

شاپا: ۱۷۳۵-۴۱۶۱

شماره پیاپی ۸۳

عنوان مقالات

- ۵۷۹ بررسی اهمیت پارامترهای الگوریتم ازدحام ذرات چند هدفه در بهینه‌یابی درصد دفع اجزاء محلول اولترافیلتراسیون شیر شتر با استفاده از رگرسیون حداقل مربعات جزئی
سید محمد علی رضوی - مرتضی کاشانی‌نژاد
- ۵۹۵ بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست فراسودمند حاوی پودر کارلا
زینب محکم - حسن قربانی قوژدی - فاطمه پیدرنامی - یعقوب شیری
- ۶۰۹ ارزیابی تغییرات ویژگی‌های بافتی و کیفی کیک غنی شده با جوانه گندم
سید مصطفی صادقی - ماندانا طایفه - لیلی فدایی اشکیکی - کامییز غیاثوند
- ۶۱۹ کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر خصوصیات بیوشیمیایی، کیفی و ماندگاری توت فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch)
زینب قاسمی ارشد - عبدالله احتشام‌نیا - عیسی جزایری - حسن مومبوند - مرتضی سلیمانی اقدم
- ۶۲۷ تهیه بیوپلیمر بر پایه آگار استخراج شده از جلبک قرمز *Acanthophora* خلیج فارس و ارزیابی خواص آن
پرینا دیانت - مهدی حاجی‌عبدالرسولی - مرتضی یوسف زادی
- ۶۵۱ کشت سلولی میکروجلبک اسپرو لینا (*Spirulina platensis*) و مقایسه راندمان روش‌های آنزیمی، اولتراسوند، انجماد - انجمادزدایی و حلال معدنی در استخراج رنگدانه فیکوسیانین
رضا صفری - سهیل ربیحاتی پول
- ۶۶۵ افزایش تولید کاروتنوئیدهای ریزجلبک کلرلا با استفاده از تغییر غلظت مواد مغذی و فیتوهورمون
زهره نوروزی مطلق - محمود اخوان مهدوی - رضا قشلاقی
- ۶۷۷ اثر پوشش خوراکی آلزینات و اسانس لعل کوهستان بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی هویج رنده‌شده طی زمان ماندگاری
علی حسینی - نفیسه زمین‌دار - یاسمن اسمعیلی
- ۶۹۵ تأثیر پیش تیمار فراصوت بر زمان هیدرولیز به وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئین قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*)
آیسان ایزنلو - علیرضا صادقی مامونک
- ۷۱۳ بررسی خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم بایونانو کامپوزیت بر پایه‌ی موسیلاژ کتان و نانوکریستال سلولز
الهام صفایی - حنان لشکری - سارا انصاری - علیرضا شیرازی نژاد
- ۷۲۵ مطالعه پدیده گرفتگی در شفاف‌سازی غشایی آب سیب به کمک سامانه غشایی سطح تراش
سپنا پساری - حسین میرسعیدقاسی - لایلا رزویه نصیری - علی فدوی

ادامه فهرست داخل جلد

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
"براساس مصوبه وزارت عتف از سال ۱۳۹۸، کلیه نشریات دارای درجه "علمی-پژوهشی" به نشریه "علمی" تغییر نام یافتند."

آذر- دی ۱۴۰۲

شماره ۵

جلد ۱۹

صاحب امتیاز: دانشگاه فردوسی مشهد

استاد، اقتصاد کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول: دکتر ناصر شاهنوشی

دانشیار، میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد

سر دبیر: دکتر مسعود یاورمنش

اعضای هیئت تحریریه:

استاد، میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد

دکتر سید علی مرتضوی

استاد، میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

دکتر فخری شهیدی

استاد، میکروبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد

دکتر محمدباقر حبیبی نجفی

دانشیار، میکروبیولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دکتر مرتضی خمیری

استاد، مهندسی و خواص بیوفیزیک مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

دکتر سید محمد علی رضوی

استاد، شیمی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

دکتر رضا فرهوش

استاد، میکروبیولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دکتر بی بی صدیقه فضلی بزاز

استاد، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دکتر مهدی کاشانی نژاد

استاد، تکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

دکتر آرش کوچکی

استاد، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

دکتر محبت محبی

استاد، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه تبریز

دکتر بابک قنبرزاده

استاد، بیوتکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه صنعتی شریف

دکتر ایران عالمزاده

دانشیار، نانو فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد

دکتر قدیر رجبزاده اوغاز

دانشیار، زیست مولکولی، بیمارستان زنان و بزرگام، ایالت متحده آمریکا

دکتر مهیار حیدرپور

دانشیار، میکروبیولوژی غذایی، دانشگاه متروپولیتن لندن

دکتر حمید بهادر قدوسی

استاد، بیوتکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دکتر کیانوش خسروی

استاد، مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه آریزونا

دکتر مرتضی عباسزادگان

استاد، مهندسی تولید مواد غذایی، دانشگاه فنی دانمارک

دکتر محمدامین محمدیفر

استاد، بیوتکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه صنعتی شریف

دکتر منوچهر وثوقی

دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

دکتر هادی الماسی

دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان

دکتر میلاد فتحی

استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس.

دکتر سلیمان عباسی

استاد، گروه علوم تغذیه و مواد غذایی، دانشگاه پورتو، پرتغال

دکتر نونو بورخس

دانشیار، گروه علوم مولکولی، دانشکده منابع طبیعی و علوم کشاورزی، دانشگاه سوئد

دکتر علی عطا معظمی

ناشر: دانشگاه فردوسی مشهد

این نشریه در پایگاههای زیر نمایه شده است:

AGRIS, CABI, DOAJ, EBSCO, Google scholar, Internet Archive, پایگاه استنادی جهان اسلام (ISC)، سامانه نشریات علمی ایران، پایگاه

اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID)، بانک اطلاعات نشریات کشور (MAGIRAN)، مرجع دانش CIVILICA

پست الکترونیکی: ifstrj@um.ac.ir

مقالات این شماره در سایت <https://ifstrj.um.ac.ir> به صورت مقاله کامل نمایه شده است.

این نشریه به تعداد ۶ شماره در سال و به صورت آنلاین منتشر می شود.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

- ۵۷۹ بررسی اهمیت پارامترهای الگوریتم ازدحام ذرات چند هدفه در بهینه‌یابی درصد دفع اجزاء محلول اولترافیلتراسیون شیر شتر با استفاده از رگرسیون حداقل مربعات جزئی
سید محمد علی رضوی - مرتضی کاشانی‌نژاد
- ۵۹۵ بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست فراسودمند حاوی پودر کارلا
زینب محکمی - حسن قربانی قوژدی - فاطمه بیدرنامی - یعقوب شیری
- ۶۰۹ ارزیابی تغییرات ویژگی‌های بافتی و کیفی کیک غنی شده با جوانه گندم
سید مصطفی صادقی - ماندانا طایفه - لیلی فدایی اشکیکی - کامبیز غیاثوند
- ۶۱۹ کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرویل بر خصوصیات بیوشیمیایی، کیفی و ماندگاری توت فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch)
زینب قاسمی ارشد - عبداله احتشام‌نیا - عیسی حزباوی - حسن مومیوند - مرتضی سلیمانی اقدم
- ۶۳۷ تهیه بیوپلیمر بر پایه آگار استخراج شده از جلبک قرمز *Acanthophora* خلیج فارس و ارزیابی خواص آن
پریسا دیانت - مهدی حاجی عبدالرسولی - مرتضی یوسف زادی
- ۶۵۱ کشت سلولی میکرو جلبک اسپروئینا (*Spirulina platensis*) و مقایسه راندمان روش‌های آنزیمی، اولتراسوند، انجماد - انجمادزدایی و حلال معدنی در استخراج رنگدانه فیکوسیانین
رضا صفری - سهیل ریحانی پول
- ۶۶۵ افزایش تولید کاروتنوئیدهای ریز جلبک کلرلا با استفاده از تغییر غلظت مواد مغذی و فیتوهورمون
زهره نوروزی مطلق - محمود اخوان مهدوی - رضا قشلاقی
- ۶۷۷ اثر پوشش خوراکی آلژینات و اسانس لعل کوهستان بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی هویج رنده‌شده طی زمان ماندگاری
علی حسینی - نفیسه زمین‌دار - یاسمن اسمعیلی
- ۶۹۵ تأثیر پیش تیمار فراصوت بر زمان هیدرولیز به وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئین قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*)
آیسان ایزانلو - علیرضا صادقی ماهونک
- ۷۱۳ بررسی خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم بایونانو کامپوزیت بر پایه‌ی موسیلاژ کتان و نانوکریستال سلولز
الهام صفایی - حنان لشکری - سارا انصاری - علیرضا شیرازی نژاد
- ۷۲۵ مطالعه پدیده گرفتگی در شفاف‌سازی غشایی آب سیب به کمک سامانه غشایی سطح تراش
سیما یساری - حسین میرسعیدقازی - لیلا رزوبه نصیرایی - علی فدوی
- ۷۴۷ بررسی آلودگی میکروبی کنسروهای رب گوجه‌فرنگی در ایران و جداسازی و شناسایی *Alicyclobacillus acidocaldarius* به روش PCR
معصومه اطهری نیا - نسرین ذوالنوریان - ساره داورزنی



Evaluation of the Importance of Multi-objective Particle Swarm Algorithm Parameters in Optimizing the Solutes Rejection of Camel Milk Ultrafiltration Using Partial Least Squares Regression

S.M.A. Razavi^{1*}, M. Kashaninejad²

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

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

Received: 2021.03.28 Revised: 2021.07.02 Accepted: 2021.07.07 Available Online: 2021.09.15	How to cite this article: Razavi, S.M.A., & Kashaninejad, M. (2023). Evaluation of the importance of multi-objective particle swarm algorithm parameters in optimizing the solutes rejection of camel milk ultrafiltration using partial least squares regression. <i>Iranian Food Science and Technology Research Journal</i> , 19(5), 577-591. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.69556.1028
---	--

Introduction

Ultrafiltration is one of the most common membrane processes in the dairy industry, especially for condensing and separating milk components. Using this process, several products can be produced, including milk concentrate used for cheese production, low-lactose dairy products, milk protein concentrate, and serum proteins for dietary supplements. The efficiency and cost of a membrane process depend on the percentage of rejection of the soluble components. Therefore, the use of concentrated milk made by ultrafiltration in the production of various dairy products depends on the efficiency of the membrane process and the changes in milk components during this process. On the one hand, the physicochemical properties of camel milk are different from those of cow milk, especially in terms of type and amount of protein. Because significant differences exist between the physicochemical properties of camel and cow milk, likely, the membrane processing conditions and the physicochemical properties of their products will be different completely. Although many studies have been conducted on the efficacy of the ultrafiltration processing of cow milk, there is no information about the efficacy of camel milk ultrafiltration, and most of the research done regarding optimizing is based on classical algorithms. Therefore, in this study, the effects of transmembrane pressure and temperature on the solutes rejection (protein, lactose, ash, and total solids) during camel milk ultrafiltration process were investigated. Then, these properties were optimized using particle swarm algorithm. Also, because the performance of the particle swarm algorithm is highly dependent on related parameters such as the number of iterations, the number of particles, accelerate constant, inertia weight, and velocity of the particles, so before optimization, the effect of these parameters on optimal responses were examined by partial least squares regression (PLS).

Materials and Methods

In this study, a pilot crossflow ultrafiltration system was used. A UF membrane (Model 3838 HFK-131, Koch membrane systems, Inc., USA) made of polysulfone amid (PSA) with MWCO of 20 kDa was applied. Camel milk was purchased from a local market in Mashhad and for camel skim milk production, its fat was separated by a pilot plant milk fat separator in the Food Research Complex, Ferdowsi University of Mashhad. The weight percentages of protein, fat, lactose, ash, and total solids of UF permeate samples were measured by ISO 8968-1:2014, ISO 1211: 2010, ISO 26462/IDF 214:2010, ISO 5544:2008, and ISO 6731:2010 at two replications, respectively. the process treatments were performed in the form of a central composite design (CCD) (5 replications at the central point) for two independent variables at three levels so that the total number of 13 treatments was obtained. The data were modeled using the statistical



software of Design Expert (version 11) based on the response surface methodology and each of the response variables in the form of a regression model was presented as a function of independent variables.

Results and Discussion

The rejection of total solids and protein of the tested samples varied in the range of 45.4-51.03% and 94.09-97.51%, respectively. It means that in each TMP and T, more than 45% of the total solids and 94% of the protein of camel milk were kept by the membrane. The results also showed that none of the linear, quadratic and interactive effects of TMP and T on the total solids and protein rejections were not significant. According to the results, the R_L reduced with increasing T. Increasing the TMP also led to a reduction at high T and an increase in R_L rate of the samples at lower T. Also, the effect of TMP on R_A showed a non-linear trend, so that TMP at high T led to an increase, and at low T, it led to a reduction in the R_A of the samples.

Conclusion

The optimization results with the particle swarm algorithm showed that this algorithm has a high convergence speed and by recognizing and analyzing its parameters, the optimal conditions can be easily found. The optimum ultrafiltration conditions in this study with the lowest R_L and R_A were determined as 80 kPa TMP and 29.85°C T.

Keywords: Camel milk, Partial least squares regression, Particle swarm algorithm, Solute rejection, Ultrafiltration



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر-دی ۱۴۰۲، ص. ۵۷۷-۵۹۱

بررسی اهمیت پارامترهای الگوریتم ازدحام ذرات چند هدفه در بهینه‌یابی درصد دفع اجزاء محلول اولترافیلتراسیون شیر شتر با استفاده از رگرسیون حداقل مربعات جزئی

سید محمد علی رضوی^{۱*} - مرتضی کاشانی نژاد^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۶

چکیده

در این تحقیق، با توجه به اهمیت شیر شتر و ویژگی‌های عملکردی و غذایی خاص پروتئین‌های آن در فرآیند تولید کنسانتره پروتئین شیر، ابتدا اثر اختلاف فشار در عرض غشاء (۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ کیلو پاسکال) و دمای فرآیند (۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) بر درصد دفع اجزاء محلول شیر شتر (پروتئین، لاکتوز، املاح و مواد جامد کل) در طی فرآیند اولترافیلتراسیون شیر شتر توسط روش مرکب مرکزی مدلسازی شد و سپس مدل‌های معنی‌دار توسط الگوریتم ازدحام ذرات چند هدفه پس از بررسی اهمیت پارامترهای الگوریتم بهینه‌یابی شدند. نتایج نشان داد که افزایش اختلاف فشار منجر به افزایش معنی‌دار درصد دفع املاح و افزایش دمای اولترافیلتراسیون منجر به افزایش معنی‌دار درصد دفع لاکتوز و درصد دفع املاح شد. همچنین نتایج تحقیق نشان داد که هیچکدام از اثرات خطی، درجه دوم و متقابل اختلاف فشار و دما بر درصد دفع مواد جامد کل و پروتئین نمونه‌ها معنی‌دار نبودند. نتایج ضرایب استاندارد شده برای متغیرهای وابسته (درصد دفع لاکتوز (R_1) و املاح (R_a))، مدت زمان اجرا الگوریتم (CPU time) و تعداد پاسخ‌های مورد ارزیابی (NFE) با متغیرهای مستقل (تعداد تکرار (Number of Iterations)، تعداد ذرات (Number of particles)، ضریب اینرسی (W_1)، ضریب یادگیری شخصی (C_1) و ضریب یادگیری کلی (C_2)) در رگرسیون PLS نیز نشان داد که تعداد ذرات در همه پاسخ‌های مورد بررسی دارای بالاترین اهمیت بود و ضریب یادگیری شخصی و ضریب یادگیری کلی اهمیت چندانی بر مدت زمان اجرای الگوریتم و تعداد پاسخ‌های مورد ارزیابی نداشتند. به منظور بهینه‌یابی در این تحقیق نیز درصد دفع لاکتوز و درصد دفع املاح حداقل در نظر گرفته شدند که با توجه به صفات مذکور، اختلاف فشار و دمای بهینه به ترتیب ۸۰ کیلو پاسکال و ۲۹/۸۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. در چنین فرآیندی درصد دفع لاکتوز ۱۳/۳۸ درصد و دفع املاح ۱۸/۷۰ درصد بود. همچنین مدت زمان اجرای الگوریتم و تعداد پاسخ‌های مورد ارزیابی در این بهینه‌یابی نیز ۰/۱۴۳ ثانیه و ۱۰۰۰ بودند.

واژه‌های کلیدی: الگوریتم ازدحام ذرات، درصد دفع اجزاء محلول، رگرسیون حداقل مربعات جزئی، شیر شتر، فیلتراسیون

مقدمه

شیر شتر به‌عنوان یکی از منابع مهم تولید شیر، به دلیل افزایش جمعیت و کاهش تولید سرانه مواد غذایی در کشورهای در حال توسعه، بسیار حائز اهمیت است (Benmechene et al., 2014). از طرفی مهمترین محدودیت کاربرد عملی فرآیندهای اولترافیلتراسیون کاهش کارایی غشاء به دلیل پدیده‌های پلاریزاسیون غلظت و گرفتگی است، زیرا در چند دقیقه اول فرآیند، موجب کاهش شدید شار جریان تراوه، توسعه گرفتگی و تغییر میزان دفع اجزاء محلول می‌شوند که در نهایت منجر به تغییرات اساسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی محصول نهایی

اولترافیلتراسیون از متداول‌ترین فرآیندهای غشایی در صنایع لبنی به‌ویژه برای تغلیظ و جداسازی اجزای شیر است. با استفاده از این فرآیند می‌توان محصولات متعددی از جمله شیر مورد استفاده برای پنیر، فرآورده‌های لبنی با لاکتوز پایین، کنسانتره پروتئینی شیر و پروتئین‌های سرمی برای مکمل‌های غذایی تولید کرد (Ng et al., 2017). بنابراین استفاده از این فرایند در تولید محصولات متنوع به‌ویژه برای

۱ و ۲- به ترتیب استاد و دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(Email: s.razavi@um.ac.ir)

(*)- نویسنده مسئول:

محلی زیادی می‌باشند همگرایی سریع می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که ذرات جمعیت در یک نقطه بهینه محلی متوقف شده‌اند که به این پدیده همگرایی زودرس نیز گفته می‌شود (Shi & Eberhart, 1998). در این میان شناخت رفتار پارامترهای این الگوریتم و تعیین مقادیر دقیق آنها با توجه به مسئله مورد نظر می‌تواند نقش بسزایی در کاهش یا افزایش سرعت همگرایی و گریز از بهینه‌های محلی را در پی داشته باشد. در بسیاری از مطالعات مختلف، پارامترهای الگوریتم ازدحام ذرات به صورت تجربی و یا با استفاده از تجربیات مطالعات پیشین تعیین شده اند (Eberhart, Shi, & Kennedy, 2001)، اما بدیهی است که پارامترهای الگوریتم به شدت وابسته به نوع تابع هدف می‌باشد و شناخت اثر هر یک از آنها بر اساس شرایط مسئله بسیار حائز اهمیت است.

تاکنون تحقیقات چندانی در خصوص تاثیر عوامل هیدرودینامیکی بر درصد دفع اجزاء محلول شیر شتر در طی فرآیند اولترافیلتراسیون شیر شتر صورت نگرفته است و اکثر تحقیقات انجام شده در زمینه بهینه‌یابی فرآیند اولترافیلتراسیون بر مبنای الگوریتم‌های کلاسیک بوده است، لذا در این پژوهش، اثر اختلاف فشار در عرض غشاء (۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ کیلوپاسکال) و دمای فرآیند (۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) بر درصد دفع اجزاء محلول شیر شتر (پروتئین، لاکتوز، املاح و مواد جامد کل) در طی فرآیند اولترافیلتراسیون شیر شتر مدلسازی شد و مدل‌های معنی دار توسط الگوریتم ازدحام ذرات چند هدفه بهینه‌یابی شدند. چون عملکرد الگوریتم ازدحام ذرات به شدت وابسته به پارامترهای مرتبط با آن از جمله تعداد تکرار^۳، تعداد ذرات^۴، ضریب اینرسی، ضریب یادگیری شخصی و ضریب یادگیری کلی است، لذا قبل از بهینه‌یابی، اثر این پارامترها بر پاسخ‌های بهینه (درصد دفع لاکتوز و املاح)، مدت زمان اجرای الگوریتم و تعداد پاسخ‌های مورد ارزیابی، توسط رگرسیون حداقل مربعات جرئی (PLS) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سیستم غشایی و نحوه عملیات

در این تحقیق از یک سیستم اولترافیلتراسیون غشایی جریان عرضی پایلوتی استفاده شد. غشاء مورد استفاده نیز مدل 3838 HFK-131 و ساخت شرکت کوچ آمریکا (Koch membrane Com.)، از جنس پلی سولفون آمید با اندازه منافذ (MWCO) ۲۰ کیلودالتون بود. سیستم اولترافیلتراسیون مورد استفاده مجهز به تانک خوراک، پمپ سانتریفوژی، دی‌سنج، مدول اولترافیلتراسیون از نوع مارپیچ حلزونی، مبدل حرارتی لوله‌ای، دو فشار سنج عقبه‌ای، دو شیر

می‌گردند (Rao, 2002). بنابراین تعیین دقیق شرایط عوامل مؤثر بر فرایند اولترافیلتراسیون از جمله عوامل هیدرودینامیکی یعنی اختلاف فشار و دما در تولید یک محصول با کیفیت و مقرون به صرفه اهمیت فراوانی دارد. در مورد کارایی فرآیند اولترافیلتراسیون شیر گاو تحقیقات فراوانی شده است (Grandison et al., 2000; Razavi et al., 2000; Wang & Chung, 2005; Luo et al., 2015) اما در مورد درصد دفع اجزاء محلول شیر شتر اطلاعات بسیار کمی وجود دارد. مهیا و همکاران (Mehaia et al., 1996) تغییرات غلظت پروتئین، چربی، لاکتوز، مواد جامد کل و املاح شیر شتر در طول فرآیند تغلیظ توسط اولترافیلتراسیون را مورد ارزیابی قرار داد و نشان داد که ۱۰۰ درصد نیترژن پروتئینی و چربی، حدود ۱۳ درصد نیترژن غیر پروتئینی و ۱ درصد لاکتوز شیر شتر در طول فرآیند تغلیظ توسط غشاء دفع شدند. همچنین برخی محققین شیر شتر را توسط فرآیند اولترافیلتراسیون تغلیظ کرده‌اند و محصولاتی نظیر پنیر و ایزوله پروتئینی شیر شتر را تولید کرده‌اند اما کارایی غشاء و درصد دفع اجزاء محلول اولترافیلتراسیون آن را بررسی نکرده‌اند (Hassl et al., 2011; Mehaia, 1996).

از طرفی اغلب مسائل بهینه‌یابی در مهندسی علاوه بر غیر خطی بودن دارای محدودیت‌های زیادی هستند. بنابراین یافتن راه حل‌های بهینه برای اینگونه مسائل غیر خطی نیازمند الگوریتم‌های بهینه‌یابی موثر و کارا می‌باشد. بسیاری از الگوریتم‌های فراابتکاری مدرن بر مبنای هوش جمعی و الهام گرفتن از طبیعت گسترش یافته‌اند و امروزه این الگوریتم‌های فراابتکاری پیشرفته با توجه به قدرت و کارایی‌شان در کاربردهای مختلف توسعه یافته‌اند. الگوریتم بهینه‌یابی ازدحام ذرات^۱ نیز یکی از مهم‌ترین الگوریتم‌های بهینه‌یابی هوشمند است که در حوزه هوش ازدحامی^۲ جای می‌گیرد. این الگوریتم، توسط جیمز کندی و راسل سی ابرهات در سال ۱۹۹۵ معرفی گردید، و با الهام از رفتار اجتماعی حیواناتی چون ماهی‌ها و پرندگان که در گروه‌هایی کوچک و بزرگ کنار هم زندگی می‌کنند، طراحی شده است. در الگوریتم ازدحام ذرات، اعضای جمعیت جواب‌ها، به صورت مستقیم با هم ارتباط دارند و از طریق تبادل اطلاعات با یکدیگر و یادآوری خاطرات خوب گذشته، به حل مساله می‌پردازند. الگوریتم ازدحام ذرات برای انواع مسائل پیوسته و گسسته مناسب است و پاسخ‌های بسیار مناسبی برای مسائل بهینه‌یابی مختلف داده است (Yang, 2010). اگرچه الگوریتم ازدحام ذرات یک روش بسیار سریع است که برای مسائل نه چندان پیچیده و با بعد کم که احتمال دچار شدن آنها در بهینه محلی کم است، مطلوب می‌باشد، ولی در مسائل با بعد بالاتر و پیچیده‌تر که دارای نقاط بهینه

3- Number of Iterations

4- Number of particles

1- Particle Swarm optimization (PSO)

2- Swarm Intelligence

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

که در آن Y عبارت است از متغیر تابع یا پاسخ، x_i سطوح کدبندی شده متغیرهای مستقل (اختلاف فشار در عرض غشاء (کیلوپاسکال) و دما (درجه سانتی‌گراد)) و x_i^2 اثرات درجه دوم و $x_i x_j$ ضرایب اثرات متقابل می‌باشند. با استفاده از جدول آنالیز واریانس (ANOVA) معنی‌دار بودن اثرات خطی، درجه دوم و متقابل ضرایب مدل رگرسیون برای هر پاسخ در سطوح احتمال ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ بررسی گردید (Saltelli, 2002).

بهینه‌یابی با استفاده از الگوریتم ازدحام ذرات

در الگوریتم ازدحام ذرات، تعدادی از موجودات که به آن‌ها ذره گفته می‌شود در فضای جستجوی تابعی که قصد بهینه کردن مقدار آن را داریم، پخش شده‌اند. هر ذره مقدار تابع هدف را در موقعیتی از فضا که در آن قرار گرفته است، محاسبه می‌کند. سپس با استفاده از ترکیب اطلاعات محل فعلی آن و بهترین محلی که در گذشته در آن بوده است و همچنین اطلاعات یک ذره از بهترین ذرات موجود در جمع، جهتی را برای حرکت انتخاب می‌کند. همه ذرات جهتی برای حرکت انتخاب می‌کنند و پس از انجام حرکت، یک مرحله از الگوریتم به پایان می‌رسد. این مراحل چندین بار تکرار می‌شوند تا آنکه جواب مورد نظر به دست آید. در مرحله ابتدایی الگوریتم، ذرات با موقعیت‌ها و سرعت‌های تصادفی ایجاد می‌شوند. در طی اجرای الگوریتم، موقعیت و سرعت هر ذره در مرحله $t+1$ ام از الگوریتم، از روی اطلاعات مرحله قبلی ساخته می‌شوند. روابطی که سرعت و موقعیت ذرات را تغییر می‌دهند، عبارتند از:

$$V_{t+1} = WV_t + C_1 r_1 (x_{l,best_t} - x_t) + C_2 r_2 (x_{g,best_t} - x_t) \quad (3)$$

$$x_{t+1} = x_t + V_{t+1} \quad (4)$$

در این روابط w ضریب اینرسی، r_1 و r_2 اعداد تصادفی در بازه $[0, 1]$ و همچنین C_1 و C_2 ضرایب یادگیری هستند. r_1 و r_2 باعث می‌شوند که نوعی گوناگونی در جواب‌ها بوجود بیاید و به این نحو جستجوی کاملی روی فضا انجام پذیرد. ضریب یادگیری C_1 مربوط به تجارب شخصی هر ذره است و در مقابل C_2 ضریب یادگیری مربوط به تجارب کل جمع می‌باشد (Yang, 2010).

جریان و یک دماسنج دیجیتالی بود. برای جلوگیری از تغییرات دما در طی عملیات، دمای جریان توسط مبدل حرارتی لوله‌ای در حد مورد نظر تنظیم می‌گردید. شیر شتر تهیه شده از بازار محلی مشهد خریداری شد و چربی آن در مجتمع آموزشی-تحقیقاتی صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد پس از پیش گرم شدن (۳۷ درجه سانتی‌گراد) توسط سپراتور جدا شد.

آزمایشات

درصد وزنی پروتئین، چربی، لاکتوز، املاح و مواد جامد خشک بدون چربی نمونه‌های شیر شتر پس چرخ و تراوه به ترتیب به روش‌های (ISO 8968-1, 2014)، (ISO 8968-1, 2014)، (ISO 8968-1, 2014) و (ISO 8968-1, 2014) در دو تکرار اندازه‌گیری شدند. آنالیز شیمیایی شیر شتر پس چرخ نشان داد که نمونه‌ها دارای ۰/۶ درصد چربی، ۳/۲۲ درصد پروتئین، ۳/۵۶ درصد لاکتوز، ۰/۹۰ درصد املاح و ۸/۲۵ درصد مواد جامد کل و ۱۳۶۱ میلی گرم در لیتر پتاسیم و ۱۱۷۶ میلی گرم در لیتر کلسیم، ۶۵۶ میلی گرم در لیتر فسفر، ۶۴۵ میلی گرم در لیتر سدیم، ۷۷ میلی گرم در لیتر منیزیم و ۶/۵ میلی گرم در لیتر آلومینیوم، ۴/۵۵ میلی گرم در لیتر روی ۰/۳۵ میلی گرم در لیتر آهن، ۴/۵۵ میلی گرم در لیتر روی، ۰/۰۴ میلی گرم در لیتر منگنز و pH برابر ۶/۲ بودند.

درصد دفع ظاهری اجزاء محلول (پروتئین، لاکتوز، املاح و مواد جامد خشک کل) در طی عملیات اولترافیلتراسیون نیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۱):

$$Rabs = 1 - \frac{Cp}{Cb}$$

که در آن Cp غلظت جزء محلول در تراوه و Cb غلظت جزء محلول در خوراک (یا ناتراوه) است.

مدلسازی و آنالیز آماری

در این پژوهش، تیمارهای فرآیند به روش کاملاً تصادفی در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) (۵ تکرار در نقطه مرکزی) برای دو متغیر مستقل (دما و اختلاف فشار) و در سه سطح انجام شد به صورتی که تعداد کل ۱۳ تیمار (مطابق جدول ۱) به دست آمد (Montgomery, 2017). نتایج پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری دیزاین-اکسپرت (Design-Expert version 10) به روش سطح پاسخ^۱ مدلسازی شد و هر یک از متغیرهای پاسخ (درصد دفع لاکتوز و املاح) در قالب مدل رگرسیون چند جمله‌ای زیر به صورت تابعی از متغیرهای مستقل ارائه شدند:

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل طرح مرکب مرکزی فرآیند اولترافیلتراسیون نمونه‌های شیر شتر

Table 1- The levels of independent variables of the central composite design of the ultrafiltration process of camel milk samples

تیمار Treatment	اختلاف فشار در عرض غشاء Transmembrane Pressure (kPa)	دما Temperature (°C)
1	80	40
2	120	30
3	120	20
4	80	30
5	120	30
6	160	40
7	120	30
8	160	20
9	120	40
10	160	30
12	80	20
13	120	30
14	120	30

رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLS)

یکی از ابزارهای مهم برای پیش‌بینی متغیرهای وابسته از روی متغیرهای مستقل، استفاده از معادلات رگرسیون می‌باشد. وجود برخی از معایب همچون وجود هم خطی^۱ (در نظر گرفتن یک متغیر به صورت ترکیب خطی از دیگر متغیرها) بین متغیرهای مستقل در برخی از مطالعات باعث نامعتبر شدن مطالعات رگرسیونی (حداقل مربعات عمومی) شده است. از این رو محققان روش‌های جدیدی برای بنا کردن معادله پیش‌بینی ارائه داده‌اند که روش رگرسیونی موسوم به کمترین مربعات جزئی از مهمترین این معادلات می‌باشد. در این روش مؤلفه‌های جدید متعامدی که ترکیب خطی از متغیرهای اولیه هستند، ایجاد شده، سپس از این مؤلفه‌ها برای ساختن معادله رگرسیونی استفاده می‌شود. در مدل رگرسیون PLS ضرایب استاندارد (Variable Importance in Projection) VIP منعکس‌کننده اثر تک تک x ها بر روی y ها می‌باشد و به آسانی در نمودار PLS قابل مشاهده است و به این ترتیب مؤثرترین متغیرها و درجه اهمیت آنها به سرعت شناسایی و تشخیص داده می‌شوند (Tenenhaus et al., 2005). در این پژوهش با استفاده از رگرسیون کمترین مربعات جزئی و به کمک نرم‌افزار Minitab 18، درجه اهمیت متغیرهای (x) (پارامترهای الگوریتم ازدحام ذرات) ها بر روی y ها (درصد دفع لاکتوز و املاح، مدت زمان اجرا الگوریتم و تعداد پاسخ‌های مورد ارزیابی) بررسی شد.

نتایج و بحث

تعیین مدل‌های مناسب

درصد دفع مواد جامد کل شیر و پروتئین

درصد دفع مواد جامد کل شیر و پروتئین نمونه‌های مورد آزمون به ترتیب بین ۴۵/۴ تا ۵۱/۰۳ و ۹۴/۰۹ تا ۹۷/۵۱ درصد متغیر بودند. نتایج آنالیزها نشان داد که هیچ کدام از اثرات خطی، درجه دوم و متقابل اختلاف فشار و دما بر درصد دفع مواد جامد کل شیر و پروتئین نمونه ها معنی‌دار نبودند ($P > 0.05$). همچنین با توجه به اینکه در این پژوهش برای اتمام فرآیند اولترافیلتراسیون، مواد جامد کل ناتراوه یکسان در نظر گرفته شد، ملاحظه گردید که تیمارهایی که اختلاف فشار بالاتری داشتند در زمان کمتری به مواد جامد کل ناتراوه مد نظر رسیدند. با توجه به نتایج این تحقیق مشخص گردید که در هر اختلاف فشار و دمایی بیش از ۴۵ درصد مواد جامد کل شیر و ۹۴ درصد پروتئین شیر شتر توسط غشاء باز نگهداشته شده‌اند.

جدول ۲- مدل‌های تجربی به دست آمده با استفاده از روش مرکب مرکزی برای پیش‌بینی متغیرهای وابسته فرآیند اولترافیلتراسیون شیر شتر
Table 2- Experimental models obtained using the central composite method for predicting the dependent variables of the camel milk ultrafiltration process

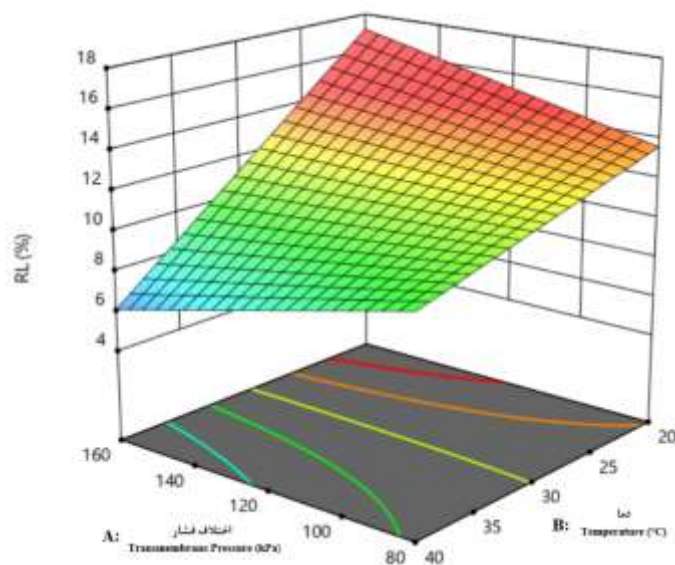
متغیرهای وابسته Dependent variables	معادله Eq	F Value	p-value Prob > F	ضریب تبیین Coefficient of determination	ضریب تغییرات Coefficient of variation	عدم برازش Lack of fit
درصد دفع لاکتوز Lactose rejection	$Y_1 = 6.20 + 0.13A + 0.19B - 0.004AB$	6.95	0.0028	0.74	15	n.s
درصد دفع املاح Ash rejection	$Y_2 = 105.83 + 0.96A - 8.92B - 0.022AB - 0.001A^2 + 0.181B^2$	0.18	0.0001	0.99	0.01	n.s

با توجه به شکل ۱ می‌توان دریافت با افزایش دمای اولترافیلتراسیون درصد دفع لاکتوز نمونه‌ها کاهش می‌یابد. اما افزایش اختلاف فشار در دماهای پایین منجر به افزایش و در دماهای بالا منجر به کاهش درصد دفع لاکتوز نمونه‌ها شد. شکل ۲ نیز نشان می‌دهد با افزایش دمای اولترافیلتراسیون از ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد، درصد دفع املاح نمونه‌ها بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد و افزایش بیشتر دما (۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد)، تاثیر ناچیزی بر افزایش درصد دفع املاح نمونه‌ها داشت. همچنین اثر اختلاف فشار بر درصد دفع املاح روند غیر خطی دارد به‌طوری‌که افزایش اختلاف فشار در دماهای بالا منجر به کاهش و در دماهای پایین منجر به افزایش درصد دفع املاح نمونه گردید. رضوی و همکاران (Razavi et al., 2003) نیز بیان کردند که افزایش اختلاف فشار، بطور جزئی درصد دفع لاکتوز و املاح را افزایش می‌دهد. ثابت شده است که لایه مسیلی متشکل از مسیل‌های کازئین به عنوان یک غشاء دینامیک عمل می‌کند که اندازه حفرات آن برابر اندازه حفرات غشاء است (Krstić et al., 2002). لذا با افزایش فشار، سرعت مهاجرت ترکیبات در اثر جریان همرفتی شار تراوه به طرف سطح غشاء زیاده‌تر می‌شود و بنابراین جذب و رسوب اجزاء محلول به لایه مسیلی سطح غشاء بیشتر گردیده و در نتیجه اندازه مؤثر حفرات کاهش می‌یابد. به همین دلیل درصد دفع اجزای محلول با افزایش اختلاف فشار افزایش می‌یابد. لیمساوات و پروکساسری (Limsawat & Pruksasri, 2010) نیز نشان دادند که افزایش اختلاف فشار فرآیند اولترافیلتراسیون منجر به کاهش درصد دفع لاکتوز شیر UHT کم چرب شد.

مهایا و همکاران (Mehaia et al., 1996) تغییرات غلظت پروتئین، چربی، لاکتوز، مواد جامد کل و املاح شیر شتر در طول فرآیند تغلیظ توسط اولترافیلتراسیون را مورد ارزیابی قرار داد و نشان داد که ۱۰۰ درصد نیتروژن پروتئینی و چربی، حدود ۱۳ درصد نیتروژن غیر پروتئینی و ۱ درصد لاکتوز شیر شتر در طول فرآیند تغلیظ توسط غشاء اولترافیلتراسیون دفع شدند. کائوتک، نابتنی و ماتسونو (Kautake, Nabetani, & Matsuno, 1986) بیان نمود که دما اثر معنی‌داری بر درصد دفع چربی و پروتئین شیر گاو در فرآیند اولترافیلتراسیون نداشت.

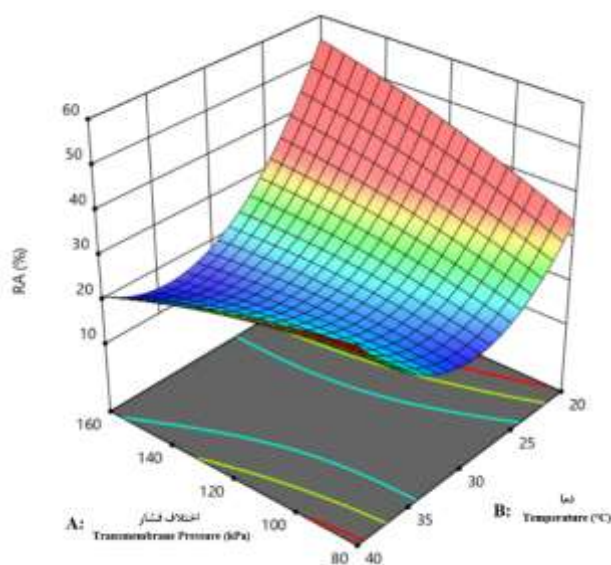
درصد دفع لاکتوز و املاح

درصد دفع لاکتوز و املاح نمونه‌های مورد آزمون به‌ترتیب بین ۴/۹۹ تا ۱۴/۷۳ و ۱۷/۴۸ تا ۳۴/۰۷ درصد متغیر بودند. رضوی، موسوی و مرتضوی (Razavi, Mousavi, & Mortazavi, 2003) نیز بیان کرد در فرآیند اولترافیلتراسیون شیر گاو به طور متوسط در حدود ۱۵ درصد لاکتوز و ۴۵ درصد املاح از توسط غشاء باز داشته شده‌اند. مدل چند جمله‌ای درجه دو Y_4 نشان داد که فقط اثر خطی دما در سطح ۹۹ درصد بر درصد دفع لاکتوز معنی‌دار بود و اختلاف فشار هیچگونه اثر معنی‌داری بر درصد دفع لاکتوز نمونه‌ها نداشت. همچنین مدل چند جمله‌ای درجه دو Y_5 نیز نشان داد که اثرات خطی دما و اختلاف فشار و اثر متقابل دما-اختلاف فشار در سطح ۹۹ درصد بر درصد دفع املاح معنی‌دار بود. شکل‌های ۱ و ۲ به‌ترتیب تأثیر اختلاف فشار و دما را بر درصد دفع لاکتوز و املاح نمونه‌ها را با توجه به ضرایب مدل‌های Y_4 و Y_5 نشان می‌دهند.



شکل ۱- تأثیر اختلاف فشار و دما بر درصد دفع لاکتوز در فرآیند اولترافیلتراسیون شیر شتر

Fig. 1. The effect of temperature and transmembrane pressure on lactose rejection of camel milk ultrafiltration



شکل ۲- تأثیر اختلاف فشار و دما بر درصد دفع املاح در فرآیند اولترافیلتراسیون شیر شتر

Fig. 2. The effect of temperature and transmembrane pressure on ash rejection of camel milk ultrafiltration

سطح غشا و نیز مولکول‌ها با غشاء و در نتیجه جذب سطحی شدیدتر باشد. پومپی، ریزمینی و پری (Pompei, Resmini, & Peri, 1973) نتیجه گرفت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد میزان بازدارندگی اجزاء محلول نسبت به ۵۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر است. اکنر و زاتولا (Eckner & Zottola, 1992) عنوان نمود که دماهای پایین‌تر بازدارندگی ترکیبات شیر (لاکتوز و املاح) را بهبود می‌بخشد.

به نظر می‌رسد علت کاهش درصد دفع لاکتوز و املاح با افزایش دمای اولترافیلتراسیون، بزرگتر شدن ضریب نفوذ آنها با افزایش دما باشد. همچنین از آنجایی که افزایش دما منجر به کاهش مقاومت گرفتگی برگشت‌ناپذیر می‌شود می‌توان بیان کرد که افزایش گرفتگی برگشت‌ناپذیر با دما بستگی به درصد دفع اجزاء محلول شیر ندارد، بلکه احتمالاً امکان تشکیل پیوندهای قوی‌تر بین مولکول‌ها در لایه مجاور

بررسی اهمیت پارامترهای الگوریتم ازدحام ذرات

در این پژوهش به منظور بهینه‌یابی کارایی اولترافیلتراسیون برای تولید محصولات پروتئینی تغلیظ شده از شیر شتر تلاش بر این بود که درصد دفع لاکتوز و املاح به عنوان توابع هدف کاهش یابند. داده‌های اولیه داده شده به الگوریتم ازدحام ذرات در حقیقت داده‌های مدل‌های پیش‌بینی شده از طرح مرکب مرکزی (جدول ۲) هستند، اما از آنجایی که عملکرد الگوریتم ازدحام ذرات به شدت وابسته به پارامترهای مرتبط با آن از جمله تعداد تکرار (Ni)، تعداد ذرات (Np)، ضریب اینرسی (W1)، ضریب یادگیری شخصی (C1) و ضریب یادگیری کلی (C2) است لذا لازم است ابتدا اثر این پارامترها بر توابع هدف اولیه مورد ارزیابی قرار گیرند. لذا در این پژوهش نیز قبل از بهینه‌یابی نهایی توابع هدف، برای مشخص نمودن ضریب اهمیت و تأثیر پارامترهای الگوریتم، ابتدا پارامترهای الگوریتم به عنوان تیمارهای فرآیند به روش کاملاً تصادفی برای پنج متغیر مستقل و در پنج سطح (مطابق جدول ۳) اجرا و پاسخ‌های بهینه (درصد دفع لاکتوز و املاح)، مدت زمان اجرای الگوریتم و تعداد پاسخ‌های مورد ارزیابی (NFE) توسط رگرسیون PLS مورد بررسی قرار گرفتند.

شکل ۳ نمودار ضرایب استاندارد شده برای متغیرهای وابسته

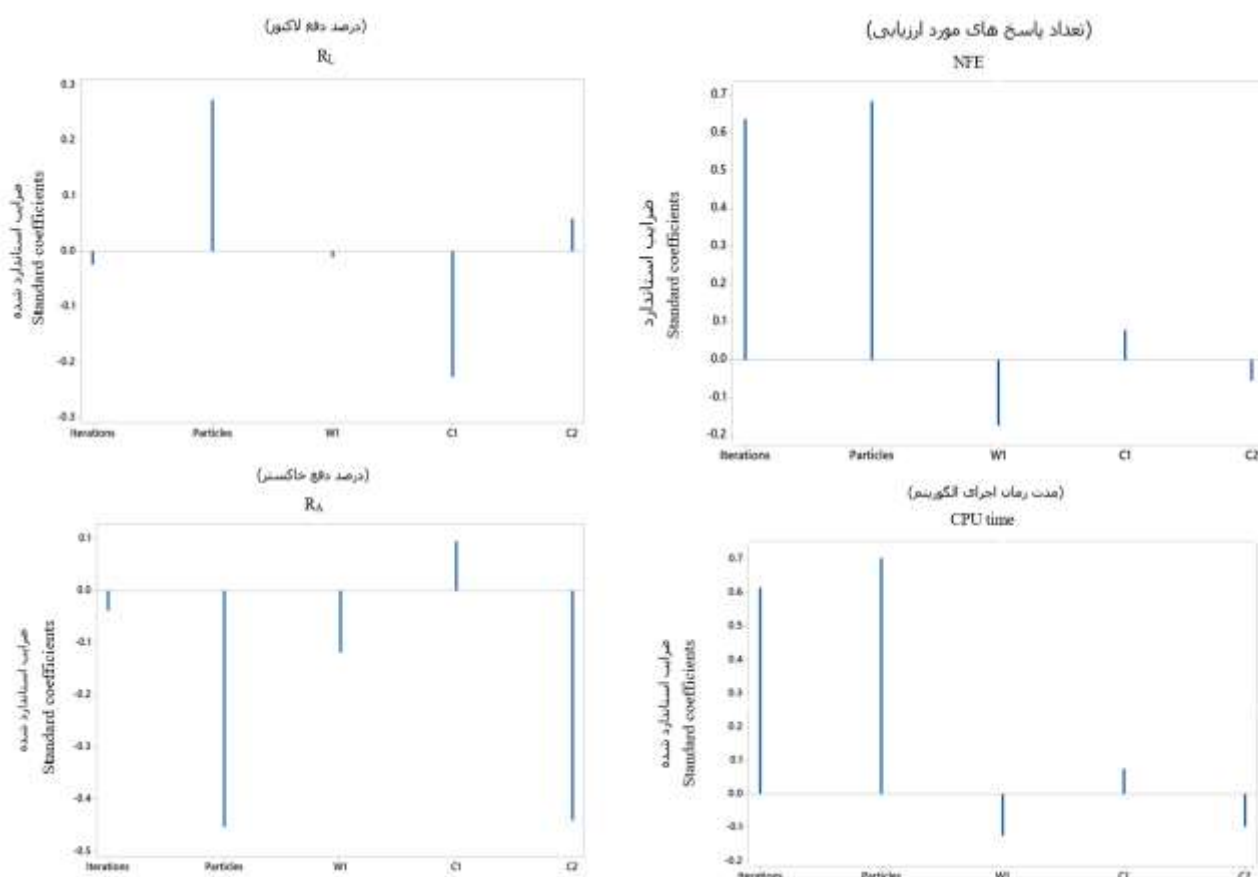
(درصد دفع لاکتوز و املاح)، مدت زمان اجرا الگوریتم و تعداد پاسخ‌های مورد ارزیابی) را با تک تک متغیرهای مستقل (تعداد تکرار، تعداد ذرات، ضریب اینرسی، ضریب یادگیری شخصی و ضریب یادگیری کلی در رگرسیون PLS نشان می‌دهد. در این اشکال هر چه فاصله اثر به عدد یک نزدیک‌تر و یا بیشتر باشد اهمیت بالاتری پیدا می‌کنند.

تعداد تکرار و ذرات

مطابق شکل ۳، تعداد تکرار در مدت زمان اجرای الگوریتم و تعداد پاسخ مورد ارزیابی از اهمیت نسبتاً بالایی برخوردار هستند. اصولاً تعداد تکرار در رسیدن به جواب مناسب به شدت به نوع مسئله وابسته است (Juneja & Nagar, 2016). تکرارهای کم ممکن است فرایند جستجو را بی‌نتیجه خاتمه دهد. همچنین تعداد تکرارهای زیاد نیز می‌تواند منجر به افزایش غیر ضروری پیچیدگی محاسباتی و نهایتاً افزایش زمان اجرای الگوریتم گردد. همچنین همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد تعداد ذرات در همه پاسخ‌های مورد بررسی دارای بالاترین اهمیت است که این اهمیت در درصد دفع لاکتوز مثبت ($+0/82$) و در درصد دفع املاح منفی ($-0/48$) است.

جدول ۳- سطوح متغیرهای پارامترهای الگوریتم ازدحام ذرات
Table 3- Variable levels of particle swarm algorithm parameters

نام متغیر Variable name	سطوح متغیر Variable levels				
تعداد تکرار Number of iterations (Ni)	100	75	50	25	5
تعداد ذرات Number of particles (Np)	100	75	50	25	5
ضریب اینرسی Coefficient of inertia (W1)	2	1.5	1	0.5	0
ضریب یادگیری شخصی Personal learning factor (C1)	4	3	2	1	0
ضریب یادگیری کلی Social learning factor (C2)	4	3	2	1	0



شکل ۳- ضریب اهمیت تخمین زده شده بوسیله رگرسیون PLS بین متغیرهای مستقل با متغیرهای وابسته
Fig. 3. The coefficient of importance estimated by PLS regression between independent and dependent variables

سرعت‌های گذشته را بر سرعت‌های زمان حال کنترل کرد. می‌توان برای برقراری موازنه بهتر میان جست وجوی سراسری و جست وجوی محلی، مقدار ضریب اینرسی را تغییر داد. مقدار زیاد ضریب اینرسی باعث می‌شود ذرات موجود در الگوریتم، به جست وجوی مناطق جدیدتر روی آورند و یک جست‌وجوی سراسری را انجام دهند. در مقابل، مقدار کم ضریب اینرسی باعث می‌شود ذرات در منطقه محدودی بمانند و در واقع جست وجوی محلی انجام دهند. جست‌وجوی محلی برای دقیق‌تر کردن جواب‌های فعلی مناسب است و جست‌وجوی سراسری برای یافتن جواب‌های بهتری که احتمالاً در جاهای ناشناخته از فضای جست وجو وجود دارند، به کار می‌رود (Kennedy & Eberhart, 1995). اولاریو و زومایا (Olariu & Zomaya, 2005) و پلی، کندی و بلک ول (Poli, Kennedy, & Blackwell, 2007) بیان کردند که مقدار مناسب برای ضریب اینرسی، باعث ایجاد تعادل بین جست‌وجوی‌های محلی و سراسری می‌شود و در بیشتر مواقع تعداد تکرارهای لازم برای همگرایی به یک جواب مناسب را کاهش می‌دهد. برگ و انگلبرت (Bergh & Engelbrecht, 2001) نیز بیان کردند که بهتر است مقدار

هر چه تعداد ذرات در گروه بیشتر باشد تنوع جواب اولیه نیز بیشتر خواهد بود. یک گروه بزرگ به قسمت‌های بیشتری از فضای جست وجو اجازه می‌دهد تا در هر تکرار پوشش داده شوند، اگر چه تعداد بیشتر ذرات، محاسبات را پیچیده‌تر می‌کند و منجر به افزایش زمان اجرای الگوریتم می‌شود. در بعضی موارد تعداد ذرات بیشتر، تعداد تکرارها را برای رسیدن به جواب بهینه کم می‌کند. برگ و انگلبرت (Bergh & Engelbrecht, 2001) در مطالعه خود نشان دادند که حضور بین ۱۰ تا ۳۰ ذره در الگوریتم ازدحام ذرات جهت تعیین مقدار بهینه تابع مورد هدفشان مناسب بود.

ضریب اینرسی (W1)

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد ضریب اینرسی در همه پاسخ‌های مورد بررسی دارای اهمیت چندان زیادی نیست که البته این اهمیت در درصد دفع املاح (۰/۱۲-) بیشتر از درصد دفع لاکتوز (۰/۱-) است. ضریب اینرسی بر روی همگرایی الگوریتم ازدحام ذرات تأثیر مستقیم دارد. در واقع می‌توان به واسطه ضریب اینرسی، تأثیر

Kennedy, 2002) نیز روابط زیر را برای تعیین ضرایب یادگیری و اینرسی پیشنهاد دادند:

$$W1 = X \quad (۱)$$

$$C1 = X\varphi_1 \quad (۲)$$

$$C2 = X\varphi_2 \quad (۳)$$

که در این روابط φ_1 و φ_2 اعدادی مثبت هستند و به نوبت انتخاب می‌شوند که $\varphi = \varphi_1 + \varphi_2 \geq 4$ باشد. X نیز از رابطه زیر تعیین می‌شود.

$$X = \frac{2}{\varphi - 2 + \sqrt{\varphi^2 - 4\varphi}} \quad (۴)$$

البته امروزه در بیشتر تحقیقات انجام شده ضریب یادگیری شخصی و ضریب یادگیری کلی ۲ در نظر گرفته شده‌اند که نتایج رضایت بخشی نیز داشته است (Poli, Kennedy & Blackwell, 2007).

بهینه‌یابی عددی

پس از بررسی و شناخت اهمیت پارامترهای الگوریتم ازدحام ذرات، بهینه‌یابی درصد دفع‌های لاکتوز و املاح اولترافیلتراسیون شیر شتر به عنوان توابع هدف انجام شد. لازم به ذکر است در این پژوهش هدف کاهش درصد دفع لاکتوز و املاح در فرایند اولترافیلتراسیون شیر شتر بود. پارامترهای دقیق الگوریتم در جدول ۴ خلاصه شده است:

با توجه به صفات مذکور، اختلاف فشار و دمای بهینه به ترتیب ۸۰ کیلوپاسکال و ۲۹/۸۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد که در چنین فرآیندی دفع لاکتوز ۳/۳۸ درصد و دفع خاکستر ۱۸/۷۰ درصد خواهد بود. همچنین مدت زمان اجرا الگوریتم و تعداد پاسخ‌های مورد ارزیابی در این بهینه‌یابی نیز ۰/۱۴۳ ثانیه و ۱۰۰۰ بودند. شکل ۴ نیز نمودار همگرایی الگوریتم ازدحام ذرات در بهینه‌یابی درصد دفع لاکتوز و درصد دفع املاح اولترافیلتراسیون شیر شتر را نشان می‌دهد.

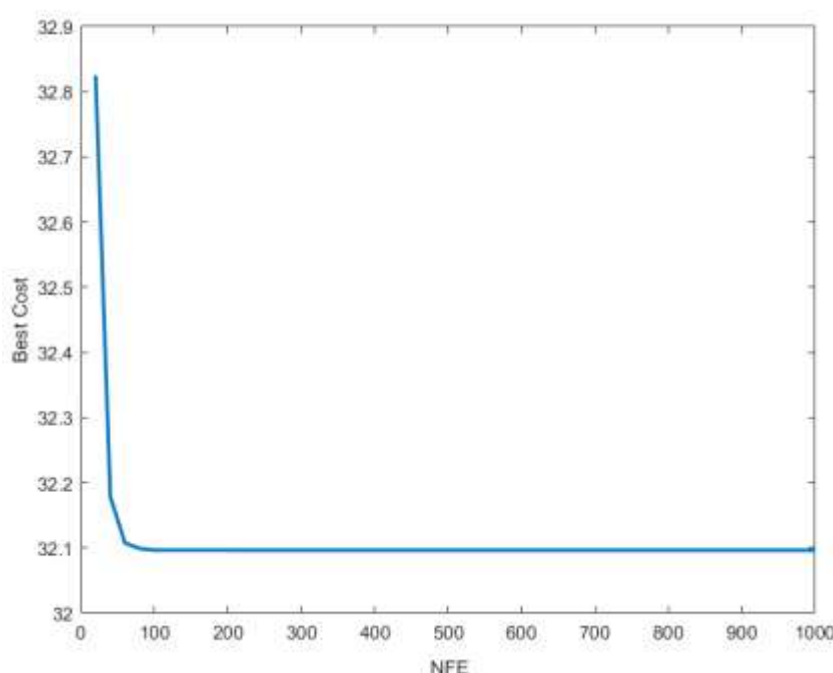
ضریب اینرسی در مراحل ابتدایی، یک مقدار بزرگ در نظر گرفته شود تا یک جست‌وجوی کامل و سراسری از فضای جست‌وجو صورت گیرد، سپس در طی مراحل اجرای الگوریتم، مقدار ضریب اینرسی به تدریج کاهش داده می‌شود تا الگوریتم به مرز هم‌گرایی نزدیک شود و جواب‌های دقیق‌تری به دست دهد. ابرهات، شی و کندی (Eberhart, Shi, & Kennedy, 2001) نیز نشان دادند که انتخاب ضریب اینرسی به صورت یک عدد تصادفی با توزیع یکنواخت در بازه (۰/۵-۱) نیز نتایج خوبی را در بهینه‌یابی توابع هدف داشته است.

ضریب یادگیری شخصی (C1) و ضریب یادگیری کلی (C2)

مطابق شکل ۳، ضریب یادگیری شخصی و ضریب یادگیری کلی در درصد دفع لاکتوز و در درصد دفع املاح از اهمیت نسبتاً بالایی برخوردار هستند که البته ضریب یادگیری شخصی در دفع لاکتوز و ضریب یادگیری کلی در درصد دفع املاح از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. همچنین این ضرایب اهمیت چندانی بر مدت زمان اجرای الگوریتم و تعداد پاسخ‌های مورد ارزیابی ندارند. کندی (Kennedy, 1999) ضمن تحقیقات خود دریافت که برای ذرات تک بعدی که به صورت غیر تصادفی حرکت می‌کنند، اگر مقدار $C1 + C2$ بین صفر و ۴ باشد، مسیرهایی که ذرات طی می‌کنند پذیرفتنی‌تر است. پلی، کندی و بلک‌ول (Poli, Kennedy, & Blackwell, 2007) و ابرهات، شی و کندی (Eberhart, Shi, & Kennedy, 2001) نیز با تحلیل‌هایی که روی سیستم حرکت ذرات انجام دادند، راهبردی برای تعیین ضرایب یادگیری شخصی و کلی ایجاد کردند و ادعا داشتند این راهبرد از ناپایدار شدن سیستم حرکتی ذرات جلوگیری می‌کند، هم‌گرایی ذرات را تضمین می‌کند و نیازی به تعریف پارامترها ندارد. کلرک و کندی (Clerc &

جدول ۴- پارامترهای بهینه‌یابی درصد دفع لاکتوز و درصد دفع املاح اولترافیلتراسیون شیر شتر با استفاده از الگوریتم ازدحام ذرات
Table 4- Optimization parameters of lactose and ash rejections of camel milk ultrafiltration using particle swarm algorithm

نام عامل Factor name	پارامترهای اولترافیلتراسیون (اختلاف فشار و دمای فرایند) Ultrafiltration parameters (transmembrane pressure and temperature)
تابع هدف Target function	مدل منتخب از طرح مرکب مرکزی Selected model of the central composite design (Table 2)
تعداد متغیرها Number of variables	دو متغیر Two variables
	۱. اختلاف فشار در عرض غشاء Transmembrane pressure (x1)
	۲. دمای فرایند Temperature (x2)
بازه تغییر متغیرها Change interval of the variables	160-80=x ₁ 40-20=x ₂
ماکزیمم تعداد تکرارها Maximum number of iteration (Max. Ni)	با توجه به همگرایی Due to convergence 50
تعداد ذرات Number of particles (Np)	با توجه به مدل‌های موجود According to the available models 20
ضریب اینرسی Coefficient of inertia (W1)	0.5
ضریب یادگیری شخصی Personal learning factor (C1)	2
ضریب یادگیری کلی Social learning factor (C2)	2
نوع الگوریتم بهینه‌سازی Type of optimization algorithm	مبتنی بر جهش گاوسی
شرط خاتمه Ending condition	سپری شدن تعداد معینی از تکرارها بدون مشاهده بهبود خاصی در نتیجه Passing a certain number of repetitions without seeing any significant improvement in the result



شکل ۴- نمودار همگرایی الگوریتم ازدحام ذرات در بهینه‌یابی درصد دفع لاکتوز و املاح اولترافیلتراسیون شیر شتر
Fig. 4. Convergence diagram of the particle swarm algorithm in optimizing the lactose and ash rejections in camel milk ultrafiltration

شرایط با استفاده از الگوریتم فراابتکاری ازدحام ذرات بهینه گردید به طوری درصد دفع لاکتوز و درصد دفع املاح حداقل باشند. با توجه به ویژگی‌های مذکور، دما و اختلاف فشار بهینه فرآیند به ترتیب ۲۹/۸۵ درجه سانتی‌گراد و ۸۰ کیلو پاسکال به دست آمد. از تشابه این نتایج با پژوهش‌های مشابه انجام شده بر روی شیر گاو می‌توان به‌طور کلی نتیجه گرفت که اگرچه شیر شتر از نظر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی تفاوت‌های بسیاری با شیر گاو دارد، اما روند کلی درصد دفع اجزاء محلول آن در فرآیند اولترافیلتراسیون با شیر گاو مشابه است. نتایج بهینه‌یابی با الگوریتم ازدحام ذرات نیز نشان داد که این الگوریتم علاوه بر سرعت همگرایی بالا، تعداد پارامترهای اندکی برای بهبود عملکرد خود نیاز دارد به گونه‌ای که با شناخت و تحلیل پارامترهای آن به راحتی می‌توان جواب بهینه را پیدا کرد.

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود نمودار پس از ارزیابی حدود ۱۰۰ پاسخ به همگرایی رسیده است. بنابراین می‌توان بیان کرد که پارامترهای الگوریتم به درستی انتخاب شده‌اند و نقاط بهینه تعیین شده نیز قابل اعتماد هستند.

نتیجه‌گیری

تولید فرآورده‌های حاصل از فرآیند اولترافیلتراسیون شیر شتر به شرط راندمان و هزینه مناسب فرآیند، بازار خوبی را برای تولیدکنندگان فراهم خواهد کرد. با توجه به اهمیت محصولات حاصل از فرآیند اولترافیلتراسیون شیر شتر و نبود اطلاعات درمورد درصد دفع اجزاء محلول شیر شتر، در این تحقیق تاثیر دما و اختلاف فشار در عرض غشاء و برهم‌کنش آنها بر این ویژگی‌ها مورد بررسی قرار گرفت و این

منابع

- Benmechernene, Z., Fernández-No, I., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Kihal, M., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2014). Genomic and proteomic characterization of bacteriocin-producing leuconostoc mesenteroides strains isolated from raw camel milk in two southwest algerian arid zones. *BioMed Research International*, 2014, 853238. <https://doi.org/10.1155/2014/853238>
- Bergh, F.V.D., & Engelbrecht, A.P. (2001). *Effects of swarm size on cooperative particle swarm optimisers*. Paper presented at the Proceedings of the 3rd annual conference on genetic and evolutionary computation.
- Clerc, M., & Kennedy, J. (2002). The particle swarm-explosion, stability, and convergence in a multidimensional complex space. *IEEE transactions on Evolutionary Computation*, 6(1), 58-73.

