisture content and oil absorption in microwave-dried potato. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 15(81), 431-442.
32. Taghavi, N., Ziaifar, A.M., Mirzaee, H., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., & Sabbaghi, H. (2018). Investigation on effect of coating on the oil uptake during deep fat frying process of traditional sweet Pishmeh. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 14(4), 561-571. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v14i4.56899>
33. Torabi, R., Hojjati, M., Barzegar, M., & Jooyandeh, H. (2017). Effect of hydrocolloid coatings in preventing acrylamide formation and reducing oil uptake in potato chips. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 12(1), 109-120.

34. Van Koerten, K.N., Schutyser, M.A., Somsen, D., & Boom, R.M. (2015). Crust morphology and crispness development during deep-fat frying of potato. *Food Research International*, 78, 336-332. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.022>
35. Varela, P., & Fiszman, S.M. (2013). Hydrocolloids in fried foods. A review. *Food Hydrocolloids*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.016>
36. Xu, K, Guo, M., Roman, L., Pico, J., & Martinez, M.M. (2020). Okra seed and seedless pod: Comparative study of their phenolics and carbohydrate fractions and their impact on bread-making, *Food Chemistry*, 317, 126387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126387>
37. Yadegari, M., Esmaeilzadeh Kenari, R., & Hashemi, S.J. (2017). Investigation of effects of lepidium sativum seed, alyssum homolocarpum and methyl cellulose gums and Compound them on oil uptake and qualitative properties of fried potato during deep frying process. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 69(14), 1-9. <http://fsct.modares.ac.ir/article-۲۴۸۳-۷-fa.html>
38. Ziaolhagh, SH., & Kanani, S. (2021). Extending the shelf life of apricots by using gum tragacanth-chitosan edible coating. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 23(2), 319-331.
39. Ziaolhagh, S., Mazaheri Tehrani, M., Razavi, M., & Rashidi, H. (2017). Roasting process optimization of walnut kernels for the preparation of walnut cream using response surface methodology. *Journal of Nuts*, 8(1), 31-40. <https://doi.org/10.22034/JON.2017.530390>
40. Zimoch-korzycka, A., Ambrozik-Haba, J., Kulig, D., & Jarmoluk, A. (2015). Modification effect of cellulose on the physicochemical characteristic of polysaccharides edible films. *International Journal of Polymer Science*, 10, 265-273. <https://doi.org/10.1155/2015/184616>



Investigating Changes in Color and Shrinkage of Dried Apple Slices Using Image Processing

J. Safari¹, S.J. Hashemi^{2*}, A. Ranjbar Nedamani³

Received: 2022.07.03

Revised: 2022.11.06

Accepted: 2022.11.28

Available Online: 2022.11.30

How to cite this article:

Safari, J., Hashemi, S.J., & Ranjbar Nedamani, A. (2023). Investigating changes in color and shrinkage of dried apple slices using image processing. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 527-540. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.77460.1188>

Introduction

Due to the importance of product appearance quality in product grading and the impact of factors such as area, uniformity, and various defects on the product quality, and also, the ability to recognize these features at a very low cost, image processing techniques, is one of the methods used to evaluate food quality. Therefore, in this study, a non-destructive image processing method was used to investigate the factors affecting the color and shrinkage of apple slices during drying.

Materials and Methods

Golden delicious apples were used in this research. The central part of the apple (including the rivet, seeds, and tail) was removed by a kernel separator and sliced into 3, 5, and 7mm thickness and approximately 7 mm diameter slices using a hand slicer without separating the skin. Three temperatures of 60, 70, and 80 °C were used to dry the samples. To determine the moisture content of a sliced apple, the samples were first weighed on a digital scale, then placed in a dryer, and the experiment was continued until the samples reached equilibrium mass. Due to the high importance of moisture ratio in controlling the drying process, moisture rate (MR) and moisture content (MC) were calculated, and samples were taken to investigate the amount of surface shrinkage, general color changes and browning index. After extracting L*, a*, and b* values, total color changes and browning index (to show the intensity of brown color in the product) for all samples before and after drying were calculated and evaluated to describe color changes after drying.

Results and Discussion

The drying kinetics results showed that the drying process significantly depends on the thickness of the samples. According to drying curves, at the early stages of drying, the decrease in humidity occurs more severely and the graph has a steeper slope, but as the process continues and the moisture content of the product decreases, the slope of the curve decreases. In the early stages of drying, due to the presence of water inside the fresh fruit cells, there is a pressure balance between the fruit and the surrounding environment, which causes the fruit to remain swollen. However, as the drying time progressed, contractile stresses are created, which cause superficial shrinkage. In this study, it was observed that increasing the thickness from 3mm to 7mm, reduced the final shrinkage on the surface of apple slices by 11% at 60 °C, 12% at 70 °C, and 13% at 80 °C. After moisture leaves the surface of the product and heat penetrates into the product, moisture begins to leave the product by conducting interstitial convection. When moisture moves to the surface, the mechanical balance and consequently the textural structure of the sample is disturbed due to the creation of different

1, 2 and 3- M.Sc. Graduated Student of Postharvest Technologies, Associate Professor and Assistant Professor of Biosystem Engineering Department, Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University, respectively.

(*- Corresponding Author Email: j.hashemi@sanru.ac.ir)

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.77460.1188](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.77460.1188)

spaces in thickness. According to the results, increasing drying time and thus decreasing the moisture content, increases the percentage of apple shrinkage. On the other hand, at a certain thickness, with increasing temperature, the percentage of shrinkage changes in the thickness of the product decreases. Therefore, at thicknesses of 3, 5, and 7 mm, the increase in temperature from 60°C to 80°C, decreased the amount of shrinkage thickness by 16, 12, and 8%, respectively. It is in higher thicknesses that react with heat and change the color of the fruit due to the Maillard reaction. After complete drying of apple samples, the highest amount of color change was related to the thickness of 7 mm and a temperature of 80°C, which was equal to 1.254. Also, the lowest rate of discoloration of apple slices in a thickness of 3 mm and a temperature of 60 °C was 0.889. The browning index (Bi) in the high thickness of apple slices is less affected by the process temperature due to the increase in moisture level. For this reason, the rate of browning was very low among the experimental samples and the highest rate of browning was related to the thickness of 7 mm and the temperature of 80 °C was 585/2559. Also, the lowest rate of browning of apple slices was observed in the thickness of 3 mm and the temperature of 60 °C was 584.254.

Conclusion

Finally, it was found that the thickness and temperature factors can have an effect on the quality of product during drying process. The results of this study can provide a cheap and fast way to control the quality of fruits during drying and help producers of these products select the main process factors that affect the final quality.

Keywords: Browning, Drying, Image processing, Machine vision, Shrinkage

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات رنگ و چروکیدگی ورقه‌های سیب خشک‌شده با استفاده از پردازش تصویر

جواد صفری^۱ - سید جعفر هاشمی^{۲*} - آزاده رنجبر ندامانی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۷

چکیده

خشک کردن با هوای داغ به دلیل استفاده از حرارت و طولانی بودن آن، باعث بروز تغییرات فیزیکی و شیمیایی مواد غذایی می‌شود. دما، زمان و ضخامت نمونه می‌تواند بر ویژگی‌های کیفی مانند رنگ و میزان چروکیدگی محصول تأثیر مستقیم داشته باشد. هدف از این مطالعه، بررسی عوامل مؤثر بر رنگ و چروکیدگی ورقه‌های سیب در سطح و ضخامت طی فرآیند خشک کردن با استفاده از روش پردازش تصویر است. سیب زرد لبنانی (گلدن دلشیز) به صورت ورقه‌های دایره‌ای با قطر ۷ سانتی‌متر و ضخامت ۳، ۵ و ۷ میلی‌متری آماده و در سه دمای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد توسط آون هوای گرم خشک شد. تغییرات در ویژگی‌های رنگی و فیزیکی نمونه‌ها از طریق تصویربرداری اندازه‌گیری و توسط نرم‌افزار Image J تجزیه و تحلیل گردید. بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل تصویر، تغییرات کلی رنگ و همچنین چروکیدگی مساحت محصول در سطح معناداری ۵٪، به دما وابسته نبوده و تغییر ضخامت تأثیر بیشتری در رنگ و چروکیدگی محصول داشته است. پس از مقایسه داده‌های به دست آمده، مشاهده شد که افزایش ضخامت هرچند باعث کاهش چروکیدگی در نمونه‌ها می‌شود، اما به دلیل تغییرات رنگی بالا و خشک و لاستیکی شدن بافت، مطلوب نیست. از میان تمام تیمارها، ضخامت ۵ میلی‌متر و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد را از لحاظ درصد چروکیدگی سطحی ۳۳ درصدی و تغییر رنگ کلی ۰/۹۲۲ به عنوان مناسب‌ترین گزینه برای خشک کردن ورقه سیب پیشنهاد شد.

واژه‌های کلیدی: بینایی ماشینی، پردازش تصویر، چروکیدگی، خشک کردن، قهوه‌ای شدن

مقدمه

روی نرخ خشک شدن و همچنین ضریب نفوذ مواد می‌گذارد که از متغیرهای اساسی در فرآیند خشک کردن به حساب می‌آید و یک عامل محدودکننده انتقال جرم (آب) هنگام خشک شدن مواد غذایی محسوب می‌شود. این موضوع سبب افزایش مدت زمان لازم برای خشک شدن می‌گردد (Momenzadeh et al., 2011).

رنگ یکی دیگر از فاکتورهای کیفی مهم در محصولات خشک شده از نظر مصرف کننده است (Zia Alhagh, 2010). تغییر رنگ طی فرآیند، یک پدیده سطحی است که وابسته به دما و زمان فرآیند است. از طرفی دمای سطحی محصول در تشکیل رنگ و واکنش‌های شیمیایی وابسته به آن، اهمیت زیادی دارد. متغیرهای رنگی می‌توانند

یکی از اساسی‌ترین اهداف خشک کردن محصولات کشاورزی، انتقال آب درون بافت جامد محصول به طرف سطح رویه آن تا یک تراز خاص بوده، به طوری که فساد میکروبی و زوال فعل و انفعالات شیمیایی به طور اساسی به حداقل مقدار ممکن برسد (Roostapour, 2015). یکی از مهم‌ترین تغییراتی که در زمان خشک شدن ماده غذایی همراه با خروج رطوبت از ماده رخ می‌دهد، کاهش حجم پوسته خارجی یا چروکیدگی است. چروکیدگی به ساختار بافت و مقدار رطوبت ماده غذایی در طول خشک شدن وابسته است (Rasouli & Seiedlou, 2012). این تغییر ظاهر تأثیرات فراوانی بر

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فناوری‌های پس از برداشت، دانشیار و استادیار گروه مهندسی بیوسیستم، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

(Email: j.hashemi@sanru.ac.ir)

(*)- نویسنده مسئول:

سریع و با کمترین هزینه در طی فرآوری و انبارداری این محصولات حائز اهمیت است (Mohebbi, 2015). لذا در این پژوهش با استفاده از روش غیرتخریبی پردازش تصویر، عوامل مؤثر بر رنگ و چروکیدگی ورقه‌های سیب در سطح و ضخامت طی فرآیند خشک کردن مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سیب زرد لبنانی از شهرستان ساری تهیه و پس از جداسازی نمونه‌های تقریباً هم اندازه جهت کاهش تنفس و فعل‌وانفعالات فیزیکی و شیمیایی، در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حدوداً یک ساعت قبل از شروع آزمایش نمونه را از یخچال خارج کرده و اجازه داده شد تا به دمای محیط برسند. پس از هم‌دما شدن، توسط یک هسته‌گیر قسمت مرکزی سیب (شامل پرچه، دانه‌ها و دنباله) خارج گردید و با استفاده از یک برش دهنده دستی، سیب‌های هم اندازه، بدون جداکردن پوست، به شکل دایره و در ضخامت‌های ۳، ۵ و ۷ میلی‌متر و قطر تقریبی ۷ سانتی‌متر برش داده شد. جهت تعیین رطوبت ورقه‌های برش خورده سیب، ابتدا نمونه‌ها توسط ترازوی دیجیتال (بادقت ۰/۰۰۱ گرم) توزین شده سپس در سه دمای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون هوای گرم اف جی فن‌دار مدل BM55E موجود در آزمایشگاه ماشین‌های صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی ساری قرار داده شد و تا رسیدن نمونه‌ها به یک وزن تقریبی ثابت، درون خشک‌کن باقی ماند. وزن نمونه‌ها بعد از خروج نیز ثبت و طبق فرمول (۱)، رطوبت نمونه‌ها بر اساس وزن مرطوب به دست آمد:

$$MC = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

دراین رابطه MC محتوای رطوبتی (بدون بعد)، m_1 وزن اولیه نمونه‌ها بر حسب گرم و m_2 وزن نهایی نمونه‌ها بر حسب گرم است. نسبت رطوبت در کنترل فرآیند خشک شدن حائز اهمیت است به همین جهت کسر رطوبتی نمونه‌ها پس از خشک شدن، با استفاده از معادله (۲) محاسبه شد:

$$MR = \frac{M - M_0}{M_0 - M_e} \times 100 \quad (2)$$

که دراین رابطه MR کسر رطوبتی (بدون بعد)، M میزان رطوبت در هر لحظه (جرم ماده جامد بر پایه تر / جرم آب)، M_0 رطوبت اولیه ماده (جرم ماده جامد بر پایه تر / جرم آب) و M_e رطوبت تعادلی (جرم ماده جامد بر پایه تر / جرم آب) هستند (Mohabbaty & Ahmadi, 2019).

تحت تأثیر روش خشک شدن قرار گیرند. روش هوای داغ به دلیل زمان طولانی فرایند، بیشترین افت رنگی را در محصولات کشاورزی ایجاد می‌کند (Satorabi et al., 2021). امروزه تمایل به استفاده از نوآوری‌ها و اندازه‌گیری غیرمخرب برای نشان دادن کیفیت مواد غذایی افزایش یافته است. تکنیک پردازش تصویر^۱ یکی از روش‌هایی است که برای ارزیابی کیفیت مواد غذایی استفاده می‌شود (Mohabbaty & Ahmadi Moghadam, 2019). از آنجا که کیفیت ظاهری در درجه بندی محصولات غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است، عواملی چون مساحت، یکنواختی و عیوب مختلف سطحی محصول می‌توانند بر نحوه درجه‌بندی محصول و پذیرش توسط مصرف کننده اثر بگذارند. از طرفی به دلیل هزینه‌های بسیار پایین تشخیص این ویژگی‌ها توسط بینایی ماشین^۲، تکنیک پردازش تصویر یکی از روش‌های غیر مخرب مناسب برای بررسی کیفیت سطحی و فیزیکی محصولات غذایی است (Khorshidi, 2016).

تکامل خصوصیات فیزیکی (چروکیدگی، چگالی و تخلخل) نمونه های سیب به شکل برش استوانه‌ای در حین خشک شدن همرفت بررسی و مشاهده شد که چروکیدگی حجم نمونه‌های سیب رابطه خطی با میزان رطوبت نشان داد (Mbarez & Mihoubi, 2019). سینتیک تغییرات رنگ برش های کدو تنبل در طول خشک کردن توسط هوای گرم همرفتی در دماهای ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد بررسی نشان داده شد که خشک شدن در دماهای بالاتر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد با وجود کاهش زمان فرآیند، منجر به تیره شدن و تغییر رنگ قابل توجه کدو نسبت به برش‌های تازه شد (Onwude et al., 2017). برخی محققین به بررسی تأثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر سینتیک خشک شدن گیلان پرداختند. در این پژوهش از خشک کن هوای گرم خشک کن انجمادی و خشک کن خلاء به کمک فراصوت استفاده شد نتایج نشان داد که خشک کن خلاء به کمک فراصوت، باعث تغییر رنگ و چروکیدگی کمتر شد (Turkmen et al., 2020). در یک مطالعه با استفاده از پردازش تصویر میزان چروکیدگی و تغییر شکل برش‌های سیب هنگام خشک شدن مشخص شد که افزایش دمای هوا موجب افزایش چروکیدگی می‌شود (Yuan et al., 2019). برخی محققین به منظور ارزیابی تغییرات رنگ و چروکیدگی گوجه فرنگی خشک شده از تکنیک پردازش تصویر استفاده کردند و مشاهده شد که با افزایش دما میزان چروکیدگی کاهش یافته و تغییر رنگ بیشتر شد (Mohabbaty & Ahmadi, 2019). با افزایش درخواست مصرف کننده برای محصولات با کیفیت، صنعت غذا وقت و هزینه زیادی برای اندازه‌گیری و کنترل رنگ محصولات صرف می‌کند. بنابراین ایجاد و گسترش یک سیستم برای اندازه‌گیری داده‌های رنگ محصولات غذایی به صورت

اندازه‌گیری چروکیدگی

معادلات مربوط به چروکیدگی سطحی و چروکیدگی ضخامت نیز توسط معادلات ۳ و ۴ به دست آمد:

$$Sh_A = \frac{A_t}{A_0} \quad (3)$$

$$Sh_x = \frac{x_t}{x_0} \quad (4)$$

که در آن Sh_A : درصد چروکیدگی سطحی و Sh_x : چروکیدگی ضخامت بوده و همچنین A_t و A_0 : سطح مقطع در لحظه و سطح مقطع اولیه و x_t و x_0 : ضخامت در لحظه و ضخامت اولیه هستند (Yuan et al., 2019).

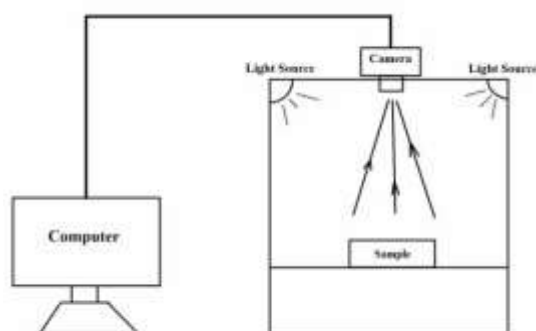
پردازش تصویر

برای تصویربرداری از دستگاه تشخیص رنگ IMG-Pardazesh CAM-System XI موجود در آزمایشگاه مهندسی ماشین‌های صنایع

غذایی گروه مهندسی بیوسیستم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به شماره ثبت اختراع ۷۸۲۱۹ (شرکت ابزارکاران فن پویای شمال - هسته فن‌آور مستقر در مرکز رشد واحدهای فناوری طبرستان - دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری) که متشکل از یک دوربین Microsoft lifecam با کیفیت HD، دو لامپ LED برای روشنایی و محفظه پوشاننده است، استفاده شد (شکل ۱). تهیه تصویر دیجیتال با دستگاه IMG-Pardazesh در شرایط ذیل صورت پذیرفت:

زاویه لامپ‌ها = ۴۵ درجه، میزان روشنایی = ۲۲۰۰ لوکس، ISO = اتوماتیک، ارتفاع دوربین از نمونه = ۳۰ سانتی‌متر و تعداد تصویر در ثانیه = ۳۰ fps

این دستگاه توسط کابل رابط به رایانه متصل بود تا تصویرهای گرفته شده برای مرحله پردازش تصویر در حافظه رایانه ذخیره گردد.



شکل ۱- سیستم تصویربرداری (سمت راست) و نحوه قرارگیری اجزاء و اتصال آن‌ها به رایانه (سمت چپ)

Fig. 1. Imaging system (right hand) and its processing schematic (left hand)

نمونه‌ها قبل و بعد از خشک‌شدن توسط معادلات ۵-۷ محاسبه شده و مورد ارزیابی قرار گرفت (Sabbagi et al., 2018).

$$\Delta E = \sqrt{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2} \quad (5)$$

$$BI = \frac{[100 - (x - 0.31)]}{0.17} \quad (6)$$

$$x = \frac{(a^* + 1.75L^*)}{(5.64L^* + a^* + 3.012b^*)} \quad (7)$$

که در آن، L^* ، a^* و b^* مؤلفه‌های رنگ پس از خشک‌شدن و L_0^* ، a_0^* و b_0^* مؤلفه‌های رنگ قبل از خشک‌شدن می‌باشند (Khorshidi et al., 2017).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به‌دست‌آمده در نرم‌افزار SAS 9.4 و با استفاده از طرح آماری فاکتوریل برای فاکتورهای ضخامت و دما مورد بررسی قرار گرفت. برای

برای بررسی میزان تغییرات ایجاد شده (ΔE) در ویژگی‌های رنگی ماده غذایی طی فرایند خشک‌شدن، از شاخص‌های رنگی استفاده می‌شود. این شاخص‌ها شامل میزان روشنایی یا L^* از رنگ سیاه تا سفید، میزان قرمزی یا a^* از سبز تا قرمز و میزان زردی یا b^* از آبی تا زرد هستند (Gholipour Shahraki & Fazel, 2019). برای اندازه‌گیری از نرم‌افزار Image J استفاده شده است و از آنجایی که تصاویر نمونه‌ها در فضای رنگی RGB هستند، با استفاده از پلاگین color space convertor به فضای رنگی LAB تبدیل شدند. پس از انتقال تصاویر به فضای رنگی LAB، تصاویر را به صورت stacks تبدیل شدند؛ بدین صورت که با استفاده از گزینه Image stacks $\Rightarrow$ stacks $\Rightarrow$ Image تصاویر به stacks تبدیل شدند. پس از استخراج مقادیر L^* ، a^* و b^* ، تغییرات کلی رنگ (معادله ۵) و شاخص قهوه‌ای شدن (BI) (جهت نشان دادن شدت رنگ قهوه‌ای در محصول) (معادله ۶) برای تمامی

آزمون مقایسه میانگین (LSD) نیز از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد.

بحث و نتایج

سینتیک خشک شدن

باتوجه به شکل ۲، رطوبت نمونه‌ها تا زمان رسیدن به رطوبت تعادلی، به صورت نمایی کاهش می‌یابد. در یک ضخامت مشخص افزایش دما موجب افزایش سرعت انتشار و خروج رطوبت از نمونه‌ها گردیده و منحنی‌های به دست آمده از تغییرات رطوبت محصول در واحد زمان دارای روند کاهشی زیادی هستند. به نحوی که در مراحل اولیه خشک شدن کاهش رطوبت با شدت بیشتری رخ داده و نمودار دارای شیب بیشتری است اما با ادامه فرآیند و کاهش میزان رطوبت محصول، شیب منحنی کاهش می‌یابد که در این مرحله محصول وارد مرحله خشک شدن با آهنگ نزولی گردیده است. نقی پورزاده ماهانی و آقی خانی (Naghypour zadeh Mahani & Aghkhani, 2016) هنگام

تحقیق بر روی هویج، تأثیر ضخامت میوه بر روند و زمان خشک شدن آن را بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که افزایش ضخامت میوه باعث افزایش مدت زمان خشک شدن نمونه‌ها در دماها و سرعت‌های مختلف آزمایش می‌گردد که دلیل این نتیجه‌گیری را بالا بودن سرعت خروج رطوبت محصول از طریق فرآیند انتشار سطحی در ابتدای فرآیند و کاهش سرعت فرآیند با گذشت زمان به دلیل خروج رطوبت از فضای موئینه درون محصول عنوان کردند. در نتیجه هرچه قدر ضخامت محصول بیشتر شود، انتقال رطوبت از درون محصول به سطح زمان بیشتری نیاز دارد. همچنین فرهمند و همکاران (Farahmand et al., 2015) هنگام خشک کردن خرمالو، فرزانه و همکاران (Farzan et al., 2017) پس از خشک کردن میوه زالزالک و هنگام خشک کردن لیمو در مورد دمای خشک کن به نتایج مشابهی دست یافتند (Torki et al., 2016). این محققین گزارش دادند که افزایش دما موجب افزایش نرخ خشک شدن و در نتیجه کاهش زمان فرآیند می‌گردد.

جدول ۱- تجزیه واریانس کسر رطوبتی، چروکیدگی سطح و ضخامت، تغییر رنگ و شاخص قهوه‌ای شدن ورقه‌های سیب نسبت به دما، ضخامت و اثر متقابل ضخامت و دما

Table 1- Analysis of variance of apple slices moisture Ratio, surface and thickness shrinkage, color change and browning index according to temperature, thickness and the interaction of thickness and temperature

منبع تغییر Source	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares				
		کسر رطوبتی Moisture rate	چروکیدگی سطح Surface shrinkage	چروکیدگی ضخامت Thickness shrinkage	تغییر رنگ Color change	قهوه‌ای شدن Browning index
دما Temperature	2	0.209**	81.01*	664.634**	0.153634**	0.00001122 ^{ns}
ضخامت Thickness	2	0.393**	819.717**	930.416**	0.014543 ^{ns}	0.00000206 ^{ns}
دما × ضخامت Temperature × Thickness	4	0.014**	6.494 ^{ns}	41.526**	0.097973**	0.00000376 ^{ns}
خطا Error	45	0.003	11.636	1.881	0.007854	0.00000355
Coeff Var	-	32.47	10.07	2.08	8.67	0.0003

*** و * به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد و ۵ درصد را نشان می‌دهند.

**and* show significant differences at the level of 1% and 5%, respectively.

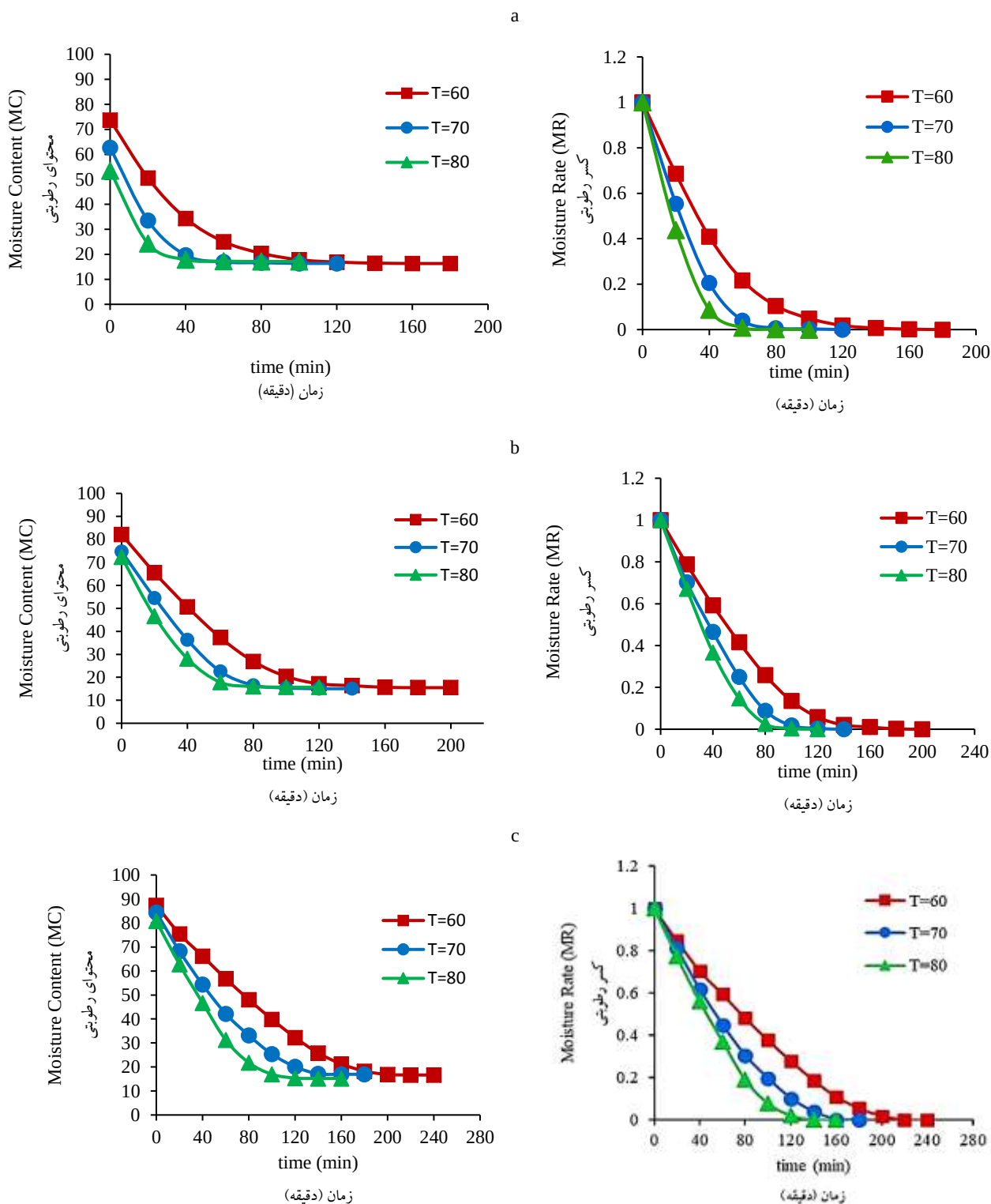
جدول ۲- نتایج آزمون مقایسه میانگین اثر متقابل ضخامت و دما بر کسر رطوبتی در زمان ۸۰ دقیقه

Table 2- Test results comparing the average interaction of thickness and temperature on moisture content at 80min

دما (°C) Temperature (°C)	ضخامت Thickness (mm)		
	3	5	7
60	0.105 ^d	0.258 ^e	0.482 ^a
70	0.006 ^e	0.089 ^d	0.304 ^b
80	0.002 ^e	0.025 ^e	0.19 ^c

*حروف مشابه در هر سطر و ستون عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

*The same letters in each row and column have no meaning.