4. Eberhart, R.C., Shi, Y., & Kennedy, J. (2001). *Swarm intelligence*: Elsevier.
5. Eckner, K., & Zottola, E. (1992). Partitioning of skim milk components as a function of pH, acidulant, and temperature during membrane processing. *Journal of Dairy Science*, 75(8), 2092-2097. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77967-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77967-3)
6. Grandison, A.S., Youravong, W., & Lewis, M.J. (2000). Hydrodynamic factors affecting flux and fouling during ultrafiltration of skimmed milk. *Le Lait*, 80(1), 165-174. <https://doi.org/10.1051/lait:2000116>
7. Hassl, M., Jørgensen, B., & Janhøj, T. (2011). Rennet gelation properties of ultrafiltration retentates from camel milk. *Milchwissenschaft*, 66(1), 80-84.
8. Juneja, M., & Nagar, S. (2016). *Particle swarm optimization algorithm and its parameters: A review*. Paper presented at the 2016 International Conference on Control, Computing, Communication and Materials (ICCCCM).
9. Kautake, M., Nabetani, H., & Matsuno, I. (1986). *Influence of operation parameters on permeate flux in ultrafiltration of milks*, technical research institute, snow brand milk products co. Ltd. Retrieved from
10. Kennedy, J. (1999). *Small worlds and mega-minds: Effects of neighborhood topology on particle swarm performance*. Paper presented at the Proceedings of the 1999 congress on evolutionary computation-CEC99 (Cat. No. 99TH8406).
11. Kennedy, J., & Eberhart, R. (1995). *Particle swarm optimization*. Paper presented at the Proceedings of ICNN'95-international conference on neural networks.
12. Krstić, D.M., Tekić, M.N., Carić, M.D., & Milanov, S. (2002). The effect of turbulence promoter on cross-flow microfiltration of skim milk. *Journal of Membrane Science*, 208(1-2), 303-314. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(02\)00308-3](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(02)00308-3)
13. Limsawat, P., & Pruksasri, S. (2010). Separation of lactose from milk by ultrafiltration. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3(2), 236-243. <https://doi.org/10.1007/s12393-022-09330-2>
14. Luo, X., Ramchandran, L., & Vasiljevic, T. (2015). Lower ultrafiltration temperature improves membrane performance and emulsifying properties of milk protein concentrates. *Dairy science & technology*, 95(1), 15-31. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0192-3>
15. Mehaia, M.A. (1996). Chemical composition of camel skim milk concentrated by ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 6(7), 741-752. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00063-1](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00063-1)
16. Montgomery, D.C. (2017). *Design and analysis of experiments*: John Wiley & sons.
17. Ng, K.S., et al. (2017). Mechanisms of flux decline in skim milk ultrafiltration: A review. *Journal of Membrane Science*, 523, 144-162. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.09.036>
18. Olariu, S., & Zomaya, A.Y. (2005). *Handbook of bioinspired algorithms and applications*: CRC Press.
19. Poli, R., Kennedy, J & Blackwell, T. (2007). Particle swarm optimization. *Swarm Intelligence*, 1(1), 33-57.
20. Pompei, C., Resmini, P., & Peri, C. (1973). Skim milk protein recovery and purification by ultrafiltration influence of temperature on permeation rate and retention. *Journal of Food Science*, 38(5), 867-870.
21. Rao, H.R. (2002). Mechanisms of flux decline during ultrafiltration of dairy products and influence of pH on flux rates of whey and buttermilk. *Desalination*, 144(1-3), 319-324. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00336-3](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00336-3)
22. Razavi, S.M., Alghooneh, A., & Behrouzian, F. (2017). Kinetic modelling of hydraulic resistance in colloidal system ultrafiltration: Effect of physiochemical and hydrodynamic parameters. *Journal of Membrane Science and Research*, 3(4), 296-302. <https://doi.org/10.22079/JMSR.2017.47339.1097>
23. Razavi, S.M.A., Mousavi, S.M., & Mortazavi, S.A. (2003). Dynamic prediction of milk ultrafiltration performance: A neural network approach. *Chemical Engineering Science*, 58(18), 4185-4195. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(03\)00301-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(03)00301-4)
24. Saltelli, A. (2002). Sensitivity analysis for importance assessment. *Risk analysis*, 22(3), 579-590. <https://doi.org/10.1111/0272-4332.00040>
25. Shi, Y., & Eberhart, R.C. (1998). *Parameter selection in particle swarm optimization*. Paper presented at the International conference on evolutionary programming.
26. Tenenhaus, M., et al. (2005). PLS methodology to study relationships between hedonic judgements and product characteristics. *Food Quality and Preference*, 16(4), 315-325. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.05.013>
27. Wang, K.Y., & Chung, T.-S. (2005). The characterization of flat composite nanofiltration membranes and their applications in the separation of cephalixin. *Journal of Membrane Science*, 247(1-2), 37-50. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.09.007>

28. Yang, X.-S. (2010). *Engineering optimization: An introduction with metaheuristic applications*: John Wiley & Sons.

Research Article
Vol. 19, No. 5, Dec.-Jan. 2023, p. 593-606

Investigating the Physicochemical Properties of Healthy Yogurt Containing Bitter Gourd Powder

Z. Mohkami^{1*}, H.Ghorbani Ghouzhd², F. Bidarnamani³, Y. Shiri⁴

1 and 3- Assistant Professors, Department of Agriculture and Plant Breeding, Agriculture Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran

(*- Corresponding Author Email: zaynabmohkami@uoz.ac.ir)

2- Lecturer, University of Gonabad, Department of Horticulture, Faculty of Sciences, Gonabad, Iran

4- Assistant Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Agriculture Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran and Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: 2022.06.01

Revised: 2023.01.24

Accepted: 2023.01.27

Available Online: 2023.01.30

How to cite this article:

Mohkami, Z., Ghorbani Ghouzhd, H., Bidarnamani, F., & Shiri, Y. (2023). Investigating the physicochemical properties of healthy yogurt containing Bitter gourd powder. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5), 593-606. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.76410.1168>

Introduction

Yogurt is one of the most widely consumed fermented milk products, which, like any other dairy products, is prone to spoilage and poor quality. On the other hand consumers have become more cautious about their diet and health. Their is an increasing demand for food products with higher nutritional values and health benefits. The continuous improvement of the production process and the quality of yogurt is at the heart of manufacturers' concerns. Also, finding a safe, cheap and affordable solution that, in addition to controlling blood sugar and preventing the complications of diabetes, relieves the pain of diabetic patients; has always been of interest to researchers. The medicinal plant Bitter gourd (*Momordica charantia* L.) from the cucurbitaceae family is used in traditional medicine to control blood sugar. Carla fruit is a rich source of phytochemical compounds such as proteins, steroids, alkaloids, mineral compounds, lipids, triterpenoids and polyphenols. Functional yogurt is one of the dairy products that can contain bioactive compounds in order to increase its acceptability and improve its nutritional and medicinal properties. Therefore, this study was carried out with the aim of producing colored yogurt containing Carla fruit powder in order to increase the variety of appearance, marketability of the product and improve the nutritional characteristics of yogurt with emphasis on the consumption of novel product.

Materials and Methods

In this study, the effects of adding Carla powder to yogurt were investigated with the aim of producing a beneficial food for diabetics. Carla fruit was collected from the medicinal plants collection of the Agriculture Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran. Then it was washed with water and cut into thin layers. These parts were completely dried in an electric oven at 40 °C for 48 hours and pulverized with an electric mill. Carla fruit powder was added to the samples in four levels of 0 (control), 0.2, 0.4 and 0.6%. Physicochemical properties of samples such as pH, acidity, viscosity (using Brookfield spindle viscometer) and water holding capacity were measured. Total phenol content was measured by Folin Ciocalteu reagent method. Antioxidant properties were investigated by scavenging rate of DPPH free radicals. The results were analyzed by SPSS version 21 statistical software at the probability level of 5% ($P < 0.05$). Duncan's multiple range test was performed to determine the statistically significant difference between the means.

Results and Discussion



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.76410.1168>

The results of this study showed that the highest pH (4.17) was detected in the control and the addition of Carla fruit powder led to a decrease in pH. Storage time also lower the pH in yogurt samples. The highest acidity (1.3%) was measured in the treatment containing 0.6% Carla fruit powder and the lowest (0.59%) was in the control. It means that adding Carla powder to yogurt leads to an increase in acidity. The highest amount of phenolic compounds (475.63 μg equivalent of gallic acid/ml yogurt), was calculated in a sample containing 0.6% of Carla fruit powder. However, extended storage time, decreases the amount of phenolic compounds. By increasing the percentage of Carla fruit powder in yogurt samples, the amount of antioxidant activity increased. So that the highest antioxidant activity (93%) was related to the treatment containing 0.6% Carla powder on the 28th day of the storage. In the present study, the highest percentage of water holding capacity (84%) was observed in samples containing 0.6% Carla powder. The lowest water holding capacity (57.61%) was measured in the control sample at the first day of storage.

Conclusion

According to the results of this study, adding Carla powder to yogurt at the level of 0.6%, in addition to maintaining appearance properties, can increase its physicochemical properties and produce a novel food. In general, Carla powder can play a significant role in improving the textural properties of yogurt, and by increasing the viscosity and the water holding capacity, can reduce the negative effects of the storage period.

Acknowledgement

This research was conducted with the financial support by Research Institute of Zabol (Grant code: IR-RIOZ-GR-9027).

Keywords: Antioxidants, Anti-diabetes, Bitter gourd, Medicinal plants, Viscosity



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲، ص. ۵۹۳-۶۰۶

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست فراسودمند حاوی پودر کارلا

زینب محکمی^{۱*} - حسن قربانی قوژدی^۲ - فاطمه بیدرنامنی^۳ - یعقوب شیری^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۰

چکیده

ماست یکی از پر مصرف‌ترین فرآورده تخمیری شیر بوده که مانند هر محصول لبنی دیگر، در معرض فساد و افت کیفیت قرار دارد. تلاش برای بهبود فرآیند تولید و بالابردن کیفیت این محصول، امری ضروری می‌باشد. همچنین پیدا کردن راهکاری مطمئن، ارزان و در دسترس که علاوه بر کنترل قند خون و جلوگیری از بروز عوارض بیماری دیابت، موجب تسکین دردهای بیماران دیابتی شود؛ همواره مورد توجه محققین بوده است. گیاه دارویی کارلا (*Momordica charantia* L.) از خانواده کدوئیان در طب سنتی برای کنترل قند خون استفاده می‌شود. در این پژوهش اثرات افزودن پودر کارلا به ماست با هدف تولید غذای فراسودمند مورد بررسی قرار گرفت. پودر میوه کارلا در چهار سطح ۰ (شاهد)، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد به نمونه‌ها در سه تکرار افزوده شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه‌ها از قبیل pH، اسیدیته، ویسکوزیته، ظرفیت نگهداری آب، محتوای فنل کل و خاصیت آنتی‌اکسیدان مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این آزمایش نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۴۷۵/۶۳ میکروگرم معادل گالیک اسید / میلی لیتر ماست)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۹۳ درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد DPPH)، بیشترین میزان ظرفیت نگهداری آب (۸۴٪) و ویسکوزیته (۳۶۶ پاسکال ثانیه) در نمونه محتوی ۰/۶ درصد پودر میوه کارلا سنجش گردید. طبق نتایج این تحقیق افزودن پودر کارلا به ماست در سطح ۰/۶ درصد، افزون بر حفظ خواص ظاهری می‌تواند ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن را بهبود بخشیده و یک محصول جدید تولید نماید.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ضد دیابت، کدوی تلخ، گیاهان دارویی، ویسکوزیته

مقدمه

2010). میوه کارلا منبعی غنی از ترکیبات فیتوشیمیایی از قبیل: پروتئین‌ها، استروئیدها، آلکالوئیدها، ترکیبات معدنی، لیپیدها، تری ترپنوئیدها و پلی‌فنول‌هاست (Ahmad et al., 2016; Sung Goo et al., 2016). اخیراً محققان از میوه‌های این گیاه برای درمان بیماری‌هایی نظیر دیابت، فشار خون بالا، چاقی، سرطان و حتی ایدز استفاده کرده‌اند (Shobha et al., 2015; Perumal et al., 2015; Updhyay et al., 2015).

امروزه غذاهای فراسودمند یا غذاهای عملگرا بعنوان راهکاری در حفظ سلامت تغذیه‌ای بشر مطرح شده و میزان تقاضا برای محصولات

کارلا (*Momordica charantia* L.) گیاهی دارویی متعلق به تیره کدوئیان و بومی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان است. این گیاه دارای ارزش غذایی بالا بوده و از قدیم به واسطه خواص دارویی بی‌شمارش در سرتاسر جهان شناخته شده بوده است (Li et al., 2020). کارلا به طور گسترده برای استفاده از میوه آن کشت می‌گردد. پرورش این گیاه در ایران، مخصوصاً در استان سیستان و بلوچستان و شهرستان کنارک در سطح وسیعی توسعه یافته است (Sarani et al., 2020).

۱- استادیار، فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران
(نویسنده مسئول: Email: zaynabmohkami@uoz.ac.ir)

۲- مربی، علوم باغبانی، دانشکده علوم، مجتمع آموزش عالی گناباد، گناباد، ایران

۳- استادیار، علوم باغبانی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران

۴- استادیار، بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران و استادیار، بیوتکنولوژی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

محققان اثر افزودن میوه کدوی خاردار (*Momordica cochinchinensis*) و بیگنای (*Antidesma bunius*) را بر خصوصیات تغذیه‌ای ماست بررسی نمودند. این دو میوه غنی از بتاکاروتن و لیکوپن هستند. افزودن پودر این دو میوه به ماست می‌تواند در بهبود بیماری‌های قلبی و کمبود ویتامین A موثر باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که پس از مدت زمان نگهداری، ماست غنی شده با پودر میوه کدوی خاردار دارای pH ۴ و مواد جامد محلول (TSS) ۲۳ درجه بریکس و محتوای اسید لاکتیک ۱ درصد و محتوای باکتریایی ۶/۷۵ CFU/mL است. اما فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه بیگنای بیشتر از کدوی خاردار بود (Gonzales et al., 2019).

گزارشات محدودی در مورد تولید ماست‌های رنگی فراسودمند وجود دارد. بنابراین هدف اصلی این مطالعه تولید ماست فراسودمند رنگی حاوی پودر میوه کارلا جهت افزایش تنوع ظاهری، بازاریابی محصول و بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای ماست در راستای اصلاح الگوی مصرف غذا و تاکید بر مصرف غذاهای فراسودمند است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

میوه کارلا از کلکسیون گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی پژوهشگاه زابل واقع در چاه‌نیمه بقیه‌اله الاعظم (عج) شهرستان زهک (موقعیت جغرافیایی ۶۱ درجه و ۲۹ دقیقه طول شرقی و عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۱۳ دقیقه شمالی و در ارتفاع ۴۹۸/۲ متر از سطح دریا) جمع‌آوری گردید (شکل ۱). سپس به وسیله آب شستشو داده شده و به کمک چاقو به لایه‌های نازک برش داده شد. این قطعات درون آون الکتریکی با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت به‌طور کامل خشک و به کمک آسیاب برقی پودر گردید. نمونه پودر شده از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد و سپس در پاکت‌های سلولزی در مکان خشک و خنک (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) دور از نور و رطوبت تا زمان مصرف نگهداری شد. خصوصیات فیتوشیمیایی کارلا به شرح ذیل سنجش شد.

اندازه‌گیری کارتنوئید

جهت سنجش کارتنوئید کل ۰/۵ گرم گوشت میوه کاملاً رسیده به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. قرائت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر صورت گرفت. استون ۸۰ درصد جهت کالیبر نمودن دستگاه استفاده گردید (Lichtenthaler, 1987; Khaleghnezhad et al., 2019).

$$C = (1000 A_{470} - 1.82 \text{ Chl } a - 85.02 \text{ Chl } b) / 198 \times (V/(W \times 1000)) \quad (1)$$

غذایی فوق به دلیل افزایش آگاهی مردم روز به روز در حال افزایش است (Siyasi pourphomani & Kohestani, 2015). این محصولات علاوه بر اثرات تغذیه‌ای، ساختار یا عملکرد بدن را جهت بهبود وضعیت سلامت و تندرستی و یا کاهش خطر و احتمال ابتلا به بیماری تحت تأثیر قرار می‌دهند (Bajhan et al., 2018). پیشگیری و کنترل بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های مزمن مرتبط با تغذیه از جمله دیابت، بیماری‌های قلبی-عروقی و انواع سرطان که با روند هشداردهنده و رو به گسترش خود هزینه‌های سنگین بر کشورها وارد می‌کنند؛ دلیل عمده و اساسی تولید و ترویج و مصرف غذاهای فراسودمند است (Abdollahi, 2018).

ماست فراسودمند یکی از محصولات لبنی است که می‌تواند حاوی ترکیبات زیست فعال به منظور افزایش مقبولیت و بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای و دارویی آن باشد. استفاده از فرآورده‌های گیاهی در تولید ماست می‌تواند سبب کاهش خطر بیماری‌های مزمن مانند سرطان، پوکی استخوان، فشار خون، دیابت و بیماری‌های قلبی شود. این عصاره‌ها شامل گلوکوزینولات، آنتی‌اکسیدان‌ها، آنتوسیانین‌ها، لیکوپن، کارتنوئید و ترکیبات فنولیک مثل فلاونوئیدها هستند (Amirdivani et al., 2012).

محققان اثر افزودن ۱ تا ۳ درصد پودر کارلا بر خصوصیات کیفی ماست را بررسی نمودند. pH و اسیدیته به ترتیب در رنج ۳/۹۵ - ۵/۸۵ و ۲/۹۷ - ۹/۶۲ درصد بود. پودر کارلا فعالیت مهار آلفا آمیلاز، آلفا گلوکوزیداز و لیپاز را افزایش داد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماست (تست DPPH و RP) با افزایش مقدار پودر کارلا افزایش یافت. این نتایج نشان داد که ماست غنی‌شده با پودر کارلا دارای فعالیت بازدارنده آنزیم‌های گوارشی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی است و انتظار می‌رود که به عنوان یک غذای فراسودمند استفاده شود (Park et al., 2018).

سلامی و همکاران تأثیر افزودن کدو سبز (*Cucurbita pepo*) را بر ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی و حسی ماست همزده طی نگهداری ارزیابی نمودند. نتایج آن‌ها بیانگر اثر معنی‌دار نوع، درصد کدوسبز و مدت زمان نگهداری بر pH، اسیدیته و سفتی بافت بود. طی زمان، اسیدیته افزایش و pH کاهش یافت. در هیچ یک از تیمارها در طول زمان نگهداری آب‌اندازی مشاهده نشد. سفتی بافت نمونه‌های حاوی پودر کدو سبز بیشتر از نمونه‌های حاوی گرانول بود و طی نگهداری سفتی بافت افزایش یافت. از روز اول تا روز پنجم، سفتی بافت افزایش یافت و طی روز پنجم به دهم کاهش سفتی مشاهده شد و نهایتاً تا روز پانزدهم سفتی بافت افزایش یافت. ارزیاب‌ها تفاوتی در نوع و درصد کدوسبز قائل نشدند و بیشترین امتیاز شاخص‌های حسی در روز پانزدهم بود و نمونه مطلوب از نظر ارزیاب‌ها، ماست حاوی ۱/۴ درصد گرانول کدوسبز بود (Salami et al., 2021).



شکل ۱- میوه کارلا در مرحله بلوغ باغبانی
Fig. 1. Carla fruit at the horticultural maturity stage

لوله‌ای آزمایش میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۳ نانومتر قرائت گردید. میزان کربوهیدرات استخراجی بر اساس میکروگرم گلوکز/ گرم وزن تر نمونه و بر اساس منحنی استاندارد گلوکز محاسبه گردید. شاهد کوت حاوی فنل و اسیدسولفوریک بدون گلوکز است (Rabiei & Jozghasemi, 2013).

اندازه‌گیری ویتامین ث به روش یدومتريک

آب میوه را به کمک آبمیوه‌گیری استخراج نموده و به کمک کاغذ صافی واتمن No:1 صاف گردید. ۱۰ میلی‌لیتر از آب میوه با آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق شد. محلول نشاسته ۱٪ تهیه گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول نشاسته را به آب میوه افزوده و به آرامی توسط محلول یدات تیترا نموده تا رنگ خاکستری روشن ظاهر گردد. حجم محلول یدات مصرفی جهت تیترا را یادداشت نموده و از فرمول ذیل میزان ویتامین ث بر حسب میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه (mg/ 100 ml fruit juice) محاسبه گردید (Rabiei & Jozghasemi, 2013).

$$A = (S \times N \times F \times 88.1 \times 100) / 10 \quad (3)$$

A: میزان اسیدآسکوربیک در عصاره میوه، S: مقدار محلول ید مصرفی، N: نرمالیت ید مصرفی (۰/۱)، F: فاکتور محلول ید مصرفی (۰/۸۸۵)

اندازه‌گیری اسیدیته کل میوه (TA)

ابتدا ۵ میلی‌لیتر از آب میوه با ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسید. این محلول با کمک دستگاه pH متر با سود ۰/۱ نرمال تیترا گردید تا زمانیکه اسیدیته آن بین ۸/۱-۸/۲ ثابت ماند. حجم سود مصرفی یادداشت گردید. این حجم از سود معرف اسیدیته کل در آب میوه بود (Rabiei & Jozghasemi, 2013).

اندازه‌گیری مواد جامد محلول (TSS)

برای اندازه‌گیری میزان مواد جامد محلول (شاخص بریکس) از دستگاه رفرکتومتر استفاده گردید (Silva et al., 2016).

در رابطه‌ی فوق A میزان جذب قرائت شده توسط دستگاه، C میزان کارتنوئید، V حجم نهایی عصاره‌ی استون ۸۰٪ و W وزن تازه بافت برای عصاره‌گیری بر حسب گرم است.

اندازه‌گیری آنتوسیانین

جهت سنجش میزان آنتوسیانین از روش متانول اسیدی استفاده گردید. بدین ترتیب که ۰/۱ گرم از بافت تازه (آریل قرمز رنگ اطراف بذر) با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (مخلوط ۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک خالص با ۹۹ میلی‌لیتر متانول) سائیده شد. عصاره‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. جذب محلول فوقانی در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل Unic, UV, 2100) قرائت گردید. از محلول متانول اسیدی به عنوان شاهد استفاده گردید (Khaleghnezhad et al., 2019).

$$A = \sum bc \quad (2)$$

Σ: ضریب خاموشی معادل ۳۳۰۰۰ مول بر سانتی‌متر، b: عرض کوت برابر یک سانتی‌متر، c: مقدار آنتوسیانین بر حسب مول بر گرم، A: مقدار جذب

اندازه‌گیری درصد پروتئین

برای اندازه‌گیری درصد نیتروژن از روش کج‌لدال استفاده شد. درصد پروتئین با استفاده از ضریب تبدیل ۶/۲۵ در درصد نیتروژن بدست آمد (Kjeldal, 1998).

اندازه‌گیری کربوهیدرات

میزان ۰/۲ گرم از بافت تازه نمونه را توزین نموده به آن ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ افزوده و سپس در حمام بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت. یک میلی‌لیتر از عصاره استخراجی فوق را با ۱ میلی‌لیتر فنول ۵٪ و ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ به آرامی مخلوط نموده و پس از سرد شدن محتویات

جدول ۱- خصوصیات شیمیایی نمونه کارلا

Table 1- Phytochemical traits of Carella sampel used in this study+

آنتوسیانین	کارتونوئید	ویتامین ث	اسیدیت کل	مواد جامد محلول	پروتئین	کربوهیدرات
Antocyanin	Cartenoeid	Vitamin C	TA	TSS	Protein	Carbohydrate
mg/g D.W.	mg/g D.W.	µg/100 g	%	Brix	%	mg Glucose/g
8.29	5.67	5.45	0.022	5.53	0.092	1.95

(Institute of Standards and Industrial Research of Iran,)

(2852).

$$\text{درصد اسیدیت} = \frac{V}{100 \times 0.009 \times N} \quad (4)$$

N: میلی لیتر حجم سود مصرفی، V: حجم نمونه

اندازه گیری سینرزیس یا آب اندازی ماست

اساس این روش اندازه گیری میزان آب اندازی نمونه ها می باشد. برای این منظور ۵۰ گرم از نمونه های ماست درون لوله های سانتریفیوژ توزین و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۲۲۲ g سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی جدا و توزین گردید. از نسبت وزن آن به وزن ماست اولیه درصد آب اندازی (معادله ۵) گزارش شد (Mohammadi Sani et al., 2015; Moayedzadeh et al.,) (2015).

$$WHC = \frac{(Y-W)}{Y} \times 100 \quad (5)$$

Y: وزن مایع رویی پس از سانتریفیوژ، W: وزن ماست اولیه

اندازه گیری ویسکوزیته

ویسکوزیته نمونه های تولیدی با استفاده از ویسکومتر با اسپندل بروکفیلد (Brookfield, USA) شماره CP51 و سرعت ۲۱ دور در دقیقه، پس از گذشت ۱۰ ثانیه از چرخش اسپندل در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد) اندازه گیری گردید (Alirezalu et al., 2015).

عصاره گیری از ماست جهت اندازه گیری فنل کل و فعالیت

آنتی اکسیدانی

به منظور تهیه عصاره ماست، ۱۰ گرم از نمونه ماست های مورد بررسی با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید و pH آن توسط اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال روی ۴ تنظیم شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۴۵ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. بعد از جدا کردن فاز رویی، تنظیم pH این قسمت با هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال تا رسیدن به

تهیه ماست و اعمال تیمارها

شیر گاو (با ویژگی های pH: ۶/۷۲ درصد، میزان ماده خشک: ۱۲/۷۰ درصد، پروتئین: ۳/۷۰ درصد و چربی: ۳/۱۵ درصد) از فروشگاه لبنیات شهر زابل تهیه شد و پودر میوه خشک کارلا با مقادیر ۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد (وزنی/وزنی) به شیر خام با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد اضافه گردید. خصوصیات نمونه کارلا افزوده شده به شیر در جدول فوق ذکر شده است (جدول ۱). این مخلوط توسط همزن برقی خوب همزده شد تا پودر خشک میوه کارلا به طور کامل در شیر حل شود. سپس مخلوط در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در حال هم زدن آرام، در حمام آب گرم پاستوریزه شد. پس از خنک شدن شیر تا دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، مایه ماست به میزان ۲ گرم بر لیتر اضافه گردید. نمونه ها در گرمخانه با دمای ۴۰-۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از ۱۲ ساعت و انعقاد کامل، ماست ها به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. طول دوره نگهداری نمونه ها در یخچال ۲۸ روز بوده و در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ اندازه گیری صفات انجام شد (Dalili et al., 2015).

اندازه گیری pH

pH نمونه ها با استفاده از روش استاندارد ایران به شماره ۲۸۵۲ اندازه گیری شد. بعد از همگن سازی نمونه های ماست مقدار ۱۰ گرم از هر نمونه را در داخل بشر ریخته و توسط pH متر که قبلاً با بافر ۴ و ۷ کالیبره شده، pH نمونه ها اندازه گیری شد (Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2852).

تعیین اسیدیت

پس از یکنواخت کردن نمونه ها، ۱۰ میلی لیتر از هر یک، با ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه رقیق شد و ۰/۵ میلی لیتر معرف فنل فتالین اضافه شد و با سود ۰/۱ نرمال تا پیدایش رنگ صورتی تیترو گردید. اسیدیت بر حسب درصد اسیدلاکتیک محاسبه (معادله ۴) و گزارش گردید

pH = 7 انجام و عمل سانتیفریوژ کردن تحت شرایط پیش گفته دوباره تکرار شد. فاز رویی به عنوان عصاره استخراجی ماست برای آزمون تعیین فنل کل و درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد مورد استفاده قرار گرفت (Rufaghari Nejad & Allahyari, 2016).

سنجش فنل کل

مقادیر ترکیبات فنلی موجود در عصاره ماست توسط روش لی و همکاران (Li et al., 2015) اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراجی درون لوله‌های آزمایش ریخته و ۴۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق شده با آب به نسبت ۱:۱۰) و ۴۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷٪ به مخلوط فوق اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری این مخلوط واکنش در شرایط دمای محیط، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. در نهایت با قرار دادن مقدار جذب در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد گالیک اسید (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) مقدار فنل کل موجود در عصاره (معادله ۶) محاسبه گردید. داده‌ها معادل میکروگرم گالیک اسید بر گرم عصاره بیان شد. همه سنجش‌ها در سه تکرار انجام شد (Li et al., 2015).

$$Y = 0.004 X + 0.1 \quad (6)$$

Y: عدد جذب شده در دستگاه اسپکتروفتومتر، X: میزان فنل کل

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان

سنجش فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به روش باروس و همکاران (Barros et al., 2007) صورت گرفت ۲۵۰ میکرولیتر از

عصاره با ۷۵۰ میکرولیتر از محلول DPPH (دو میلی گرم DPPH در ۵۰ میلی لیتر متانول) مخلوط گردید. این نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق انکوبه شد و سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. قبل از شروع قرائت نمونه‌ها دستگاه توسط متانول کالیبره گردید. درصد مهار رادیکال‌های آزاد با فرمول ذیل (معادله ۷) محاسبه گردید (Barros et al., 2007).

$$DPPH \text{ آزاد} = \frac{(AC-AS)}{AC} \times 100 \quad (7)$$

AC: میزان جذب برای شاهد، AS: میزان جذب نمونه

آنالیز آماری داده‌ها

به منظور تعیین اثر پودر کارلا بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد استفاده قرار گرفت. همه آزمون‌ها در سه مرتبه تکرار گردید. نتایج حاصل توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ در سطح احتمال ۵٪ ($P < 0.05$) آنالیز شدند. آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از آن بود که اثر افزودن پودر میوه کارلا و مدت زمان نگهداری در یخچال بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس حاصل از آنالیز آماری داده‌ها

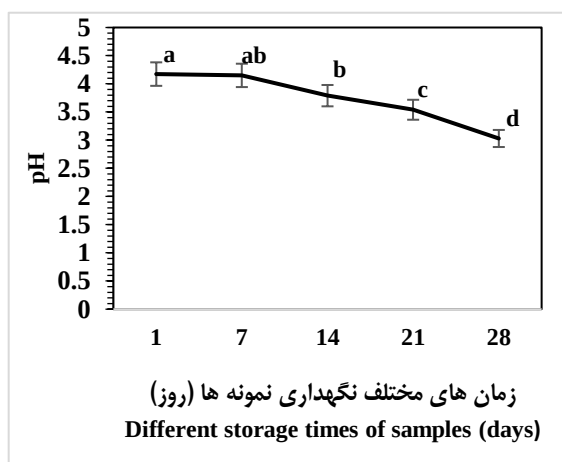
Table 2- Analysis of variance obtained from statistical analysis of data

تیمار Treatment	درجه آزادی DF	بی‌اچ pH (%)	اسیدیته Acidity (%)	ظرفیت نگهداری آب Water holding capacity (%)	ویسکوزیته Viscosity (PS)	فنل کل Total phenol (µg GAE/mg)	فعالیت آنتی‌اکسیدان
							Antioxidant activity (Scavenging Percentage of DPPH free radicals)
پودر میوه کارلا (a) Carella powder	3	0.523*	1270.94*	0.1372*	13963.66*	16107.43*	7060.97*
زمان نگهداری (b) Time (b)	4	1.67*	80.96*	0.1434*	19069.60*	20642.12*	476.59*
اثر متقابل (a*b) Interaction effect	12	0.059 ^{ns}	219.86**	0.0070*	11927.56*	7984.5**	49.40**
خطا (Error) (Error)	-	0.035	0.8	0.0008	195.26	1977.08	35.65
ضریب تغییرات (C.V.)	-	4.98	1.26	3.31	7.002	13.34	13.10

* معناداری در سطح احتمال ۰/۰۵ ($P < 0.05$) ** معناداری در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P < 0.01$) ^{ns} عدم معناداری

*Significance at 0.05 % probability level ($P < 0.05$) ** Significance at 0.01% probability level ($P < 0.01$) ^{ns} non Significance

(شکل ۳). به طور کلی بر اساس نتایج این آزمایش نمونه ماست حاوی ۰/۶ درصد پودر میوه کارلا کمترین pH را در روز ۲۸ام در مقایسه با سایر نمونه‌ها داشت ($p < 0.05$). نتایج آزمایش ما با نتایج تحقیق سلامی و همکاران (Salami et al., 2021) در مورد افزودن کدو سبز به ماست هم‌زده مطابقت داشت. طبق نتایج آن‌ها نیز کمترین pH مربوط به نمونه ماست محتوی ۲ درصد پودر کدو سبز (بالاترین درصد پودر) و در روز پانزدهم نگهداری (آخرین روز آزمایش) بود. آن‌ها اذعان نمودند که با افزایش زمان، اسیدیته افزایش و pH کاهش پیدا کرد که عامل آن افزایش فعالیت متابولیکی باکتری‌های اسید لاکتیک ماست است. آغازگرها با مصرف قند و تولید اسیدهای آلی باعث افزایش اسیدیته و کاهش pH می‌شوند (Karami & Asadi, 2017). دلیل افزایش اسیدیته و کاهش pH ماست در اثر افزایش مقدار پودر میوه کارلا را می‌توان چنین توجیه کرد که خود دارای شرایط اسیدی بوده بنابراین افزودن آن به ماست می‌تواند باعث کاهش pH گردد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر تحقیقات پیرامون افزودن پوره‌های گیاهی کدوسبز و کدو تنبل به ماست مطابقت دارد (Ozcan & Yildiz, 2016).

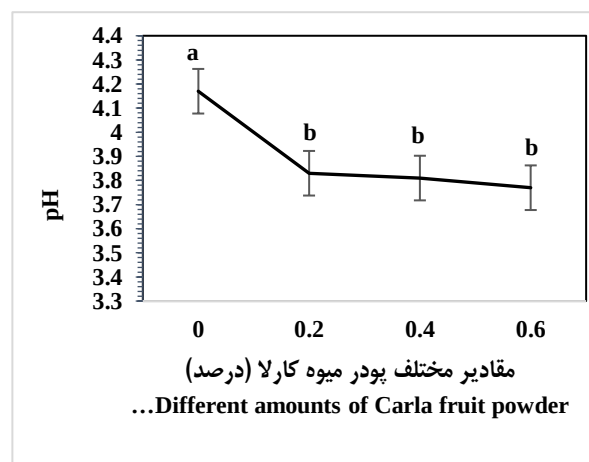


شکل ۳- تأثیر مدت زمان نگهداری بر pH ماست
Fig. 3. The effect of storage time on yogurt pH

پودر میوه کارلا و کمترین میزان آن (۰/۵۹٪) در تیمار شاهد (عدم افزودن پودر کارلا) اندازه‌گیری شد و افزودن پودر کارلا منجر به افزایش میزان اسیدیته گردید. در این آزمایش، اسیدیته قابل تیتراسیون نیز تغییراتی مشابه ولی برخلاف pH نشان داد. به‌طوری‌که با افزایش زمان نگهداری، اسیدیته در تمامی نمونه‌ها بیشتر شد و تأثیر زمان روی افزایش اسیدیته معنی‌دار بود ($P < 0.05$). همچنین اثر متقابل زمان و

ارزیابی pH ماست حاوی درصدهای مختلف پودر کارلا

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده افزودن پودر میوه کارلا به ماست و مدت زمان نگهداری بر میزان pH نمونه‌های ماست مورد بررسی اثر معناداری در سطح احتمال ۵٪ داشت؛ اما اثر متقابل این فاکتورها بر میزان pH نمونه‌ها اثر معنی‌داری نداشت (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد بالاترین میانگین میزان pH (۴/۱۷) در تیمار شاهد (عدم افزودن پودر میوه کارلا) اندازه‌گیری شد و افزودن پودر میوه کارلا منجر به کاهش میزان pH گردید. هرچند با افزایش درصد پودر میوه کارلا در ماست میزان pH به مقدار بیشتری کاهش یافت؛ لیکن اختلاف آماری معنی‌داری بین درصدهای مختلف پودر میوه کارلا وجود نداشت (شکل ۲). زمان نگهداری نیز باعث کاهش pH در نمونه‌های ماست گردید. یک روز پس از اعمال تیمارها بالاترین میانگین میزان pH (۴/۱۷) در نمونه‌ها سنجش شد و به تدریج با گذر زمان تا روز ۲۸ام میزان pH کاهش یافت به‌طوری‌که در این روز (روز ۲۸ام) پایین‌ترین میانگین pH (۳/۰۳) مشاهده گردید



شکل ۲- تأثیر درصدهای مختلف پودر کارلا بر pH ماست
Fig. 2. The effect of different percentages of bitter melon powder on yogurt pH

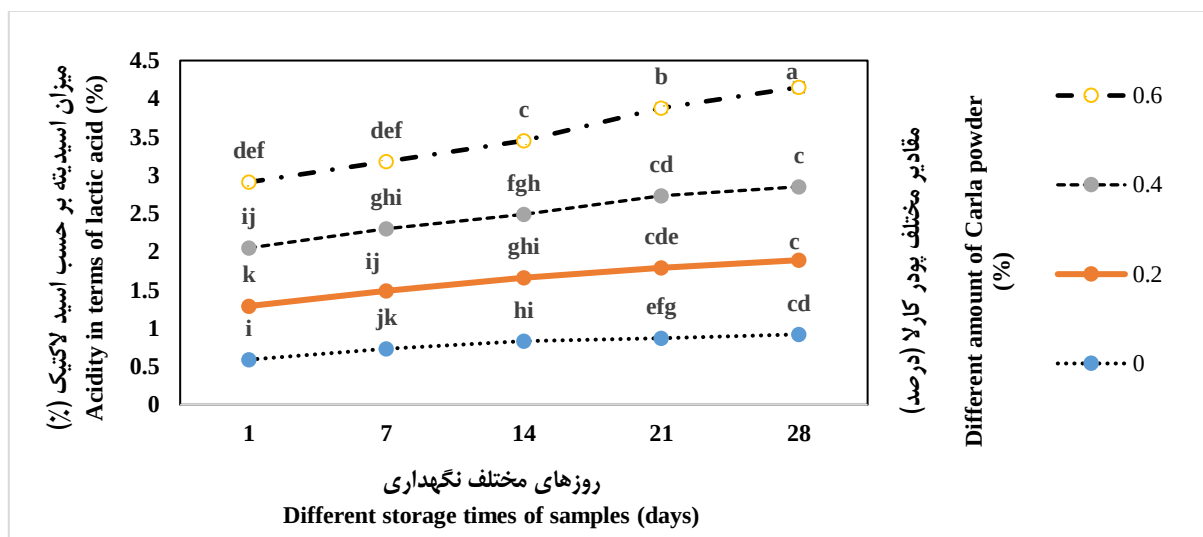
ارزیابی اسیدیته ماست حاوی درصدهای مختلف پودر کارلا

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که افزودن پودر میوه کارلا به ماست، مدت زمان نگهداری و اثر متقابل این دو فاکتور بر میزان اسیدیته نمونه‌های ماست مورد بررسی اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۵٪ داشت (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۴ ملاحظه می‌گردد بالاترین میانگین میزان اسیدیته (۱/۳٪) در تیمار حاوی ۰/۶ درصد

از افزودن پودر کارلا به ماست و با گذشت زمان اسیدیته افزایش یافت. علت آن است که با افزایش نگهداری و نیز ادامه فرآیند تخمیر لاکتوز توسط باکتری‌های استارتر و پروبیوتیک اسیدیته به دلیل تجمع اسیدهایی نظیر اسید لاکتیک، اسید فرمیک و غیره افزایش می‌یابد (Park et al., 2018).

تیمار نیز تأثیر معنادار روی اسیدیته نشان داد. میزان اسیدیته میوه کارلا رقم Jounpoury که در مطالعه حاضر نیز استفاده شده، ۰/۰۲۲ درصد است که خود می‌تواند عامل مهمی در کاهش اسیدیته نمونه‌های ماست غنی‌شده با پودر کارلا باشد.

در مورد اسیدیته کل همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد بیشترین میزان اسیدیته در تیمار محتوی بالاترین درصد پودر میوه کارلا و در روز ۲۸م اندازه‌گیری شد. محققان دیگر نیز گزارش نمودند که پس



شکل ۴- اثر متقابل درصدهای مختلف پودر میوه کارلا و مدت زمان نگهداری بر تغییرات اسیدیته در ماست
Fig. 4. Interaction of different percentages of Carla fruit powder and storage time on changes in acidity in yogurt

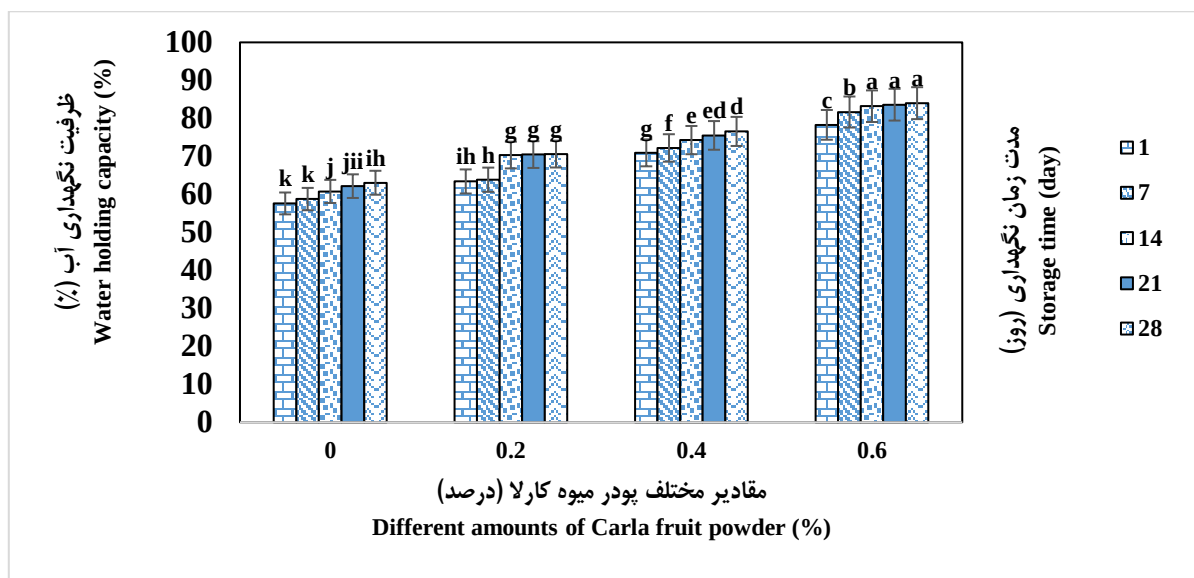
و همکاران (Salami et al., 2021) نیز گزارش نمودند که به طور کلی افزودن پودر کدو سبز تأثیر منفی بر پایداری ماست همزده نداشت.

ارزیابی ویژگی ویسکوزیته ماست با درصدهای مختلف پودر میوه کارلا

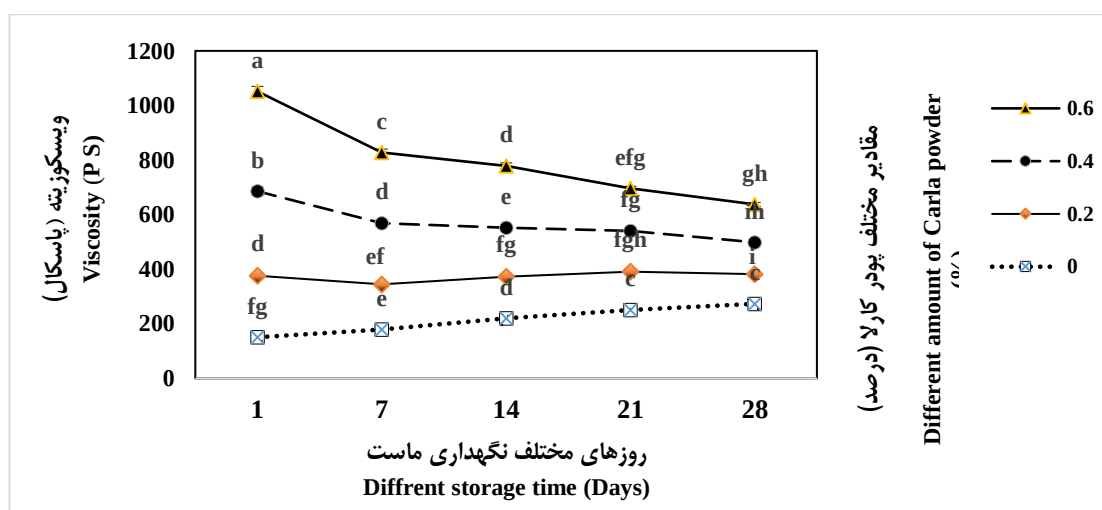
ویسکوزیته یکی از خصوصیات کیفی ماست است و عوامل مختلفی همچون دمای نگهداری، محتوای ماده خشک، تیمار حرارتی شیر، اسیدیته شیر و نوع کشت آغازگر بر آن موثر است (Ashrafi Yourghanloo & Gheybi, 2019). همان‌طور که در شکل ۶ ملاحظه می‌گردد ویسکوزیته ماست حاوی پودر میوه کارلا نسبت به نمونه شاهد در تمامی روزهای آزمایش بالاتر بوده است. اگرچه در نمونه شاهد با افزایش مدت زمان نگهداری ویسکوزیته افزایش یافت؛ اما در نمونه‌های حاوی پودر کارلا این سیر نزولی بود (شکل ۶).

ارزیابی ظرفیت نگهداری آب ماست با درصدهای مختلف پودر میوه کارلا

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف پودر میوه کارلا بر ظرفیت نگهداری آب در نمونه‌های ماست اثر معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). شکل ۵ ظرفیت نگهداری آب در نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج مندرج در شکل ۵، بالاترین درصد نگهداری آب (۸۴٪) در نمونه‌های محتوی ۰/۶ درصد پودر کارلا مشاهده گردید. کمترین ظرفیت نگهداری آب (۵۷/۶۱٪) در نمونه شاهد و در روز نخست مشاهده گردید. کومار و میشر (Mishra, 2004) (Kumar & Mishra, 2004) اذعان نمودند که بین غلظت پایدارکننده و میزان آب اندازی ماست رابطه معکوس وجود دارد. همچنین سایر محققان حضور فیبر در کدوی سبز را علت افزایش جذب آب و کاهش آب‌اندازی ماست دانستند (Karami & Asadi, 2017; Salami et al., 2021). سلامی



شکل ۵- ظرفیت نگهداری آب در نمونه‌های ماست
Fig. 5. Water holding capacity of yogurt samples



شکل ۶- ویژگی ویسکوزیته ماست با درصدهای مختلف پودر میوه کارلا
Fig. 6. Viscosity of yogurt with different percentages of Carla fruit powder

در این مطالعه کمترین میزان ترکیبات فنلی (۱۲۱/۴۲ میکروگرم گالیک اسید/میلی گرم عصاره ماست) در روز ۲۸ام در نمونه شاهد (فاقد پودر کارلا) و بیشترین میزان ترکیبات فنلی (۴۷۵/۶۳ میکروگرم گالیک اسید/میلی گرم عصاره ماست) در نمونه محتوی ۰/۶ درصد پودر کارلا و در روز نخست مشاهده شد. نتایج حاکی از آن است که با افزایش درصد پودر کارلا در نمونه ماست میزان ترکیبات فنلی کل افزایش می‌یابد (شکل ۷).

مطابق با نتایج حاضر، شیروانی و انصاری (Shiravani & Ansari, 2021) اظهار داشتند که نمونه ماست حاوی ۲ درصد عصاره

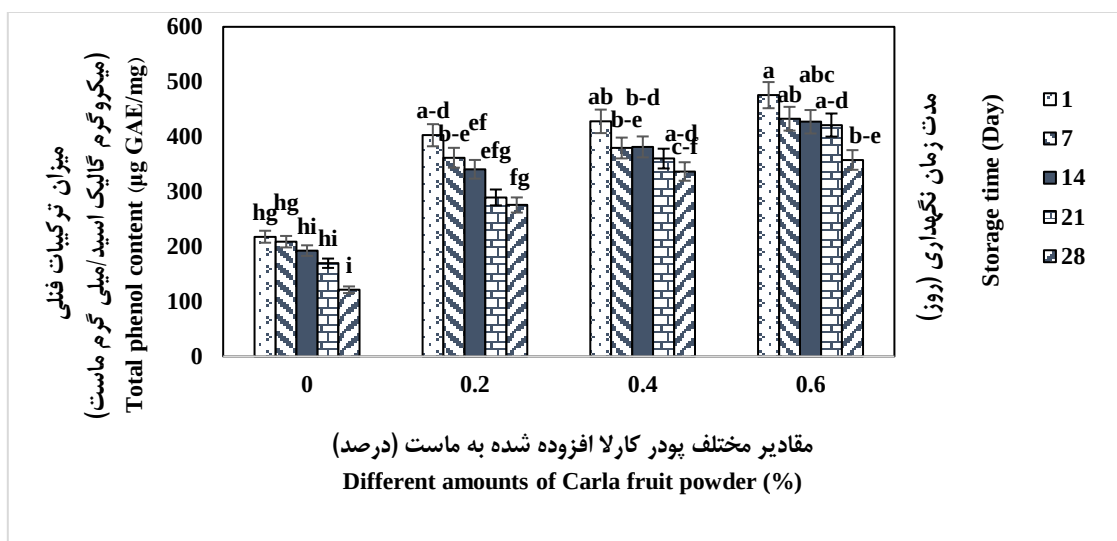
ارزیابی محتوای فنل کل ماست محتوی درصدهای مختلف پودر میوه کارلا

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از آن بود که اثر افزودن پودر میوه کارلا به ماست و مدت زمان نگهداری در یخچال، بر میزان فنل کل در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل این دو فاکتور بر محتوای فنل کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

آن‌طور که در شکل ۷ قابل مشاهده است در تمامی نمونه‌ها با گذر زمان از شروع بازه نگهداری، میزان ترکیبات فنلی کاهش یافته است.

مطابقت داشت. این در حالی است که جونگ و همکاران (Joung et al., 2016) گزارش کردند که محتوای فنول کل برای تمامی تیمارهای ماست طی نگهداری بطور تدریجی افزایش یافت و در انتهای دوره نگهداری ۲۸ روزه، ماست حاوی عصاره برگ *Nelumbo nucifera* (۸۸/۴ معادل گالیک اسید در میلی لیتر) و پس از آن ماست حاوی عصاره *Diospyros kaki* (۷۷/۸ معادل گالیک اسید در میلی لیتر) بیشترین میزان فنول کل را داشتند. کاهش فنول کل طی ذخیره سازی را می توان به فعالیت متابولیکی باکتری در ارتباط با کاهش یا تغییر ترکیبات غیر فنولیک که قادر به واکنش با معرف فولین سیوکالتیو بودند نسبت داد (Shiravani & Ansari, 2021).

برگ گردو با میزان ۹۲۸/۶ میکروگرم معادل گالیک اسید / میلی گرم دارای بیشترین و نمونه شاهد با میزان ۱۴۷/۲۳ میکروگرم معادل گالیک اسید / میلی گرم دارای کمترین میزان ترکیبات فنلی بوده است. علیرضالو و همکاران (Alirezalo et al., 2015) نیز بیان کردند که ماست شاه توت دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولیکی (۵۶۳ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) در مقایسه با ماست هویج و کنترل بود. در تحقیق حاضر مقدار فنل کل تمامی تیمارهای ماست در طول دوره ذخیره سازی به طور معناداری کاهش یافت ($p < 0.05$) و پس از ۲۸ روز نگهداری در ۴ درجه سانتی گراد به کمترین مقدار رسید که با شيروانی و انصاری (Shiravani & Ansari, 2021) در مورد اثر عصاره گردو بر ماست



شکل ۷- اثر متقابل پودر میوه کارلا و مدت زمان نگهداری بر محتوای فنلی ماست
Fig. 7. Interaction of Carla fruit powder and storage time on yogurt phenolic content

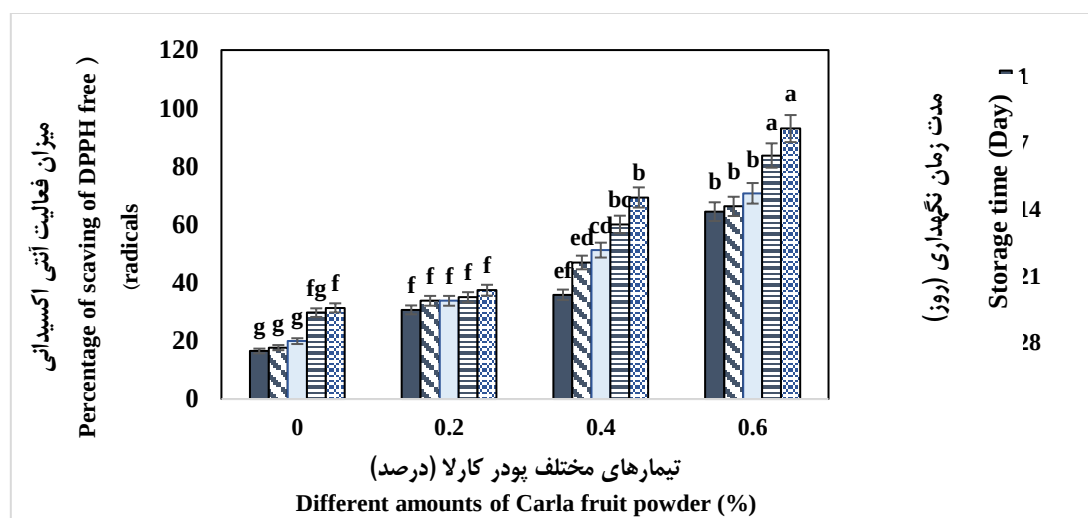
ما مشاهده گردید که زمان نگهداری به طور معناداری باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می گردد؛ به طوری که بیشترین فعالیت آنتی-اکسیدانی در روز ۲۸ ام در تمامی نمونه ها ثبت شد (شکل ۸). سایر محققان نیز اذعان نمودند که افزودن پودر کارلا (۱ تا ۳ درصد) به ماست منجر به افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی آن می گردد (Park et al., 2018).

افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی ماست غنی شده با پودرهای گیاهی به احتمال زیاد در نتیجه محتوای فیتوشیمیایی گیاهی و فعالیت میکروبی می باشد (Thompson et al., 2007). فعالیت متابولیکی میکروبی احتمالا موجب تخریب ماکرومولکول ها و تولید ترکیباتی می شود که قابلیت واکنش با معرف DPPH و در نتیجه افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی را دارند. همچنین رشد میکروبی در طی ذخیره سازی ممکن است برخی از ترکیبات فنلی را تغییر داده و فعالیت های آنتی اکسیدانی را افزایش دهد (Blum, 1998).

ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی ماست حاوی درصد های مختلف پودر کارلا

نتیجه تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر افزودن پودر میوه کارلا و مدت زمان نگهداری بر فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های مختلف ماست اثر معناداری در سطح احتمال ۵ درصد ($p < 0.05$) داشت؛ در حالی که اثر متقابل این دو فاکتور اثر معنادار در سطح احتمال ۱ درصد ($p < 0.01$) داشت (جدول ۲).

همان طور که در شکل ۸ ملاحظه می گردد با افزایش درصد پودر میوه کارلا در نمونه های ماست میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش می یابد؛ به طوری که بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی (۹۳ درصد) مربوط به تیمار محتوی ۰/۶ درصد پودر کارلا در روز ۲۸ ام آزمایش بود؛ در حالی که کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی (۱۶/۵ درصد) در نمونه شاهد و در روز نخست آزمایش ثبت گردید (شکل ۸). همچنین در نتایج آزمایش



شکل ۸- اثر متقابل پودر کارلا و مدت زمان نگهداری بر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ماست

Fig. 8. Interaction of Carla powder and storage time on the antioxidant activity of yogurt extract

نتیجه گیری

بر این پارامتر داشت به طوری که با افزایش بازه زمان نگهداری، میزان ترکیبات فنلی کاهش یافت. فعالیت آنتی اکسیدانی نیز در ماست های فراسودمند محتوی مقادیر بالاتر پودر کارلا و در بازه زمانی نگهداری طولانی تر، بیشتر بود. به طور کلی پودر کارلا قادر است نقش قابل توجهی در بهبود خواص بافتی ماست ایفا کند و با افزایش ویسکوزیته و افزایش ظرفیت نگهداری آب، اثرات منفی طول مدت نگهداری را کاهش دهد و می تواند آن را به یک غذای فراسودمند تبدیل نماید.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه زابل (IR-) Grant code: RIOZ-GR-9027 انجام شده است. نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر خود را از معاونت محترم پژوهشی پژوهشگاه زابل به عمل می آورند.

در این پژوهش اثر افزودن مقادیر مختلف پودر میوه کارلا (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد) و مدت زمان نگهداری (۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز) بر ویژگی های فیزیکی-شیمیایی ماست مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که مقادیر مختلف پودر کارلا، مدت زمان نگهداری و اثر متقابل این تیمارها روی تغییرات pH، اسیدیته، ظرفیت نگهداری آب، ویسکوزیته، ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی معنی دار بود. با افزایش مدت زمان نگهداری، pH کاهش و اسیدیته افزایش یافت. با افزایش درصد پودر کارلا میزان ویسکوزیته افزایش یافت اما اثر مدت زمان نگهداری بر این ویژگی منفی بود؛ به طوری که با افزایش مدت زمان نگهداری، ویسکوزیته کاهش یافت. افزایش درصد پودر کارلا منجر به افزایش ترکیبات فنلی شد اما مدت زمان نگهداری اثر معکوس

منابع

- Abdollahi, Z. (2018). *The effect of fasting on health and immune system*. Publications of the Community Nutrition Improvement Office of the Ministry of Health and Medical Education, No. 148041. (In Persian)
- Ashrafi Yourghanloo, R., & Gheybi, N. (2019). Investigation the effect of dill extract (*Anethum graveolens*) using on the antioxidant and physicochemical properties of set yogurt. *Food science and industry (JFST)*, 84(15), 203-215.
- Ahmad, N., Hasan, N., Ahmad, Z., Zishan, M., & Zohrameena, S. (2016). *Momordica charantia*: for traditional uses and pharmacological actions. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 6(2), 40-44. <https://doi.org/10.22270/jddt.v6i2.1202>
- Alirezalo, K., Hesari, J., Sadeghi, M.H., & Bek Mohammadpour, M. (2015). Production of functional colored yoghurts incorporating with blackberry and carrot extracts. *Innovative Food Technologies*, 3(2), 53-64. <https://doi.org/10.22104/JIFT.2016.278>
- Amirdivani, Sh., & Salihin Hj Baba, A. (2012). *Herbal yogurt as a functional food to manage hypertension & diabetes: Inhibitory effects of herbal yogurt on enzymes relevant to hypertension & diabetes*. LAP Lambert Academic Publishing, Germani.

6. Bajhan, M., Kalantari, N., Keshavarz Mohammadi, N., Eini Zeinab, H., & Hosseini, H. (2018). Explaining the facilitators of consuming useful dairy products. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Industry*, 52, 38-27. (In Persian)
7. Barros, L., Baptista, P., & Ferreira, I.C.F.R. (2007). Effect of fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays *Lactarius piperatus*. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1731-1737. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.006>
8. Blum, U. (1998). Effects of microbial utilization of phenolic acids and their phenolic acid breakdown products on allelopathic interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 685-708. <https://doi.org/10.1023/A:1022394203540>
9. Dalili, R., Khosrowshahi Asl, A., & Almasi, H. (2015). Effect of okra mucilage (*Hibiscus esculentus* L.) and guar gum as fat replacers on viability of *Bifidobacterium bifidum* and some quality properties of low fat yoghurt. *Journal of Food Reaserch*, 27(3), 77-89.
10. Gonzales Buckes, R.J., Algar, A.F., & Tayobong, R.R. (2019). Nutritional and functional properties of yoghurt drink with Philippine Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) and Bignay (*Antidesma bunius*) fruits. *International Joint Conference on JSAM and SASJ and 13th CIGR Technical Symposium*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15188.35203>
11. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2006). No. 2852. Milk and its products -Determination of acidity and pH - Test method.
12. Joung, J.Y., Lee, J.Y., Ha, Y.S., Shin, Y.K., Kim, Y., & Kim, Sh. (2016). Enhanced microbial, functional and sensory properties of herbal yogurt fermented with Korean traditional plant extracts. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(1), 90-99. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.1.90>
13. Khaleghnezhad, V., Yousefi, A.R., Tavakoli, A., & Farajmand, B. (2019). Interactive effects of abscisic acid and temperature on rosmarinic acid, total phenolic compounds, anthocyanin, carotenoid and flavonoid content of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). *Scientia Horticulturae*, 250, 302-309.
14. Kjeldahl, J. (1883). New Method for the Determination of Nitrogen. *Chem. News*. 48(1240), 101-102.
15. Karami, M., & Asadi, J. (2017). Rheological, physico-chemical and sensorial attributes of stirred yoghurt with irradiated and autoclaved thyme. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 14, 241-252.
16. Kumar, P., & Mishra, H. (2004). Mango soy fortified set yoghurt: effectof stabilizer addition on physiochemical, sensory and textural properties. *Food Chemistry*, 87, 501-507.
17. Li, Z., Xia, A., Li, S.Sh., Yang, G., Jin, W., Zhang, M., & Wang, S. (2020). The pharmacological properties and therapeutic use of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.). *Current Pharmacology Reports*, 6, 103-109.
18. Li, F.J., Liu, X.Y., Xu, G.J., & Guo, H.Y. (2015). Effects of extraction solvents on antioxidant activity of Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.) fruits in vitro. *Innovations in Food Research*, 1, 1-3.
19. Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane. *Methods in Enzymology*, 148, 350-381.
20. Mohammadi Sani, A., Hassani, M., Sharifi, A., & Hassani, B. (2015). Investigation of the properties of moldy and stirred flavored probiotic yogurt using seedless Barberry powder. *Journul of Innovation in Food Science and Technology*, 7(2), 119-109. (In Persian)
21. Özcan, T., & Yıldız, E. (2016). Determination of textural and sensory properties of yogurt produced with the vegetable puree. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 4, 579-587.
22. Park, S., Lee, S., & Kim, M. (2018). Quality characteristics and functionality of yogurt added with *Momordica charantia* L. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 47(12), 1251-1258. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2018.47.12.1251>
23. Perumal, V., Murugesu, S., Lajis, N.H., Khatib, A., Saari, K., Abdul-Hamid, A., Khoo, W.C., Mushtaq, M.Y., Abas, F., Ismail, I.S., & Ismail, A. (2015). Evaluation of antidiabetic properties of *Momordica charantia* in streptozotocin induced diabetic rats using metabolomics approach. *International Food Research Journal*, 22(3), 1298-1306.
24. Rabiei, V., & Joz Ghasemi, S. (2013). *Horticulture and crop science laboratory practical methods*. 1th edition, Jihad Daneshgahi Publications of West Azerbaijan Branch, Iran, 264 p.
25. Rufaghari Nejad, L., & Allahyari, N. (2016, October). *Study of the effect of cinnamon extract application on antioxidant and physicochemical properties of mold yogurt*. Paper presented at the 2016 International Congress and the Twenty-Fourth National Congress of Food Science and Technology of Iran. (In Persian)
26. Salami, M., Mehraban Sangatash, M., & Ehtiati, A. (2021). Effect of adding Zucchini (*Cucurbita pepo*) on the physico-chemical and sensory properties of stirred yogurt during storage. *Iranian Food Science and Technology*, 17(1), 93-106.
27. Sarani, M., Fanaei, H.R., & Kuhkan, S.H. (2010). *Evaluation of compatibility and performance of Momordica charantia cultivars in Sistan region*. Paper presented at the 2010 National Conference on Medicinal Plants. Iran. (In Persian)

28. Silva, G.M.S.W., Premathilaka, U.L.R.R.W., Maduwanthi, S.D.T., & Uthpala, T.G.G. (2016). Development of fermented *Momordica charantia* and analysis of biochemical properties. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 7(3), 362-366.
29. Shiravani, M., & Ansari, S. (2021). Yogurt fortification with walnut leaf extract and investigation of its physicochemical and sensory properties. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 12(4), 1-17. (In Persian)
30. Shobha, C.R., Vishwanath, P., Suma, M.N., Prashant, A., Rangaswamy, C., & Gowdappa, B.H. (2015). In vitro anticancer activity of ethanolic extract of *Momordica charantia* on cervical and breast cancer cell lines. *International Journal of Health & Allied Science*, 4, 210-217. <https://doi.org/10.4103/2278-344X.167649>
31. Siyasi Pourphomani, A., & Kohestani, N. (2015). *Healthy foods: probiotics, prebiotics and synbiotics*. Paper presented at The First National Conference on Technological Achievements of Iranian Food Science and Industry, Iran, Babolsar. (In Persian)
32. Sung Goo, K., Ashari S., Basuki, N., & Noor Sugiharto, A. (2016). The Bitter Gourd *Momordica charantia* L.: Morphological Aspects, Charantin and Vitamin C Contents. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 9(10), 76-81.
33. Thompson, J.L., Lopetcharat K., & Drake, M.A. (2007). Preferences for commercial strawberry drinkable yogurts among African American, Caucasian, and Hispanic consumers in the United States. *Journal of Dairy Science*, 90, 4974-4987. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0313>



Evaluation of Changes in Some Textured and Qualitative Properties of Cake Enriched with Wheat Germ

S.M. Sadeghi¹, M. Tayefe^{2*}, L. Fadayi Eshkiki³, K. Ghiasvand⁴

1- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

2, 3 and 4- Assistant Professor and M.Sc of Food Technology, Department of Food Science and Engineering, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: m.tayefe@liau.ac.ir)

Received: 2022.06.26
Revised: 2023.02.15
Accepted: 2023.03.12
Available Online: 2023.03.14

How to cite this article:

Sadeghi, S.M., Tayefe, M., Fadayi Eshkiki, L., & Ghiasvand, K. (2023). Evaluation of changes in some textured and qualitative properties of cake enriched with wheat germ. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5), 607-616. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.77230.1185>

Introduction

Bakery products such as cakes are consumed in a relatively large amount all over the world due to their ready to eat format. Among different foods, bakery products provide a great opportunity to use edible portions of seeds, vegetables or other unconventional food sources. On the other hand, cakes are susceptible to oxidation due to high amounts of fat and consequently reduce shelf life. Therefore, due to the high nutritional value of cake, improving its characteristics seems necessary. Wheat germ is the richest known source of vitamin E of plant origin. Consumption of wheat germ can prevent artery- clogging and also helps fight against free radical damage and procrastination are effective in the aging process of cells and preventing coronary disease. Despite the beneficial properties of wheat germ, it is difficult to keep it raw in the formulation of crops due to the presence of high unsaturated fatty acids and lipase enzymes. However, by performing thermal processes such as steam, fluidized substrate or thermal dryer, enzymes such as lipase and lipoxygenase can be deactivated. In this study, the effect of adding wheat germ as a rich source of fiber, tocopherols and essential fatty acids as well as ascorbyl palmitate as antioxidant compound on the qualitative and structural properties of cake was investigated.