شکل ۲- منحنی‌های محتوای رطوبتی (MC) و کسر رطوبتی (MR) نسبت به زمان در ضخامت‌های ۳، ۵ و ۷ میلی‌متر (a، b و c) و سه دمای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد

Fig. 2. Moisture Content (MC) and Moisture Rate (MR) with respect to time for samples with thicknesses of 3, 5 and 7 mm (a, b and c) at three temperatures of 60, 70 and 80 °C

باتوجه به نتایج نشان داده شده در **جدول ۱**، اثر مستقل دما و ضخامت ورقه‌های سیب و همچنین اثر متقابل ضخامت و دما (دما $\times$ ضخامت) بر میزان رطوبت خارج شده از نمونه‌ها در زمان ثابت ۸۰ دقیقه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است که باتوجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل ضخامت و دما، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در **جدول ۲** نشان می‌دهد که در مدت زمان ۸۰ دقیقه، بیشترین میزان رطوبت باقی‌مانده در نمونه‌های سیب مربوط به دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ضخامت ۷ میلی‌متر به میزان ۰/۴۸۲ بوده است. همچنین کمترین مقدار رطوبت باقی‌مانده در نمونه‌های سیب مربوط به دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و ضخامت ۳ میلی‌متر به میزان ۰/۰۰۲ به دست آمد.

چروکیدگی سطح

در **جدول ۳** میزان چروکیدگی سطحی یکی از نمونه‌های سیب با ضخامت ۵ میلی‌متر و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد مشخص است که توسط نرم‌افزار ایمیج‌جی پردازش گردیده است. در یک ضخامت خاص، میزان چروکیدگی ورقه‌های سیب با گذشت زمان به دلیل کاهش

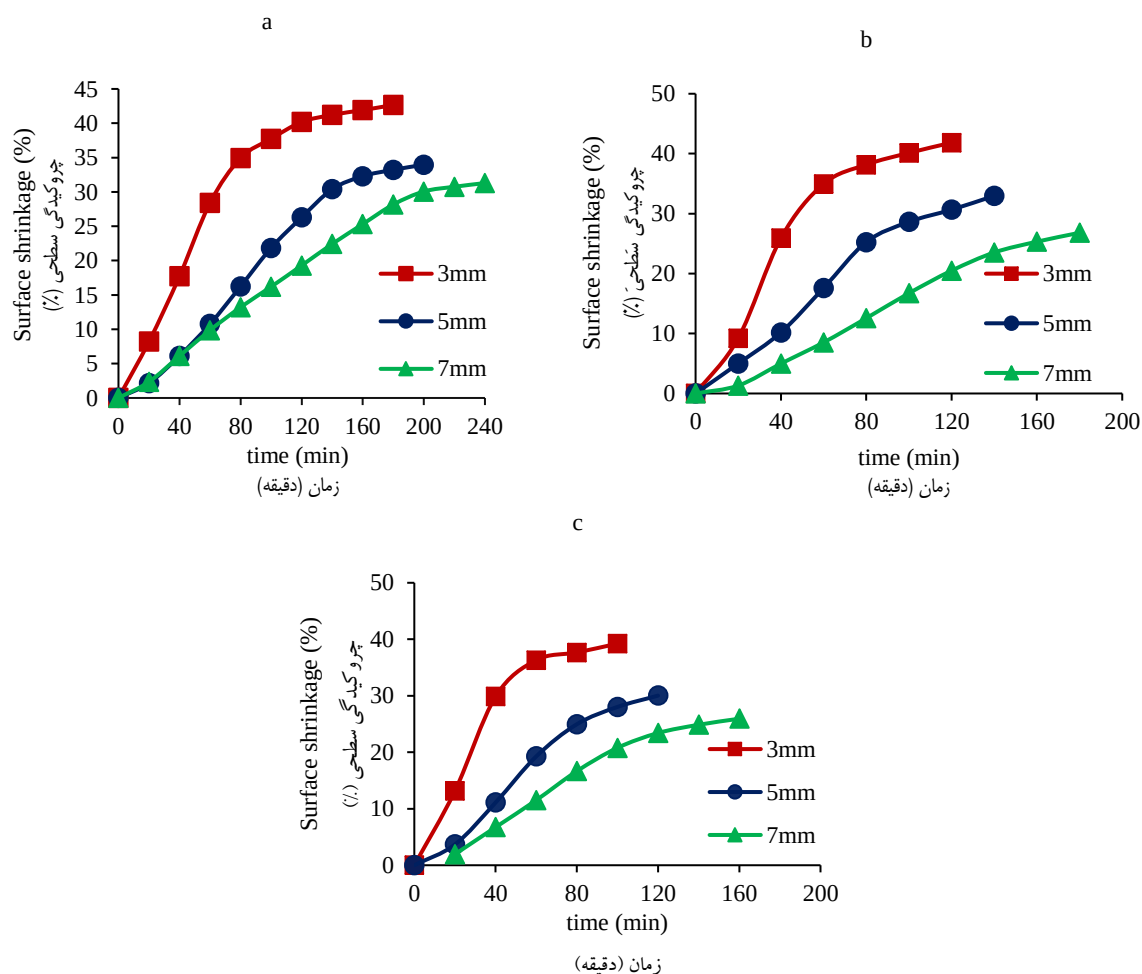
محتوی رطوبت و نیز کاهش فشار داخلی محصول افزایش می‌یابد. به دلیل وجود آب درون سلول میوه تازه، یک تعادل فشار بین میوه و محیط اطراف وجود دارد که باعث متورم ماندن میوه می‌شود. اما با طولانی‌تر شدن زمان خشک‌شدن محصول، به دلیل خروج آب از درون سلول‌ها و کاهش فشار داخلی، باعث ایجاد تغییرات ساختاری منافذ و خلل‌و فرج‌ها و مسیرهای مویینی که تا قبل از این با مولکول آب پر شده بودند گشته که باعث بروز چروکیدگی می‌شود (Taghinezhad et al., 2020). باتوجه به **شکل ۳** مشاهده می‌شود که افزایش ضخامت از ۳ میلی‌متر تا ۷ میلی‌متر، موجب کاهش چروکیدگی نهایی ورقه‌های سیب به میزان ۱۱ درصد در دمای ۶۰ درجه، ۱۲ درصد در دمای ۷۰ درجه و ۱۳ درصد در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد شد.

روستاپور و همکاران (Roosata pour et al., 2015) هنگام بررسی اثر ضخامت و دمای خشک‌کن هوای گرم بر خشک‌شدن سیب زمینی به این نتیجه رسیدند که افزایش ضخامت تأثیر معنی‌داری در کاهش مساحت سیب‌زمینی‌ها داشته و چروکیدگی کمتر گشته است که با یافته‌های این تحقیق مطابقت دارد.

جدول ۳- چروکیدگی سیب در ضخامت ۵ میلی‌متر و دمای ۷۰ درجه در طول روند خشک‌شدن

Table 3- Shrinkage of apples with 5mm thickness during the drying at 70°C

زمان Time (min)	0	20	40	60	80
تصویر رنگی Color image					
تصویر پردازش شده Processed image					
زمان Time (min)	100	120	140		
تصویر رنگی Color image					
تصویر پردازش شده Processed image					



شکل ۳- تغییر چروکیدگی سطحی در سه دمای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد (a، b و c) و سه ضخامت ۳، ۵ و ۷ میلی‌متر بر حسب زمان
 Fig. 3. The changes of surface shrinkage at three temperatures of 60, 70 and 80 °C (a, b and c) and three thicknesses of 3, 5 and 7 mm over drying time

باتوجه به نتایج تجزیه و تحلیل آماری چروکیدگی سطح (جدول ۱)، اثر مستقل هر یک از فاکتورهای ضخامت و دما به ترتیب در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بود؛ اما اثر متقابل آنها بر میزان چروکیدگی سطحی ورقه‌های سیب معنی‌دار نیست. همچنین میزان اثربخشی ضخامت ورقه‌های سیب بر روی چروکیدگی آن‌ها بیشتر از اثر تفاوت دما است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD برای اثر مستقل ضخامت بر روی چروکیدگی نمونه‌ها انجام گرفت. نتایج نشان دادند مقایسه میانگین اثر ضخامت بر تغییر چروکیدگی برای ضخامت‌های ۳، ۵، و ۷ میلی‌متر، به ترتیب ۴۱/۲۴۳، ۳۲/۳۱۷، و ۲۸/۰۱۲ می‌باشد.

چروکیدگی ضخامت

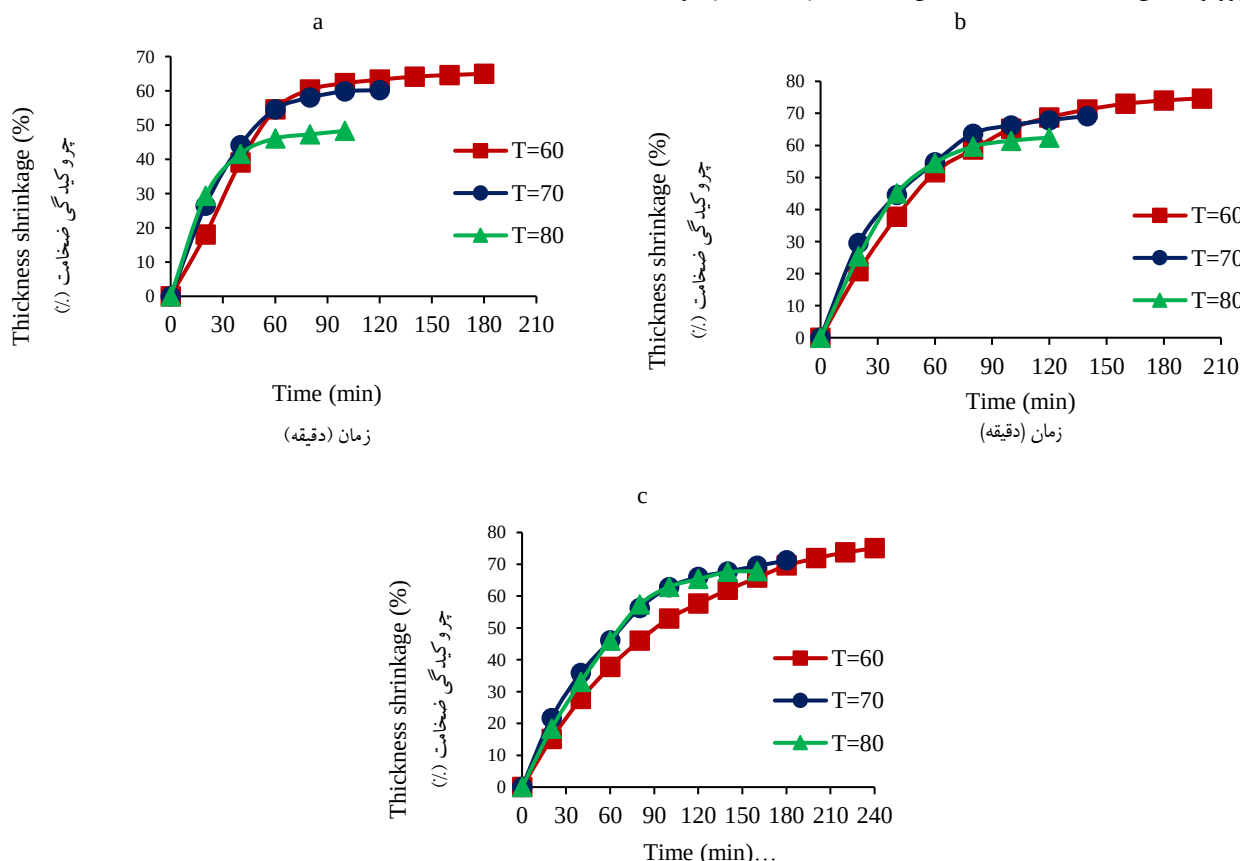
درصد تغییرات چروکیدگی ضخامت ورقه‌های سیب در حین خشک‌شدن بر حسب تابعی از زمان در شکل ۴ نشان داده شده است. باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده از میزان چروکیدگی ورقه‌های سیب،

همچنین خورشیدی و همکاران (Khorshidi et al., 2016) در خشک‌کردن گلابی به وسیله خشک‌کن هوای داغ به این نتیجه رسیدند که خشک‌کردن میوه در دماهای بالاتر علاوه بر کاهش زمان خشک‌شدن محصول، منجر به کاهش درصد چروکیدگی آن نیز می‌شود زیرا با افزایش زمان خشک‌شدن و کاهش رطوبت داخلی، فشار داخل سلول‌ها و منافذ موئینه کاهش یافته که این موضوع منجر به چروکیدگی بیشتر میوه می‌گردد و با افزایش دمای هوای خشک‌کن می‌توان زمان فرآیند و درنهایت میزان چروکیدگی محصول را کاهش داد. با این وجود تقی‌نژاد و همکاران (Taghinezhad et al., 2020) در تحقیق بر روی میوه «به» به این نتیجه رسیدند که افزایش دما موجب افزایش چروکیدگی گردید که با نتیجه این تحقیق مغایرت دارد و دلیل این مغایرت را می‌توان تفاوت ساختاری، محتوای آب و تخلخل بافت میوه «به» عنوان نمود.

در یک توان ثابت به دلیل خروج سریع تر رطوبت از بافت محصول، درصد چروکیدگی ضخامت کاهش می‌یابد که با یافته‌های این تحقیق مطابقت دارد.

باتوجه به نتایج تجزیه و تحلیل آماری میزان چروکیدگی ضخامت ورقه‌های سیب در **جدول ۱**، فاکتورهای دما، ضخامت و اثر متقابل دما و ضخامت در سطح یک درصد معنی‌دار هستند. بر اساس مقایسه میانگین‌ها (LSD) در **جدول ۴**، با افزایش دما از ۶۰ درجه سانتی‌گراد به ۸۰ درجه سانتی‌گراد به دلیل خروج سریع تر رطوبت، میزان چروکیدگی در ضخامت کاهش یافته است. پس از خشک شدن کامل ورقه‌های سیب، کمترین مقدار چروکیدگی در ضخامت نمونه‌ها مربوط به ضخامت ۳ میلی‌متر و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد برابر با ۴۸/۲۷۷ درصد به دست آمد. همچنین بیشترین مقدار چروکیدگی در ضخامت ۷ میلی‌متر و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به میزان ۷۵/۰۳۵ درصد مشاهده گردید.

مشاهده می‌شود که با افزایش زمان خشک شدن و در نتیجه کاهش محتوای رطوبتی، درصد چروکیدگی‌های سیب افزایش می‌یابد. از طرفی، باتوجه به **شکل ۴** مشاهده می‌گردد که در یک ضخامت معین، با افزایش دما درصد تغییرات چروکیدگی در ضخامت محصول کاهش یافته است. از همین رو در ضخامت‌های ۳، ۵ و ۷ میلی‌متر، افزایش دما از ۶۰ درجه سانتی‌گراد به ۸۰ درجه سانتی‌گراد، میزان چروکیدگی ضخامت به ترتیب ۱۶، ۱۲ و ۸ درصد کاهش یافت. می‌توان بیان کرد که پس از خروج رطوبت از سطح محصول و نفوذ گرما به درون آن، رطوبت از طریق هدایت همرفت میان بافتی شروع به خروج از محصول می‌کند. هنگامی که رطوبت به سمت سطح حرکت می‌کند، تعادل مکانیکی و در نتیجه ساختار بافتی نمونه به دلیل ایجاد فضاهاى مختلف در ضخامت به هم می‌خورد. این تنش ناشی از عدم تعادل، منجر به بروز چروکیدگی در ضخامت محصول می‌گردد. طبایی و همکاران (Tabaei et al., 2020) پس از تحقیق بر روی خرما، در خشک کن مایکروویو به این نتیجه رسیدند که کاهش ضخامت برگه‌های خرما



شکل ۴- تغییر چروکیدگی در ضخامت در سه ضخامت ۳، ۵ و ۷ میلی‌متر (a، b و c) و سه دمای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد بر حسب زمان
Fig. 4. The changes in thickness shrinkage at three thicknesses of 3, 5 and 7 mm (a, b and c) and three temperatures of 60, 70 and 80 °C during drying time

جدول ۴- نتایج آزمون مقایسه میانگین اثر متقابل ضخامت و دما بر چروکیدگی ضخامت سیب

Table 4- Test results comparing the average interaction of thickness and temperature on apple shrinkage

دما Temperature(°C)	ضخامت Thickness(mm)		
	3	5	7
60	64.959 ^d	74.694 ^a	75.035 ^a
70	60.172 ^f	69.176 ^c	71.182 ^b
80	48.277 ^g	62.422 ^g	67.812 ^c

حروف مشابه در هر سطر و ستون عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

The same letters in each row and column have no meaning.

تغییرات کلی رنگ

تغییرات کلی رنگ به توصیف میزان تغییر رنگ محصول قبل و پس از اتمام فرآیند خشک کردن می‌پردازد. فاکتورهای ضخامت، دما و اثر متقابل تغییرات ضخامت و دما بر میزان تغییر رنگ نمونه‌ها در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصله معنی‌دار بودن فاکتور ضخامت و اثر متقابل ضخامت و دما را در سطح یک درصد را نشان می‌دهند (جدول ۵). واکنش‌های مربوط به قندهای موجود در میوه‌جات با حرارت تشدید شده و بر اثر واکنش مایلارد رنگ میوه تغییر می‌کند و چون در ضخامت‌های بالاتر مواد قندی بیشتر است و همچنین زمان

بیشتری برای خشک شدن نیاز دارند، قند موجود بیشتر در معرض حرارات قرار گرفته و رنگدانه‌های قهوه‌ای بیشتری بر اثر واکنش مایلارد رخ می‌دهد (Miranda et al., 2009). طبایی و همکاران (Tabaei et al., 2020) در خشک کردن خرمالو نیز به نتایج مشابهی دست یافتند که افزایش ضخامت موجب افزایش تغییر رنگ کلی نمونه‌های آزمایش گشته و دلیل این امر را وجود مواد قندی، پروتئین و آمینو اسیدها در این مواد گزارش کردند که به شدت تحت تأثیر دما تغییر پیدا می‌کنند و افزایش دما و ضخامت محصول، موجب تغییر رنگ قابل توجه در محصول می‌شود که در شکل ۵ نیز این موضوع مشاهده می‌شود.

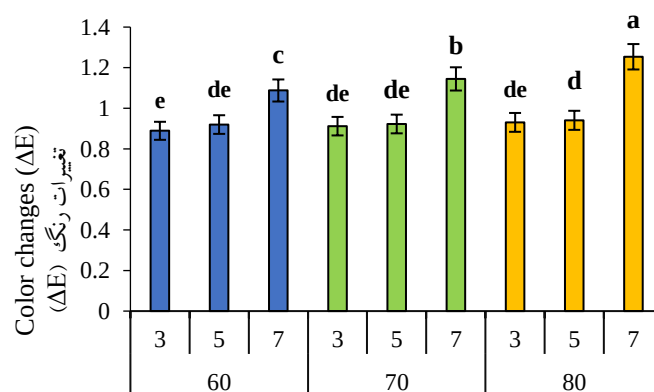
جدول ۵- نتایج آزمون مقایسه میانگین اثر متقابل ضخامت و دما بر تغییر رنگ

Table 5- Test results comparing the average interaction of thickness and temperature on color change

دما Temperature (°C)	ضخامت Thickness (mm)		
	3	5	7
60	0.889 ^e	0.919 ^{de}	1.087 ^c
70	0.912 ^{de}	0.922 ^{de}	1.145 ^b
80	0.93 ^e	0.94 ^d	1.254 ^a

حروف مشابه در هر سطر و ستون عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

The same letters in each row and column have no meaning.



شکل ۵- نمودار میانگین تغییرات رنگ بر حسب ضخامت و دما

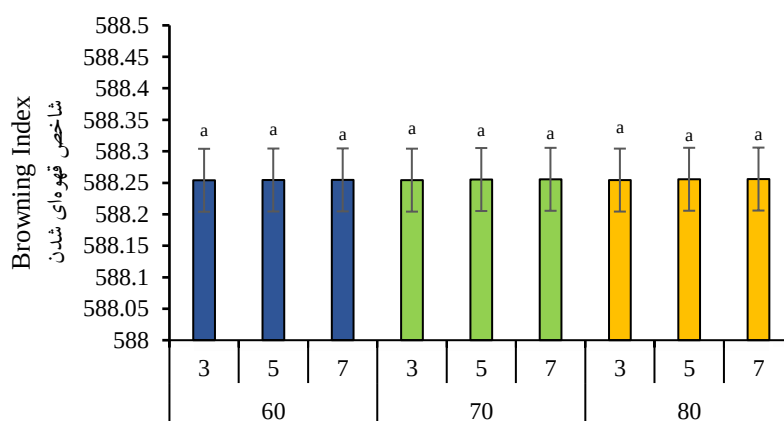
Fig. 5. Average color changes in terms of thickness and temperature

دما و اثر متقابل آن‌ها است. قهوه‌ای شدن در ضخامت‌های بالای سیب، به دلیل افزایش سطح رطوبت، کمتر تحت تأثیر دمای فرآیند قرار می‌گیرد. صباغی و همکاران (Sabbaghi et al., 2018) به نتیجه‌ای مشابه دست یافتند و یافته‌های این تحقیق را مورد تأیید قرار دادند. در حالی که آنوود و همکاران (Onwude et al., 2017) مشاهده کردند که افزایش دما بر میزان قهوه‌ای شدن کدوتنبیل تأثیر معنی‌داری داشته و موجب افزایش میزان شاخص قهوه‌ای شدن کدو تنبل گردید. بر اساس گزارش این محققین، افزایش دما موجب اکسیداسیون، کاروتنوئیدها از جمله بتا کاروتن می‌گردد که افزایش این اکسیداسیون، کاهش میزان a^* و b^* به طور قابل توجهی را به دنبال داشت که موجب افزایش شاخص قهوه‌ای شدن کدوتنبیل شد. علاوه بر این، تولید رنگدانه‌های ملانین و کینون بر اثر اکسیداسیون کاروتنوئیدها را از دیگر عوامل افزایش شاخص قهوه‌ای شدن کدو تنبل در دماهای بالا عنوان کردند. همچنین محبی (Mohebi, 2015) از خشک‌کردن گوجه فرنگی، کاهش شاخص قهوه‌ای شدن نمونه‌ها با افزایش دما را گزارش کرد و دلیل این امر را افزایش تعداد رنگدانه‌های قهوه‌ای در دمای پایین به خاطر افزایش زمان خشک‌شدن محصول عنوان کرد.

باتوجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل ضخامت و دمای هوا بر روی میزان تغییرات رنگ (ΔE)، مقایسه میانگین‌ها (LSD) در جدول ۵ نشان می‌دهد که پس از خشک‌شدن کامل نمونه‌های سیب، بیشترین میزان تغییر رنگ مربوط به ضخامت ۷ میلی‌متر و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد است که برابر با ۱/۲۵۴ به دست آمد. همچنین کمترین میزان تغییر رنگ ورقه‌های سیب در ضخامت ۳ میلی‌متر و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به میزان ۰/۸۸۹ مشاهده گردید.

شاخص قهوه‌ای شدن

شکل ۶ میانگین شاخص قهوه‌ای شدن ورقه‌های سیب در ضخامت و دماهای مورد مطالعه را نشان می‌دهد. باتوجه به **شکل ۶** با افزایش ضخامت نمونه‌ها، شاخص قهوه‌ای شدن افزایش یافته به‌طوری‌که در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین تغییر (حدود ۵۸۸/۲۵۵۹) و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد کمترین تغییر (حدود ۵۸۸/۲۵۴) را نشان می‌دهد. تفاوت معنی‌داری در میزان قهوه‌ای شدن نمونه‌ها مشاهده نگردید و جدول نتایج تجزیه واریانس ارزیابی شاخص قهوه‌ای شدن (Bi) (جدول ۱) نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن اثر هریک از فاکتورهای ضخامت،



شکل ۶- میانگین شاخص قهوه‌ای شدن ورقه‌های سیب بر حسب ضخامت و دما
Fig. 6. Average index of browning of apple slices in terms of thickness and temperature

می‌یابد و در یک ضخامت معین افزایش دما موجب افزایش سرعت انتشار رطوبت گردید. با کاهش ضخامت و افزایش دما، سینتیک خشک‌شدن محصول روند کاهشی را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل تصویر، تغییرات کلی رنگ و همچنین چروکیدگی سطح به دما وابسته نبوده و تغییر ضخامت تأثیر بیشتری در رنگ و چروکیدگی محصول داشته است. پس از مقایسه داده‌ها مشاهده گردید که افزایش ضخامت هرچند باعث کاهش چروکیدگی در نمونه‌ها می‌شود، اما به دلیل تغییرات رنگ بالا و خشک و الاستیکی شدن بافت، مطلوب نیست.

نتیجه‌گیری

امروزه با ورود تکنولوژی‌های غیر تخریبی مانند پردازش تصویر و بینایی ماشینی، بررسی رنگ محصولات خشک شده که نیازمند توسعه روش‌ها، مدل‌ها و درک درست از متغیرهای مورد بررسی است، در صنعت غذا امکان‌پذیر شده است. در این مقاله با استفاده از روش غیر تخریبی پردازش تصویر، اثر ضخامت میوه و دمای فرآیند بر کیفیت رنگی و میزان چروکیدگی نمونه‌های سیب بررسی شد. نتایج نشان داد که رطوبت نمونه‌ها تا حد رطوبت تعادلی، به‌صورت نمایی کاهش

به‌نوعی در این دو فاکتور کیفی اثر قابل ملاحظه‌ای داشته باشند. نتایج این پژوهش می‌تواند روشی ارزان و سریع برای کنترل کیفی میوه‌جات حین خشک‌شدن ارائه کند و به تولیدکنندگان این محصولات در انتخاب فاکتورهای اصلی فرآیند که بر کیفیت نهایی اثر می‌گذارند، کمک نماید.

نهایتاً در مقایسه تیمارها، ضخامت ۵ میلی‌متر و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد از لحاظ حفظ کیفیت بافت، درصد چروکیدگی سطحی (۳۳ درصدی) و تغییر رنگ کلی (۰/۹۲۲) به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار برای خشک‌کردن پیشنهاد می‌گردد. فاکتور ضخامت و دما هر کدام می‌توانند

منابع

- Farahmand, A., Mousavi Baygi, S.F., Taghizadeh, M., & Ziafroughi, M.A. (2015). Quality characteristics of persimmon slices during infrared and hot-air frying. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 11(5), 654-664. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v0i0.32844>
- Farzan, E., Rahimi, M.R., & Madadi Avargani, V. (2017). Drying kinetic and shrinkage study of a Hawthorn sample in a vibro fluidized bed dryer using an adsorption system in order to control of inlet air humidity. *Innovative Food Technologies*, 5(1), 107-122. <https://doi.org/10.22104/jift.2017.508>
- Gholipour Shahraki, P., & Fazel, M. (2019). Effect of edible coating and time and temperature of drying on properties of dried fig. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 15(1), 77-89. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v0i0.68897>
- Khorshidi, Y., Kalantari, D., & Asghari, A. (2017). Investigating the influence of drying temperature and air flow velocity on some qualitative specifications of the sliced pear during drying and employment of image processing technique. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 6(1), 87-102. <https://doi.org/10.22101/JRIFST.2017.05.22.617>
- Mbarek, R., & Mihoubi, D. (2019). Development of physical properties of apple during dehydration. *Periodica Polytechnical Chemical Engineering*, 63(4), 591-599. <https://doi.org/10.3311/PPCh.13033>
- Miranda, M., Maureira, H., Rodriguez, K., & Vegalvez, A. (2009). Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.007>
- Mohabbaty, M.H., & Ahmadi Moghadam, P. (2019). *Determination of wrinkles, water absorption capacity and color changes of tomato slices during drying process*, 2nd International Conference and 6th National Conference on Organic and Conventional Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran.
- Mohebi, S. (2015). *Qualitative evaluation of tomato during drying process using different methods*. The thesis (MS) submitted to the Graduate for the degree of Master of Science in Mechanical Engineering of Biosystems. Department of Mechanical Engineering of Biosystems. Urmia University. Iran.
- Mohsenabadi, M. (2012). *Effect of some enzymatic browning inhibitors on color change in green olive fruits preprocessing*. Master Thesis in Horticulture, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran.
- Momenzadeh, L., Zomorodian, A., & Mowla, D. (2011). Applying artificial neural network for shrinkage prediction of green pea in a microwave assisted fluidized bed dryer. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 6(4), 277-285. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v6i4.9285>
- Naghipour zadeh Mahani, M., & Aghkhani, M.H. (2016). The effect of slicing type on drying kinetics and quality of dried carrot. *Journal of Agricultural Machinery*, 6(1), 224-235. <https://doi.org/10.22067/jam.v6i1.34483>
- Onwude, D.I., Hashim, N., Janius, R., Nawi, N.M., & Abdan, K. (2017). Color change kinetics and total carotenoid content of pumpkin as affected by drying temperature. *Italian Journal of Food Science*, 29(1), 1-18.
- Rasouli, M., & Seiedlou, S. (2012). Brief report: A study of the shrinkage changes and mathematical modeling of garlic (*Allium Sativum* L.) during convective drying. *Journal of Agricultural Machinery*, 2(1), 67-73. <https://doi.org/10.22067/jam.v2i1.14295>
- Roosata pour, O.R., Maftoon Azad, N., & Khalu Ahmadi, A. (2015). Study of drying kinetics and shrinkage of potato slice in a parallel flow dryer. *Journal of Food Science and Technology(Iran)*, 12(47), 109-122.
- Sabbaghi, H., Ziiaifar, A.M., & Kashaninejad, M. (2018). Fractional conversion modeling of color changes in apple during simultaneous dry-blanching and dehydration process using intermittent infrared irradiation. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 14(2), 383-397. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v0i0.62293>
- Satorabi, M., Salehi, F., & Rasouli, M. (2021). Effect of edible coatings on the color and surface changes of apricot slices during drying in infrared system. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 18(112), 21-30. <https://doi.org/10.52547/fsct.18.112.21>
- Seyedabadi, E. (2017). *Numerical modeling of simultaneous mass and heat transfer with shrinkage effect during convective drying of banana*. Ph.D. Dissertation. Faculty of Agriculture. Ferdowsi University of Mashhad. Iran.

18. Tabaei, A., Hazbavi, I., & Shahbazi, F. (2020). Modeling and optimization of persimmon drying using response surface methodology. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 17(98), 109-119. <https://doi.org/10.29252/fsct.17.01.10>
19. Taghinezhad, E., Kaveh, M., Jahanbakhshi, A., & Golpour, I. (2020). Use of artificial intelligence for the estimation of effective moisture diffusivity, specific energy consumption, color and shrinkage in quince drying. *Journal of Food Process Engineering*, 43(4), 1-12. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13358>
20. Torki Harchegan, M., Sadeghi, M., Ghanbarian, D., & Moheb, A. (2016). Dehydration characteristics of whole lemons in a convective hot air dryer. *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering-International English Edition*, 35(3), 65-73. <https://doi.org/10.30492/ijcce.2016.22060>
21. Turkmen, F., Karasu, S., & Karadag, A. (2020). Effects of different drying methods and temperature on the drying behavior and quality attributes of cherry laurel fruit. *Mdpi. Processes*, 8(7), 761-786. <https://doi.org/10.3390/pr8070761>
22. Khorshidi, Y. (2016). *Investigation of drying kinetics of pear fruit slices in a thin layer dryer and their dimensional changes by image processing techniques*. M.Sc thesis of Mechanics of Bio-System Engineering. Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University. Iran.
23. Yuan, Y., Tan, L., Xu, Y., Yuan, Y., & Dong, J. (2019). Numerical and experimental study on drying shrinkage-deformation of apple slices during process of heat-mass transfer. *International Journal of Thermal Sciences*, 136, 539-548. <https://doi.org/10.1016/j.ijthermalsci.2018.10.042>
24. Zia Alhagh, S.H.R. (2010). Determination of the optimum conditions for preparing and drying of potato slices. *Journal of Food Research (University of Tabriz)*, 19(1)(2), 23-36.



Evaluation of Antioxidant Effect of Ethanolic Extract of Aloe Vera Gel on the Stability of Soybean Oil

M. Karami¹, L. Nateghi^{2*}, S. Asadollahi³

Received: 2022.07.08

Revised: 2022.09.01

Accepted: 2022.10.11

Available Online: 2022.10.12

How to cite this article:

Karami, M., Nateghi, L., & Asadollahi, S. (2023). Evaluation of antioxidant effect of ethanolic extract of aloe vera gel on the stability of soybean oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 541-556. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.77602.1189>

Introduction

Oxidation of lipids results in changes that may affect the nutritional quality, wholesomeness, colour, flavour and texture of food. The aim of this study was to investigate the type and amount of phenolic compounds in ethanolic extract of aloe vera gel as a source of natural antioxidant and its effect on the oxidative stability of soybean oil.

Using synthetic antioxidant due to the possibility of toxic and carcinogenic effects is limited. Thus, it is important to find an alternative to synthetic antioxidants by natural antioxidant. Different intrinsic and extrinsic factors may initiate the oxidation of lipids. The initial products of oxidation are tasteless and odorless and after degradation and production of secondary products, the off-flavors and off-odors will appear in edible oils. This is a great concern in food industry, because it decreases the shelf life of food products. Free radicals are produced during chain reactions in lipid oxidation process. To avoid this, synthetic antioxidants are usually used which are sensible to heat and are hazardous to human health and may cause cancer. Polyphenols have antioxidant activity and absorb free radicals. Thus, the vegetable oils rich in polyphenols can affect human health. In this research, we aimed to investigate the application of natural extract of aloe vera gel as a natural antioxidant to avoid soy oil oxidation and to compare it with synthetic antioxidants. The rate of oxidation reaction can be delayed by adding antioxidants. Consumers today tend to use natural antioxidants instead of synthetics. The overall purpose of this study was to investigate the effect of adding ethanolic extract of aloe vera gel as natural antioxidant on improving the stability of soybean oil.

Materials and Methods

The compounds in ethanolic extract of aloe vera gel were determined using GC / MS. The antioxidant activity was evaluated by the method of DPPH. For this purpose, ethanolic extracts of aloe vera gel were added to soybean oil in four different concentrations (500, 1000, 1500, 2000 ppm) and peroxide value, acidity, thiobarbituric acid, total phenol, oxidative stability to Rancimat method, fatty acid profile and sensory evaluation were performed on soybean oil samples and compared with the control sample containing 120 ppm BHA and soybean oil sample without adding antioxidants during 30, 60 and 90 days of storage at 25 ° C.

Results and Discussion

The results showed that by increasing the concentration of aloe vera extracts from 500 to 2000 ppm, the oxidation rate decreases during 90 days of storage, the amount of peroxide, thiobarbituric acid and acidity of soybean oil containing

1, 2 and 3- M.Sc and Associate Professors, Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran, respectively.

(* - Corresponding Author Email: leylanateghi@iauvaramin.ac.ir)

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.77602.1189](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.77602.1189)

2000 ppm ethanolic extract of aloe vera gel was lower than the control sample containing 120 ppm BHA. The total phenol content and free radical scavenging and stability to oxidative degradation by Rancimat method in soybean oil sample containing 2000 ppm aloe vera ethanol extract was higher than soybean oil samples containing BHA120 ppm. Evaluation of sensory properties showed that no significant difference was observed between the sensory properties of the oil sample containing 2000 ppm ethanolic extract of aloe vera gel and the control soybean oil sample of BHA120 ppm.

Conclusion

Considering that the sample of soybean oil containing 2000 ppm ethanolic extract of aloe vera gel had higher phenol content and free radical scavenging and more antioxidant properties than the control sample, it did not differ significantly from the control sample. Qualitative and health properties were selected as the superior treatment. The results of this study showed that the ethanolic extract of aloe vera gel can be used as a natural antioxidant instead of conventional synthetic antioxidants in the oil industry and to prevent oxidative spoilage of the oil in a desirable way. Therefore, it might be employed as a natural antioxidant in foods, particularly those containing edible oils.

Keywords: Aloe vera gel, Antioxidant activity Soybean oil

مقاله پژوهشی

بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا بر پایداری روغن سویا

مرجان کرمی^۱ - لیلا ناطقی^{۲*} - سیمین اسداللهی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۷

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۶/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۹

چکیده

اکسیداسیون چربی‌ها از مهم‌ترین دلایل فساد مواد غذایی به شمار می‌آید. سرعت واکنش اکسیداسیون را می‌توان با اضافه کردن آنتی اکسیدان‌ها به تأخیر انداخت. در این مطالعه اثر آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی آلوئه‌ورا بر پایداری روغن سویا مورد مطالعه قرار گرفت. ترکیبات موجود در عصاره آلوئه‌ورا با استفاده از GC/MS شناسایی شدند. بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی با اندازه‌گیری مقدار ترکیلات فنلی و فلاونوئیدی عصاره اتانولی و آزمون رادیکال‌کنندگی DPPH صورت گرفت و در ادامه عصاره آلوئه‌ورا در چهار سطح (۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ ppm) و آنتی اکسیدان سنتزی BHA، در سطح ۱۲۰ ppm به روغن سویا اضافه و عدد پراکسید، اسیدیته، تیوباربیتوریک اسید و پایداری اکسایشی به روش رنسیمت اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت عصاره‌های آلوئه‌ورا از ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ ppm، فساد اکسیداتیو با روند کندتری طی ۹۰ روز نگهداری در روغن سویا مشاهده گردید. پس از ۹۰ روز نگهداری، میزان عدد پراکسید، تیوباربیتوریک اسید و اسیدیته نمونه روغن سویا حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا از نمونه شاهد که حاوی ۱۲۰ ppm BHA بود کمتر بود. میزان فنل کل و مهار رادیکال آزاد و پایداری به فساد اکسیداتیو به روش رنسیمت در نمونه روغن سویا حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا از نمونه روغن سویا که حاوی ۱۲۰ ppm BHA بود بالاتر بود. با توجه به اینکه نمونه روغن سویای حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا میزان فنل کل و مهار رادیکال آزاد و خصوصیات آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به نمونه شاهد داشت بنابراین نمونه مذکور از نظر خواص کیفی و سلامت بخشی به عنوان تیمار برتر انتخاب گردید.

واژه‌های کلیدی: اثر آنتی اکسیدانی، روغن سویا، ژل آلوئه‌ورا، عصاره اتانولی

مقدمه

اکسایش چربی‌ها در حین نگهداری و فرآوری غذا نه تنها باعث از دست رفتن کیفیت تغذیه‌ای غذا می‌شود، بلکه محصولات حاصل از اکسایش همانند رادیکال‌های آزاد می‌توانند منجر به واکنش‌های نامطلوب شیمیایی نیز شوند. آنتی اکسیدان‌ها از ویتامین‌های محلول در چربی، کاروتنوئیدها و سایر اجزای مغذی موجود در غذاها محافظت می‌نمایند (Bubonja-Sonje et al., 2011).

برای جلوگیری از اکسایش روغن‌ها معمولاً از آنتی اکسیدان‌های سنتزی مانند TBHQ^۴، BHA^۵ و BHT^۶ استفاده می‌شود. این

روغن‌های گیاهی نقش مهمی در تغذیه بشر بر عهده دارند ولی به دلیل داشتن اسیدهای چرب غیراشباع در معرض فساد اکسیداتیو هستند. اکسایش، یکی از واکنش‌های مهم در کاهش ارزش تغذیه‌ای و کیفیت چربی‌ها می‌باشد. اکسایش چربی‌ها می‌تواند تحت تأثیر عوامل داخلی و خارجی متعددی مانند نوع اسید چرب، مقدار و فعالیت آنتی اکسیدانی، نور، دما، فشار اکسیژن، تماس با اکسیژن و فعالیت آبی قرار گیرد.

۱، ۲ و ۳- به ترتیب کارشناس ارشد و دانشجویان، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
(Email: leylanateghi@iauvaramin.ac.ir - نویسنده مسئول)

به خوبی توانسته است شاخص پراکسید و اسید تیوباربیتوریک را کنترل کرده و جایگزین آنتی اکسیدانی های BHA و BHT شود (Rafiei et al., 2011). با توجه به این که تاکنون اطلاعات اندکی در ارتباط با خصوصیات آنتی اکسیدانی ژل آلوهورا و استفاده از آن بعنوان آنتی اکسیدان طبیعی در روغن انجام شده است، لذا هدف از این پژوهش بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی آلوهو را در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی BHA بود.

مواد و روش ها

مواد

برگ آلوهورا مورد استفاده از یک عطاری واقع در تهران خریداری شد و نام علمی آن در هرباریوم دانشگاه تهران به نام *Aloe vera* تایید گردید. روغن سویای تصفیه شده و فاقد آنتی اکسیدان از کارخانه روغن نباتی ورامین، ایران تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی شامل معرف فولین سیو کالتیو، کربنات سدیم، متانول، بوتانول، آلومینیوم کلراید، پتاسیم استات 10^{-4} ، کوئرتستین، دی فنیل پیکریل هیدرازیل، اسید استیک و کلروفرم، یدور پتاسیم، تیوسولفات 0.2 ، نرمال، دی اتیل اتر، فنل فتالئین، هیدروکسید سدیم، هیدروکسید پتاسیم و اسید تیوباربیتوریک از شرکت مرک^۱ آلمان تهیه گردید.

روش آماده سازی ژل آلوهورا

در ابتدا برگ های آلوهورا خریداری شد و پس از شستشو با آب و بریدن آن ها، ژل درون برگ های تازه آلوهورا خارج گردید. ژل بدست آمده به منظور جداسازی فیبرها، در 4000°C دور و به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ گردید (Ayoubi et al., 2013).

استخراج عصاره اتانولی از ژل آلوهورا

ژل های آلوهورا در آون 60°C درجه سانتی گراد خشک و به پودر تبدیل شدند. سپس عصاره اتانولی پودر ژل آلوهورا به روش غوطه وری مطابق با روش (Tiwari et al., 2011) با اندکی تغییر استخراج شد. ۵۰ g پودر ژل آلوهورا در ۲۵۰ ml اتانول ۹۶٪ به مدت یک شبانه روز با استفاده از دستگاه همزن مغناطیسی در دمای اتاق همزده شد. عصاره حاصل با کاغذ واتمن شماره یک صاف گردید. سپس حلال با استفاده از دستگاه اواپراتور چرخان تحت خلاء در دمای کمتر از 40°C حذف شد و عصاره آلوهورا تا غلظت ۲۱ mg/ml تغلیظ شد. سپس عصاره اتانولی بدست آمده در یک ظرف شیشه ای پوشیده شده با فویل آلومینوم ریخته شده و تا زمان استفاده بعدی در دمای یخچال نگهداری گردید.

آنتی اکسیدان ها فرار و حساس به گرما بوده و استفاده از آنها سلامتی انسان را تهدید کرده و باعث بروز سرطان می شوند. استفاده از این ترکیبات در مواد غذایی روز به روز محدودتر شده و بررسی جایگزین های طبیعی منجر به شناسایی آنتی اکسیدان های طبیعی از منابع گیاهی شده است (Wang et al., 2008). امروزه استفاده از ترکیبات فنولی موجود در گیاهان را می توان به عنوان یکی از بهترین منابع ضد اکسایشی طبیعی نام برد. پلی فنول ها ترکیبات آنتی اکسیدانی هستند و قادرند رادیکال های آزاد را جذب نمایند. با توجه به فوایدی که پلی فنول ها در سلامتی انسان دارند، روغن های گیاهی غنی از پلی فنول ها می توانند در افزایش سلامت بشر نیز تاثیر گذار باشد (Salta et al., 2007).

آلوهو را با نام علمی *Aloe vera* گیاهی متشکل از 96 درصد آب و 4 درصد ماده خشک می باشد. ترکیباتی که در ژل آلوهو را یافت شده اند، از جمله ترکیبات پلی ساکارییدی هستند که قادر به کاهش و ترمیم التهاب هستند. این ترکیبات همچنین دارای خاصیت ضد میکروبی نیز هستند. آلوهورا دارای بیش از ۷۵ ماده مغذی، ۲۰۰ ترکیب فعال، ۲۰ نوع ماده معدنی، ۱۸ نوع آمینو اسید و ۱۲ نوع ویتامین (از جمله E، C، B12، B6، B2، B1 و A فولیک اسید و نیاسین) بوده و ترکیباتی نظیر آلوئین، فامودین، آنتراکینون، ایزوباربالوئین در آن موجود است. کلسیم و آلوئین نیز در آلوهو را موجود هستند، آلوئین میلینی بسیار قوی است. ویتامین های موجود در آلوهو را E، C، B12، B6، B2، B1 و A فولیک اسید و نیاسین می باشد. مواد معدنی که در آلوهو را یافت می شود و شامل کلسیم، سدیم، آهن، پتاسیم، کروم، منگنز، مس و روی می باشد که همگی برای سلامتی بسیار حیاتی می باشند. آنزیم هایی نظیر آمیلاز و لیپاز که برای کاهش چربی و قند خون مفیدند، در این گیاه موجود است. از قندهای موجود در این گیاه منو و پلی ساکاریدها نظیر گلوکوز و مانوز را می توان نام برد (Joseph, 2010).

در پژوهشی فعالیت آنتی اکسیدانی برگ سنا را بر پایداری روغن سویا بررسی کرده و نشان دادند که غلظت ۷۵۰ ppm عصاره متانولی برگ سنا کارایی خوبی در کند نمودن روند اکسایش روغن سویا دارد (Parizan et al., 2011). در پژوهش دیگری اثر آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی هسته انار را بر روغن سویا مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که غلظت ۳۵۰ ppm عصاره هسته انار دارای اثر آنتی اکسیدانی مشابه غلظت ۲۰۰ ppm آنتی اکسیدان های سنتزی می باشد (Samad Louei et al., 2007). در پژوهش دیگری ویژگی های آنتی اکسیدانی عصاره برگ زیتون در روغن آفتابگردان را بررسی نمودند. آنها در این بررسی نشان دادند که عصاره متانولی برگ زیتون در سطح ۱۰۰۰ ppm

توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV2100/VIS T80+ (spectrophotometer، آمریکا) قرائت گردید. کوئرتستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. مقدار فلاونوئید براساس میزان میلی گرم معادل کوئرتستین در گرم نمونه خشک بیان شد (Chang et al., 2002).

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

توانایی آنتی اکسیدانی عصاره‌های آلوئه‌ورا از طریق بی رنگ شدن محلول اتانولی DPPH اندازه‌گیری گردید. در این روش به عنوان ترکیبات رادیکالی از DPPH به عنوان معرف استفاده گردید (Yao et al., 2013). بدین ترتیب که ۵۰ µl از غلظت‌های مختلف اسانس در اتانول به ۵ ml محلول ۰/۰۰۴ درصد DPPH در اتانول اضافه گردید. بعد از ۳۰ min گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ nm در برابر شاهد قرائت شده و درصد مهار شدن رادیکال‌های آزاد با استفاده از معادله ۱ محاسبه گردید.

$$DPPH = \frac{\text{درصد جذب نمونه} - \text{درصد جذب شاهد}}{\text{درصد جذب شاهد}} \times 100 \quad (1)$$

آماده‌سازی نمونه‌های روغن سویا

عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا استخراج شده در چهار سطح (ppm ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰) و آنتی اکسیدان سنتزی BHT در سطح (ppm ۱۲۰) به روغن سویای بدون آنتی اکسیدان که در شیشه‌های تیره رنگ ریخته شده بودند اضافه شد و درب شیشه‌ها بسته شد سپس نمونه‌ها به همراه نمونه شاهد (روغن سویا بدون آنتی اکسیدان) به مدت ۲۰ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ نگهداری آزمون‌های روغن شامل (عدد پراکسید، اسیدیته، تیوباریتوریک اسید و رنسیمت) انجام و نمونه‌های روغن سویا حاوی عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا با نمونه روغن سویا حاوی آنتی اکسیدان BHT و روغن سویا بدون آنتی اکسیدان مقایسه گردید.

آزمون‌های روغن سویا

تعیین عدد پراکسید

در این روش مقدار ۵ گرم نمونه آماده شد در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری وزن گردید و ۳۰ میلی‌لیتر حلال (مخلوط اسید استیک و کلروفرم) به آن اضافه شد، سپس حدود ۰/۵ میلی‌لیتر یدور پتاسیم به آن اضافه گردید و مخلوط به مدت یک دقیقه ساکن گذاشته و گاهی هم‌زده شد، سپس حدود ۳۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و مخلوط به مدت یک دقیقه ساکن گذاشته و چند قطره چسب نشاسته به محلول اضافه و با محلول تیوسولفات ۰/۰۲ نرمال تیترو گردید. وقتی

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی عصاره آلوئه‌ورا

برای آنالیز اسانس، دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل Agilent Technologies 7890A، ساخت کشور آمریکا) و طیف‌سنج جرمی (مدل Agilent Technologies 5975C، ساخت کشور آمریکا) با ستون دستگاه (Agilent Technologies Inc. HP-5MS، ساخت کشور آمریکا) که از نوع موئینه با طول ۳۰ m، قطر ۰/۲۵ mm که لایه فاز ساکن در آن ۰/۲۵ µm میکرون می‌باشد مورد استفاده قرار گرفت. برنامه ریزی حرارتی از ۵۰ C° تا ۲۷۰ با افزایش دمای ۳ C° در دقیقه بود. درجه حرارت محفظه تزریق ۲۸۰ C° بود. گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با درجه خلوص بالا مورد استفاده قرار گرفت. انرژی یونیزاسیون ۷۰ eV بود. شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره با استفاده از شاخص‌های بازدارندگی و بررسی طیف‌های جرمی ترکیبات و مقایسه آن‌ها با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه‌های رایانه‌ای و مراجع معتبر صورت گرفت (Singh et al., 2005).

آزمون‌های انجام شده بر روی عصاره‌ها

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیب‌های فنولی

محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیوکالتیو انجام شد. غلظت ۱ mg/ml از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ ml از هر غلظت از عصاره با ۲/۵ ml واکنشگر فولین سیو کالتیو مخلوط شده و به مدت ۵ min هم زده شد. سپس ۲ ml محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ g/l اضافه گردید. جذب نمونه‌ها پس از ۲ h در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش T80+ (UV2100/VIS spectrophotometer، آمریکا) در ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک بیان گردید. به این صورت که میانگین جذب حاصل در معادله خط به دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شده و نتیجه به عنوان محتوای تام فنولی عصاره به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد سه بار تکرار شد (Ebrahimzadeh et al., 2008).