Materials and Methods

In this study, five treatments of oil cake including control, ascorbyl palmitate (100 ppm), wheat germ (5, 10 and 15%), were prepared and physic-chemical properties including the moisture, firmness and volume of cake at the beginning of storage period, peroxide number and acidity during 14-day storage period were investigated. In order to evaluate the texture of the cake, texture analyzer was performed with dimensions of 25 mm and penetration of 50% in the sample at a speed of 2 mm/s and a 30-second stop between the first and second compressions. The specific volume of the produced samples and moisture of the middle part of the samples were measured 3 hours after baking.

Results and Discussion

The results showed that addition of L-ascorbyl palmitate had no significant effect on moisture content, hardness and cake volume. However, wheat germ increased hardness (in amounts more than 5%), decreased moisture content and specific volume of cake. Also, with increasing the amount of wheat germ, a significant decrease in peroxide and acidity of the samples were observed during the storage period. However, the values of the mentioned indices in the sample containing palmitate ascorbyl were lower than those containing wheat germ. According to the results, it seems that the sample containing 5% processed wheat germ can be recommended as a suitable formulation for cake enrichment.



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.77230.1185>

Conclusion

Considering that oxidation of cakes and reduction shelf life in different type of cakes are probable due to the presence of considerable amounts of fatty acids, in this study the effect of adding L-ascorbyl palmitate as a common antioxidant and processed wheat germ due to its antioxidant behavior on the moisture content, hardness, specific volume, texture and shelf-life characteristics of the oil cake was investigated. The overall results show that by adding L-ascorbyl palmitate, there was no significant effect on moisture content, hardness and specific volume. However, processed wheat germ increased hardness (in amounts more than 5%), decreased moisture content and specific volume of cake. Also, with increasing the amount of wheat germ, a significant decrease in peroxide value and acidity of the cake was observed during the storage period. However, the values of moisture content, hardness and specific volume in the sample containing palmitate ascorbyl were lower than samples containing wheat germ. According to the results, it seems that sample containing 5% processed wheat germ can be recommended as a suitable formulation for cake enrichment and artificial antioxidant replacement.

Keywords: Antioxidant, Ascorbil palmitate, Bakery products, Oxidative, Processed wheat germ



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲، ص. ۶۱۶-۶۰۷

ارزیابی تغییرات ویژگی‌های بافتی و کیفی کیک غنی شده با جوانه گندم

سید مصطفی صادقی^۱ - ماندانا طایفه^{۲*} - لیلی فدایی اشکیکی^۳ - کامبیز غیاثوند^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۱

چکیده

تلاش‌ها برای گسترش غذاهای غنی از مواد گیاهی و ضدسرطان می‌تواند یک نقش اساسی در تضمین سلامتی داشته باشد. در بین مواد غذایی مختلف، فراورده‌های پخت یک فرصت عالی برای بکارگیری بخش‌های قابل خوردن منابع غذایی غیرمتداول را فراهم می‌کند. از طرفی انواع کیک به دلیل داشتن مقادیر بالای چربی مستعد اکسیداسیون و در نتیجه کاهش عمر انبارمانی هستند. در این پژوهش اثر افزودن جوانه گندم به عنوان منبع غنی از فیبر، توکوفرول‌ها و اسیدهای چرب ضروری و همچنین اسکوربیل پالمیتات به عنوان آنتی‌اکسیدان بر ویژگی‌های کیفی و حسی کیک بررسی شد. بدین منظور در این مطالعه ۵ تیمار کیک روغنی شامل شاهد، اسکوربیل پالمیتات (پی‌پی‌ام ۱۰۰)، جوانه گندم (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد)، تهیه شد و مقادیر رطوبت، سختی بافت و حجم مخصوص کیک در ابتدای دوره نگهداری و عدد پراکسید، اسیدیته کیک طی دوره نگهداری ۱۴ روزه بررسی شد. نتایج نشان داد تأثیر افزودن ال اسکوربیل پالمیتات و جوانه گندم تا میزان ۵ درصد بر مقادیر رطوبت، سختی بافت و حجم مخصوص کیک تا میزان ۵ درصد معنی‌دار نیست در صورتی که در مقادیر بالاتر از ۵ درصد جوانه گندم میزان رطوبت و حجم مخصوص کاهش یافته در صورتی که سختی بافت به طور معنی‌داری رو به افزایش بود. همچنین بکارگیری اسکوربیل پالمیتات (۱۰۰ پی‌پی‌ام) و جوانه گندم منجر به کاهش مقادیر پراکسید و اسیدیته در فراورده نهایی شده است به طوری که در روز چهاردهم نمونه حاوی اسکوربیل پالمیتات کمترین میزان پراکسید (۱/۶۳) و تیمار شاهد بالاترین میزان پراکسید (۴/۳۲) نشان دادند. البته مقادیر شاخص‌های پراکسید و اسیدیته در نمونه حاوی اسکوربیل پالمیتات میزان کمتری را نسبت به نمونه‌های حاوی جوانه گندم از خود نشان داد. با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد نمونه حاوی ۵ درصد جوانه گندم فراوری شده، می‌تواند به عنوان فرمولاسیون مناسب برای غنی‌سازی کیک توصیه گردد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسکوربیل پالمیتات، اکسیداتیو، جوانه گندم فراوری شده، فراورده‌های پخت

مقدمه

می‌شود به دلیل عمر نگهداری نسبتاً بالا، به صورت گسترده در صنعت تولید می‌شوند. متخصصان تغذیه مصرف کیک را به دلیل کمتر در رژیم های غذایی توصیه می‌کنند (Zarenejad et al., 2014). جوانه گندم بخش مربوط به تولیدمثل گیاه است که حدود ۲/۵ درصد وزن دانه را تشکیل می‌دهد و یکی از محصولات جانبی آسیاب غلتکی گندم است که به عنوان ضایعات کارخانجات آرد به مصرف خوراک دام و یا تولید روغن می‌رسد. پسماند سالانه گندم در دنیا ۲۵۰۰۰۰۰ تن ارزیابی می

با افزایش سطح آگاهی مصرف‌کنندگان، جایگزینی ترکیبات طبیعی فراسودمند به جای افزودنی‌های شیمیایی نیز در حال افزایش است که سبب پژوهش‌های کاربردی در زمینه تولید فراورده‌های عملگر با خصوصیات حسی مطلوب توسط متخصصین شده است. نان، شیرینی و کیک از فراورده‌های پخت پرتعداد است که در مقیاس بالا در دنیا مصرف می‌شوند. انواع کیک که توسط گروه‌های مختلف جامعه مصرف

۱- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۲، ۳ و ۴- به ترتیب استادیار و دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد فناوری مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

(*- نویسنده مسئول: Email: m.tayefe@liau.ac.ir)

(*al., 2006*). برای بهبود طعم و حفظ ظاهر در طول فرآوری، بسته‌بندی و نگهداری غذاهای فرآوری شده، از مواد افزودنی مختلفی استفاده می‌شود. اسکوربیل پالمیتات یک مشتق مصنوعی آمفیفیلک از اسید اسکوربیک است که محلول در چربی بوده و استفاده گسترده آن در غذاهای حاوی چربی، لوازم آرایشی، پزشکی و دارویی به عنوان آنتی‌اکسیدان در FDA به‌عنوان ماده غذایی امن (GRAS) و نیز در لیست مواد آرایشی و بهداشتی اروپا (European Economic Community) حضور دارد. اسکوربیل پالمیتات همچنین به عنوان ماده‌ای جهت پایداری رنگ در فراورده‌های گوشتی استفاده می‌شود و تندشدگی اکسیداتیو را نیز به تأخیر می‌اندازد (*Sohrabi et al., 2018*). اسکوربیل پالمیتات نیز توانایی حذف فلزات تسریع‌کننده تشکیل پراکسید را دارد (*Javidipour et al., 2015*). اسدی و همکاران (*Asadi et al., 2021*) به بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و حسی نان مسطح فراسودمند بدون گلوتن با جایگزینی آرد جوانه‌های گندم، عدس و ماش پرداختند. نتایج نشان داد با بالا رفتن درصد آرد جوانه گندم، عدس و ماش مقدار چربی، پروتئین، کلسیم، خاکستر، نمک، افزایش پیدا کرده و از رطوبت کاسته می‌شود (*Asadi et al., 2021*). در پژوهشی، جوانه گندم به‌عنوان منبع پروتئینی مناسب جهت هیدرولیز آنزیمی برای تولید پپتید آنتی‌اکسیدانت استفاده شد و هیدرولیز آنزیمی پروتئین جوانه گندم با استفاده از آنزیم پپسین انجام شد و با کمک روش RSM بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها بهینه‌سازی شدند سپس فراکسیون‌ها در نقطه بهینه با استفاده از HPLC-RP جدا شدند و فراکسیون با بالاترین فعالیت مهار رادیکال ABTS با استفاده از MS/MS/LC شناسایی شد. نتایج نشان داد که پپتید حاصل از پروتئین جوانه گندم، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی و قابل ملاحظه بود (*Karami et al., 2018*). جاویدی پور و همکاران (*Javidipour et al., 2015*) به بررسی تأثیر غلظت ۴۰۰ ppm اسکوربیل پالمیتات بر پایداری اکسیداتیو روغن زیتون و پنبه دانه طی دوره نگهداری ۲۸ روزه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد پرداختند. مقادیر توکوفرول روغن‌ها طی زمان نگهداری کاهش و مقادیر مالون دی‌الدهید و عدد پراکسید طی مدت نگهداری افزایش یافت. افزودن اسکوربیل پالمیتات به روغن‌های مذکور سبب کاهش نرخ تغییرات در پارامترهای مذکور شد (*Javidipour et al., 2015*). لذا هدف از این پژوهش بررسی تأثیر مقادیر مختلف جوانه گندم بر روند فساد اکسیداتیو و خواص کیفی و حسی کیک روغنی طی زمان نگهداری و مقایسه عملکرد آن با اسکوربیل پالمیتات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مصنوعی بود.

شود (*Rosental, 1995*). در حالی که جوانه گندم سرشار از ویتامین‌ها، پروتئین‌ها، فیبر رژیمی و مواد معدنی است (*Moghim, 2017*). جوانه حاوی مقدار کمی نشاسته بوده و فاقد گلوتن است (*Rahbari & Alamy, 2014*). پروتئین جوانه گندم هم‌رده با پروتئین‌های حیوانی بوده و غنی از اسیدآمینه‌هایی نظیر لایزین، متیونین و ترئونین است که در غلات دیگر نادر هستند. همچنین جوانه گندم غنی‌ترین منبع شناخته شده ویتامین E با منشاء گیاهی است و مقدار کل آن در حدود ۱۳۰۰ پی‌پی‌ام می‌باشد. توکوفرول‌های موجود در جوانه گندم بیشتر در شکل آلفا-توکوفرول بوده و بتا-توکوفرول دومین توکوفرول فراوان آن است. به دلیل حضور آلفا توکوفرول، مصرف جوانه گندم می‌تواند از گرفتگی شریان‌ها جلوگیری کند و همچنین علاوه بر حفاظت از سلول‌های بدن از آسیب رادیکال‌های آزاد و تعویق در فرایند پیری سلول‌ها و جلوگیری از بیماری کرونری موثر هستند (*Hassanein & Abedel-Razek, 2009*). فلاونوئیدها نیز به مقدار ۰/۳ گرم در هر ۱۰۰ گرم جوانه گندم وجود دارد. علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی فعالیت‌های ضدآلرژی، ضد ویروسی، ضدالتهاب و اتساع عروق دارند و قابلیت دسترسی تغذیه‌ای و کاربردی پروتئین‌های مواد غذایی را افزایش می‌دهند (*Zhu et al., 2011*). با وجود ویژگی‌های سودمند جوانه گندم، نگهداری آن به صورت خام در فرمولاسیون محصولات به دلیل وجود اسیدهای چرب غیراشباع بالا و آنزیم لیپاز، مشکل است. علاوه بر آن جوانه گندم حاوی ترکیبات ضدتغذیه‌ای به نام آگلوتینین است که ترکیبی سمی شناخته شده و مسئول رشد فزاینده روده کوچک و پانکراس است (*Matucci et al., 2004*). همچنین وجود گلوتاتیون نیز می‌تواند بر شبکه گلوتنی تأثیر گذاشته و سبب ضعیف شدن آن می‌شود (*Hosensy, 1998*). با این حال با انجام فرایندهای حرارتی نظیر استفاده از بخار، بستر سیال و یا خشک‌کن حرارتی می‌توان آنزیم‌هایی نظیر لیپاز و لیپوکسیژناز را غیرفعال کرده و نیز برخی از ترکیبات ضدتغذیه‌ای را مانند مهارکننده تریپسین، اسیدفیتیک و آگلوتینین را از بین برد. در این راستا جمعی از محققین به بررسی کاربرد جوانه‌ی گندم تثبیت شده با حرارت (بخار و استفاده از خشک‌کن غلتکی و بستر سیال) در فرمولاسیون محصولات نانوایی پرداختند. براساس نتایج این محققین مشخص شد که تیمارهای حرارتی مختلف اثر به‌خصوصی بر ویژگی‌های جوانه گندم نداشته و تیمار بخار داده شده بیشترین میزان حفظ‌کنندگی ویتامین E را دارا بود. در تمام موارد نیز آنزیم لیپاز به‌طور کامل و آنزیم لیپوکسیژناز ۹۲-۸۰ درصد غیر فعال و گلوتاتیون نابود گردید. این در حالی بود که استفاده از جوانه‌ی گندم تثبیت شده با حرارت در سطوح کمتر از ۱۰ درصد نسبت به کاربرد جوانه خام در فرمولاسیون خمیر نان توانایی تولید محصولی قابل قبول به لحاظ بافت، ظاهر و امتیاز پذیرش کلی داشت (*Gomez et al., 2012; Srivastava et*

مواد و روش‌ها

آرد گندم با در استخراج ۷۷ درصد (کارخانه آرد خانی، واقع در قزوین، آبیگ)، پودر شکر، روغن هیدروژنه نیمه جامد، بیکنینگ پودر، شیر خشک، وانیل، پودر آب پنیر و تخم مرغ از یک عرضه کننده مواد غذایی تهیه شد. اسکوریل پالمیتات و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمون‌ها از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردید. جوانه گندم از شرکت جوانه شاداب فربد واقع در استان قزوین تهیه گردید و به منظور جلوگیری از اکسید شدن مواد مغذی و تغییرات نامطلوب در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

فرایند تثبیت جوانه گندم

عمل بخار دادن جوانه گندم مطابق با روش مقیمی (Moghipi, 2017) انجام شد. بدین منظور جوانه گندم مورد استفاده به ضخامت ۱ سانتی‌متر در ظرف بخارپز به‌طور یکنواخت پخش شد و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفت. پس از اتمام مدت زمان ذکر شده نمونه در آون در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت خشک شد.

آماده‌سازی کیک

برای تهیه خمیر کیک از ۱۰۰ گرم آرد، ۵۷ گرم روغن، ۷۲ گرم شکر، ۷۲ گرم تخم مرغ، ۱/۳۴ گرم بیکنینگ پودر، ۰/۵ گرم وانیل و ۲۵ گرم آب استفاده شد. همچنین مقادیر مختلف جوانه گندم (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) و اسکوریل پالمیتات (۱۰۰ ppm) در تیمارهای جداگانه به خمیر کیک افزوده شد. سپس خمیر به قالب منتقل شد تا برای پخت به مدت ۳۰ دقیقه درون فر با دمای ۱۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد. کیک‌ها پس از خروج از فر و سرد شدن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط درون کیسه‌های پلی اتیلنی بسته‌بندی شدند. آزمون‌ها بر روی نمونه تازه و همچنین طی ۱۴ روز نگهداری در شرایط اتاق انجام گرفت (Khodadadzadeh & Nasehi, 2018; Kiakajoori & Jafarian, 2019).

آزمون ارزیابی بافت

به منظور ارزیابی بافت کیک از بافت‌سنج، ساخت کشور آمریکا مدل TA-CT3 و آزمون TPA استفاده شد. بدین طریق اندازه‌گیری بافتی در قطعات با ابعاد ۲۵ میلی‌متر و با فشردگی ۵۰ درصدی در نمونه و با سرعت ۲ میلی‌متر بر ثانیه و توقف ۳۰ ثانیه‌ای بین اولین و دومین فشردگی صورت گرفت (Qavidel et al., 2014).

آزمون ارزیابی حجم مخصوص

قطعه‌ای از کیک توزین و داخل ظرف دارای حجم مشخص (V_1) قرار گرفت، بقیه فضای خالی ظرف توسط دانه‌های کلزا پر شد. سپس کیک خارج و حجم دانه‌های کلزا یادداشت شد (V_2) و حجم کیک در نهایت از اختلاف ($V_1 - V_2$) حاصل گردید در نهایت از نسبت حجم به وزن، حجم مخصوص محاسبه شد (Esfandiary et al., 2021).

رطوبت

رطوبت مغز هر یک از نمونه‌ها در فاصله زمانی ۳ ساعت پس از پخت با استفاده از دستگاه رطوبت‌سنج محاسبه شد (AACC, 2005).

استخراج روغن از کیک

استخراج چربی از کیک مطابق روش بایونا و همکاران (Baiona et al., 2005) انجام شد. بدین منظور ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم نمونه را وزن شدو توسط مخلوط کن، خرد گردید سپس به همراه ۲۰۰ سی‌سی آن-هگزان در دکانتور ریخته و به مدت یک ساعت دکانتور تکان داده شد و از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده سپس در روتاری در دمای ۵۰ درجه قرار گرفت تا حلال آن تبخیر شود و فقط روغن باقی بماند. روغن استخراج شده و میزان چربی بر حسب درصد از طریق رابطه (۱) به دست آمد.

$$\times 100 = (\text{وزن نمونه} / \text{وزن ظرف} - \text{وزن ظرف و چربی}) = \text{درصد چربی} \quad (1)$$

آزمون اندازه‌گیری پراکسید:

عدد پراکسید بر اساس (استاندارد ملی ایران شماره ۴۱۷۹، ۱۳۹۶) اندازه‌گیری شد.

آزمون اندازه‌گیری اسیدیته:

اسیدیته بر حسب اولتیک اسید گزارش شد (استاندارد ملی ایران، شماره ۱۵۸۱۳، ۱۳۹۷).

تجزیه و تحلیل آماری

نمونه‌های کیک در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار تهیه شده و با نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. رسم نمودارها و جداول نیز توسط نرم‌افزار EXCELL صورت گرفت.

نتایج و بحث

رطوبت

نتایج ارزیابی رطوبت (جدول ۱) کاهش معنی‌دار ($p > 0.05$) میزان رطوبت با افزودن جوانه گندم را نسبت به نمونه شاهد نشان داد. از طرف دیگر میزان رطوبت با افزایش غلظت جوانه گندم از ۵ به ۱۵ درصد به طور معنی‌داری کاهش یافت. بین میزان رطوبت، حجم مخصوص و مقدار سختی رابطه‌ی معکوس برقرار است، بدین صورت که هرچه میزان سختی بیشتر باشد، میزان رطوبت و حجم مخصوص کمتر خواهد بود. به نظر می‌رسد افزایش غلظت جوانه گندم منجر به کاهش حجم هوا در خمیر شده در نتیجه به دام نیفتادن بخار آب تولید شده در سلول های هوا در طول پخت کیک تولیدی می‌تواند دلیل کاهش رطوبت در طول پخت تلقی گردد (Zarenejad et al., 2013).

حجم مخصوص

نتایج حاصل از بررسی حجم مخصوص کیک (جدول ۱) نشان می‌دهد که با افزودن سطح جوانه گندم به فرمولاسیون کیک، حجم نمونه های تولید شده کاهش معنی‌داری ($p > 0.05$) یافت. به‌طوری‌که بالاترین میزان حجم مخصوص در نمونه شاهد و کمترین مقدار آن در نمونه کیک حاوی ۱۵ درصد جوانه گندم مشاهده شد. مقدار حجم مخصوص بین نمونه شاهد و نمونه حاوی اسکوربیل پالمیتات تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. کاهش حجم مخصوص به معنای کاهش حجم کیک های تولیدی می‌باشد. زارع نژاد و همکاران (Zarenejad et al., 2014) نیز در نتایج تحقیق خود کاهش حجم مخصوص ظاهری در اثر افزودن جوانه گندم تا سطح ۲۰ درصد را طی پخت در نتیجه افزایش وزن مخصوص و کاهش ویسکوزیته خمیر بیان نمودند. کاهش

ویسکوزیته می‌تواند ناشی از رطوبت بالای جوانه گندم نسبت به ماده خشک آن باشد به علاوه عملیات پخت نیز باعث کاهش ویسکوزیته می‌گردد که می‌تواند منجر به کاهش حجم هوا نیز شود بنابراین خروج گازهای ناشی از تبخیر و تخمیر در طی پخت اتفاق افتاده که کاهش حجم کیک را به دنبال دارد باشد (Matsakidou et al., 2010; Sowmya et al., 2009). تحقیقات مشابه نیز کاهش حجم کیک را با افزایش فیبرهای رژیمی در فرمولاسیون آن، گزارش نموده‌اند (Sudha et al., 2007).

بعضی از محققین افزایش میزان حجم جامد را به خلل و فرج در کیک تولیدی دلیل کاهش حجم مخصوص بیان نموده‌اند (Keskin et al., 2004; Gill et al., 2002).

سختی بافت کیک

براساس نتایج بدست آمده از ارزیابی سختی بافت کیک (جدول ۱) مشخص گردید که افزودن جوانه گندم تثبیت شده در سطح ۵ درصد به فرمولاسیون تفاوت معنی‌داری ($p > 0.05$) با نمونه شاهد (فاقد جوانه) و نمونه حاوی آنتی‌اکسیدان اسکوربیل پالمیتات نداشت. این در حالی بود که با افزایش میزان جوانه گندم از ۵ به ۱۵٪ سختی بافت افزایش یافت و بیشترین میزان سختی در نمونه ۱۵ درصد جوانه گندم تثبیت شده گزارش شده است. نتایج تحقیق قویدل و همکاران (Qavidel et al., 2014) بر خواص کیک روغنی غنی شده با جوانه گندم فراروری شده به دو روش بخار دادن و برشته کردن نیز بر وجود رابطه مستقیم بین میزان سختی بافت کیک و مقدار جوانه گندم افزوده شده در فرمولاسیون کیک دلالت دارد.

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات بافتی اندازه‌گیری شده

Table 1- Comparison of average measured textural properties

Properties Treatment تیما	صفات	Moisture (%) رطوبت	Specific volume (cm ³ g ⁻¹) حجم مخصوص	Hardness (N) سختی
Blank شاهد		0.10 ^b ±16.5	0.20 ^a ±4.0	0.11 ^c ±8.60
Ascorbil Palmitate اسکوربیل پالمیتات		0.2 ^b ±16.30	0.20 ^a ±3.90	0.001 ^c ±8.50
Wheat germ (5%) جوانه گندم (5%)		0.001 ^a ±17.80	0.5 ^b ±3.40	0.11 ^c ±8.50
Wheat germ (10%) جوانه گندم (10%)		0.20 ^{bc} ±15.60	0.10 ^c ±2.50	0.12 ^b ±8.90
Wheat germ (15%) جوانه گندم (15%)		0.746 ^c ±15.06	0.12 ^c ±2.30	0.20 ^a ±9.40

در هر ستون میانگین‌هایی که حروف مشابه دارند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

In each column, the averages with the same letters do not differ significantly from each other.

تواند به دلیل وجود مقدار قابل ملاحظه ترکیبات پلی‌فنلی و توکوفرول‌ها در جوانه گندم باشد که نقش محافظتی بر اکسیداسیون اسیدهای چرب را ایفا می‌کند (Zarenejad et al., 2013). اگرچه حرارت‌دهی می‌تواند از طریق اکسیداسیون ترکیبات پلی‌فنلی باعث کاهش مقدار آن‌ها در طی فرایند تثبیت گردد (Brenes et al., 2002).

اسیدیته

اسیدیته معیاری مناسب برای نشان دادن تازگی فراورده تولیدی است. واضح است که افزایش اسیدیته، آمادگی فراورده را برای تند شدن نشان می‌دهد (Nasir et al., 2009). نتایج ارزیابی اسیدیته نمونه‌های کیک (جدول ۲) نشان داد که در تمامی نمونه‌های حاوی جوانه گندم مقدار اسیدیته اندازه‌گیری شده به طور معنی‌داری ($p > 0.05$) پایین‌تر از نمونه شاهد قرار دارند. البته مقدار اسیدیته گزارش شده در نمونه حاوی اسکوربیل پالمیتات در روز چهاردهم پایین‌تر از نمونه‌های حاوی جوانه تثبیت شده بود (۰/۲۸ درصد برحسب اسید اولئیک). با افزایش مقدار جوانه گندم در فرمولاسیون، میزان اسیدیته نمونه‌های تولیدی در روز چهاردهم کاهش معنی‌داری نشان داد و کمترین میزان اسیدیته در نمونه حاوی ۱۵ درصد جوانه گندم تثبیت شده مشاهده شد (۰/۳ درصد برحسب اسید اولئیک). طی روزهای نگهداری نیز از روز اول تا چهاردهم مقدار اسیدیته افزایش داشت که شیب افزایش در ازای افزودن مقدار جوانه گندم تثبیت شده، کاهشی بود. به نظر می‌رسد ترکیبات شیمیایی جوانه گندم تثبیت شده از هیدرولیز جلوگیری کرده و مانع از افزایش اسیدچرب آزاد می‌گردند. فرایند تثبیت که باعث غیرفعال شدن آنزیم لیپاز و لیپوکسیژناز می‌گردد به عملکرد جوانه گندم در طی دوره نگهداری کمک می‌نماید (Pinarli et al., 2004; Zarenejad et al., 2013).

ایجاد اتصالات عرضی در فراورده نهایی و تراکم گلوتنین حاصل از آن می‌تواند یکی از دلایل افزایش سختی بافت باشد (Gomez et al., 2012; Baiano et al., 2009). از طرف دیگر افزودن مقادیر بیشتر از ۱۰٪ جوانه گندم باعث افزایش ظرفیت نگهداری آب پروتئین‌های خمیر شده که این امر به افزایش جذب آب و تورم نشاسته موجود در خمیر و در نهایت سختی بافت محصول منتهی می‌گردد (Rahbari & Alamy, 2014; Renzetti et al., 2008).

پراکسید

عدد پراکسید مهمترین عامل در شناسایی تند شدن اکسیداتیو روغن‌ها و ارزیابی درجه فسادشان به شمار می‌رود. بررسی نتایج عدد پراکسید (جدول ۲) حاکی از کاهش معنی‌دار ($p > 0.05$) مقدار پراکسید نمونه‌های تولیدی با افزایش مقدار جوانه گندم تثبیت شده در فرمولاسیون کیک طی روزهای نگهداری (تا روز چهاردهم) بود. بیشترین میزان پراکسید در روز چهاردهم در نمونه شاهد مشاهده شد (4.32 meq kg^{-1}). با افزودن اسکوربیل پالمیتات به فرمولاسیون نمونه شاهد عدد پراکسید به طور معنی‌داری کاهش یافت به نظر می‌رسد که میزان بالای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند عامل بازدارنده افزایش پراکسید در طی دوره نگهداری باشد. اگرچه فرایند حرارتی جهت تثبیت، باعث کاهش غلظت عوامل آنتی‌اکسیدانی (ترکیبات پلی‌فنلیک و توکوفرول‌ها) می‌گردد و اثر ضد اکسیداسیونی آن‌ها را کاهش می‌دهد (Zarenejad et al., 2013).

زارع‌نژاد و همکاران (Zarenejad et al., 2013) گزارش کردند جوانه گندم به لحاظ غنی بودن از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و نقش محافظتی در برابر اکسیداسیون، باعث افزایش محتوای اسیدهای چرب غیراشباع در محصول می‌گردد. ثابت ماندن پروفیل اسیدهای چرب به ویژه اسید چرب غیراشباع در طی دوره حرارت‌دهی جهت تثبیت می‌

جدول ۲- مقایسه میانگین اسیدیته و پراکسید

Table 2- Comparison of average acidity and peroxide

Treatment	Peroxide (meq kg^{-1})	Acidity (uleic acid %)
تیمار	پراکسید	اسیدیته
Blank	4.573 ^a	0.226 ^a
شاهد		
Ascorbil Palmitate	4.020 ^{ab}	0.166 ^{bc}
اسکوربیل پالمیتات		
Wheat germ (5%)	1.317 ^b	0.220 ^b
جوانه گندم (5%)		
Wheat germ (10%)	1.271 ^{bc}	0.156 ^{bc}
جوانه گندم (10%)		
Wheat germ (15%)	1.111 ^c	0.146 ^c
جوانه گندم (15%)		

در هر ستون میانگین‌هایی که حروف مشابه دارند، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

In each column, the averages with the same letters do not differ significantly from each other.

جدول ۳- مقایسه میانگین پراکسید (meq kg^{-1}) در روزهای نگهداری
Table 3- Comparison of average peroxide (meq kg^{-1}) on storage days

Treatment تیمار	Day1 روز ۱	Day7 روز ۷	Day14 روز ۱۴
Blank شاهد	0.44 ^{Ac}	2.95 ^{Ab}	4.32 ^{Aa}
Ascorbil Palmitate اسکوربیل پالمیتات	0.29 ^{Dc}	1.14 ^{Db}	1.63 ^{Ca}
Wheat germ (5%) جوانه گندم (5%)	0.36 ^{BCc}	1.48 ^{Bb}	2.11 ^{Ba}
Wheat germ (10%) جوانه گندم (10%)	0.35 ^{Cc}	1.45 ^{Bb}	2.02 ^{Ba}
Wheat germ (15%) جوانه گندم (15%)	0.38 ^{Bc}	1.38 ^{Cb}	1.81 ^{BCa}

تفاوت حروف بزرگ و کوچک در هر ستون به ترتیب بیانگر اختلاف معنی دار میانگین پراکسید در هر دوره زمانی و اختلاف معنی دار میانگین پراکسید در هر مقدار افزودنی است.
The difference between capital and lowercase letters in each column indicates a significant difference between the mean peroxide in each time period and a significant difference between the mean peroxide per add-on value, respectively.

جدول ۴- مقایسه میانگین اسیدیته (% اسیداولئیک) در روزهای نگهداری
Table 4- Comparison of mean acidity (% of Oleic acid) on storage days

Treatment تیمار	Day1 روز ۱	Day7 روز ۷	Day14 روز ۱۴
Blank شاهد	0.059 ^{Ac}	0.31 ^{Ab}	0.61 ^{Aa}
Ascorbyl Palmitate اسکوربیل پالمیتات	0.029 ^{Cc}	0.19 ^{Bb}	0.28 ^{Da}
Wheat germ (5%) جوانه گندم (5%)	0.037 ^{Bc}	0.10 ^{Cb}	0.39 ^{Ba}
Wheat germ (10%) جوانه گندم (10%)	0.039 ^{Bc}	0.11 ^{Cb}	0.32 ^{Ca}
Wheat germ (15%) جوانه گندم (15%)	0.039 ^{Bc}	0.10 ^{Cb}	0.30 ^{CDa}

تفاوت حروف بزرگ و کوچک در هر ستون به ترتیب بیانگر اختلاف معنی دار میانگین اسیدیته در هر دوره زمانی و اختلاف معنی دار میانگین اسیدیته در هر مقدار افزودنی است.
The difference between capital and lowercase letters in each column indicates a significant difference between the mean peroxide in each time period and a significant difference between the mean peroxide per add-on value, respectively.

نتیجه گیری

نظر به اینکه انجام اکسیداسیون و کاهش عمر انبارداری در انواع کیک به دلیل وجود مقادیر قابل ملاحظه اسیدچرب محتمل است، در این پژوهش تأثیر افزودن ال اسکوربیل پالمیتات به عنوان یک آنتی اکسیدان رایج و جوانه گندم با توجه به رفتار آنتی اکسیدانی آن در ویژگی های کیفی، بافتی و ماندگاری کیک بررسی شد. نتایج کلی نشان داد با افزودن ال اسکوربیل پالمیتات تأثیر معنی داری بر مقادیر رطوبت، سختی بافت و حجم کیک ایجاد نشده است. اما جوانه گندم سبب افزایش سختی (در مقادیر بیشتر از ۵ درصد)، کاهش رطوبت و حجم

مخصوص کیک شد. همچنین با افزایش مقدار جوانه گندم، کاهش پراکسید و اسیدیته محصول در طول دوره نگهداری مشاهده شد. البته مقادیر شاخص های مذکور در نمونه حاوی اسکوربیل پالمیتات میزان کمتری را نسبت به نمونه های حاوی جوانه گندم از خود نشان داد. با توجه به نتایج و با عنایت به عدم وجود تفاوت معنی دار در ویژگی های بافتی و فیزیکی بین تیمار حاوی ۵ درصد جوانه گندم تثبیت شده و تیمار حاوی اسکوربیل پالمیتات و همچنین بهبود عدد پراکسید، اسیدیته و افزایش عمر انبارداری در طی دوران نگهداری نسبت به نمونه شاهد، تیمار حاوی ۵ درصد جوانه گندم پیشنهاد می گردد.

1. AACC. (1999). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Method 2005. The Association, St Paul, MN.
2. Asadi, Z., Masoudnia, A., & Ziabari, F. (2021). Study of physicochemical and sensory properties of gluten-free functional flat bread by replacing wheat germ flour, lentils, mash. *Iranian Food Science and Technology Journal*, 18(120). (In Persian)
3. Baiano, A., & Del Nobile, M.A. (2005). Shelf life extension of almond paste pastries. *Journal of Food Engineering*, 66, 487-495. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.020>
4. Baiano, A., Romaniello, R., Lamacchia, C., & La Notte, E. (2009). Physical and mechanical properties of bread loaves produced by incorporation of two types of toasted durum wheat flour. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.029>
5. Brenes, M., García, A., Dobarganes, M.C., Velasco, J., & Romero, C. (2002). Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5962-5967. <https://doi.org/10.1021/jf020506w>
6. Esfandiary, M., Farajpoor, P., Bagheri, H., & Mirarab Razi, F. (2021). Investigating the possibility of low fat cup cakes using of inulin and xanthan gum. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 12(18). (In Persian)
7. Gill, S., Vasanthan, T., Ooraikul, B., & Rossnagel, B. (2002). Wheat bread quality as influenced by the substitution of waxy and regular barley flours in their native and extruded forms. *Journal of Cereal Science*, 36(2), 219-237.
8. Gómez, M., González, J., & Oliete, B. (2012). Effect of extruded wheat germ on dough rheology and bread quality. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2409-2418. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0519-5>
9. Hassanein, M.M.M.; & Abedel-Razek, A.G. (2009). Chromatographic quantitation of some bioactive minor components in oils of wheat germ and grape seeds produced as byproducts. *Journal of Oleo Science*, 58, 227-233. <https://doi.org/10.5650/jos.58.227>
10. Hosensy, R.C. (1998). *Principles of Cereals Sciences and Technology*. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN.
11. Iranian National Standardization Organization. 15813, (2018), Hazelnut butter Specifications and test methods.
12. Iranian National Standardization Organization. 4179, (2017), Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value - Iodometric (visual) endpoint determination.
13. Javidipour, I., Tüfenk, R., & Baştürk, A. (2015). Effect of ascorbyl palmitate on oxidative stability of chemically interesterified cottonseed and olive oils. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 876-884. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1086-8>
14. Karami, Z., Peyghambari, H., Hesari, J., & Akbari Adregani, B. (2018). Isolation and identification of peptides with antioxidant properties from wheat germ protein using Pepsin enzyme, *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 13(4), 39-50. (In Persian)
15. Keskin, S.O., Sumnu, G., & Sahin, S. (2004). Bread baking in halogen lamp-microwave combination oven. *Food Research International*, 37(5), 489-495. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2003.10.001>
16. Khodadadzadeh, M., & Nasehi, B. (2018). Evaluation of physicochemical properties, sensory and textural sponge cake enriched with bagasse fiber powder, *JFST*, 78(15). (In Persian)
17. Kiakajoori, A., & Jafarian, S. (2019). *The effect of different levels of L-ascorbyl palmitate on oxidative depravity of oil cake*. 3rd International and 26th National Iranian Food Science and Technology. (In Persian)
18. Matsakidou, A., Blekas, G., & Paraskevopoulou, A. (2010). Aroma and physical characteristics of cakes prepared by replacing margarine with extra virgin olive oil. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 949-957. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.002>
19. Matucci, A., Veneri, G., Dalla Pellegrina, C., Zoccatelli, G., Vincenzi, S., & Chignola, R. (2004). Temperature dependent decay of wheat germ agglutinin activity and its implications for food processing and analysis. *Food Control*, 15, 391-5.
20. Moghimi, M. (2017). Physicochemical, antioxidant and sensory properties of oil cake containing wheat germ and sesame meal. *Food Science and Technology of Iran*, 14(69), 318-307.
21. Nasir, M., Butt, M.S., Anjum, F.M., Jamil, A.M.E.R., & Ahmad, I.J.A.Z. (2009). Physical and sensory properties of maize germ oil fortified cakes. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11, 311-315.
22. Pınarlı, İ., İbanoğlu, Ş., & Öner, M.D. (2004). Effect of storage on the selected properties of macaroni enriched with wheat germ. *Journal of Food Engineering*, 64(2), 249-256. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.10.005>
23. Qavidel, R., Ghiafeh, M., Karimi, M., & Dehghan, M. (2014). The effect of adding processed wheat germ on the quantitative and qualitative properties of oil cake. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 3(6), 59-65.
24. Rahbari, M., & Alamy, M. (2014). *Wheat germ from flour waste to health-boosting*, 1st National Conference on Snacks, Food Science and Technology Research Institute. (In Persian)

25. Renzetti, S., Dal Bello, F., & Arendt, E.K. (2008). Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science*, 48(1), 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.07.011>
26. Rosental, A.J. (1995). Application of aged egg in enabling increased substitution of sucrose by Litesse (polydextrose) on high ratio cakes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68, 127-31. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740680120>
27. Sohrabi, Y., Mohammadzadeh-Aghdash, H., Baghbani, E., Dehghan, P., & Dolatabadi, J.E.N. (2018). Cytotoxicity and genotoxicity assessment of ascorbyl palmitate (AP) food additive. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 8(2), 341-346. (In Persian). <https://dx.doi.org/10.15171%2Fapb.2018.039>
28. Sowmya, M., Jeyarani, T., Jyotsna, R., & Indrani, D. (2009). Effect of replacement of fat with sesame oil and additives on rheological, microstructural, quality characteristics and fatty acid profile of cakes. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1827-1836. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.008>
29. Srivastava, A.K., Sudha, M.L., Baskaran, V., & Leelavathi, K. (2006). Studies on heat stabilized wheat germ and its influence on rheological characteristics of dough. *Journal of European Food Research Technology*, 224, 365-372.
30. Sudha, M.L., Srivastava, A.K., & Leelavathi, K. (2007). Studies on pasting and structural characteristics of thermally treated wheat germ. *European Food Research and Technology*, 225(3), 351-357. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0422-x>
31. Zarenejad, F., Azadmard-Demirchi, S., Peyghambari, H., Nemati, M., & Rafat, S. (2013). Changes in functional compounds and some chemical properties in cake enriched with wheat germ, *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 2(2), 53-66. (In Persian)
32. Zarenejad, F., Peyghambari, H., & Azadmard Demirchi, S. (2014). The effect of adding raw and stabilized wheat germ on the qualitative properties of mold cake. *Iranian Journal of Food Science and Technology Research*, 10(3). (In Persian). <https://dx.doi.org/10.22067/ifstrj.v10i3.38297>
33. Zhu, K., Lian, C., Guo, X., Peng, W., & Zhou, H. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry*, 126, 1122-1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.144>



Pre-harvest Application of Chitosan with Carvacrol on Biochemical, Qualitative and Shelf Life Characteristics of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.)

Z. Ghasemi Arshad¹, A. Ehtesham Nia^{ID 2*}, E. Hazbawi³, H. Mumivand⁴, M. Soleimani Aghdam⁵

1, 2 and 4- M.Sc. and Associate Professors, Department of Horticultural Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: Ehteshamniamia.ab@lu.ac.ir)

3- Assistant Professor, Department of Biosystem, Lorestan University, Khorramabad, Iran

5- Associate Professor, Department of Horticultural Science, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

How to cite this article:

Received: 2022.07.21
Revised: 2023.01.29
Accepted: 2023.02.14
Available Online: 2023.02.19

Ghasemi Arshad, Z., Ehtesham Nia, A., Hazbawi, E., Mumivand, H., & Soleimani Aghdam, M. (2023). Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on biochemical, qualitative and shelf life characteristics of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch). *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5), 617-633. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.77806.1192>

Introduction

The increase in people's awareness of the negative effects of chemical preservatives has led to more research on the antimicrobial effect of plant essential oils and their potential to be used as preservative compounds. Strawberry (*Fragaria ananassa* cv. qingxiang) is one of the most popular and widely consumed berries due to its taste, sweetness and healthy function. The taste of strawberry is related to its hardness, viscosity, sugars, protein, total soluble solid, titratable acidity content and minerals like P, K, Ca and Fe. It is a good source of polyphenolic compounds such as flavanols and has antioxidant activity. This, together with higher vitamin C content in strawberries, contributes beneficial effects on the maintenance of consumer health. Strawberry has higher antioxidant activities than orange, grape, banana, apple, etc. Strawberries are among the fruits sensitive to mechanical and physiological damage and have a fast metabolism and deterioration during the storage period. For this reason, it is necessary to use safe methods to control spoilage and maintain the quality of strawberry fruit during storage.

Materials and Methods

The experiment was conducted in a completely randomized design, in a 5 x 4 factorial scheme (5 treatments x 4 periods evaluated), with four replications. The first variable was the type of material with different concentrations in five levels including 0, 0.3%, 0.6% carvacrol, the combination of chitosan with 0.3% and 0.6% carvacrol, and the second variable was storage time in four periods including 0, 10, 20, 30 days of storage. The harvested fruits were kept at 4°C and with a relative humidity of 90±5% and parameters such as weight loss, pH, firmness of the fruit tissue, acidity (TA), soluble solids (TSS) and taste index, vitamin C, phenol and flavonoid, fruit shelf life (number of days) during the storage period were investigated and studied.

Results and Discussion

The ANOVA results showed that the effect of the type of treatment and storage time on all investigated traits except for the firmness of the fruit texture was significant at the probability level of 1%. The fruits treated with the combination of chitosan and carvacrol 0.6% had more texture firmness, vitamin C, total phenol content and the amount of soluble solids and better shelf life than the control. In all four storage times, the highest content of total phenol (2.49 mg of gallic



acid per 100 gr FW), total flavonoid (0.435 mg of Quercetin per 100 gr FW) and firmness (3.80 N) was related to the combined treatment of chitosan with carvacrol 0.6% and the lowest amount was related to the control. The firmness of the fruit tissue gradually decreased during storage, but this process was observed at a significantly slower rate in the treated fruits.

Conclusion

Considering the increase of 10 and 12 days of shelf life post- harvest of the combined treatment of chitosan + 0.6% carvacrol compared to other treatments and the control, hence the application of chitosan pre harvest and the use of 0.6% carvacrol edible coatings can be recommended as a safe and low-cost strategy to increase the shelf life post harvesting of 'Parus ' strawberry cultivar.

Keywords: Carvacrol, Edible coating, Firmness of fruit texture, Shelf life, Vitamin C



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲، ص. ۶۳۳-۶۱۷

کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر خصوصیات بیوشیمیایی، کیفی و ماندگاری توت فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch.)

زینب قاسمی ارشد^۱- عبدالله احتشام‌نیا^{۲*} ID - عیسی حزباوی^۳- حسن مومیوند^۴- مرتضی سلیمانی اقدام^۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۵

چکیده

بالا رفتن سطح آگاهی مردم نسبت به اثرات منفی نگهدارنده‌های شیمیایی، منجر به انجام تحقیقات بیش‌تر در زمینه پوشش‌های طبیعی، زیست‌تخریب‌پذیر با خاصیت ضد میکروبی شده است. این پژوهش، به‌صورت آزمایش فاکتوریل، در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار در گلخانه آموزشی تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. فاکتور اول، نوع مواد با غلظت‌های مختلف در پنج سطح شامل صفر (شاهد)، کارواکرول ۰/۳ درصد، کارواکرول ۰/۶ درصد، ترکیب کیتوزان ۱/۵ درصد با کارواکرول ۰/۳ درصد و ترکیب کیتوزان ۱/۵ درصد با کارواکرول ۰/۶ درصد و فاکتور دوم زمان انبارمانی در چهار سطح شامل صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ روز پس از انبارمانی بود. میوه‌های برداشت شده در دمای ۴±۰/۵ درجه سانتی‌گراد، با رطوبت نسبی ۹۰±۵ درصد نگهداری شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تاثیر نوع تیمار و مدت زمان انبارمانی بر تمام صفات مورد بررسی به‌جز سفتی بافت میوه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. میوه‌های تیمار شده با ترکیب کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ درصد سفتی بافت، ویتامین C، مواد فنولی و مقدار مواد جامد محلول بیش‌تر و ماندگاری بهتری نسبت به شاهد داشتند. به‌طوری‌که بالاترین میزان محتوای فنل کل (۲/۴۹ میلی‌گرم اسیدگالیک در ۱۰۰ گرم وزن تر) و سفتی بافت (۳/۸۰ کیلوگرم نیرو) مربوط به تیمار ترکیبی کیتوزان با کارواکرول ۰/۶ درصد بود. نتایج این مطالعه نشان داد کاربرد قبل از برداشت کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ درصد می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد ایمن و کم هزینه جهت افزایش عمر پس از برداشت توت‌فرنگی رقم 'پاروس' قابل توصیه باشد.

واژه‌های کلیدی: پوشش خوراکی، سفتی بافت میوه، کارواکرول، ماندگاری، ویتامین C

مقدمه

(Mozafari et al., 2018). همه‌ی این ترکیبات اثر هم‌افزایی و تجمعی بر ارتقای سلامت انسان و پیشگیری از بیماری‌ها دارند. میوه توت‌فرنگی میوه‌ای نافرازگرا است و برای به‌دست آوردن حداکثر کیفیت بازاریابی باید در مرحله بلوغ کامل برداشت شود. این میوه همچنین به‌دلیل سرعت تنفس بالا، مقاومت مکانیکی کم و حساسیت بالا به حمله پاتوژن‌ها بسیار مستعد فاسدشدن است (Hashmi et al., 2013; Neri et al., 2014). با این حال، ویژگی‌های فیزیولوژیکی میوه‌های

توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch.) یک محصول مهم اقتصادی در سراسر جهان است (Ahn et al., 2021; Ilari et al., 2021). ارزش غذایی زیادی دارد زیرا حاوی مواد معدنی، ویتامین‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی با خواص بیولوژیکی مفید است، به‌عنوان مثال فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدالتهابی دارد

۱، ۲ و ۴- به‌ترتیب کارشناسی ارشد و دانشجویان گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
(*)- نویسنده مسئول: (Email: Ehteshamnia.ab@lu.ac.ir)

۳- استادیار گروه بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۵- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

نشان می‌دهد. این فعالیت‌ها شامل خواص آنتی‌اکسیدانی آن در غذا و در داخل بدن و مهار باکتری‌های بیماری‌زا، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌های بیماری‌زا و حشرات در محیط آزمایشگاهی و در غذای انسانی حساس به آنتی‌بیوتیک و مقاوم به آنتی‌بیوتیک انسانی و مواد غذایی است (Friedman, 2014). به‌طور کلی کارواکرول به‌عنوان ایمن (GRAS)^۱ برای مصرف توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده شناخته می‌شود و در حال حاضر در صنایع غذایی به‌عنوان یک عامل طعم‌دهنده و در بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شود (Kachur et al., 2019). هی و همکاران (He et al., 2018) در پژوهشی به ارزیابی تیمار قبل از برداشت الیگوساکاریدهای کیتوسان بر کیفیت میوه توت‌فرنگی پرداختند. نتایج نشان داد که سفتی میوه، ویسکوزیته، لیگنین، مواد جامد محلول، پروتئین، مواد جامد محلول کل در میوه‌های تیمار شده با الیگوساکارید کیتوسان نسبت به شاهد افزایش یافت. علاوه بر این، تیمار الیگوساکارید کیتوسان قبل از برداشت تأثیر مثبتی بر فعالیت مهارکننده آنتوسیانین، فنل کل، فلاونوئید، محتوای ویتامین ث و میزان آنتی‌اکسیدان توت‌فرنگی داشت (He et al., 2018). پرتو و همکاران (Peretto et al., 2014)، در پژوهشی به ارزیابی افزایش ماندگاری توت‌فرنگی با بخارهای ضد میکروبی کارواکرول و متیل سینامات منتشر شده از پوشش‌های خوراکی توت‌فرنگی پرداختند. نتایج نشان دادند که تأخیر و کاهش قابل توجهی در شدت پوسیدگی در میوه‌های تیمار شده مشاهده شد (Peretto et al., 2014). باتوجه به اینکه پژوهشی راجع به بررسی اسانس کارواکرول حاصل از مرزه خوزستانی در ترکیب با پلیمر زیستی کیتوزان انجام نشده است. بنابراین، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی اثر تیمارهای قبل از برداشت کیتوزان ترکیب شده با اسانس کارواکرول در غلظت‌های مختلف بر حفظ و بهبود خصوصیات کمی و کیفی میوه توت‌فرنگی رقم 'پاروس' در طی دوره پس از برداشت انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار پنج گلدان، جمعا بیست گلدان برای هر تیمار بر روی گیاه توت‌فرنگی رقم 'پاروس' انجام شد. نشاهای توت‌فرنگی از نهالستان مورد تایید جهاد کشاورزی استان کردستان تهیه و در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۱۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۷ سانتی‌متر در بستر کاشت با نسبت وزنی ۱:۱:۲ شامل خاک (لومی رسی)، کود دامی پوسیده، ماسه کشت شد. اولین آبیاری بلافاصله بعد از کاشت و آبیاری

توت‌فرنگی به راحتی از بین می‌رود، زیرا نرم شدن آن‌ها باعث کاهش ماندگاری پس از برداشت آن‌ها در انبار سرد می‌شود (Eum et al., 2021; Chiabrando et al., 2019). توت‌فرنگی یکی از میوه‌های پرمصرف و با طعمی لذیذ است که در مناطق معتدل کشت می‌شود. به‌دلیل خواص دارویی و غذایی، کشت توت‌فرنگی رو به افزایش است (Nezmer et al., 2018). تلفات پس از برداشت محصول یک مبارزه دائمی برای کشاورزی مدرن است که توسعه جایگزین‌های جدید برای کاهش ضایعات را ضروری می‌کند (De Corato, 2020; Ziv & Fallik, 2021). برای افزایش عمر نگهداری میوه‌ها و سبزیجات تازه و با حداقل فرآوری شده، چندین جایگزین و درمان فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی پیشنهاد شده است (Agriopoulou et al., 2020). اخیراً روش‌های ازن، بسته‌بندی جوی کنترل‌شده، ترکیبات طبیعی، پوشش‌های خوراکی ضدقارچ و عوامل کنترل زیستی به‌عنوان جایگزین‌های ایمن و روش‌های نگهداری کارآمد در صنعت محصولات تازه ظاهر شده‌اند (Romanazzi et al., 2018; Tzortzakos & Xylia, 2019; Abd-Elkader et al., 2021). پوشش‌های خوراکی از پلیمرهای طبیعی مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، موم‌ها و کامپوزیت‌های آن‌ها تشکیل شده‌اند که میوه‌ها را از محیط اطراف جدا می‌کند (Farina et al., 2020; Ghoora & Srividya, 2020). پوشش‌های حاوی فیلم‌های خوراکی و اسانس‌ها (EOs) همچنین می‌توانند با کاهش تعرق و تنفس به حفظ کیفیت میوه‌ها پس از برداشت کمک کنند (Hosseini et al., 2019; Yuan et al., 2016). آنها همچنین با کاهش رشد میکروبی و افزایش کیفیت بافت میوه‌ها و سبزیجات در برابر فساد محافظت می‌کنند (Khodaei et al., 2021; Kahramano, 2016; Nair et al., 2020). استفاده از ترکیبات طبیعی برای کنترل پاتوژن‌های گیاهی باعث کاهش استفاده از قارچ کش‌ها می‌گردد. کیتوزان با قابلیت دوگانه کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی القایی، به‌عنوان ماده غیرسمی قابل اطمینان در برخورد با پاتوژن‌ها شناخته شده است (Shirzad, 2013). همچنین به‌دلیل حالیت بالا، غیر سمی بودن و زیست سازگاری، به‌عنوان یک ماده تنظیم‌کننده گیاهی سازگار با محیط زیست در نظر گرفته می‌شود. بنابراین، مطالعه اثر کیتوزان بر کیفیت میوه توت‌فرنگی مورد توجه است (Nia et al., 2023). گیاهان معطر ترکیبات آلی تولید می‌کنند که ممکن است در دفاع از گیاهان در برابر حشرات گیاهی، باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها نقش داشته باشد. یکی از این ترکیبات به نام کارواکرول (۵-ایزوپروپیل-۲-متیل فنل) که در غلظت‌های بالایی در اسانس‌هایی مانند مرزه خوزستانی یافت می‌شود، گزارش شده است که فعالیت‌های زیستی متعددی در سلول‌ها و حیوانات

1- generally recognized as safe

M1=وزن نمونه در روز اول و M2=وزن نمونه در روز پایانی

اندازه گیری مواد جامد محلول

مواد جامد محلول توت فرنگی ها در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد تعیین شد. ابتدا براساس پالمو و گروسو (Tanada-Palmu & Grosso, 2005)، با همزن مکانیکی به طور کامل و یکدست مخلوط شدند تا پوره همگن میوه بدست آید. با استفاده از رفراکتومتر ATAGO (مدل ان یک، ژاپن) مقدار مواد جامد محلول نمونه ها قرائت شد، پیش از شروع به کار، رفرکتومتر با آب مقطر کالیبره گردید. پس از هر بار قرائت به دقت رفراکتومتر تمیز شد تا از خطا جلوگیری گردد.

اسیدیته قابل تیتراسیون

اسیدیته براساس درصد اسیدسیتریک موجود در میوه با استفاده از روش پتانسیومتری توصیف شده توسط (Tanada-Palmu & Grosso, 2005) اندازه گیری شد. برای این منظور ۵ گرم از مخلوط پوره میوه در بشر کوچکی ریخته شد و با اضافه کردن آب مقطر به حجم ۵۰ رسانده شد. از هیدروکسیدسدیم ۰/۱ نرمال تا رسیدن pH به ۸/۱ استفاده گردید. اسیدیته قابل تیتر به صورت درصد اسیدسیتریک بیان شد. برای این منظور، مقدار هیدروکسیدسدیم مصرفی با استفاده از رابطه ۳ تبدیل به درصد اسیدسیتریک شد.

$$V \times 0.064 = \text{اسیدیته قابل تیتراسیون} \quad (۲)$$

شاخص رسیدگی (شاخص طعم)

نسبت TSS به TA با تقسیم TSS به درصد TA، پس از قرائت درصد مواد جامد محلول (TSS) با دستگاه رفرکتومتر و محاسبه اسیدیته قابل تیتراسیون با روش تیتراسیون (TA) محاسبه شد (Saki, 2019 et al.).

سفتی بافت

سفتی بافت میوه با استفاده از دستگاه سفتی سنج (Lutron FG5020, Taiwan) و با یکبار نفوذ میله نفوذکننده با قطر ۳ میلی متر در نیمه استوایی هر میوه انجام شد. سفتی بافت میوه براساس بیشینه نیروی لازم برای نفوذ میله در گوشت میوه و برحسب کیلوگرم نیرو (Kgf) بیان گردید.

اندازه گیری pH میوه

میزان پی اچ آب میوه با استفاده از دستگاه پی اچ سنج (مدل، ۳۲۲۰، جنوبی) اندازه گیری شد. در هر نوبت اندازه گیری ابتدا دستگاه با بافرهای

های بعدی تا زمان استقرار کامل گیاه هر دو روز یکبار به صورت دستی صورت انجام شد. تیمارها شامل شاهد (صفر)، کارواکرول ۰/۳ درصد، کارواکرول ۰/۶ درصد، ترکیب کیتوزان ۱/۵ درصد با کارواکرول ۰/۳ درصد و ترکیب کیتوزان ۱/۵ درصد با کارواکرول ۰/۶ درصد بودند و بوته های توت فرنگی در سه مرحله شامل گلدهی، تشکیل میوه و تغییر رنگ میوه محلول پاشی شدند. به منظور ارزیابی عمر پس از برداشت میوه توت فرنگی با استفاده از تیمارهای ذکر شده، میوه ها در زمان رسیدن کامل برداشت شدند. میوه ها به انبار با دمای چهار درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی 90 ± 5 درصد انتقال یافتند. سپس به فاصله هر ۱۰ روز یک بار در طول ۳۰ روز انبارمانی، ۴ میوه از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و خصوصیات بیوشیمیایی میوه ها نظیر کل مواد جامد محلول، آنتی اکسیدان و اسیدهای آلی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

آماده سازی میکس کیتوزان با اسانس (کارواکرول)

برای تهیه ترکیب کیتوزان با جرم مولکولی متوسط با کارواکرول ابتدا ۱/۵ درصد کیتوزان (وزنی/وزنی) استفاده شده یعنی ۱/۵ گرم کیتوزان در ۱۰۰ سی سی آب مقطر استفاده گردید، و برای حل شدن بهتر ۵۰۰ میکرولیتر استیک اسید یک درصد (حجمی/حجمی) به آن اضافه شد. به منظور افزایش کارایی و انعطاف پذیری پوشش ها از نرم کننده گلیسرول ۲۰ درصد (وزنی/وزنی) استفاده شد. همچنین این ماده به عنوان نرم کننده، به افزایش تحرک مولکول های پلیمر کیتوزان کمک می کند. پس از تنظیم پی اچ ۵/۵، ۲۰ درصد (وزنی/وزنی) به وزن کل محلول از ترکیب کارواکرول به عنوان، ترکیب طبیعی داخل محلول گنجانده شد. سپس امولسیون تولید شده، در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تحت فراصوت قرار گرفت. سپس محلول تولید شده، داخل پتريدیش، ریخته در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت توسط آون خشک و به ترتیب ۰/۳ و ۰/۶ درصد (۰/۳ و ۰/۶ در ۱۰۰ سی سی آب مقطر به همراه مقدار کمی DMSO) با پایه ۱/۵ درصدی کیتوزان استفاده گردید (Fernández-Pan et al., 2015).

کاهش وزن

نمونه هایی که برای این آزمون انتخاب شدند به طور جداگانه و ثابت در یک ظرف برچسب گذاری شده نگهداری شدند. از هر تیمار ۴ میوه انتخاب گردید. در روز اول پس از اعمال تیمارها وزن اولیه نمونه ها با دقت اندازه گیری شد. در روزهای دیگر نیز وزن نمونه ها اندازه گیری شد و اختلاف میان وزن نمونه ها در روزهای مختلف با روز اول بیانگر میزان کاهش وزن می باشد، که به صورت درصد افت وزن بیان شد (Tanada-Palmu & Grosso, 2005).

$$\text{کاهش وزن} = \frac{(M1 - M2)}{M2} \times 100 \quad (۱)$$

۴ و ۷ کالبره شد. سپس الکتروستاتیک داخل آب میوه قرار داده شد و پس از ثابت شدن عدد نمایش داده شده، میزان پی‌اچ ثبت شد.

ویتامین ث

محتوای ویتامین ث مطابق با روش تیتراسیون ۶،۲-دی کلروفنول ایندوفنل برآورد شد. به‌طور خلاصه، ۵ گرم توت‌فرنگی در ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲ گرم در میلی‌لیتر اسیدگزالیک همگن شد و سپس در ۱۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع‌رویی (۱۰ میلی‌لیتر) با ۰/۱ درصد ۶،۲-دی‌کلرو فنول ایندوفنل به رنگ صورتی دائمی تیترا شد. غلظت ویتامین ث با توجه به حجم تیتراسیون ۶،۲-دی‌کلروفنول ایندوفنل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و به‌صورت میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن میوه (FW) بیان شد (Nia et al., 2023).

$$\text{NaOH normality (0.1N)} \times \text{Citric acid (\%)} = \text{Titre (mL)} \\ \times \text{citric acid eq. weight (64gm)} \times \text{vol. made up (50mL)} \times \\ \text{wt. of sample} \times \text{Vol. of sample for titrate (5mL)} / 100 \\ 1000 \times \text{taken (10 g)}$$

تهیه عصاره توت‌فرنگی

۲/۵ گرم میوه توت‌فرنگی با نیتروژن مایع به‌طور کامل پودر شدند. سپس ۳۷/۵ میلی‌لیتر متانول حاوی ۰/۲ درصد استیک اسید به پودر توت‌فرنگی اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بن‌ماری شد. پس از عبور از صافی، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند و مایع‌رویی شفاف برای تجزیه و تحلیل صفات مورد بررسی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (He et al., 2018).

محتوای فنل کل

محتوای فنل کل با استفاده از روش فولین سیکالتیو (Slinkard et al., 1977; Singleton et al., 1999) مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، برای هر لوله آزمایش، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره، ۲ میلی‌لیتر از معرف فولین سیکالتیو ۱۰ درصد و ۴ میلی‌لیتر سدیم کربنات یک مولار اضافه شد. لوله آزمایش به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. سپس نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. اسیدگالیک در غلظت‌های مختلف (صفر، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰) به‌عنوان استاندارد استفاده شد و نتایج به‌صورت میلی‌گرم اکویوالانت اسیدگالیک در گرم وزن میوه بیان شد (Nia et al., 2023).

ارزیابی محتوای فلاونوئید کل

محتوای فلاونوئیدها با استفاده از روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد. ۱۰۰۰ میکرولیتر عصاره توت‌فرنگی و ۵۰۰ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵ درصد در یک فاکون ۱۰ میلی‌لیتری اضافه شد. پس از ۶ دقیقه، ۵۰۰ میکرولیتر نیترات‌آلومینوم ۱۰ درصد اضافه شد و اجازه داده شد به مدت ۶ دقیقه بماند. سپس ۴ میلی‌لیتر از هیدروکسیدسدیم ۴ درصد و الکل اتیلیک ۷۰ درصد به فاکون‌ها اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه اجازه داده شد تا بماند. در نهایت جذب در طول موج ۵۰۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. از ماده روتین در غلظت‌های مختلف (صفر، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج به‌صورت میلی‌گرم در گرم وزن میوه گزارش شد (He et al., 2018).

ماندگاری میوه (تعداد روز)

مدت زمان نگهداری، از زمان نگهداری تا تاریخ انقضا در نظر گرفته شد. زمان ماندگاری میوه‌ها با ثبت تعداد روزهایی که در انبار با حفظ ویژگی‌های کیفی و بدون هیچ گونه فساد میکروبی تعیین شد. زمانی که میوه‌ها بیش از ۵۰ درصد از بین رفتند، به‌عنوان پایان ماندگاری گزارش گردید (Nia et al., 2021).

تجزیه آماری داده‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار پنج گلدان انجام شد. فاکتور اول، نوع مواد در پنج سطح صفر (شاهد)، کارواکرول ۰/۳ درصد، کارواکرول ۰/۶ درصد، ترکیب کیتوزان ۱/۵ درصد با کارواکرول ۰/۳ درصد و کیتوزان ۱/۵ درصد با کارواکرول ۰/۶ درصد می‌باشد و فاکتور دوم زمان انبارداری در چهار سطح شامل صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ روز پس از انبارمانی بود. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای رسم نمودار از نرم افزار اکسل استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین خطاهای استاندارد ارائه شده و اختلاف معنی‌داری بین تیمارها برای هر صفت با حداقل اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد مشخص شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تاثیر نوع تیمار و زمان انبارمانی در تمامی صفات (سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار بوده است اما اثر متقابل در صفت سفتی معنی‌دار نشد (جدول ۱).