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی

مقدار کل ترکیب‌های فلاونوئیدی موجود در عصاره آلوئه‌ورا از طریق رنگ سنجی اندازه‌گیری گردید. ۰/۵ ml از عصاره درون لوله آزمایش در ۱/۵ ml متانول حل شد و سپس ۰/۱ ml آلومینیوم کلراید ۱۰٪ و ۰/۱ ml از محلول پتاسیم استات ۱ مولار به آن اضافه گردید. در نهایت ۲/۸ ml آب مقطر به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ min در دمای اتاق نگهداری شد و جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ nm

که رنگ نمونه به یک حالت شفاف و زلال رسید تیتراسیون متوقف شد و عدد پراکسید بر حسب میلی اکسی آلان بر کیلوگرم با استفاده از معادله (۲) زیر محاسبه شد (Selmi et al., 2011).

$$(2) \quad \text{حجم تیتراسیون مصرفی} \times \text{نرمالیت} \times 1000 = \frac{\text{عدد پراکسید}}{\text{حجم نمونه}}$$

تعیین عدد اسیدیته

۲۰ میلی لیتر اتانول و ۲۰ میلی لیتر دی اتیل اتر در یک ارلن مایر ریخته و ۵ قطره فنل فتالین به آن افزوده شد و خوب مخلوط گردید. ۵ گرم نمونه روغن را در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری دیگر وزن گردید و حلال فوق به آن افزوده شد. محتویات ارلن را با هیدروکسید سدیم یا هیدروکسید پتاسیم ۰/۱ یا ۰/۰۱ نرمال تا ظهور رنگ صورتی کم رنگ که به مدت ۱۵ ثانیه پایدار بود تیتراژ نموده و حجم قلیای مصرفی یادداشت شد. نمونه شاهد نیز از طریق تیتراسیون حلال (بدون حضور نمونه روغن) با هیدروکسید سدیم یا هیدروکسید پتاسیم ۰/۱ یا ۰/۰۱ نرمال تا ظهور رنگ صورتی کم رنگ انجام پذیرفت و از طریق معادله (۳) اندیس اسیدی محاسبه گردید (Javadi et al., 2015).

$$(3) \quad \text{عدد اسیدی} = \frac{(A-B) \times N \times 56.1}{W}$$

A: حجم قلیای مصرفی در تیتراسیون نمونه (میلی لیتر)

B: حجم قلیای مصرفی در تیتراسیون شاهد (میلی لیتر)

N: نرمالیت قلیای مصرفی

W: وزن نمونه (گرم)

تعیین عدد تیوباربیتوریک اسید (TBA)

اندازه گیری این شاخص با استفاده از بوتانول به عنوان حلال و در حضور معرف اسید تیوباربیتوریک در طول موج ۵۳۰ نانومتر انجام گرفت. در ابتدا ۲۰۰ میلی گرم نمونه روغن در بالن ۲۵۰ میلی لیتری وزن شد سپس با بوتانول به حجم رسانده شد و به طور کامل توسط همزن مخلوط گردید. ۵ میلی لیتر از محلول نمونه با ۵ میلی لیتر محلول واکنش گر تیوباربیتوریک (حل کردن ۲۰۰ میلی گرم از پودر TBA در ۱۰۰ میلی لیتر حلال بوتانول و سپس صاف کردن آن) مخلوط شد و به مدت دو ساعت در یک حمام بخار با دمای ۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از اتمام این مدت، لوله آزمایش با استفاده از جریان آب به مدت ۱۰ دقیقه سرد گردید. میزان جذب محلول در طول موج ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (شامل حلال و محلول واکنش گر) اندازه گیری گردید (Selmi et al., 2011).

اندازه گیری شاخص پایداری اکسایشی (آنزیم رنسیمت)

پایداری اکسایشی (دوره اکسایش کند) با استفاده از دستگاه رنسیمت مدل Metrohm 743 (ساخت کشور سوئیس) در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس به میزان ۲/۵ g نمونه و دبی هوای ۲/۵ ml/min اندازه گیری گردید. در این آزمون ابتدا جریان هوای خالص از داخل نمونه عبور داده شد تا به دمای تعیین شده برسد. گازهای آزاد شده در طی فرآیند اکسیداسیون همراه با هوا از داخل یک فلاسک حاوی آب عاری از مواد معدنی، با تقطیر شده عبور گردید. این فلاسک دارای یک الکتروود به منظور اندازه گیری هدایت الکتریکی بود که به یک وسیله ثبات و اندازه گیری متصل بود. پایان مدت زمان القا نشان داد که در چه مدت زمانی هدایت الکتریکی به سرعت افزایش یافت. این روند سریع افزایش به دلیل تجمع اسیدهای چرب فرار تولید شده طی فرآیند اکسیداسیون بود (Farhoosh, 2007).

تجزیه و تحلیل داده ها

تجزیه و تحلیل نتایج به روش آنالیز واریانس یکطرفه و مقایسه میانگین توسط روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد به وسیله نرم افزار مینی تب ۱۶ انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی ترکیبات فرار عصاره اتانولی ژل آلوئه ورا

براساس نتایج به دست آمده همانطور که در جدول ۱ مشاهده می گردد ۲۰ نوع ترکیب فنی در عصاره اتانولی ژل آلوئه ورا شناسایی گردید. که بیشترین میزان مربوط به ترکیبات مونوترپن های اکسیژن دار مثل کاروون (۱۵/۱۰٪)، و پس از آن متعلق به سیتوسترول (۹/۳۶۶٪) و کمترین میزان ترکیبات عصاره اتانولی ژل آلوئه ورا متعلق به ۷- تترادکان (۱/۰۰۰٪) بود. در تأیید نتایج بدست آمده، محققین به بررسی اثرات عصاره آلوئه ورا بر شاخص های رشد، ترکیب لاشه و فلور باکتریایی روده تاسماهی سبیری (*Acipenser baerii*) پرداختند (Bazari Moghadam et al., 2016) و با توجه به تنوع ترکیبات موجود در برگ آلوئه ورا و ویژگی های خاص هر یک از ترکیبات نظیر نقطه جوش متفاوت، از دو روش کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین ترکیبات شامل آلوتین^۲، اسکپولتن^۳، لیمونن^۴، n-هگزادکانوئیک اسید^۵، کاروون^۶ و کاماریک اسید^۷ بود.

5- n- Hexadecanoic acid

6- Carvone

7- Comaric acid

1- Thiobarbituric acid

2- Aloin

3- Squalene

4- Limonene

همچنین نوع ترکیبات عمده و درصد آن‌ها در اسانس مورد مطالعه، در مقایسه با سایر بررسی‌های انجام گرفته متفاوت است که می‌تواند به شرایطی نظیر نوع کشت، شرایط خاک، آب و هوا، زمان برداشت، مدت زمان نگهداری، عصاره‌گیری از اندام‌های مختلف و در نهایت تفاوت ژنتیکی گیاه وابسته باشد.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی عصاره ژل آلوئه‌ورا

Table 1- Chemical composition of aloe vera gel extract

ترکیبات Compounds	میزان (درصد) Level	زمان بازداری Retention time (min)
Paraoxin	5.666±0.041	3.10
1, 5 Hepta DN- 4- N	1.366±0.047	3.86
Tricycline	1.166±0.057	7.86
Tridekan	3.200±0.000	8.33
2-Hydroxyethyl propionate	1.466±0.056	11.16
8-Methyl octa-hydro coumarin	1.233±0.050	12.95
Hexadecanoic acid methyl ester	4.033±0.052	16.56
Hexa decanoic acid	9.166±0.054	18.1
7-Tetradekan	1.000±0.000	19.92
Methyl eruption	2.266±0.051	20.43
Lopeol	1.366±0.044	20.62
Pirokaktol	9.166±0.046	21.15
Oleic acid	6.866±0.048	21.96
Cinnamic acid	3.266±0.052	22.78
15,12,9- Octa-de-tri-anoic acid methyl ester	5.066±0.055	23.66
Paracoumaric acid	8.733±0.053	24.82
Skovaln	8.033±0.046	31.67
Octadecan, 2- Methyl ester	2.466±0.040	33.2
Karron	15.100±0.048	36.78
Cytosterol	9.366±0.049	39.2

رادیکال DPPH افزایش می‌یابد. طی تحقیقی محتوای فنولی در عصاره‌های ریحان، برگ بو، جعفری، سروکوهی، تخم بادیان رومی، رازیانه، زیره، هل و زنجبیل مورد بررسی قرار گرفته و بیان نمودند عصاره‌های مربوط به ریحان و برگ بو، بیش‌ترین فعالیت ضد اکسایشی را در مقایسه با سایر گیاهان تحت بررسی دارا می‌باشند که به دلیل بالابودن میزان ترکیبات فنلی در این عصاره‌ها بود (Hinneburg et al., 2006). همچنین در پژوهش دیگری به‌ترتیب با افزودن ژل آلوئه‌ورا به نوشیدنی انگور- زنجبیل (Sasi Kumar et al., 2013) و خربزه درختی (Boghani et al., 2012) افزایش قابل توجه در زمان ماندگاری محصول را مشاهده کردند و علت آن را ترکیبات آنتی اکسیدانی و فلاونوئیدی (که دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشند) موجود در ژل آلوئه‌ورا دانستند. طی بررسی غنی‌سازی نکتار نارنگی با ژل آلوئه‌ورا (Bhargawa et al., 2014) افزایش ارزش تغذیه‌ای نوشیدنی حاصل را گزارش کردند که علت آن را ترکیبات آنتی اکسیدانی و فنولی موجود در آلوئه‌ورا بیان نمودند.

خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا

ارزیابی خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا در جدول ۲ نشان داده شده است. مطابق با نتایج میزان فنل کل عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا (۱۹۲/۶۷۷ mgGAE/g)، قدرت مهارکنندگی رادیکال (۸۶/۵۳۳ µg/ml) و میزان فلاونوئید (۱۵۱/۹۰۰ mg QE/g) گزارش شد.

با افزایش غلظت یا درجه هیدروکسیلاسیون ترکیبات فنولی، فعالیت مهار رادیکال DPPH افزایش می‌یابد که به‌عنوان فعالیت آنتی اکسیدانی تعریف می‌شود. این روش در غلظت‌های بسیار کم نیز قابل استفاده است که به دلیل حساسیت زیاد رادیکال DPPH، به ترکیبات اهداءکننده هیدروژن می‌باشد که باعث تبدیل آن به فرم غیررادیکالی و کاهش جذب در ۵۱۷ نانومتر می‌گردد. با افزایش غلظت ترکیبات فنولی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط و در نتیجه افزایش احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال آزاد، فعالیت مهار

جدول ۲- بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی ژل آلوه ورا
Table 2- Investigation of antioxidant properties of ethanolic extract aloe vera gel

Total phenol (mg/g)	192.667±0.025
فنل کل (میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره)	
DPPH radical inhibitory power (μg / ml)	86.533±0.451
مقدار قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH (میکروگرم / میلی لیتر)	
The amount of flavonoids in aloe vera gel extract (mg QE/g)	151.900±0.361
مقدار فلاونوئید در عصاره ژل آلوه ورا (میلی گرم بر گرم)	

نتایج میزان اسیدیته روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوه ورا

عدد اسیدی یکی از معیارهای شیمیایی مفید برای تعیین شدت تجزیه روغن است. به هر حال، عدد اسیدی معرف اسید چرب آزاد می‌باشد که این اسیدهای چرب به سرعت اکسید می‌شوند و اکسایش اسیدهای چرب غیراشباع دیگر را نیز از طریق فعال‌سازی و انحلال کاتالیزورهای فلزی افزایش می‌دهند (Shahidi, 2005). میزان اسیدیته روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوه ورا در جدول ۳ گزارش شده است. عدد اسیدی با گذشت زمان روند افزایشی داشت به‌طوری‌که بعد از ۹۰ روز نگهداری، بالاترین میزان اسیدیته (۱/۱۳۳ KOH/g) متعلق به نمونه روغن سویای شاهد و پائین‌ترین میزان اسیدیته (۰/۱۴۶ mg/KOH) متعلق به نمونه روغن سویا حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره اتانولی آلوه ورا بود که علت آن می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی

بالا در عصاره اتانولی آلوه ورا باشد که مانع از اکسیداسیون در روغن می‌گردند. در این راستا محققین پس از بررسی اثر عصاره گیاه اناریچه بر پایداری روغن کانولا، بیان کردند که میزان عدد اسیدی نمونه های حاوی عصاره اناریچه تقریباً مشابه با نمونه حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی بود و طی دوره نگهداری میزان عدد اسیدی همه نمونه‌ها افزایش یافت (Salehi et al., 2014). همچنین اسفندیارفر و ضیاءالحق (Esfandiari & Ziaolhagh, 2021) به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های بره موم بر روغن سویا و آفتابگردان پرداختند و گزارش نمودند که با افزودن این عصاره به نمونه‌های روغن میزان اندیس اسیدی به طور معنی‌داری کاهش یافت. آن‌ها همچنین مشاهده کردند که در طی دوره نگهداری، میزان این اندیس در کلیه نمونه‌ها به تدریج افزایش پیدا کرد که با نتایج تحقیق حاضر مشابهت داشت. طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۳۹۲، بیشینه اسیدیته روغن سویا ۰/۱ درصد تعیین شده است که نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نمونه‌های روغن حاوی ۲۰۰۰ ppm در محدوده استاندارد بودند.

جدول ۳- بررسی تغییرات اسیدیته MgKOH/g روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی ژل آلوه ورا طی ۹۰ روز نگهداری و شاهد^۱
Table 3- Evaluation of MgKOH / g acidity changes of soybean oil containing different concentrations of ethanolic extract of aloe vera gel during 90 days of storage and control ¹

Type and concentration of antioxidant نوع و غلظت آنتی‌اکسیدان	Storage time at 25 ° C مدت زمان نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد		
	Day 30 روز ۳۰	Day 60 روز ۶۰	Day 90 روز ۹۰
500 ppm extract+ oil	0.200 ± 0.000 ^{bC}	0.326 ± 0.005 ^{bB}	0.573 ± 0.005 ^{bA}
1000 ppm extract+ oil	0.170 ± 0.000 ^{cC}	0.266 ± 0.005 ^{cB}	0.503 ± 0.005 ^{cA}
1500 ppm extract+ oil	0.163 ± 0.005 ^{cC}	0.240 ± 0.000 ^{deB}	0.453 ± 0.005 ^{cdA}
2000 ppm extract+ oil	0.146 ± 0.005 ^{dC}	0.226 ± 0.005 ^{eB}	0.413 ± 0.005 ^{dA}
120 ppm BHT+ oil	0.160 ± 0.000 ^{cC}	0.246 ± 0.005 ^{dB}	0.496 ± 0.005 ^{cA}
Oil (without antioxidant)	0.373 ± 0.005 ^{aC}	0.693 ± 0.005 ^{aB}	1.133 ± 0.057 ^{aA}

شاهد^۱: روغن سویا بدون آنتی‌اکسیدان و حاوی ۱۲۰ ppm BHT

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد.

Control ¹: Soybean oil without antioxidants and containing 120 ppm BHT

Results are shown as mean ± standard deviation.

Small lower case letters indicate a significant difference in each column.

Different uppercase letters indicate a significant difference in each row.

ماندگاری مواد غذایی می‌گردند. مطالعات نشان داده است که آلوئه‌ورا حاوی ۱۲ آنتراکینون^۱ متفاوت می‌باشد (Chang et al., 2011). شناخته‌شده‌ترین این ترکیبات فنولی، آلوین^۲ و امودین^۳ می‌باشند که اثرات ضد درد، ضد باکتریایی و ضد ویروسی آن‌ها به اثبات رسیده است (Gupta & Malhotra, 2012).

بررسی تغییرات DPPH (%) عصاره اتانولی آلوئه‌ورا

مهار رادیکال‌های آزاد، یکی از شناخته‌شده‌ترین مکانیسم‌هایی است که به واسطه آن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند اکسیداسیون چربی‌ها را مهار نمایند. DPPH، رادیکال چربی‌دوستی است که ماکزیمم جذب را در ۵۱۷ nm داراست و روبرو شدن با یک ترکیب‌دهنده پروتون منجر به کاهش جذب می‌گردد (Dordevic & Petrovic, 2007).

میزان DPPH غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوئه‌ورا در جدول ۵ گزارش شده است. همانطور که مشاهده گردید میزان DPPH با گذشت زمان روند کاهشی ($p \leq 0.05$) داشت به طوری که پس از ۹۰ روز نگهداری بالاترین میزان DPPH (۳۹/۰۰۰٪) متعلق به روغن سویای حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره اتانولی آلوئه‌ورا و پایین‌ترین میزان DPPH (۰/۰۰۰٪) در نمونه شاهد (روغن سویای بدون آنتی‌اکسیدان) بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) با یکدیگر داشتند. علت آن می‌تواند حضور ترکیبات فنولی در عصاره ژل آلوئه‌ورا باشد که به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را دارند. فعالیت آنتی-اکسیدانی ترکیبات فنولی به تعداد گروه هیدروکسیل در حلقه آروماتیک آن‌ها بستگی دارد، به طوری که با افزایش گروه هیدروکسیل در ساختار ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد. تغییر در قطبیت حلال، توانایی آن حلال را در حل کردن یک گروه خاص از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تغییر داده و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Molyneux et al., 2004).

هم‌راستا با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، محققینی پس از بررسی اثر استفاده از اسانس پوست پرتقال بر پایداری اکسیداتیو روغن سویا بیان نمودند که اسانس پوست پرتقال دارای فعالیت ضد رادیکالی بوده و نسبت به نمونه کنترل (فاقد آنتی‌اکسیدان)، باعث پایداری اکسایشی روغن سویا در طی شرایط حرارتی شد (Dehghan et al., 2018). همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه مرزه توسط محققین بررسی شد و نشان دادند که فعالیت ضد رادیکالی عصاره متانولی مرزه بیشتر از عصاره اتانولی آن بود (Kamkar et al., 2013).

نتایج محتوای فنل کل در روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوئه‌ورا

ترکیبات فنلی (مانند فلاوونوئیدها، فنولیک اسیدها و آنتوسیانین‌ها) که به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های آبدوست شناخته شده‌اند، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که در گیاهان به وفور وجود دارند. خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی به طور مستقیم با ساختار آن‌ها مرتبط است. این ترکیبات با داشتن یک یا چند گروه هیدروکسیل قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد می‌باشد. ترکیبات فنلی از طریق اهداء الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسایش چربی را مهار می‌کنند (Ahmadi et al., 2007).

میزان فنل کل روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوئه‌ورا در جدول ۴ گزارش شده است. همانطور که مشاهده گردید میزان فنل کل با گذشت زمان روند کاهشی داشت به طوری که پس از ۹۰ روز نگهداری بالاترین میزان فنل کل (۱۰۲/۳۳۳ mg GAE/g) متعلق به روغن سویای حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره اتانولی آلوئه‌ورا و پایین‌ترین میزان فنل کل (۰/۰۰۰ mg GAE/g) در نمونه شاهد (روغن سویای بدون آنتی‌اکسیدان) بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) با یکدیگر داشتند. علت کاهش میزان ترکیبات فنلی طی زمان نگهداری می‌تواند مربوط به وقوع فعالیت‌های آنزیمی که مسئول تجزیه ترکیبات فنلی هستند، باشد (Froehlicher et al., 2009).

ترکیب‌های فنولیک قادرند تا یک اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد بدهند و بدین ترتیب باعث توقف پیش روی واکنش‌های زنجیری در طی فرایند اکسایش چربی شوند. هم‌چنین، امکان اثر تشدیدکنندگی میان ترکیب‌های دارای اکسیژن و افزایش فعالیت ضد اکسایشی نیز وجود دارد (Kulisic et al., 2004).

عصاره ژل آلوئه‌ورا سرشار از ترکیبات فنولی بوده و این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را دارند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی به تعداد گروه هیدروکسیل در حلقه آروماتیک آن‌ها بستگی دارد، به طوری که با افزایش گروه هیدروکسیل در ساختار ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد. تغییر در قطبیت حلال، توانایی آن حلال را در حل کردن یک گروه خاص از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تغییر داده و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (El-Shemy et al., 2010).

اهمیت ترکیبات فنولی در صنعت مواد غذایی رو به افزایش است چرا که منجر به تأخیر اکسیداسیون چربی‌ها و در نتیجه بهبود کیفیت و

جدول ۴- بررسی تغییرات فنل کل mg GAE/g روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی ژل آلوئه ورا طی ۹۰ روز نگهداری و شاهد^۱
 Table 4- Evaluation of MgKOH / g Total phenol changes of soybean oil containing different concentrations of ethanolic extract of aloe vera gel during 90 days of storage and control¹

نوع و غلظت آنتی‌اکسیدان Type and concentration of antioxidant	مدت زمان نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد Storage time at 25 ° C		
	روز ۳۰ Day 30	روز ۶۰ Day 60	روز ۹۰ Day 90
500 ppm extract+ oil	103.333 ± 0.577 ^{dA}	98.67 ± 1.53 ^{cB}	72.333 ± 0.577 ^{dC}
1000 ppm extract+ oil	125.333 ± 0.577 ^{cA}	111.67 ± 1.53 ^{bB}	93.333 ± 0.577 ^{cC}
1500 ppm extract+ oil	137.667 ± 0.577 ^{bA}	126.67 ± 0.58 ^{aB}	99.333 ± 1.155 ^{bC}
2000 ppm extract+ oil	140.333 ± 0.577 ^{aA}	129.00 ± 1.00 ^{aB}	102.333 ± 0.577 ^{aA}
120 ppm BHT+ oil	137.333 ± 1.155 ^{dA}	127.33 ± 0.58 ^{aB}	99.667 ± 0.577 ^{bC}
Oil (without antioxidant)	0.000 ± 0.000 ^{eA}	0.000 ± 0.000 ^{dA}	0.000 ± 0.000 ^{eA}

شاهد^۱: روغن سویا بدون آنتی‌اکسیدان و حاوی ۱۲۰ ppm BHT

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد.

Control¹: Soybean oil without antioxidants and containing 120 ppm BHT

Results are shown as mean ± standard deviation.

Small lower case letters indicate a significant difference in each column.

Different uppercase letters indicate a significant difference in each row.

جدول ۵- بررسی تغییرات DPPH (%) روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی ژل آلوئه ورا طی ۹۰ روز نگهداری و شاهد^۱
 Table 5- Evaluation of DPPH (%) changes of soybean oil containing different concentrations of ethanolic extract of aloe vera gel during 90 days of storage and control¹

نوع و غلظت آنتی‌اکسیدان Type and concentration of antioxidant	مدت زمان نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد Storage time at 25 ° C		
	روز ۳۰ Day 30	روز ۶۰ Day 60	روز ۹۰ Day 90
500 ppm extract+ oil	49.000 ± 0.000 ^{dA}	32.333 ± 0.577 ^{dB}	17.333 ± 0.577 ^{cC}
1000 ppm extract+ oil	53.333 ± 0.577 ^{cA}	43.000 ± 1.000 ^{cB}	28.667 ± 0.577 ^{bC}
1500 ppm extract+ oil	61.000 ± 1.000 ^{bA}	51.667 ± 0.577 ^{bB}	37.333 ± 0.577 ^{aC}
2000 ppm extract+ oil	63.000 ± 1.000 ^{aA}	54.333 ± 0.577 ^{aB}	39.000 ± 1.000 ^{aC}
120 ppm BHT+ oil	60.333 ± 0.577 ^{bA}	52.333 ± 0.577 ^{bB}	38.333 ± 0.577 ^{aC}
Oil (without antioxidant)	0.000 ± 0.000 ^{eA}	0.000 ± 0.000 ^{eA}	0.000 ± 0.000 ^{dA}

شاهد^۱: روغن سویا بدون آنتی‌اکسیدان و حاوی ۱۲۰ ppm BHT

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد.

Control¹: Soybean oil without antioxidants and containing 120 ppm BHT

Results are shown as mean ± standard deviation.

Small lower case letters indicate a significant difference in each column.

Different uppercase letters indicate a significant difference in each row.

است. همانطور که مشاهده می‌شود میزان پراکسید طی دوره نگهداری در تمامی به صورت معنی‌داری ($p \leq 0.05$) افزایش پیدا نمود، به طوری که پس از ۹۰ روز نگهداری بالاترین میزان پراکسید (۱۱/۱۶۶ Meq/kg) در نمونه شاهد (روغن سویای بدون آنتی‌اکسیدان) و پایین‌ترین میزان پراکسید (۶/۸۳۳ Meq/kg) متعلق به روغن سویای حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره اتانولی آلوئه‌ورا و پس از آن نمونه شاهد حاوی ۱۲۰ ppm BHT بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری

بررسی تغییرات پراکسید روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوئه‌ورا

عدد پراکسید به عنوان شاخص اولیه اکسیداسیون مطرح بوده، که در درجه حرارت‌های بالا ناپایدار بوده و به سهولت به مخلوطی از ترکیبات فرار آلدئید تبدیل می‌شود، بنابراین عدد پراکسید نمی‌تواند معیار مناسبی جهت تعیین پیشرفت واقعی اکسیداسیون باشد (Yaghmur et al., 2001). تغییرات میزان عدد پراکسید در جدول ۶ گزارش شده

($p \leq 0.05$) با یکدیگر داشتند. علت بالاتر بودن اندیس پراکسید نمونه شاهد بدون آنتی اکسیدان ناشی از عدم افزوده شدن ضد اکساینده بوده اما از طرف دیگر چون روغن سویا مورد استفاده در این پژوهش، تصفیه شده بود، بخشی از ترکیب‌های طبیعی آن مانند توکوفرول‌ها از دست رفته‌اند که خود در تسریع اکسایش مؤثر بوده است. علت پایین بودن اندیس پراکسید در نمونه‌های حاوی ۵۰۰ پی‌پی‌ام عصاره اتانولی می‌تواند به دلیل حضور ترکیبات فنلی در ژل آلوئه‌ورا باشد که تحقیقات انجام شده در این زمینه حاکی از وجود رابطه بین مقدار ترکیبات فعال آنتی اکسیدانی، بخصوص فنول‌ها و پایداری اکسیداتیو روغن‌ها باشد (Iqbal et al., 2008).

در این راستا محققینی فعالیت ضد اکسایشی عصاره دانه رازیانه را روی روغن آفتابگردان بررسی و بیان کردند که عصاره دانه رازیانه دارای فعالیت ضد اکسایشی بالاتری نسبت به ضد اکساینده‌های سنتزی رایج BHT و BHA در روغن آفتابگردان می‌باشد (Tahami et al., 2012). همچنین خاصیت ضد اکسایشی عصاره استخراجی از تفاله انگور در جلوگیری از اکسایش روغن سویا بررسی شده و نتایج اعداد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید نشان داد که عصاره حاوی تانن تفاله انگور، دارای فعالیت مناسبی در مهار اکسایش روغن سویا بوده و حتی از ضد اکساینده‌های سنتزی نیز عملکرد بهتری داشته است (Rouzbehan et al., 2008).

جدول ۶- بررسی تغییرات عدد پراکسید (Meq/kg) روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا طی ۹۰ روز نگهداری و شاهد^۱

Table 6- Evaluation of Peroxide (Meq/kg) changes of soybean oil containing different concentrations of ethanolic extract of aloe vera gel during 90 days of storage and control ¹

نوع و غلظت آنتی اکسیدان Type and concentration of antioxidant	مدت زمان نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد Storage time at 25 ° C		
	روز ۳۰ Day 30	روز ۶۰ Day 60	روز ۹۰ Day 90
500 ppm extract+ oil	3.066±0.051 ^{bC}	5.966±0.052 ^{bB}	8.366±0.055 ^{bA}
1000 ppm extract+ oil	2.766±0.115 ^{cC}	5.500±0.000 ^{cB}	7.833±0.056 ^{cA}
1500 ppm extract+ oil	2.465±0.052 ^{dC}	5.033±0.054 ^{eB}	7.266±0.052 ^{eA}
2000 ppm extract+ oil	2.200±0.100 ^{eC}	4.766±0.057 ^{fB}	6.833±0.055 ^{fA}
120 ppm BHT+ oil	2.466±0.053 ^{dC}	5.266±0.059 ^{dB}	7.633±0.051 ^{dA}
Oil (without antioxidant)	3.566±0.057 ^{aC}	7.566±0.058 ^{aB}	11.166±0.058 ^{aA}

شاهد^۱: روغن سویا بدون آنتی اکسیدان و حاوی ۱۲۰ ppm BHT

نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد.

Control ¹: Soybean oil without antioxidants and containing 120 ppm BHT

Results are shown as mean $\pm$ standard deviation.

Small lower case letters indicate a significant difference in each column.

Different uppercase letters indicate a significant difference in each row.

هیدروپراکسیدها و تشکیل محصول ثانویه اکسیداسیون لیپید، بود (Mohammadi et al., 2016).

همچنین پس از ۹۰ روز نگهداری میزان اندیس TBA در نمونه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های حاوی آنتی اکسیدان سنتزی و عصاره‌های ژل آلوئه‌ورا بود ($p \leq 0.05$)، زیرا عصاره‌های ژل آلوئه‌ورا دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی بوده و از طریق کاهش سرعت اکسیداسیون، موجب کاهش تشکیل محصولات حاصل از اکسایش چربی گردید.

مطابق با نتایج تحقیق حاضر، (Mazaheri Kalhori et al., 2014) نشان دادند با افزایش غلظت عصاره دانه رازیانه در روغن سویا تا محدوده ۴۰۰ mg/l میزان تولید محصولات ثانویه اکسایش و همچنین شدت اکسایش کاهش یافته اما در غلظت‌های بالاتر از میزان

بررسی تغییرات تیوباربیتوریک اسید روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوئه‌ورا

تغییرات میزان تیوباربیتوریک اسید در جدول ۷ گزارش شده است. مطابق با نتایج میزان تیوباربیتوریک اسید طی دوره نگهداری در تمامی به صورت معنی‌داری ($p \leq 0.05$) افزایش پیدا نمود، به طوری که پس از ۹۰ روز نگهداری بالاترین میزان تیوباربیتوریک اسید (mg MDA/kg) (۱/۲۰۰) متعلق به نمونه شاهد (روغن سویای بدون آنتی اکسیدان) و پایین‌ترین میزان تیوباربیتوریک اسید (mg MDA/kg) (۰/۵۱۳) در روغن سویای حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره اتانولی آلوئه‌ورا و پس از آن (۰/۵۴۰ mg MDA/kg) نمونه سویا حاوی ۱۵۰۰ ppm بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) با یکدیگر داشتند. در واقع علت افزایش میزان تیوباربیتوریک اسید در طی زمان نگهداری شکست

و متانولی مرزه (Kamkar *et al.*, 2013) و عصاره‌های مختلف اولئوگم رزین کندر (Mohammadi & Arabshahi- 2016) سبب افزایش پایداری اکسیداتیو در روغن سویا شده و میزان درصد مهار تولید مالون دی‌آلدئید کاهش دهند.

ذکر شده به علت افزایش اثرات پرواکسیدانی سرعت اکسایش افزایش می‌یابد. سایر محققین گزارش کردند عصاره‌های گیاهی نظیر عصاره استونی هسته انار (Samad Louei *et al.*, 2007)، عصاره‌های اتانولی

جدول ۷- بررسی تغییرات تیوباربتوریک اسید (mg MDA/kg) روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی ژل آلوئه ورا طی ۹۰ روز نگهداری و شاهد^۱

Table 7- Evaluation of mg MDA/kg TBA changes of soybean oil containing different concentrations of ethanolic extract of aloe vera gel during 90 days of storage and control ¹

نوع و غلظت آنتی‌اکسیدان Type and concentration of antioxidant	مدت زمان نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد Storage time at 25 ° C		
	روز ۳۰ Day 30	روز ۶۰ Day 60	روز ۹۰ Day 90
500 ppm extract+ oil	0.216 ± 0.005 ^{bC}	0.566 ± 0.005 ^{bB}	0.743 ± 0.011 ^{bA}
1000 ppm extract+ oil	0.170 ± 0.010 ^{cC}	0.426 ± 0.011 ^{cB}	0.620 ± 0.010 ^{cA}
1500 ppm extract+ oil	0.136 ± 0.005 ^{dC}	0.363 ± 0.005 ^{dB}	0.553 ± 0.005 ^{dA}
2000 ppm extract+ oil	0.126 ± 0.005 ^{dC}	0.356 ± 0.011 ^{dB}	0.513 ± 0.005 ^{eA}
120 ppm BHT+ oil	0.126 ± 0.005 ^{dC}	0.363 ± 0.005 ^{dB}	0.540 ± 0.010 ^{dA}
Oil (without antioxidant)	0.340 ± 0.010 ^{aC}	0.920 ± 0.010 ^{aB}	1.200 ± 0.000 ^{aA}

شاهد^۱: روغن سویا بدون آنتی‌اکسیدان و حاوی ۱۲۰ ppm BHT

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد.

Control ¹: Soybean oil without antioxidants and containing 120 ppm BHT

Results are shown as mean ± standard deviation.

Small lower case letters indicate a significant difference in each column.

Different uppercase letters indicate a significant difference in each row.

عصاره‌های اتانولی ژل آلوئه‌ورا و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA موجب افزایش معنی‌دار پایداری روغن سویا نسبت به اکسیداسیون گردید، که این امر به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و چلات‌کنندگی عصاره‌های مذکور می‌باشد.

در این راستا محققین ثمرین و همکاران (Mohagheghi Samarin *et al.*, 2011) به بررسی خاصیت ضداکسایشی عصاره استخراجی از پوست سیب‌زمینی در جلوگیری از اکسایش روغن سویا با روش رنسیمت پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره مورد بررسی، دارای فعالیت مناسبی در جلوگیری از اکسایش روغن سویا بوده و فعالیت ضداکسایشی مشابه با ضداکساینده‌های سنتزی BHT و BHA داشته است. در پژوهش دیگری محققین گزارش نمودند عصاره دانه رازیانه باعث افزایش زمان مقاومت نسبت به اکسایش در روغن آفتابگردان شده است (Tahami *et al.*, 2012).

بررسی تغییرات رنسیمت روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوئه‌ورا

روش رنسیمت اغلب برای ارزیابی یا پیش‌بینی پایداری اکسیداتیو در شرایط حرارتی بوده و به عنوان زمان القاء یا زمان مقاومت استفاده می‌شود. تغییرات میزان رنسیمت در جدول ۸ گزارش شده است. مطابق با نتایج میزان رنسیمت طی دوره نگهداری در تمامی نمونه‌ها به صورت معنی‌داری ($p \leq 0.05$) کاهش پیدا نمود، به طوری که پس از ۹۰ روز نگهداری بالاترین میزان رنسیمت (۴/۴۳۰) متعلق به روغن سویای حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره اتانولی آلوئه‌ورا و پایین‌ترین میزان رنسیمت (۱/۱۰۶) در نمونه شاهد (روغن سویای بدون آنتی‌اکسیدان) و پس از آن (۲/۶۴۳) نمونه سویا حاوی ۵۰۰ ppm بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) با یکدیگر داشتند.

عصاره‌های اتانولی ژل آلوئه‌ورا طی دوره نگهداری تأثیر قابل توجهی بر بهبود پایداری روغن سویا از خود نشان دادند. و افزودن

جدول ۸- بررسی تغییرات رنسیمت روغن سویا حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا طی ۹۰ روز نگهداری و شاهد^۱

Table 8- Evaluation of rancimat changes of soybean oil containing different concentrations of ethanolic extract of aloe vera gel during 90 days of storage and control¹

نوع و غلظت آنتی اکسیدان Type and concentration of antioxidant	مدت زمان نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد Storage time at 25 ° C		
	روز ۳۰ Day 30	روز ۶۰ Day 60	روز ۹۰ Day 90
500 ppm extract+ oil	5.640 ± 0.010 ^{EA}	4.363 ± 0.005 ^{dB}	2.643 ± 0.005 ^{EC}
1000 ppm extract+ oil	6.303 ± 0.005 ^{DA}	5.420 ± 0.010 ^{CB}	3.223 ± 0.005 ^{DC}
1500 ppm extract+ oil	7.126 ± 0.005 ^{CA}	5.903 ± 0.005 ^{BB}	4.116 ± 0.011 ^{CC}
2000 ppm extract+ oil	7.520 ± 0.000 ^{BA}	6.240 ± 0.010 ^{AB}	4.430 ± 0.010 ^{AC}
120 ppm BHT+ oil	7.233 ± 0.005 ^{BA}	5.916 ± 0.005 ^{BB}	4.143 ± 0.005 ^{BC}
Oil (without antioxidant)	3.403 ± 0.005 ^{EA}	2.166 ± 0.057 ^{EB}	1.106 ± 0.005 ^{EC}

شاهد^۱: روغن سویا بدون آنتی اکسیدان و حاوی ۱۲۰ ppm BHT

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد.

Control¹: Soybean oil without antioxidants and containing 120 ppm BHT

Results are shown as mean ± standard deviation.

Small lower case letters indicate a significant difference in each column.

Different uppercase letters indicate a significant difference in each row.

نتیجه‌گیری

امروزه تحقیقات نسبتاً وسیعی در ارتباط با توان بالقوه آنتی اکسیدان‌های طبیعی و بررسی امکان جایگزینی آن به جای آنتی اکسیدان‌های سنتزی در روغن‌های خوراکی انجام شده است. در این پژوهش فعالیت آنتی اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی آلوئه‌ورا بر پایداری اکسایشی روغن سویا طی ۹۰ روز نگهداری بررسی گردید. بررسی ترکیبات عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا در این مطالعه نشان داد، که دارای مقادیر بالای ترکیبات اکسیژن‌دار و ترکیبات فنولیک است که خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا را تصدیق می‌کند. از این رو با افزایش غلظت عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا به کار گرفته شده در نمونه‌های روغن سویا، به صورت معنی‌داری از افزایش

عدد پراکسید، تیوباربتوریک اسید و اسیدیته روغن سویا نسبت به نمونه شاهد (بدون آنتی اکسیدان) و نمونه حاوی ۱۲۰ ppm آنتی اکسیدان طی ۹۰ روز نگهداری جلوگیری نمود. نمونه روغن سویای حاوی ۲۰۰۰ ppm عصاره اتانولی ژل آلوئه‌ورا نسبت به سایر تیمارها بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را داشت و به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی، توانایی واکنش با رادیکال‌های حاصل از اکسیداسیون لیپیدها را داشته و موجب قطع واکنش‌های زنجیری و افزایش زمان اکسیداسیون کند و کاهش سرعت اکسیداسیون خودبه خودی می‌شود. بنابراین، می‌توان عصاره آلوئه‌ورا را پس از آزمایش‌های تکمیلی، در غلظت‌های مناسب، به عنوان جایگزین طبیعی ترکیب‌های سنتزی BHA و BHA در مواد غذایی به کار برد.

منابع

- Ahmadi, F., Kadivar, M., & Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of kelussia odoratissima moza, in model and food systems. *Food Chemistry*, 105, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.056>
- Ayoubi, A., Omid, A., Valizade, R., & Mousaei, A. (2013). Effect of hydroalcoholic extract of *Aloe vera* and *Teucrium* on serum glucose and lipid profile in streptozotocin diabetic male rats. *Journal Birjand University Medical Science*, 20(2), 144-152. (In Persian). <http://journal.bums.ac.ir/article-1-1335-fa.html>
- Bazari Moghaddam, S., Haghighi, M., Sharif Rohani, M., Hamidi, M., & Ghasemi, M. (2016). Effects of *Aloe vera* extract on growth indices, carcass composition and bacterial flora of intestine in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 25(1), 40-53. (In Persian). <https://doi.org/10.22092/ISFJ.2017.110222>
- Bhargawa, S., Kapoor, S., Ranote, P.S., & Sharma, S. (2014). Studies on aloe juice supplemented kinnow nectar. *Research Journal Agriculture and Forestry Science*, 2(8), 14-20. http://www.isca.me/AGRI_FORESTRY/Archive/v2/i8/3.ISCA-RJAFS-2014-041.pdf
- Boghani, A.H., Raheem, A., & Hashmi, S.I. (2012). Development and storage studies of blended papaya-Aloe vera ready to serve (RTS) beverage. *Jornal of Food Process Technology*, 3(10), 2. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000185>

6. Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., & Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127(4), 1821-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.071>
7. Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
8. Chang, X.L., Chen, B.Y., & Feng, Y.M. (2011). Water-soluble polysaccharides isolated from skin juice, gel juice and flower of Aloe vera Miller. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(2), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.07.007>
9. Dordevic, S., & Petrovic, S. (2007). Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *Journal of Ethnopharmacol*, 109, 458-63. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.021>
10. Dehghan, B., Esmailzadeh Kenari, R., & Raftani Amiri, Z. (2019). Investigate the antioxidant properties of orange peel essential oil (*Citrus sinensis*) on the stability of soybean oil during storage conditions. *Food Technology & Nutrition*, 16(3), 73-90. (In Persian). https://jftn.srbiau.ac.ir/article_14371.html?lang=en
11. Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., & Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of Biology*, 32, 43-49. <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol32/iss1/7>
12. El-Shemy, H.A., Aboul-Soud, M.A., Nassr- Allah, A.A., Aboul-Enein, K.M., Kabash, A., & Yagi, A. (2010). Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes activity by *Aloe vera* leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. *Current Medicinal Chemistry*, 17(2), 129-38. <https://doi.org/10.2174/092986710790112620>
13. Esfandiarifard, M., & Ziaolhagh, S. (2021). Study on the antioxidant activity of propolis extract and its effect on the oxidation of sunflower oil. *Biochemistry and Forensic Science*, 17(107), 119-130. <https://doi.org/10.52547/fsct.17.107.119>
14. Farhoosh, R. (2007). The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 84, 205-209. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11746-006-1030-4>
15. Froehlicher, T., Hennebelle, T., Martin-Nizard, F., Cleenewerck, P., Hilbert, J.L., Trotin, F., & Grec, S. (2009). Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chemistry*, 115, 897-903. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.004>
16. Gupta, V.K., & Malhotra, S. (2012). Pharmacological attribute of *Aloe vera*: revalidation through experimental and clinical studies. *An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda*, 33(2), 193-196. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.105237>
17. Hinneburg, I., Damien Dorman, H.J., & Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Journal of Food Chemistry*, 97, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.028>
18. Iqbal, S., & Bhanger, M. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100, 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.049>
19. Joseph, B. (2010). Pharmacognostic and phytochemical properties of *Aloe vera* linn – an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4(2), 34-42. [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=996325](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=996325)
20. Kamkar, A., Tooryan, F., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., & Shariatifar, N. (2013). Chemical composition of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and comparison of antioxidant activity with aqueous and alcoholic extracts. *Journal of Veterinary Reserch*, 68, 2, 183-190. (In Persian). <https://doi.org/10.22059/JVR.2013.31966>
21. Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milosa, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, analytical, nutritional and clinical methods. *Food Chemistry*, 85, 633-640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024>
22. Mazaheri Kalhori, M., Basiri, A., & Jalali, H. (2014). Evaluation of anti-oxidant properties of fennel seed essential oil (*Foeniculum vulgare*) and its effect on oxidative stability of soybean oil. *Iranian Biosystem Engineering*, 45(2), 131-139. (In Persian). <https://doi.org/10.22104/JIFT.2014.41>
23. Molyneux, P.H. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar in Journal Science Technology*, 26, 211-9. <https://www.thaiscience.info/journals/article/song/10462423.pdf>

24. Mohagheghi Samarin, A., Poorazarang, H., Elhamirad, A.H., Dezashibi1, Z., & Hematyar, N. (2011). Extraction of phenolic compounds from potato peel (*Ramus variety*) with solvent and ultrasound-assisted methods and evaluation of its antioxidant activity in soybean oil. *Journal of Food Science and Technology*, 8(1), 81-91. <http://fsct.modares.ac.ir/article-7-5437-en.html>
25. Mohammadi, A., Jafari, S.M., Esfanjani, A.F., & Akhavan, S. (2016). Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chemistry*, 190, 513-519. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.115>
26. Mohammadi, A., & Arabshahi- Delouee, S. (2016). Antioxidant properties of extract *Boswellia serrata* oleo-gum resin in soyabean oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 12(4), 477-488. (In Persian). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v12i4.40783>
27. Parizan, T., Elhamirad, A.H., Estiri, S.H., & Armin, M. (2011). Assessing antioxidant activity methanol extract of senna leaf and its effect on the stability of soybean oil. *Inovations in Food Science and Technology*, 1(7), 51-59. (In Persian). <https://sid.ir/paper/176504/fa>
28. Rafiei, Z., Jafari, S.M., Alami, M., & Khomeiri, M. (2011). Antioxidant properties of olive leaf extract and its application in sunflower oil. *Journal of Food Research (University of Tabriz)*, 21(1), 11-23. (In Persian). https://foodresearch.tabrizu.ac.ir/article_938.html?lang=en
29. Rouzbehan, Y., Alipour, D., Barzegar, M., & Azizi, M.H. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds of grape pomace. *International Journal of Food Science and Technology*, 5(3), 69-74. <https://sid.ir/paper/72424/en>
30. Salehi, E.A., Esmailzadeh Kenari, R., & Nasiri Takami, T. (2014). Investigation of the effect of pomegranate extract (*Pimpinella affinis* Ledeb) on the stabilization of canola oil during storage conditions. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 10(2), 176-181. (In Persian). https://ifstrj.um.ac.ir/article_33825_f546275fc322bf7f7ba17b9384341f13.pdf
31. Salta, F.N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., & Andrikopoulos, N.K. (2007). Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Science and Technology International*, 13(6), 413-421. <https://doi.org/10.1177/1082013208089563>
32. Samad Louei, H.R., Azizi, M.H., & Barzegar, M. (2007). Antioxidative effect of pomegranate seed phenolic componends on soybean oil. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 14(4), 193-200. (In Persian). https://www.sid.ir/fa/VEWSSID/J_pdf/51413860416.pdf
33. Sasi Kumar, R., Ray, R.C., Paul, P.K., & Suresh, C.P. (2013). Development and storage studies of therapeutic ready to serve (RTS) made from blend of *Aloe vera* Aonla and ginger juice. *Journal Food Process Technology*, 4(232), 2. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000232>
34. Selmi, S., Limam, Z., Batista, I., Bandarra, N.M., & Nunes, M. L. (2011). Effects of storage temperature and α tocopherol on oil recovered from sardine mince. *International Journal of Refrigeration*, 34(5), 1315-1322. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2010.08.018>
35. Shahidi, F. (2005). *Bailey's industrial oil and fat products*. (6th edn), John Wiley & Sons, Inc, simultaneously in Canada. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/047167849X>
36. Singh, G., Maurya, S., & Catalan, C. (2005). Chemical constituents antimicrobial investigations and antioxidant potentials of *Anethum graveolens* essential oil and acetone extract: part 52. *Journal Food Science*, 70, 208-215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07190.x>
37. Tahami, F.S., Basiri, A., Tarzi, B., & Mahasti, P. (2012). Evaluation of the antioxidant effect of fennel seed extract (*Foeniculum vulgare*) on the stability of sunflower oil. *Food Technology & Nutrition*, 10(1), 71-78. (In Persian). <https://sid.ir/paper/143139/fa>
38. Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *International Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98-108. <http://www.ipharmsciencia.com>
39. Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., & Fu, Y.J. (2008). Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, 108, 1019-1022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.046>
40. Yaghmur, A., Aserin, A., Mizrahi, Y., Nerd, A., & Garti, N. (2001). Evaluation of argan oil for deep-fat frying. *Lebensm Wiss. u.-Technology*, 34, 124-130. <https://doi.org/10.1006/fstl.2000.0697>
41. Yao, X., Zhang, D., Zu, Y., Fu, Y., Luo, M., Gu, C., Li, C.M.F., & Efferth, T. (2013). Free radical scavenging capability, antioxidant activity and chemical constituents of *Pyrola incarnata* Fisch. Leaves. *Industrial Crops and Products*, 49, 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.058>



The Effect of *Lactiplantibacillus plantarum* from Motal Cheese on the Adhesion of *Cronobacter sakazakii* to Epithelial Cells

S.S. Fatemizadeh¹, M.B. Habibi Najafi^{ID 2*}, D.S. Nielsen³

Received: 2022.07.31

Revised: 2022.10.02

Accepted: 2022.11.23

Available Online: 2022.11.27

How to cite this article:

Fatemizadeh, S.S., Habibi Najafi, M.B., & Nielsen, D.S. (2023). The effect of *Lactiplantibacillus plantarum* from Motal cheese on the adhesion of *Cronobacter sakazakii* to epithelial cells. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 557-575. (In Persian with English abstract).

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.78002.1193>

Introduction

Cronobacter sakazakii is an opportunistic pathogen, which has been linked to the contamination of powdered infant formula, and associated with outbreaks leading to fatalities in neonatal intensive care units. Few studies have explored the direct interaction between probiotics and *C. sakazakii*. In this study, the effect of a *Lactiplantibacillus plantarum* strain (M17) along with the standard strain *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) and the well-characterized probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG on the adhesion of *C. sakazakii* to intestinal epithelial cells was analyzed.

Materials and Methods

Acid and bile tolerance of M17 was evaluated in the presence of pepsin and pancreatin. L-arginine hydrolysis was investigated using an arginine-including medium. Auto-aggregation and co-aggregation assays were performed by absorbance measurement. Minimum inhibitory concentrations of the antimicrobials recommended by the European Food Safety Authority were established. Total lactic acid and the ratio of D/L lactate isomers were determined with a Megazyme enzymatic kit. The ability of the isolate to produce biogenic amines was tested by qualitative and quantitative monitoring. Hemolysis was assessed phenotypically on MRS agar enriched with sheep blood. The strain was tested for its capability to adhere to mucin and Caco-2 cells. The antagonistic effects of the strain against *C. sakazakii* were further evaluated *in vitro* on mucin and cultured Caco-2 cells. The LAB strain was added simultaneously with, before, and after *C. sakazakii* to Caco-2 cells for competition, exclusion and displacement assays, respectively. Data analysis was performed in R using one-way analysis of variance, and the experimental groups were compared with the controls using Tukey's test. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results and Discussion

There was no significant difference in the survival rate of M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 at pH = 4. After 2 h of incubation at pH = 2.5, the survival rate of *L. plantarum* ATCC 8014 was estimated to be higher than strain M17, but this difference was not significant. After 4 hours of incubation at pH = 8, M17 showed a higher survival rate than *L. plantarum* ATCC 8014, and this difference was significant after transfer from pH = 4. These results confirm the appropriate viability of M17 in the gastrointestinal tract. Both M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 developed the color yellow in the L-arginine hydrolysis assay, which confirms the safety of these strains. The percentage of auto-aggregation for M17, *L. plantarum* ATCC 8014, and *Lactobacillus rhamnosus* LGG was estimated at 24.38, 25.28, and 32 after 6 hours, respectively, and no statistically significant difference between the two isolates were noticed. Given the auto-aggregation and co-

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

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

3- Professor of Department of Food Science, Copenhagen University, Denmark

DOI: [10.22067/ifstrj.2022.78002.1193](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.78002.1193)

aggregation parameters of M17, this strain may constitute a defense mechanism against *C. sakazakii*. Strain M17 showed resistance to kanamycin and clindamycin antibiotics. With intrinsic resistance, the risk of transferring resistance genes is not only speculative, but practically impossible. Intrinsic resistance of lactic acid bacteria may be considered desirable because it ensures their survival when the host is treated with antibiotics. Both D and L isomers of lactic acid were produced by the studied strains. In humans, D(-)-lactic acidosis is a rare metabolic complication that has only been reported in individuals with short bowel syndrome). Clinical studies have shown that the consumption of probiotic bacteria producing D(-)-lactic acid is safe for children and does not cause a long-term increase in blood D(-)-lactic acid. The reference *L. plantarum* strain and M17 did not produce biogenic amine precursors, and had no β -hemolytic activity. Mucin adhesion assay exhibited that M17 has less adhesion (12.10 ± 1.14 %) than *L. plantarum* ATCC 8014 (13.33 ± 2.30 %) and LGG (15.93 ± 2.06 %) although these differences were not statistically significant. However, the amount of adhesion for the positive control sample *Escherichia coli* K12 (25.19 ± 4.40 %) was significantly higher than those of the other strains. Compared to the positive control, M17 had a significantly lower adhesion rate (6.8 ± 1.41) to CaCo-2 cells. This value was estimated at 13.77 ± 3.53 % for the reference strain and 21.6 ± 7.54 % for *Lactobacillus fermentum* PCC (positive control). In antagonistic assays, M17 was able to reduce the adhesion of *C. sakazakii* to mucin and CaCo-2 cells in all three methods of exclusion/inhibition, competition and displacement. Statistical analysis of the results does not show a significant difference between M17 and LGG. Therefore, the performance of M17 is similar to that of the standard probiotic LGG.

Conclusion

Lactic acid bacteria with acceptable ability to adhere to epithelial cells can be suitable for colonization in the intestine. They can act as a barrier to fight pathogens through various competitive mechanisms, such as co-aggregation with pathogens and adhesion. The M17 strain has an acceptable immune profile and probiotic properties because it shows an acceptable antagonistic activity against *C. sakazakii* invasion.