جدول ۱- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر خصوصیات بیوشیمیایی، کیفی و ماندگاری توت فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch)
Table 1- Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on biochemical, qualitative and shelf life characteristics of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch)

منابع تغییرات S.O.V	درجه ازادی df	فلاونوئید Flavonoid	فینول کل Total phenolic	ویتامین C Vitamin C	شاخص طعم TSS/TA ^۲	مواد جامد محلول TSS	اسیدیته TA	سفتی Firmness	پایه pH	کاهش وزن Weight Loss
نوع محلول پوشش دهی Type of coating solution	4	0.096**	0.897**	493.37**	105.32**	7.025**	0.0022**	2.015**	1.167**	288.364**
زمان انبارش Storage	3	0.039**	0.697**	2335.44**	107.12**	4.770**	0.0022**	2.237**	0.274**	551.861**
نوع محلول پوشش دهی زمان انبارش Type of coating solution*Storage	12	0.0014*	0.129**	16.04**	10.127**	1.747*	0.0018**	0.166 ^{ns}	0.0698*	55.896**
خطا Error	40	0.057	0.011	5.24	1.002**	0.823	0.0001	0.1291	0.029	1.978
ضریب تغییرات CV	.	25.006	7.678	7.229	4.184	8.906	2.538	14.461	5.821	17.499

ns، ** و * وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم اختلاف معنی دار.

*, **, and ns: Significant at 5% and 1% levels of probability and non-significant, respectively.

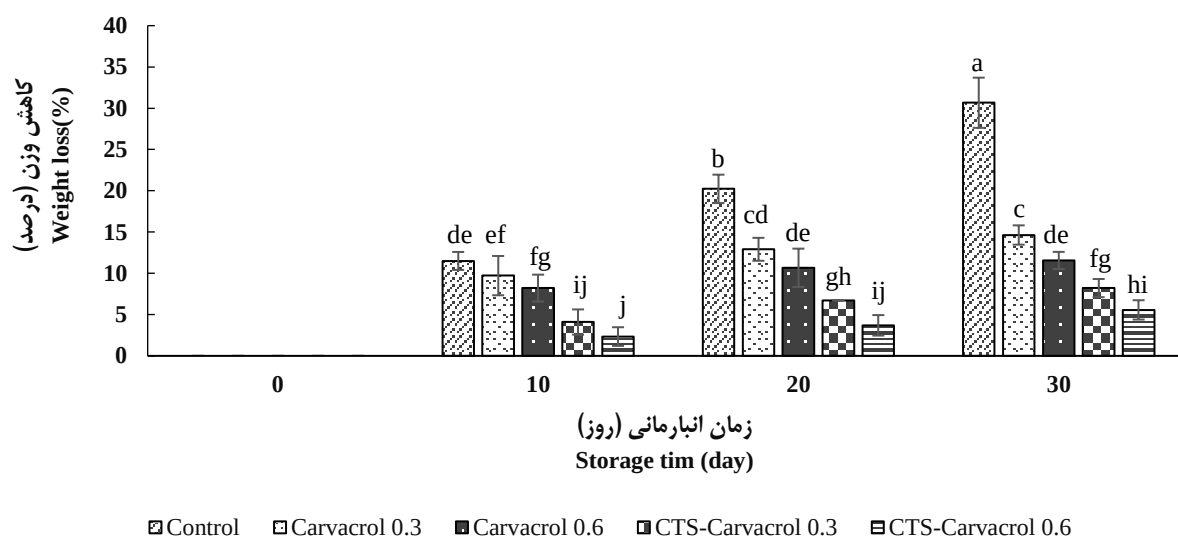
کاهش وزن (WL)

کنترل کاهش وزن میوه‌ها و سبزی‌های تازه یکی از مهم‌ترین اهداف پوشش‌دهی است. در دوره پس از برداشت دو عامل مهم باعث از دست دادن آب و کاهش وزن محصول می‌شود. یکی قطع شدن رابطه آب میوه با گیاه مادری و دومی افزایش تعرق در سطح میوه که یک فرآیند فیزیکی است و منجر به از دست دادن رطوبت محصول می‌شود. تغییرات کاهش وزن میوه در شرایط پس از برداشت بسته به نوع محصول، رقم و خصوصیات بافت آن می‌تواند متفاوت باشد، که این موضوع با دما و رطوبت انبار نیز در نتیجه میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان تغییرات کاهش وزن کم‌تری نسبت به میوه‌های شاهد دارد (Ergun & Satici, 2012). نتایج مقایسات میانگین مربوط به میزان کاهش وزن نمونه‌های تیمار شده با کیتوزان و کارواکرول در شکل ۱ نشان داده شده است. براساس این نتایج، با افزایش زمان نگهداری، تمامی نمونه‌ها به‌طور پیوسته کاهش وزن ناشی از تبخیر رطوبت را داشتند. به‌طوری که در روز آخر آزمایش، بیش‌ترین میزان کاهش وزن مربوط به نمونه شاهد (۳۰/۶۶ درصد) و کم‌ترین آن مربوط به تیمار ترکیبی کیتوزان و کارواکرول (۵/۵۷ درصد) بوده و همچنین کاربرد تیمارهای ترکیبی کیتوزان با کارواکرول (۰/۳ و ۰/۶) باعث کاهش وزن کم‌تری نسبت به سایر تیمارها داشته است. درواقع در تیمار ترکیبی کیتوزان با کارواکرول ۰/۶ کاهش وزن کم‌تری نسبت به تیمار ترکیبی کیتوزان با کارواکرول ۰/۳ هم مشاهده شد. به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد که ترکیب کارواکرول در پوشش خوراکی مانند کیتوزان نیز بر جلوگیری از کاهش وزن توت‌فرنگی‌ها موثر بوده است. نتایج این پژوهش نشان داد که به مانند سایر پوشش‌های خوراکی (کیتوزان)، کارواکرول نیز موجب جلوگیری از افت رطوبت و کنترل تغییرات تنفسی شد. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش میزان اسانس، افت وزنی کم‌تری در نمونه‌ها اتفاق می‌افتد. تغییرات کاهش وزن میوه در روزهای آخر به‌علت افزایش فعالیت متابولیکی و همچنین رشد سریع میکروبی با تخریب بافت میوه می‌باشد. در مطالعه علیرضالو و همکاران (Alirezalu et al., 2018) در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری به‌علت تبخیر سطحی، میزان آب میوه‌ها کاهش و درصد کاهش وزن افزایش پیدا کرد. در این میان بیش‌ترین درصد کاهش وزن مربوط به تیمار شاهد و کم‌ترین درصد کاهش وزن مربوط به توت‌فرنگی پوشش داده شده با یک درصد کیتوزان حاوی ۱۰ درصد عصاره چای سبز بود (Alirezalu et al., 2018). در مطالعه فیض‌اللهی و همکاران (Feyzollahi et al., 2022)، به‌طوری که بیش‌ترین درصد کاهش

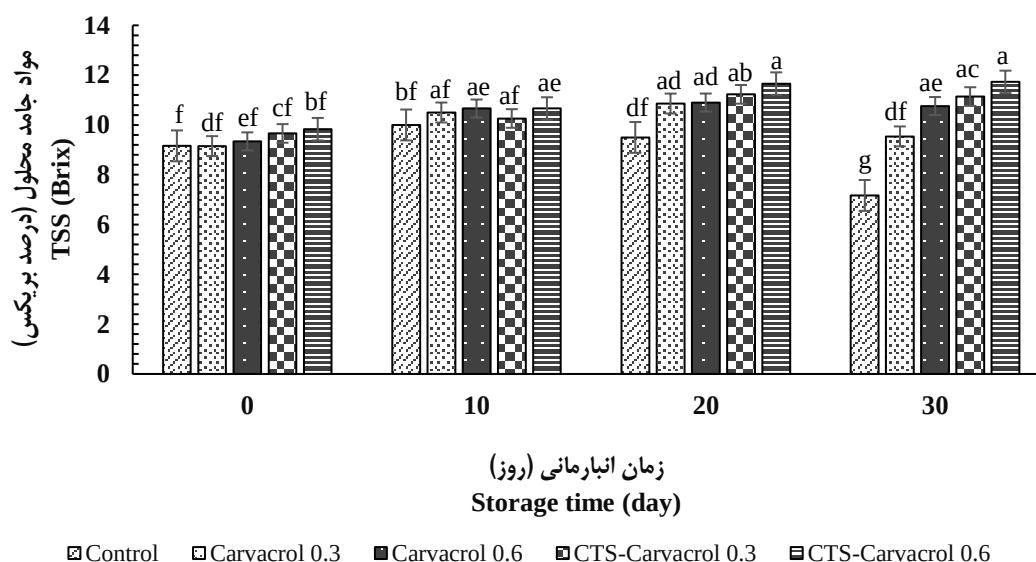
وزن مربوط به تیمار شاهد در روز ۱۵ نگهداری (۴۸/۰۸ درصد) و کم‌ترین میزان کاهش وزن (۶/۵۶ درصد) مربوط به نمونه‌های بسته‌بندی شده با فیلم حاوی ۲۰٪ اسانس بود. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از کیتوزان و اسانس باعث کاهش درصد کاهش وزن میوه‌ها شد که با نتایج این پژوهش‌ها مطابقت دارد.

مواد جامد محلول کل (TSS)

نتایج مقایسه میانگین مربوط به مواد جامد محلول طی دوره انبارداری در دمای سرد نشان داد با افزایش زمان نگهداری توت‌فرنگی‌ها، مواد جامد محلول میوه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۲). به‌طوری که کم‌ترین مقدار در روز آخر مربوط به تیمار شاهد (۷/۱۷ درصد) و در روز آخر بیش‌ترین میزان مواد جامد محلول مربوط به تیمار کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ درصد (۱۱/۷۳ درصد) مشاهده شد. کاربرد تیمار ترکیبی کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ نسبت به تیمار ترکیبی کیتوزان و کارواکرول ۰/۳ باعث افزایش بیش‌تر در مواد جامد محلول گردید. همچنین کاربرد تیمارهای ترکیبی کیتوزان و کارواکرول (۰/۳ و ۰/۶)، باعث مواد جامد محلول بیش‌تری نسبت به سایر تیمارها گردید. به‌نظر می‌رسد کاهش مواد جامد محلول میوه در تیمار شاهد در روزهای آخر به‌علت افزایش فعالیت متابولیکی، رشد سریع میکروبی با تخریب بافت میوه و همچنین طعم نامطلوب میوه با توجه به تست پانل (ترشیدگی) می‌باشد. در مطالعه رستم‌زاده و همکاران (Rostamzadeh et al., 2015) نشان داد که افزایش مواد جامد محلول در همه تیمارها نسبت به شاهد معنی‌دار بوده است. تفاوت معنی‌داری بین تیمار یک و دو درصد وجود نداشت. در این بین بیش‌ترین مقدار مواد جامد محلول مربوط به تیمار دو درصد کیتوزان و کم‌ترین متعلق به شاهد بود. از آنجایی که اسیدآلی و نشاسته در طی فرایند تنفس مصرف شده و منبع تأمین مواد جامد محلول می‌باشند، می‌توان بالا بودن مواد جامد محلول در تیمار کیتوزان دو درصد و یک درصد را با مصرف شدن این دو ترکیب در آنها مرتبط دانست. تأثیر کیتوزان بر میزان مواد جامد محلول در میوه‌های مختلف متفاوت است مثلاً در پاپایا تأثیر معنی‌داری نداشت و در انبه باعث افزایش آن گردید (Bautista-Banos et al., 2003; Srinivasa et al., 2002).



شکل ۱- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر کاهش وزن میوه توت فرنگی رقم پاروس طی انبارمانی
Fig. 1. Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on weight loss of Paros strawberry fruit during storage

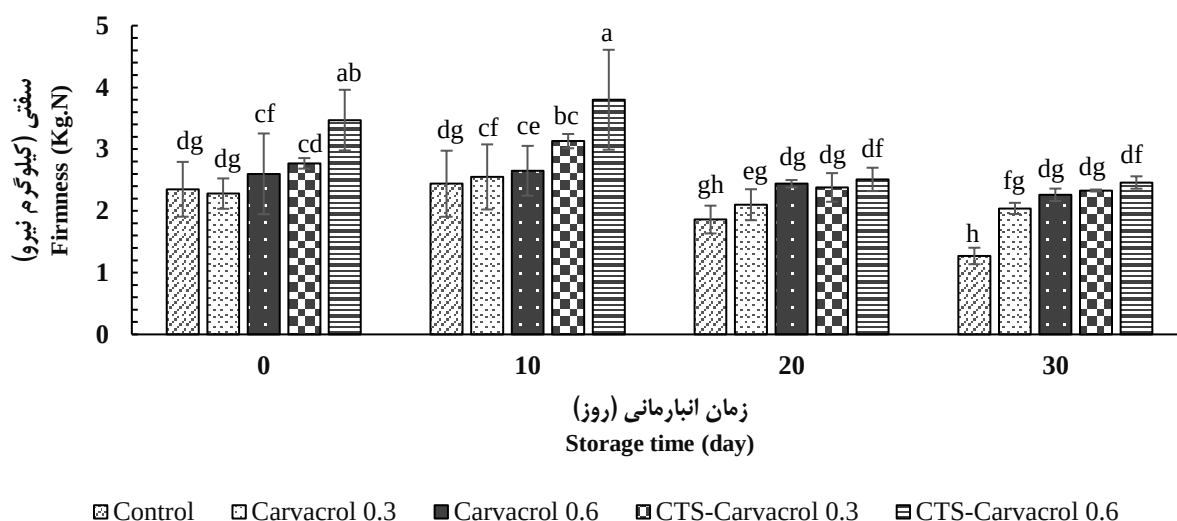


شکل ۲- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر مواد جامد محلول کل بافت میوه توت فرنگی رقم پاروس طی انبارمانی
Fig. 2. Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on total soluble solids of Paros strawberry fruit tissue during storage

نیرو) در روز ۱۰ و کمترین میزان سفتی مربوط به تیمار شاهد (۱/۲۷ کیلوگرم نیرو) در روز آخر بوده است. به طوری که در توت فرنگی های پوشش داده شده با کیتوزان و کارواکرول (۰/۳ و ۰/۶) از سفتی بیش تری نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد (شکل ۳). در مطالعه ای انگورهای پوشش داده شده با کیتوزان و آلوهورا به طور قابل توجهی سفت تر از میوه های تیمار شده با کیتوزان بودند. ($P < 0.05$)

سفتی بافت^۱ (FR)

سفتی، یک ویژگی مهم حسی، شاخصی از ماندگاری و کیفیت میوه است. نتایج نشان داد طی ۳۰ روز نگهداری توت فرنگی ها در یخچال، سفتی بافت نمونه شاهد کاهش یافت. به طوری که با افزایش زمان میزان سفتی بافت میوه در تمامی تیمارها تا روز ۱۰ افزایش پیدا کرد و بعد از آن روند کاهشی در روز آخر مشاهده شد. درواقع بیشترین میزان سفتی مربوط به تیمار کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ درصد (۳/۸ کیلوگرم



شکل ۳- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر سفتی بافت میوه توت‌فرنگی رقم پاروس طی انبارمانی
 Fig. 3. Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on firmness of Paros strawberry fruit tissue during storage

به‌نظر می‌رسد افزایش اسیدیته میوه در تیمار شاهد در روزهای آخر به‌علت افزایش فعالیت متابولیکی میوه، رشد سریع میکروبی با تخریب بافت میوه و همچنین طعم نامطلوب میوه با توجه به تست پانل می‌باشد. با طولانی شدن زمان انبارمانی میزان اسید قابل تیتراسیون در میوه‌های پوشش داده‌شده کاهش یافت؛ اما شدت کاهش در نمونه‌های شاهد کندتر بود (Ali et al., 2011).

شاخص طعم (TSS/TA)

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که نسبت TSS/TA در تمامی تیمارها (شاهد تا روز ۱۰) تا روز ۲۰ افزایش یافته است اما در روز آخر در تمامی تیمارها میزان شاخص طعم کاهش پیدا کرده است. درواقع میزان افزایش شاخص طعم در میوه‌های گروه شاهد کندتر از میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان بود. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان نسبت TSS/TA مربوط به تیمار کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ (۳۰/۴۴) در روز ۲۰ و کم‌ترین این نسبت مربوط به تیمار شاهد (۱۶/۵۶) در روز آخر مشاهده شد در واقع توت‌فرنگی پوشش داده شده با کیتوزان و کارواکرول (۰/۳ و ۰/۶) از شاخص طعم بهتری نسبت به سایر تیمارها برخوردار شدند (شکل ۵). نتایج این شاخص با پژوهش‌های سایر محققین، در میوه انگور با کاربرد پوشش کیتوزان مطابقت داشت (Nia et al., 2021).

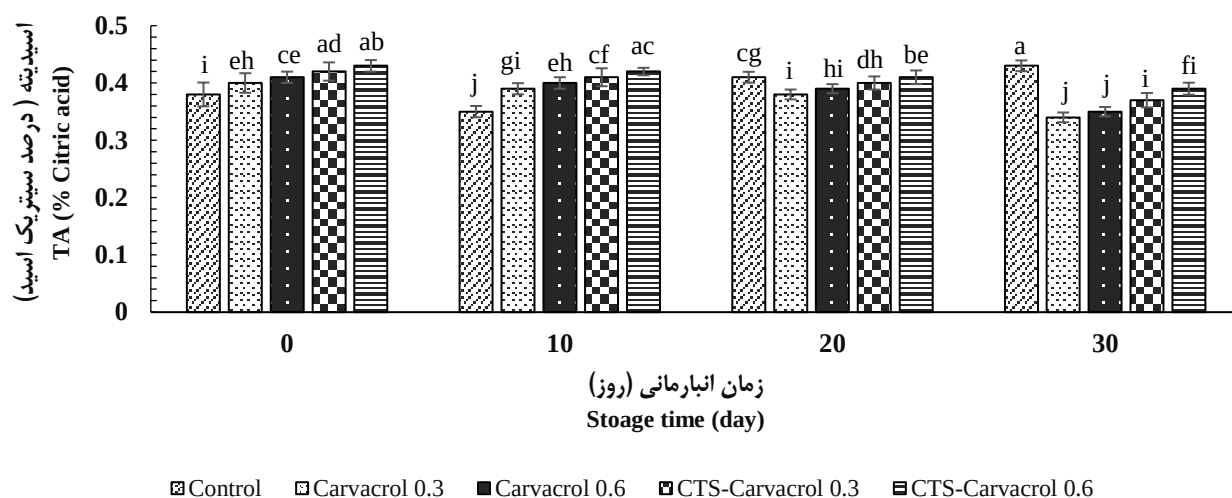
میزان نرم شدن میوه به‌طور مستقیم با سرعت پوسیدگی ترکیبات پکتین از طریق فعالیت آنزیمی آنزیم‌های پکتین‌متیل‌استراز (PME) و پلی‌گالاکتورناز (PG) در طول رسیدن مرتبط است. کیتوزان فعالیت آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی را کاهش می‌دهد و پوسیدگی قارچی را کاهش می‌دهد که در نتیجه می‌تواند سفتی بافت را در مقایسه با شاهد حفظ کند (Mostofi et al., 2010). نتایج این آزمایش با دیگر پژوهش‌های انجام‌شده روی انبه، گوجه و ذغال‌اخته مطابقت دارد به طوری‌که تیمار کیتوزان توانسته از کاهش سفتی بافت میوه طی مدت انبارمانی جلوگیری کند (Chien et al., 2007; Duan et al., 2001; Liu et al., 2007).

اسیدیته قابل تیتر (TA)^۳

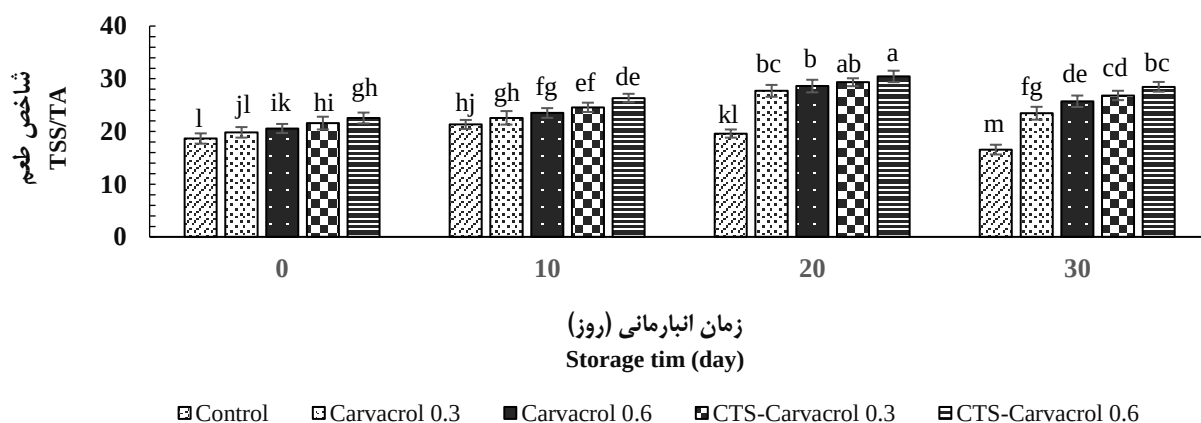
مقدار اسیدهای قابل تیتراسیون با رسیدگی محصول در ارتباط است و موجب طعم ترش در میوه‌ها و سبزی‌ها می‌گردند. با رسیدن در اکثر میوه‌ها میزان اسیدهای آلی کاهش می‌یابد (Jalili Marandi, 2013). نتایج مقایسه میانگین مربوط به اسیدیته طی دوره انبارمانی در دمای سرد نشان داد که با افزایش زمان نگهداری توت‌فرنگی‌ها، همگی تیمارها به‌جز شاهد (تا روز ۱۰) اسیدیته آن‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۴). به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان اسیدیته در روز ۳۰ مربوط به شاهد (۰/۴۳) درصد اسیدسیتریک بوده است. درواقع در طی آزمایش در روزهای آخر، تیمارهای ترکیبی کیتوزان با کارواکرول (۰/۳ و ۰/۶) از اسیدیته بیش‌تری نسبت به سایر تیمارها به‌جز شاهد مشاهده شد.

3- Titratable acidity

1- Pectin Methylesterases
 2- Polygalacturonases



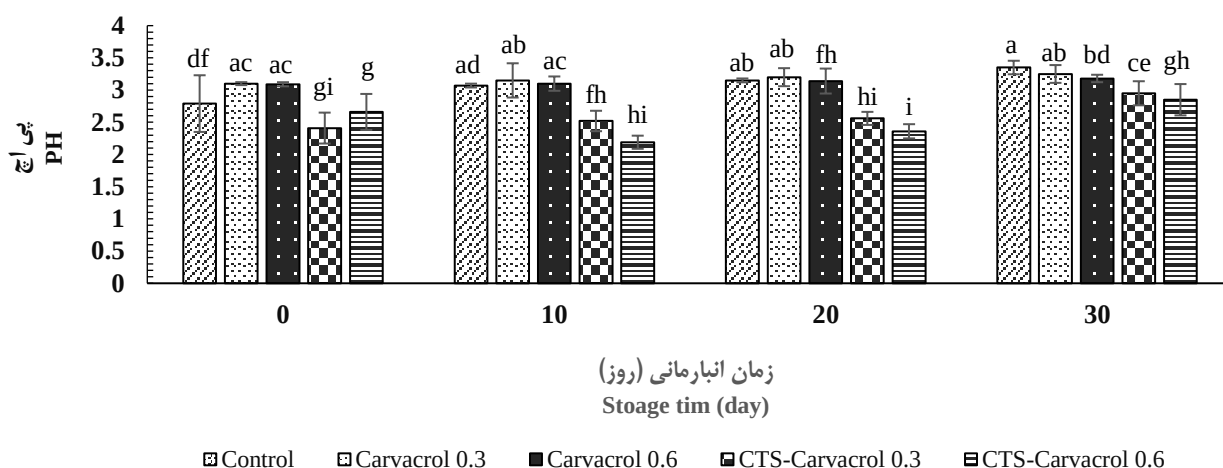
شکل ۴- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر اسیدیته قابل تیتر بافت میوه توت فرنگی رقم پاروس طی انبارمانی
Fig. 4. Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on titratable acidity of Paros strawberry fruit tissue during storage



شکل ۵- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر شاخص طعم بافت میوه توت فرنگی رقم پاروس طی انبارمانی
Fig. 5. Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on the taste index of Paros strawberry fruit texture during storage

که باعث کاهش میزان تنفس و رشد میکروب‌ها می‌شود. علت افزایش میزان pH در تیمار شاهد می‌تواند به دلیل عدم وجود پوشش مناسب در اطراف آن باشد که باعث افزایش میزان تنفس میوه و مصرف اسیدهای آلی و همچنین مربوط به رشد نسبی کپک‌ها و مخمرها و مصرف اسیدهای آلی توسط آنها باشد (Zivanovic et al., 2007). نتایج مشابه در رابطه با پوشش گواوا با فیلم بر پایه صمغ عربی حاوی اسانس دارچین (Etemadipoor et al., 2019) و فیلم زیست‌تخریب‌پذیر پلی وینیل‌الکل و کیتوزان برای بسته‌بندی توت فرنگی (Ding et al., 2019) گزارش شده است.

pH
نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در طول مدت زمان نگهداری میزان pH توت فرنگی‌های پوشش داده شده و شاهد افزایش پیدا کرد. pH توت فرنگی‌های پوشش داده شده به صورت معنی داری ($P < 0/01$) کم‌تر از نمونه شاهد بود (جدول ۱). به طوری که کم‌ترین pH مربوط به تیمار کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ در ۱۰ روز بعد از انبارمانی (۲/۱۹) و بیش‌ترین میزان pH در روز آخر مربوط شاهد (۳/۳۵) بوده است (شکل ۶). علت این تغییر احتمالا می‌تواند مربوط به ممانعت‌کنندگی پوشش کیتوزان و اثرات ضد میکروبی کارواکرول باشد



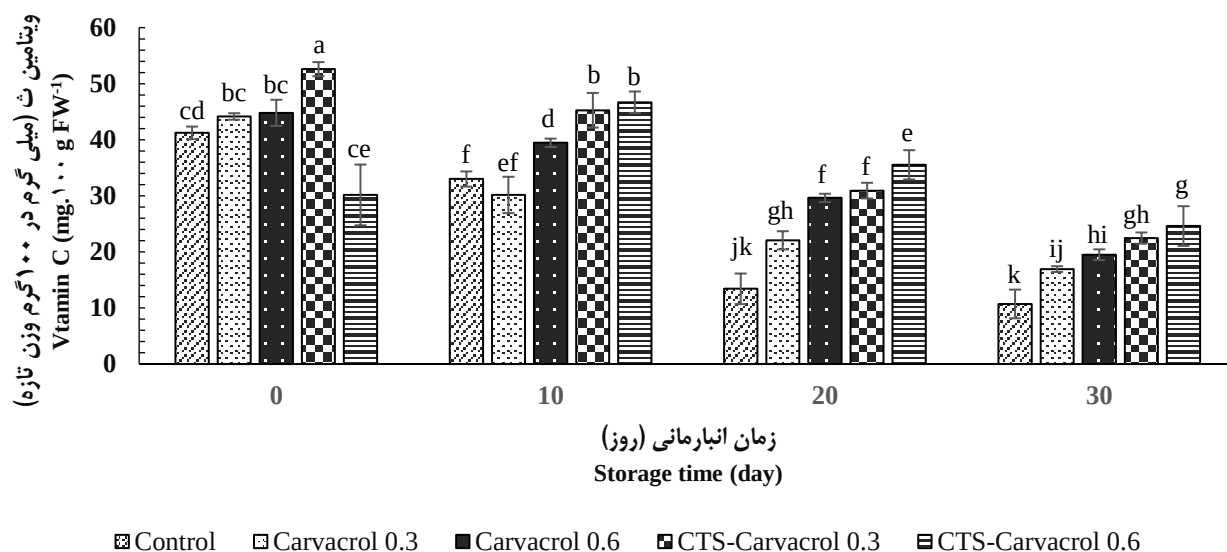
شکل ۶- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر پی اچ بافت میوه توت‌فرنگی رقم پاروس طی انبارمانی
 Fig. 6. Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on pH of Paros strawberry fruit tissue during storage

ویتامین‌ت

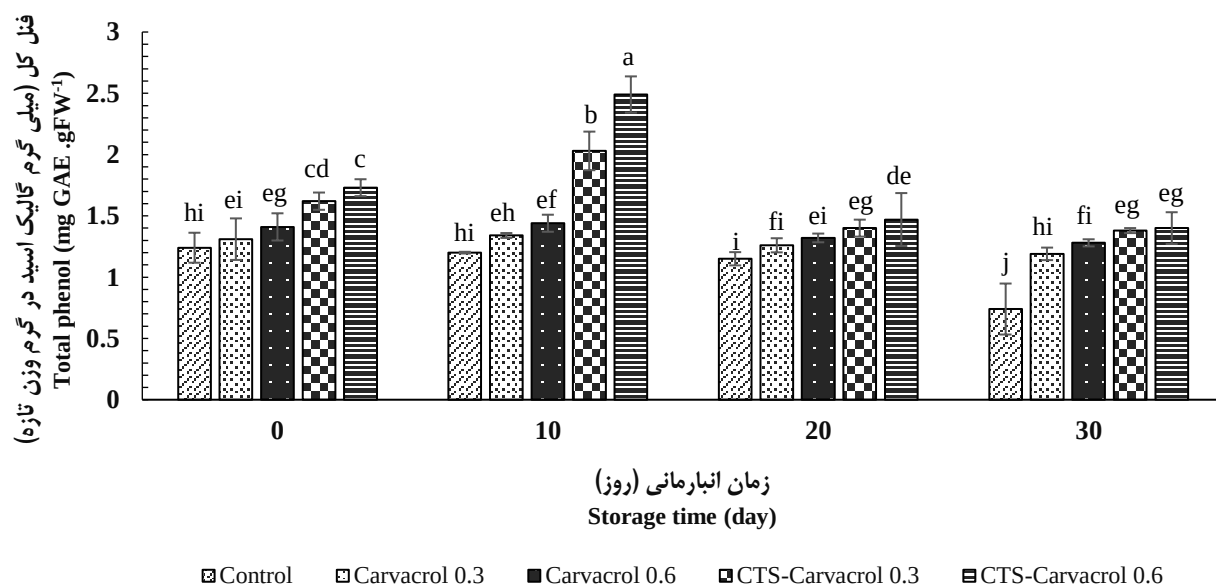
میزان فنل کل

مقایسه میانگین‌های داده‌ها، نشان داد که روند تغییر فنل کل طی دوره نگهداری میوه در همه تیمارها به‌جز شاهد تا ۱۰ روز بعد از انبارمانی افزایشی، اما پس از آن میزان فنل کل کاهش پیدا کرد. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان فنل مربوط به تیمار کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ درصد (۲۰/۴۹ میلی‌گرم اسیدگالیک در ۱۰۰ گرم وزن تر) در روز ۱۰ و کم‌ترین آن مربوط به تیمار شاهد (۲۰/۷۴ میلی‌گرم اسیدگالیک در ۱۰۰ گرم وزن تر) در روز آخر مشاهده شد، همچنین تیمارهای ترکیبی کیتوزان با کارواکرول (۰/۳ و ۰/۶ درصد) میزان فنل بیش‌تری نسبت به سایر تیمارها داشتند (شکل ۸). میزان فنل میوه‌ها و سبزی‌ها پس از برداشت می‌تواند کاهش یا افزایش یابد که این امر بستگی زیادی به شرایط انبارمانی دارد. نگهداری میوه‌های بالغ در سردخانه به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فنل‌ها می‌گردد و این مسئله می‌تواند به‌واسطه تغییرات در متابولیسم فنلی در طی انبارمانی و همچنین افزایش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیز باشد. آزمایشی که روی سبب انجام گرفت، نشان داد که میزان فنل کل پس از پایان دوره نگهداری طولانی در انبار افزایش یافته است (Leja et al., 2008). قاسم‌نژاد و همکاران (Ghasemnezhad et al., 2010) گزارش کردند که زردآلوهای تیمار شده با کیتوزان در مقایسه با شاهد از ترکیبات فنلی بیش‌تری برخوردار بودند.

براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها اثرات متقابل تیمارهای ترکیبی کیتوزان با کارواکرول تاثیر مثبتی بر میزان ویتامین‌ت توت‌فرنگی در چهار زمان اندازه‌گیری داشتند. بطوری‌که در روز آخر بیش‌ترین مقدار ویتامین‌ت مربوط به تیمار کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ درصد (۲۴/۶۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر) و کم‌ترین میزان ویتامین‌ت مربوط به تیمار شاهد (۱۰/۷۱ درصد میلی‌گرم در گرم وزن تر) مشاهده شد و همچنین تیمارهای ترکیبی کیتوزان با کارواکرول (۰/۳ و ۰/۶) نسبت به سایر تیمارها ویتامین‌ت بیش‌تری مشاهده شد (شکل ۷). در مطالعه رستم‌زاده و همکاران (Rostamzadeh et al., 2015)، کم‌ترین ویتامین‌ت در شاهد و بیش‌ترین در غلظت یک درصد کیتوزان وجود داشت. کاهش میزان ویتامین‌ت طی مدت انبارمانی ممکن است ناشی از افزایش اکسیداسیون حاصل از کاهش آب باشد (Shin et al., 2007). با توجه به اینکه کاهش ویتامین‌ت از نظر ارزش غذایی نامطلوب است، بنابراین جلوگیری از کاهش آن که احتمالاً با جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های مرتبط با اکسیداسیون آن صورت می‌گیرد، در ماندگاری ارزش تغذیه‌ای میوه بسیار مفید است (Mac Lean et al., 2000). نتایج این پژوهش با نتایج روی میوه‌های انبه و لیچی مطابقت دارد و بیانگر این است که پوشش کیتوزان توانسته است در طول مدت انبارمانی، از دست رفتن ویتامین‌ت را کم کرده و اکسیداسیون آن را کاهش دهد (Chien et al., 2007; Dong et al., 2004).



شکل ۷- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر میزان ویتامین ث میوه توت فرنگی رقم پاروس طی انبارمانی
Fig. 7. Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on vitamin C content of Paros strawberry fruits during storage

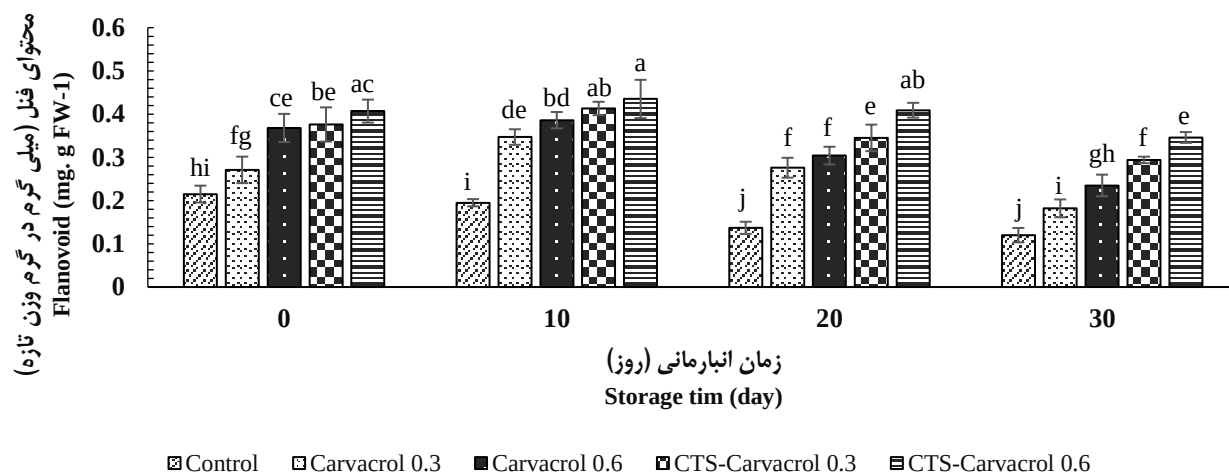


شکل ۸- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر محتوای فنل کل میوه توت فرنگی رقم پاروس طی انبارمانی
Fig. 8. Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on total phenolic content of Paros strawberry fruit during storage

بیشترین میزان فلاونوئید مربوط به تیمار ترکیبی کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ درصد (۰/۳۴ میلی گرم در گرم وزن تر) بود و همچنین در تیمارهای ترکیبی کیتوزان با کارواکرول (۰/۳ و ۰/۶ درصد) نسبت به سایر تیمارها میزان فلاونوئید بیش‌تری مشاهده شد. بنابراین میزان فلاونوئید تیمارهای کیتوزان نسبت به شاهد افزایش یافته که نشان می‌دهد کاربرد قبل از برداشت کیتوزان به‌طور قابل توجهی بر محتوای فلاونوئید تأثیر می‌گذارد (Bursac Kovacevic et al., 2015).

فلاونوئید

فلاونوئیدها گروه عمده‌ای از خانواده ترکیبات فنلی با فعالیت آنتی اکسیدانی و بیولوژیکی هستند که در میوه‌ها شناسایی شده‌اند (Fernández-Pan et al., 2015). همان‌طور که در شکل ۹ نشان داده شده است، روند تغییر فلاونوئید طی دوره نگهداری میوه در همه تیمارها به‌جز شاهد تا ۱۰ روز بعد از انبارمانی به‌صورت افزایشی، اما پس از آن میزان فلاونوئید کاهشی یافت. به‌طوری‌که کم‌ترین محتوای فلاونوئید مربوط به تیمار شاهد (۰/۱۲ میلی گرم در گرم وزن تر) در روز آخر و

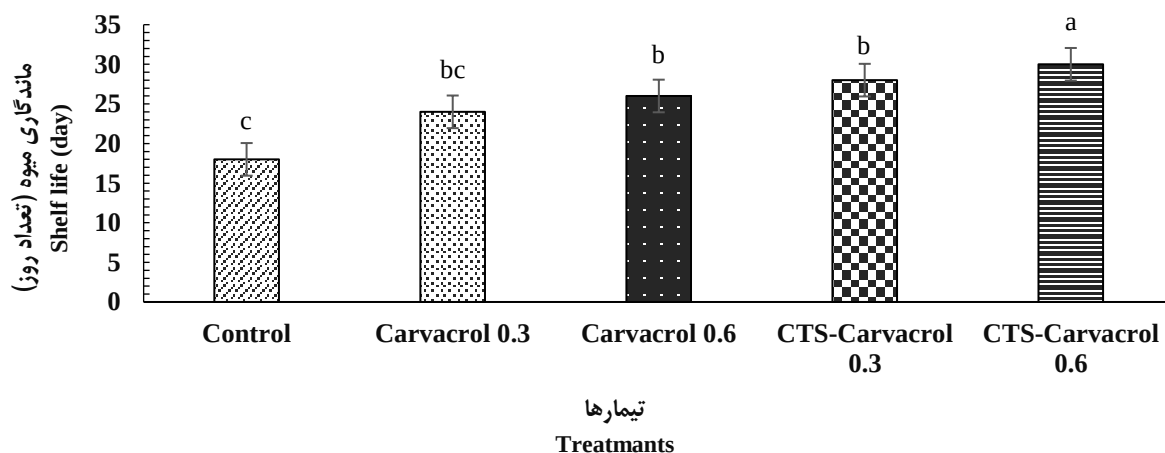


شکل ۹- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر میزان کل فلاونوئید میوه توت‌فرنگی رقم پاروس طی انبارمانی
Fig. 9. Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on total flavonoid content of Paros strawberry fruit during Storage

کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ درصد بوده است (شکل ۱۰). در مطالعات قبلی، ماندگاری انار (Meighani *et al.*, 2015) و انجیر تیمار شده با کیتوزان (Saki *et al.*, 2019) به ترتیب ۱۲۰ روز و ۲۰ روز، به طور قابل توجهی بیش‌تر از شاهد در طول دوره نگهداری بود.

ماندگاری میوه (تعداد روز)

تمام تیمارهای این مطالعه بر عمر ماندگاری توت‌فرنگی تأثیرگذار بودند. براساس نتایج نشان داده شده در شکل ۱۰، کم‌ترین (۱۸ روز) و بیش‌ترین (۳۰ روز) ماندگاری میوه به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار



شکل ۱۰- کاربرد قبل از برداشت کیتوزان با کارواکرول بر ماندگاری میوه توت‌فرنگی رقم پاروس طی انبارمانی
Fig. 10. Pre-harvest application of chitosan with carvacrol on shelf life of Paros cultivar strawberry fruit during storage

این رقم را در مقایسه با شاهد ۱۰ و ۱۲ روز بهبود بخشید. از این رو کاربرد قبل از برداشت کیتوزان و کارواکرول می‌تواند به عنوان یک راهبرد ایمن و کم‌هزینه جهت افزایش عمر پس از برداشت توت‌فرنگی رقم 'پاروس' قابل توصیه باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تیمار ترکیبی کیتوزان و کارواکرول ۰/۶ درصد، سبب بهبود صفات سفتی یافت میوه، ویتامین‌ث، مواد جامد محلول و شاخص طعم میوه توت‌فرنگی در مقایسه با دیگر تیمارها و شاهد گردید. همچنین، استفاده از این تیمارها ترکیبی (کیتوزان با کارواکرول ۰/۳ و ۰/۶) توانست عمر پس از برداشت

منابع

1. Abd-Elkader, D.Y., Salem, M.Z.M., Komeil, D.A., Al-Huqail, A.A., Ali, H.M., Salah, A.H., Akrami, M., & Hassan, H.S. (2021). Post-harvest enhancing and *Botrytis cinerea* control of strawberry fruits using low cost and eco-friendly natural oils. *Agronomy*, 11, 1246. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061246>
2. Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020). Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: quality and safety aspects. *Microorganisms*, 8, 952. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>
3. Ahn, M.G., Kim, D.S., Ahn, S.R., Sim, H.S., Kim, S., & Kim, S.K. (2021). Characteristics and trends of strawberry cultivars throughout the cultivation season in a Greenhouse. *Horticulturae*, 7, 30. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7020030>
4. Ali, A., Tengku, M., Muda, M., Sijam, K., & Siddiqu, Y. (2011). Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 124, 620-626. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.085>
5. Alirezalu, K., Tavakolian, R., & Jaffarpour, P. (2018). Effect of postharvest application of chitosan coating containing green tea extract on quality characteristics and shelf life of Selva strawberry cultivar. *Research in Pomology*, 3(1), 43-56.
6. Bautista-Banos, S., Hernandez-Lopez, M., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C.L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22, 1087-1092. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00117-0)
7. Bursac Kovacevic, D., Putnik, P., Uzelac Verica, D., & Livaj, B. (2015). Influences of organically and conventionally grown strawberry cultivars on anthocyanins content and color in purees and low-sugar jams. *Food Chemistry*, 181, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.063>
8. Chiabrandio, V., Garavaglia, L., & Giacalone, G. (2019). The postharvest quality of fresh sweet cherries and strawberries with an active packaging system. *Foods*, 8, 335. <https://doi.org/10.3390/foods8080335>
9. Chien, P.J., Sheu, F., & Yang, F.H. (2007). Effect of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Food Engineering*, 78, 225-229. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.09.022>
10. De Corato, U. (2020). Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 940-975. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1553025>
11. Ding, J., Zhang, R., Ahmed, S., Liu, Y., & Qin, W. (2019). Effect of sonication duration in the performance of polyvinyl alcohol/chitosan bilayer films and their effect on strawberry preservation. *Molecules*, 24(7), 1408-1414. <https://doi.org/10.3390/molecules24071408>
12. Dong, H., Cheng, L., Tan, J., Zheng, K., & Jiang, Y. (2004). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. *Food Engineering*, 64, 355-358. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.11.003>
13. Duan, J., Wu, R., Strik, B.C., & Zhao, Y. (2011). Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.08.006>
14. Ergun, M., & Satıcı, F. (2012). Use of *Aloe vera* gel as biopreservative for 'Granny Smith' and 'Red Chief' apples. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(2), 363.
15. Etemadipoor, R., Ramezani, A., Dastjerdi, A.M., & Shamili, M. (2019). The potential of gum arabic enriched with cinnamon essential oil for improving the qualitative characteristics and storability of guava *Psidium guajava* L. fruit. *Scientia Horticulturae*, 251, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.021>
16. Eum, H.-L., Han, S.-H., & Lee, E.-J. (2021). High-CO₂ treatment prolongs the postharvest shelf life of strawberry fruits by reducing decay and cell wall degradation. *Foods*, 10, 1649. <https://doi.org/10.3390/foods10071649>
17. Farina, V., Passafiume, R., Tinebra, I., Palazzolo, E., & Sortino, G. (2020). Use of *Aloe vera* gel-based edible coating with natural anti-browning and anti-oxidant additives to improve post-harvest quality of fresh-cut 'Fuji' apple. *Agronomy*, 10, 515. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040515>
18. Fernández-Pan, I., Maté, J. I., Gardrat, C., & Coma, V. (2015). Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. *Food Hydrocolloids*, 51, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.033>
19. Feyzollahi, Y., Golmohammadi, A., Nematollahzadeh, A., & Tahmasebi, M. (2022). Evaluation the effect of biodegradable active packaging based on Zein containing *Zataria multiflora* essential oil on postharvest shelf life of strawberry. *Innovative Food Technologies*, 9(2), 113-127. <https://doi.org/10.22104/jift.2021.5248.2071>
20. Friedman, M. (2014). Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31), 7652-7670. <https://doi.org/10.1021/jf5023862>

21. Ghasemnezhad, M., Shiri, M.A., & Sanavi, M. (2010). Effect of chitosan coatings on some quality indices of apricot (*Prunus armeniaca* L.) during cold storage. *Journal of Enviromental Sciences*, 8, 25-33. https://cjes.guilan.ac.ir/data/cjes/coversheet/head_en.jpg
22. Ghoora, M.D., & Srividya, N. (2020). Effect of packaging and coating technique on postharvest quality and shelf life of *Raphanus sativus* L. and *Hibiscus sabdariffa* L. *Microgreens Foods*, 9, 653. <https://doi.org/10.3390/foods9050653>
23. Hashmi, M.S., East, A.R., Palmer, J.S., & Heyes, J.A. (2013). Hypobaric treatment stimulates defence-related enzymes in strawberry. *Postharvest Biology Technology*, 85, 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.05.002>
24. He, Y., Bose, S.K., Wang, W., Jia, X., Lu, H., & Yin, H. (2018). Pre-harvest treatment of chitosan oligosaccharides improved strawberry fruit quality. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2194. <https://doi.org/10.3390/ijms19082194>
25. Hosseini, S.F., Amraie, M., Salehi, M., Mohseni, M., & Aloui, H. 2019. Effect of chitosan-based coatings enriched with savory and/or tarragon essential oils on postharvest maintenance of kumquat (*Fortunella* sp.) fruit. *Food Science and Technology International*, 7, 155-162. <https://doi.org/10.1002/fsn3.835>
26. Ilari, A., Toscano, G., Boakye-Yiadom, K.A., & Duca, D. (2021); Foppa pedretti, E. life cycle assessment of protected strawberry productions in central Italy. *Sustainability*, 13, 4879. <https://doi.org/10.3390/su13094879>
27. Jalili Marandi, R. (2013). *Physiology after harvesting*. Academic Jihad Publications of Urmia University. 276 p. <https://doi.org/10.3390/su142214918>
28. Kahramanoğlu, I. (2019). Effects of lemongrass oil application and modified atmosphere packaging on the postharvest life and quality of strawberry fruits. *Science Horticulture*, 256, 108527. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.05.054>
29. Khodaei, D., Hamidi-Esfahani, Z., & Rahmati, E. (2021). Effect of edible coatings on the shelf-life of fresh strawberries: A comparative study using TOPSIS-Shannon entropy method. *NFS Journal*, 23, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2021.02.003>
30. Leja, M., Mareczek, A., & Ben, J. (2008). Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. *The Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 396-401. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00263-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00263-7)
31. Liu, J., Tian, S., Menga, X., & Xua, Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.12.019>
32. Mac Lean, D.D., Murr, D.P., & DeELL, J.R.A. (2000). Modified total oxyradical scavenging capacity assay for antioxidants in plant tissues. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 183-194. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00248-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00248-X)
33. Meighani, H., Ghasemnezhad, M., & Bakhshi, D. (2015). Effect of different coatings on post-harvest quality and bioactive compounds of pomegranate (*Putnica granatum* L.) fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4507-4514. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1484-6>
34. Montero-Prado, P., Rodriguez-Lafuente, A., & Nerin, C. (2011). Active label-based packaging to extend the shelf-life of "Calanda" peach fruit: Changes in fruit quality and enzymatic activity. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.01.008>
35. Moraes, K.S., de Fagundes, C., Melo, M.C., Andreani, P., & Monteiro, A.R. (2012). Con-servation of Williams pear using edible coating with alginate and carrageenan. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 32, 679-684. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00093-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00093-4)
36. Mozafari, A.A., Dedejani, S., & Ghaderi, N. (2018). Positive responses of strawberry (*Fragaria_ananassa* Duch.) explants to salicylic and iron nanoparticle application under salinity conditions. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 134, 267-275. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1420-y>
37. Nair, M.S., Tomar, M., Punia, S., Kukula-Koch, W., & Kumar, M. (2020) Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.083>
38. Nemzer, B., Vargas, L., Xia, X., & Feng, H. (2018). Phytochemical and physical properties of blueberries, tart cherries, strawberries, and cranberries as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, 262, 242-250. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.047>
39. Nia, A.E., Taghipour, S., & Siahmansour, S. (2021). Pre-harvest application of chitosan and postharvest Aloe vera gel coating enhances quality of table grape (*Vitis vinifera* L. cv. 'Yaghouti') during postharvest period. *Food Chemistry*, 347, 129012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129012>
40. Nia, A.E., Malekzadeh, E., Taghipour, S., Tatari, A., Arshad, Z.G. (2023). Effects of preharvest chitosan-Myrtus communis essential oil composite and postharvest nanocellulose on quality of strawberry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126733. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126733>

41. Peretto, G., Du, W.X., Avena-Bustillos, R.J., Sarreal, S.B.L., Hua, S.S.T., Sambo, P., & McHugh, T.H. (2014). Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. *Postharvest Biology and Technology*, 89, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.11.003>
42. Romanazzi, G., Feliziani, E., Sivakumar, D., & Chitosan, A. (2018). Biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Front. Microbiology*, 9, 2745. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02745>
43. Rostamzadeh, B., Ramin, A.A., Amini, F., & Pirmoradian, M. (2015). Effect of chitosan coating on increasing postharvest life and maintaining apple fruit quality Cv "Soltani". *JCPP*, 5(17), 263-272.
44. Saki, M., ValizadehKaji, B., Abbasifar, A., & Shahrjerdi, I. (2019). Effect of chitosan coating combined with thymol essential oil on physicochemical and qualitative properties of fresh fig (*Ficus carica* L.) fruit during cold storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), 1147-1158. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00030-w>
45. Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J., Holliday, D., & Watkins, C.B. (2007). Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 349-357. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.007>
46. Shirzad, H. (2013). Effect of chitosan and calcium chloride to reduce postharvest rot and different quality attributes on Siah mashhad sweetcherry. *Journal of Horticultural Science*, 26(4), 378-384. <https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.18224>
47. Srinivasa, P.C., Baskaran, R., Armes, M.N., Harish Prashanth, K.V., & Tharanathan, R.N. (2002). Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan. *Food Research and Technology*, 215, 504-508. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0591-1>
48. Tanada-Palmu, P., & Grosso, C. (2005). Effect of edible wheat gluten-based films an coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 199-208. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.12.003>
49. Tzortzakis, N., Xylia, P., & Chrysargyris, A. (2019). Sage essential oil improves the effectiveness of *Aloe vera* gel on postharvest quality of tomato fruit. *Agronomy*, 9, 635. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100635>
50. Yuan, G., Chen, X., & Li, D. (2016). Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Research International*, 89, 117-128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.004>
51. Ziv, C., & Fallik, E. (2021). Postharvest storage techniques and quality evaluation of fruits and vegetables for reducing food loss. *Agronomy*, 11, 1133. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061133>
52. Zivanovic, S., Shuang, C., & Draughon, A.F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Food Science*, 70, 45-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09045.x>



Preparation of Biopolymer Based on Agar Extracted from Persian Gulf Red Algae *Acanthophora* and Evaluation of Its Properties

P. Dianat¹, M. Haji Abdolrasouli^{ID}*², M. Yousefzadi³

1- Studnet, Department of Marine Biotechnology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

2- Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

(*- Corresponding Author Email: abdorrasouli@hormozgan.ac.ir)

3- Full Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran

How to cite this article:

Received: 2022.09.10
Revised: 2022.12.24
Accepted: 2023.01.01
Available Online: 2023.01.02

Dianat, P., Haji Abdolrasouli, M., & Yousefzadi, M. (2023). Preparation of biopolymer based on agar extracted from Persian Gulf red algae *Acanthophora* and evaluation of its properties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5), 635-648. (In Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78025.1196>

Introduction

Consumer demand for healthy food free of chemical preservatives and environmental concerns with plastic packaging environments are analyzed, which can be replaced by aquatic environments that can be contaminated, for the development of bio-based packaging materials. Natural polymers have the ability to be biodegradable due to the presence of oxygen or nitrogen atoms in their main polymer chain compared to the dominant carbon-carbon bonds in fossil-based polymers. Among the various biopolymers used to prepare multilayer films, polysaccharides are considered as the main components of the film due to their abundance and non-toxicity. These films generally have good mechanical strength, moderate physical properties, and most importantly, are edible and easily degradable. However, they are very brittle and hydrophilic, and these properties are undesirable in food packaging applications. Among polysaccharides, agar, commercially extracted from seaweed, is one of the most common and widely studied base materials. Agar is insoluble in cold water, but soluble in water at 90-100°C. When making an agar film, the solution and casting surface must be kept above the agarose gel setting temperature to avoid premature gelation. Compared to other biopolymers, agar is more stable at low pH and high temperature. This thermoplastic and biocompatible polysaccharide creates films with high mechanical strength, transparency and moderate barrier properties to carbon dioxide and oxygen, and most importantly, it is edible and easily biodegradable. Mixing agar with other polymers such as polyvinyl alcohol (PVA) and polyethylene improves the mechanical, thermal and biodegradability properties of bio composites. The main goal of this study is to make biofilms for use in packaging industries with agar polymer extracted from macroalgae species *Acanthophora* sp. Agar was extracted by sodium hydroxide/heating method and the film was prepared in combination with industrial polymer PVA and glycerol.

Materials and Methods

To make biofilms based on agar polymer, firstly, optimization of agar polymer extraction from macroalgae species *Acanthophora* sp. was done by sodium hydroxide/heating method, and in the next step, total phenolic compounds and the amount of soluble protein in extracted agar were measured. In the next step, glycerol with 30% by weight was used as a softener and PVA polymer with a weight ratio of 25% to the dry weight of agar powder was used to make bio composite by solvent casting method, in order to strengthen the mechanical and physical properties of bio composites. Characterization tests of the prepared composites included: XRD, FTIR and Tensile test. Laboratory tests include; The



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78025.1196>

percentage of solubility in water and degree of swelling for all bio-composites were evaluated to determine the optimal physical properties of bio-films.

Results and Discussion

he results showed that; 15% extraction efficiency was obtained for sodium hydroxide/heating pretreatment method. The results of measuring the amount of total phenolic compounds in agar solution extracted by sodium hydroxide/heating method showed that the number of phenolic compounds in agar solution was 0.077 ± 0.004 in terms of mg of gallic acid/g of agar. The results of measuring the amount of protein in extracted agar determined by Bradford method showed that the agar solution contains 0.040 ± 0.019 mg/ml of protein. A decrease in the swelling rate and an increase in the water solubility of the agar bio composite occurred with the addition of glycerol and PVA polymer. The results of the tensile test showed that the addition of glycerol, a small hydrophilic molecule, to the agar bio composite leads to a decrease in the elastic modulus and an increase in flexibility. Adding PVA to agar/glycerol biofilm caused a decrease in the amount of elastic modulus and percentage of flexibility, which is the main factor of this phenomenon, the low values of elastic modulus and flexibility of PVA. Finally, the results confirm the use of these coatings for packing fruits and vegetables in tropical regions by increasing their shelf life for at least 5 days at 25°C.

Keywords: Bioplastic, Bio-polymer, Packing, Polysaccharide, PVA



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲، ص. ۶۴۸-۶۳۵

تهیه بیوپلیمر بر پایه آگار استخراج شده از جلبک قرمز *Acanthophora* خلیج فارس و ارزیابی خواص آن

پریسا دیانت^۱ - مهدی حاجی عبدالرسولی^{۲*} - مرتضی یوسف زادی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۱

چکیده

در میان پلیمرهای زیستی مختلف مورد استفاده برای تهیه فیلم، پلی ساکاریدها به دلیل فراوانی و غیر سمی بودن به عنوان اجزای اصلی فیلم به شمار می آیند. مخلوط آگار با سایر پلیمرها مانند PVA، خواص مکانیکی و زیست تخریب پذیری کامپوزیت های زیستی بهبود می بخشد. هدف اصلی این پژوهش ساخت بیوپلیمر به منظور کاربرد در صنایع بسته بندی با آگار استخراج شده از ماکرو جلبک *Acanthophora* در ترکیب با پلیمر صنعتی پلی ونیل الکل و گلیسرول است. برای ساخت بیوپلیمر آگار، در ابتدا بهینه سازی استخراج پلیمر آگار از ماکرو جلبک با روش سدیم هیدروکسید/ گرمادهی انجام و در مرحله بعد سنجش ترکیبات محلول آگار استخراجی صورت گرفت. سپس برای ساخت کامپوزیت زیستی با روش قالب گیری از گلیسرول (۳۰ درصد وزنی-وزنی) و پلیمر PVA (۲۵ درصد وزنی-وزنی) استفاده شد. نتایج نشان داد که بازده استخراج برای روش پیش تیمار سدیم هیدروکسید/ گرمادهی ۱۵ درصد است. آزمون سنجش میزان کل ترکیبات فنلی محلول آگار استخراج شده نشان داد که میزان ترکیبات فنولی محلول آگار 0.04 ± 0.07 بر حسب میلی گرم اسید گالیک/ گرم آگار و میزان پروتئین محلول آگار استخراج شده، حاوی 0.19 ± 0.40 پروتئین بر حسب میلی گرم/ میلی لیتر آگار است. نتایج آزمون کشش بیانگر این بود که افزودن گلیسرول به آگار باعث افزایش انعطاف پذیری و افزودن پلیمر PVA باعث افزایش در میزان استحکام کششی و بهبود خواص فیزیکی نظیر افزایش درجه تورم، کاهش درصد حلالیت در آب فیلم های زیستی بر پایه آگار می شود. در نهایت نتایج، استفاده از این پوشش ها جهت بسته بندی میوه و سبزیجات در مناطق گرمسیری با افزایش طول عمر مفید آن ها به مدت حداقل تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تایید می کند.

واژه های کلیدی: بسته بندی، بیوپلیمر، پلاستیک زیستی، پلی ساکارید، PVA

مقدمه

بازیافت بسته بندی مواد غذایی به دلیل باقیمانده مواد غذایی دشوار و گران است. بنابراین، توسعه مواد بسته بندی مواد غذایی ساخته شده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر مورد نیاز است. همچنین تقاضای مصرف کننده برای غذای سالم و عاری از مواد نگهدارنده مصنوعی و نگرانی های زیست محیطی مرتبط با زباله های بسته بندی پلاستیکی تجزیه ناپذیر که اکوسیستم از جمله محیط های آبی را آلوده می کنند،

مواد بسته بندی به عنوان آلاینده های زیست محیطی در سراسر جهان عمل می کنند. زیرا عموماً از پلیمرهای تجزیه ناپذیر از جمله پلی اتیلن، پلی پروپیلن و اتیلن ترفتالات ساخته شده اند. علاوه بر این، بسته بندی مواد غذایی بیشترین ضایعات بسته بندی را تشکیل می دهد، زیرا

۱- دانشجوی، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

(*)- نویسنده مسئول: (Email: abdorrasouli@hormozgan.ac.ir)

۳- استاد تمام، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

جمله نشاسته از منابع گیاهی مختلف (Fakhouri et al., 2013; Marichelvam et al., 2019; Marichelvam et al., 2022) ژلاتین استخوان جانداران (Fakhouri et al., 2012; Susilawati et al., 2019; Wulandari et al., 2022) کیتوزان (Hasan & Rahman, 2018; Suryanegara et al., 2021) پلی لاکتیک اسید (Abdullah et al., 2019; Yusoff et al., 2021) آگار (Arham et al., 2018; Basumatary et al., 2018; Hii et al., 2016; Hong et al., 2021; Kumar et al., 2019; Rhim, 2014; Shankar et al., 2013; Rhim et al., 2011) و آگار در ترکیب با سایر بیوپلیمرها (Lee et al., 2021; Madera-Santana et al., 2011; Madera-Santana et al., 2009; Nguyen et al., 2021; Orsuwan et al., 2016) انجام شده است. در مطالعه حاضر آگار استخراج شده از ماکرو جلبک قرمز *Acanthophora* در ترکیب با پلیمر PVA برای تولید فیلم‌های زیستی مورد استفاده و خواص فیزیکی و مکانیکی آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماده اولیه جهت استخراج پلی ساکارید آگار شامل سدیم هیدروکسید از شرکت سیگما آلدريج (کشور آلمان) است. در ساخت پلاستیک زیستی از گلیسرول و پلیمر صنعتی پلی وینیل الکل با وزن مولکولی ۷۲۰۰۰ دالتون تهیه شده از شرکت مرک (کشور آلمان) استفاده شد.

جمع‌آوری و شناسایی جلبک قرمز دریایی

جهت استخراج آگار، ماکرو جلبک قرمز در پاییز از ناحیه جزرومدی، در زمان حداکثر جزر از سواحل شیب‌دراز جزیره قشم واقع در خلیج فارس جمع‌آوری گردید. توده‌های جمع‌آوری شده با آب دریا شسته شد و بعد از جداسازی شن و یا جانداران اپی فیت به آزمایشگاه زیست‌فناوری دریایی دانشگاه هرمزگان منتقل گردید و نمونه‌ها چندین بار با آب شهری شستشو شد تا هر گونه مواد و جسم خارجی از جلبک خارج شود. در آخرین مرحله شستشو، یک بار با آب مقطر شسته شد تا شوری اضافه زدوده گردد و سپس در سایه در رطوبت ۵۰٪ و در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) خشک گردید. نمونه جمع‌آوری شده با کلیدهای شناسایی معتبر [۱۴-۱۶]، اطلس و چک لیست‌های موجود از ماکرو جلبک‌های منطقه خلیج فارس [۱۷، ۱۸]، جست‌وجو در پایگاه علمی بانک جلبک (Algae base) و نیز براساس خصوصیات مورفولوژیک تا سطح جنس شناسایی شدند.

منجر به توسعه مواد بسته‌بندی زیستی جایگزین شده است. پلاستیک‌های زیستی عمدتاً از زیست توده‌های تجدیدپذیر مانند پلی ساکاریدها و پروتئین‌هایی که جایگزین‌های جذابی برای پلیمرهای پلاستیکی بر پایه نفت هستند، تهیه می‌شوند (Spierling et al., 2018). پلیمرهای طبیعی به دلیل وجود اتم‌های اکسیژن یا نیتروژن در زنجیره اصلی پلیمری آن‌ها در مقایسه با پیوندهای کربن-کربن غالب در پلیمرهای برپایه نفت، قابلیت زیست تخریب‌پذیری دارند (Kumar et al., 2018). در میان پلیمرهای زیستی مختلف مورد استفاده برای تهیه فیلم‌های چند لایه، پلی ساکاریدها به دلیل فراوانی و غیرسمی بودن به عنوان اجزای اصلی فیلم به‌شمار می‌آیند. این فیلم‌ها عموماً دارای استحکام مکانیکی خوب، خواص فیزیکی متوسط و مهم‌تر از همه، خوراکی هستند و به راحتی تجزیه می‌شوند. با این حال، آن‌ها بسیار شکننده و آب‌دوست هستند. این ویژگی‌ها در کاربردهای بسته‌بندی مواد غذایی نامطلوب هستند. نشاسته، آگار، سلولز و مشتقات آن، پکتین، کیتوزان، آلژینات و کاراگینان مواد پلی ساکارید اصلی هستند که به عنوان مواد بسته‌بندی خوراکی عموماً مورد استفاده قرار می‌گیرد (da Rocha et al., 2018). در میان پلی ساکاریدها، آگار که به صورت تجاری از جلبک‌های دریایی استخراج می‌شود، یکی از رایج‌ترین مواد پایه‌ای است که به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (Basumatary et al., 2018; Hernández et al., 2022; Kumar et al., 2019; Madera-Santana et al., 2011). آگار در آب سرد نامحلول است، اما در دمای ۹۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در آب محلول است. هنگام ساخت یک فیلم آگار، محلول و سطح قالب‌گیری باید بالاتر از دمای تنظیم ژل آگاروز نگهداری شود تا از ژل شدن زودرس جلوگیری شود. در مقایسه با سایر پلیمرهای زیستی، شفاف و با خواص سدپذیری متوسط نسبت به گاز کربن‌دی‌اکسید و اکسیژن ایجاد می‌کند و مهم‌تر از همه، خوراکی و به آسانی قابل تجزیه زیستی است (da Rocha et al., 2018). مخلوط آگار با سایر پلیمرها مانند پلی وینیل الکل (PVA) و پلی اتیلن، خواص مکانیکی، حرارتی و زیست‌تخریب‌پذیری کامپوزیت‌های زیستی بهبود می‌بخشد (Madera-Santana et al., 2009). PVA یک ماده با انحلال‌پذیری عالی است که به دلیل ماهیت محلول در آب، زیست تخریب‌پذیری و سازگاری بالا آن برای کاربردهای بسته‌بندی، استفاده می‌شود (Haghighi et al., 2021; Lee et al., 2021; Mathew et al., 2019). این پلیمر غیرسمی سنتزی و نیمه کریستالی شفاف، بی بو، بسیار انعطاف‌پذیر با خواص امولسیون‌کنندگی و چسبندگی عالی است. از این رو، PVA در چسب‌ها و پوشش‌های کاغذ و مواد بسته‌بندی استفاده می‌شود. اما محدودیت‌های این پلیمر شامل ماهیت قطبی بالا، بازدارندگی ضعیف و خواص مکانیکی نامطلوب می‌باشد (Madera-Santana et al., 2014). تا اکنون ساخت پلاستیک زیستی توسط محققان با استفاده از پلیمرهای مختلف؛ از



شکل ۱- ماکرو جلبک قرمز گونه *Acanthophora* sp. عکس از نگارنده

Fig. 1. Red macroalgae *Acanthophora* sp. Photo by the author

استخراج پلیمر آگار

برای استخراج آگار از ماکرو جلبک بومی خلیج فارس جنس *Acanthophora* استفاده شد. استخراج به روش گرمادهی صورت گرفت. علاوه بر این، اثر یک مرحله پیش تصفیه قلیایی اولیه برای حذف ناخالصی‌ها از جلبک دریایی خام، قبل از فرآیندهای استخراج نیز مورد بررسی قرار گرفت (Martínez-Sanz et al., 2019). در ابتدا، نمونه‌های یک گرمی ماکرو جلبک خشک شده در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر غوطه‌ور شد و سپس جهت افزایش خلوص و قدرت ژل شدگی آگار استخراج شده، سدیم هیدروکسید ۱۰ درصد (وزنی - حجمی) قطره قطره اضافه گردید تا به pH معادل ۱۱ برسد و سپس به مدت زمان ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در حمام بن ماری (کمپانی Daihan Scientific، مدل WB-11) قرار گرفت. سپس فیلتراسیون با استفاده از دستگاه سانتری فیوژ (کمپانی سیگما، مدل 2-16P) صورت گرفت و چندین بار با آب شهری شستشو داده شد تا اسیدیته باقی‌مانده توده ماکرو جلبک خنثی شود. در مرحله بعد باقی‌مانده ماکرو جلبک در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر خیسانده شد و سپس به مدت زمان ۲ ساعت تحت تاثیر دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از انجام فیلتراسیون محلول آگار از باقی‌مانده توده ماکرو جلبک جدا گردید و بعد از دو چرخه انجماد_ذوب (۲۱-۲۵ درجه سانتی‌گراد) خشک شد. در انتها میزان بازدهی استخراج آگار برای روش استخراجی فوق، طبق معادله ۱ محاسبه شد:

$$(1) \quad \text{Yield (\% w/w)} = \frac{\text{dry weight agar (g)}}{\text{initial dry weight seaweed (g)}} \times 100$$

سنجش محتوی ترکیبات فنلی آگار

ترکیبات فنلی محلول آگار با روش رنگ‌سنجی فولین سیو کالتو با اندکی تغییر برآورد شد (Soleimani et al., 2022). اساس کار در این روش، احیا معرف فولین سیو کالتو توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۵

نانومتر نشان می‌دهد. در این آزمایش، ابتدا غلظت‌های مختلفی از اسید گالیک (۰/۰۰۳ - ۰/۰۲۴ میلی گرم بر میلی لیتر) به عنوان استاندارد تهیه شد. به طور خلاصه، معرف فولین - سیو کالتو به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شد و ۳ میلی لیتر از رقت نهایی با ۰/۶ میلی لیتر از نمونه محلول آگار (محلول در آب مقطر با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) در دمای اتاق مخلوط شد. در نهایت ۲/۴ میلی لیتر کربنات سدیم (۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در حمام بن ماری قرار گرفتند و مقادیر جذب در ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. آب مقطر به عنوان بلانک استفاده شد. یک منحنی کالیبراسیون با استفاده از اسید گالیک به عنوان استاندارد ساخته شد و محتوای فنلی کل به صورت میلی گرم اسید گالیک در گرم آگار استخراج شده بیان شد. همه آزمایشات در سه تکرار انجام شد. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره طبق فرمول ۲ محاسبه گردید:

$$(2) \quad C = c \cdot \frac{v}{m'}$$

C میزان کل ترکیبات فنلی موجود در محلول آگار را نشان می‌دهد (mg/g)، c غلظت معادل اسید گالیک که از منحنی استاندارد به دست می‌آید (mg/ml)، v حجمی از محلول آگار که با آن آزمایش صورت گرفت (ml) و m' میزان آگار به دست آمده از یک گرم توده جلبک می‌باشد.

سنجش محتوی پروتئین آگار

محتوی پروتئین محلول آگار استخراجی، طبق روش برادفورد مورد سنجش قرار گرفت. در این روش، ۳۰۰ میکرو لیتر از محلول آگار (۱ میلی گرم در میلی لیتر) با ۳ میلی لیتر محلول برادفورد مخلوط شد. پس از ورتکس لوله‌ها و ماندن در دمای آزمایشگاه به مدت ۵ دقیقه، جذب مخلوط واکنش در دستگاه اسپکتروفتومتر (کمپانی Cecil، مدل ۹۰۰۰) و در طول موج ۵۹۵ نانومتر سنجیده شد. سپس میزان پروتئین نمونه‌ها با استفاده از نمودار استاندارد بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر نمونه‌ها به دست آمد. میزان پروتئین محلول آگار با سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin (BSA)) به عنوان استاندارد مقایسه شد. سدیم کلراید ۰/۱۵ مولار نیز به عنوان بلانک استفاده شد. جهت رسم نمودار استاندارد، ابتدا با استفاده از محلول ۰/۱۵ مولار سدیم کلراید، محلول ۰/۵ مولار سرم آلبومین گاوی در غلظت‌های ۰/۰۳۱، ۰/۰۶۲، ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد، سپس آزمایش مانند روش بیان شده در بالا انجام شد.

آماده‌سازی بیوپلیمر

ساخت فیلم‌های زیستی آگار/گلیسرول طبق روش قالب‌گیری با اندکی تغییر انجام شد. برای بهینه‌سازی نسبت آگار استخراجی و

$$\text{Water solubility} = \left(\frac{w_1 - w_2}{w_1} \right) \times 100 \quad (4)$$

که در آن w_1 وزن خشک فیلم‌های زیستی و w_2 وزن نهایی فیلم‌های زیستی است.

آزمون کشش

خواص مکانیکی فیلم‌های زیستی بر اساس استاندارد ASTM D 882 با استفاده از دستگاه تست جهانی Tinius Olsen H50 KT با اعمال یک سلول بارگذاری ۵۰۰ نیوتن با سرعت ۵ میلی‌متر در دقیقه اندازه‌گیری شد. هر نمونه (۳ cm × ۱۰ cm) به صورت عمودی در بین دو فک دستگاه قرار گرفت. فاصله اولیه دو فک دستگاه روی ۵۰ میلی‌متر و سرعت حرکت گیره در ۵۰ میلی‌متر در دقیقه تنظیم شد. ضخامت نمونه با استفاده از میکرومتر الکترونیکی با دقت ۱ میکرومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر متوسط خواص مکانیکی استحکام (مگاپاسکال)، درصد انعطاف‌پذیری، مدول الاستیک (مگاپاسکال) و چقرمگی (ژول) از نتایج ۶ آزمایش محاسبه و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد.

طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس

از طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس جهت بررسی بیوپلیمرهای ساخته شده استفاده شد. این آزمون برای هر ۴ نمونه لایه نازک بیوپلیمر با ابعاد ۲ cm × ۲ cm، توسط دستگاه XRD مدل X'pert شرکت Philips ساخت کشور هلند انجام شد. الگوی پراش پرتو ایکس با وضوح بالا در 2θ در ۳ Kw با استفاده از طیف گسیل شده با طول موج ۱/۵۸ آنگستروم در ۴۰ kV و ۴۰ mA اندازه‌گیری شد و در محدوده $5^\circ - 80^\circ$ برای فیلم‌های زیستی ثبت گردید.

طیف‌سنجی بازتاب کلی ضعیف شده مادون قرمز تبدیل فوری

برای شناسایی ساختار شیمیایی بیوپلیمرها ساخته شده از طیف‌سنجی بازتاب کلی ضعیف شده مادون قرمز تبدیل فوری استفاده شد. برای این منظور از دستگاه ATR-FTIR مدل ALPHA-E همراه با Zn-Se ATR شرکت Bruker ساخت کشور آلمان استفاده شد. بیوپلیمرهای تهیه شده در محدوده طول موج $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ اندازه‌گیری شد.

آزمون پایداری میوه و سبزیجات

بیوپلیمرهای ساخته شده برای آزمایش افزایش ماندگاری توت فرنگی مورد مطالعه قرار گرفت. توت فرنگی با اندازه، شکل، بلوغ و رنگ تقریباً مشابه از بازار محلی خریداری شد و با هر نمونه فیلم

نرم‌کننده گلیسرول، ۲/۵ گرم پودر آگار استخراجی با ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد (وزنی-وزنی) گلیسرول مخلوط شد. در ابتدا، پودر آگار خشک (۲/۵ گرم) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۹۰ درجه سانتی‌گراد با هم زدن به‌طور مداوم در دور بالا با استفاده از دستگاه هیتر همزن مغناطیسی (کمپانی IKA آلمان، مدل RH Basic 2) مخلوط شد، تا محلول شفاف شود. سپس گلیسرول به میزان ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد (وزنی-وزنی) نسبت به وزن خشک آگار قطره قطره به محلول آگار اضافه شد و به مدت زمان ۲ ساعت به‌طور مداوم هم‌زده شد. بعد از رسیدن دمای محلول به ۶۰ درجه سانتی‌گراد در ظروف بزرگ پتری‌دیش ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه خشک شد (Kumar et al., 2019). طبق آنالیز خواص مکانیکی و تعیین بهینه‌ترین میزان نرم‌کننده گلیسرول، در مرحله بعد برای ساخت بیوپلیمر آگار/گلیسرول/PVA، ۲۵ درصد (وزنی-وزنی) پلی‌وینیل الکل (PVA) به محلول بهینه ۲/۵ گرم پودر آگار استخراجی و گلیسرول اضافه شد (Madera-Santana et al., 2014).

ارزیابی خواص بیوپلیمرها

درجه تورم

برای تعیین درجه تورم هر کدام از بیوپلیمرها، ابتدا هر کدام از بیوپلیمرها به طور تصادفی در سه تکرار در ابعاد ۵ cm × ۵ cm برش داده شد و پس از تعیین وزن اولیه (w_1)، به مدت ۴۵ دقیقه در آب مقطر غوطه‌ور شد. در مرحله بعد بیوپلیمرها از آب خارج شدند و پس از خشک کردن آب سطحی، وزن ثانویه (w_2) تعیین شد (Shankar & Rhim, 2017). درجه تورم هر کدام از فیلم‌ها مطابق فرمول ۳ محاسبه شد:

$$\text{Swelling ratio} = \left(\frac{w_2 - w_1}{w_1} \right) \times 100 \quad (3)$$

که در آن w_1 وزن خشک فیلم‌های زیستی و w_2 وزن نهایی فیلم‌های زیستی است.

حلالیت در آب

جهت تعیین میزان حلالیت در آب بیوپلیمرها، ابتدا فیلم‌ها در سه تکرار در ابعاد ۳ cm × ۳ cm برش داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شد و سپس وزن اولیه (w_1) تعیین شد. هر بیوپلیمر در بشرهای جداگانه در حجم ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. در مرحله بعد، بیوپلیمرها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شد و سپس وزن ثانویه (w_2) محاسبه شد (Shankar & Rhim, 2017). درصد حلالیت هر کدام از بیوپلیمرها در آب طبق فرمول ۴ محاسبه شد:

قدرت ژل می‌شود. از سوی دیگر، آگار در طی تیمار قلیایی تحت تخریب و انتشار به سمت محیط آبی قرار می‌گیرد، بنابراین به طور قابل توجهی بازده استخراج را کاهش می‌دهد (Kumar & Fotedar, 2009; Sasuga et al., 2017; Martínez-Sanz et al., 2019). به علاوه مطالعات مشابه نشان داده است که استخراج آگار با یک مرحله پیش تیمار با سدیم هیدروکسید، باعث حداکثر میزان خلوص ژل آگار استخراجی با حداقل میزان ترکیبات فنولی و پروتئین خواهد شد و در نهایت استحکام کششی ژل استخراجی را بهبود می‌بخشد (Ganesan et al., 2018; Martínez-Sanz et al., 2019).

ارزیابی خواص بیوپلیمرها

درجه تورم و حلالیت در آب فیلم‌های زیستی

نتایج درجه تورم و درصد حلالیت بیوپلیمرها به ترتیب در شکل ۲ و شکل ۳ قابل مشاهده است. طبق نتایج به دست آمده (شکل ۲)، میزان درجه تورم آگار خالص $3/25 \pm 318$ است و درجه تورم PVA خالص، به دلیل حلالیت در آب بالا، صفر گزارش شد. افزودن گلیسرول به بیوپلیمر آگار، طبق انتظار باعث کاهش درجه تورم فیلم‌های زیستی تا $4/95 \pm 138$ درصد شد. افزودن پلیمر PVA تاثیر چندانی بر میزان درجه تورم فیلم زیستی مبتنی بر آگار نداشت. نتایج جذب آب کامپوزیت‌های زیستی آگار خالص، PVA خالص، آگار/گلیسرول و آگار/گلیسرول/PVA (شکل ۳) قابل مشاهده است. در مقابل، فیلم‌های زیستی آگار خالص و PVA خالص به ترتیب دارای کمترین و بیشترین میزان جذب آب است. افزودن گلیسرول به بیوپلیمر آگار باعث افزایش ۸۲ درصدی میزان جذب آب فیلم‌های کامپوزیتی شد. اما زمانی که PVA به بیوپلیمر آگار/گلیسرول افزوده شد، درصد حلالیت بیوپلیمر به $2/3 \pm 8/2$ درصد کاهش یافت. شبکه‌های قوی زنجیره‌های آگار از متلاشی شدن ماتریس فیلم در آب جلوگیری می‌کند و منجر به افزایش مقاومت در برابر نفوذ آب، یعنی افزایش درجه تورم و کاهش حلالیت در آب می‌شود (Wongphan & Harnkarnsujarit, 2020). بر این اساس، بر خلاف پلیمر PVA، فضاهای بین زنجیره‌های آگار خالص، بدون فروپاشی ساختاری آن‌ها، به‌طور چشمگیری با افزایش طول زنجیره‌های پلیمر آگار در تماس مستقیم با آب گسترش می‌یابد، که اجازه می‌دهد مقدار زیادی آب را حفظ کند (Lee et al., 2021; Samadi et al., 2018). افزودن گلیسرول به بیوپلیمر آگار، به دلیل اینکه گلیسرول کوچک مولکول بین زنجیره‌های پلیمری آگار نفوذ می‌کند و باعث تسهیل در باز شدن گره خوردگی‌های بین زنجیره‌ای آگار می‌شود، علاوه بر افزایش انعطاف‌پذیری، منجر به افزایش حلالیت در آب و کاهش درجه تورم فیلم‌های زیستی آگار/گلیسرول می‌شود.

کامپوزیت زیستی ۳ تکرار توت فرنگی پیچیده شد. توت فرنگی‌ها با ۳ تکرار بدون پوشش و به عنوان شاهد با فیلم پلاستیکی (پلی اتیلن) نگهداری شد. نمونه‌های بسته‌بندی شده برای شبیه‌سازی شرایط، در شرایط محیطی (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد که در آن توسط فروشندگان و خرده‌فروشان محلی نگهداری می‌شوند و میوه‌های بسته‌بندی شده به طور مرتب تا ۵ روز ارزیابی شد (Kumar et al., 2019).

آنالیز آماری

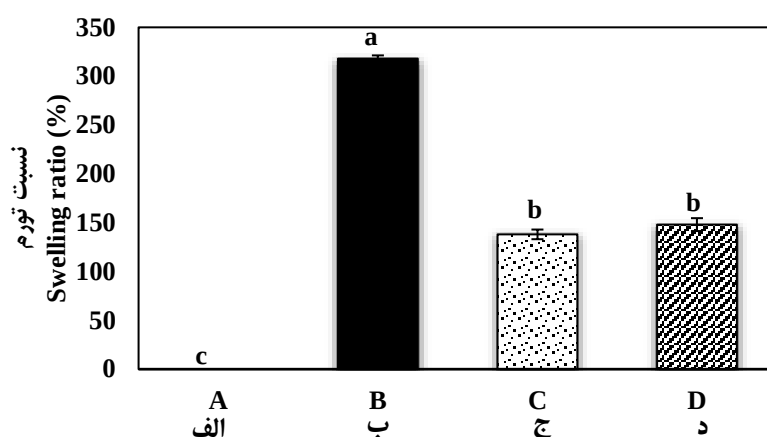
در این پژوهش تمامی آزمون‌های زیستی و غیرزیستی با سه بار تکرار انجام شد. تحلیل آماری نتایج با نرم افزار SPSS و Excel 2019 (V26.0; IBM Corp., USA) انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزارهای Excel 2019 و Origin pro 2019 رسم و نتایج به وسیله آزمون ANOVA با مقدار معنی داری p کمتر از ۰/۰۵ ارزیابی و میانگین نتایج به همراه انحراف معیار ($\pm SD$) گزارش شد.

نتایج و بحث

بهینه‌سازی استخراج آگار و سنجش ترکیبات محلول آگار استخراج شده

بازده استخراج ۱۵٪ برای روش پیش‌تیمار سدیم هیدروکسید/گرمادهی بدست آمد. نتایج سنجش میزان کل ترکیبات فنلی محلول آگار استخراج شده به روش پیش‌تیمار سدیم هیدروکسید/گرمادهی نشان داد که میزان ترکیبات فنولی محلول آگار $0/004 \pm 0/077$ بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک/گرم آگار است. نتایج حاصل از سنجش میزان پروتئین محلول آگار استخراج شده به روش برادفورد نشان داد که محلول آگار حاوی $0/019 \pm 0/040$ پروتئین بر حسب میلی‌گرم/میلی‌لیتر آگار است.

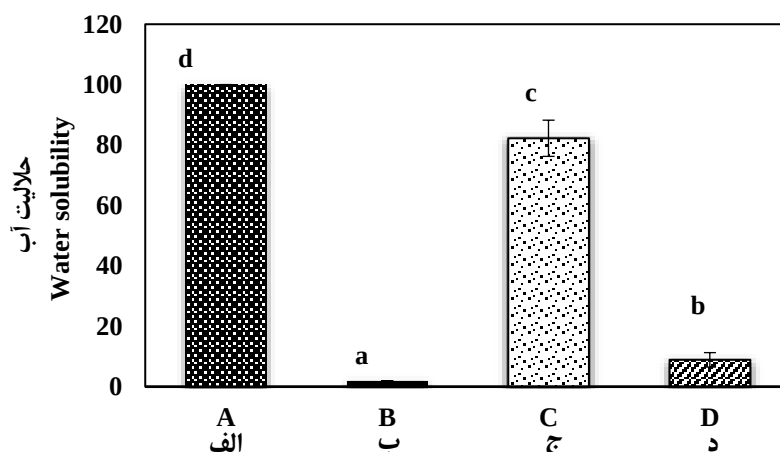
مقایسه بازده استخراج با مقادیری که قبلاً در مقالات گزارش شده است به دلیل ۱- تنوع زیاد در پارامترهای استخراج مانند زمان استخراج، دمای استخراج و نسبت آب به جلبک دریایی گزارش شده در مقالات (Kumar & Fotedar, 2009; Mensi, 2019; Sousa et al., 2010; Sudhakar et al., 2021) و ۲- تنوع در محتوای آگار در گونه‌های مختلف جلبک دریایی مورد استفاده، بسیار پیچیده است (Sasuga et al., 2017). یک واقعیت که به طور مداوم در مقالات متعددی گزارش شده است این است که پیش‌تیمار قلیایی منجر به کاهش قابل توجه بازده استخراج می‌شود. پیش‌تیمار قلیایی به دلیل تبدیل L-گالاکتوز-۶-سولفات (L-Galactose-6-sulphate) به ۳-۶-انهدیرو-L-گالاکتوز (3,6-anhydro-L-galactose) شناخته شده است، بنابراین توانایی ژل‌سازی آگار را بهبود می‌بخشد و منجر به افزایش



شکل ۲- درجه تورم کامپوزیت‌های زیستی (الف) پلی وینیل الکل، (ب) آگار، (ج) آگار/گلیسرول و (د) آگار/گلیسرول/پلی وینیل الکل هر کدام از داده‌ها ذکر شده میانگین سه تکرار با $\pm$ انحراف معیار است.

Fig. 2. Swelling ratio of (a) PVA, (b) agar, (c) agar/glycerol and (d) agar/glycerol/PVA bio composites

Each of the mentioned data is the average of three replicates with $\pm$ standard deviation



شکل ۳- حلالیت در آب کامپوزیت‌های زیستی (الف) پلی وینیل الکل، (ب) آگار، (ج) آگار/گلیسرول و (د) آگار/گلیسرول/پلی وینیل الکل هر کدام از داده‌ها ذکر شده میانگین سه تکرار با $\pm$ انحراف معیار است.

Fig. 3. Water solubility of (a) PVA, (b) agar, (c) agar/glycerol and (d) agar/glycerol/PVA biocomposites

Each of the mentioned data is the average of three replicates with $\pm$ standard deviation.

خواص مکانیکی فیلم‌های زیستی

ارزیابی خواص مکانیکی بیوکامپوزیت‌های برای کاربرد در صنایع بسته‌بندی مواد غذایی حائز اهمیت است. اثر غلظت گلیسرول بر استحکام کششی، انعطاف‌پذیری و مدول الاستیک بیوپلیمر آگار/گلیسرول و همچنین خواص مکانیکی بیوکامپوزیت‌های آگار خالص، PVA خالص و آگار/گلیسرول (۳۰٪) PVA طبق نتایج به‌دست آمده در جدول ۱ قابل مشاهده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که افزودن گلیسرول به بیوپلیمر آگار، به دلیل اینکه گلیسرول کوچک مولکول می‌باشد بین زنجیره پلیمری آگار نفوذ کرده و بعنوان یک نرم‌کننده تحرک زنجیره‌های پلیمری آگار را افزایش داده

و با کاهش میزان گره‌خوردگی بین زنجیره‌های آگار بطور نسبی باعث کاهش مدول الاستیک (سفتی) و استحکام و در مقابل باعث افزایش درصد کرنش در شکست (انعطاف‌پذیری) شده‌است. این یافته نشان می‌دهد که فیلم‌های آگار با افزایش گلیسرول نرم‌تر و انعطاف‌پذیرتر شدند (Madera-Santana et al., 2014). با توجه به اینکه در بیوپلیمر آگار حاوی ۳۰٪ وزنی گلیسرول انعطاف‌پذیری بطور قابل ملاحظه‌ای بهبود یافته و در عین حال افت سفتی و استحکام قابل توجه نیست، نمونه حاوی ۳۰٪ وزنی گلیسرول به‌عنوان نمونه بهینه در نظر گرفته می‌شود. همانطور که در جدول ۱ دیده می‌شود، افزودن PVA به فیلم زیستی آگار/گلیسرول (۳۰٪) باعث افزایش استحکام از حدود $9/2 \pm$

امتزاج‌پذیری PVA با آگار به دلیل ساختار شیمیایی متفاوت، ارتباط دارد. در نتیجه فصل مشترک به نسبت ضعیف تشکیل شده بین این دو جز در کامپوزیت، باعث کاهش مدول الاستیک (سفتی) می‌شود. کرنش در شکست آگار/گلیسرول حدود ۵٪ می‌باشد که در نمونه کامپوزیتی به حدود ۲/۵ درصد کاهش می‌یابد. کاهش نسبی انعطاف‌پذیری نمونه کامپوزیتی به انعطاف‌پذیری پایین جز PVA (کرنش در شکست برابر با ۲/۱٪) در مقایسه با انعطاف‌پذیری آگار/گلیسرول ارتباط دارد.

۳۵/۴۲ مگاپاسکال به $41/36 \pm 5/53$ مگاپاسکال می‌شود. با توجه به اینکه استحکام کششی PVA از آگار بیش‌تر است، افزایش استحکام در کامپوزیت به جایگزینی آگار (بخشی از آن) با PVA و همچنین برقراری پیوند هیدروژنی بین مولکول آگار و PVA مرتبط هست (Lee *et al.*, 2021). کاهش مدول کششی (سفتی) نمونه آگار/گلیسرول از $1/39 \pm 0/49$ مگاپاسکال به $0/36 \pm 0/01$ مگاپاسکال با افزودن PVA علی‌رغم بالاتر بودن سفتی PVA خالص از آگار/گلیسرول، به عدم

جدول ۱- ضخامت و خواص مکانیکی آزمون کشش کامپوزیت‌های زیستی ساخته شده: پلی‌وینیل الکل، آگار، آگار/گلیسرول و آگار/گلیسرول/پلی وینیل الکل

Table 1- Thickness and mechanical properties of tensile test of bio composites made: PVA, agar, agar/glycerol and agar/glycerol/PVA

Sample نمونه	Elastic modulus (GPa) $\times 10^{-3}$ مدول الاستیک	Elongation at break (%) انعطاف‌پذیری	Tensile strength (MPa) استحکام	Thickness (mm) ضخامت
پلی‌وینیل الکل خالص Pure PVA	2.30 ± 0.12	2.1 ± 0.03	48.46 ± 0.05	0.10
آگار خالص Pure agar	7.87 ± 0.15	1.48 ± 0.02	32.46 ± 0.02	0.025
آگار/گلیسرول ۱۰ درصد Agar/ glycerol (10%)	1.00 ± 0.20	3.32 ± 1.48	22.93 ± 3.78	0.040
آگار/گلیسرول ۲۰ درصد Agar/glycerol (20%)	0.41 ± 0.04	3.96 ± 1.22	16.21 ± 3.22	0.035
آگار/گلیسرول ۳۰ درصد Agar/glycerol (30%)	1.39 ± 0.46	12.97 ± 3.81	35.42 ± 9.2	0.035
آگار/گلیسرول ۴۰ درصد Agar/ glyceol (40%)	0.07 ± 0.02	19.17 ± 3.61	9.33 ± 2.76	0.030
آگار/گلیسرول ۳۰ درصد/ پلی‌وینیل الکل Agar/ glycerol (30%)/PVA	0.36 ± 0.01	2.49 ± 0.34	41.36 ± 5.53	0.032

* داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند.

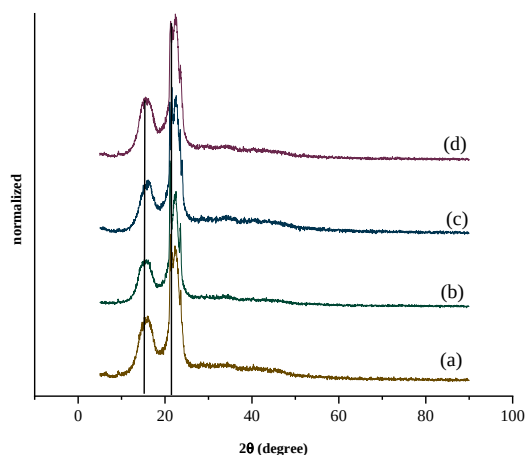
* The data shown are the standard deviation $\pm$ mean.

طیف‌سنجی بازتاب کلی ضعیف شده مادون قرمز تبدیل فوریه

بیوکامپوزیت‌های PVA، آگار، آگار/گلیسرول و آگار/گلیسرول/ PVA توسط آزمون طیف‌سنجی بازتاب کلی ضعیف شده مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۵). طیف مربوط به فیلم PVA، نوارهای معمولی را برای پلیمر مصنوعی پلی‌وینیل الکل با باند جذب گسترده بین $3600 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ ، در محدوده‌های $1660 - 1650 \text{ cm}^{-1}$ و 1090 cm^{-1} نشان می‌دهد (Madera-Santana *et al.*, 2014).

طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس

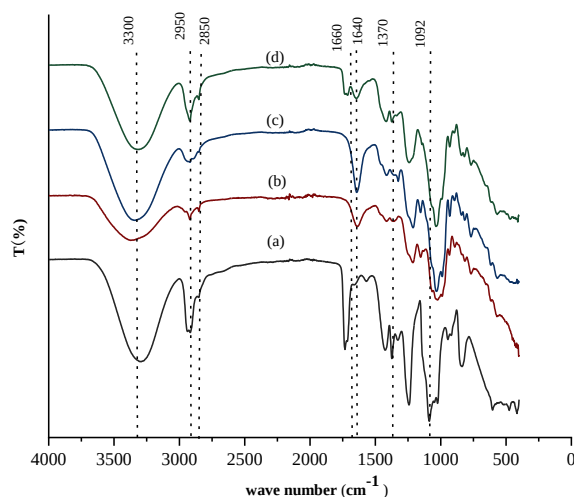
نتایج آنالیز و تشخیص فاز کامپوزیت‌های زیستی بر پایه پلیمر آگار استخراجی (شکل ۴) نشان داده شده است. براساس الگوی طیفی پراش پرتوی ایکس، زاویه پراش 2θ در $20/5^\circ$ به صفحه (۱۰۱) با تداخل بین مولکولی در بین زنجیره‌های PVA مرتبط است و اطلاعات مفیدی در مورد ویژگی پیوندهای هیدروژنی ارائه می‌دهد. همچنین زاویه پراش 2θ در $14/9^\circ$ و 20° نیز مشخص‌کننده فاز پلیمر پایه آگار است، که برای همه نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شده است. ضمناً قابل ذکر می‌باشد که با توجه به عدم تغییر زاویه و شدت پیک‌ها PVA در نتایج XRD به واسطه افزودن گلیسرول و یا آگار بنظر می‌رسد تغییری در ساختار بلورهای PVA صورت نگرفته است.



شکل ۴- مقایسه الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به (الف) پلی وینیل الکل، (ب) آگار، (ج) آگار/ گلیسرول و (د) آگار/ گلیسرول/ پلی وینیل الکل
Fig. 4. Comparison of X-ray diffraction (XRD) patterns of (a) PVA, (b) agar, (c) agar/glycerol and (d) agar/ glycerol/ PVA

(Rhim, 2017). رفتار مشابهی در گستره 1370 cm^{-1} مشاهده می شود که به استر سولفات مرتبط است (Madera-Santana *et al.*, 2014). همچنین پیک در گستره $2850\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ به گروه متوکسیل مرتبط است که با افزودن آگار تغییرات قابل توجهی نشان داد (Madera-Santana *et al.*, 2014). افزایش شدت پیک با افزودن گلیسرول در گستره 3300 cm^{-1} ، به رفتار آب دوستی گلیسرول و تشکیل پیوندهای هیدروژنی ارتعاشی تک پل در تعامل با ساختار آگار و PVA نسبت داده می شود (Madera-Santana *et al.*, 2014).

پیک در گستره 3300 cm^{-1} به ارتعاشات گروه هیدروکسیل (O-H)، در گستره 1092 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه کربونیل (C=O) و پیک در گستره 1660 cm^{-1} می توان به ارتعاشات مرتبط به اسکلت بنزن نسبت داد (Nguyen *et al.*, 2021; Orsuwan *et al.*, 2016; Shankar & Rhim, 2017). در طیف فیلم زیستی آگار خالص یک پیک فشرده در گستره 1640 cm^{-1} مشاهده شد که مربوط به کشش پیوند پپتیدی مزدوج تشکیل شده توسط گروه آمین (NH) و گروه کربونیل (C=O) است که با افزودن PVA کاهش می یابد (Madera-Santana *et al.*, 2014; Orsuwan *et al.*, 2016; Shankar &

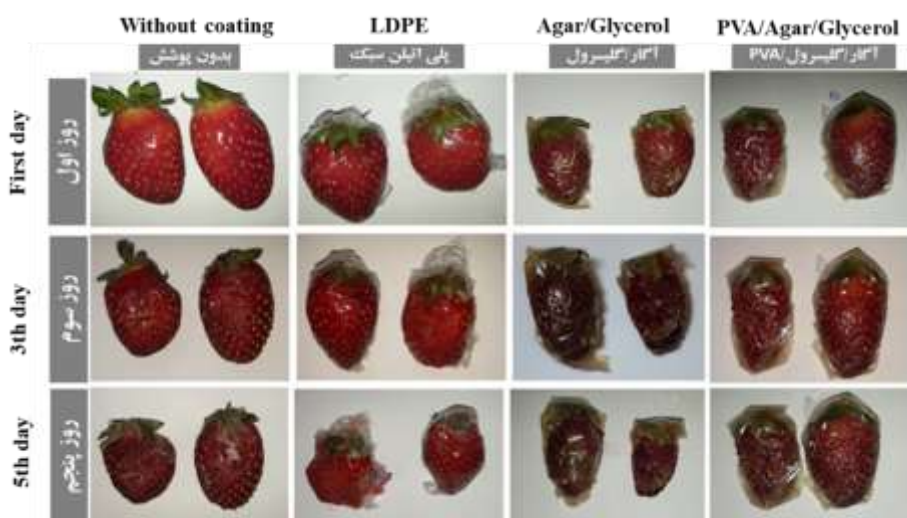


شکل ۵- طیف سنجی بازتاب کلی ضعیف شده مادون قرمز تبدیل فوریه کامپوزیت زیستی (الف) PVA، (ب) آگار، (ج) آگار/ گلیسرول و (د) آگار/ گلیسرول/ PVA
Fig. 5. FTIR spectrum of bio composite (a) PVA, (b) agar, (c) agar/glycerol and (d) agar/glycerol/PVA

آزمون پایداری میوه

سوم، توت فرنگی بدون پوشش و دارای پوشش پلی اتیلن دچار از دست دادن طراوت و تغییر رنگ شدند. همچنین توت فرنگی با پوشش کامپوزیتی آگار/گلیسرول در روز سوم مستعد پوسیدگی بود. در روز پنجم، توت فرنگی بدون پوشش، با پوشش پلی اتیلن و دارای پوشش کامپوزیت زیستی آگار/گلیسرول دچار پوسیدگی و کپک زدگی شدند. همچنین توت فرنگی با پوشش کامپوزیت زیستی آگار/گلیسرول/PVA، اندکی دچار از دست دادن تازگی و طراوت و تیرگی شد. بررسی ها کاربرد کامپوزیت زیستی بر پایه آگار را برای نگهداری میوه را به مدت یک هفته تایید می کند.

در این آزمون، توت فرنگی با کامپوزیت های زیستی آگار/گلیسرول و آگار/گلیسرول/PVA با ۳ تکرار پوشانده شد (شکل ۶). همچنین به منظور مقایسه اثر کامپوزیت های زیستی ساخته شده بر پایه آگار در نگهداری میوه، با پلی اتیلن بازاری نیز پوشانده شد. خصوصیات ظاهری توت فرنگی در روزهای ۱، ۳ و ۵ با پوشش کامپوزیت زیستی، پلی اتیلن و بدون پوشش به صورت بصری بررسی شد (Kumar et al., 2019). همان طور که در شکل ۶ قابل مشاهده است، همه توت فرنگی ها در روز اول کاملاً سالم و دارای رنگ طبیعی است. با گذشت زمان تا روز



شکل ۶- کاربرد بیوکامپوزیت های آگار/گلیسرول و آگار/گلیسرول/ پلی وینیل الکل در بسته بندی و خواص ظاهری توت فرنگی (*Fragaria ananassa*) در مدت زمان ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد

Fig. 6. Application of agar/glycerol and agar/glycerol/PVA biocomposites in packaging and appearance properties of strawberry (*Fragaria ananassa*) and broccoli (*Brassica oleracea*) during 5-10 days at 25°C

نتیجه گیری

پلیمر صنعتی پلی وینیل الکل، جهت تقویت خواص مکانیکی و فیزیکی کامپوزیت های زیستی استفاده شد. افزودن پلیمر PVA باعث افزایش در میزان استحکام کششی و بهبود خواص فیزیکی نظیر افزایش درجه تورم، کاهش درصد حلالیت در آب فیلم های زیستی بر پایه آگار شد. همچنین نتایج استفاده از این پوشش ها جهت بسته بندی میوه و سبزیجات در مناطق گرمسیری با افزایش طول عمر مفید آن ها به مدت حداقل تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تایید می کند. علاوه بر این، استفاده از بسته بندی جدید بر پایه ی پلیمر های طبیعی، کم هزینه و در دسترس است، پتانسیل زیادی در حفظ محصولات کشاورزی پس از برداشت، ارائه و از مشکل توزیع و ذخیره سازی کالاهای گرمسیری جلوگیری می کنند و همچنین باعث کاهش استفاده از بسته بندی های مصنوعی می شود، که در حال حاضر مشکل شدید آلودگی محیط زیستی، ایجاد کرده اند.

هدف مطالعه حاضر، ساخت پلاستیک زیستی بر پایه پلیمر آگار استخراج شده از ماکرو جلبک قرمز گونه *Acanthophora* sp. و بهینه سازی خواص مکانیکی، فیزیکی و زیستی کامپوزیت های زیستی بر پایه پلیمر آگار، با افزودن گلیسرول (به عنوان نرم کننده) و پلیمر صنعتی زیست تخریب پذیر پلی وینیل الکل است. استخراج آگار از ماکرو جلبک قرمز *Acanthophora* با استفاده از روش استخراج گرمادهی و یک مرحله پیش تیمار سدیم هیدروکسید، محلول آگار به دست آمده عمدتاً از آگار خالص تشکیل شده که دارای میزان ترکیبات فنلی و پروتئین کم است و محلول شفاف تقریباً بی رنگ بدست آمد. خلوص بیش تر محلول آگار منجر به افزایش استحکام ژل استخراجی شد که برای استفاده در صنایع بسته بندی بهینه است. در ادامه برای ساخت فیلم های زیستی مناسب بر پایه پلیمر آگار، از گلیسرول به عنوان نرم کننده و

این پژوهش توسط بنیاد ملی نخبگان (دوره پنجم طرح احمدی روشن)، وزارت علوم و تحقیقات و همچنین مرکز رشد دانشگاه هرمزگان مورد حمایت بوده است.

منابع

1. Abdullah, A.H.D., Fikriyyah, A.K., Putri, O.D., & Asri, P.P.P. (2019). *Fabrication and characterization of poly lactic acid (PLA)-starch based bioplastic composites*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2023.108000>
2. Arham, R., Salengke, S., Metusalach, M., & Mulyati, M. (2018). Optimization of agar and glycerol concentration in the manufacture of edible film. *International Food Research Journal*, 25(5), 1845-1851.
3. Basumatary, K., Daimary, P., Das, S.K., Thapa, M., Singh, M., Mukherjee, A. & Kumar, S. (2018). Lagerstroemia speciosa fruit-mediated synthesis of silver nanoparticles and its application as filler in agar based nanocomposite films for antimicrobial food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 17, 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.06.003>
4. da Rocha, M., de Souza, M.M., & Prentice, C. (2018). *Biodegradable films: An alternative food packaging* [Interview]. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00009-9>
5. Fakhouri, F.M., Costa, D., Yamashita, F., Martelli, S.M., Jesus, R.C., Alganer, K., Collares-Queiroz, F.P., & Innocentini-Mei, L.H. (2013). Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. *Carbohydrate Polymers*, 95(2), 681-689. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.027>
6. Fakhouri, F.M., Martelli, S.M., Bertan, L.C., Yamashita, F., Mei, L.H.I., & Queiroz, F.P.C. (2012). Edible films made from blends of manioc starch and gelatin-Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. *LWT*, 49(1), 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.017>
7. Ganesan, A.R., Shanmugam, M., Palaniappan, S., & Rajauria, G. (2018). Development of edible film from *Acanthophora spicifera*: Structural, rheological and functional properties. *Food Bioscience*, 23, 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.009>
8. Haghighi, H., Gullo, M., La China, S., Pfeifer, F., Siesler, H.W., Licciardello, F., & Pulvirenti, A. (2021). Characterization of bio-nanocomposite films based on gelatin/polyvinyl alcohol blend reinforced with bacterial cellulose nanowhiskers for food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 113, 106454. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106454>
9. Hasan, M., & Rahmayani, R.F.I., (2018). *Bioplastic from chitosan and yellow pumpkin starch with castor oil as plasticizer*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, (Vol. 333,p, 012087). IOP Publishing.
10. Hernández, V., Ibarra, D., Triana, J.F., Martínez-Soto, B., Faúndez, M., Vasco, D.A., Gordillo, L., Herrera, F., García-Herrera, C., & Garmulewicz, A. (2022). Agar biopolymer films for biodegradable packaging: A reference dataset for exploring the limits of mechanical performance. *Materials*, 15(11), 3954. <https://doi.org/10.3390/ma15113954>
11. Hii, S.-L., Lim, J.-Y., Ong, W.-T., & Wong, C.-L. (2016). Agar from Malaysian red seaweed as potential material for synthesis of bioplastic film. *Journal of Engineering Science and Technology*, 11, 1-15.
12. Hong, S.-I., Cho, Y., & Rhim, J.-W. (2021). Effect of agar/AgNP composite film packaging on refrigerated beef loin quality. *Membranes*, 11(10), 750. <https://doi.org/10.3390/membranes11100750>
13. Kumar, S., Boro, J.C., Ray, D., Mukherjee, A., & Dutta, J. (2019). Bionanocomposite films of agar incorporated with ZnO nanoparticles as an active packaging material for shelf life extension of green grape. *Heliyon*, 5(6), e01867. <https://doi.org/10.1016%2Fj.heliyon.2019.e01867>
14. Kumar, S., Shukla, A., Baul, P.P., Mitra, A., & Halder, D. (2018). Biodegradable hybrid nanocomposites of chitosan/gelatin and silver nanoparticles for active food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.008>
15. Kumar, V., & Fotedar, R. (2009). Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar, & Kraft, 1994). *Carbohydrate Polymers*, 78, 813-819. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.001>
16. Lee, J.-S., Choi, I., & Han, J. (2021). Mathematical modeling of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark oil release from agar/PVA biocomposite film for antimicrobial food packaging: The effects of temperature and relative humidity. *Food Chemistry*, 130306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130306>
17. Madera-Santana, T., Freile-Pelegrín, Y., & Azamar-Barrios, J. (2014). Physicochemical and morphological properties of plasticized poly (vinyl alcohol)-agar biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.044>

18. Madera-Santana, T.J., Robledo, D., & Freile-Pelegrín, Y. (2011). Physicochemical properties of biodegradable polyvinyl alcohol–agar films from the red algae *Hydropuntia cornea*. *Marine Biotechnology*, 13(4), 793-800. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.158>
19. Madera- Santana, T., Misra, M., Drzal, L., Robledo, D., & Freile- Pelegrin, Y. (2009). Preparation and characterization of biodegradable agar/poly (butylene adipate- co- terephthalate) composites. *Polymer Engineering & Science*, 49(6), 1117-1126 .<https://doi.org/10.1002/pen.21389>
20. Marichelvam, M.K., Jawaid, M., & Asim, M. (2019). Corn and rice starch-based bio-plastics as alternative packaging materials. *Fibers*, 7(4), 32 . <https://doi.org/10.3390/fib7040032>
21. Marichelvam, M., Manimaran, P., Sanjay, M., Siengchin, S., Geetha, M., Kandakodeeswaran, K., Boonyasopon, P., & Gorbatyuk, S. (2022). Extraction and development of starch-based bioplastics from *Prosopis juliflora* Plant: Eco-friendly and sustainability aspects. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 100296 . <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100296>
22. Martínez-Sanz, M., Gómez-Mascaraque, L.G., Ballester, A.R., Martínez-Abad, A., Brodtkorb, A., & López-Rubio, A. (2019). Production of unpurified agar-based extracts from red seaweed *Gelidium sesquipedale* by means of simplified extraction protocols. *Algal Research*, 38, 101420. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101420>
23. Mathew, S., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. (2019). Polyvinyl alcohol/silver nanocomposite films fabricated under the influence of solar radiation as effective antimicrobial food packaging material. *Journal of Polymer Research*, 26(9), 1-10 . <https://doi.org/10.1007/s10965-019-1888-0>
24. Mensi, F. (2019). Agar yield from R-phycoerythrin extraction by-product of the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 741-75 <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1533-z> .
25. Nguyen, T.T., Nguyen, T.-T.H., Pham, B.-T.T., Van Tran, T., Bach, L.G., Thi, P.Q.B., & Thuc, C.H. (2021). Development of poly (vinyl alcohol)/agar/maltodextrin coating containing silver nanoparticles for banana (*Musa acuminata*) preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 29, 100740. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100740>
26. Orsuwan, A., Shankar, S., Wang, L.-F., Sothornvit, R., & Rhim, J.-W. (2016). Preparation of antimicrobial agar/banana powder blend films reinforced with silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 60, 476-485. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.017>
27. Rhim, J.-W. (2011). Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 691-699. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.010>
28. Rhim, J., Wang, L., & Hong, S. (2013). Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 327-335. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.002>
29. Samadi, N., Sabzi, M., & Babaahmadi, M. (2018). Self-healing and tough hydrogels with physically cross-linked triple networks based on Agar/PVA/Graphene. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2291-2297. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.104>
30. Sasuga, K., Yamanashi, T., Nakayama, S., Ono, S., & Mikami, K. (2017). Optimization of yield and quality of agar polysaccharide isolated from the marine red macroalga *Pyropia yezoensis*. *Algal Research*, 26, 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.010>
31. Shankar, S., & Rhim, J.-W. (2017). Preparation and characterization of agar/lignin/silver nanoparticles composite films with ultraviolet light barrier and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 71, 76-84 . <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.002>
32. Shankar, S., Teng, X., & Rhim, J.-W. (2014). Properties and characterization of agar/CuNP bionanocomposite films prepared with different copper salts and reducing agents. *Carbohydrate Polymers*, 114, 484-492 . <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.036>
33. Soleimani, S., Yousefzadi, M., Nezhad, S.B.M., Pozharitskaya, O.N., & Shikov, A.N. (2022). Evaluation of fractions extracted from *Polycladia myrica*: biological activities, UVR protective effect, and stability of cream formulation based on it. *Journal of Applied Phycology*, 34(3), 1763-1777 . <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02705-2>
34. Sousa, A. M., Alves, V., Morais, S., Delerue-Matos, C., & Gonçalves, M.P. (2010). Agar extraction from integrated multitrophic aquacultured *Gracilaria vermiculophylla*: evaluation of a microwave-assisted process using response surface methodology. *Bioresource technology*, 101(9), 3258-3267. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.061>
35. Spierling, S., Knüpffer, E., Behnsen, H., Mudersbach, M., Krieg, H., Springer, S., Albrecht, S., Herrmann, C., & Endres, H.-J. (2018) Bio-based plastics-A review of environmental, social and economic impact assessments. *Journal of Cleaner Production*, 185, 476-491. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.014>
36. Sudhakar, M.P., Magesh Peter, D., & Dharani, G. (2021). Studies on the development and characterization of bioplastic film from the red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*). *Environmental Science and Pollution Research*, 28(26), 33899-33913. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10010-z>
37. Suryanegara, L., Fatriasari, W., Zulfiana, D., Anita, S.H., Masruchin, N., Gutari, S., & Kemala, T. (2021). Novel antimicrobial bioplastic based on PLA-chitosan by addition of TiO₂ and ZnO. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19(1), 415-425. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00614-z>

38. Susilawati, S., Rostini, I., Pratama, R.I., & Rochima, E. (2019). Characterization of bioplastic packaging from tapioca flour modified with the addition of chitosan and fish bone gelatin. *World Scientific News*, 135, 85-98.
39. Wongphan, P., & Harnkarnsujarit, N. (2020). Characterization of starch, agar and maltodextrin blends for controlled dissolution of edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 80-93. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.056>
40. Wulandari, D., Hermiyati, I., Iswahyuni, I., & Tawarniate, A.Z. (2022). Production and characterization of gelatin from rabbit bone as bioplastics material by acid pre-treatment. *World Rabbit Science*, 30(1): 83-93.
41. Yusoff, N.H., Pal, K., Narayanan, T., & de Souza, F.G. (2021). Recent trends on bioplastics synthesis and characterizations: Polylactic acid (PLA) incorporated with tapioca starch for packaging applications. *Journal of Molecular Structure*, 1232, 129954. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129954>



Cell Culture of *Spirulina* Microalgae (*Spirulina platensis*) and Comparison the Efficiency of Enzymatic, Ultrasound, Freeze-defrosting and Mineral Solvent Methods in Extraction of Phycocyanin Pigment

R. Safari^{1*}, S. Reyhani Poul²

1- Assistant Professor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education And Extension Organization, Sari, Iran

2- Ph.D. Graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

(*- Corresponding Author Email: Safari1351@gmail.com)

Received: 2022.09.17
Revised: 2022.12.09
Accepted: 2022.12.24
Available Online: 2023.01.02

How to cite this article:

Safari, R., & Reyhani Poul, S. (2023). Cell culture of spirulina microalgae (*Spirulina platensis*) and comparison the efficiency of enzymatic, ultrasound, freeze-defrosting and mineral solvent methods in extraction of phycocyanin pigment. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5), 649-661. (In Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78800.1204>

Introduction

Phycocyanin is one of the pigments used in the food industry due to its antioxidant and antibacterial as well as coloring properties. This pigment is commercially produced from *Spirulina platensis* microalgae, in the form of photoautotrophic cultures and in open environments in large ponds or pools in tropical or subtropical areas at the edges of oceans. Different techniques are used in order to extract phycocyanin from spirulina microalgae. Each technique has its own advantages and disadvantages besides different efficiency. These methods include freezing-defrosting, enzymatic, ultrasound, high hydrostatic pressure, ultracentrifuge, ultra homogenization, extraction using water and various solvents. Of course recently, the production of recombinant phycocyanin has been considered as a suitable option for the production of heterotrophic phycocyanin. The purpose of the current research was to cultivate *Spirulina platensis*, evaluation of the microalgae growth process, and comparison of the efficiency of different methods in the extraction of phycocyanin pigment.

Materials and Methods

The pure sample of *Spirulina platensis* microalgae was prepared from Algaeology Laboratory, Biology Department of Tarbiat Modares University. For the cultivation of spirulina, Zarrouk culture medium with different compositions was used, and after cultivation in smaller scales (100 and 500 ml), the final cultivation was carried out in volumes of 5 and 50 liters. After cultivating the microalgae and exposing them to fluorescent light with appropriate light lux intensity (3500 to 8000) and a period of 12 hours of darkness and 12 hours of light, the samples were placed at 29 °C for 16 days. In order to evaluate the growth process of the algal mass, the absorbance of the solution containing the algal cells was read at a wavelength of 540 nm. After preparing the dry mass of spirulina microalgae, four methods of ultrasound, freezing-defrosting, enzymatic and mineral solvent technique were used to extract phycocyanin. In the next steps, the efficiency of each method was evaluated by measuring the concentration and purity of phycocyanin. In addition, the effect of applying the purification process by ammonium sulfate on the concentration and purity of the extracted pigment was also evaluated. This research was conducted in a completely randomized design and SPSS and EXCEL softwares were used



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78800.1204>

for statistical analysis and drawing of diagram, respectively. Data were analyzed using one-way analysis of variance and the difference between the means was evaluated by Duncan's test at 95% confidence level.

Results and Discussion

The results showed that microalgae growth from day 0 to 14 had an upward trend and the resulting changes were significant at all times, except days 14 and 16 ($p < 0.05$). Also, after passing the short resting phase (2 days), the microalgae entered the logarithmic growth phase and continued to grow until the 14th day, but between the 14th and 16th days, the growth was almost constant. In the following, it was found that the mass produced after 16 days is 1120 mg/l. The concentration of phycocyanin extracted in enzymatic and ultrasound methods (1.815 and 1.786 mg/ml, respectively) had no significant difference ($p > 0.05$) and was at a higher level than the other two methods ($p < 0.05$); In addition, the pigment concentration was higher in the freezing-defrosting technique (1.535 mg/ml) than in the mineral solvent method (1.121 mg/ml). After purification of the pigment using ammonium sulfate, the pigment concentration and purity increased significantly in each method ($p < 0.05$). The results of this research showed that by choosing the optimal method and applying the purification process using ammonium sulfate, the extraction efficiency of phycocyanin from *Spirulina platensis* microalgae could be increased.

Conclusion

Based on the results of this research, the growth trend of *Spirulina platensis* in Zarrouk culture medium was ascending first and then constant (during 16 days). Ultrasound technique and enzymatic method (lysozyme enzyme) to extract phycocyanin pigment from *Spirulina platensis* microalgae have more efficiency than freezing-defrosting and inorganic solvent (hydrochloric acid) methods. Also, purification of the extracted pigment using 40% ammonium sulfate increases the concentration and purity of phycocyanin in each method.

Keywords: Enzymatic technique, Lysozyme enzyme, Phycocyanin extraction, *Spirulina* microalgae, Ultrasound method



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲، ص. ۶۶۱-۶۴۹

کشت سلولی میکروجلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) و مقایسه راندمان روش‌های آنزیمی، اولتراسوند، انجماد-انجمادزدایی و حلال معدنی در استخراج رنگدانه فیکوسیانیین

رضا صفری^{۱*} - سهیل ریحانی پول^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۳

چکیده

جهت استخراج رنگدانه‌ها از جلبک‌های دریایی از تکنیک‌های مختلفی استفاده می‌شود که هر تکنیک علاوه بر داشتن معایب و مزایایی، راندمان متفاوتی دارد. یکی از این رنگدانه‌ها، فیکوسیانیین است که از روش‌های مختلفی جهت استخراج آن استفاده می‌گردد. هدف پژوهش حاضر کشت میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و استخراج فیکوسیانیین از آن با استفاده از چهار روش اولتراسوند، انجماد-انجمادزدایی، آنزیمی و حلال معدنی بود. در مراحل بعد، میزان راندمان هر روش از طریق اندازه‌گیری غلظت و خلوص فیکوسیانیین ارزیابی شد. ضمن اینکه اثر اعمال فرایند خالص‌سازی با سولفات آمونیوم نیز بر غلظت و خلوص رنگدانه مستخرج مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد رشد میکروجلبک از زمان صفر تا ۱۴ روز، دارای روند صعودی و تغییرات حاصله نیز در تمامی زمان‌ها، بجز روزهای ۱۴ و ۱۶، معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$). همچنین جلبک بعد از سپری کردن فاز سکون کوتاه (۲ روز)، وارد مرحله رشد لگاریتمی شد و تا روز ۱۴ به رشد خود ادامه داد اما بین روزهای ۱۴ و ۱۶، رشد تقریباً روند ثابتی بخود گرفت. در ادامه مشخص شد که میزان توده تولیدشده پس از ۱۶ روز، ۱۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. غلظت فیکوسیانیین استخراج‌شده در روش‌های آنزیمی و اولتراسوند (به ترتیب ۱/۸۱۵ و ۱/۷۸۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) فاقد اختلاف معنی‌دار ($p > 0.05$) و در سطح بالاتری از دو روش دیگر قرار داشت ($p < 0.05$); ضمن اینکه غلظت رنگدانه در تکنیک انجماد-انجمادزدایی (۱/۵۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بیشتر از روش حلال معدنی (۱/۱۲۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود ($p < 0.05$). پس از خالص‌سازی رنگدانه با استفاده از سولفات آمونیوم، غلظت و خلوص رنگدانه به صورت معنی‌داری در هر روش افزایش یافت ($p < 0.05$). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با انتخاب روش بهینه و همچنین اعمال فرایند خالص‌سازی با سولفات آمونیوم، می‌توان راندمان استخراج فیکوسیانیین از میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: میکروجلبک اسپیرولینا، استخراج فیکوسیانیین، روش اولتراسوند، تکنیک آنزیمی، آنزیم لیزوزیم

مقدمه

است (Salehifar et al., 2013; Zanganeh et al., 2020; Barzegar et al., 2021; Safari et al., 2022). یکی از ترکیبات مفید و ارزشمندی که از میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس استخراج شده است، رنگدانه فیکوسیانیین می‌باشد (Safari et al., 2022). این رنگدانه آبی دارای کاربردهای بسیار گسترده‌ای در صنایع غذایی، پزشکی و داروسازی می‌باشد که همواره انجام تحقیقات پیشرفته و

طی دهه اخیر، میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس^۳ به دلیل دارا بودن ترکیبات منحصر به فرد و فوق‌العاده مغذی (Zanganeh et al., 2020) بسیار مورد توجه متخصصین حوزه‌های مختلف به‌خصوص علوم و صنایع غذایی قرار داشته و تحقیقات متعددی نیز پیرامون این میکروجلبک و استفاده از آن در فرمولاسیون مواد غذایی صورت گرفته

۱- استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

(*)- نویسنده مسئول: Email: Safari1351@gmail.com

۲- دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تکمیلی در این زمینه در جریان است. فیکوسیانیل دارای خواص درمانی (اثرات مثبت بر تقویت سیستم ایمنی و خواص ضد التهابی)، آنتی اکسیدانی و آنتیباکتریایی نیز می‌باشد و به نوعی می‌توان مواد غذایی مختلف را با این رنگدانه غنی و یا به‌منظور افزایش زمان ماندگاری از آن در فرمولاسیون استفاده کرد (Safari et al., 2022).

فیکوسیانیل به شکل تجاری توسط میکروجلیک / اسپیرولینا پلاتنسیس، در قالب کشت‌های فتواتوتروف و در محیط‌های باز در حوضچه‌های بزرگ و یا استخرهای نقاط گرمسیری و یا نیمه‌گرمسیر در حواشی اقیانوس‌ها تولید می‌شود. کارایی تولید توده زیستی با تامین نور تعیین می‌شود. اسپیرولینا پلاتنسیس در کشت‌های میکسوتروف نیز توانایی رشد دارد. نرخ رشد ویژه کشت‌های میکسوتروف با جمع کشت های اتوتروف و هتروتروف برابری می‌کند. اسپیرولینا پلاتنسیس قادر به رشد در شرایط هتروتروف نیز می‌باشد اما از آن جا که نرخ رشد ویژه و محتوای فیکوسیانیل در چنین کشت‌هایی پایین است، تولید آن با استفاده از چنین روشی امکان‌پذیر نمی‌باشد. در حال حاضر تولید فیکوسیانیل به صورت هتروتروف با استفاده از گونه گالدیریا سولفوراریا^۱ انجام می‌گیرد. این میکروارگانیسم، تک سلولی و گزینه مناسبی جهت تولید فیکوسیانیل به صورت هتروتروف می‌باشد. زیستگاه طبیعی آن آب‌های گرم و اسیدی و دمای رشد بهینه این میکروارگانیسم بالاتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد است (Graverholt & Erikse, 2007). اگرچه محتوای فیکوسیانیل سلولی این میکروارگانیسم به مراتب کمتر از اسپیرولینا پلاتنسیس است اما با تولید توده زیستی ۵۰ گرم در لیتر در روز، باعث تولید فیکوسیانیل تقریباً ۱۰ برابر بیشتر از اسپیرولینا پلاتنسیس می‌گردد. اخیراً نیز تولید فیکوسیانیل نوترکیب بعنوان گزینه ایی مناسب جهت تولید هتروتروف فیکوسیانیل مورد توجه قرار گرفته است (Pulz & Gross, 2004; Graverholt & Erikse, 2007). جهت استخراج ترکیبات موثره (ترکیبات پروتئینی و پلی‌ساکاریدی) از منابع گیاهی از روش‌های مختلف استفاده می‌شود. یکی از روش‌های استخراج پروتئین از ماکرو و میکروجلیک‌ها، روش آنزیمی می‌باشد. در دیواره این موجودات، انواع ترکیبات پلی‌ساکاریدی مثل سلولز، آلژینات، کاراگینان، آگار، نشاسته، گلوکان و ... وجود دارد. آنزیم‌های دارای ماهیت پلی‌ساکاریدازی مثل لیزوزیم، سلولاز، گلوکاناز، آگاراز، گالاکتاز، گزیلاناز باعث هیدرولیز و یا تجزیه ترکیبات پلی‌ساکاریدی و در نتیجه تخریب دیواره سلولی و یا غشای سیتوپلاسمی می‌شوند. در نتیجه ترکیبات درون سلولی از جمله پروتئین‌ها آزاد می‌گردند. علاوه بر این، با فعالیت این آنزیم‌ها، پلی‌ساکاریدهای متصل به پروتئین، تحت تأثیر هیدرولیز آنزیمی قرار گرفته و در نتیجه راندمان استخراج پروتئین افزایش می‌یابد (Joubert & Fleurence, 2008; Harnedy &).

(Fitzgerald, 2013; Bleakley & Hayes, 2017). اولتراسوند یا فراصوت یکی دیگر از روش‌های نوین جهت استخراج مواد موثره و پروتئین‌ها و دارای کاربردهای گسترده‌ای در زمینه استخراج، تجزیه، ریزپوشانی و ... است. مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون^۲ مربوط می‌شود. برخلاف شیوه‌های مرسوم، امواج صوتی باعث تخریب دیواره سلولی در یک مدت زمان کوتاه می‌شوند و عصاره گیاهی در طول دیواره سلولی انتشار می‌یابد. مشخصات گیاهی مثل میزان رطوبت، اندازه ذرات و نوع حلال مورد استفاده به‌منظور استخراج کارآمد و موثر، مهم هستند. به علاوه فاکتورهای زیادی شامل فرکانس، فشار، دما و زمان، کارکرد امواج صوتی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Shotipruk & Kaufman, 2001). در تحقیقات مختلف روش فراصوت به همراه سایر روش‌ها نظیر غرقابی، مایکروویو و هموژنیزاسیون جهت استخراج رنگدانه‌ها و مواد موثره گیاهی بصورت منفرد و ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاکی از راندمان بالاتر روش فراصوت در ترکیب با حلال نسبت به سایر روش‌ها بوده است (Ying et al., 2011). از مزایای استخراج به کمک امواج فراصوت، افزایش قطبیت سیستم (شامل استخراج کننده، آنالیت‌ها و ماتریس) و افزایش بازدهی استخراج با حفره‌زایی است که می‌تواند مشابه یا بزرگ‌تر نسبت به استخراج سوکسله باشد. با توجه به حساسیت رنگدانه‌ها به دماهای بالا، روش فراصوت، استخراج در دماهای پائین را امکان‌پذیر می‌سازد. استخراج با کمک امواج فراصوت امکان افزودن یک استخراج‌کننده کمکی را فراهم می‌کند و موجب افزایش قطبیت فاز مایع می‌شود. فراصوت می‌تواند دمای عملیاتی را کاهش دهد و امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت را فراهم کند. همچنین زمان استخراج نسبت به استخراج سوکسله نیز کوتاه‌تر است. از مزایای استخراج با کمک امواج فراصوت نسبت به استخراج با کمک امواج مایکروویو می‌توان به سریع‌تر و ساده‌تر بودن این روش اشاره کرد. در جذب اسید، روش فراصوت نسبت به مایکروویو ایمن‌تر است، به‌طوری‌که به دماها و فشارهای بالا نیاز ندارد. استخراج با کمک امواج فراصوت نسبت به استخراج سیال فوق بحرانی تجهیزات بسیار ساده‌تری نیاز دارد. بنابراین هزینه کل فرایند استخراج بسیار پایین‌تر است. استخراج با کمک فراصوت می‌تواند با هر حلالی برای استخراج دامنه وسیعی از ترکیبات طبیعی استفاده شود. از طرف دیگر، استخراج با سیال فوق بحرانی به طور انحصاری از دی‌اکسیدکربن برای استخراج استفاده می‌کند. بنابراین دامنه آن به آنالیت‌های غیر قطبی محدود است (Vinatoru, 2001). از مهم‌ترین روش‌های فیزیکی جهت استخراج مواد پروتئینی از ماکرو و میکروجلیک‌ها می‌توان به هموژنیزاسیون، استرس و شوک اسمزی اشاره نمود. مطالعات نشان داد که استفاده از روش‌های مذکور

کشت جلبک و قرار دادن در برابر نور فلورسنت با شدت لوکس نوری مناسب (۳۵۰ تا ۸۰۰) و دوره زمانی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، نمونه‌ها در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ روز قرار داده شدند. نمونه‌ها روزانه برای ۳ بار تکان داده شدند تا رشد جلبک به درستی انجام گیرد. به منظور ارزیابی روند رشد توده جلبکی، جذب محلول حاوی سلول‌های جلبک در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. پس از مشاهده شکوفایی جلبکی، نسبت به جمع‌آوری توده سلولی اقدام شد. این فرایند با استفاده از صافی‌های ۱۰۰ و ۲۰ میکرونی انجام گردید که به ترتیب برای جداسازی ذرات بزرگ‌تر و توده جلبک مورد استفاده قرار گرفتند. توده جمع‌آوری شده ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد (این عمل برای کاهش اثرات محیط کشت انجام شد). برای خشک کردن جلبک، نمونه‌ها در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد آون (به‌داده، ایران) برای مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند (Kamble et al., 2013; Prabakaran & Ravindran, 2013).