Acknowledgement

This study was supported by Ferdowsi University of Mashhad (Research affairs) [project No.:46718] and the research infrastructure at the University of Copenhagen.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, *In vitro* properties, *Lactiplantibacillus plantarum*, Probiotic

مقاله پژوهشی

اثر لاکتی پلانتهی باسیلوس پلانتاروم پنیر موتال بر چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های روده‌ای

سعیده سادات فاطمی زاده^۱ - محمد بافر حبیبی نجفی^{۲*} - دنیس سندریس نیلسن^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۲

چکیده

کرونوباکتر ساکازاکی موجب نگرانی تولیدکنندگان شیرخشک نوزادان است. در این مطالعه ایزوله لاکتی پلانتهی باسیلوس پلانتاروم M17 از پنیر سنتی موتال (شماره دسترسی KX572391) به همراه سویه استاندارد لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC ۸۰۱۴) جهت کنترل کرونوباکتر ساکازاکی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی خواص پروبیوتیکی و ایمنی، آزمون‌هایی جهت بررسی بقای جدایه، هیدرولیز آل - آرژنین، خود انبوهش، حساسیت آنتی بیوتیکی، تولید ایزومرهای اسید لاکتیک، تولید آمین‌های بیوژنیک، فعالیت همولیتیک، چسبندگی به موسین و چسبندگی به سلول‌های Caco-2 صورت پذیرفت. به منظور بررسی اثر ایزوله M17 بر کرونوباکتر ساکازاکی، پارامترهای هم انبوهش، چسبندگی به موسین و چسبندگی به سلول‌های Caco-2 به همراه باکتری استاندارد پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس LGG صورت پذیرفت. سویه M17 ۹۱٪ در شرایط مشابه اسید معده و ۸۹٪ در غلظت مشابه نمک‌های صفاوی زنده ماند، و توانایی خود انبوهش بیش از ۲۴٪ را نشان داد. چسبندگی ایزوله M17 در شرایط برون تنی به موسین و سلول‌های Caco-2 به ترتیب در مقادیر ۱۲ و ۷٪ ثبت شد. ایزوله مورد مطالعه دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی مناسبی در مقایسه با نمونه استاندارد است و می‌تواند کاندید مناسبی جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک در شیرخشک نوزادان باشد. با این حال، در آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی، ایزوله M17 در برابر کانامایسین و کلیندامایسین مقاومت نشان داد، که این ویژگی امکان استفاده از این ایزوله را محدود خواهد کرد. نتایج برآورد اثر پروبیوتیکی M17 بر کرونوباکتر ساکازاکی نشان از عملکرد مشابه با سویه استاندارد LGG دارد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، کرونوباکتر ساکازاکی، لاکتی پلانتهی باسیلوس پلانتاروم، ویژگی‌های برون تنی

مقدمه

پودر شیر خشک است که با شیوع بیماری در نوزادان، به خصوص در بخش‌های مراقبت‌های ویژه نوزادان مرتبط است (Bowen & Braden, 2006). مطالعات نشان داده که pH معده نوزادان نسبت به بزرگسالان بالاتر بوده (خنثی در بدو تولد و بین ۲/۳ الی ۳/۶ تا ۳ سالگی) (Blackburn, 2016; Erickson et al., 2005) و این امر

کرونوباکتر^۴ها، باکتری‌های میله ای گرم منفی، متحرک، غیر اسپورزا و تاژک دار عضو خانواده انتروباکتریاسه^۵ هستند (Farmer et al., 1980; Food Safety Authority of Ireland, 2011). کرونوباکتر ساکازاکی^۶ یک پاتوژن فرصت طلب و عامل مهم در آلودگی

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

۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم، دانشگاه کپنهاگ، دانمارک

می‌تواند بقای کرونوباکتر را تسهیل کند (Pagotto & Farber, 2009).

اگر چه بروز بیماری توسط کرونوباکتر ساکازاکی به طور کلی ناچیز است، اما میزان مرگ و میر نوزادان به علت درگیری با این باکتری ۳۳-۸۰٪ گزارش شده است (Lai, 2001; Gurtler; Drudy et al., 2006; et al., 2005; Nazarowec-White & Farber, 1997). در نتیجه چسبیدن و تهاجم باکتریایی به خطوط سلولی اندوتلیال مویرگی مغز انسان، بیماری اغلب منجر به تأخیر نمو و اختلال در عملکرد ادراکی می‌شود. تعدادی از مطالعات نشان داده اند که پروتئین‌های غشای خارجی A و X کرونوباکتر ساکازاکی در حمله و عبور از سلول‌های اندوتلیال مویرگی مغز، که سد خونی-مغزی را تشکیل می‌دهند، نقش دارند (Mohan Nair et al., 2009).

حضور محافظ میکروبیولوژیکی در شیر خشک می‌تواند به ننگه داشتن ارگانیسم بیماری زا در مقادیر کم پس از بازسازی کمک کند و خطر ابتلا به بیماری فاجعه بار را کاهش دهد (Kent et al., 2015). پروبیوتیک‌ها در حال حاضر به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده ای تعریف می‌شوند که به هنگام استفاده در مقادیر کافی، بر سلامت میزبان تأثیر مثبتی می‌گذارند (Guarner & Schaafsma, 1998; CODEX Alimentarius Commission, 2008). مطالعات علمی اخیر در مورد خواص و عملکرد میکروارگانیسم‌های زنده در مواد غذایی نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در فعالیت‌های ایمونولوژیکی، گوارشی و تنفسی ایفا می‌کنند و می‌توانند تأثیر قابل توجهی در کاهش بیماری‌های عفونی در کودکان داشته باشند (FAO/WHO, 2006b). هانتز و همکاران (Hunter et al., 2009) نشان دادند که لاکتوباسیلوس بولگاریکوس از آسیب سلول‌های اپی‌تلیال روده ای ناشی از اکسید نیتریک تولید شده در نتیجه حضور کرونوباکتر ساکازاکی در یک مدل نوزاد موش مبتلا به/تتروکوئیت نکروزان جلوگیری می‌کند (Hunter et al., 2009). کولادو و همکاران (Collado et al., 2008a) برای مقابله با چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به مخاط جدا شده از انسان، سویه‌های پروبیوتیک را مورد آزمایش قرار دادند (این مطالعه شامل LGG نبود).

به منظور فراهم کردن مواد غذایی فراسودمند برای یک جمعیت هدف، انتخاب منطقی بهترین کاندیداهای پروبیوتیک با اثبات ادعاهای سلامتی بخش آنها توصیه می‌شود (Arbolea et al., 2012). بنابراین خواص ویژه سویه‌های پروبیوتیک باید با دقت تعیین و تأثیر هر سویه بر سلامت میزبان به صورت موردی نشان داده شود (Campana et al., 2017). باکتری‌های پروبیوتیک مختلفی شناسایی شده‌اند که قادر به مهار پاتوژن‌های بالقوه هستند. با این حال، مطالعات

اندکی به بر هم کنش مستقیم بین پروبیوتیک و باکتری کرونوباکتر ساکازاکی پرداخته اند. در این مطالعه، برای اولین بار اثر جدایه لاکتی پلانسی باسیلوس پلانتاروم بر چسبندگی باکتری کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های اپی‌تلیال روده ای، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و فعال‌سازی جدایه لاکتوباسیلوس فراورده لبنی سنتی

باکتری لاکتوباسیلوس مورد استفاده در این مطالعه، در پژوهش عزیزی و همکاران (Azizi et al., 2017) از فراورده لبنی سنتی پنیر موتال جداسازی شد. به منظور فعال‌سازی جدایه در دسترس، نمونه از فریزر ۸۰- (Holm & Halby, پروتئین، دانمارک) خارج و در بن ماری دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محتویات تیوب بر روی محیط کشت MRS آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد (Holm & Halby, پروتئین، دانمارک).

آماده‌سازی کشت‌های کرونوباکتر ساکازاکی

کرونوباکتر ساکازاکی از مرکز کلکسیون باکتری دانشگاه گوتنبرگ با شماره دسترسی CCUG 28860 خریداری شد. به منظور فعال‌سازی، کرونوباکتر ساکازاکی به صورت کشت شبانه در محیط کشت BHI برات و سپس روی محیط کشت VRBG آگار (Oxoid)، راسکیله، دانمارک) در شرایط میکروآئروفیلیک با استفاده از جار بی‌هوازی و گازپک در دمای ۳۷°C کشت داده شد (Charchoghlyan et al., 2016).

ارزیابی بقای جدایه لاکتوباسیلوس در مدل برون‌تنی نیمه دینامیک

برای انجام این آزمایش از روش Kos et al., 2000 با اصلاحات جزئی استفاده شد. از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۸۰۱۴ ATCC (خریداری شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) به عنوان نمونه شاهد در این آزمایش استفاده گردید. به شکل مختصر، ابتدا نمونه های شاهد و لاکتی پلانسی باسیلوس به مدت ۲۴ ساعت در MRS برات کشت داده شدند. محیط کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۸۱۰ × g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma 3_30K، آلمان) و سپس با استفاده از محلول استریل ۰.۵٪ NaCl سه بار شستشو داده شد. حجم‌های دو میلی‌لیتری از سوسپانسیون سلول‌های شسته شده به

سوسپانسیون سلولی در ۱۰ ml بافر PBS تا حدود 10^8 CFU/ml (OD_{۵۵۰} ۰/۲-۰/۳) مجدداً حل گردید. هر سوسپانسیون برای ۱۰ ثانیه ورتکس شده و در دمای اتاق به مدت ۶ ساعت انکوباسیون شد. سپس در هر ساعت، ۱ ml از سوسپانسیون بالایی برداشته شده و جذب در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Thermo Fisher، Genesys 30، Scientific، آمریکا). درصد خود انبوهش (Auto-A%) طبق فرمول ۱ محاسبه گردید (Campana et al., 2017).

$$\text{Auto-A\%} = 1 - (A_t/A_0) \times 100 \quad (1)$$

که در آن A_t جذب در زمان‌های مختلف و A_0 جذب در زمان صفر است. نتیجه نهایی خود انبوهش بر مبنای آخرین میزان جذب (پس از ۶ ساعت انکوباسیون) ذکر می‌شود.

برای آزمون هم انبوهش، مقادیر ۲ میلی‌لیتری از سوسپانسیون‌های باکتریایی لاکتوباسیلوس و کرونوباکتر با غلظت استاندارد سلولی (۰/۰۵ ± 0.25 ، $A_{600 \text{ nm}} = 10^8$ cells/ml، ۰/۵ مک فارلند) به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شده و به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق بدون تکان دادن قرار گرفت. نمونه‌های حاوی مقادیر ۴ میلی‌لیتری از سوسپانسیون باکتری لاکتوباسیلوس پلاتناروم (ATCC ۸۰۱۴) به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. در هر ساعت، ۱ ml از سوسپانسیون بالایی برداشته شده و جذب مخلوط‌ها (لاکتوباسیلوس و کرونوباکتر ساکارازی) طی ۴ ساعت انکوباسیون بررسی شد. نتیجه نهایی هم انبوهش بر مبنای آخرین میزان جذب (پس از ۶ ساعت انکوباسیون) ذکر می‌شود. جذب برای مخلوط و برای سوسپانسیون‌های باکتری به تنهایی تعیین، و درصد هم انبوهش طبق معادله زیر محاسبه شد، که در آن A_x و A_y به ترتیب نشان‌دهنده خواص انبوهش جدایه‌های لاکتوباسیلوس و کرونوباکتر به تنهایی و $A(x+y)$ انبوهش ترکیبی جدایه‌های لاکتوباسیلوس و کرونوباکتر است. همه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شدند (Campana et al., 2017).

$$\% \text{Coaggregation} = \frac{((A_x + A_y)/2) - A(x+y)}{A_x + A_y/2} \times 100 \quad (2)$$

حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه لاکتوباسیلوس

جدایه لاکتوباسیلوس از لحاظ انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج انسانی که قابل انتقال هستند، مورد بررسی قرار گرفت. اساس روش شامل تست مقاومت/حساسیت بر اساس آزمون میکرودیوژن است (Polka et al., 2016). بدین منظور، جدایه لاکتوباسیلوس به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت MRS آگار و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این آزمایش بر اساس پیشنهادات اداره ایمنی مواد غذایی اروپا، جنتامایسین (۱۲۸ mg/L)، کانامایسین (۱۰۲۴ mg/L)، استرپتومایسین (۲۵۶ mg/L)، تتراسایکلین (۶۴ mg/L)، اریترومایسین

فلاسک‌های استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر شیر به معده متشکل از محلول استریل NaCl ۰/۵٪ در pH ۲/۵ و ۴/۰، تنظیم شده با اسید کلریدریک ۱ مولار و پیپسین (سیگما، آمریکا) اضافه شده (۳ گرم در لیتر) منتقل شدند. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک شیکر چرخان (۱۵۰ دور در دقیقه)، حجم‌های ۱ میلی‌لیتری از هر فلاسک در زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه خارج شده و شمارش سلول‌های زنده انجام گردید. سپس محیط کشت موجود در هر شیر به معده با سانتریفوژ شدن در $2810 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه شسته شده، در ۵ میلی‌لیتر محلول NaCl ۰/۵٪ به تعلیق در آمده و با ۱۰ میلی‌لیتر از مایعات شبیه سازی شده روده (متشکل از محلول استریل NaCl ۰/۵٪ در pH ۸/۰ حاوی صفرا (۱۰ g/l) و پانکراتین (۱ g/l)) مخلوط شدند. این مخلوط در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک شیکر چرخان (۱۵۰ دور در دقیقه) انکوباسیون و سپس حجم‌های ۱ میلی‌لیتری بعد از ۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه خارج و شمارش سلول‌های زنده انجام گردید. هر آزمایش سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین CFU/ml اعلام گردید (de Carvalho et al., 2009).

هیدرولیز ال-آرژنین جدایه لاکتوباسیلوس

بررسی هیدرولیز ال-آرژنین توسط جدایه لاکتوباسیلوس با کشت در محیط آرژنین دار و تغییر رنگ معرف نسلر انجام گردید. بدین منظور، یک کلنی یا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به محیط مایع حاوی ۰/۳٪ اسید آمینه ال-آرژنین منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد (Iranian National Standard No. 19459. 2014). پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت روی کاغذ صافی حاوی معرف نسلر قرار داده و تغییر رنگ بررسی گردید. ایجاد رنگ نارنجی مایل به قرمز نشان دهنده واکنش مثبت و برای استفاده در محصولات شیرخواران و غذای کودک، غیر قابل قبول است. در این آزمایش از استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۵۹۲۳) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

آنالیز انبوهش باکتریایی جدایه لاکتوباسیلوس

سویه‌های دارای بالاترین درصد خود انبوهش و هم انبوهش، سویه‌های پروبیوتیکی برتر محسوب می‌شوند (Collado et al., 2008b). آزمون خود انبوهش جدایه براساس روش دل ری و همکاران (Del Re et al., 2000) و توماس و همکاران (Tomás et al., 2005) پس از تغییر جزئی به شرح زیر انجام گردید. جدایه لاکتوباسیلوس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸°C در MRS براث در شرایط میکروآئروفیلیک با استفاده از جار بی‌هوایی و گازپک کشت داده شد. سپس محیط کشت باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ و

(۱۶ mg/L)، کلیندامایسین (۳۲ mg/L)، آمپی سیلین (۱۶ mg/L)، ونکوماسین (۱۶ mg/L) و کلرامفنیکول (۶۴ mg/L) بود. تمام آزمون ها در پلیت های میکروبتیر ۹۶ چاهکی استریل (پلی استایرن) حاوی غلظت های مناسب آنتی بیوتیک ها مطابق با پروتکل ISO/IDF انجام شد. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شدند. در پایان دوره انکوباسیون، میزان رشد و تکثیر نمونه با مشاهده چشمی خوانده شد (Polka et al., 2016). در این آزمایش از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC ۸۰۱۴) به عنوان شاهد استفاده گردید.

ارزیابی تولید ایزومرهای لاکتیک اسید

تولید اسید لاکتیک در سوپرناتانت های حاصل از کشت هر یک از جدایه لاکتوباسیلوس و نمونه شاهد (لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۸۰۱۴ ATCC) رشد کرده در شرایط مطلوب خود با کیت تجاری (D-لاکتیک اسید/L-لاکتیک اسید، مگازایم) در سه تکرار مستقل تعیین گردید (Muñoz-Quezada et al., 2013).

ارزیابی تولید آمین های بیوژنیک

توانایی برخی از سویه های لاکتوباسیلوس در تولید آمین های بیوژنیک سمی به وجود فعالیت آمینو اسید دکربوکسیلاز مرتبط است. از این رو، می توان از یک روش کیفی بر اساس تغییر رنگ شاخص بروموکروزول بنفش (سیگما آلدریج، کپنهاگ، دانمارک) از زرد به بنفش در حضور هیستیدین، لیزین، اورنیتین و تیروزین اضافه شده به یک محیط کشت محدود غربالگری (Bover-Cid & Holzapfel, 1999) حاوی تریپتون (۰/۵٪)، عصاره مخمر (۰/۵٪)، کلرید سدیم (۰/۵٪)، توئین ۸۰ (۰/۵٪)، سولفات منیزیم (۰/۰۲٪)، سولفات منگنز (۰/۰۵٪)، سولفات آهن (II) (۰/۰۵٪) و کربنات کلسیم (۰/۰۱٪) در pH ۵/۰، با نشانگر بروموکروزول بنفش و بدون افزودن گلوکز (Møller et al., 2020) استفاده کرد. تغییر رنگ شاخص بروموکروزول بنفش از زرد به بنفش به عنوان فعالیت معنی دار آمینو اسید دکربوکسیلاز به حساب می آید که مربوط به حداقل ۳۵۰ میلی گرم از یک آمین بیوژنیک خاص / لیتر است (Olasupo et al., 2001). برای انجام این آزمایش از سویه لاکتوباسیلوس برویس ۴۱۲۱ CECT به عنوان کنترل مثبت برای تولید تیرامین و سویه لاکتوباسیلوس پارابوچنری KUH8 به عنوان کنترل مثبت برای تولید هیستامین، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC ۸۰۱۴) به عنوان نمونه شاهد و جدایه M17 استفاده شد. سویه هایی که قبلاً در MRS برات کشت شده بودند، در ۱۰۰ میکرولیتر به محیط های محدود حاوی اسیدهای آمینه و بروموکروزول بنفش تلقیح شدند. لوله های تلقیح شده به همراه لوله های کنترل منفی (محیط

محدود تلقیح نشده) به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و هر ۲۴ ساعت تغییر رنگ مشاهده شد. آزمایش ها در سه تکرار مستقل انجام شدند (Pérez Martínez et al., 2012). به منظور تأیید تولید آمین های بیوژنیک، پس از ۵ روز، ۱/۲ میلی لیتر از محیط مرحله قبل جمع آوری، و به مدت ۳۰ دقیقه در ۹۶۰۰x g سانتریفیوژ شد. مایع رویی با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر در لوله های اپندورف استریل جدید فیلتر، و تا زمان مشتق سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. غلظت آمین های بیوژنیک مواد رویی با استفاده از UPLC بر اساس روش ردروئل و همکاران (Redruello et al., 2013) اندازه گیری شد. مایع رویی فیلتر (۰/۴۵ μm) غشای استات سلولز، VWR، سوپورگ، دانمارک)، و ۱۰ برابر در هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار رقیق شد. سپس به ۱۷۵ میکرولیتر از بافر بورات ۱ مولار (۹/۰ pH)، ۷۵ میکرولیتر متانول و ۲ میکرولیتر L-آمینو آدیپیک اسید (۰/۰۷ میلی مولار) اضافه شد. پس از آن، ۳ میکرولیتر دی اتیل اتوکسی متیلن مالونات (DEEMM) اضافه، مخلوط و رتکس شد، و در ۳۰ درجه سانتی گراد در حمام اولتراسوند به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه ها در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند تا DEEMM غیرفعال شود. نمونه ها سپس سانتریفیوژ شدند (۱۰ دقیقه در ۹۶۰۰x g و دمای ۴ درجه سانتی گراد) و با استفاده از یک غشای PTFE (۰/۲۲ میکرومتر، VWR) در ویال مخروطی (VWR) فیلتر شدند. مقدار ۱ میکرولیتر از نمونه مشتق شده (۱۶ درجه سانتی گراد) با استفاده از ابزار UPLC (سیستم H-Class Acquity UPLCTM، Waters، تاستروپ، دانمارک) متصل به یک حسگر آرایه فوتودیود در ۲۸۰ نانومتر، با یک ستون (Acquity BEH C18، ۱/۷ μm، ۲۸۰ mm × ۲/۱×۱۰۰، واترز) در ۳۵ درجه سانتی گراد، طبق روش گزارش شده توسط (Redruello et al., 2013) مورد تحلیل قرار گرفت. معرف ها درجه HPLC بودند و از سیگما آلدریج (کپنهاگ، دانمارک) تهیه شدند. استاندارد با ۱۸ ترکیب آمینو از ترمو فیشر (راسکیله، دانمارک) خریداری شد. کروماتوگرام ها با تمام پیک های مربوط به ۳۰ ترکیب آمینه مورد بررسی (شامل ۲۲ اسید آمینه، یون آمونیوم و ۷ آمین بیوژنیک) در مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند و پروفایل های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Empower (نسخه ۳، واترز) آنالیز شدند (Møller et al., 2020).

ارزیابی فعالیت همولیتیک

به منظور برآورد فعالیت همولیتیک جدایه پروبیوتیک مورد مطالعه، آزمایش مطابق استاندارد ۱۹۴۵۹ صورت پذیرفت (Iranian National Standard No. 19459, 2014). بدین منظور جدایه لاکتوباسیلوس / استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۵۹۲۳) و لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC ۸۰۱۴) بر روی محیط کشت آگار حاوی خون گوسفند (۷٪

خون گوسفندی دفیبرینه) به روش نقطه ای کشت داده شدند. پلیت‌ها به صورت وارونه در دما و شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری و پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر وجود هاله شفاف حاصل از هیدرولیز سلول‌های خونی در اطراف کلنی‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. وجود هاله شفاف نشان دهنده واکنش مثبت و همولیز نوع بتا است که از نظر ایمنی نامطلوب است.

چسبندگی به موسین

به منظور بررسی چگونگی اتصال باکتری به موسین از روش (Bengoa et al., 2018) استفاده شد. به شکل مختصر، موسین (سیگما، آمریکا) با غلظت ۳ گرم در لیتر با استفاده از PBS حل و فیلتراسیون ($0.22 \mu m$) گردید و سپس برای اتصال به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه پلی استایرن استریل (Maxisorp Nunc، راسکیله، دانمارک) در آن وارد گردید. بدین منظور، پلیت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. انکوباسیون مجدد به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد تا محل‌های اتصال خالی در پلیت پلی استایرن به حداقل برسد. در نهایت، پلیت با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر PBS دو بار شستشو داده شد. یک میلی لیتر از نمونه‌های باکتری کشت داده شده در $1000 \times g$ و در ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ، و پلت تشکیل شده دو بار با محلول PBS شستشو داده شد. پلت باکتری در ۱ میلی لیتر محلول PBS حل گردید و سپس با استفاده از روش اسپکتوفتومتری و در $OD = 550 nm$ غلظت باکتری‌ها در 10^9 واحد تشکیل دهنده کلنی تنظیم گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هر باکتری به چاهک‌ها منتقل گردید. محیط به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گذاری شد. چاهک‌ها ۶ بار با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر محلول PBS شستشو داده شد تا باکتری‌هایی که اتصال پیدا نکرده اند از پلیت حذف شوند. دویست میکرولیتر از محلول ترایتون X100 با غلظت ۵ میلی‌لیتر/لیتر در چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا باکتری‌های متصل شده آزاد شوند. صد میکرولیتر از هر چاهک خارج و در PBS رقیق شد و بر روی پلیت MRS آگار کشت داده شد. از سویه *شرشیا کلی* K12 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محیط‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و سپس شمارش کلنی صورت گرفت.

چسبندگی به سلول‌های Caco-2

میزان چسبندگی جدایه M17 به سلول‌های اپی‌تلیال مطابق استاندارد ۱۹۴۵۹ مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شد

(Iranian National Standard No. 19459, 2014). سلول‌های Caco-2 با غلظت 10^5 سلول در چاهک در صفحات کشت ۱۲ چاهکی (Corning® Costar®، مرک، دانمارک) کاشته شدند و به مدت ۱۵ روز در اتمسفر مرطوب برای رسیدن به تمایز سلولی انکوبه شدند (Briske- Anderson, et al., 1997). سلول‌های Caco-2 به مدت ۱ ساعت در معرض تیمار با سوسپانسیون لاکتی پلانتهی باسیلوس پلاتناروم در DMEM بدون آنتی‌بیوتیک ($10^8 \times 5 CFU$ / چاهک) قرار گرفتند. بافر فسفات (غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار) به مخلوط‌های تیمار اضافه شد تا $pH 7.4 \pm 0.2$ حفظ شود. تک‌لایه‌های Caco-2 با محلول نمکی بافر فسفات Dulbecco (DPBS) شسته شدند تا سلول‌های باکتریایی غیر متصل، حذف شوند. سپس لاکتوباسیلوس‌های چسبیده با استفاده از ۱ میلی‌لیتر DPBS با محلول ۱٪ (v/v) تریتون X-100 جدا شدند. تعداد باکتری‌های چسبیده با استفاده از روش شمارش پلیت بر روی آگار MRS تعیین و نتایج به صورت درصد باکتری‌های چسبیده نسبت به مقدار باکتری‌های اضافه شده (درصد CFU باکتری‌های چسبیده / CFU باکتری‌های اضافه شده) بیان شد (Campana et al., 2017). از سویه لاکتوباسیلوس فرمنتوم PCC به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Srimahaeak et al., 2021).

جلوگیری از چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های CaCo-2

آزمون‌های مهار کنندگی شامل حذف، رقابت و جابجایی با استفاده از سویه M17 انجام شد. سوسپانسیون‌های باکتریایی سویه M17 و کرونوباکتر ساکازاکی همان طور که در بالا توضیح داده شد، تهیه شدند. برای آزمون حذف، تک لایه‌های Caco-2 با ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون M17 به مدت ۱ ساعت تیمار و سپس با PBS شسته شدند تا باکتری‌های غیر چسبیده حذف شوند. در این مرحله، ۱ میلی‌لیتر از کرونوباکتر ساکازاکی به تک‌لایه‌های سلولی برای ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO_2 اضافه شد. در پایان انکوباسیون، سلول‌ها ۳ الی ۵ بار با PBS شسته، و با تریتون X-۱۰۰ (۰.۵٪ در PBS) لیز شدند. در نهایت، سلول‌های لیز شده به صورت سریالی در محلول نمکی فیزیولوژیکی رقیق شدند، به محیط کشت حاوی آگار منتقل و در شرایط کشت مناسب برای شمارش CFU/ml انکوبه شدند. برای آزمون رقابت، سلول‌ها در معرض سوسپانسیون مخلوط (۱:۱) از کرونوباکتر ساکازاکی و M17 قرار گرفتند. پس از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO_2 ، تک لایه‌ها ۳ الی ۵ بار با PBS شسته، و با تریتون X-۱۰۰ (۰.۵٪ در PBS) لیز شدند. سپس سلول‌های لیز شده به صورت سریالی در سالیین رقیق شدند، به محیط کشت حاوی آگار منتقل و در شرایط کشت مناسب برای شمارش

بافر PBS شسته شده و باکتری‌های متصل پس از افزودن تربیتون $100 \times (0.5\%)$ شمارش شدند. سه آزمون مستقل و هر سنجش در سه تکرار انجام و درصد مهار پاتوژن با استفاده از فرمول ۳ محاسبه شد (Collado et al., 2008b):

$$\% \text{inhibition} = \frac{(\% \text{adherence of pathogen}) - (\% \text{adherence of pathogen with probiotic})}{\% \text{adherence of pathogen}} \times 100 \quad (3)$$

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیزهای آماری با بسته R انجام شد. آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون توکی ($P < 0.05$) برای بررسی تفاوت‌های معنی دار بین تیمارها در سنجش چسبندگی مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بقای سویه در شرایط مشابه دستگاه گوارش با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 انجام شد.