شکل ۱- کشت سلولی میکرو جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس
Fig. 1. *Spirulina platensis* microalgae cell culture

جدول ۱- محتویات محیط کشت میکرو جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس

Table 1- Contents of <i>Spirulina platensis</i> microalgae culture medium	
Composition of the culture medium	Amount (g)
ترکیب محیط کشت	میزان
NaHCO ₃	8
K ₂ HPO ₄	0.5
NaNO ₃	2.5
K ₂ SO ₄	0.5
NaCl	2
MgSO ₄	0.2
FeSO ₄	0.05
Urea	0.2

باعث افزایش استخراج و بازیافت پروتئین از جلبک‌هایی نظیر *اولا/فاسیاتا*^۱، *سارگاسوم ولگاره*^۲ و *پورفیرا آکانتوفورا*^۳ می‌شود و نتایج حاکی از کارایی بالاتر شوک اسمزی نسبت به اولتراهموژنیزاسیون می‌باشد (Barbarino & Lourenço, 2005; Harnedy & Fitzgerald, 2013). یکی دیگر از روش‌های استخراج مواد پروتئینی از جلبک‌ها، میدان پالس الکتریکی می‌باشد. در این روش، جریان الکتریکی باعث افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی می‌شود و الکتروپورشن^۴ قابل و یا غیر قابل برگشت رخ می‌دهد. این روش جهت استخراج اجزای درون سلولی مثل پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، کاروتنوئیدها و کلروفیل از جلبک‌هایی نظیر اسپیرولینا، کلرلا ولگاریس^۵، نانوکلوپسیس سالینا^۶ مورد استفاده قرار گرفته است (Goettel et al., 2013; Coustets et al., 2013; Parniakov et al., 2015).

به‌منظور استخراج فیکوسیانین از روش‌های مختلفی نظیر انجماد-انجمادزدایی، آنزیمی، اولتراسوند، فشار هیدرواستاتیک بالا، اولتراسانتریفوژ، اولتراهموژنیزاسیون، استخراج با آب و حلال‌های مختلف استفاده شده است که هر یک از روش‌های مذکور دارای مزایا و معایبی هستند (Prabakaran & Ravindran, 2013; Sivasankari et al., 2014). هدف تحقیق حاضر در مرحله اول کشت میکرو جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس طی ۱۶ روز و ارزیابی روند رشد و تکثیر آن است. در مرحله بعد با استفاده از چهار روش اولتراسوند، انجماد-انجمادزدایی، آنزیمی و حلال معدنی اقدام به استخراج رنگدانه فیکوسیانین و ارزیابی بازده (غلظت و خلوص) هر یک از روش‌های مذکور خواهد شد. ضمن اینکه پس از عمل خالص‌سازی رنگدانه با استفاده از سولفات آمونیوم، مجدداً غلظت و خلوص فیکوسیانین اندازه‌گیری می‌شود.

مواد و روش‌ها

کشت میکرو جلبک اسپیرولینا و ارزیابی روند رشد

نمونه خالص جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس از آزمایشگاه جلبک شناسی بخش بیولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید. جهت کشت اسپیرولینا از محیط کشت زاروک^۷ با ترکیبات متفاوت استفاده و پس از کشت در مقیاس‌های کوچک‌تر (۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتر)، کشت نهایی در حجم‌های ۵ و ۵۰ لیتر انجام گردید (شکل ۱). ترکیبات محیط کشت جلبک مورد مطالعه (pH=۸/۵) در جدول ۱ ارائه شده است. پس از

5- *Chlorella vulgaris*
6- *Nannochloropsis salina*
7- Zarrouk medium

1- *Ulva fasciata*
2- *Sargassum vulgare*
3- *Porphyra acanthophora*
4- Electroporation

مایع بی‌رنگ رویی حاصل از سانتریفوژ، دور ریخته شد. سپس به رسوب آبی رنگ، مقداری محلول بافر فسفات (pH=۷) اضافه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Mary, 2006; Patil et al., 2010; Leema et al., 2010).



شکل ۲- استخراج نمونه‌های فیکوسیانین از میکرو جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس

Fig. 2. Extraction of phycocyanin samples from *Spirulina platensis* microalgae

محاسبه غلظت و خلوص فیکوسیانین در روش‌های مختلف استخراج

برای محاسبه غلظت فیکوسیانین، جذب نوری (اسپکتروفتومتر، Hitachi، ژاپن) محلول در طول موج‌های ۶۲۰ و ۶۵۲ نانومتر قرائت و غلظت فیکوسیانین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر طبق فرمول ذیل محاسبه گردید (Kumar et al., 2013; Kumar et al., 2014). در این رابطه C-PC، غلظت فیکوسیانین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، A_{620} ، جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر و A_{652} ، جذب در طول موج ۶۵۲ نانومتر است.

$$C-PC = [(A_{620} - 0.474) \times A_{652}] / 5.34$$

جهت تعیین مقدار فیکوسیانین بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک جلبک از معادله زیر استفاده گردید (Silveira et al., 2007). در این رابطه، V، حجم حلال مورد استفاده و DB، وزن خشک جلبک بر حسب گرم است.

$$B = (C.PC - V) / DB$$

خلوص فیکوسیانین (P) نیز از رابطه زیر محاسبه شد (Muthulakshmi et al., 2012).

$$P = OD_{620} / OD_{280}$$

استخراج رنگدانه فیکوسیانین از میکرو جلبک اسپیرولینا

به منظور استخراج رنگدانه فیکوسیانین از میکرو جلبک اسپیرولینا، از روش اولتراسوند، انجماد-انجمادزدایی، آنزیمی و حلال معدنی استفاده شد (شکل ۲). بدین ترتیب که ابتدا ۲ گرم از توده خشک اسپیرولینا به ۴۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار اضافه شد و با قراردادن بر روی هیتر مگنت (به مدت ۳۰ دقیقه)، سوسپانسیون هموژنی از آن تهیه و جهت انجام فرآیند استخراج آماده گردید. در روش اولتراسوند، سوسپانسیون حاوی جلبک به مدت ۱۰ دقیقه و با فرکانس ۲۰ کیلو هرتز سونیکه شد (Prabakaran and Ravindran, 2013). در روش انجماد-انجمادزدایی، سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و پس از آن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، انجمادزدایی شد. این فرآیند دو بار تکرار شد (Prabakaran & Ravindran, 2013; Kamble et al., 2013). در روش آنزیمی، از آنزیم لیزوزیم جهت هضم و هیدرولیز آنزیمی جلبک استفاده شد که مقدار آن نیز ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن خشک جلبک بود (در مطالعه حاضر میزان اسپیرولینای مورد استفاده ۲ گرم بوده است). جهت آغاز هیدرولیز آنزیمی، از لیزوزیم (سیگما، آلدریج) به همراه EDTA و سدیم آزید (مرک، آلمان) به مقدار ۱۰۰ میلی‌مولار (بعنوان عوامل ضد میکروبی) استفاده شد و نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در حمام آب ۴۴ درجه سانتی‌گراد شیک (اختربان، ایران) شدند. در روش تیمار اسیدی از اسید کلریدریک (مرک، آلمان) ۱۰ نرمال استفاده و سوسپانسیون حاوی اسید در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد (Prabakaran & Ravindran, 2013). برای روش‌های اولتراسوند و انجماد، پس از انجام فرآیند، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳ ساعت شیک شدند. اما در روش‌های آنزیمی و حلال معدنی، از شیک اضافه استفاده نشد. پس از انجام مراحل فوق، نمونه‌ها در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Hettick، آلمان) و مایعات رویی (رنگ آبی تیره) برای اندازه‌گیری پیگمان جمع‌آوری شدند (Prabakaran & Ravindran, 2013; Kamble et al., 2013; Jerley & Prabu, 2015).

خالص‌سازی نسبی فیکوسیانین

به منظور خالص‌سازی نسبی رنگدانه فیکوسیانین، از سولفات آمونیوم (مرک، آلمان) با درجه اشباعیت ۴۰ درصد استفاده شد. این ماده به آرامی به محلول حاوی فیکوسیانین اضافه و به مدت یک ساعت هم زده شد. پس از قراردادن نمونه حاوی مخلوط فوق در مکان تاریک و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، فرآیند سانتریفوژ (Kokosan، ژاپن) در دور ۱۵۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید.

در تمامی زمان‌ها، بجز روزهای ۱۴ و ۱۶، معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$). ارزیابی تغییرات رشد نشان داد که جلبک بعد از سپری کردن فاز سکون کوتاه (۲ روز)، وارد مرحله رشد لگاریتمی شد و تا روز ۱۴ به رشد خود ادامه داده است. در ادامه، بین روزهای ۱۴ و ۱۶، رشد تقریباً روند ثابتی بخود گرفته و اصطلاحاً جلبک وارد فاز رشد ثابت شد. مطابق جدول ۲، جذب نوری جلبک در طول موج ۵۴۰ نانومتر، از ۰/۰۹ در روز صفر به ۲/۳۲۵ در روز ۱۴ افزایش یافت. بطوری‌که رنگ محیط کشت از سبز روشن به سبز تیره تغییر کرد که این مورد نشان‌دهنده رشد فزاینده جلبک می‌باشد (در مشاهده میکروسکوپی، انبوهی از رشته‌های مارپیچی منظم جلبک در حال حرکت دیده شد). میزان توده خشک جلبک پس از پایان دوره کشت (۱۶ روز)، انجام فرآیند لخته‌سازی، شستشو و خشک کردن، ۱۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بود.

تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز و معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها بوسیله آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارزیابی شد.

نتایج و بحث

ارزیابی رشد میکرو جلبک

تغییرات رشد و تولید توده سلولی جلبک مورد مطالعه (اسپیرولینا پلاتنسیس) در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که رشد از زمان صفر تا ۱۴ روز، دارای روند صعودی و تغییرات حاصله نیز

جدول ۲- تغییرات جذب نوری میکرو جلبک/اسپیرولینا پلاتنسیس در زمان‌های مختلف
Table 2- Changes in light absorption of *Spirulina platensis* microalgae at different times

Time (day)	Light absorption of microalgae at 540 nm wavelength
زمان	جذب نوری میکرو جلبک در طول موج ۵۴۰ نانومتر
0	0.09±0.002 ^h
2	0.21±0.014 ^g
4	0.44±0.01 ^f
6	0.83±0.02 ^e
8	1.215±0.02 ^d
10	1.71±0.05 ^c
12	2.165±0.09 ^b
14	2.325±0.077 ^a
16	2.35±0.044 ^a

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ($p < 0.05$).

Different letters indicate significant differences between the data ($p < 0.05$).

اسپیرولینا ۹ روز بوده است). یکی از پارامترهای اصلی در اختلاف رشد و تولید توده جلبکی، نوع و غلظت مورد استفاده املاح معدنی می‌باشد. شیخی نژاد و همکاران (Sheykhinejad et al., 2015) از دو سیستم هوادهی (هم‌زدن با هوا و هم‌زدن با چرخش ظرف کشت) جهت کشت و تولید توده اسپیرولینا در محیط‌های کشت زاروک، اف-۲، شولر و نمک دریا در یک دوره ۱۴ روزه استفاده کردند. نتایج نشان داد که در روش هم‌زدن با هوا، بیشترین و کمترین توده به ترتیب مربوط به محیط‌های کشت زاروک (۴ گرم در لیتر) و نمک دریا (۲/۴۹ گرم در لیتر) است. همچنین در روش هم‌زدن با چرخش ظرف کشت، بیشترین و کمترین توده به ترتیب در نمک دریا (۳/۶۹ گرم در لیتر) و محیط اف-۲ (۲/۴۹ گرم در لیتر) ثبت شد. در تحقیق حاضر از روش هم‌زدن با هوادهی ملایم و محیط کشت زاروک استفاده گردید و میزان تولید توده اسپیرولینا کمتر از پژوهش شیخی نژاد و همکاران (Sheykhinejad

در تحقیقات مختلف جهت کشت اسپیرولینا از روش‌های کشت متفاوت نظیر سیستم‌های بسته یا بیج‌کالچر^۱، فدیج‌کالچر^۲ و یا مداوم^۳ و همچنین محیط‌های کشت مختلف بر پایه املاح معدنی نظیر زاروک، جرج، جردن، اف-۲، شولر استفاده شده است که دارای منابع کربنی مانند بی‌کربنات سدیم و کربنات سدیم، منبع نیتروژنی مثل املاح آمونیوم، نیتريت و نیترات و منبع فسفات می‌باشند (Sharma et al., 2014; Ismaiel et al., 2016). نتیجه پژوهش‌های محققین مختلف موید آن است که با تغییر املاح معدنی مورد استفاده، می‌توان شرایط رشد اسپیرولینا را بهینه کرد و به توده بیشتری از جلبک دست یافت (Sharma et al., 2014). جرلی و پروبو (Jerley & Prabu, 2015) از محیط تغییر یافته زاروک جهت کشت اسپیرولینا استفاده کردند. میزان توده در طول ۹ روز کشت در pH=۹، ۲۸۰ میلی‌گرم در لیتر بود که در مقایسه با تحقیق حاضر بسیار کمتر می‌باشد (هر چند که زمان کشت

(*et al.*, 2015) بود. علت این مورد، عدم کنترل مناسب هوای تزریق شده به محیط کشت می‌باشد. اما در تحقیق مذکور (*Sheykhinejad et al.*, 2015) میزان هوای ورودی به صورت کنترل شده و با فلوی vvm ۰/۲ و در روش هم‌زدن بصورت چرخشی، میزان دور هم‌زن نیز ۱۵۰ دور در دقیقه بوده است. و همکاران (*Ismail et al.*, 2016) گزارش کردند که بیشترین توده اسپیرولینا در دوره کشت ۱۴ روزه و $pH=9$ معادل ۶۶ میلی گرم وزن توده در ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت است که مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. علاوه بر املاح معدنی، پارامترهای دیگر نظیر نور و طول دوره روشنایی و تاریکی، دما، زمان و تغییرات pH از فاکتورهای اصلی جهت بهینه‌سازی شرایط رشد و تکثیر اسپیرولینا می‌باشند. دما و pH مناسب جهت رشد اسپیرولینا به ترتیب ۳۰-۳۲ درجه سانتی‌گراد و ۹-۱۰ هستند که در اکثر تحقیقات از شرایط مذکور استفاده می‌شود (*Kuddus et al.*, 2013; *Kumar et al.*, 2013; *Sharma et al.*, 2014). با تغییر در پارامترهای کلیدی و ایجاد استرس، می‌توان میزان تولید برخی از متابولیت‌ها از جمله رنگدانه‌ها را افزایش داد. به عنوان مثال در تحقیقات مختلف گزارش شد که با افزایش درصد نمک سدیم در محیط کشت، اضافه نمودن اوره به عنوان منبع ازت و کاهش نسبی pH به ۸/۵-۸، می‌توان میزان تولید رنگدانه فیکوسیانیین را افزایش داد (*Kuddus et al.*, 2013; *Kumar et al.*, 2013). نتایج تحقیق فرجی و همکاران (*Faraji et al.*, 2012) نشان داد که افزایش نور، روش فدیج کالچر و سوبسترای گلوکز دارای تاثیرات مثبت بر تولید رنگدانه هستند اما با این وجود، افزایش دما میزان تولید فیکوسیانیین را کاهش می‌دهد. در پژوهش حاضر شرایط متفاوت بود؛ بطوری که دوره نوری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و روش کشت نیز به صورت بسته یا بیج کالچر تعریف شد. در روش فدیج کالچر به دلیل تزریق مواد مغذی با روند افزایشی در بازه‌های زمانی مختلف، رشد و تکثیر جلبک مطلوب‌تر صورت می‌گیرد و در نتیجه میزان توده بیشتری تولید می‌شود. دمای مورد استفاده در پژوهش فرجی و همکاران (*Faraji et al.*, 2012) جهت کشت، ۲۹ تا ۳۱ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه رشد اسپیرولینا) بود اما با افزایش دما، روند رشد کاهش یافت که دلیل آن نیز اختلال در متابولیسم سلولی است. در پژوهش جوشی و همکاران (*Joshi et al.*, 2014)، کشت آزمایشگاهی اسپیرولینا در حضور سوبستراهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط‌های کشت تهیه شده در قالب تیمارهای مختلف حاوی آب پنیر، ادرار گاو، آب باران و آب شهری تعریف شدند و میزان کلروفیل و پروتئین در توده تولید شده محاسبه گردید. نتایج نشان داد که با طولانی شدن زمان پرورش جلبک

(۱۵ روز)، فاکتورهای فوق روند صعودی دارند. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که به دنبال استفاده از منابع ارزان در فرمولاسیون محیط پایه زاروک، جهت تامین ازت و سایر پارامترها، می‌توان به توده بیشتری از جلبک دست یافت. با تغییر در فرمولاسیون محیط کشت می‌توان زمان شکوفایی جلبک را کاهش داد و در زمان کوتاه‌تر به توده بیشتر رسید. در پژوهش حاضر، اسپیرولینا در طول ۱۶ روز به بالاترین میزان رشد رسید که مشابه نتایج جوشی و همکاران (*Joshi et al.*, 2014) می‌باشد. به هنگام کشت اسپیرولینا در محیط‌های کشت معمولی و زاروک بدون تغییر، زمان رسیدن جلبک به بالاترین میزان رشد، معمولاً ۲۵ روز طول می‌کشد. در برخی از محیط کشت‌ها مثل کانوی مدیوم، این زمان به ۳۰ روز هم می‌رسد (*Qaeni et al.*, 2012). سرویا و مهتا (*Sarvaiya & Mehta*, 2016) در تحقیق خود به ارزیابی رشد اسپیرولینا در محیط‌های کشت مختلف نظیر زاروک، CFTRI، OFERR، زاروک+PGR و VITAL BIOTECH پرداختند و تاثیر دما، pH ، نور و هم‌زدن در طول دوره ۲۰ روزه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که دامنه توده تولید شده بین ۱/۲۵-۰/۴۰ گرم وزن خشک در لیتر متغیر است. نتایج توده تولید شده مشابه پژوهش حاضر می‌باشد؛ با این تفاوت که دوره کشت جلبک در تحقیق پیش رو ۱۶ روز بود. در مقایسه محیط‌های کشت مورد استفاده، محیط VITAL BIOTECH مطلوب‌تر از بقیه نتیجه داد. نتایج تحقیق سرویا و مهتا (*Sarvaiya & Mehta*, 2016) نشان داد؛ هر چند که فاکتورهای مورد بررسی بر روند رشد اسپیرولینا تاثیرگذار هستند اما دو پارامتر هم‌زدن و نور از فاکتورهای کلیدی جهت دستیابی به بالاترین توده و بیوستز پروتئین می‌باشند.

مقایسه غلظت و خلوص فیکوسیانیین در روش‌های مختلف استخراج

نتایج غلظت و خلوص فیکوسیانیین استخراج شده با روش‌های اولتراسوند، انجماد-انجمادزدایی، آنزیمی و حلال معدنی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که استخراج آنزیمی و اولتراسوند ($p > 0.05$) بیشترین راندمان را جهت استخراج فیکوسیانیین دارند ($p < 0.05$). ضمن اینکه روش‌های انجماد-انجمادزدایی و حلال معدنی (اسیدکلریدریک) به ترتیب در مراتب بعدی قرار گرفتند ($p < 0.05$). مطابق جدول ۳، خلوص اولیه فیکوسیانیین (قبل از تیمار با سولفات آمونیوم) در روش‌های مورد استفاده، فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p > 0.05$).

جدول ۳- مقایسه غلظت و خلوص فیکوسیانین در روش‌های مختلف استخراج
Table 3- Comparison of phycocyanin concentration and purity in different extraction methods

Extraction methods	Phycocyanin concentration (mg/ml)	Purity (A ₆₂₀ /A ₂₈₀)
روش‌های استخراج	غلظت فیکوسیانین	خلوص
Enzymatic (lysozyme) آنزیمی (لیزوزیم)	1.815±0.06 ^a	0.825±0.04 ^a
Ultrasound اولتراسوند	1.786±0.02 ^a	0.821±0.01 ^a
Freeze-defrosting انجماد-انجمادزدایی	1.535±0.03 ^b	0.823±0.02 ^a
Hydrochloric acid هیدروکلریک‌اسید	1.121±0.05 ^c	0.820±0.02 ^a

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ($P < 0.05$); برای هر تیمار، ۵ تکرار انجام شد.

Different letters in each column indicate significant differences between the data ($p < 0.05$); for each treatment, 5 replications were done.

عمل می‌کنند و در نتیجه در عصاره بدست‌آمده علاوه بر فیکوسیانین، رنگدانه‌های دیگر مثل آلفوفیکوسیانین، فیکواریترین^۱، زاگزانتین، آستاگزانتین، لوتئین و کلروفیل نیز وجود دارند (Moraes et al., 2011; Wu et al., 2016). مطالعات مختلفی در خصوص استخراج رنگدانه‌های جلبکی خصوصاً فیکوسیانین و بهره‌گیری از روش‌های مختلف اولتراسوند، ترکیبی از اولتراسوند و غوطه‌وری در حلال آلی، اولتراهموژنیزاسیون، انجماد-انجمادزدایی، سیال فوق بحرانی، مایکروویو، حلال‌های آلی و معدنی انجام شده است (Kuddus et al., 2013; Sivasankari et al., 2014; Wu et al., 2016). در پژوهش مورائس و همکاران (Moraes et al., 2011)، از شش روش استخراج شامل روش‌های شیمیایی (اسیدهای آلی و معدنی)، فیزیکی (انجماد-انجمادزدایی، فراصوت و هموژنیزاسیون) و آنزیمی (لیزوزیم) جهت استخراج فیکوسیانین استفاده شد. نتایج نشان داد که روش اولتراسوند دارای کارایی بالاتری نسبت به سایر تکنیک‌ها است و بعد از آن به ترتیب روش انجماد-انجمادزدایی قرار دارد. این یافته مطابق با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. احتمالاً میکروجلبک اسپیرولینا تحت تاثیر امواج اولتراسوند قرار گرفته و با بهینه‌سازی پارامترهای استخراج نظیر فرکانس، آمپلیتود، زمان و تعداد سیکل، می‌توان به بالاترین راندمان استخراج دست یافت. دی جسوس و همکاران (De Jesus et al., 2016) در مطالعه مروری خود به روش‌های استخراج فیکوسیانین از میکروجلبک‌های مختلف اشاره و گزارش کردند که روش‌هایی نظیر تیمار حرارتی، هموژنیزاسیون، انجماد-انجمادزدایی، نیتروژن مایع و شوک اسمزی از طریق تخریب سلولی میکروجلبک، منجر به رهاسازی متابولیت‌های مختلف از جمله فیکوسیانین می‌شوند. مطالعه مروری

یافته‌های این بخش حاکی از کارایی بالاتر روش‌های آنزیمی و اولتراسوند نسبت به دو روش دیگر در استخراج فیکوسیانین از میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس می‌باشد. به نظر می‌رسد که استفاده از حلال معدنی، ساختار مولکولی پروتئین فیکوسیانین را تحت تاثیر قرار می‌دهد و روش مناسبی برای استخراج این پروتئین نیست. این روش بیشتر برای استخراج ترکیبات فنلی و پلی‌ساکاریدها از گیاهان و میکروجلبک‌ها کاربرد دارد (Kumar et al., 2013; Kuddus et al., 2013). در روش‌های آنزیمی، انجماد-انجمادزدایی و اولتراسوند در حقیقت از تیمارهای بیوشیمیایی و فیزیکی جهت تخریب دیواره سلولی اسپیرولینا استفاده می‌شود. در نتیجه انتظار بر این است که راندمان فیکوسیانین استخراج‌شده نیز نسبتاً بیشتر باشد. بنابراین کارایی استخراج، خلوص و غلظت فیکوسیانین به روند تخریب پوشش سلولی بستگی دارد. در این تحقیق از آنزیم لیزوزیم استفاده شد و از آنجا که این آنزیم دارای فعالیت گلیکوزیدازی است، پیوند گلیکوزیدی ۱-۴ بین ان‌استیل‌مورامیک‌اسید^۱ و ان‌استیل‌گلوکزآمین^۲ پپتیدوگلیکان دیواره سلولی جلبک را تحت تاثیر قرار می‌دهد و منجر به آزادسازی متابولیت‌های مختلف از جمله فیکوسیانین می‌گردد. شایان ذکر است که جلبک‌های سبز-آبی یا سیانوفیت‌ها به دلیل وجود پپتیدوگلیکان در دیواره سلولی، به باکتری‌ها شباهت دارند. علاوه بر این، در روش آنزیمی، EDTA و بافر فسفات با کلاته کردن یون منیزیم و تخریب غشای سیتوپلاسمی، باعث آزادشدن فیکوسیانین می‌گردند. در روش اولتراسوند، بدنال استفاده از امواج اولتراسونیک، سلول‌های جلبک متلاشی و متابولیت‌های مختلف آزاد می‌شوند. هر دو روش آنزیمی و اولتراسوند مشابه روش‌های انجماد و حلال معدنی، بطور غیرانتخابی

3- Phycoerythrin

1- N-Acetylmuramic acid

2- N-Acetylglucosamine

مذکور نشان داد که روش‌های مورد استفاده ممکن است بصورت منفرد و یا ترکیبی و همراه با روش‌هایی نظیر آنزیمی مورد استفاده قرار گرفته که در برخی از موارد، استفاده از روش‌های ترکیبی اثر افزایشی و یا سینرژیستی بر هم دارند و راندمان استخراج فیکوسیانیین را افزایش می‌دهند. در پژوهش حاضر، استخراج فیکوسیانیین بدون بهره‌گیری از تیمار اولیه صورت گرفت و از روش‌های ترکیبی استفاده نگردید. نتیجه‌گیری که دی جسوس و همکاران (De Jesus et al., 2016) از مطالعه خود بیان داشتند آن بود که هر چند اتخاذ روش‌های مناسب استخراج، بر راندمان فیکوسیانیین تاثیرگذار می‌باشد، اما تازگی توده و گونه مورد نظر از فاکتورهای اصلی هستند که غلظت نهایی فیکوسیانیین را تعیین می‌کنند. وو و همکاران (Wu et al., 2016) در تحقیق خود از روش تلفیقی انجماد-انجمادزدایی بمدت ۱ ساعت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد و متعاقب آن اولتراسوند در ۶ میکرون آمپلی‌تود به مدت ۳ دقیقه استفاده کردند. در پژوهش مذکور، نمونه‌ها پس از سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰۰g بمدت ۳۰ دقیقه و جداسازی مایع رویی، از نظر غلظت فیکوسیانیین مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که غلظت فیکوسیانیین در دو آزمایش مجزا و منبع نور متفاوت سفید و قرمز به ترتیب ۰/۷۲۸ و ۳/۲۷۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر که از منبع نور سفید نیز استفاده شد، کمتر می‌باشد (۱/۸۱۵-۱/۱۲۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). علت اختلاف غلظت فیکوسیانیین احتمالا بدلیل فرمولاسیون متفاوت محیط‌های کشت است که در پژوهش حاضر از زاروک تغییر یافته و در مطالعه وو و همکاران (Wu et al., 2016) از محیط کشت F/2 مدیوم (یا محیط تغییر یافته گیلارد) استفاده گردید. سیواسنکاری و همکاران (Sivasankari et al., 2014) از روش‌های مختلف انجماد-انجمادزدایی، حلال آلی و معدنی، اولتراسوند، هموژنیزاسیون و بافر فسفات سدیم جهت استخراج فیکوسیانیین استفاده کردند. نتایج حاکی از کارایی بالای تکنیک انجماد-انجمادزدایی در جداسازی فیکوسیانیین بود. همچنین کمترین غلظت فیکوسیانیین در دو روش حلال معدنی و اولتراسوند ثبت شد. در پژوهش مذکور، تأثیر زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روند استخراج فیکوسیانیین نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که غلظت رنگدانه در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت دارای اختلاف معنی‌دار است اما این روند در ۷۲ ساعت فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشد. نتایج غلظت فیکوسیانیین در روش‌های مورد استفاده توسط سیواسنکاری و همکاران (Sivasankari et al., 2014) بجز روش اولتراسوند، مشابه روش‌های انتخاب شده در تحقیق حاضر است و اختلاف در غلظت فیکوسیانیین در روش اولتراسوند احتمالا بدلیل نوع فرکانس انتخاب شده، زمان مورد نظر و تعداد سیکل در دوره زمانی مشخص می‌باشد. در پژوهش هدیانتو و سوتریس نورهادی (Hadiyanto & Sutrisnorhadi, 2016) از روش تلفیقی حلال و

اولتراسوند جهت استخراج فیکوسیانیین از اسپیرولینا استفاده شد و نتایج نشان داد که بیشترین راندمان استخراج رنگدانه مربوط به دمای ۵۲/۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۴۲ دقیقه و فرکانس ۴۲ کیلو هرتز است (۱۵/۷ درصد). در حالی که در تیمار حاوی حلال اتانول بصورت منفرد، راندمان استخراج ۱۱/۱۳ درصد ثبت شد. در تحقیق حاضر اولتراسوند بصورت منفرد مورد استفاده قرار گرفت و فرکانس و زمان مورد استفاده به ترتیب ۲۰ کیلو هرتز و ۱۰ دقیقه و غلظت فیکوسیانیین نیز ۱/۷۸۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش گردید.

خالص‌سازی فیکوسیانیین استخراج شده با استفاده از سولفات آمونیوم

جدول ۴. نتایج خلوص و غلظت فیکوسیانیین را پس انجام فرایند خالص‌سازی با استفاده از سولفات آمونیوم ۴۰ درصد نشان می‌دهد. از مقایسه **جدول ۳** و **۴** مشخص می‌شود که پس از انجام فرایند تخلیص فیکوسیانیین با ماده مذکور، خلوص و غلظت فیکوسیانیین استخراج شده با هر روش نیز افزایش یافته است. همانطور که در **جدول ۴** مشاهده می‌شود، اگرچه که پس از انجام فرایند تخلیص، خلوص رنگدانه در روش‌های مختلف استخراج فاقد اختلاف معنی‌دار (با وجود ارتقا نسبت به قبل از فرایند تخلیص) است ($p > 0.05$) اما بین غلظت فیکوسیانیین در برخی از تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < 0.05$). به این صورت که حداکثر غلظت مربوط به فیکوسیانیین مستخرج با روش‌های آنزیمی (لیزوزیم) و اولتراسوند ($p > 0.05$) است. ضمن اینکه این غلظت در روش انجماد-انجمادزدایی به صورت معنی‌داری بیشتر از روش حلال معدنی (اسید کلریدریک) می‌باشد ($p < 0.05$).

نتایج این بخش نشان داد که با اعمال تیمارهای مختلف می‌توان درصد خلوص فیکوسیانیین را افزایش داد که این موضوع به کاربرد فیکوسیانیین در صنایع مختلف (آرایشی، بهداشتی، غذایی، دارویی و آزمایشگاهی) بستگی دارد. تحقیقات مختلف نشان داد که استفاده از روش‌های ترکیبی نظیر سولفات آمونیوم، دیالیز و کروماتوگرافی تعویض یونی می‌تواند درصد خلوص فیکوسیانیین را بطور معنی‌داری افزایش دهد (Moraes et al., 2011; Jerley & Prabu, 2015; Wu et al., 2016). نتایج پژوهش موتولاکشمی و همکاران (Muthulakshmi et al., 2012) نشان داد که به هنگامی که نسبت A_{620}/A_{280} از ۴ بیشتر باشد، فیکوسیانیین استخراج شده دارای درجه آزمایشگاهی و دارویی است و زمانی که این مقدار بین ۰/۷ تا ۳/۹ باشد جهت مصارف غذایی و آرایشی قابل استفاده می‌باشد. با توجه به این مطلب، خلوص فیکوسیانیین استخراج شده در تحقیق حاضر قابلیت استفاده در مواد غذایی و آرایشی را دارا می‌باشد (۱/۱۳۵، روش آنزیمی).

جدول ۴- غلظت و میزان خلوص فیکوسیانین در تیمارهای خالص سازی شده با سولفات آمونیوم
Table 4- Concentration and degree of purity of phycocyanin in purified treatments using ammonium sulfate

Extraction methods روش های استخراج	Purity (A_{620}/A_{280}) خلوص	Phycocyanin concentration (mg/ml) غلظت فیکوسیانین
Enzymatic (lysozyme) آنزیمی (لیزوزیم)	1.135±0.08 ^a	3.751±0.05 ^a
Ultrasound اولتراسوند	1.131±0.05 ^a	3.748±0.07 ^a
Freeze-defrosting انجماد-انجمادزدایی	1.132±0.03 ^a	3.705±0.02 ^b
Hydrochloric acid هیدروکلریک اسید	1.128±0.04 ^a	3.523±0.08 ^c

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین داده ها است ($p < 0.05$); برای هر تیمار، ۵ تکرار انجام شد.

Different letters in each column indicate significant differences between the data ($p < 0.05$); for each treatment, 5 replications were done.

نتیجه گیری

براساس نتایج تحقیق حاضر، تکنیک اولتراسوند و روش آنزیمی (لیزوزیم) به منظور استخراج رنگدانه فیکوسیانین از میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس کارایی مطلوب تری نسبت به روش های انجماد-انجمادزدایی و حلال معدنی (اسید کلریدریک) دارند. همچنین تکنیک انجماد-انجمادزدایی در این زمینه کارآتر از روش حلال معدنی است. مطابق یافته ها، خالص سازی رنگدانه مستخرج با استفاده از سولفات آمونیوم ۴۰ درصد، موجب افزایش غلظت و خلوص فیکوسیانین در هر روش می گردد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با انتخاب روش بهینه و همچنین اعمال فرایند خالص سازی با استفاده از سولفات آمونیوم، می توان راندمان استخراج فیکوسیانین از میکروجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس را افزایش داد.

سپاسگزاری

محققین تحقیق حاضر بر خود لازم می دانند از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و همچنین پژوهشکده اکولوژی دریای خزر جهت حمایت مالی و در اختیار نهادن تجهیزات تخصصی تقدیر و تشکر به عمل آورند.

دی جسوس و همکاران (De Jesus et al., 2016) در پژوهش خود به روش های مختلف خالص سازی فیکوسیانین از جمله کروماتوگرافی تعویض یونی، اولتراسانتریفوژ، الکتروفورز، ژل فیلتراسیون کروماتوگرافی، اولترافیلتراسیون، کیتوزان، زغال فعال، سولفات آمونیوم، یونیزاسیون شعله ای و تلفیقی از روش های مذکور از میکروجلبک هایی نظیر اسپیرولینا، آنابنا، پورفیرا، آفانو کاپسا^۱ پرداختند و مزایا و معایب روش ها را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج تحقیق مذکور نشان داد که استفاده از سولفات آمونیوم در مرحله اول و متعاقب آن اولترافیلتراسیون، درصد خلوص فیکوسیانین را بطور قابل ملاحظه ای افزایش می دهد. همچنین استفاده از سولفات آمونیوم به تنهایی قادر به افزایش خلوص فیکوسیانین نیست و در حقیقت، خالص سازی بطور نسبی انجام می گیرد. وو و همکاران (Yu et al., 2017) در تحقیق خود از سولفات آمونیوم ۳۰٪ جهت خالص سازی اولیه فیکوسیانین و سپس از اشکال مختلف کروماتوگرافی مثل کروماتوگرافی تعویض یونی، کروماتوگرافی ستونی هیدروکسی آپاتیت و کروماتوگرافی هیدروفوبیک به منظور خلوص بالاتر رنگدانه استفاده کردند. نتایج پژوهش آن ها نشان داد که بدنبال استفاده از روش های کروماتوگرافی، غلظت و درصد خلوص فیکوسیانین افزایش معنی دار پیدا می کند. بنابر یافته های تحقیقات مذکور، با اتخاذ روش های مناسب جهت خالص سازی فیکوسیانین، می توان به خلوص بالاتری از آن جهت استفاده در علوم پزشکی نظیر نشان دار کردن آنتی ژن یا آنتی بادی (بعنوان ماده فلورسنت) دست یافت.

منابع

1. Barbarino, E., & Lourenço, S.O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro-and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17(5), 447-460. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>
2. Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, 6(5), 33. <https://doi.org/10.3390%2Ffoods6050033>
3. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., Zanganeh, N., & Abdolnabipoor, E. (2021). Effect of *Spirulina platensis* microalgae powder as an egg white substitute on the sponge cake properties. *Journal of Food Science and Technology*, 108(17), 31-44. <https://dx.doi.org/10.52547/fsct.17.108.31>
4. Coustets, M., Al-Karablieh, N., Thomsen, C., & Teissié, J. (2013). Flow process for electroextraction of total proteins from microalgae. *The Journal of Membrane Biology*, 246(10), 751-760. <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9542-y>
5. De Jesús, V.C., Gutiérrez-Rebolledo, G.A., & Hernández-Ortega, M. (2016). Methods for extraction, isolation and purification of C-phyococyanin: 50 years of research in review. *International Journal of Food and Nutritional Science*, 3(3), 2-10. <https://doi.org/10.15436/2377-0619.16.946>
6. Faraji, D., Rezaei, K., & Golmaei, M. (2012). *Optimization of phycocyanin production from spirulina algae under culture conditions*. Master's thesis in the field of food industry. Islamic Azad University, Varamin branch.
7. Graverholt, O.S., & Eriksen, N.T. (2007). Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 69-75. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1150-2>
8. Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research*, 2(4), 401-408. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.07.004>
9. Harnedy, P.A., & FitzGerald, R.J. (2013). Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.023>
10. Hadiyanto, H., & Sutrisnorhadi, S. (2016). Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae *Spirulina platensis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 227-234. <https://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2015-05-193>
11. Ismaiel, M., El-Ayouty, Y.M., & Piercey-Normore, M.D. (2014). Antioxidants characterization in selected cyanobacteria. *Annals of Microbiology*, 64(3), 1223-1230. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0763-1>
12. Joubert, Y., & Fleurence, J. (2008). Simultaneous extraction of proteins and DNA by an enzymatic treatment of the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 20(1), 55-61. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9180-9>
13. Joshi, S.M., Bera, M.B., & Panesar, P.S. (2014). Extrusion cooking of maize/spirulina mixture: factors affecting expanded product characteristics and sensory quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(2), 655-664. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12015>
14. Jerley, A.A., & Prabu, D.M. (2015). Purification, characterization and antioxidant properties of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Scrutiny International Research Journal of Agriculture, Plant Biotechnology and Bio Products*, 2(1), 7-15.
15. Kamble, S.P., Gaikar, R.B., Padalia, R.B., & Shinde, K.D. (2013). Extraction and purification of C-phyococyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(8), 149-153. <https://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2013.3826>
16. Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phyococyanin. *BioMed Research International*, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2013/742859>
17. Kumar, D., Kumar, N., Pabbi, S., Walia, S., & Dhar, D.W. (2013). Protocol optimization for enhanced production of pigments in *Spirulina*. *Indian Journal of Plant Physiology*, 18(3), 308-312. <https://doi.org/10.1007/s40502-013-0045-8>
18. Kumar, D., Dhar, D.W., Pabbi, S., Kumar, N., & Walia, S. (2014). Extraction and purification of C-phyococyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(2), 184-188. <https://doi.org/10.1007/s40502-014-0094-7>
19. Leema, J.M., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N.V., Dheenani, P.S., & Karthikayulu, S. (2010). High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*, 101(23), 9221-9227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.120>

20. Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G.P., & Kalil, S.J. (2011). C-phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, 45-49. <https://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322011000100006>
21. Muthulakshmi, M., Saranya, A., Sudha, M., & Selvakumar, G. (2012). Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from *Spirulina* isolated from fresh water body against various human pathogens. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(3), 7-11.
22. Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
23. Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A.S., & Raghavarao, K.S.M.S. (2006). Method to obtain C-phycoyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, 1127(1-2), 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.073>
24. Prabakaran, P., & Ravindran, A.D. (2013). Efficacy of different extraction methods of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *International Journal of Research in Pharmacy and Life Sciences*, 1(1), 15-20.
25. Parniakov, O., Barba, F.J., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015). Pulsed electric field assisted extraction of nutritionally valuable compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. using the binary mixture of organic solvents and water. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.11.002>
26. Qaeni, M., Hashtroudi, M., & Qaderi, F. (2012). Investigation of chlorophyll a and carotenoids in spirulina microalgae. *Journal of Marine Biology*, 3(14), 1-7.
27. Shotipruk, A., Kaufman, P.B., & Wang, H.Y. (2001). Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable menthaxpiperata using ultrasonic extraction. *Biotechnology Progress*, 17(5), 924-928.
28. Silveira, S.T., Burkert, J.D.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V., & Kalil, S.J. (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98(8), 1629-1634. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.050>
29. Salehifar, M., Shahbazizadeh, S., Khosravi, K., Bahmadi, H., & Ferdowsi, R. (2013). Possibility of using microalgae *Spirulina platensis* powder in industrial production of Iranian traditional cookies. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 7(4), 63-72.
30. Sharma, G., Kumar, M., Ali, M.I., & Jasuja, N.D. (2014). Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. *Microbial and Biochemical Technology*, 6(4), 202-206. <https://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000144>
31. Sivasankari, S., & Ravindran, D. (2014). Comparison of different extraction methods for phycocyanin extraction and yield from *Spirulina platensis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(8), 904-909.
32. Sheykhinejad, A., Lababpour, A., & Moazami. (2015). Increasing cyanobacteria *Spirulina* production with mixing and cyanobacteria spirulina production with mixing and chemical composition of culture medium. *Plant Research Journal*, 28(2), 353-344.
33. Sarvaiya, A., & Mehta, J. (2016). Biomass estimation of *Spirulina platensis* under different physical and chemical environment. *International Journal of Recent Biotechnology*, 4(2), 14-24.
34. Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., & Ghaffari, H. (2022). Nanoencapsulation of phycocyanin extracted from the alga *Spirulina* (*Spirulina platensis*) and use of resulting nanoparticles in ice cream formulation. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 123(19), 145-159. <https://dx.doi.org/10.52547/fsct.19.123.145>
35. Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303-313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
36. Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives of Toxicology*, 90(8), 1817-1840. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>
37. Ying, Z., Han, X., & Li, J. (2011). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, 127(3), 1273-1279. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.083>
38. Yu, P., Wu, Y., Wang, G., Jia, T., & Zhang, Y. (2017). Purification and bioactivities of phycocyanin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(18), 3840-3849. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668>
39. Zanganeh, N., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. (2020). Investigation of the effect of different *Spirulina platensis* levels on nutritional, physicochemical and sensory properties of sponge cake. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 16(2), 207-220. <https://doi.org/10.22067/iftstrj.v16i2.81859>



Increasing the Production of Carotenoids in *Chlorella sorokiniana* IG-W-96 by Changing the Concentration of Nutrients and Phytohormones

Z. Noruzi Motlagh¹, M.A. Mahdavi^{2*}, R. Gheshlaghi³

1, 2 and 3- Ph.D. Student and Associate Professors, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

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

Received: 2022.10.02 Revised: 2022.11.05 Accepted: 2022.11.27 Available Online: 2022.11.30	How to cite this article: Noruzi Motlagh, Z., Mahdavi, M.A., & Gheshlaghi, R. (2023). Increasing the production of carotenoids in <i>Chlorella sorokiniana</i> IG-W-96 by changing the concentration of nutrients and phytohormones. <i>Iranian Food Science and Technology Research Journal</i> , 19(5), 663-673. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.79014.1209
---	---

Introduction

Carotenoids have many effects on human health. These compounds are produced by plants and microalgae. The extraction of carotenoids from microalgae such as *Chlorella* has received much attention, since microalgae grow all year round (regardless of the season) and at a much faster rate than plants in non-arable lands. The aim of this research was to optimize the concentrations of nutrients (nitrogen and phosphorous) in the growth medium of microalgae with the objective of maximizing carotenoids content. At the optimized nutrient conditions, the effect of phytohormones on production of carotenoids using *Chlorella sorokiniana* IG-W-96 was investigated.

Materials and Methods

Chlorella sorokiniana IG-W-96 was cultivated in BG11 growth medium with light intensity of 25000 lux and light: dark cycle of 16: 8 supplied with compressed air flow of 0.5 vvm containing 6% vol carbon dioxide. Under three concentrations of nitrate (0.04, 0.25, 1.5 g L⁻¹) and three concentrations of phosphate (0.01, 0.04, 0.16 g L⁻¹) and carotenoid concentration was measured. Full factorial experimental design was performed and the results of the experiments were analyzed using Minitab (ver. 21.01.1). Finally, the best concentrations of nitrate and phosphate were chosen for pigments production, and at that concentration, naphthalene acetic acid (0, 2.5, 5, 7.5, 10 and 12 ppm) was added to the culture medium to check its effect on pigments production. By measuring the dry weight of *C. sorokiniana*, its growth rate was determined. After extracting the pigments with solvent, the concentration of the pigments was determined by measuring the amount of light absorption.

Results and Discussion

Dry weight

The results showed that the highest amount of dry weight was related to the treatment with nitrate amount of 0.25 g L⁻¹, and nitrate more and less than this amount caused a decrease in growth. This result was not dependent on the amount of phosphate and was true for all phosphate concentrations. Nitrate reduction from 1.5 to 0.25 g L⁻¹ increased the growth of microalgae up to 81.8%, so that the dry weight of 0.88 g L⁻¹ reached 1.6 g L⁻¹. However, reduction of nitrate



from 0.25 to 0.04 g L⁻¹ decreased the dry weight by 65.6%. In order to reach the maximum growth rate, it is necessary to determine the appropriate concentration of each nutrient.

Carotenoids

Unlike the dry weight, not only the pigment production did not decrease with the excessive of nitrate concentration, but also the maximum amount of pigment production was related to the treatment with the maximum amount of nitrate concentration. Based on the results obtained, the concentration of carotenoids was higher in the concentration of 1.5 g L⁻¹ of nitrate and 0.04 g L⁻¹ of phosphate (6.7 mg L⁻¹).

When the nitrate concentration was very low (0.04 g L⁻¹), changing the phosphate concentration had no significant effect on the production rate of any of the pigments. Only when the nitrate concentration was high (1.5 g L⁻¹), change in phosphate concentration caused a change in pigments concentration. The increase of phosphate concentration from 0.01 to 0.04 g L⁻¹ increased the carotenoids concentration to 1.65-fold. Of course, increasing phosphate concentration to 0.16 g L⁻¹ did not affect the pigments concentration.

Based on the statistical analysis, the P-value < 0.05 indicated that the effect of the factors and the model was significant. In this situation, in order to increase the production of carotenoids, naphthalene acetic acid was added to the phytohormone culture medium. At the optimal concentration of 2.5 ppm of naphthalene acetic acid, the concentration of carotenoids increased by 26.71% and reached 8.49 mg L⁻¹. However, phytohormone had no significant effect on dry weight.

Conclusion

Carotenoid production using microalgae could be maximized through optimization of nutrients concentrations (nitrate and phosphate) in the growth medium. Phytohormones could further increase the production of carotenoids at optimum concentrations.

Keywords: *C. sorokiniana*, Nitrate, Phosphate, Pigment



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲، ص. ۶۶۳-۶۶۳

افزایش تولید کاروتنوئیدهای ریزجلبک کلرلا با استفاده از تغییر غلظت مواد مغذی و فیتوهورمون

زهره نوروزی مطلق^۱ - محمود اخوان مهدوی^۲ - رضا قشلاقی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۶

چکیده

کاروتنوئیدها اثرات فراوانی بر روی سلامتی انسان دارند. این ترکیبات توسط گیاهان و ریزجلبکها تولید می‌شوند. امروزه استخراج کاروتنوئیدها از ریزجلبکهای خوراکی همچون کلرلا بسیار مورد توجه قرار گرفته است، زیرا ریزجلبکها در تمام سال (بدون توجه به فصل) و با سرعتی بسیار بیش‌تر از گیاهان در زمین‌های غیر زراعی رشد می‌کنند. هدف از این پژوهش ارایه روشی برای افزایش تولید کاروتنوئیدهای ریزجلبک کلرلا سروکینیانا است. برای این منظور، اثر غلظت‌های متفاوت از دو ماده مغذی نیترات سدیم به‌عنوان منبع نیترات و دی پتاسیم هیدروژن فسفات به‌عنوان منبع فسفات بر روی میزان تولید کاروتنوئیدها به صورت آماری بررسی شد. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیترات و فسفات از طرح کاملاً تصادفی آزمایش فاکتوریل و نرم‌افزار Minitab استفاده شد که در آن سطوح غلظت در نظر گرفته شده برای نیترات برابر 0.4 g L^{-1} ، 0.25 و $1/5$ و برای فسفات برابر 0.1 g L^{-1} ، 0.4 و $1/6$ بود. نتایج نشان داد که در غلظت $1/5 \text{ g L}^{-1}$ از نیترات و 0.4 g L^{-1} از فسفات غلظت کاروتنوئیدها بیشینه است ($6.75 \pm 0.21 \text{ mg L}^{-1}$). در این شرایط، جهت افزایش تولید کاروتنوئیدها، به محیط کشت فیتوهورمون نفتالن استیک اسید اضافه شد. در غلظت بهینه $2/5 \text{ ppm}$ از نفتالن استیک اسید غلظت کاروتنوئیدها $26/71\%$ افزایش یافت و به مقدار mg L^{-1} $0.15 \pm 8/49$ رسید.

واژه‌های کلیدی: رنگدانه، سروکینیانا، فسفات، نیترات

مقدمه

(Maneeruttanarungroj, 2022 &). آن‌ها همچنین سیستم ایمنی بدن را تقویت می‌کنند (Udayan et al., 2022) و باعث جلوگیری از ابتلا به سرطان، دیابت و بیماری‌های قلبی می‌شوند (Nwoba et al., 2020). اگرچه که گیاهان حاوی کاروتنوئیدها هستند اما جالب اینجاست که رنگدانه‌ها در ریزجلبکها می‌توانند در غلظت‌های بالاتری نسبت به گیاهان تولید شوند. مثلاً "میزان β -کاروتن ریزجلبک *Dunaliella* حدود ۱۰۰ برابر بیش‌تر از هویج است (Nwoba et al., 2020). علاوه بر این ریزجلبکها نرخ رشد بسیار بالاتری نسبت به گیاهان دارند برای مثال *Chlorella* با ظرفیت بالای فتوسنتز، قادر

کاروتنوئیدها از جمله رنگدانه‌هایی هستند که توسط گیاهان و ریزجلبکها تولید می‌شوند. کاروتنوئیدها شامل دو گروه اصلی کاروتن‌ها و زانتوفیل‌ها هستند (Sathasivam & Ki, 2018). کاروتنوئیدهایی مانند لوتئین و زآنتین می‌توانند با جذب طول موج‌های خاصی از نور به محافظت از چشم‌ها کمک کنند و β -کاروتن می‌تواند به ویتامین A تبدیل شود. به‌طور کلی کاروتنوئیدها کارایی قوی در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن را دارند و می‌توانند از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از اشعه‌ی UV و آفتاب سوختگی محافظت کنند (Maswanna

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیاران گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*)- نویسنده مسئول: (Email: mahdavi@um.ac.ir)

است زیست توده سلولی خود را در کم‌تر از یک روز دو برابر کرده و با سرعتی صد برابر بیش‌تر از گیاهان رشد کند (Shu et al., 2012; Sirisuk et al., 2018). ریزجلبک‌ها در کل سال (بدون توجه به فصل) و در زمین‌های غیر زراعی قابل کشت هستند (Maswana & Maneeruttanarungroj, 2022). از طرفی در مدت زمان مشخص، برای تولید یک تن توده زیستی ریزجلبک نسبت به تولید یک تن گیاه مساحت کم‌تری لازم است (Simionato et al., 2013). بعلاوه توانایی رشد ریزجلبک‌ها در آب‌های شور و شیرین و فاضلاب (Udayan et al., 2022) باعث شده تا نه تنها در مصرف آب آشامیدنی صرفه‌جویی گردد بلکه تصفیه فاضلاب با رشد ریزجلبک امکان‌پذیر شود. تمام این عوامل باعث شده تا محبوبیت تولید رنگدانه‌ها از ریزجلبک‌ها افزایش یابد.

از دیگر مزایای استفاده از رنگدانه ریزجلبک‌ها این است که می‌توان شرایط محیط کشت ریزجلبک (نور، دما، میزان مواد مغذی) را طوری تغییر داد که میزان سنتز رنگدانه‌ها و به‌طور خاص کاروتنوئیدها افزایش یابد (Pal et al., 2011; Liu et al., 2012). نیترات و فسفات از جمله مواد مغذی محیط کشت ریزجلبک هستند که اثر مستقیم بر روی تولید رنگدانه‌ها دارند. پژوهشگران سعی کردند تا با تغییر میزان نیترات و یا فسفات، تولید رنگدانه‌ها را افزایش دهند. در پژوهشی که در سال ۲۰۲۱ انجام شد، با افزایش غلظت نیترات و فسفات به ترتیب تا $1766 \mu\text{M}$ و $76/2 \mu\text{M}$ میزان تولید کلروفیل، لوتئین، ویولانتین و β -کاروتن تولید شده توسط *Tetraselmis* افزایش یافت (Montes-González et al., 2021). به‌طور مشابه افزایش نیترات از صفر تا 72 mg L^{-1} نیز باعث افزایش کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدهای *Isochrysis galbana* شد (Zarrinmehr et al., 2020). دو برابر شدن فسفات میزان تولید کلروفیل و کاروتنوئیدهای *Tetraselmis* را به‌ترتیب $1/44$ و $2/6$ برابر افزایش داد (Dammak et al., 2017). در پژوهش دیگری افزایش نیترات از 0 تا 30 mM و فسفات از 0 تا 5 mM باعث افزایش شدید کلروفیل *Chlorella kessleri* شد (Shrestha et al., 2020). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۹ انجام شد، مشاهده شد که کاهش میزان نیترات و فسفات در محیط کشت *Tisochrysis lutea*، میزان تولید کلروفیل a، کلروفیل c و فوکوزانتین را به شدت کاهش می‌دهد (Huang et al., 2019). به‌طور مشابه کاهش نیترات باعث شد تا میزان کلروفیل *Scenedesmus* از $7/71$ به $2/69 \mu\text{g mL}^{-1}$ و میزان کاروتنوئیدها از $1/3$ به $0/61 \mu\text{g mL}^{-1}$ کاهش یابد (Pancha et al., 2014). علاوه بر تغییر غلظت مواد مغذی، دیده شده است که فیتوهورمون‌ها نیز اثر مثبت بر سنتز رنگدانه‌ها می‌گذارند. در پژوهشی که بر روی *Chlamydomonas reinhardtii* انجام شد، مشاهده شد که غلظت‌های بسیار کم (کم‌تر از 1 ppm) فیتوهورمون‌های ایندول

استیک اسید، جیبرلیک اسید و کینتین باعث افزایش تولید رنگدانه‌ها شد (Park et al., 2013). در پژوهش مشابهی سنتز کلروفیل در ریزجلبک *Scenedesmus* با افزودن ایندول استیک اسید 20% افزایش یافت (Dao et al., 2018). همچنین در حضور ایندول استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید و کینتین تولید کلروفیل a، کلروفیل b و زانتوفیل‌ها توسط *Acutodesmus obliquus* افزایش یافت (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2018). در پژوهش دیگری، β -کاروتن ریزجلبک *Dunaliella salina* در حضور مایو اینوسیتول و آب‌سزیک اسید به‌ترتیب 58% و 79% افزایش یافت (Lv et al., 2019). هدف از انجام این پژوهش افزایش تولید کاروتنوئیدهای ریزجلبک با استفاده از تغییر مواد مغذی (نیترات و فسفات) و یا افزودن فیتوهورمون (نفتالن استیک اسید) بود. برای این منظور، ریزجلبک *Chlorella* (کلرلا) به علت دارا بودن انواع مختلفی از کاروتنوئیدها شامل آستازانتین، ویولانتین، زآزانتین، لوتئین و β -کاروتن (Sathasivam & Ki, 2018)، انتخاب شد. کلرلا قادر به کاهش سطح کلسترول و کاهش فشار خون است (Paniagua-Michel 2015) و امروزه به عنوان مکمل غذایی سالم در بسیاری از کشورها مانند چین، ژاپن، اروپا و ایالات متحده استفاده می‌شود (Paniagua-Michel, 2015). در این پژوهش، اثر هر دو روش تغییر مواد مغذی و افزودن فیتوهورمون بر روی رشد و تولید رنگدانه‌های ریزجلبک خوراکی *Chlorella sorokiniana* بررسی شد. تا به حال اثر هورمون و تغییر مواد مغذی به‌طور همزمان بر روی یک ریزجلبک بررسی نشده است. برای این منظور، ابتدا غلظت بهینه فسفات و نیترات جهت تولید حداکثر کلروفیل و کاروتنوئیدها تعیین شد و سپس در غلظت بهینه بدست آمده اثر غلظت‌های مختلف از فیتوهورمون نفتالن استیک اسید بر روی میزان تولید کلروفیل و کاروتنوئیدها بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت ریزجلبک

ریزجلبک *Chlorella sorokiniana* IG-W-96 که از فاضلاب تصفیه خانه پرکندآباد مشهد خالص‌سازی شده است و با شماره‌ی دسترسی MF459965.1 در پایگاه NCBI ثبت شده است در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. برای کشت ریزجلبک کلرلا از محیط کشت BG11 استفاده شد. کشت در یک بطری ۱ لیتری (با حجم کاری 750 میلی‌لیتر) با چگالی نوری (OD) اولیه $0/075$ (در طول موج 680 نانومتر)، انجام شد. بطری حاوی ریزجلبک درون شیکر انکوباتور با دمای 25 ± 1 سانتی‌گراد قرار داده شد. برای نوردهی کشت در داخل شیکر انکوباتور از LED سفید با شدت نور 25000 لوکس (تایوان، Lutron، LX-1108) با چرخه روشنایی: تاریکی $8:16$ استفاده شد.

درون آون با دمای ۴۵ درجه قرار داده شد. پس از خشک شدن زیست توده، وزن آن با ترازو اندازه‌گیری شد.

آنالیز رنگدانه‌ها

برای آنالیز رنگدانه‌های کلرلا (کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها)، از روش جورج و همکاران با اندکی اصلاح استفاده شد (George et al., 2014). به میزان ۱ mL نمونه از محیط کشت حاوی ریزجلبک برداشته شد و بعد از ۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm، مایع رویی جدا شد و با ۱ mL متانول جایگزین شد. پس از ورتکس شدن، در تاریکی و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت قرار داده شد. پس از آن، زیست‌توده به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. جذب محلول بالایی نمونه در طول موج‌های ۶۶۵، ۶۵۲ و ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (آمریکا، Unico2100، UV-VIS2100) اندازه‌گیری شد. غلظت رنگدانه‌ها توسط معادلات ۱ تا ۳ محاسبه شد (Lichtenthaler, 1987).

$$\text{Chl a (mg/L)} = 16.72 \times A_{665} - 9.16 \times A_{652} \quad (۱)$$

$$\text{Chl b (mg/L)} = 34.09 \times A_{652} - 15.28 \times A_{665} \quad (۲)$$

$$\text{Car (mg/L)} = (1000 \times A_{470} - 1.63 \times \text{Chl a} - 104.9 \times \text{Chl b}) / 221 \quad (۳)$$

که در این روابط Chl a کلروفیل a، Chl b کلروفیل b و Car کاروتنوئیدها است.

نتایج و بحث

اثر نیترات و فسفات بر رشد

رشد ریزجلبک‌ها به شدت وابسته به غلظت نیترات و فسفات در محیط کشت است. در این پژوهش، میزان تغییرات رشد ریزجلبک با در نظر گرفتن غلظت‌های متفاوتی از نیترات و فسفات بررسی شد. نتایج حاصل از این آزمایشات در شکل ۱ نشان داده شده است. بیش‌ترین مقدار رشد در شرایط 0.25 g L^{-1} نیترات و 0.04 g L^{-1} فسفات بدست آمد که برابر با $0.06 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ است. با توجه به نتایج بدست آمده هنگامی که غلظت نیترات بسیار کم (0.04 g L^{-1}) است، تغییر غلظت فسفات اثری بر روی میزان رشد ندارد. با افزایش غلظت نیترات تا 0.25 g L^{-1} ، افزایش فسفات از 0.01 g L^{-1} به 0.04 g L^{-1} باعث افزایش غلظت زیست‌توده از $0.16 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}$ به $0.06 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ شد، اما افزایش بیش‌تر فسفات تا 0.16 g L^{-1} اثر چشمگیری بر روی رشد ندارد. هنگامی که نیترات در بالاترین میزان خود بود (0.25 g L^{-1})، افزایش فسفات از 0.01 g L^{-1} تا 0.04 g L^{-1} باعث کاهش رشد شد. بنابراین غلظت مناسب فسفات وابسته به غلظت نیترات است. در پژوهشی که بر روی *Chlorella regularis* انجام

جریان هوای فشرده به میزان 0.5 vvm حاوی ۶٪ حجمی دی‌اکسید کربن، پس از عبور از فیلتر $0.22 \mu\text{m}$ وارد بطری حاوی ریزجلبک شد. در انتهای فاز لگاریتمی وزن خشک ریزجلبک و میزان تولید رنگدانه آن اندازه‌گیری شد.

طراحی آزمایش‌ها

در تمام آزمایشات، همه مواد به جز NaNO_3 (منبع نیتروژن) و K_2HPO_4 (منبع فسفر) غلظت یکسانی داشتند، اما غلظت نیترات و فسفات متغیر بود. تمام غلظت‌ها بر اساس پیش‌آزمایش‌ها و محدودیت‌های کشت انتخاب شدند. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف از طرح کاملاً تصادفی آزمایش فاکتوریل و نرم‌افزار Minitab (ویرایش 21.1.0) استفاده شد. سطوح در نظر گرفته شده برای متغیرها (غلظت نیترات و فسفات) در هر آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است. آزمایشات دو بار تکرار شدند.

جدول ۱- سطوح در نظر گرفته شده برای غلظت نیترات و فسفات در

آزمایش‌های انجام شده

Table 1- The considered levels for the nitrate and phosphate concentration in the experiments

آزمایش Run	$\text{NaNO}_3 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)$	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)$
1	0.04	0.01
2	0.04	0.04
3	0.04	0.16
4	0.25	0.01
5	0.25	0.04
6	0.25	0.16
7	1.50	0.01
8	1.50	0.04
9	1.50	0.16

غلظت فیتوهورمون

برای بررسی اثر فیتوهورمون بر رشد و تولید رنگدانه از فیتوهورمون نفتالن استیک اسید استفاده شد. محیط کشت BG11 تهیه شد و سپس به آن نفتالن استیک اسید اضافه شد. به‌طوری‌که غلظت نهایی فیتوهورمون در محیط کشت برابر ۰، ۰.۲/۵، ۰.۷/۵، ۱۰ و ۱۲ ppm بود.

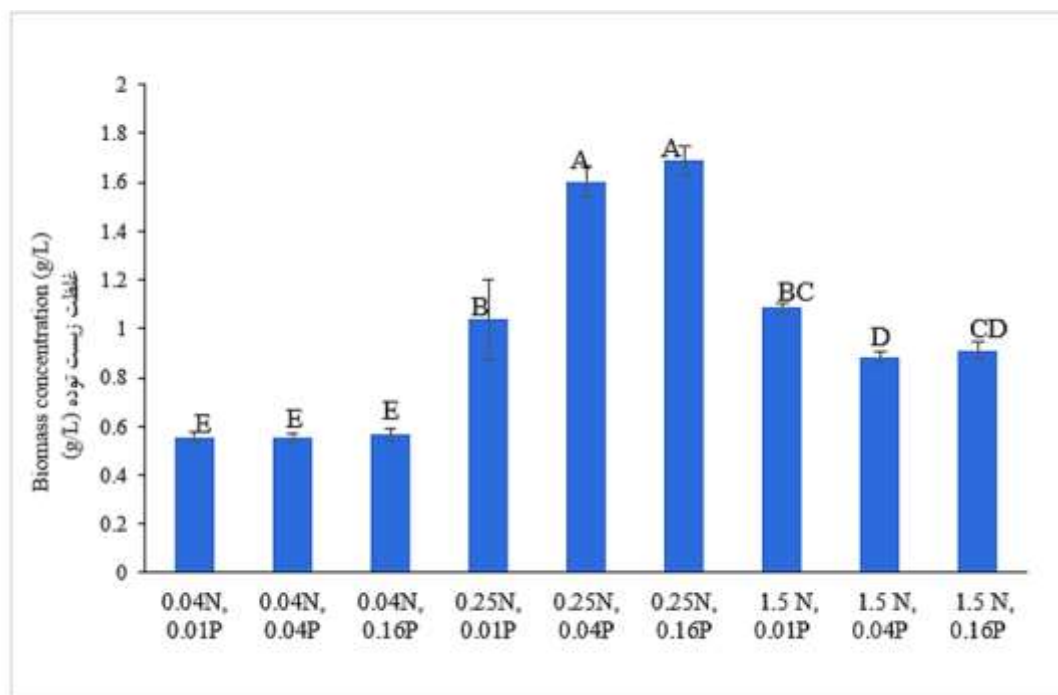
روش‌های آنالیز

تعیین وزن خشک

در پایان مرحله رشد جهت اندازه‌گیری میزان زیست‌توده، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول ریزجلبک به فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۴۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع شفاف رویی جدا شد و زیست‌توده باقی مانده دوبار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس زیست‌توده‌ی مرطوب، جهت تعیین وزن خشک به مدت ۲۴ ساعت

نیتрат آن‌ها متفاوت است (آزمایش‌های ۲، ۵ و ۸)، کاهش نیترات از $1/5 \text{ g L}^{-1}$ به $0/25 \text{ g L}^{-1}$ باعث افزایش رشد ریزجلیک تا $81/8\%$ شد، به‌طوری‌که غلظت زیست‌توده از $0/88 \pm 0/02 \text{ g L}^{-1}$ به $0/25 \text{ g L}^{-1}$ رسید. اما کاهش بیش‌تر نیترات از $0/25 \text{ g L}^{-1}$ تا $0/04 \text{ g L}^{-1}$ باعث کاهش رشد به میزان $65/6\%$ شد. برای رسیدن به حداکثر میزان رشد لازم است که غلظت مناسب از هر کدام از مواد مغذی تعیین شوند (Venkatesan et al., 2013).