نتایج

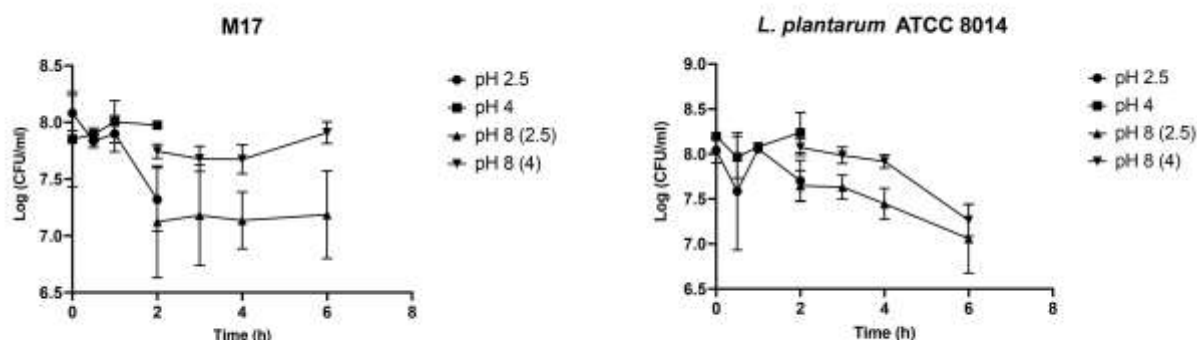
شناسایی خواص پروبیوتیکی

میزان بقای جدایه M17 و لاکتوباسیلوس پلانتروم ATCC ۸۰۱۴ در فاصله زمانی ۶ ساعته تحت شرایط مشابه دستگاه گوارش مورد ارزیابی قرار گرفت؛ حرکت توده غذا در دستگاه گوارش حداقل به ۶ ساعت زمان نیاز دارد (Grodner et al., 2021). این آزمون شامل مقاومت در برابر pH پایین محیط، پپسین، نمک‌های صفراوی و پانکراتین بود. شبیه سازی اثر انگوباسیون باکتری‌های جدایه M17 و لاکتوباسیلوس پلانتروم ATCC ۸۰۱۴ با شیر معده و روده در شکل ۱ آورده شده است.

CFU/ml انگوبه شدند. برای ارزیابی توانایی سویه M17 در جابجایی باکتری‌های ساکاراکی، این باکتری به سلول‌های Caco-2 اضافه، و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انگوبه شد. پس از شستشو و حذف پاتوژن‌های غیر متصل، M17 به چاهک‌ها افزوده، و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انگوبه شدند. سپس، چاهک‌ها شسته، و سلول‌ها لیز شدند و شمارش باکتری‌ها انجام شد. مهار کرونوباکتر ساکاراکی به عنوان تفاوت بین چسبندگی کرونوباکتر قبل و بعد از افزودن سویه M17 محاسبه شد. سه آزمون مستقل و هر سنجش در چهار تکرار انجام شد (Campana et al., 2017).

جلوگیری از چسبندگی کرونوباکتر ساکاراکی به موسین

به منظور ارزیابی توانایی سویه M17 در مهار، جابجایی و رقابت، روش (Collado et al., 2008b) با برخی تغییرات استفاده شد. چاهک‌های پلی استایرن همان طور که قبلاً توضیح داده شد، آماده شدند. برای آزمون مهار، پس از انگوباسیون و شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی M17 (10^8 – 10^9 CFU/ml) به چاهک‌ها اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انگوبه شد. چاهک‌ها دو بار با PBS شسته شدند و اطمینان حاصل شد که بافر در چاهک‌ها باقی نمانده است. در مجموع ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کرونوباکتر ساکاراکی (10^8 CFU/ml) اضافه، و به مدت ۱ ساعت انگوبه شد. برای سنجش جابجایی، روش فوق‌الذکر انجام شد، اما ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کرونوباکتر ساکاراکی به مدت ۱ ساعت به چاهک‌ها اضافه، و قبل از انگوباسیون با سوسپانسیون M17 شسته شد. برای آزمون رقابت، چاهک‌ها در معرض سوسپانسیون مخلوط (۱:۱) از کرونوباکتر ساکاراکی و M17 قرار گرفتند. در تمامی موارد، چاهک‌ها با



شکل ۱- شبیه سازی اثر انگوباسیون جدایه M17 و لاکتوباسیلوس پلانتروم ATCC ۸۰۱۴ در شیر معده و روده در فاصله زمانی ۶ ساعته
Fig. 1. Effect of incubation of isolate M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 in simulated gastric and intestinal juice for 6 hours

جدول ۱- درصد زنده‌مانی جدایه‌های M17 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴ در شیر معده و روده در فاصله زمانی ۶ ساعته
Table 1- Survival percentage of M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 in simulated gastric and intestinal juice for 6 hours

سویه	لاکتی پلانتهی باسیلوس پلانتاروم M17				لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴			
Strain	<i>L. plantarum</i> M17				<i>L. plantarum</i> ATCC 8014			
pH	2.5	4	8 with initial pH 2.5	8 with initial pH 4	2.5	4	8 with initial pH 2.5	8 with initial pH 4
			۸ با pH اولیه ۲/۵	۸ با pH اولیه ۴			۸ با pH اولیه ۲/۵	۸ با pH اولیه ۴
Time زمان (h)	2	2	6	6	2	2	6	6
ضریب زنده مانگی (%)	90.55±1.71	101.76±5.22	89.01±6.43	100.91±4.86	95.79±2.67	100.52±2.60	87.86±5.92	88.63±2.32
Survival rate	abcd	a	bcd	ab	abcd	abc	d	cd

مقادیر، میانگین سنجش‌ها با سه تکرار ± انحراف معیار هستند. a,b,c,d داده‌های موجود در هر ردیف با رونوشت‌های متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

The data are represented as the mean ± standard deviation with three replicates. a,b,c,d, the data in each row indicate significant differences with different transcripts ($P < 0.05$)

بدست آمده در این مطالعه نشان داد که هر دو نمونه جدایه M17 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴ رنگ زرد را نشان دادند که تأییدی بر ایمن بودن این باکتری‌ها می‌باشد. در این آزمایش رنگ مربوط به نمونه کنترل مثبت (باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳ ATCC) نارنجی متمایل به قرمز گزارش شد.

درصد خود انبوهش برای جدایه مورد مطالعه و لاکتوباسیلوس پلانتاروم به ترتیب ۲۴/۳۸ و ۲۵/۲۸ بعد از ۶ ساعت برآورد گردید که از لحاظ آماری تفاوت معنی داری بین نمونه شاهد و جدایه M17 وجود نداشت ($P > 0.05$). بررسی پارامترهای خود انبوهش و هم انبوهش نشان از توانایی مناسب سویه M17 در مهار کرونوباکتر ساکازاکی داشت (جدول ۲). ما از لاکتوباسیلوس رامنوسوس LGG به عنوان کنترل مثبت استفاده کردیم که بالاترین توانایی خود انبوهش را نشان داد (۳۲٪). آنالیز آماری بین دو سویه M17 و LGG نشان از تفاوت معنی دار آماری ندارد ($P > 0.05$). بنابراین سویه M17 دارای ویژگی‌های خودانبوهش و هم انبوهش مشابه با سویه استاندارد LGG است.

بهترین درصد زنده مانگی برای هر دو گونه شاهد و تیمار در pH برآورد گردید. تفاوت معنی داری بین دو گونه مورد مطالعه در pH وجود نداشت ($P > 0.05$) و حتی تکثیر جزئی نیز در این pH صورت پذیرفت. پس از ۱۲۰ دقیقه حضور در pH = ۲/۵، درصد زنده مانگی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴ بیشتر از سویه M17 برآورد گردید ولی این تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). طبق استاندارد ملی ایران ۱۹۴۵۹، پس از آزمون مقاومت به شیر معده، تعداد شمارش شده نباید کمتر از 10^6 باشد (Iranian National Standard No. 19459. 2014). پس از ۴ ساعت حضور باکتری‌ها در pH = ۸، جدایه M17 درصد زنده‌مانی بالاتری از لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴ را نشان داد که این اختلاف پس از انتقال از pH = ۴ معنی‌دار بود ($P < 0.05$) (جدول ۱). این نتایج تأییدی بر مقاومت مناسب جدایه M17 نسبت به شرایط دستگاه گوارش است. آزمایش هیدرولیز آل-آرژنین به منظور بررسی ایمنی جدایه M17 برای نوزادان انجام شد. این آزمایش کیفی با تغییر رنگ از زرد تا نارنجی متمایل به قرمز باکتری‌های ایمن را از غیر ایمن تفکیک می‌نماید. نتایج

جدول ۲- درصد خود انبوهش و هم انبوهش سویه‌های M17 و LGG با کرونوباکتر ساکازاکی

Table 2- Percentage of auto-aggregation and co-aggregation of M17 and LGG strains with *C. sakazakii*

سویه	خود انبوهش پس از ۶ ساعت	هم انبوهش با کرونوباکتر ساکازاکی پس از ۶ ساعت
Strain	Auto-aggregation after 6 h (%)	Co-aggregation after 6 h (%)
M17	24.38 ± 4.56 ^a	18.09 ± 1.96 ^a
لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC 8014	25.28 ± 4.06 ^a	13.22 ± 1.92 ^b
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014		
LGG	32.00 ± 1.40 ^a	21.71 ± 1.72 ^a

مقادیر، میانگین سنجش‌ها با سه تکرار ± انحراف معیار هستند. a,b داده‌های موجود در هر ستون با رونوشت‌های متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

The data are represented as the mean ± standard deviation with three replicates. a,b, the data in each row indicate significant differences with different transcripts ($P < 0.05$).

به روزرسانی معیارهای ارزیابی مقاومت باکتریایی در برابر آنتی بیوتیک‌ها در انسان و حیوانات بسیار حائز اهمیت است. از این رو، پانل آنتی‌بیوتیکی (EFSA J 732:1-15) برای افزودنی‌ها و یا مواد غذایی مورد استفاده در دام ایجاد شده است (European Food Safety Authority, 2008). برای آزمون، آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، و کلرامفنیکل استفاده می‌شود. نتایج مقادیر آزمون MIC برای حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های لاکتوباسیلوس در برابر ۱۰ آنتی بیوتیک آزمایش شده در جدول ۳ آورده شده است. سویه مرجع مقادیر

جدول ۳- تعیین میزان حساسیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم مرجع و M17 در برابر آنتی‌بیوتیک

Table 3- Antibiotic sensitivity of reference strain *L. plantarum* and M17 ANTIBIOTIC [MIC ($\mu\text{G/ML}$)]

سویه Strain	آمپی سیلین AMP	جنتامایسین GEN	کانامایسین CAN	اریترومایسین ERY	کلیندامایسین CLI	تتراسایکلین TET	کلرامفنیکول CHL
نقطه انفصال *breakpoint	2	16	64	1	2	32	8
لاکتوباسیلوس <i>L. plantarum</i> ATCC 14917	0.25	<4	64	0.25	1	16	8
M17	0.5	16	128	0.5	4	16	8

* مقادیر توصیه شده EFSA لاکتوباسیلوس پلانتاروم هتروفرماتیبو استاندارد ارائه شده است.

*Values are according to EFSA recommendations for heterofermentative *L. plantarum* strains

جدول ۴- مقدار اسیدهای لاکتیک تولید شده به تفکیک برای نمونه‌های مرجع و M17

Table 4- Lactic acid isomers produced by reference strain and M17

سویه Strain	D-لاکتیک اسید D-lactic acid		L-لاکتیک اسید L-lactic acid		لاکتیک اسید کل Total lactic acid
	%	گرم در لیتر g/L	%	گرم در لیتر g/L	گرم در لیتر g/L
M17	53.70	7.80 ± 0.64	46.30	6.73 ± 0.34	14.54 ± 0.99
لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۸۰۱۴ <i>L. plantarum</i> ATCC 8014	16.89	0.33 ± 0.02	83.11	1.64 ± 0.29	1.97 ± 0.31
LGG	12.07	1.67 ± 1.06	87.93	12.30 ± 0.44	13.99 ± 0.51

مطابق الزامات ایمنی EFSA، نمونه M17 و مرجع فاقد فعالیت بتاهمولتیک بودند، در حالی که نمونه کنترل مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳ ATCC فعالیت همولیتیکی را نشان داد. بررسی چگونگی اتصال به موسین نیز تایید کرد که سویه M17 چسبندگی کمتری ($1/14^a \pm 12/10^a$ ٪) نسبت به لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۸۰۱۴ ATCC ($2/30^a \pm 13/33^a$ ٪) و LGG ($2/06^a \pm 15/93^a$ ٪) دارد، هرچند که از لحاظ آماری این اختلاف‌ها معنی‌دار نبودند ($P > 0.05$). با این حال، میزان چسبندگی در نمونه کنترل مثبت ($25/19 \pm 4/40$) برآورد گردید که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با سایر سویه‌ها دارد ($P < 0.05$) (جدول ۵).

تولید آمین‌های بیوژنیک توسط باکتری‌های اسید لاکتیک خاصیت مطلوبی نیست و تنها ایزوله‌های منفی به عنوان پروبیوتیک مناسب هستند. نتایج این بخش نشان داد که علی‌رغم مثبت شدن نتایج آزمون باکتری‌های لاکتوباسیلوس پارابوچنری KUH8 (تولید کننده هیستامین) و لاکتوباسیلوس برویس CECT ۴۱۲۱ (تولید کننده تیرامین) که در این مطالعه به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند، نمونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم مرجع و ایزوله M17 در محیط کشت، پیش سازهای آمین بیوژنیک را تولید نکردند (شکل ۲).

یکی دیگر از الزامات ایمنی EFSA، بررسی چسبندگی باکتری به سلول‌های CaCo-2 است. نتایج به دست آمده از این آزمون نشان داد که ایزوله بررسی شده در این مطالعه، در مقایسه با کنترل مثبت، به شکل معنی‌داری درصد چسبندگی کمتری ($1/41 \pm 6/8$) با سلول‌های CaCo-2 داشت ($P < 0/05$). این مقدار برای نمونه لاکتوباسیلوس پلاتناروم مرجع ($3/53 \pm 13/77$) و نمونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم PCC ($7/54 \pm 21/6$) برآورد گردید (جدول ۶).

بررسی بازدارندگی چسبندگی سویه‌های پروبیوتیک M17 و LGG در سه روش حذف، رقابت و جابه جایی نشان از توان سویه‌های مورد مطالعه در کاهش چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های

CaCo-2 بود (جدول ۷). سویه LGG درصد بازدارندگی بالاتری را با روش حذف نشان داد، و سویه M17 با روش جابجایی کمترین درصد بازدارندگی را داشت. با این حال، آنالیز آماری نتایج، تفاوت معنی‌داری بین دو سویه با روش بازدارندگی یکسان نشان نمی‌دهد ($P > 0/05$). از این رو، عملکرد M17 مشابه با پروبیوتیک استاندارد LGG می‌باشد. بررسی بازدارندگی چسبندگی سویه‌های پروبیوتیک M17 و LGG در سه روش مهار، رقابت و جابه جایی توانایی سویه‌های مورد مطالعه در کاهش چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به موسین را نمایش داد (جدول ۸). آنالیز آماری نتایج تفاوت معنی‌داری بین سویه M17 و سویه استاندارد LGG نشان نمی‌دهد ($P > 0/05$). از این رو، عملکرد M17 مشابه با پروبیوتیک استاندارد LGG می‌باشد.

جدول ۵- درصد چسبندگی سویه M17 و سویه‌های مرجع به موسین

Table 5- Mucin adhesion of M17 and reference strains

سویه Strain	M17	لاکتوباسیلوس پلاتناروم ATCC 8014 <i>L. plantarum</i> ATCC 8014	اشرشیا کلی <i>E. coli</i> K12
چسبندگی به موسین (%) Mucin adhesion	12.10 ± 1.14^b	13.33 ± 2.30^b	25.19 ± 4.40^a

جدول ۶- درصد چسبندگی سویه M17 و سویه‌های مرجع به سلول‌های CaCo-2

Table 6- Caco-2 adhesion of M17 and reference strains

سویه Strain	M17	لاکتوباسیلوس پلاتناروم ATCC 8014 <i>L. plantarum</i> ATCC 8014	لاکتوباسیلوس فرمنتوم <i>L. fermentum</i> PCC
چسبندگی به سلول‌های CaCo-2 (%) CaCo-2 adhesion	6.8 ± 1.41^b	13.77 ± 3.53^{ab}	21.6 ± 7.54^a

جدول ۷- درصد کاهش چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های CaCo-2 تحت تأثیر سویه‌های M17 و LGG

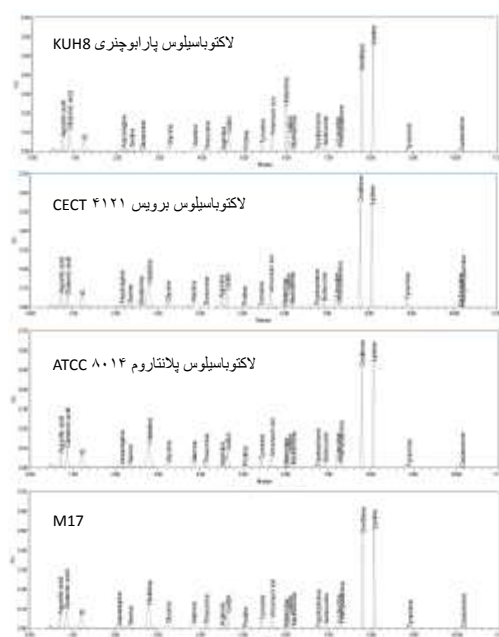
Table 7- Reduction of *C. sakazakii* adhesion to CaCo-2 cells under the influence of M17 and LGG strains

روش بازدارندگی Antagonism method	حذف Exclusion	رقابت Competition	جابجایی Displacement
سویه Strain			
M17	19.10 ± 4.55^{ab}	$\pm 4.60^{ab}$ 17.21	9.86 ± 5.22^b
LGG	25.61 ± 5.45^a	$\pm 7.41^a$ 23.42	$\pm 5.70^{ab}$ 15.71

جدول ۸- درصد کاهش چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به موسین تحت تأثیر سویه‌های M17 و LGG

Table 8- Reduction of *C. sakazakii* adhesion to mucin under the influence of M17 and LGG strains

روش بازدارندگی Antagonism method	مهار Inhibition	رقابت Competition	جابجایی Displacement
سویه Strain			
M17	14.72 ± 7.06^b	17.31 ± 3.90^b	12.44 ± 4.81^b
LGG	24.47 ± 2.81^{ab}	35.65 ± 6.23^a	17.53 ± 4.32^b



شکل ۲- بررسی تولید آمین‌های بیوژنیک در گونه‌های مورد مطالعه

باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پارابوچنری* KUH8 (تولید کننده هیستامین) و *لاکتوباسیلوس برویس* CECT ۴۱۲۱ (تولید کننده تیرامین) به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده اند.

Fig. 2. Production of biogenic amines in the studied species

Lactobacillus parabucheneri KUH8 (histamine producer) and *L. brevis* CECT 4121 (tyramine producer) were used as positive controls

بحث

پروبیوتیک‌ها باید قادر به عبور از معده باشند، جایی که pH می تواند تا ۳/۰ پایین باشد و به مدت ۲ الی ۴ ساعت زنده بمانند (Liong, Shah & 2005). به همین ترتیب، آنها باید قادر به عبور از دوازدهه، که در آن مقادیر نمک‌های صفراوی می‌تواند تا ۰/۷٪ بالا باشد، زنده بمانند (Barrett et al., 2009). زنده ماندن در این شرایط سخت گوارشی، پروبیوتیک‌ها را قادر می‌سازد تا زنده به روده باریک برسند، در آن مستقر شوند و فواید خود را آشکار سازند. مقاومت به صفرا یک پیش نیاز برای استقرار و فعالیت متابولیکی پروبیوتیک‌ها در روده باریک است (Singhal et al., 2010). نمک‌های صفراوی دارای اثرات ضد میکروبی علیه برخی از میکروارگانیسم‌ها هستند (Fontana et al., 2013) و ممکن است سرعت رشد را کاهش دهند (Liu et al., 2020). با این حال، برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک هیدرولازهای نمک‌های صفراوی تولید می‌کنند که نمک‌های صفراوی مزدوج را هیدرولیز کرده و در نتیجه سمیت آنها را کاهش می‌دهد (Liong & Shah, 2005). میانگین غلظت صفرا در دوازدهه حدود ۰/۳٪ است (Jose et al., 2015). در این مطالعه جدایه M17، در محیط کشت مایع حاوی ۱٪ نمک‌های صفراوی مقاومت نشان داد. این یافته‌ها با نتایج چندین

مطالعه همخوانی دارد (Bassyouni et al., 2012; Jose et al., 2015; Abushelaibi et al., 2017).

آرژنین برای نوزادان ضروری است زیرا قادر به سنتز آن نیستند (Aristoy & Toldrá, 2012). بنابراین عدم هیدرولیز آل-آرژنین یک معیار انتخاب برای سویه‌های جدید مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک برای نوزادان پیشنهاد شده است. بر اساس این مفهوم، سویه مورد مطالعه می‌تواند کاندیدای مناسبی برای استفاده به عنوان پروبیوتیک در شیر خشک باشد. مطالعات دیگر آمین زدایی آرژنین را توسط سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* گزارش کردند (Ruiz-Moyano et al., 2009). با این حال برخی مطالعات، حاکی از عدم توانایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در هیدرولیز آرژنین بودند (Papamanoli et al., 2003). خود انبوهش به تجمع سلول‌های باکتریایی اشاره دارد که از نظر ژنتیکی یکسان هستند (Grady et al., 2011). خود انبوهش به توانایی سلول‌های میکروبی برای چسبیدن به سلول‌های اپی‌تلیال و سطوح مخاطی مربوط می‌شود (Collado et al., Del Re et al., 2000). در این مطالعه، جدایه مورد مطالعه خاصیت خود انبوهش مناسبی از خود نشان داد که نشان دهنده توانایی چسبیدن به اپی‌تلیوم روده و مقاومت در برابر حرکت غذا در لوله گوارش است. خود انبوهش صرفاً آزمایش غربالگری اولیه برای باکتری‌های چسبنده است (Del

طبیعی میکروبیوتای روده را حتی زمانی که میزبان تحت درمان با آنتی بیوتیک است حفظ می‌نماید (Bacha et al., 2010).

گونه‌های باکتریایی از جنس باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند L(+)-لاکتیک اسید، D(-)-لاکتیک اسید، مخلوط راسمیک DL-لاکتات یا ترکیبی از این‌ها تولید کنند (Cekola et al., 2015). سویه مورد مطالعه توانایی تولید هر دو ایزومر D و L لاکتیک اسید را دارد. در انسان، اسیدوز D(-)-لاکتیک یک رویداد متابولیک نادر است که فقط در افراد مبتلا به سندرم روده کوتاه گزارش شده است (Ewaschuk et al., 2005). مطالعات بالینی انجام شده در کودکان نشان می‌دهد که مصرف باکتری‌های پروبیوتیک تولید کننده D(-)-لاکتیک اسید بی خطر است و باعث افزایش طولانی مدت D(-)-لاکتیک اسید خون نمی‌شود (Papagaroufalos et al., 2014). علاوه بر این، باکتری‌های تولیدکننده D(-)-لاکتیک اسید قرن‌ها از مواد غذایی تخمیر شده مانند ماست، کلم ترش و خیارشور و اخیراً از مکمل‌های پروبیوتیک بدون علائم منفی مرتبط، توسط انسان مصرف می‌شوند (Vitetta et al., 2017).

آمین‌های بیوژنیک که یکی از متابولیت‌های بیوژنیک نامطلوب باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شوند، باید به عنوان معیاری برای انتخاب سویه‌های پروبیوتیک استفاده شوند (Pereira et al., 2001). مطالعه ما نشان داد که هیچ پتانسیل تولید آمین‌های بیوژنیک در سویه لاکتی پلانتهی باسیلوس پلانتاروم آزمایش شده وجود ندارد. در تأیید نتایج ما، سویه لاکتوباسیلوس پلانتارومی که به عنوان یک ارگانیسم پروبیوتیک بالقوه شناسایی شده است (Noomhorm & Pianpumepong, 2010) هیچ فعالیت دکربوکسیلازی نشان نداد. مشاهدات مشابهی توسط هولزافل و بوور کید (Holzapfel & Bover-Cid, 1999) و ایرکیلا (Erkkilä et al., 2001) با استفاده از همین گونه گزارش شده است. با این حال، برخی از محققین در مورد سویه‌های لاکتوباسیلوس خاص، نتایج متفاوتی گزارش داده‌اند (Priyadarshani & Rakshit, 2011; Holzapfel & Bover-Cid, 1999). این امر، ماهیت اختصاصی بودن این ویژگی برای هر سویه میکروارگانیسم را نشان می‌دهد. همان‌طور که توسط اوزگول (Özogul, 2007) گزارش شده است، تولید آمین‌ها می‌تواند در میان گونه‌های باکتریایی یک خانواده و حتی بین سویه‌های یک گونه باکتری متفاوت باشد. بنابراین، به وضوح مشهود است که برای جلوگیری از تولید آمین‌های بیوژنیک و کاهش خطر مسمومیت، نیاز به شناسایی و تعیین ویژگی‌های سویه‌های باکتریایی در نظر گرفته شده برای استفاده در مواد غذایی و بررسی توانایی بالقوه آنها در تولید آمین‌های بیوژنیک وجود دارد.

بنابراین، باید سنجش چسبندگی در شرایط برون تنی یا درون تنی برای اثبات توانایی چسبندگی انجام شود. هم انبوهش، تجمع سلول‌های باکتریایی است که از نظر ژنتیکی متمایز هستند (Grady et al., 2011). این ویژگی در جلوگیری از چسبیدن پاتوژن‌ها به مخاط روده مهم است (Botes et al., 2008). علاوه بر این، از طریق هم انبوهش، باکتری‌های اسید لاکتیک ترکیبات ضد میکروبی را در مجاورت با پاتوژن‌ها ترشح می‌کند که مانع بقای آنها در دستگاه گوارش می‌شود (Li et al., 2015). از نتایج، به نظر می‌رسد که LGG، در مهار کرونوباکتر ساکارازی موثرتر از M17 باشد. به طور کلی، سویه‌های چسبنده تر، درصد هم انبوهش بالاتری را نشان می‌دهند. هم انبوهش مشاهده شده با کرونوباکتر ساکارازی با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (Collado et al., 2008a).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک ذاتی است و مکانیسم‌های درگیر عبارتند از عدم وجود هدف، نفوذپذیری کم، غیرفعال‌سازی آنتی‌بیوتیک و وجود مکانیسم‌های خروجی (Radulović et al., 2012). مقاومت مکرر لاکتیک اسید باکتری‌ها به آمینوگلیکوزیدها و لینکوزامیدها توسط مطالعات مختلف گزارش شده است (Byakika et al., 2020). اگرچه مقاومت به تتراسایکلین شایع ترین مقاومت اکتسابی گزارش شده در ایزوله‌های لاکتوباسیلوس با منشأ غذایی است، اما ایزوله مورد مطالعه ما نسبت به تتراسایکلین حساس نبود. نتایج این مطالعه، سایر مطالعات را تأیید می‌کند که نشان دهنده شیوع گسترده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های غذایی لبنی است که تا حدی ناشی از استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در چند سال گذشته در حیوانات و انسان‌ها است (Pesavento et al., 2014). نگرانی‌هایی وجود دارد که برخی از لاکتیک اسید باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ممکن است مخازن ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند که قادر به انتقال به پاتوژن‌ها باشند (Mathur & Singh, 2005). با این حال، با مقاومت ذاتی، خطر انتقال ژن‌های مقاومت نه تنها بر اساس حدس و گمان، بلکه عملاً غیرممکن است (Radulović et al., 2012). به عنوان مثال، تصور می‌شود که مقاومت لاکتوباسیلوس‌ها در برابر آمینوگلیکوزیدهایی مانند کانامایسین ذاتی است (Hummel et al., 2007). مقاومت لاکتیک اسید باکتری‌ها به کانامایسین و کلیندامایسین در منابع دیگر نیز گزارش شده است (Mathara et al., 2008). حساسیت سویه‌های ارزیابی شده در این مطالعه به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مانند اریترومایسین، آمپی سیلین و کلرامفنیکل نیز در مطالعات پیشین گزارش شده است (Abushelaibi et al., 2017). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌تواند یک ویژگی مطلوب باشد زیرا بقای آنها را تضمین می‌کند و در نتیجه تعادل

همولیز یکی از عوامل مهم بیماریزایی در باکتری‌های پاتوژن است، و از این رو، یکی از جنبه‌های ایمنی سویه مورد مطالعه، آزمایش برون تنی برای فعالیت همولیتیک در نظر گرفته شده است. در تحقیق حاضر، جدایه M17 باعث همولیز آلفا یا بتا نشد، علی‌رغم این که همولیز آلفا در بین لاکتوباسیلوس‌های با منشأ غذایی و محصولات لبنی غیرمعمول نیست (Kaktcham et al., 2012).

پروبیوتیک‌ها باید ابتدا خود را به اپی‌تلیوم روده بچسباند تا بتوانند مزایای سلامتی را برای میزبان خود به ارمغان آورند (Chou & Weimer). چسبندگی تا حدی آنها را قادر می‌سازد تا در برابر حرکات لوله گوارش مقاومت کنند (Tomáška et al., 2015). علاوه بر این، چسبندگی پروبیوتیک‌ها موجب جابجایی پاتوژن‌ها از سطح مشترک مجرای مخاطی از طریق رقابت برای مکان‌های اتصال در سطوح اپی تلیال و/یا مخاطی می‌شود (Veerappan et al.; Collado et al., 2007). مطالعات همچنین گزارش داده اند که چسبندگی برخی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بر روی اپی‌تلیوم روده باعث ایجاد پاسخ های ایمنی خاص می‌شود. اتصال پروبیوتیک‌ها همچنین می‌تواند عملکرد سد روده^۱ را بهبود بخشد و نفوذپذیری آن را در برابر پاتوژن‌ها و آنتی‌ژن‌ها کاهش دهد (Caballero-Franco et al., 2007). علاوه بر این، اتصال آنها به روده می‌تواند باعث تحریک ترشح ترکیبات ضد میکروبی توسط سلول‌های اپی‌تلیال روده شود (Veerappan et al., 2012). ما در این مطالعه چسبندگی لاکتی پلانسی باسیلوس پلانتروم سویه M17 و همچنین توانایی آن در بازدارندگی چسبندگی کرونوباکتر ساکاراکی به موسین و سلول‌های Caco-2 را آزمایش کردیم. مقادیر چسبندگی در محدوده ای بود که قبلاً برای لاکتوباسیلوس‌ها گزارش شده بود (Collado et al., 2007).

توانایی حذف یا جابجایی پاتوژن‌ها از موسین و سلول‌های روده توسط سایر لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک قبلاً گزارش شده است (Sherman et al., 2005). به نظر می‌رسد توانایی بازدارندگی چسبندگی پاتوژن‌ها هم به لاکتوباسیلوس‌ها و هم به پاتوژن آزمایش شده بستگی دارد که نشان دهنده اختصاصیت بسیار بالا است. سویه LGG با روش حذف، مؤثرترین روش بازدارنده چسبندگی کرونوباکتر ساکاراکی به سلول‌های Caco-2 بود، در حالی که همین سویه با روش

منابع

1. Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P., & Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT—Food Science and Technology*, 79, 316–325. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.lwt.2017.01.041>
2. Agostoni, C., Axelsson, I., Goulet, O., Koletzko, B., Michaelsen, K.F., Puntis, J.W.L., Rigo, J., Shamir, R., Szajewska, H., Turck, D., Vandenplas, Y., & Weaver, L.T. (2004). Preparation and handling of powdered infant

رقابت بیشترین درصد بازدارندگی چسبندگی به موسین را نشان داد. هر دو سویه با روش جابجایی کمترین توانایی بازدارندگی چسبندگی به سلول‌های Caco-2 و موسین را داشتند. این نتایج حاکی از آن است که بازدارندگی چسبندگی می‌تواند با چسبنده‌ها و گیرنده‌های اختصاصی پروبیوتیک و پاتوژن برای آن با هم رقابت کنند (Lee & Puong, 2002) یا با عوامل دیگری مانند هم‌انبوهش هر دو سویه (Reid et al., 1988) مرتبط باشد. طبق نتایج ما می‌توان اظهار کرد که به‌ویژه هم‌انبوهش بین کرونوباکتر ساکاراکی و سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌تواند در کاهش چسبندگی پاتوژن به موسین نقش داشته باشد و این ویژگی می‌تواند برای غربال‌گری پروبیوتیک‌های خاص برای استفاده در شیرخشک نوزادان استفاده شود.

این مطالعه اختصاصیت بسیار بالایی را در بازدارندگی چسبندگی کرونوباکتر ساکاراکی توسط سویه مورد مطالعه گزارش می‌کند که نشان‌دهنده نیاز به شناسایی موردی سویه‌های پروبیوتیک است. چنین مطالعاتی امکان انتخاب سویه‌هایی را با کاربرد بالقوه در پیشگیری یا درمان عفونت‌های گوارشی خاص فراهم می‌کند. این مطالعه نشان می‌دهد که سویه‌ها باید بر اساس کاربرد مورد نظرشان انتخاب شوند، زیرا اختصاصیت عمل یک سویه خاص ممکن است بسیار بالا باشد. انتخاب پروبیوتیک‌هایی که یک پاتوژن خاص را مهار یا جابجا می‌کنند، رویکرد منطقی برای پیشگیری یا درمان عفونت ناشی از آن پاتوژن خواهد بود. با این حال، باید در نظر گرفت که مطالعات درون تنی برای تأیید چنین تأثیرات بالقوه ای ضروری است.

نتیجه‌گیری

سویه‌های لاکتیک اسید باکتری با توانایی قابل قبول برای چسبیدن به سلول‌های اپی‌تلیال می‌توانند برای استقرار در روده مناسب باشند. آنها می‌توانند به عنوان مانعی برای مبارزه با پاتوژن‌ها از طریق مکانیسم‌های رقابتی مختلف، مانند هم‌انبوهش با پاتوژن‌ها و چسبندگی عمل کنند. سویه M17 پروفایل ایمنی و ویژگی‌های پروبیوتیکی مناسبی دارد زیرا فعالیت تداخلی قابل قبولی در مقابل تهاجم کرونوباکتر ساکاراکی نشان می‌دهد.

- formula: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39, 320–322. <https://doi.org/10.1097/00005176-200410000-00002>
3. Arbolea, S., González, S., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C.G., & Gueimonde, M. (2012). Development of probiotic products for nutritional requirements of specific human populations. *Engineering in Life Sciences*, 12, 368–376. <https://doi.org/10.1002%2Felsc.201100129>
4. Aristoy, M.C., & Toldrá, F. (2012). Essential Amino Acids. *Handbook of analysis of active compounds in functional foods*. Boca Raton: CRC press.
5. Azizi, F., Habibi Najafi, M.B., & Edalatian Dovom, M.R. (2017). The biodiversity of *Lactobacillus* spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. *AMB Expr*, 7, 176. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0474-2>
6. Bacha, K., Mehari, T., & Ashenafi, M. (2010). Antimicrobial susceptibility patterns of LAB isolated from Wakalim, a traditional Ethiopian fermented sausage. *Journal of Food Safety*, 30, 213–223. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00201.x>
7. Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., & Brooks, H.L. (Eds.). (2018). *Ganong's Review of Medical Physiology*, 25e. McGraw Hill.
8. Bassyouni, R.H., Abdel-All, W. S., Fadl, M.G., Abdel-All, S., & Kamel, Z. (2012). Characterization of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Egypt as a probiotic. *Life Science Journal*, 9, 2924–2933.
9. Bengoa, A.A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S.A., Bronsoms, S., Serradell, M.L.Á., Garrote, G.L., & Abraham, A.G. (2018). Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Research International*, 103, 462–467. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.093>
10. Blackburn, S. (2016). *Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology: A Clinical Perspective*. Saunders Elsevier.
11. Botes, M., Van Reenen, C.A., L. & Dicks, M.T. (2008). Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastrointestinal model with infant milk formulations as substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.016>
12. Bover-Cid, S., & Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00152-X)
13. Bowen, A.B., & Braden, C.R. (2006). Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 1185–1189. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1208.051509>
14. Briske-Anderson, M.J., Finley, J.W., & Newman, S.M. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 214(3). <https://doi.org/10.3181/00379727-214-44093>
15. Byakika, S., Mukisa, I.M., Byenkya, Y., & Muyanja, C. (2020). Probiotic potential of lactic acid starter cultures isolated from a traditional fermented sorghum-millet beverage. *International Journal of Microbiology*, <https://doi.org/10.1155/2020/7825943>
16. Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292, 315–322. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00265.2006>
17. Campana, R., van Hemert, S., & Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, 9, 12. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0162-4>
18. Cekola, P.L., Czerkies, L.A., Storm, H.M., Wang, M.H., Roberts, J., & Saavedra, J.M. (2015). Growth and tolerance of term infants fed formula with probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Clinical Pediatrics*, 54(12), 1175–84. <https://doi.org/10.1177/0009922815574076>
19. Charchoghlyan, H., Kwon, H., Hwang, D.J., Lee, J.S., Lee, J., & Kim, M. (2016). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er2 317/402. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(5), 635–640. <https://doi.org/10.5851%2Fkosfa.2016.36.5.635>
20. Chou L.S., & Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82, 23–31. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75204-5](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75204-5)
21. CODEX Alimentarius Commission. (2008). *Cac/rcp 66-2008 Code of Hygienic Practice for Powdered Infant Formula for Infants and Young Children*. Joint FAO/WHO food standards programme. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

22. Collado, M.C., Isolauri, E., & Salminen, S. (2008a). Specific probiotic strains and their combinations counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 285, 58–64. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01211.x>
23. Collado, M.C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 454–60. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02212.x>
24. Collado, M.C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008b). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226, 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
25. de Carvalho, K.G., Kruger, M.F., Furtado, D.N., Todorov, S.D., & de Melo Franco, B.D.G. (2009). Evaluation of the role of environmental factors in the human gastrointestinal tract on the behaviour of probiotic cultures of *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus casei* LC01 by the use of a semi-dynamic *in vitro* model. *Annals of Microbiology*, 59(3), 439–445. <https://doi.org/10.1007/BF03175128>
26. Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 438–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>
27. Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.G., & Fanning, S. (2006). *Enterobacter sakazakii*: An emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 996–1002. <https://doi.org/10.1086/501019>
28. Erickson, T., Ahrens, W.R., Aks, S., Baum, C., & Ling, L. (2005). *Pediatric Toxicology: Diagnosis and Management of the Poisoned Child*. New York: McGraw-Hill.
29. Erkkilä, S., Petäjä, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T., & Suihko, M.L. (2001). Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. *Meat Science*, 58, 111–116. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(00\)00135-2](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(00)00135-2)
30. European Food Safety Authority. (2008). Technical guidance prepared by the panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antimicrobials of human or veterinary importance. *EFSA Journal*, 732, 1–15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.732>
31. Ewaschuk, J.B., Naylor, J.M., & Zello, G.A. (2005). D-lactate in human and ruminant metabolism. *The Journal of Nutrition*, 135(7), 1619–25. <https://doi.org/10.1093/jn/135.7.1619>
32. FAO. (2007). *Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
33. FAO/WHO. (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report on joint FAO/WHO expert consultation, Córdoba, Argentina. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf?ua=1
34. FAO/WHO. (2006a). Expert meeting on *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, Italy.
35. FAO/WHO. (2006b). Probiotics in food; Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome, Italy.
36. Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W., & Brenner, D.J. (1980). The Enterobacteriaceae study group *Enterobacter sakazakii*: A New Species of “Enterobacteriaceae” Isolated from Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, 569–584. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-3-569>
37. Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, 35–50. <https://doi.org/10.1017/s0007114512004011>
38. Food Safety Authority of Ireland. (2011). *Guidance Note No. 18: Validation of Product Shelf-Life* (Revision 1); Dublin, Ireland.
39. Grady Jr, C.L., Daigger, G.T., Love, N.G., & Filipe, C.D. (2011). *Biological Wastewater Treatment*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. <https://doi.org/10.1201/b13775>
40. Grodner, M., Escott-Stump, S., & Dorner, S. (2021). *Nutritional Foundations and Clinical Applications A Nursing Approach*.
41. Guarner, F., & Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 237–238. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(97\)00136-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)00136-0)
42. Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., & Beuchat, L.R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.013>
43. Holý, O., & Forsythe, S. (2014). *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*, 86, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.011>

44. Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., & Franz, C.M.A.P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 730–739. <https://doi.org/10.1128/aem.02105-06>
45. Hunter, C.J., Williams, M., Petrosyan, M., Guner, Y., Mittal, R., Mock, D., Upperman, J.S., Ford, H.R., & Prasadaraio, N.V. (2009). *Lactobacillus bulgaricus* prevents intestinal epithelial cell injury caused by *Enterobacter sakazakii*-induced nitric oxide both *in vitro* and in the newborn rat model of necrotizing enterocolitis. *Infection and Immunity*, 77(3), 1031–1043. <https://doi.org/10.1128/iai.01192-08>
46. Iranian National Standard No. 19459. (2014). *Probiotic microorganisms specifications and test methods*. Iranian Standards and Industrial Research Institute, Tehran.
47. Jose, N., Bunt, C., & Hussain, M. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, 3, 198–212. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3020198>
48. Kaktcham, N.F., Zambou, F.M., El-Soda, T.M., & Choudhary, M.I. (2012). Antimicrobial and safety properties of lactobacilli isolated from two Cameroonian traditional fermented foods. *Scientia Pharmaceutica*, 80, 189–203. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1107-12>
49. Kent, R.M., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R.P. (2015). Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. *Nutrients*, 7, 1217–1244. <https://doi.org/10.3390%2Fnu7021217>
50. Kos, B., Suskovic, J., Goreta, J., & Matosic, S. (2000). Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 121–127.
51. Lai, K.K. (2001). *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. *Medicine*, 80, 113–122. <https://doi.org/10.1097/00005792-200103000-00004>
52. Lee, Y.K., & Puong, K.Y. (2002). Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in presence of carbohydrate. *British Journal of Nutrition*, 88, 101–108. <https://doi.org/10.1079/bjn2002635>
53. Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., & Wang, Y. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 3, 84–92.
54. Liong, M.T., & Shah N.P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, 88, 55–66. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72662-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72662-x)
55. Liu, W., Chen, M., & Duo, L. (2020). Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum. *Journal of Dairy Science*, 103, 4013–4025. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17602>
56. Mathara, J., Schillinger, U., & Guigas, C. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.027>
57. Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
58. Mohan Nair, M.K., Venkitanarayanan, K., Silbart, L.K., & Kim, K.S. (2009). Outer Membrane Protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* Binds Fibronectin and Contributes to Invasion of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(4), 495–501. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0228>
59. Møller, C.O.A., Ücok, E.F., & Rattray, F.P. (2020). Histamine forming behaviour of bacterial isolates from aged cheese. *Food Research International*, 128, 108719. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108719>
60. Muñoz-Quezada, S., Chenoll, E., Vieites, J.M., Genovés, S., Maldonado, J., Bermúdez-Brito, M., Gomez-Llorente, C., Matencio, E., Bernal, M.J., Romero, F., Suárez, A., Ramón, D., & Gil, A. (2013). Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *British Journal of Nutrition*, 109, S51–S62. <https://doi.org/10.1017/s0007114512005211>
61. Nazarowec-White, M., & Farber, J.M. (1997). *Enterobacter sakazakii*: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 103–113. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01172-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01172-5)
62. Olasupo, N.A., Schillinger, U., & Holzapfel, W.H. (2001). Studies on some technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Nigerian fermented foods. *Food Biotechnology*, 15(3), 157–167. <http://dx.doi.org/10.1081/FBT-100107627>
63. Özogul, F., & Özogul, Y. (2007). The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*, 225, 385–394. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0429-3>
64. Pagotto, F.J., & Farber, J.M. (2009). *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*): Advice, policy and research in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.010>

65. Papagaroufalos, K., Fotiou, A., Egli, D., Tran, L.A., & Steenhout, P. (2014). A randomized double blind controlled safety trial evaluating D-lactic acid production in healthy infants fed a *Lactobacillus reuteri*-containing formula. *Nutrition and Metabolic Insights*, 7, 19-27. <https://doi.org/10.4137/nmi.s14113>
66. Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65, 859-867. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(02\)00292-9](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00292-9)
67. Pereira, C.I., Barreto Crespo, M.T. & San Romao, M.V. (2001). Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 211-216. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00534-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00534-7)
68. Pérez Martínez, G., Bäuerl, C., & Amores, M.C.C. (2012). *Selection and evaluation of probiotics*. In L. M. L. Nollet and F. Toldrá eds. Handbook of analysis of active compounds in functional foods. CRC Press; Taylor & Francis Group.
69. Pesavento, G., Calonico, C., Ducci, B., Magnanini, A., & Lo Nostro, A. (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiology*, 41, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.008>
70. Pianpumepong, P. & Noomhorm, A. (2010). Isolation of probiotic bacteria from turmeric (*Curcuma longa* Linn.) and its application in enriched beverages. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 2456-2462. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02337.x>
71. Polka, J., Morelli, L., & Patrone, V. (2016). Microbiological cutoff values: A critical issue in phenotypic antibiotic resistance assessment of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Microbial Drug Resistance*, 24, 345-370. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0328>
72. Priyadarshani, W.M.D., & Rakshit, S.K. (2011). Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 2062-2069. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02717.x>
73. Radulović, Z., Petrović, T., & Bulajić, S. (2012). Antibiotic susceptibility of probiotic bacteria. http://cdn.intechopen.com/pdfs/34710/InTechAntibiotic_susceptibility_of_probiotic_bacteria.pdf
74. Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J.R., Martín, M.C., Fernández, M., & Alvarez, M.A. (2013). A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1029-35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.071>
75. Reid, G., McGroarty, J.A., Angotti, R., & Cook, R.L. (1988). *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 344-351. <https://doi.org/10.1139/m88-063>
76. Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Casquete, R., Serradilla, M.J., & Córdoba, M.d.G. (2009). Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, 83, 460-467. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.027>
77. Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S.C., Goulet, J., & Tompkins, T.A. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and Immunity*, 73, 5183-5188. <https://doi.org/10.1128/iai.73.8.5183-5188.2005>
78. Singhal, K., Joshi, H., & Chaudhary B.L. (2010). Bile and acid tolerance ability of probiotic *Lactobacillus* strains. *Journal of Global Pharma Technology*, 2, 17-25.
79. Srimahaeak, T., Bianchi, F., Chlumsky, O., Larsen, N., & Jespersen, L. (2021). *In-vitro* study of *Limosilactobacillus fermentum* PCC adhesion to and integrity of the Caco-2 cell monolayers as affected by pectins. *Journal of Functional Foods*, 79. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104395>
80. Tomás, M.S.J., Wiese, B., & Nader-Macías, M.E. (2005). Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1383-1391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02726.x>
81. Tomáška, M., Drončový, M., Klapáčová, L., Slotťová, A., & Kološta, M. (2015). Potential probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from goat's milk. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 9(1), 66-71. <https://doi.org/10.5219/434>
82. Veerappan, G.R., Betteridge, J., & Young, P.E. (2012). Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports*, 14, 324-333. <https://doi.org/10.1007/s11894-012-0265-5>
83. Vitetta, L., Coulson, S., Thomsen, M., Nguyen, T., & Hall, S. (2017). Probiotics, D-Lactic acidosis, oxidative stress and strain specificity. *Gut Microbes*, 4, 311-322. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1279379>

Contents

Evaluation of Oxidation Development of Soybean Oil Enriched with Essential Oil from Aerial Parts of <i>Ferulago angulata</i> Boiss during Accelerated Storage	399
A. Hemmati, A. Ganjloo, K. Varmira, M. Bimakr	
Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Nanoemulsion of <i>Citrus paradisi</i> Essential Oil Against Pathogenic Microorganisms: <i>In Vitro</i> Study	415
H. Zanganeh, F. Shahidi, S.A. Mortazavi, B. Alizadeh Behbahani	
Evaluation of the Effect of Sodium Stearoyl-2-lactylate Emulsifier, Xylanase Enzyme, and Alcoholic Sugar Sorbitol on the Quality of Wheat Bran Bread	427
P. Parsa, M. Mazaheri Tehrani, M. Mohebbi	
Evaluation of Physicochemical and Microstructure Properties of Expanded Quinoa	451
E. Ghiami, A. Koocheki, E. Milani	
Production of Gelatin Nanoparticles by Solvent Dissolution Method for Use as Food-grade	463
N. Soleimanpoor Tamam, A. Arianfar, V. Hakimzadeh, B. Emadzadeh	
Investigation of Chemical Properties of Green Tea Ethanolic Extract and Its Inhibitory and Lethal Effects on <i>Aspergillus niger</i>, <i>Botrytis cinerea</i> and <i>Rhizopus stolonifer</i> (Causing Rot in Strawberry and Grapes)	477
M. Rahmati-Joneidabad, B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad	
The Mineral Content of Sesame Seed and Its Transition to Ardeh and Refined Sesame Oil	491
S. Kheirati Rounizi, F. Akrami Mohajeri, H. Moshtaghi Broujeni, S. Jambarsang, H. Kiani, E. Khalili Sadrabad	
Measurement and Comparison of Nitrate, Nitrite and Toxic Elements in First Harvest and Re-harvest Rice	501
Z. Soltan Touye, Sh. Dehghan Abkenar, N. Khakipour	
The Effect of Chitosan and Okra Mucilage Edible Coatings on the Physico-chemical Properties of Fried Potato Strips	511
A. Farazmand, H. Jalali, A. Najafi	
Investigating Changes in Color and Shrinkage of Dried Apple Slices Using Image Processing	527
J. Safari, S.J. Hashemi, A. Ranjbar Nedamani	
Evaluation of Antioxidant Effect of Ethanolic Extract of Aloe Vera Gel on the Stability of Soybean Oil	541
M. Karami, L. Nateghi, S. Asadollahi	
The Effect of <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> from Motal Cheese on the Adhesion of <i>Cronobacter sakazakii</i> to Epithelial Cells	557
S.S. Fatemizadeh, M.B. Habibi Najafi, D.S. Nielsen	

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Vol. 19

No. 4

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.

Contents

Evaluation of Oxidation Development of Soybean Oil Enriched with Essential Oil from Aerial Parts of <i>Ferulago angulata</i> Boiss during Accelerated Storage	399
A. Hemmati, A. Ganjloo, K. Varmira, M. Bimakr	
Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Nanoemulsion of <i>Citrus paradisi</i> Essential Oil Against Pathogenic Microorganisms: <i>In Vitro</i> Study	415
H. Zanganeh, F. Shahidi, S.A. Mortazavi, B. Alizadeh Behbahani	
Evaluation of the Effect of Sodium Stearoyl-2-lactylate Emulsifier, Xylanase Enzyme, and Alcoholic Sugar Sorbitol on the Quality of Wheat Bran Bread	427
P. Parsa, M. Mazaheri Tehrani, M. Mohebbi	
Evaluation of Physicochemical and Microstructure Properties of Expanded Quinoa	451
E. Ghiami, A. Koocheki, E. Milani	
Production of Gelatin Nanoparticles by Solvent Dissolution Method for Use as Food-grade	463
N. Soleimanpoor Tamam, A. Arianfar, V. Hakimzadeh, B. Emadzadeh	
Investigation of Chemical Properties of Green Tea Ethanolic Extract and Its Inhibitory and Lethal Effects on <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> and <i>Rhizopus stolonifer</i> (Causing Rot in Strawberry and Grapes)	477
M. Rahmati-Joneidabad, B. Alizadeh Behbahani, M. Noshad	
The Mineral Content of Sesame Seed and Its Transition to Ardeh and Refined Sesame Oil	491
S. Kheirati Rounizi, F. Akrami Mohajeri, H. Moshtaghi Broujeni, S. Jambarsang, H. Kiani, E. Khalili Sadrabad	
Measurement and Comparison of Nitrate, Nitrite and Toxic Elements in First Harvest and Re-harvest Rice	501
Z. Soltan Touye, Sh. Dehghan Abkenar, N. Khakipour	
The Effect of Chitosan and Okra Mucilage Edible Coatings on the Physico-chemical Properties of Fried Potato Strips	511
A. Farazmand, H. Jalali, A. Najafi	
Investigating Changes in Color and Shrinkage of Dried Apple Slices Using Image Processing	527
J. Safari, S.J. Hashemi, A. Ranjbar Nedamani	
Evaluation of Antioxidant Effect of Ethanolic Extract of Aloe Vera Gel on the Stability of Soybean Oil	541
M. Karami, L. Nateghi, S. Asadollahi	
The Effect of <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> from Motal Cheese on the Adhesion of <i>Cronobacter sakazakii</i> to Epithelial Cells	557
S.S. Fatemizadeh, M.B. Habibi Najafi, D.S. Nielsen	