شد، مشاهده شد که در شرایط کمبود نیترات، افزودن فسفات به محیط می‌تواند میزان رشد را افزایش دهد (Fu et al., 2017). به‌طور کلی بیش‌ترین میزان رشد مربوط به آزمایشاتی است که میزان نیترات آن‌ها $0/25 \text{ g L}^{-1}$ است و نیترات بیش‌تر و کم‌تر از این مقدار باعث کاهش رشد شد. این نتیجه وابسته به میزان فسفات نیست و برای تمام غلظت‌های فسفات صادق است. برای مثال، با مقایسه‌ی نتایج آزمایشاتی که میزان فسفات آن‌ها $0/04 \text{ g L}^{-1}$ است و فقط



شکل ۱- اثر غلظت‌های متفاوت نیترات و فسفات بر روی غلظت زیست توده کلرلا

N نیترات و P فسفات است. اعداد غلظت‌ها را نشان می‌دهند. براساس آزمون توکی، نتایج با حروف یکسان تفاوت معنادار ندارند.

Fig. 1. The effect of different concentrations of nitrate and phosphate on the biomass concentrations of *Chlorella*
N nitrate and P phosphate. The numbers show the concentrations. The results with the same letters are not significantly different.

تا $175 \mu\text{M}$ دیگر باعث بالا رفتن غلظت زیست‌توده نشد (Khozin-Goldberg & Cohen, 2006).

اثر نیترات و فسفات بر غلظت رنگدانه‌ها

نیترات و فسفات از جمله مواد مغذی محیط کشت هستند که تغییر غلظت آن‌ها اثر زیادی بر روی تولید رنگدانه‌ها می‌گذارد. در جدول ۲ غلظت رنگدانه‌ها در غلظت‌های مختلف از نیترات و فسفات نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان تولید کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها در شرایط $1/5 \text{ g L}^{-1}$ نیترات و $0/04 \text{ g L}^{-1}$ فسفات به‌ترتیب برابر $0/80 \pm 0/34/58$ ، $0/42 \pm 0/60$ و $6/75 \pm 0/21 \text{ mg L}^{-1}$ بدست آمد. هنگامی که غلظت نیترات بسیار کم ($0/04 \text{ g L}^{-1}$) است، تغییر غلظت

مطالعات گذشته نیز این نتایج را تأیید می‌کنند. افزودن مقدار جزئی نیترات به محیط کشت *Schizochytrium* sp. باعث افزایش ۴۴ درصدی غلظت زیست‌توده شد. در صورتی که افزودن مقدار زیاد نیترات بی‌فایده بود و باعث افزایش بیش‌تر غلظت زیست‌توده نشد (Ju et al., 2020). در پژوهش دیگری، میزان رشد *C. vulgaris* با خوراک‌دهی $0/13 \text{ g L}^{-1}$ نیترات، حدود ۴۶٪ افزایش یافت (Mujtaba et al., 2012). افزایش فسفات از $0/22 \text{ g L}^{-1}$ تا $0/44 \text{ g L}^{-1}$ باعث افزایش رشد *Botryococcus braunii* شد (Ruangsomboon, 2012). افزایش فسفات از ۰ تا $52/5 \mu\text{M}$ نیز باعث افزایش غلظت زیست‌توده *Monodus subterraneus* شد، اما افزایش بیش‌تر فسفات

باعث افزایش کلروفیل a و b و کاروتنوئیدهای *Isochrysis galbana* شد (Zarrinmehr et al., 2020). به طور مشابه در پژوهش دیگری افزایش نیتрат از ۰ تا ۳۰ mM باعث افزایش شدید کلروفیل *kessleri* *Chlorella* شد (Shrestha et al., 2020). برعکس، کاهش نیترات باعث شد تا میزان کلروفیل *Scenedesmus* از ۷/۷۱ به $\mu\text{g mL}^{-1}$ ۲/۶۹ و میزان کاروتنوئیدها از ۱/۳ به $\mu\text{g mL}^{-1}$ ۰/۶۱ کاهش یابد (Pancha et al., 2014). گرسنگی نیترات باعث کاهش کاروتنوئیدها و کلروفیل *Acutodesmus dimorphus* شد (Rani & Maróti, 2021). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۹ انجام شد، مشاهده شد که کاهش میزان نیترات و فسفات در محیط کشت *T. lutea*، میزان تولید کلروفیل a، کلروفیل c و فوکوزانتین را به شدت کاهش می‌دهد (Huang et al., 2019). افزایش غلظت فسفات باعث بالا رفتن تولید رنگدانه‌های *Tetraselmis* (Dammak et al., 2017) و *C. kessleri* (Shrestha et al., 2020) شد.

فسفات اثر معنا داری بر میزان تولید هیچ کدام از رنگدانه‌ها ندارد. با افزایش نیترات تا g L^{-1} ۰/۲۵، تغییر غلظت فسفات همچنان اثر معناداری بر روی کلروفیل b و کاروتنوئیدها ندارد و فقط میزان کلروفیل a تحت تأثیر غلظت فسفات قرار دارد، به طوری که با افزایش غلظت فسفات از g L^{-1} ۰/۰۱ تا g L^{-1} ۰/۱۶ غلظت کلروفیل a حدود ۳۸/۹٪ کاهش می‌یابد. تغییر غلظت فسفات تنها در مواردی که غلظت نیترات بالا (g L^{-1} ۱/۵) است، باعث تغییر در غلظت کل رنگدانه‌ها می‌شود. در غلظت g L^{-1} ۱/۵ از نیترات، افزایش غلظت فسفات از g L^{-1} ۰/۰۱ به g L^{-1} ۰/۰۴ باعث ۲/۲۳ و ۲/۴۵ برابر شدن غلظت کلروفیل a و b و ۱/۶۵ برابر شدن غلظت کاروتنوئیدها شد. البته افزایش بیش‌تر غلظت فسفات (g L^{-1} ۰/۱۶) تأثیری بر میزان رنگدانه‌ها ندارد. همان‌طور که از نتایج مشخص است، افزایش نیترات از g L^{-1} ۰/۰۴ تا g L^{-1} ۱/۵ باعث افزایش تولید رنگدانه‌ها شد (بدون توجه به غلظت فسفات). پژوهش‌های گذشته نیز درستی این نتایج را تأیید می‌کنند. در پژوهشی، افزایش نیترات از صفر تا mg L^{-1} ۷۲

جدول ۲- اثر غلظت نیترات و فسفات بر میزان تولید رنگدانه‌ها

Table 2- The effect of nitrate and phosphate concentration on the production of pigments

Run	NaNO_3 ($\frac{\text{g}}{\text{L}}$)	K_2HPO_4 ($\frac{\text{g}}{\text{L}}$)	Chlorophyll a (mg/L) ($\frac{\text{mg}}{\text{L}}$) a کلروفیل	Chlorophyll b (mg/L) ($\frac{\text{mg}}{\text{L}}$) b کلروفیل	Carotenoids (mg/L) ($\frac{\text{mg}}{\text{L}}$) کاروتنوئیدها
1	0.04	0.01	2.11±0.01 ^{F*}	0.73±0.16 ^E	1.34±0.02 ^F
2	0.04	0.04	2.56±0.49 ^F	0.97±0.25 ^{DE}	1.45±0.08 ^F
3	0.04	0.16	2.05±0.12 ^F	0.85±0.05 ^{DE}	1.37±0.04 ^F
4	0.25	0.01	9.23±0.32 ^{CD}	3.17±0.32 ^C	3.87±0.2 ^{CD}
5	0.25	0.04	7.06±0.45 ^{DE}	2.60±0.14 ^{CD}	3.43±0.1 ^{DE}
6	0.25	0.16	5.64±0.07 ^E	1.93±0.06 ^{CDE}	3.09±0.13 ^E
7	1.50	0.01	10.99±1.03 ^C	5.13±0.64 ^B	4.05±0.35 ^C
8	1.50	0.04	24.5±0.8 ^A	12.59±0.42 ^A	6.70±0.14 ^A
9	1.50	0.16	21.91±0.89 ^B	12.49±1.09 ^A	5.55±0.035 ^B

* نتایج با حروف یکسان تفاوت معنادار ندارند.

*The results with the same letters are not significantly different.

آنالیز آماری نتایج

آنالیز آماری نتایج براساس غلظت کاروتنوئیدها انجام شد. مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ در جدول ۳ نشان می‌دهد که اثر فاکتورها و مدل برازش شده معنادار بوده و به طور اتفاقی یا به دلیل پارازیت‌ها و اختلالات نمی‌باشد. علاوه بر این، مقدار ضریب تعیین $R^2=99/68$ نشان می‌دهد که مدل می‌تواند تقریباً کل تغییرات را توضیح دهد. به منظور بررسی صحت داده‌ها و آنالیز واریانس، از رسم منحنی‌های مقادیر باقی مانده استفاده شد. باقیمانده‌ها یک ابزار اضافی به منظور بررسی صحت نتایج هستند. شکل ۲- A نمودار احتمال نرمال باقیمانده‌ها برای غلظت کاروتنوئیدها را نشان می‌دهد. در این نمودار نقاط باقیمانده به

برخلاف رشد، نه تنها تولید رنگدانه با افزایش بیش از حد نیترات کاهش نیافت، بلکه حداکثر میزان تولید رنگدانه‌ها نیز مربوط به آزمایشاتی بود که میزان نیترات حداکثر بود. البته این مورد که غلظت بهینه نیترات برای رسیدن به حداکثر رشد و رنگدانه با یکدیگر برابر نیست در پژوهش‌های گذشته نیز تأیید شده است (Dammak et al., 2017; Montes-González et al., 2021). در پژوهشی، حداکثر غلظت زیست‌توده و کاروتنوئیدها *Isochrysis galbana* به ترتیب در غلظت mg L^{-1} ۱۴۴ و mg L^{-1} ۷۲ از نیترات بدست آمد (Zarrinmehr et al., 2020). برخی از محققان به این مورد اشاره کردند که در شرایط ایجاد استرس مانند افزایش شدت نور، دمای بالا، اگر چه رشد ریزجلبک کاهش می‌یابد اما تولید کاروتنوئیدها جهت حفظ ریزجلبک در مقابل شرایط استرسی، افزایش می‌یابد.

طور مطلوبی در مجاورت خط مستقیم قرار گرفته‌اند. این مجاورت ثابت می‌کند که خطاها به‌طور نرمال توزیع شده‌اند. همچنین خطاها دارای میانگین تقریباً برابر با صفر و ثابت هستند. شکل ۲-۲-B منحنی باقیمانده‌ها بر حسب ترتیب آزمایشات را نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود در این شکل الگوی خاصی مشاهده نمی‌شود، یعنی آزمایشات تماماً به‌طور تصادفی انجام شده‌اند که این خود دلیلی بر مستقل بودن خطاها است. در نتیجه دو پارامتر غلظت نیترات و غلظت فسفات نقش مهمی در میزان تولید رنگدانه‌ها (کاروتنوئیدها) داشتند.

اثر فیتوهورمون بر رشد و غلظت کاروتنوئید

بر حسب نتایج آزمایش‌ها، بیش‌ترین مقدار رشد در شرایط 0.25 g L^{-1} نیترات و 0.04 g L^{-1} فسفات بدست آمد. اما بیش‌ترین

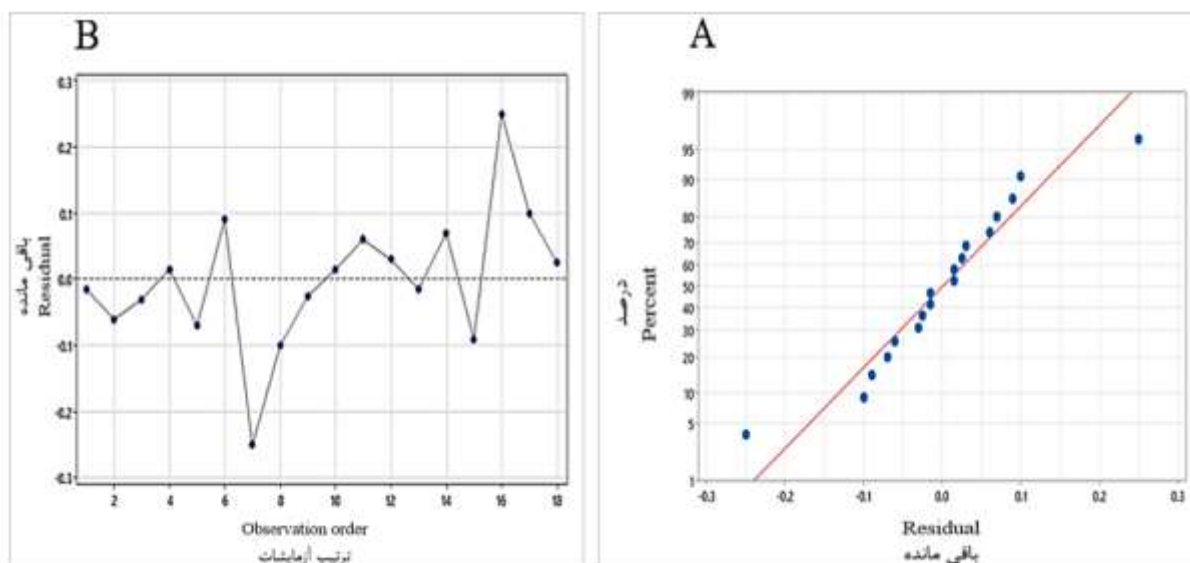
غلظت رنگدانه‌ها مربوط به شرایط $1/5 \text{ g L}^{-1}$ نیترات و 0.04 g L^{-1} فسفات بود. با توجه به این که هدف افزایش غلظت رنگدانه بود، پس به محیط کشت حاوی $1/5 \text{ g L}^{-1}$ نیترات و 0.04 g L^{-1} فسفات، غلظت‌های مختلف از فیتوهورمون افزوده شد و رشد و غلظت رنگدانه بررسی شد. نتایج نشان داد که فیتوهورمون اثر چشمگیری بر رشد ندارد (نتایج نشان داده نشد). اما همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، افزودن $2/5 \text{ ppm}$ نفتالن استیک اسید به محیط کشت باعث افزایش $20/5\%$ در میزان کلروفیل a شد. غلظت کاروتنوئیدها با افزایش $26/71\%$ درصدی از $0.21 \text{ mg L}^{-1} \pm 0.75$ به $0.49 \text{ mg L}^{-1} \pm 0.49$ رسید. افزودن فیتوهورمون اثر چشمگیری بر غلظت میزان کلروفیل b نداشت. به‌طور کلی غلظت‌های بسیار بالای نفتالن استیک اسید غلظت رنگدانه‌ها را افزایش نداد.

جدول ۳- آنالیز آماری نتایج بر اساس غلظت کاروتنوئیدها

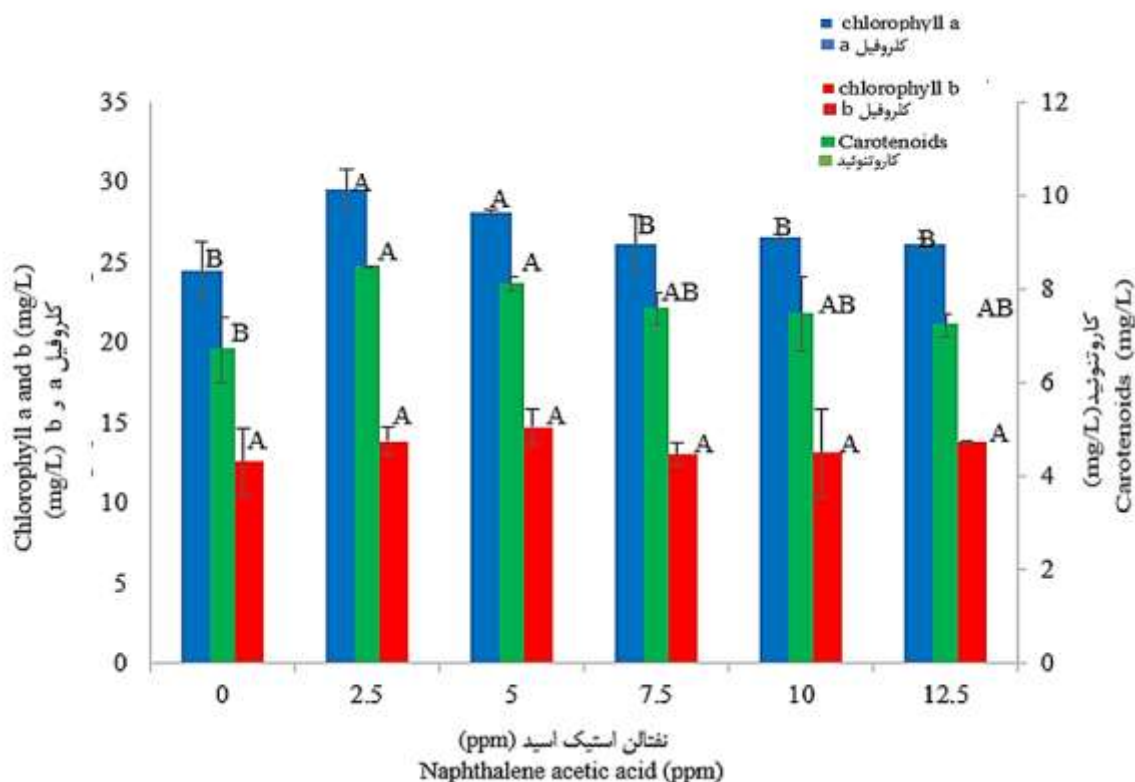
براساس نتایج بدست آمده از نرم افزار Minitab، مقدار $R^2\text{-sq}$ برابر $99/68\%$ بود.

Table 3- Statistical analysis of the results based on the concentration of carotenoids
Based on the results obtained from Minitab software, the value of $R^2\text{-sq}$ was equal to 99.68%.

Source منبع	DF درجه آزادی	Adj SS مجموع مجزورات	Adj MS میانگین مجزورات	F-Value مقدار-F	P-Value مقدار-P
Model مدل	8	56.8355	7.1044	351.03	0.000
Linear خطی	4	50.9913	12.7478	629.87	0.000
Nitrate نیترات	2	49.1379	24.5690	1213.95	0.000
Phosphate فسفات	2	1.8534	0.9267	45.79	0.000
2-Way Interactions برهم کنش اثر نیترات و فسفات	4	5.8442	1.4611	72.19	0.000
Error خطا	9	0.1822	0.0202		
Total کل	17	57.0177			



شکل ۲- آنالیز باقی مانده ها. (A) نمودار احتمال نرمال بر حسب باقیمانده ها. (B) منحنی باقیمانده ها بر حسب ترتیب آزمایشات
Fig. 2. Analysis of residuals. A) Normal probability diagram according to residuals. B) The curve of the residuals according to the order of the test



شکل ۳- اثر نفتالن استیک اسید بر غلظت رنگدانه ها
براساس آزمون توکی، نتایج با حروف یکسان تفاوت معنادار ندارند.
Fig. 3. The effect of naphthalene acetic acid on the concentration of pigments
The results with the same letters are not significantly different.

نتیجه گیری

نیترا ت و فسفات از جمله مواد مغذی محیط کشت ریز جلبک ها هستند. افزایش این دو ماده مخصوصاً "نیترا ت، باعث افزایش غلظت کاروتنوئیدهای ریز جلبک می شود. افزودن فیتوهورمون ها به محیط کشت سبب تحریک تولید رنگدانه ها از جمله کاروتنوئیدها می شود. لذا فیتوهورمون ها ترکیبات مناسبی برای افزایش تولید کاروتنوئیدها در ریز جلبک هستند.

در پژوهش های گذشته نیز مشاهده شد که ۰/۱ mM ایندول استیک اسید و ۱ mM نفتالن استیک اسید میزان کاروتنوئیدهای *Chlorella vulgaris* را به ترتیب ۱۰/۷۷٪ و ۴۱/۵۳٪ افزایش دادند (Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz, 2014). همچنین کلروفیل *C. sorokiniana* در حضور ایندول استیک اسید، کینتین و جیبرلیک اسید افزایش یافت (Guldhe et al., 2019). در پژوهشی که در سال ۲۰۲۰ انجام شد، مشاهده شد که جهت سنتز لوتئین در دو ریز جلبک *Kirchneriella aperta* و *Brachiomonas submarina* افزودن متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید مؤثرتر از افزایش غلظت نیترا ت و فسفات بودند (Mc Gee et al., 2020).

منابع

- Dammak, M., Hadrich, B., Miladi, R., Barkallah, M., Hentati, F., Hachicha, R., Laroche, C., Michaud, P., Fendri, I. & Abdelkafi, S. (2017). Effects of nutritional conditions on growth and biochemical composition of *Tetraselmis* sp. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0378-1>
- Dao, G.-H., Wu, G.-X., Wang, X.-X., Zhuang, L.-L., Zhang, T.-Y. & Hu, H.-Y. (2018). Enhanced growth and fatty acid accumulation of microalgae *Scenedesmus* sp. LX1 by two types of auxin. *Bioresource Technology*, 247, 561-567. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.079>
- Fu, L., Cui, X., Li, Y., Xu, L., Zhang, C., Xiong, R., Zhou D. & Crittenden, J.C. (2017). Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation. *Chemical Engineering Journal*, 330, 566-572. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.182>
- George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T. & Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*—A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology*, 171, 367-374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>
- Guldhe, A., Renuka, N., Singh P., & Bux, F. (2019). Effect of phytohormones from different classes on gene expression of *Chlorella sorokiniana* under nitrogen limitation for enhanced biomass and lipid production. *Algal Research*, 40, 101518. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101518>
- Huang, B., Marchand, J., Thiriet-Rupert, S., Carrier, G., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Moreau, B., Morant-Manceau, A., Bougaran, G., & Mimouni, V. (2019). Betaine lipid and neutral lipid production under nitrogen or phosphorus limitation in the marine microalga *Tisochrysis lutea* (Haptophyta). *Algal Research*, 40, 101-506. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101506>
- Ju, J.-H., Ko, D.-J., Heo, S.-Y., Lee, J.-J., Kim, Y.-M., Lee, B.-S., Kim, M.-S., Kim, C.-H., Seo, J.-W., & Oh, B.-R. (2020). Regulation of lipid accumulation using nitrogen for microalgae lipid production in *Schizochytrium* sp. ABC101. *Renewable Energy*, 153, 580-587. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.047>
- Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water euglenophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 696-701. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. pp 350-382. *Methods in enzymology*, Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liu, J., Yuan, C., Hu G., & Li, F. (2012). Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(8), 2127-2137. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9639-2>
- Lv, H., Wang, Q.-e., Wang, S., Qi, B., He, J., & Jia, S. (2019). Enhancing biomass production of *Dunaliella salina* via optimized combinational application of phytohormones. *Aquaculture*, 503, 146-155.
- Maswanna, T., & Maneeruttanarungroj, C. (2022). Identification of major carotenoids from green alga *Tetraspora* sp. CU2551: partial purification and characterization of lutein, canthaxanthin, neochrome, and β -carotene. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(8), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03320-6>

13. Mc Gee, D., Archer, L., Fleming, G.T., Gillespie, E., & Touzet, N. (2020). The effect of nutrient and phytohormone supplementation on the growth, pigment yields and biochemical composition of newly isolated microalgae. *Process Biochemistry*, 92, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.001>
14. Montes-González, O., González-Silvera, A., Valenzuela-Espinoza, E., Santamaría-del-Ángel, E., & López-Calderón, J. (2021). Effect of light intensity and nutrient concentration on growth and pigments of the green microalga *Tetraselmis suecica*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(3), 431-441.
15. Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G., & Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, 123, 279-283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.057>
16. Nwoba, E.G., Ogbonna, C.N., Ishika, T., & Vadiveloo, A. (2020). Microalgal pigments: a source of natural food colors. *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*, 81-123. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_3
17. Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., & Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1429-1441. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3170-1>
18. Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 156, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>
19. Paniagua-Michel, J. (2015). Microalgal nutraceuticals. pp 255-267. *Handbook of marine microalgae*, Elsevier, México. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.000169>
20. Park, W.-K., Yoo, G., Moon, M., Kim, C.W., Choi, Y.-E., & Yang, J.-W. (2013). Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(5), 1128-1142. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0386-9>
21. Piotrowska-Niczyporuk, A., & Bajguz, A. (2014). The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Growth Regulation*, 73(1), 57-66. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9867-7>
22. Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka-Szelewa, E., & Bralska, M. (2018). Exogenously applied auxins and cytokinins ameliorate lead toxicity by inducing antioxidant defence system in green alga *Acutodesmus obliquus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 535-546. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.09.038>
23. Rani, V., & Maróti, G. (2021). Assessment of nitrate removal capacity of two selected eukaryotic green microalgae. *Cells*, 10(9), 2490. <https://doi.org/10.3390/cells10092490>
24. Ruangsomboon, S. (2012). Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. *Bioresource Technology*, 109, 261-265. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.025>
25. Sathasivam, R., & Ki, J.-S. (2018). A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Marine Drugs*, 16(1), 26. <https://doi.org/10.3390/md16010026>
26. Shrestha, N., Dandinpet, K.K., & Schneegurt, M.A. (2020). Effects of nitrogen and phosphorus limitation on lipid accumulation by *Chlorella kessleri* str. UTEX 263 grown in darkness. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 2795-2805. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02144-x>
27. Shu, C.H., Tsai, C.C., Liao, W.H., Chen, K.Y., & Huang, H.C. (2012). Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(5), 601-607. <https://doi.org/10.1002/jctb.2750>
28. Simionato, D., Basso, S., Giacometti, G.M., & Morosinotto, T. (2013). Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. *Biophysical Chemistry*, 182, 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.017>
29. Sirisuk, P., Ra, C.-H., Jeong, G.-T., & Kim, S.-K. (2018). Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination. *Bioresource Technology*, 253, 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.020>
30. Udayan, A., Pandey, A.K., Sirohi, R., Sreekumar, N., Sang, B.-I., Sim, S.J., Kim, S.H., & Pandey, A. (2022). Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals. *Phytochemistry Reviews*, 1-28. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09784-y>
31. Venkatesan, S., Swamy, M.S., Jayavel, D., Senthil, C., & Bhaskar, S. (2013). Effects of nitrate and phosphate on total lipid content and pigment production in *Botryococcus braunii* Kutzinger KM-104. *Journal of Applied Phycology*, 23(6): 1031-1037. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9636-1>
32. Zarrinmehr, M.J., Farhadian, O., Heyrati, F.P., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M., & Daneshvar, E. (2020). Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *Journal of Aquatic Research*, 46(2), 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003>



Effect of Edible Coatings of Alginate and *Oliveria decumbens* Essential Oil on Physicochemical, Microbial and Sensory Properties of Grated Carrots During Shelf Life

A. Hosseini¹, N. Zamindar^{2*}, Y. Esmaili³

1, 2 and 3- Graduated Master, Associate Professor and Graduated Master, Department of Food Science and Technology, College Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: n.zamindar@khuisf.ac.ir)

Received: 2022.10.05
Revised: 2022.11.16
Accepted: 2022.12.05
Available Online: 2022.12.07

How to cite this article:

Hosseini, A., Zamindar, N., & Esmaili, Y. (2023). Effect of edible coatings of alginate and *Oliveria decumbens* essential oil on physicochemical, microbial and sensory properties of grated carrots during shelf life. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5), 675-692. (In Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.78868.1207>

Introduction

Today, carrots are widely used in freshly cut products, including ready to eat salads, however, its shelf life is reduced due to the damage caused on the texture of the product which accelerate the reduction of nutritional value as well as the growth of microorganisms, (Azizian *et al.*, 2020). To increase the shelf life of freshly cut products, it is recommended to use coatings on the surface of these products. Alginate is a hydrophilic biopolymer and having unique colloidal characteristics, it demonstrates a suitable coating function. Olivas *et al.* (2008) showed that by coating fresh apple slices with alginate and antimicrobial agents increased the shelf life of apple and decreased weight loss. Among the native plants of Iran, we can mention the *Oliveria* plant, which belongs to the Amblifra family. The aerial parts of this plant have a significant amount of essential oils (EOs). Researches by Amin *et al.* (2005) on the antimicrobial properties of *Oliveria* essential oils have shown a broad-spectrum antimicrobial activity against all studied organisms, and this effect is comparable to that of commercial antibiotics. Packaging with modified atmosphere is one of the best ways to increase the shelf life of fruits and vegetables. The purpose of this study was to investigate the effect of alginate and *Oliveria* essential oils on the physicochemical and microbial characteristics of grated carrots in polypropylene packages with modified atmosphere during storage.

Methods

Essential oil of *Oliveria* plant was extracted, dehydrated by sodium sulfate and placed in sealed glass container and stored at 4°C until using. Carrots prepared from Wilmoren cultivar. An industrial crusher crushed the carrots, and samples were coated by treatment solutions. Two treatments of coating were prepared, one as control with 0% and the other one with 1.5% alginate with stirring and moderate heat (50-60°C) (Lu *et al.*, 2009). Then the *Oliveria* EO was added to the alginate solution at the specified concentration. The resulting solution was deaerated at 25°C.

T1: control sample (without coating)

T2: 1.5% alginate

T3: 150 ppm *Oliveria* EO

T4: 250 ppm *Oliveria* EO

T5: 1.5% alginate and 150 ppm of *Oliveria* EO



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.78868.1207>

T6: 1.5% alginate and 250 ppm of *Oliveria* EO

After weighing (250 g), the grated carrots (control and coated) were placed in 10 g polypropylene packages of suitable food grade in dimensions of 50 × 190 × 144 cm and the package was injected with 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. The packages were then stored in the refrigerator for 12 days at 4±1°C. All experiments were performed on days 1, 3, 6, 9, and 12.

Evaluation of Chemical, Microbial and Sensory Characteristics

A pH meter used for pH determination (Rad *et al.*, 2020). The acidity measured based on Rocha *et al.* (2007) method.

The weight was reported using pre and post-storage weight. The carotenoid concentration calculated by Rocha *et al.* (2007) method. Total soluble solids determined by refractometer (Rad *et al.*, 2020). Ascorbic acid content measured by Falahi *et al.* (2013) method. The L*, a*, b* and WI (white index) indicators of grated carrots evaluated by Hunter lab system. A 5-point hedonic test was used to assess sensory attributes (Ajnevardi *et al.*, 2002). The internal gas concentration evaluated by Ullsten & Hedenqvist (2003) method. Total count microorganisms, mold, and yeast were counted according to the method of Azizian *et al.* (2020).

Data Analysis

This study was conducted in a completely randomized design with factorial form to investigate the effect of independent variables of type of alginate coating (2 levels), essential oil (3 levels) and time (5 levels) on the physicochemical properties of grated carrots (3 replications) and total counting, mold and yeast (2 replications). Mean comparison was performed using LSD test at 5% probability level and SPSS software was used to statistically analyze data.

Result

The results showed that the level of acidity, carotenoid and acid ascorbic, the amount of L* and sensory (color, quality, flavor, odor) scores reduced during time. By contrast the level of pH, weight loss, the amount of a*, b*, CO₂, TSS and total counts increased ($P<0.05$). Also, with increasing the concentration of essential oils and alginates, the amount of acidity, carotenoids, ascorbic acid, L* increased and pH, weight loss, TSS, a*, b*, CO₂ and total count decreased ($P<0.05$). *Escherichia coli*, mold and yeast count of the samples did not show any growth from the mentioned treatments until the 12th day. Overall, the *Oliveria* essential oil and alginate were effective in improving the properties of grated carrots under the modified atmosphere during storage.

Conclusion

The study showed that *Oliveria* EO and alginate added to grated carrots in modified atmosphere packaging during storage was effective in reducing respiration, water loss, microbial load and increased the shelf life. Treatment containing 1.5% alginate and 250 ppm *Oliveria* EO showed the best chemical, microbial and sensory characteristics. The results indicated that by packing under modified atmosphere and coating by alginate and *Oliveria* EO, a new carrot product provided to the market with maintaining durability and quality characteristics during storage.

Keywords: Alginate, Modified atmosphere, *Oliveria decumbens* essential oil, Polypropylene

مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲، ص. ۶۷۵-۶۹۲

اثر پوشش خوراکی آلزینات و اسانس لعل کوهستان بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی هویج رنده شده طی زمان ماندگاری

علی حسینی^{۱*} - نفیسه زمین دار^{۲*} - یاسمن اسمعیلی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۴

چکیده

تلاش برای کاهش ضایعات غذایی اولویت صنعت غذا است. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر پوشش آلزینات و اسانس لعل کوهستان بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی هویج رنده شده در طول انبارداری بود. هویج‌های رنده شده (شاهد و پوشش‌دهی شده) پس از توزین تحت اتمسفر اصلاح شده در بسته‌های پلی پروپیلنی بسته‌بندی و به مدت ۱۲ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به‌این‌منظور، آزمون‌های رنگ، اسید آسکوربیک و مواد جامد محلول کل، اسیدیت، pH، دی‌اکسیدکربن، کاهش وزن و کاروتنوئید (۳ تکرار) و شمارش کلی و کپک مخمر (۲ تکرار) در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل با ۶ تیمار با آلزینات ۱/۵ درصد و غلظت‌های مختلف اسانس لعل کوهستان (۱۵۰ و ۲۵۰ ppm) و نمونه‌برداری در روزهای ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ انجام شد. نتایج نشان داد میزان اسیدیت، کاروتنوئید و اسید آسکوربیک، مقدار L^* و ویژگی‌های حسی (رنگ، مقبولیت، عطر و طعم) با توجه به گذشت زمان کاهش و میزان pH، کاهش وزن، مقادیر a^* ، b^* ، گاز دی‌اکسیدکربن، مواد جامد محلول کل و شمارش کلی افزایش یافت ($P < 0.05$). همچنین با افزایش غلظت اسانس و آلزینات، میزان اسیدیت، کاروتنوئید، اسید آسکوربیک، L^* افزایش و مقادیر pH، کاهش وزن، مواد جامد، a^* ، b^* ، کربن دی‌اکسید و شمارش کلی کاهش یافت ($P < 0.05$). نتایج حاصل از شمارش کپک و مخمر نمونه‌ها هیچ‌گونه رشدی از شاخص‌های مذکور تا روز ۱۲ را نشان نداد. در مجموع اسانس لعل کوهستان و آلزینات بر بهبود ویژگی‌های هویج رنده شده تحت اتمسفر اصلاح شده در طول انبارداری مؤثر بود.

واژه‌های کلیدی: آلزینات، اتمسفر اصلاح شده، اسانس لعل کوهستان، پلی پروپیلن

مقدمه

افزایش مصرف یوه و سبزی‌ها در رژیم‌های غذایی توصیه می‌شود؛ هویج یکی از مهم‌ترین سبزی‌ها در سراسر جهان است. امروزه از هویج در تهیه فراورده‌های تازه برش خورده از جمله در تهیه سالادهای آماده استفاده فراوانی می‌شود، ولی آسیب رسیدن به بافت محصول و تسریع در کاهش ارزش غذایی و همچنین رشد میکروب‌ها سبب کاهش مدت ماندگاری آن شده است (Zamindar et al., 2020). مطالعه‌های قبلی عمر مفید هویج‌های با حداقل فراوری را ۴ الی ۵ روز نشان دادند (Ayhan et al., 2008).

استفاده از پوشش خوراکی محافظ بر روی این محصولات می‌تواند سبب افزایش ماندگاری آنها گردد (Esmaeili et al., 2021). آلزینات یک بیوپلیمر آب‌دوست است و با دارا بودن خواص کلونیدی منحصر به فرد، عملکرد پوششی مناسبی را نشان می‌دهد (Acevedo et al., 2010). از جمله خواص کاربردی آلزینات می‌توان به قابلیت تشکیل ژل، افزایش استحکام بافت‌ها، پایدار کنندگی، قابلیت تشکیل فیلم و پوشش خوراکی و همچنین حفظ ظرفیت نگهداری آب، محافظت در برابر فساد میکروبی و مقاومت در برابر اکسیداسیون اشاره کرد (Cho

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

(*- نویسنده مسئول: Email: n.zamindar@khuif.ac.ir)

- ۳: اسانس لعل کوهستان ۱۵۰ ppm
 ۴: اسانس لعل کوهستان ۲۵۰ ppm
 ۵: آلزینات ۱/۵ درصد و اسانس لعل کوهستان ۱۵۰ ppm
 ۶: آلزینات ۱/۵ درصد و اسانس لعل کوهستان ۲۵۰ ppm

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه لعل کوهستان

گیاه لعل کوهستان از منطقه کازرون (استان فارس) تهیه گردید. پس از خشک کردن گیاه، با دستگاه کلونجر به مدت ۶ ساعت از اندام هوایی گیاه اسانس‌گیری شد. سپس از اسانس جمع‌آوری شده توسط سولفات سدیم خشک (Sigma، ساخت آلمان) آب‌گیری شد. در نهایت در ظرف شیشه‌ای غیرقابل نفوذ قرار داده و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Mogharabi et al., 2020).

آماده‌سازی هویج

ضد عفونی هویج‌های تهیه شده (رقم ویلمورن) با محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر هیپوکلریت سدیم (Merck، ساخت آلمان) به مدت ۱ دقیقه انجام گردید و ۲ بار با آب سرد برای زدودن گل‌ولای شسته شدند. هویج‌ها، سرزنی و پوست‌گیری شد و به وسیله خردکن صنعتی (fam، مدل fv-2d Corporations، ساخت بلژیک) عمل خرد کردن هویج‌ها (ضخامت ۲/۵ میلی‌متر و قطر ۴۰ میلی‌متر) انجام شد و هویج‌های رنده شده پس از جداسازی آب سطحی به وسیله سانتریفیوژ (Nuve، ساخت ترکیه)، در محلول تیمارهای مورد آزمایش قرار گرفتند (Mogharabi et al., 2020).

آماده‌سازی محلول آلزینات

محلول آلزینات (Sigma، ساخت آمریکا) در دو غلظت ۰ و ۱/۵ درصد وزنی-حجمی همراه با هم زدن در آب مقطر به عنوان حلال و با گرمای ملایم (۵۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد) تهیه گردید (Lu et al., 2009) و برای جلوگیری از شکنندگی به آن ۲ درصد وزنی-حجمی گلیسرول (Sigma، ساخت آمریکا) اضافه شد (Rojas-Graü et al., 2007). جهت یکنواخت‌سازی آن از یک همزن مغناطیسی (Heidolph، ساخت آلمان) استفاده شد (Lu et al., 2009). سپس اسانس لعل کوهستان با غلظت‌های تهیه شده به محلول آلزینات اضافه شد و با استفاده از مخلوط کن (Heidolph، ساخت آلمان) با سرعت ۷۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱/۵ دقیقه به طور یکنواخت توزیع گردید. محلول تشکیل شده تحت خلا در ۲۵ درجه سانتی‌گراد هوا گیری شد. ۲۵۰ گرم هویج رنده شده به مدت ۲ دقیقه داخل محلول با غلظت

(Dreher, 2001 &). اولیوز و همکاران (Olivas et al., 2008) با پوشش دهی برش‌های تازه سیب غوطه ور شده در محلول کلرید سدیم خوراکی توسط آلزینات و عوامل ضد میکروبی مشاهده نمودند که آلزینات سبب طولانی‌تر شدن مدت ماندگاری برش‌های سیب و کاهش افت وزن آن نسبت به نمونه شاهد در طول مدت نگهداری شد. تلاش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید با ظهور سوبه‌های مقاوم به داروهای شیمیایی ضروری می‌باشد (Srinivasan et al., 2001). از جمله گیاهان بومی ایران می‌توان به گیاه لعل کوهستان با جنس *Oliveria* متعلق به خانواده اومبلیفره^۱ اشاره کرد (Amin et al., 2005). این گیاه در مناطق گرمسیری ایران، سوریه، عراق و جنوب شرق آناتولی رشد می‌کند (Mogharabi et al., 2020). مقدار قابل توجهی اسانس در اندام هوایی این گیاه موجود می‌باشد. این اسانس دارای ۲۳ درصد کارواکرول، ۴۷ درصد تیمول، ۱۸ درصد گاما-ترپنین و ۸/۷ درصد پاراسیمین بوده که سبب اثر ضد میکروبی در برابر قارچ‌ها و باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد (Ghorbani et al., 2020). مطالعه‌های مختلفی روی ترکیب شیمیایی اسانس حاصل از گیاه لعل کوهستان انجام گرفته است. امین و همکاران (Amin et al., 2005). با مطالعه خاصیت ضد میکروبی گیاه لعل کوهستان مشاهده نمودند که اسانس این گیاه، در مقابل همه ارگانسیم‌های مطالعه شده فعالیت ضد میکروبی وسیعی دارد و این اثر با اثر آنتی‌بیوتیک‌های تجاری قابل مقایسه است (Esmaeili et al., 2021). یکی از روش‌های بسیار موثر برای افزایش ماندگاری چنین محصولات فسادپذیری، استفاده از بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده می‌باشد (Joubling, 2005) در بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده، تغییر ترکیب گازهای درون بسته شده باعث به حداقل رساندن فعالیت‌های فیزیولوژیکی و فساد محصولات می‌شود. ساندھیا (Sandhya, 2010)، با بررسی بسته‌بندی اتمسفر اصلاح شده برای میوه‌ها و سبزی‌ها مختلف (از جمله هویج، موز، خیار و انگور)، مخلوط گازهای توصیه شده برای افزایش ماندگاری هویج با بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده را ۵ درصد اکسیژن، ۳-۴ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۱-۹۲ درصد نیتروژن اعلام نمود (Ghorbani et al., 2021).

با توجه به مطالب گفته شده هدف از این تحقیق بررسی اثر اسانس لعل کوهستان و آلزینات بر ویژگی‌های میکروبی و فیزیکوشیمیایی هویج رنده شده در بسته‌های پلی‌پروپیلنی با اتمسفر اصلاح شده در طول انبارداری می‌باشد که تاکنون در مطالعه دیگری مورد استفاده قرار نگرفته است. نمونه‌های بررسی شده در این پژوهش به شرح زیر بود:

۱: نمونه شاهد (بدون پوشش)

۲: آلزینات ۱/۵ درصد

(Merck، ساخت آلمان) به محلول رویی استخراج شده اضافه و هموژنیزه گردید. برای تهیه ۱۰ میلی لیتر محلول، آب اضافه شد و سانتریفیوژ (۵ دقیقه در ۲۷۰۰ دور در دقیقه) گردید و به وسیله اسپکتروفتومتر (Milton Roy، ساخت آمریکا) در طول موج ۴۸۰ نانومتر میزان جذب محلول صاف شده اندازه گیری و غلظت کاروتنوئید (برحسب میکروگرم بر لیتر) با استفاده از رابطه (۳) محاسبه شد (Rocha et al., 2007).

$$\frac{A \times V \times 10^4}{A_{1\%}^{1\text{cm}} \times p} = \text{کاروتنوئید کل} \quad (3)$$

در رابطه (۳)، A: میزان جذب نمونه، V: حجم کل عصاره (میلی لیتر)، P: وزن نمونه (گرم) و $A_{1\%}^{1\text{cm}}$: ضریب ثابت مربوط به بتاکاروتن (معادل عدد ۲۵۹۲) می باشد.

مواد جامد محلول کل

هویج های بسته بندی شده به نسبت ۱:۱ با آب مقطر در یک مخلوط کن (Heidolph، ساخت آلمان) به مدت ۱ دقیقه همگن شد. مخلوط حاصل از صافی عبور داده و به مدت ۱ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (Nuve، ساخت ترکیه) با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مواد جامد محلول کل با استفاده از دستگاه فراکتومتر (Atago، ساخت ژاپن) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد برحسب درصد بریکس اندازه گیری شد (AOAC, 1990).

اسید آسکوربیک

تیتراسیون ۱۰ میلی لیتر از محلول صاف شده آب هویج با شناساگر ۶،۲-دی کلروفنل ایندوفنل (Carolina، ساخت آمریکا) تا ظهور رنگ صورتی کم رنگ انجام شد. محتوای اسید آسکوربیک با استفاده از رابطه (۴) بر حسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم نمونه محاسبه گردید (Falahi et al., 2013).

$$\text{اسید آسکوربیک} = \frac{V \times T}{W} \times 100 \quad (4)$$

در رابطه (۴)، V: حجم شناساگر ۶،۲-دی کلروفنل ایندوفنل مورد استفاده در تیتراسیون (میلی لیتر)، T: اکی والان شناساگر ۶،۲-دی کلروفنل ایندوفنل و W: وزن نمونه در حجم محلول تیترا شده (گرم) می باشد.

شاخص رنگ

با استفاده از سیستم هانتربل (JPK co-Reston، ساخت آلمان) شاخص های a^* ، b^* و L^* هویج های رنده شده ارزیابی و مقدار WI (شاخص سفیدی) از طریق رابطه (۵) به دست آمد. شاخص a^* بیانگر رنگ سبز تا قرمز، b^* آبی تا زرد و L^* سفید تا سیاه است (Rocha et al., 2007).

به دست آمده غوطه ور و پوشش دهی شدند و در نهایت هویج ها در آبکش ضد عفونی شده قرار گرفتند تا اضافه آلژینات خارج شود و فرصت داده شد سطح هویج ها به وسیله هوا خشک گردد (Mogharabi et al., 2020).

فرایند بسته بندی

هویج های رنده شده (شاهد و پوشش دهی شده) پس از توزین (۲۵۰ گرم) درون بسته های پلی پروپیلنی ۱۰ گرمی با ابعاد $14 \times 19 \times 5$ میلی متر قرار گرفتند و در دستگاه بسته بندی با اتمسفر اصلاح شده (witt-gasetechnik، مدل 100-2mem، ساخت آلمان) تحت تزریق گاز (۵٪ کربن دی اکسید، ۵٪ اکسیژن و ۹۰٪ نیتروژن) در دمای ۱۷۰ درجه سانتی گراد به منظور دوخت حرارتی بسته ها قرار گرفتند. پس از دوخت، بسته ها در دمای 4 ± 1 درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ روز نگهداری و ویژگی های فیزیکیوشیمیایی و میکروبی آنها در طول فرایند ذخیره سازی در روزهای ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ مورد بررسی قرار گرفت (Ayhan et al., 2008).

pH و اسیدیته

هویج های بسته بندی شده به نسبت ۱:۱ با آب مقطر مخلوط شد و pH آن در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به وسیله دستگاه pH دیجیتال (KNICK، ساخت آلمان) اندازه گیری گردید (Rad et al., 2020). پس از رقیق سازی ۲۵ گرم از نمونه هویج با ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر، ۲۵ میلی لیتر از نمونه محلول با هیدروکسید سدیم (Merck، ساخت آلمان) ۰/۱ نرمال تیترا شد (تا رسیدن به $\text{pH} = 8/3$) و میزان اسید آلی قابل تیتراسیون (برحسب درصد اسید مالیک) با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید (Rocha et al., 2007).

$$100 \cdot C = \frac{N \times V \times E}{D} \times \quad (1)$$

در رابطه (۱)، C: میزان اسید آلی قابل تیتراسیون (میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر)، N: نرمالیه سود مصرفی، V: حجم سود مصرفی، E: اکی والان گرم اسید مالیک و D: حجم نمونه (میلی لیتر) می باشد.

کاهش وزن

با استفاده از وزن قبل و بعد از ذخیره سازی درصد کاهش وزن در هر تیمار براساس رابطه (۲) محاسبه گردید (Becaro et al., 2016).

$$100 \times \frac{\text{وزن بعد از ذخیره سازی} - \text{وزن قبل از ذخیره سازی}}{\text{وزن قبل از ذخیره سازی}} = \text{افت وزن} \quad (2)$$

کاروتنوئید

پس از رقیق شدن ۱۰ گرم هویج در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر، ۱۰ میلی لیتر از مخلوط به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۲۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Nuve، ساخت ترکیه) شد. سپس ۸ میلی لیتر استون

$$WI = -\sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

ارزیابی حسی

ارزیاب‌های حسی نمونه‌های کدگذاری شده با اعداد تصادفی سه‌رقمی را از نظر ویژگی‌های رنگ، عطر، طعم و مقبولیت عمومی ارزیابی کردند. در این ارزیابی از آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای (امتیاز ۵ برای ویژگی بسیار عالی و امتیاز ۱ برای ویژگی ضعیف) استفاده شد (Badi et al., 2021).

تغییرات اتمسفر گاز بسته در طول زمان

غلظت گاز درون بسته با استفاده از دستگاه آنالایزر گاز (Mecca، ساخت فرانسه) به روش Ullsten و Hedenqvist (Ullsten et al., 2003) اندازه‌گیری گردید.

تعیین بار میکروبی

شمارش کلی و کپک و مخمر به منظور تعیین فلور میکروبی برش‌های هویج تعیین شدند. ۱۰ گرم نمونه هویج از هر بسته تحت شرایط بهداشتی برداشته و با ۹۰ میلی‌لیتر آب پیتون استریل (Merck، ساخت آلمان) همگن شد و رقت‌های موردنظر از آن تهیه گردید. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت به پلیت‌های استریل حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت‌های استریل منتقل و در انکوباتور (Wisecube، ساخت کره جنوبی) نگهداری شدند. از محیط کشت پلیت کانت آگار^۱ (Merck، ساخت آلمان) و نگهداری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز برای شمارش کلی و محیط کشت یست گلوکز کلرامفیکل آگار^۲ و نگهداری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز (Merck، ساخت آلمان) برای کپک‌ها و مخمرها استفاده شد (Zamindar et al., 2020).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل برای بررسی اثر متغیرهای مستقل نوع پوشش آلژینات (۲ سطح: ۰ و ۱/۵ درصد)، اسانس (۳ سطح: ۰، ۱۵۰، و ۲۵۰ ppm) و زمان (۵ سطح: روزهای ۱، ۳، ۶ و ۹ و ۱۲) بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی (۳ تکرار) و خصوصیات میکروبی هویج رنده شده (۲ تکرار) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت و از نرم‌افزار SPSS نسخه ۹.۱ جهت تجزیه داده‌های آماری بهره‌گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمون‌های فیزیکوشیمیایی

pH و اسیدیته

میزان pH، معرف قلیایی و یا اسیدی بودن سبزیجات و میوه‌ها است (Mogharabi et al., 2020). نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش، زمان و همچنین اثرات متقابل اسانس-زمان، پوشش-زمان بر تغییرات اسیدیته معنی‌دار بود ($P < 0/01$). همچنین اثر اسانس، پوشش، زمان و همچنین اثرات متقابل اسانس-پوشش، اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات pH معنی‌دار بود ($P < 0/01$). pH با گذشت زمان روندی صعودی و اسیدیته روندی نزولی ($P < 0/01$) داشت (جدول ۱) که با فرآیند رسیدن میوه‌ها و سبزیجات و افزایش pH مطابقت داشت. علت کاهش اسیدیته و افزایش pH در زمان نگهداری را بدین گونه شرح می‌دهند که اسیدهای آلی در طی نگهداری به دلیل مصرف آن‌ها در جریان تنفس کم می‌شوند و روند نزولی پیدا می‌کنند (Babalar et al., 2015).

اثر متقابل اسانس، آلژینات و زمان بر pH و اسیدیته هویج رنده شده نشان داد که در تمامی تیمارها با افزایش غلظت آلژینات، میزان اسیدیته افزایش و میزان pH کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0/01$). همچنین در تمامی تیمارها نمونه‌های حاوی اسانس لعل کوهستان نسبت به نمونه‌های فاقد اسانس، میزان pH کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0/01$). به گونه‌ای که در روز ۱۲ نگهداری بیشترین میزان اسیدیته و کمترین میزان pH در نمونه حاوی ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان و ۱/۵ درصد آلژینات و کمترین میزان اسیدیته و بیشترین میزان pH در نمونه شاهد گزارش شد ($P < 0/01$). به عبارتی، نمونه‌های ترکیبی نسبت به نمونه‌هایی که به تنهایی استفاده شدند سطح بیشتری از اسیدیته و سطح کمتری از pH را دارا بودند و در حفظ مقدار اسیدیته هویج‌های رنده شده موثرتر بودند. در حقیقت، استفاده از پوشش خوراکی به دلیل ویژگی سدی آنها در برابر گازها می‌تواند با کاهش نرخ تنفس میزان مصرف اسیدهای آلی را کاهش دهد. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج گل و همکاران (Gol et al., 2013) و مقرب و همکاران (Mogharabi et al., 2020) مطابقت دارد.

نتایج به دست آمده از اسیدیته با نتایج حاصل از محتوای pH هویج رنده شده در روزهای مختلف نگهداری مطابقت داشت و نشان می‌دهد که همبستگی منفی میان دو فاکتور اسیدیته و pH در هویج‌های رنده شده وجود داشت، به گونه‌ای که کاهش اسیدیته منجر به افزایش pH در نمونه‌ها شد.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر زمان بر خواص فیزیوشیمیایی و شمارش کلی در هویج رنده شده

Table 1- Mean comparison of Alginate and *Oliveria decumbens* Essential Oil on physiochemical properties and total count of grated carrot

پارامتر Parameters	زمان (روز) Day				
	1	3	6	9	12
pH	6.22± 0.00 ^e	6.31± 0.02 ^d	6.41± 0.08 ^c	6.49± 0.15 ^b	6.55± 0.19 ^a
اسیدیته (درصد) Acidity(%)	2.59± 0.01 ^a	2.44± 0.04 ^b	2.23± 0.13 ^c	1.95± 0.17 ^d	1.55± 0.22 ^e
کاهش وزن (درصد) Weight loss (%)	0.00± 0.00 ^e	0.61± 0.23 ^d	1.04± 0.47 ^c	2.14± 0.91 ^b	2.92± 0.98 ^a
کاروتنوئید (میکروگرم بر لیتر) Carotenoid (mg/l)	35.84± 0.00 ^a	35.35± 0.18 ^b	34.84± 0.33 ^c	34.29± 0.50 ^d	33.86± 0.82 ^e
مواد جامد محلول کل (درصد) Total soluble solid (%)	8.60± 0.00 ^e	8.89± 0.07 ^d	9.26± 0.21 ^c	10.33± 0.28 ^b	11.36± 0.71 ^a
اسید آسکوربیک (درصد) Ascorbic acid (%)	8.13± 0.00 ^a	7.96± 0.05 ^b	7.17± 0.33 ^c	6.41± 0.46 ^d	5.21± 0.73 ^e
L*	52.33± 0.01 ^a	51.61± 0.22 ^b	50.26± 0.82 ^c	48.63± 1.30 ^d	47.61± 1.33 ^e
b*	35.53± 0.00 ^b	33.49± 0.22 ^d	34.60± 0.63 ^c	35.60± 0.75 ^b	37.01± 1.15 ^a
a*	28.32± 0.01 ^e	29.37± 0.18 ^d	30.80± 0.51 ^c	31.97± 0.77 ^b	33.06± 1.10 ^a
طعم حسی Taste acceptance	5.00± 0.00 ^a	4.98± 0.13 ^a	4.42± 0.50 ^b	3.07± 0.58 ^c	2.20± 0.55 ^d
رنگ حسی Color acceptance	5.00± 0.00 ^a	5.00± 0.00 ^a	4.53± 0.50 ^b	3.45± 0.50 ^c	2.83± 0.42 ^d
عطر حسی Flavor acceptance	5.00± 0.00 ^a	5.00± 0.00 ^a	4.42± 0.50 ^b	2.63± 0.49 ^c	2.10± 0.57 ^d
مقبولیت Total acceptance	5.00± 0.00 ^a	5.00± 0.00 ^a	4.55± 0.50 ^b	2.87± 0.72 ^c	2.35± 0.48 ^d
تغییرات دی اکسید کربن (درصد) CO ₂ (%)	5.24± 0.16 ^e	17.37± 0.26 ^d	27.86± 0.48 ^c	38.33± 0.58 ^b	47.63± 0.29 ^a
تغییرات اکسیژن (درصد) O ₂ (%)	5.00± 0.00 ^a	0.00± 0.00 ^b	0.00± 0.00 ^b	0.00± 0.00 ^b	0.00± 0.00 ^b
شمارش کلی (لگاریتم واحد تشکیل کلنی/گرم) Total count (Log cfu/g)	0.00± 0.00 ^d	0.00± 0.00 ^d	0.22± 0.37 ^c	1.05± 0.44 ^b	1.82± 0.61 ^a

-اعداد، میانگین ± انحراف معیار هستند

- اعداد با حروف غیر مشابه سبب اختلاف معنی دار از لحاظ آزمون LSD می شود ($P \leq 0.05$).

Numbers are mean ± standard deviation (three replicates).

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

کاهش وزن

یکی از مهم ترین اهداف بسته بندی و پوشش دهی کنترل وزن میوه ها و سبزی های تازه می باشد (Larsen & Wold, 2016). نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش، زمان و همچنین اثرات متقابل اسانس-پوشش، اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات کاهش وزن معنی دار بود ($P < 0.05$). اثر متقابل آلژینات، اسانس و زمان بر کاهش وزن هویج رنده شده در جدول ۲ نشان داد که

در تمام نمونه ها در روز اول نگهداری کاهش وزن مشاهده نشد اما با افزایش زمان نگهداری شاخص مذکور افزایش معنی داری پیدا کرد ($P < 0.05$). همچنین در تمامی تیمارها و در تمامی روزهای نگهداری، با افزایش غلظت آلژینات و اسانس لعل کوهستان میزان کاهش وزن افزایش معنی داری یافت ($P < 0.05$), به گونه ای که بیشترین میزان کاهش وزن در روز ۱۲ نگهداری در نمونه شاهد (۴.۶۳) مشاهده گردید ($P < 0.05$).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل آلژینات، اسانس لعل کوهستان و زمان بر pH، اسیدیته، اسید آسکوربیک، کاهش وزن و مواد جامد محلول هویج رنده شده

Table 2- Mean comparison of Alginate and *Oliveria decumbens* Essential Oil on pH, acidity, ascorbic acid content, total soluble solid and weight loss of grated carrot

غلظت اسانس لعل کوهستان (ppm) <i>Oliveria decumbens</i> Essential Oil (ppm)	غلظت آلژینات Alginate(%)	زمان Day	کاهش وزن Weight loss (%)	اسیدآسکوربیک Ascorbic acid (%)	اسیدیته Acidity (%)	pH	مواد جامد محلول Total soulable solid
0	0	1	0.00±0.00 ^q	28.31±0.00 ^s	2.68±0.00 ^a	6.22±0.00 ⁿ	8.6±0 ^a
		3	0.94±0.02 ^k	29.70±0.07 ^o	2.47±0.01 ^b	6.32±0.01 ^{mlk}	8.94±0.02 ^a
		6	1.79±0.01 ^h	31.57±0.41 ^h	2.15±0.01 ⁱ	6.55±0.01 ^c	9.56±0.02 ^a
		9	3.86±0.03 ^b	33.07±0.02 ^c	1.84±0.02 ⁿ	6.78±0.03 ^b	10.85±0.04 ^a
	12	4.63±0.03 ^a	34.87±0.04 ^a	1.32±0.01 ^r	6.91±0.02 ^a	12.61±0.82 ^a	
	1.5	1	0.00±0.00 ^q	28.32±0.00 ^s	2.68±0.00 ^a	6.22±0.00 ⁿ	8.6±0 ^a
		3	0.82±0.02 ^l	29.47±0.03 ^p	2.43±0.01 ^{cd}	6.31±0.01 ^{mlk}	8.88±0.16 ^a
		6	1.50±83.01 ⁱ	31.19±0.38 ^j	2.27±0.07 ^g	6.46±0.01 ^{gfe}	9.37±0.28 ^a
		9	2.60±2.03 ^e	32.71±0.02 ^d	1.93±0.01 ^{lm}	6.51±0.02 ^{dce}	10.47±0.03 ^a
	12	3.49±0.03 ^c	33.87±0.02 ^b	1.53±0.02 ^q	6.55±0.02 ^c	11.55±0.04 ^a	
	0	1	0.00±0.00 ^q	28.32±0.00 ^s	2.68±0.00 ^a	6.22±0.00 ⁿ	8.6±0 ^a
		3	0.63±0.02 ^m	29.37±0.05 ^{qp}	2.43±0.02 ^{cd}	6.33±0.01 ^{mlk}	8.9±0.01 ^a
6		0.95±0.01 ^k	30.89±0.01 ^k	2.24±0.01 ^h	6.39±0.01 ^{jih}	9.23±0.02 ^a	
9		1.89±0.02 ^g	32.04±0.01 ^f	1.96±0.01 ^{lk}	6.47±0.01 ^{dfe}	10.31±0.04 ^a	
150	0	12	2.94±0.03 ^d	33.05±0.02 ^c	1.56±0.02 ^{qp}	6.53±0.01 ^{dc}	11.32±0.04 ^a
		1	0.00±0.00 ^q	28.31±0.00 ^s	2.68±0.00 ^a	6.22±0.00 ⁿ	8.6±0 ^a
		3	0.38±0.02 ^o	29.23±91.05 ^r	2.41±0.02 ^{bc}	6.31±0.01 ^{ml}	8.88±0.02 ^a
		6	0.65±0.01 ^m	30.46±0.01 ^m	2.26±0.02 ^f	6.36±0.01 ^{jik}	9.12±0.02 ^a
	9	1.47±0.01 ⁱ	31.34±0.04 ⁱ	1.98±0.01 ^g	6.40±0.01 ^{jih}	10.12±0.05 ^a	
	12	2.03±0.03 ^f	32.29±0.03 ^e	1.57±0.01 ^o	6.42±0.02 ^{gih}	10.88±0.03 ^a	
	1.5	1	0.00±0.00 ^q	28.32±0.00 ^s	2.68±0.00 ^a	6.22±0.00 ⁿ	8.6±0 ^a
		3	0.56±0.01 ⁿ	29.26±0.03 ^{qr}	2.45±0.02 ^{de}	6.30±0.01 ^{ml}	8.89±0.01 ^a
		6	0.82±0.03 ^l	30.67±0.02 ^l	2.36±0.01 ^{gh}	6.39±0.01 ^{jih}	9.24±0.22 ^a
		9	1.81±0.01 ^h	31.74±0.03 ^g	2.08±0.03 ^k	6.44±0.01 ^g	10.24±0.06 ^a
	12	2.64±0.04 ^e	32.70±0.05 ^d	1.79±0.02 ^p	6.51±0.01 ^{dce}	11.17±0.05 ^a	
	250	0	1	0.00±0.00 ^q	28.31±0.00 ^s	2.68±0.00 ^a	6.22±0.00 ⁿ
3			0.31±0.00 ^p	29.20±0.01 ^r	2.47±0.01 ^b	6.30±0.01 ^{ml}	8.82±0.02 ^a
6			0.54±0.01 ⁿ	30.06±0.01 ⁿ	2.38±0.01 ^{ef}	6.32±0.01 ^{mlk}	9.03±0.03 ^a
9			1.18±0.03 ^j	30.90±0.03 ^k	2.17±0.03 ⁱ	6.34±0.01 ^{mlk}	10.02±0.02 ^a
12		1.76±0.01 ^h	31.58±0.01 ^h	1.91±0.02 ^m	6.36±0.01 ^{jlk}	10.62±0.04 ^a	

اعداد، میانگین ± انحراف معیار (سه تکرار) می باشند.

اعداد با حروف غیر مشابه سبب اختلاف معنی دار از لحاظ آزمون LSD می شود ($P \leq 0.05$).

Numbers are mean ± standard deviation (three replicates).

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

پوشش خوراکی آلژینات سبب طولانی تر شدن مدت ماندگاری سبب شده بدون اینکه باعث تولید تنفس بی هوازی شود و سبب کاهش کاهش وزن در طول نگهداری شد.

کارتونوئید

کارتونوئیدها، ترکیباتی هستند که قادر هستند با اثرات مضر اما طبیعی فرآیند فیزیولوژیک اکسیداسیون در بافتها مقابله کرده و سلول های بدن را در برابر رادیکالهای آزاد حفظ نمایند (Mogharabi et al., 2020). نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش، زمان ($P < 0.01$)

انتقال بخار آب از قسمت آب دوست فیلم یا پوشش خوراکی انجام می شود و به نسبت اجزای آبدوست- آب گریز بستگی دارد (Norajit et al., 2010). لذا با توجه به آبدوستی پوشش آلژینات به نظر می رسد افزودن اسانس لعل کوهستان به دلیل ماهیت آب گریز اسانس و تغییر در نسبت آبدوستی به آب گریزی پوشش خوراکی از میزان آبدوستی پوشش خوراکی کم کرده و در نهایت باعث کاهش از دست رفتن رطوبت در این پوشش شده است (Sánchez-González et al., 2011). اومس اولیو و همکاران (Oms-Oliu et al., 2008) نیز با بررسی اثر پوشش خوراکی فیلم آلژینات در سیب مشاهده کردند که

در نمونه‌های حاوی آلژینات ۱/۵ درصد نسبت به نمونه فاقد آن میزان کاروتنوئید بالاتری گزارش شد ($P < 0.05$)، به گونه‌ای که بیشترین میزان کاروتنوئید در نمونه حاوی ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان و ۱/۵ درصد آلژینات مشاهده گردید (۳۵،۲۹) ($P < 0.05$). دانگ و همکاران (Dong et al., 2004) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. آنها با بررسی رشد و عملکرد بادام زمینی به وسیله پوشش خوراکی مشاهده کردند که پوشش خوراکی منجر به افزایش مقدار کاروتنوئید شد.

و اثر متقابل اسانس-پوشش ($P < 0.05$) بر تغییرات میزان کاروتنوئید معنی‌دار بود اما اثرات متقابل اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات آن معنی‌دار گزارش نشد (جدول ۳).
اثر متقابل پوشش آلژینات و اسانس بر کاروتنوئید هویج رنده‌شده در جدول ۵ نشان داد که در تیمارهای فاقد اسانس لعل کوهستان، نمونه فاقد آلژینات نسبت به نمونه حاوی ۱/۵ درصد آلژینات تفاوت معنی‌داری در میزان کاروتنوئید نداشتند اما با افزایش غلظت اسانس لعل کوهستان،

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل آلژینات و اسانس لعل کوهستان بر تغییرات کاروتنوئید و مواد جامد محلول هویج رنده‌شده
Table 3- Mean comparison of Alginate and *Oliveira decumbens* Essential Oil on total soluble solid and carotenoid of grated carrot

غلظت اسانس لعل کوهستان <i>Oliveira decumbens</i> Essential Oil (ppm)	غلظت آلژینات Alginate (%)	مواد جامد محلول Total soluble solid	کاروتنوئید Carotenoid (mg/l)
0	0	10.11±0.03 ^a	34.55±0.03 ^d
	1.5	9.77±0.03 ^b	34.57±0.03 ^d
150	0	9.67±0.03 ^{bc}	34.71±0.03 ^{cd}
	1.5	9.52±0.03 ^{de}	35.05±0.03 ^{ab}
250	0	9.63±0.03 ^{dc}	34.85±0.03 ^{bc}
	1.5	9.42±0.03 ^e	35.29±0.03 ^a

اعداد، میانگین ± انحراف معیار (سه تکرار) می‌باشند.

اعداد با حروف غیرمشابه سبب اختلاف معنی‌دار از لحاظ آزمون LSD می‌شود ($P \leq 0.05$).

Numbers are mean ± standard deviation (three replicates).

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

پوشش‌ها با بستن روزنه‌ها و کم کردن میزان اتلاف رطوبت و وزن، موجب کندشدن روند افزایشی میزان مواد جامد محلول در طی زمان نگهداری گردیدند (Manthe et al., 1992). مطالعات عشقی و همکاران (Eshghi et al., 2013) نیز بیانگر این نکته بود که پوشش‌دهی توت‌فرنگی با کیتوزان از شدت تغییرات مواد جامد محلول در تیمارهای پوششی با کیتوزان نسبت به تیمار شاهد کم کرد.

اسید آسکوربیک

اسید آسکوربیک یکی از مهم‌ترین ویتامین‌ها در مواد غذایی به خصوص میوه‌ها و سبزیجات می‌باشد (Mogharabi et al., 2020). نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش، زمان و همچنین اثرات متقابل اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات اسید آسکوربیک معنی‌دار بود ($P < 0.01$) اما اثر متقابل اسانس-پوشش بر تغییرات آن معنی‌دار گزارش نشد.

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت اسانس لعل کوهستان، میزان اسید آسکوربیک افزایش یافت به گونه‌ای که نمونه حاوی ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان بالاترین و نمونه فاقد اسانس لعل کوهستان پایین‌ترین میزان شاخص مذکور را دارا بودند

مواد جامد محلول

مصرف‌کنندگان میوه رسیده با مواد جامد محلول کل بالا را می‌پسندند (Burdon et al., 2004). نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش، زمان و همچنین اثرات متقابل اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش ($P < 0.05$) بر تغییرات مواد جامد محلول معنی‌دار بود اما اثر متقابل اسانس-پوشش-زمان معنی‌دار بر تغییرات آن معنی‌دار گزارش نشد.

افزایش درصد مواد جامد محلول در زمان انبارداری فقط مربوط به اضافه شدن قند نیست، بلکه به افزایش و کاهش موادی مانند اسیدها، پکتین‌های محلول و ترکیبات فنلی نیز بستگی دارد (Amodio & Colelli & Kader, 2007).

اثر متقابل پوشش آلژینات و اسانس بر شاخص مواد جامد محلول هویج رنده‌شده در جدول ۳ نشان داد که در تمام نمونه‌ها، با افزایش غلظت آلژینات میزان مواد جامد محلول کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.05$)، به‌طوری‌که بالاترین میزان شاخص ذکرشده مربوط به نمونه شاهد و پایین‌ترین میزان آن مربوط به آلژینات ۱/۵ درصد و اسانس لعل ۲۵۰ ppm بود ($P < 0.05$). در حقیقت، استفاده از پوشش‌ها به خصوص به‌صورت ترکیبی مواد جامد محلول کل را در سطوح پایین‌تری نسبت به تیمار شاهد نگه‌داشته است ($P < 0.05$)، چرا که

شاخص L^*

یکی از معیارهای مهم، سفیدی ایجاد شده توسط خشک شدن سطحی هویج‌های رنده شده است. نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش، زمان و همچنین اثرات متقابل اسانس-پوشش، اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات شاخص L^* معنی‌دار بود ($P < 0.01$).

اثر متقابل آلزینات، اسانس و زمان بر شاخص L^* در جدول ۴ نشان داد که در روز اول نگهداری در تمامی تیمارها از لحاظ میزان شاخص L^* تفاوت معنی‌داری دیده نشد و همچنین در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری میزان شاخص مذکور کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.01$). همچنین در تمامی تیمارها با افزایش غلظت آلزینات و همچنین غلظت اسانس لعل کوهستان، میزان شاخص L^* و روشنایی افزایش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0.01$). به گونه‌ای که در روز ۱۲ نگهداری بیشترین میزان شاخص مذکور در نمونه حاوی ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان و ۱/۵ درصد آلزینات و کمترین میزان آن در نمونه شاهد گزارش شد ($P < 0.01$). نتایج مطالعه‌های Rojas-Graü و همکاران (Rojas-Graü et al., 2007) با نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش مطابقت داشت.

شاخص b^*

نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش، زمان و همچنین اثرات متقابل اسانس-زمان و پوشش-زمان ($P < 0.01$) و اسانس-پوشش-زمان ($P < 0.01$) بر تغییرات شاخص b^* و زردی نمونه معنی‌دار بود ولی اسانس-پوشش بر تغییرات آن اثر معنی‌داری نداشت.

اثر متقابل آلزینات، اسانس و زمان بر شاخص b^* و زردی نمونه در جدول ۴ نشان داد که در روز اول نگهداری در تمامی تیمارها از لحاظ میزان شاخص b^* تفاوت معنی‌داری دیده نشد و با افزایش زمان نگهداری میزان شاخص مذکور افزایش معنی‌داری یافت ($P < 0.01$). همچنین به غیر از روز اول، در تمامی تیمارها با افزایش غلظت آلزینات و اسانس لعل کوهستان، میزان شاخص b^* کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0.01$). به گونه‌ای که در روز ۱۲ نگهداری کمترین میزان شاخص مذکور در نمونه حاوی ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان و ۱/۵ درصد آلزینات و بیشترین میزان آن در نمونه شاهد گزارش شد ($P < 0.01$).

($P < 0.01$). نمونه دارای پوشش آلزینات و نمونه فاقد آلزینات از لحاظ میزان اسید آسکوربیک دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر بودند ($P < 0.01$). به گونه‌ای که نمونه حاوی ۱/۵ درصد آلزینات بالاترین و نمونه فاقد آن پایین‌ترین ($P < 0.01$) میزان این شاخص را دارا بودند (جدول ۲). همچنین میانگین شاخص اسید آسکوربیک روزهای مختلف روندی نزولی داشت ($P < 0.01$). به گونه‌ای که هویج‌های رنده شده در روز اول نگهداری بالاترین و در روز ۱۲ پایین‌ترین میزان اسید آسکوربیک ($P < 0.01$) را دارا بودند (جدول ۱) از طرفی در این مطالعه در بسته‌بندی اتمسفر اصلاح‌شده با گذر زمان میزان دی‌اکسیدکربن مقداری افزایش و اکسیژن کاهش داشت. اکسیژن یکی از عوامل مؤثر در کاهش اسید آسکوربیک بوده و موجب می‌شود که اسید آسکوربیک طی زمان نگهداری روندی کاهشی پیدا کند (Zhang, 2000).

اثر متقابل آلزینات، اسانس و زمان بر شاخص اسید آسکوربیک هویج رنده‌شده در جدول ۴ نشان داد که در تمامی تیمارها نمونه‌های حاوی آلزینات و اسانس لعل کوهستان (منفرد یا ترکیبی) نسبت به نمونه‌های فاقد آلزینات و اسانس اسید آسکوربیک بالاتری نشان دادند ($P < 0.01$). به گونه‌ای که در روز ۱۲ نگهداری بیشترین میزان اسید آسکوربیک در نمونه حاوی ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان و ۱/۵ درصد آلزینات و کمترین میزان آن در نمونه شاهد مشاهده گردید ($P < 0.01$). پوشش آلزینات حاوی اسانس و همچنین بسته‌بندی اتمسفر اصلاح‌شده اتمسفر درونی هویج را تغییر داده و میزان اکسیژن را کم و دی‌اکسیدکربن اطراف میوه را افزایش می‌دهند که کاهش تبدلات گازی محصول با محیط اطراف، از جمله کاهش اکسیژن ورودی به میوه منجر به کاهش اکسیداسیون اسیدها، فنل‌ها و سایر ترکیبات مانند اسیدآسکوربیک می‌گردد (Ayranci & Tunc, 2004). مشابه نتایج این پژوهش در مطالعات Xing و همکاران (Xing et al., 2011) گزارش شده است که پوشش کیتوزان منجر به حفظ اسیدآسکوربیک و ترکیبات فتولیک در میوه‌های گوجه‌فرنگی و فلفل دلمه‌ای در انبار می‌گردد.

شاخص رنگ

حفظ رنگ یکی از مشخصه‌های کیفی محصولات تازه بوده و در پذیرش محصول از نظر مصرف‌کننده اهمیت بسیاری دارد (Kim and Rhee, 2015).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل آلژینات، اسانس لعل کوهستان و زمان بر تغییرات رنگ (a^* و b^* ، L^*) و دی اکسید کربن در هویج رنده شده

Table 4- Mean comparison of Alginate and Oliveria decumbens Essential Oil on color change, and CO₂ concentration of grated carrot

غلظت اسانس لعل کوهستان (ppm) <i>Oliveria decumbens</i> Essential Oil (ppm)	غلظت آلژینات (%) Alginate (%)	زمان (روز) Day	تغییرات دی اکسید کربن CO ₂ (%)	a^*	b^*	L^*
0	0	1	5.37±0.00 ^p	28.31±0.00 ^s	35.53±0.00 ^{gf}	52.32±0.00 ^a
		3	18.8±0.02 ^l	29.70±0.02 ^o	33.88±0.02 ^j	51.25±0.02 ^{fe}
		6	30.43±0.02 ⁱ	31.57±0.02 ^h	35.59±0.02 ^f	49.07±0.02 ^j
		9	40.70±0.04 ^f	33.07±0.04 ^c	36.96±0.04 ^c	47.20±0.04 ^m
	1.5	12	49.77±0.82 ^a	34.87±0.82 ^a	38.85±0.82 ^a	46.08±0.82 ⁿ
		1	5.32±0.00 ^{qp}	28.32±0.00 ^s	35.52±0.00 ^{gf}	52.32±0.00 ^a
		3	18.50±0.16 ^m	29.47±0.16 ^p	33.64±0.16 ^{kl}	51.44±0.16 ^{ced}
		6	30.27±0.28 ^j	31.19±0.28 ^j	34.98±0.28 ^b	49.66±0.28 ⁱ
		9	40.57±0.03 ^f	32.71±0.03 ^d	35.99±0.03 ^e	47.40±0.03 ^m
		12	49.53±0.04 ^b	33.87±0.04 ^b	38.04±0.04 ^b	46.28±0.04 ⁿ
	0	1	5.13±0.00 ^{qp}	28.32±0.00 ^s	35.53±0.00 ^{gf}	52.33±0.00 ^a
		3	18.27±0.01 ⁿ	29.37±0.01 ^{qp}	33.42±0.01 ^{ml}	51.61±0.01 ^{cbd}
150	0	6	30.32±0.02 ^j	30.89±0.02 ^k	34.62±0.02 ⁱ	49.98±0.02 ^h
		9	40.57±0.04 ^f	32.04±0.04 ^f	35.53±0.04 ^{gf}	47.96±0.04 ^l
		12	49.23±0.04 ^c	33.05±0.04 ^c	36.88±0.04 ^c	47.20±0.04 ^m
		1	5.23±0.00 ^{qp}	28.31±0.05 ^s	35.53±0.05 ^{gf}	52.33±0.00 ^a
	1.5	3	18.20±0.01 ⁿ	29.23±0.00 ^r	33.33±0.00 ^m	51.80±0.01 ^b
		6	30.00±0.01 ^k	30.46±0.02 ^m	33.85±0.02 ^{kj}	51.03±0.22 ^f
		9	40.20±0.01 ^g	31.34±0.02 ⁱ	35.07±0.02 ^h	49.60±0.06 ⁱ
		12	48.90±0.01 ^d	32.29±0.05 ^e	36.17±0.05 ^e	48.58±0.05 ^k
	0	1	5.17±0.01 ^q	28.32±0.00 ^s	35.52±0.00 ^{gf}	52.33±0.00 ^a
		3	18.23±0.01 ⁿ	29.26±0.02 ^{qr}	33.39±0.02 ^m	51.69±0.02 ^{cb}
		6	30.20±0.01 ^j	30.67±0.03 ^l	34.52±0.03 ⁱ	50.46±0.02 ^g
		9	40.20±0.01 ^g	31.74±0.02 ^g	35.35±0.02 ^g	48.97±0.05 ^j
250	0	12	49.00±0.01 ^d	32.70±0.04 ^d	36.58±0.04 ^d	47.74±0.03 ^l
		1	5.13±0.01 ^q	28.31±0.00 ^s	35.53±0.00 ^{gf}	52.33±0.00 ^a
		3	18.03±0.01 ^o	29.20±0.02 ^r	33.27±0.02 ^m	51.85±0.02 ^b
		6	30.00±0.01 ^k	30.06±0.03 ⁿ	34.05±0.03 ^j	51.35±0.03 ^{ed}
	1.5	9	39.93±0.01 ^h	30.90±0.02 ^k	34.71±0.02 ⁱ	50.68±0.02 ^g
		12	48.30±0.01 ^e	31.58±0.04 ^h	35.55±0.04 ^{gf}	49.79±0.04 th

اعداد، میانگین $\pm$ انحراف معیار (سه تکرار) می باشند.

اعداد با حروف غیر مشابه نشانگر اختلاف معنی دار از لحاظ آزمون LSD است ($P \leq 0.05$).

Numbers are mean $\pm$ standard deviation (three replicates).

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

اسانس-پوشش، اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات شاخص مذکور معنی دار بود ($P < 0.01$). اثر متقابل آلژینات، اسانس و زمان بر شاخص a^* و قرمزی نمونه در جدول ۴ نشان داد که در روز اول نگهداری در تمامی تیمارها از لحاظ میزان شاخص مذکور تفاوت معنی داری دیده نشد و در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری میزان شاخص a^* افزایش معنی داری یافت ($P < 0.01$). همچنین در تمامی تیمارها به غیر از روز اول، با افزایش غلظت آلژینات و اسانس لعل کوهستان میزان شاخص a^* کاهش معنی داری پیدا کرد ($P < 0.01$)، به گونه ای که در روز ۱۲ نگهداری کمترین میزان شاخص

در بررسی انجام شده توسط Rojas-Graü و همکاران (Rojas-Graü et al., 2007) که از پوشش خوراکی آلژینات به همراه عوامل ضد میکروبی برای افزایش زمان ماندگاری برش های تازه سیب استفاده کردند، به کارگیری پوشش آلژینات باعث کاهش معنی داری در میزان تغییرات b^* در نمونه های پوشش داده شده نسبت به تیمار شاهد شد.

شاخص a^*

میزان a^* یک پارامتر خوب برای نشان دادن توسعه رنگ قرمز و درجه ی رسیدگی در میوه می باشد (Mogharabi et al., 2020). نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش، زمان و همچنین اثرات متقابل

مذکور در نمونه حاوی ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان و ۱/۵ درصد آلزینات و بیشترین میزان آن در نمونه شاهد گزارش شد. نتایج مطالعه‌ی روجاز گرو و همکاران (Rojas-Graü et al., 2007) با نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش مطابقت داشت.

نتایج آزمونه‌های حسی

ارزیابی حسی

رنگ حسی

نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش ($P < 0.05$) و زمان ($P < 0.01$) بر تغییرات رنگ حسی معنی‌دار بود اما اثرات متقابل اسانس-پوشش، اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات آن معنی‌دار گزارش نشد.

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود نمونه فاقد اسانس لعل کوهستان نسبت به نمونه‌های حاوی اسانس لعل کوهستان میزان امتیاز رنگ پایین‌تری از دید ارزیابی حسی کسب کردند ($P < 0.05$). با افزایش غلظت اسانس لعل کوهستان، میزان امتیاز رنگ از دید ارزیابی حسی افزایش یافت که البته این افزایش معنی‌دار نبود. نمونه دارای پوشش آلزینات و نمونه فاقد آن از لحاظ میزان رنگ از دید ارزیابی حسی دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر بودند ($P < 0.05$), به گونه‌ای که نمونه حاوی ۱/۵ درصد آلزینات بالاترین و نمونه فاقد آن کمترین میزان امتیاز رنگ حسی ($P < 0.05$) را از دید ارزیابی حسی دارا بودند (جدول ۲). همچنین در روز اول و سوم نگهداری میزان شاخص مذکور از دید ارزیابی حسی تفاوت معنی‌داری نداشت و با افزایش زمان نگهداری، میزان آن کاهش ($P < 0.01$) معنی‌داری یافت (جدول ۳). به عبارتی مصرف‌کنندگان تا روز ۳ نگهداری تفاوتی با نمونه‌های روز اول مشاهده نکردند و با افزایش زمان نگهداری متوجه تغییرات در رنگ هویج‌های رنده شده شدند.

طعم حسی

شیرینی عامل بسیار مهم برای پذیرش هویج رنده‌شده توسط مصرف‌کنندگان، پس از استحکام، آبداربودن، عطر و طعم و طراوت در نظر گرفته شده است (Mogharabi et al., 2020). نتایج نشان داد که اثر زمان ($P < 0.01$) بر تغییرات طعم حسی معنی‌دار بود اما اثر اسانس، پوشش و اثرات متقابل اسانس-پوشش، اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات آن معنی‌دار گزارش نشد.

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود نمونه‌های حاوی اسانس لعل کوهستان و همچنین نمونه‌های دارای پوشش آلزینات نسبت به نمونه شاهد از لحاظ میزان طعم تفاوت معنی‌داری از دید ارزیابی حسی

نداشتند. شاخص مذکور از دید ارزیابی حسی در روز اول و سوم نگهداری تفاوت معنی‌داری نداشتند. با افزایش زمان نگهداری، میزان طعم از دید ارزیابی حسی کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.01$), به گونه‌ای که هویج‌های رنده شده در روز اول بالاترین و در روز ۱۲ پایین‌ترین میزان ($P < 0.01$) میزان امتیاز طعم را دارا بودند (جدول ۱ و ۵). به عبارتی با افزایش زمان ماندگاری تغییرات در طعم هویج‌های رنده شده مشاهده شد.

عطر حسی

نتایج نشان داد که اثر زمان بر تغییرات عطر از دید ارزیابی حسی معنی‌دار بود ($P < 0.01$) اما اثر پوشش، اسانس، اثرات متقابل اسانس-پوشش، اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات آن معنی‌دار گزارش نشد.

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود میزان عطر از دید ارزیابی حسی در روز اول و سوم نگهداری تفاوت معنی‌داری نداشتند. با افزایش زمان نگهداری، میزان عطر از دید ارزیابی حسی کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.01$), به گونه‌ای که هویج‌های رنده شده در روز اول و سوم بالاترین و در روز ۱۲ پایین‌ترین میزان امتیاز عطر را دارا بودند ($P < 0.01$). به عبارتی افزایش زمان ماندگاری سبب کاهش عطر نمونه‌ها گردید (جدول ۵).

مقبولیت حسی

نتایج نشان داد که اثر اسانس و زمان بر تغییرات مقبولیت حسی معنی‌دار بود ($P < 0.01$) اما اثر پوشش و اثرات متقابل اسانس-پوشش، اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات آن معنی‌دار گزارش نشد.

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند، ولی نسبت به نمونه فاقد اسانس لعل کوهستان به طور معنی‌داری مقبولیت بالاتری از دید ارزیابی حسی کسب کردند ($P < 0.01$). همچنین روز اول و سوم نگهداری از لحاظ مقبولیت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و با افزایش زمان نگهداری از روز ۶ تا روز ۱۲ نگهداری، میزان شاخص مذکور از دید ارزیابی حسی کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.01$), به گونه‌ای که هویج‌های رنده شده در روز اول و سوم بالاترین و در روز ۱۲ پایین‌ترین ($P < 0.01$) میزان مقبولیت را دارا بودند (جدول ۵).

بنابراین از نتایج به‌دست‌آمده از ارزیابی حسی می‌توان نتیجه گرفت که تیمارها عملکردهای متفاوتی از دید ارزیابی حسی داشتند، اما به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد آلزینات و اسانس به‌کاررفته اثر نامطلوبی بر فاکتورهای

حسی نداشت. به گونه‌ای که در تمام فاکتورهای حسی، تیمارهای ترکیبی امتیاز بالایی کسب نمودند. نتایج این پژوهش با یافته‌های بررسی‌های سایر محققان مبنی بر اینکه پوشش‌های خوراکی به‌عنوان یک لایه باعث کاهش ازدست‌رفتن وزن و به‌تأخیرافتادن کاهش آب محصول، بهبود و به‌هم‌پیوستگی بافت و حفظ ویژگی‌های حسی میوه‌ها و سبزی‌ها می‌شوند (Bahraminan et al., 2010)، مطابقت داشت.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل آلژینات، اسانس لعل کوهستان و زمان بر ارزیابی حسی هویج رنده‌شده

Table 5- Mean comparison of Alginate and <i>Oliveria decumbens</i> Essential Oil sensory evaluation of grated carrot							
رنگ	طعم	عطر	مقبولیت	زمان (روز)	غلظت آلژینات	غلظت اسانس لعل کوهستان (ppm)	
Color	Flavor	Aroma	Acceptance	Day	Alginate(%)	<i>Oliveria decumbens</i> Essential Oil (ppm)	
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	1	0	0	
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	3			
48 ^a .3±0.4	48 ^a .3±0.4	48 ^a .3±0.4	52 ^a .4±0.4	6			
48 ^a .3±0.3	57 ^a .1±0.3	53 ^a .5±0.2	7 ^a .6±0.2	9			
52 ^a .6±0.2	57 ^a .1±0.2	67 ^a .2±0	32 ^a .1±0.2	12			
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	1	1.5		
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	3			
52 ^a .6±0.4	52 ^a .4±0.4	52 ^a .4±0.4	53 ^a .5±0.4	6			
52 ^a .4±0.3	57 ^a .1±0.3	52 ^a .6±0.2	7 ^a .6±0.2	9			
48 ^a .7±0.2	63 ^a .2±0.2	63 ^a .2±0.2	42 ^a .2±0.2	12			
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	1	0	150	
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	3			
53 ^a .5±0.4	52 ^a .4±0.4	48 ^a .3±0.4	53 ^a .5±0.4	6			
52 ^a .4±0.3	57 ^a .1±0.3	48 ^a .7±0.2	74 ^a .9±0.2	9			
42 ^a .8±0.2	63 ^a .2±0.2	47 ^a .2±0	48 ^a .3±0.2	12			
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	1	1.5		
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	3			
48 ^a .7±0.4	53 ^a .5±0.4	53 ^a .5±0.4	53 ^a .5±0.4	6			
52 ^a .6±0.3	67 ^a .3±0	52 ^a .6±0.2	67 ^a .3±0	9			
3±0 ^a	42 ^a .2±0.2	57 ^a .1±0.2	53 ^a .5±0.2	12			
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	1	0	250	
5±0 ^a	32 ^a .9±0.4	5±0 ^a	5±0 ^a	3			
53 ^a .5±0.4	52 ^a .4±0.4	52 ^a .4±0.4	52 ^a .6±0.4	6			
53 ^a .5±0.3	57 ^a .1±0.3	48 ^a .7±0.2	74 ^a .9±0.2	9			
57 ^a .9±0.2	57 ^a .1±0.2	63 ^a .2±0.2	52 ^a .4±0.2	12			
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	1	1.5		
5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	3			
52 ^a .6±0.4	53 ^a .5±0.4	52 ^a .6±0.4	42 ^a .8±0.4	6			
53 ^a .5±0.3	3±0/67 ^a	48 ^a .7±0.2	79 ^a .2±0.3	9			
3±0 ^a	52 ^a .4±0.2	57 ^a .1±0.2	52 ^a .6±0.2	12			

اعداد، میانگین $\pm$ انحراف معیار (سه تکرار) می‌باشند.

اعداد با حروف غیرمشابه سبب اختلاف معنی‌دار از لحاظ آزمون LSD می‌شود ($P \leq 0.05$).

Numbers are mean $\pm$ standard deviation (three replicates).

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

تغییرات اتمسفر گاز بسته در طول زمان

اکسیژن

اندازه‌گیری غلظت گازهای موجود در بسته نشان داد که میزان دی‌اکسیدکربن موجود در بسته‌ها با گذشت زمان روندی افزایشی داشت

ولی غلظت اکسیژن موجود در بسته‌ها در روز ۳ به صفر رسید (جدول

۱).

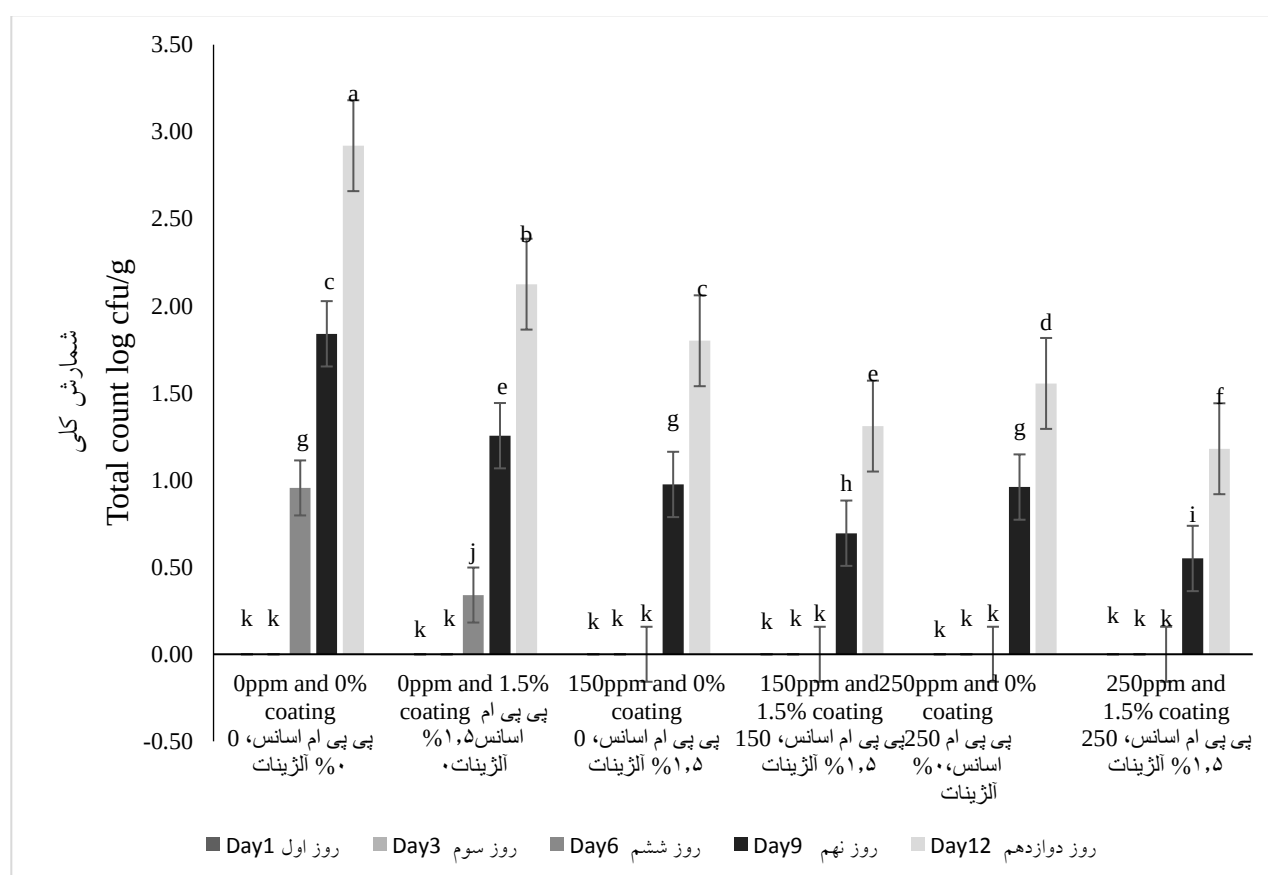
دی‌اکسیدکربن

نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش، زمان و همچنین اثرات متقابل اسانس-پوشش ($P < 0.01$)، اسانس-زمان، پوشش-زمان و

کمترین میزان دی اکسیدکربن در نمونه حاوی ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان و ۱/۵ درصد آلژینات و بیشترین میزان آن در نمونه شاهد گزارش شد. به علت تنفس هوازی سلول‌های هویج و پس از آن بر اثر تنفس بی‌هوازی سلول‌های هویج و همچنین تنفس بی‌هوازی میکروب‌ها میزان دی اکسیدکربن در بسته‌بندی‌های هویج‌های رنده‌شده در سه روز اول نگهداری افزایش یافت و در بسته‌های حاوی نمونه شاهد در روز ۱۲ نگهداری بیشترین میزان آن مشاهده گردید.

اسانس-پوشش-زمان بر تغییرات شاخص دی اکسیدکربن معنی‌دار بود ($P < 0.01$).

اثر متقابل آلژینات، اسانس و زمان بر شاخص دی اکسیدکربن در جدول ۴ نشان داد که در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری شاخص مذکور افزایش معنی‌داری یافت ($P < 0.01$) و با افزایش غلظت آلژینات (به غیر از روز اول نگهداری) و غلظت اسانس لعل کوهستان (به غیر از روز اول و سوم نگهداری) میزان دی اکسیدکربن کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.01$)، به گونه‌ای که در روز ۱۲ نگهداری



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل پوشش آلژینات و اسانس لعل کوهستان بر شمارش کلی در هویج رنده شده
Fig. 1. Mean comparison of Alginate and *Oliveria decumbens* Essential Oil on total Count of grated carrot

یافت ($P < 0.01$). شاخص مذکور در نمونه‌های فاقد اسانس لعل کوهستان (حاوی و فاقد آلژینات) نسبت به نمونه‌های حاوی اسانس لعل کوهستان به طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.01$). همچنین در تمامی تیمارها با افزایش غلظت آلژینات، میزان شمارش کلی کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0.01$). به گونه‌ای که در روز ۱۲ نگهداری کمترین میزان شاخص مذکور در نمونه حاوی ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان و ۱/۵ درصد آلژینات و بیشترین میزان آن در نمونه فاقد آلژینات و اسانس لعل کوهستان گزارش شد ($P < 0.01$) (شکل ۱)، که

نتایج آزمایش‌های میکروبی

تعیین بار میکروبی

شمارش کلی

نتایج نشان داد که اثر اسانس، پوشش، زمان و همچنین اثرات متقابل اسانس-پوشش، اسانس-زمان، پوشش-زمان و اسانس-پوشش-زمان بر شمارش کلی معنی‌دار بود ($P < 0.01$).

اثر متقابل آلژینات، اسانس و زمان در شکل ۱ نشان داد که شمارش کلی در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری افزایش معنی‌داری

چرب کوتاه زنجیر و الکل‌ها را تولید می‌نمایند. دی‌اکسید کربن خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی داشته که این خاصیت بستگی زیادی به غلظت آن دارد. نتایج مطالعه‌ی مقربی و همکاران (Mogharabi et al., 2020) با نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش مطابقت داشت.

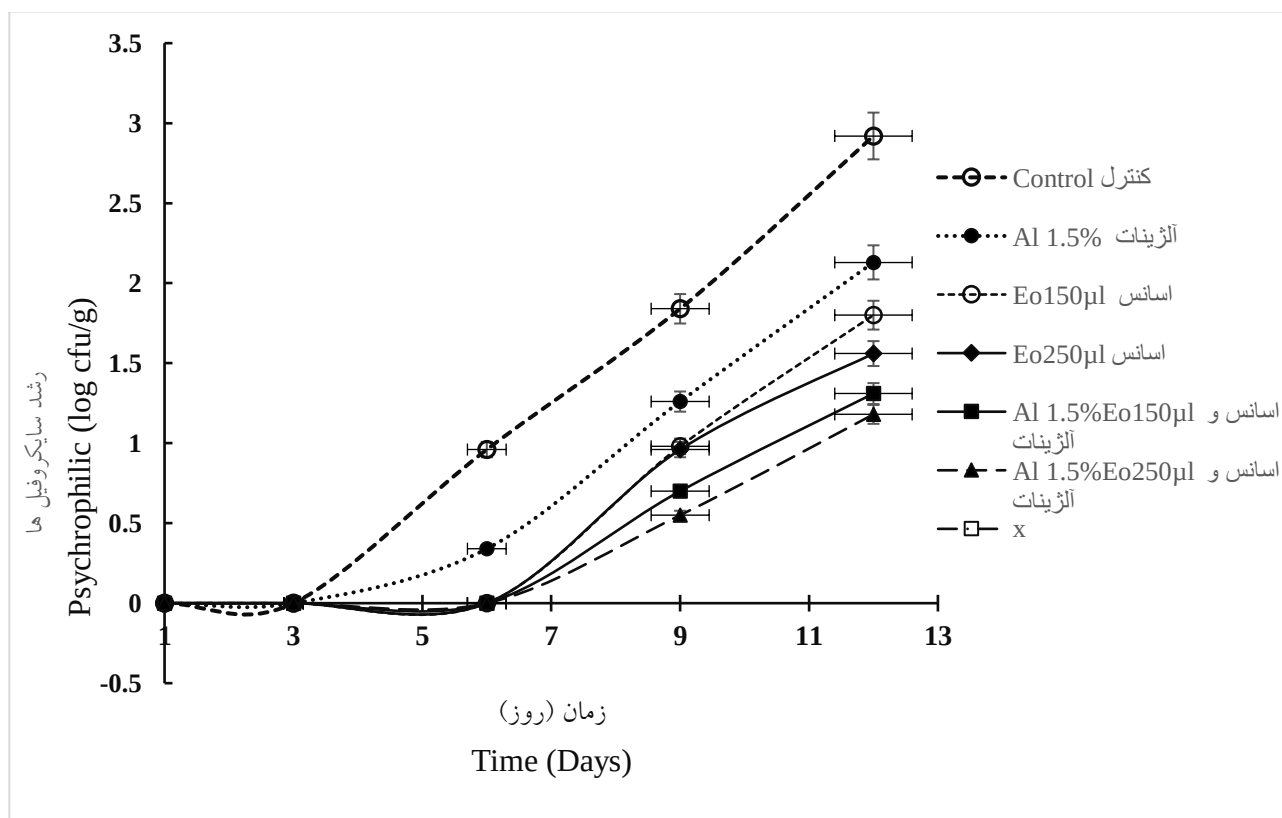
جمعیت سایکروفیل

همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در تمام نمونه‌های حاوی اسانس لعل کوهستان و فاقد اسانس، نمونه حاوی آلژینات نسبت به نمونه فاقد آلژینات از لحاظ میزان سایکروفیل تفاوت معنی‌داری داشتند ($P < 0.01$)، به گونه‌ای که در تمامی نمونه‌های حاوی اسانس لعل کوهستان و فاقد اسانس، نمونه‌های حاوی ۱/۵٪ آلژینات نسبت به نمونه فاقد آن سایکروفیل کمتری را دارا بودند ($P < 0.01$) و کمترین میزان سایکروفیل در نمونه حاوی ۲۵۰ ppm اسانس لعل کوهستان و ۱/۵٪ آلژینات مشاهده گردید ($P < 0.01$).

به‌نظر می‌رسد به‌خاطر خاصیت ضد میکروبی اسانس لعل کوهستان و تأثیر مثبت آن بر کاهش آلودگی باشد (Sánchez-González et al., 2011). از طرفی مخلوط نیتروژن و دی‌اکسید کربن با فراهم کردن یک محیط بی‌هوازی و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های هوازی، از پیشرفت فساد جلوگیری کرده و باعث افزایش عمر ماندگاری می‌شود (Sandhya, 2010). میزان اکسیژن و دمای محیط بر میزان فعالیت ضد میکروبی اسانس تأثیرگذار است، به‌طوری‌که میزان فعالیت ضد باکتریایی اسانس در غلظت‌های پایین اکسیژن بیشتر می‌شود که مطابق با نتایج Atress و همکاران (Atress et al., 2010) بود.

جمعیت کپک و مخمر

نتایج حاصل از شمارش کپک و مخمر نمونه‌ها هیچ‌گونه رشدی از کپک و مخمر تا روز ۱۲ را نشان نداد. در بیان علت آن می‌توان گفت که محصول تازه معمولاً دارای بافت زنده بوده و تنفس می‌کنند. بنابراین اکسیژن مصرف و دی‌اکسید کربن و ترکیبات فراری مانند اسیدهای



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل پوشش آلژینات و اسانس لعل کوهستان بر رشد سایکروفیل در هویج رنده شده

Fig. 2. Mean comparison of Alginate and *Oliveria decumbens* Essential Oil on psychrophilic Count of grated carrot

نتیجه گیری

۲۵۰ ppm بهترین خصوصیات شیمیایی، میکروبی و حسی را نشان داد. نتایج حاکی از آن بود که با ترکیب بسته بندی با اتمسفر اصلاح شده و پوشش آلزینات حاوی اسانس لعل کوهستان، می توان محصول جدید هویج رنده شده آماده مصرف را به بازار مصرف ایران ارائه نمود به طوری که ماندگاری و خصوصیات کیفی خود را در طول نگهداری حفظ نماید.

یافته های پژوهش حاضر نشان داد افزودن اسانس لعل کوهستان و آلزینات به هویج رنده شده در بسته های با اتمسفر اصلاح شده در طول انبارداری در کاهش تنفس، ازدست دادن آب، افزایش عمر نگهداری و کاهش بار میکروبی مؤثر بود و نمونه آلزینات ۱/۵ درصد و اسانس لعل

منابع

1. Acevedo, C.A., López, D.A., Tapia, M.J., Enrione, J., Skurtys, O., Pedreschi, F., ... & Osorio, F. (2012). Using RGB image processing for designing an alginate edible film. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1511-1520. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0453y>
2. Amin, G., Sourmaghi, M.S., Zahedi, M., Khanavi, M., & Samadi, N. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Oliveria decumbens*. *Fitoterapia*, 76(7-8), 704-707.
3. Amodio Colelli, H., & Kader, A.A. (2007). A comparative study of composition and postharvest performance of organically and conventionally grown kiwifruits, *Science of Food and Agriculture*, 87, 1236-1228.
4. AOAC. (1990). *Association of Official Analytical Chemists*. Chemical compositions, nutritional properties and volatile compounds of guddaim (*Grewia Tenax*. Forssk) Fiori Fruits. In.
5. Atress, A., El-Mogy, M.M., Aboul-Anean, H.E., & Alsanius, B.W. (2010). Improving strawberry fruit storability by edible coating as a carrier of thymol or calcium chloride, *Horticultural Science & Ornamental Plants*, 2, 88-97.
6. Ayhan, Z., Esturk, O., & TAŞ, E. (2008). Effect of modified atmosphere packaging on the quality and shelf life of minimally processed carrots. *Turkish Journal of Agriculture*, 32, 57-62.
7. Ayranci, E., & Tunc, S. (2004). The effect of edible coatings on water and vitamin C loss of apricots (*Armeniaca vulgaris* Lam.) and green peppers (*Capsicum annum* L.), *Food Chemistry*, 87, 339-342. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.003>
8. Babalar, M., Asgarpour, A., & Asgari, M.A. (2015). The effect of pre and postharvest treatment of salicylic acid and putrescine on some fruit quality of Granny Smith apple. *Journal of Horticultural Science*, 28(4), 479-486.
9. Badi, H.N., Naghavi, M., Asadi, S., Moghaddam, H., & Salami, A.R. (2021). Home Browse Journal Info Guide for Authors Submit Manuscript Reviewers Contact Us The effect of deficient irrigation on growth period duration and phenology of some Cannabis ecotypes, 23(3). <https://doi.org/10.22067/ijfstrj.v8i3.18476>
10. Bahramian, F., & Javanmard, M. (2010). Shelf-life stability of fresh-cuts melon coated with whey protein stored at low temperatures. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 5(2), 53-62.
11. Batu, A., & Thompson, A.K. (1998). Effects of modified atmosphere packaging on post harvest qualities of pink tomatoes. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22(4), 365-372.
12. Becaro, A.A., Puti, F.C., Panosso, A.R., Gern, J.C., Brandão, H.M., Correa, D.S., & Ferreira, M.D. (2016). Postharvest quality of fresh-cut carrots packaged in plastic films containing silver nanoparticles. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 637-649. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1656-z>
13. Burdon, J., McLeod, D., Lallu, N., Gamble, J., Petley, M., & Gunson, A. (2004). Consumer evaluation of "Hayward" kiwifruit of different at-harvest dry matter contents. *Postharvest Biology and Technology*, 34(3), 245-255. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.04.009>
14. Cho, S.S., & Dreher, M.L. (2001). *Handbook of dietary fiber*. 1th edn, USA: CRC Press, 15.
15. Dong, H., Cheng, L., Tan, J., Zheng, K., & Jiang, Y. (2004). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. *Journal of Food Engineering*, 64(3), 355-358. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.11.003>
16. Esmaeili, Y., Zamindar, N., Paidari, S., Ibrahim, S.A., & Mohammadi Nafchi, A. (2021). The synergistic effects of aloe vera gel and modified atmosphere packaging on the quality of strawberry fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(12), p.e16003. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16003>
17. Esmaeili, Y., Paidari, S., Baghbaderani, S.A., Nateghi, L., Al-Hassan, A.A., & Ariffin, F. (2021). Essential oils as natural antimicrobial agents in postharvest treatments of fruits and vegetables: a review. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01178-0>
18. Eshghi, S., Hashemi, M., Mohammadi, A., Badie, F., Hosseini, Z.M., Ahmadi, K., & Ghanati, K. (2013). Effect of nano-emulsion coating containing chitosan on storability and qualitative characteristics of strawberries after picking. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(2), 9-19.

19. Falahi, E., Ghiasvand, A., Ebrahimzadeh, F., & Khalkhali Rad, A.H. (2013). The determination of vitamin C, organic acids, phenolic compounds concentration of Red and Golden delicious apple grown in Lorestan province. *Yafte*, 15(2), 5-14.
20. Ghorbani, Z., Zamindar, N., Baghersad, S., Paidari, S., Jafari, S.M., & Khazdooz, L. (2021). Evaluation of quality attributes of grated carrot packaged within polypropylene-clay nanocomposites. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(4), 3770-3781. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00925-7>
21. Ghorbani, Z., Zamindar, N., Jelvan, M., & Golabadi, M. (2020). Effect of *Oliveria decumbens* essential oils on microbial characteristics of hamburger. *Food Hygiene*, 10(2 (38)), 77-93.
22. Gol, N.B., Patel, P.R., & Rao, T.V.R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185-195.
23. Jobling, J. (2001). Modified atmosphere packaging: Not as simple as it seems. *Good Fruit and Vegetables Magazine*, 11, 1-3.
24. Kim, S.A., & Rhee, M.S. (2015). Synergistic antimicrobial activity of caprylic acid in combination with citric acid against both *Escherichia coli* O157: H7 and indigenous microflora in carrot juice. *Food Microbiology*, 49, 166-172. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.009>
25. Larsen, H., & Wold, A.B. (2016). Effect of modified atmosphere packaging on sensory quality, chemical parameters and shelf life of carrot roots (*Daucus carota* L.) stored at chilled and abusive temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 114, 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.014>
26. Lu, F., Liu, D., Ye, X., Wei, Y., & Liu, F. (2009). Alginate-calcium coating incorporating nisin and EDTA maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4 C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(5), 848-854. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3523>
27. Manthe, B., Schulz, M., & Schnabl, H. (1992). Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L: evidence for salicylic acid metabolism, *Journal of Chemical Ecology*, 18, 1525-1539.
28. Mogharabi, A., Zamindar, N., Khosravi, E., & Ghorbani, Z. (2020). The effects of *Oliveria decumbens* essential oil and chitosan on physicochemical, microbial and sensory characteristics of grated carrots in polypropylene packaging under modified atmosphere during storage. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 9(2), 203-220. <https://doi.org/10.22101/JRIFST.2020.209697.1127>
29. Norajit, K., Kim, K.M., & Ryu, G.H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 377-384. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.015>
30. Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.005>
31. Quitão-Teixeira, L. J., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Mota-Ramos, A., & Martín-Belloso, O. (2009). Comparative study on antioxidant properties of carrot juice stabilised by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(15), 2636-2642. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3767>
32. Rad, M., Ghafori, H., & Gholami, Z. (2020). Effect of edible coating containing carboxymethyl cellulose and sodium metabisulfite on the shelf life of the button mushroom. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 16(5), 581-605. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v16i5.83614>
33. Rocha, A. M., Ferreira, J. F., Silva, Â. M., Almeida, G. N., & Morais, A. M. (2007). Quality of grated carrot (var. Nantes) packed under vacuum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(3), 447-451. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2723>
34. Rojas-Graü, M.A., Tapia, M.S., Rodríguez, F.J., Carmona, A.J., & Martín-Belloso, O. (2007). Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.03.001>
35. Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Chafer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9031-3>
36. Sandhya, M. (2010). Modified atmosphere packaging of fresh produce: current status and future needs. *LWT Food Science Technology*, 43, 381-392.
37. Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., & Perumalsamy, P.L. (2001). Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 74(3), 217-220. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00345-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00345-7)
38. Ullsten, N.H., & Hedenqvist, M.S. (2003). A new test method based on head space analysis to determine permeability to oxygen and carbon dioxide of flexible packaging. *Polymer Testing*, 22(3), 291-295. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(02\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(02)00101-0)

39. Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y., & Tang, Y. (2011). Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, 124(4), 1443-1450. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.105>
40. Zamindar, N., Ghorbani, Z., & Mosafa, L. (2020). Changes in the physicochemical and microbial properties of fresh-cut cucumber during storage as affected by modified atmosphere packaging and films of polypropylene containing clay nanoparticles. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 15(1), 83-92.
41. Zhang, D., Quantick, P., Wiktorowicz, R., & Irvén, J. (2000). Noble gases for modified atmosphere packaging of fresh fruits and vegetables. *Critical reviews in Food Science*, 3, 12-16.



The Effect of Ultrasound Pretreatment on Hydrolysis Time by Pepsin Enzyme to Produce Antioxidant Peptides from Edible Mushroom (*Agaricus bisporus*) Protein

I. Izanloo¹, A.R. Sadeghi Mahoonak^{2*}

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

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

Received: 2022.10.20
Revised: 2023.03.02
Accepted: 2023.04.29
Available Online: 2023.04.29

How to cite this article:

Izanloo, I., & Sadeghi Mahoonak, A.R. (2023). The effect of ultrasound pretreatment on hydrolysis time by pepsin enzyme to produce antioxidant peptides from edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5), 693-709. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78786.1203>

Introduction

Free radicals originate from oxidation reactions decrease food quality and also promote incidence of various diseases such as cancer. In this regard, the use of natural compounds with antioxidant properties, such as bioactive peptides, is of interest to many researchers. Food-derived bioactive peptides, can play an important role in the oxidative systems. Ultrasound, as a cheap and green technology, is widely used to extract proteins and antioxidant compounds. Ultrasound pretreatment before enzymatic hydrolysis can open the protein structure and increase the intensity of proteolysis by increasing the exposure of peptide bonds prone to enzymatic hydrolysis; which increases the production efficiency of bioactive peptides. Ultrasound treatment changes the three-dimensional structure of proteins. Therefore, a combination of pretreatment with ultrasound and sequential enzymatic hydrolysis can be a promising way to modify the function of proteins.

Materials and Methods

In this research the effect of hydrolysis time and ultrasonic pretreatment on enzymatic hydrolysis of edible mushroom protein by pancreatic enzyme to produce peptides with high antioxidant capacity was evaluated. First edible mushroom was turned into powder and then, in order to optimize the production of hydrolyzed proteins with maximum antioxidant activity, the hydrolysis was performed 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 minutes with a ratio of enzyme to substrate of 1% (based on the result of previous research) and at 40°C in four conditions (1- without ultrasound pre-treatment, 2- with ultrasound pre-treatment with 40% power, 3- with ultrasound pre-treatment with 70% power and 4- with ultrasound pre-treatment with 100% power) by ultrasound probe in 5 minutes before adding the enzyme. In the next step, the antioxidant capacity of hydrolyzed proteins was measured at different times by DPPH free radical scavenging activity, iron ion reduction power, iron ion chelation and total antioxidant capacity.

Results

The results showed that the highest DPPH free radical scavenging activity in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 69.1, 77.45, 79.07 and 80.27, respectively. In most of the hydrolysis times, DPPH free radical scavenging activity in ultrasound treatment with 100% power was higher than the samples treated with 40 and 70% power. The highest total antioxidant capacity in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 0.871, 1.025, 1.05 and 1.2 (absorption at 695 nm), respectively. In most of the hydrolysis times, the total antioxidant capacity in the samples treated with ultrasound with 100% power was higher than the samples treated with



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78786.1203>

40 and 70% power. The results showed that the highest reducing power of Fe^{3+} in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 2.03, 2.40, 2.44 and 2.51 (absorption at 700 nm), respectively. The highest iron ion chelation power in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 25.22, 30.40, 26.52 and 41.10%, respectively. By increasing the ultrasound power in most of the hydrolysis times, the chelating power of iron ions in the ultrasound treatment with 100% power was higher than the samples pretreated with 40 and 70% power. The results showed that samples pretreated with 100% power ultrasound have the highest antioxidant properties compared to samples without pretreatment and pretreated with 40% and 70% ultrasound power. Based on the results, using ultrasound treatment with 100% power and during hydrolysis time of 60 minutes, a product with high antioxidant capacity was obtained and selected as a suitable treatment.

Conclusion

The ultrasonic mechanism is attributed to its thermal effects, cavitation and mechanical efficiency, so that it can increase the mass transfer and increase the contact between the substrate and the enzyme or change the spatial structure of the substrate. The results showed that samples pretreated with ultrasound with 100% power have the highest antioxidant properties compared to samples without pretreatment and pretreated with 40 and 70% power. Therefore, the use of high-power ultrasonic pretreatment shortens the hydrolysis time to achieve peptides with higher antioxidant capacity and thus increases the efficiency of enzymatic hydrolysis.

Keywords: Antioxidant properties, Bioactive peptides, Mushroom powder, Pretreatment, Protein



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- آذر ۱۴۰۲ ص. ۶۹۳-۷۰۹

تأثیر پیش تیمار فراصوت بر زمان هیدرولیز به وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی اکسیدانی از پروتئین قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*)

آیسان ایزانلو^۱ - علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۹

چکیده

پپتیدهای زیست فعال در واقع بخش های پروتئینی خاصی هستند که علاوه بر ارزش غذایی، تأثیرات مثبتی بر عملکرد بدن دارند. فراصوت، به عنوان یک فناوری سبز، و ارزان، به طور گسترده ای برای استخراج پروتئین و ترکیبات آنتی اکسیدانی استفاده می شود. تیمار با فراصوت باعث تغییر ساختار سه بعدی پروتئین ها می شود. در نتیجه، ترکیبی از پیش تیمار با فراصوت و هیدرولیز آنزیمی می تواند راهی امیدوار کننده برای اصلاح عملکرد پروتئین ها باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثر زمان هیدرولیز و همچنین تأثیر پیش تیمار فراصوت بر هیدرولیز آنزیمی پروتئین قارچ دکمه ای به وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی اکسیدانی می باشد. جهت انجام پژوهش ابتدا قارچ به پودر تبدیل و سپس عمل هیدرولیز در زمان های ۳۰-۲۱۰ دقیقه با نسبت به آنزیم به سوبسترا ۱٪ (وزنی/وزنی) نسبت به وزن سوبسترای پروتئینی) و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در چهار وضعیت بدون و با پیش تیمار فراصوت با توان ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ صورت گرفت. افزایش توان تیمار فراصوت باعث افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، فعالیت شلاته کنندگی یون آهن، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و قدرت احیا کنندگی یون آهن در زمان های هیدرولیز کوتاه تر گردید. نتایج نشان داد، نمونه های پیش تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ نسبت به نمونه های بدون پیش تیمار و پیش تیمار شده با توان ۴۰ و ۷۰٪ بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی را دارا می باشند. بنابراین استفاده از پیش تیمار فراصوت با توان بالا موجب کوتاه نمودن زمان هیدرولیز جهت دستیابی به پپتیدهای با قابلیت آنتی-اکسیدانی بالاتر و افزایش کارایی هیدرولیز آنزیمی می گردد. براساس نتایج تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ و طی زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه موجب دستیابی محصولی با قابلیت آنتی اکسیدانی بالا می گردد و به عنوان تیمار مناسب انتخاب گردید.

واژه های کلیدی: پپتیدهای زیست فعال، پروتئین، پودر قارچ، پیش تیمار، ویژگی آنتی اکسیدانی

مقدمه

ارتباط با ایمنی و جنبه های وابسته به سلامتی آن ها نگرانی هایی وجود دارد. از این رو پیشرفت در استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی به منظور جایگزینی با آنتی اکسیدان های مصنوعی مورد توجه پژوهشگران می باشد (Vioque et al., 2001). آنتی اکسیدان های سنتزی مانند BHA، BHT، PG^۳ و TBHQ^۴ به دلیل نگرانی های مرتبط با عوارض نامطلوب آن ها بر سلامت انسان، تحت کنترل و نظارت شدید

به منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت بدن در مقابل بسیاری از بیماری ها ضروری است از پراکسیداسیون چربی ها و تشکیل رادیکال های آزاد به وجود آمده در فرآورده های غذایی و سلول های زنده جلوگیری شود. بسیاری از آنتی اکسیدان های سنتزی به عنوان افزودنی غذایی جهت جلوگیری از کاهش کیفیت غذا به کار برده می شوند که در

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*)- نویسنده مسئول (Email: sadeghiaz@gau.ac.ir)

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78786.1203>

3- butylated hydroxyanisole

4- butylated hydroxytoluene

5- propyl gallate

6- Tertiary butylhydroquinone

قارچ به عنوان یکی از قدیمی ترین مواد غذایی با ارزش غذایی مناسب در نظر گرفته می شود، و ارزش غذایی آن ها قابل مقایسه با ماهی و گوشت، می باشد. قارچ منبع مناسبی از اسیدهای آمینه ضروری متعدد، پروتئین ها، ویتامین ها، موادمعدنی و غیره است و به همین دلیل مصرف آن رو به افزایش است. یکی از اجزای تغذیه ای مهم قارچ پروتئین است، در نتیجه می تواند منبع خوبی جهت تولید پپتیدهای زیست فعال باشد (Lavi et al., 2012). هدف از این پژوهش بررسی اثر زمان هیدرولیز و همچنین تاثیر پیش تیمار فراصوت بر هیدرولیز آنزیمی پروتئین قارچ دکمه ای (*Agaricus bisporus*) به وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان می باشد.

مواد و روش ها

مواد

پپسین (به صورت پودر با فعالیت ۲۵۰ U/mg)، DPPH، پتاسیم فری سیانید، فریک کلراید، تری کلرواستیک اسید، آسکوربیک اسید از شرکت سیگما، اتانول ۹۶٪، سود، اسید کلریدریک، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، اسید فسفریک از شرکت مرک و قارچ خوراکی دکمه ای (*Agaricus bisporus*) از بازار محلی تهیه شدند.

آماده سازی قارچ خوراکی

قارچ های خریداری شده ابتدا شسته و قطعه قطعه، سپس توسط آب داغ آنزیم بری (فرو بردن در آب جوش به مدت ۳ دقیقه و سپس فرو بردن در آب یخ) شدند. سپس در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد در آن تا زمانی که رطوبت آن ها به زیر ۱۰ درصد برسد، خشک شدند. در نهایت قارچ های خشک شده به کمک آسیاب آزمایشگاهی تبدیل به پودر شدند و پس از عبور از الک با مش ۸۰ در کیسه های پلی پروپیلنی بسته بندی و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شدند (He et al., 2012).

اندازه گیری ترکیبات شیمیایی

اندازه گیری ترکیبات شیمیایی با استفاده از روش AOAC انجام شد. برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، از دستگاه کلدال (ساخت آلمان، بهر، S3)، میزان خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی (ساخت آلمان، نابرت، FX118-30) استفاده شد و میزان رطوبت با قرار دادن در آن ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، تعیین شد (Horwitz et al., 1970).

هستند. در سال های اخیر، افزایش آگاهی مصرف کنندگان در ارتباط بین سلامت و رژیم غذایی موجب افزایش تقاضا برای غذاهای فراسودمند شده است (FitzGerald & Meisel, 2000). پپتیدهای زیست فعال توالی هایی با ۲۰-۳ اسید آمینه هستند که از شکسته شدن پروتئین به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد تشکیل می شوند (Nourmohammadi et al., 2017). پپتیدهای زیست فعال در واقع بخش های پروتئینی خاصی هستند که علاوه بر ارزش غذایی، تأثیرات مثبتی بر عملکرد بدن و شرایطی دارند که منجر به اثرگذاری بر سلامتی می شود. البته پپتیدهای زیست فعال در ساختار پروتئین والد به شکل غیرفعال هستند و زمانی که به صورت توالی پپتیدی آزاد می شوند، می توانند اثرات سلامتی بخش خود را بروز دهند (Bhat et al., 2015). رایج ترین روش تولید پپتیدهای فعال زیستی از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین ها است. اکثر پپتیدهای فعال زیستی شناخته شده با استفاده از آنزیم های دستگاه گوارش، معمولاً پپسین و تریپسین تولید شده اند. در زمینه تولید پروتئین های هیدرولیز شده تحقیقات زیادی انجام شده است. فرآیندهای هیدرولیز آنزیمی دارای معایبی از جمله کارایی پایین آنزیم، زمان طولانی فرایند آنزیمی و نرخ پایین تبدیل سوبسترا به محصول می باشند (Zhou et al., 2017). در نتیجه امروزه از روش های مختلف نظیر امواج فراصوت، مایکروویو، انجماد، فرایند فشار بالا، و غیره برای پیش تیمار پروتئین و رفع مشکلات فوق استفاده می شود (Li et al., 2017). فراصوت، به عنوان یک فناوری سبز، و ارزان، به طور گسترده ای برای استخراج پروتئین و ترکیبات آنتی اکسیدانی استفاده می شود (Wen et al., 2018). علاوه بر این، فرایند فراصوت تأثیری بر روی ساختار اولیه پروتئین ندارد با این حال موجب تغییر در ساختار سوم و چهارم پروتئین می گردد که این امر در ویژگی های عملکردی و زیست فعالی آن تأثیرگذار است (Walters, 2019). پیش تیمار فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی می تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین و افزایش شدت پروتئولیز از طریق افزایش در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مستعد به هیدرولیز آنزیمی گردد؛ این امر باعث افزایش کارایی تولید پپتیدهای زیست فعال می گردد (Kadam et al., 2015). تیمار با فراصوت باعث تغییر ساختار سه بعدی پروتئین ها می شود. در نتیجه، ترکیبی از پیش تیمار با فراصوت و هیدرولیز آنزیمی متوالی می تواند راهی امیدوارکننده برای اصلاح عملکرد پروتئین ها باشد (Chen et al., 2011).

پن و همکاران (Pan et al., 2016)، گزارش کردند که افزایش مدت زمان فعالیت آنزیم، منجر به افزایش رهاسازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهنده می شود، که این پپتیدها می توانند رادیکال های آزاد را به ترکیباتی پایدار تبدیل کنند، در نتیجه با افزایش مدت زمان هیدرولیز، فعالیت آنتی اکسیدانی کل نمونه ها افزایش یافته است.

هیدرولیز پروتئین پودر قارچ

جهت انجام هیدرولیز با پیپسین از روش (Paisansak et al., 2020)، با کمی تغییرات استفاده شد. ۵۰ گرم پودر قارچ را در بالن حجمی توزین و در ۱۰۰۰ میلی لیتر بافر فسفات (pH=۲) مخلوط گردید. سپس به منظور بهینه سازی تولید پروتئین های هیدرولیز شده با حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی، عمل هیدرولیز در طی زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه با نسبت به آنزیم به سوستر ۱ درصد (بر مبنای آزمون های اولیه) و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در چهار وضعیت صورت گرفت. حالت اول نمونه بدون پیش تیمار فراصوت، حالت دوم همراه با پیش تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد، حالت سوم همراه با پیش تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد و حالت چهارم همراه با پیش تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد توسط پروب فراصوت (توان ۲۰۰ وات و فرکانس ۲۴ کیلوهرتز، مدل UP 200H Ultrascallprozessor) در زمان ۵ دقیقه قبل از افزودن آنزیم انجام گرفت (لازم به ذکر است که انتخاب توان فراصوت بر مبنای آزمون های اولیه صورت گرفت). پس از اتمام زمان هیدرولیز به منظور غیرفعال کردن آنزیم، محلول پروتئینی تلقیح شده با آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب قرار داده شد تا آنزیم غیرفعال شود. هر تیمار به طور جداگانه در سانتریفیوژ یخچال دار با ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و سوپرناتانت حاصل با خشک کن انجمادی برای به دست آوردن پودر پروتئین هیدرولیز شده خشک گردید. سپس پودر حاصل تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در مرحله بعد قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین های هیدرولیز شده در زمان های مختلف توسط روش های فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، شلاته کنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل اندازه گیری گردید.

آزمون های آنتی اکسیدانی

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH از روش چی و همکاران (Chi et al., 2015)، قدرت احیا کنندگی آهن از روش بوگاتوف و همکاران (Bougatef et al., 2009)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل از روش پریو و همکاران (Dasgupta & De, 2007) و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن از روش جامدار و همکاران (Jamdar et al., 2010) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش اثر زمان های مختلف هیدرولیز (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه) بر ویژگی های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ی قارچ خوراکی و همچنین تأثیر پیش تیمار فراصوت ویژگی های آنتی اکسیدانی با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار

SPSS نسخه ۱۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه آزمون ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن جهت بررسی معنی دار بودن متغیر در $P < 0.05$ و رسم نمودارها نیز با نرم افزار Excel 2013 انجام گرفت.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی

ترکیبات شیمیایی پودر قارچ در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی پودر قارچ خوراکی
Table 1- Chemical composition of mushroom powder

ترکیب شیمیایی Chemical compounds	مقدار Amount
پروتئین (N×۶/۲۵) Protein	26.6 ± 0.17
چربی Fat	3.8 ± 0.15
رطوبت Moisture	6.02 ± 0.52
خاکستر Ash	7.66 ± 0.12
کربوهیدرات (اختلاف از سایر ترکیبات) Carbohydrate by Diff.	55.92 ± 0.15

*اعداد بر مبنای وزن خشک گزارش شدند.

Data reported as dry basis

*میانگین سه تکرار ± انحراف معیار

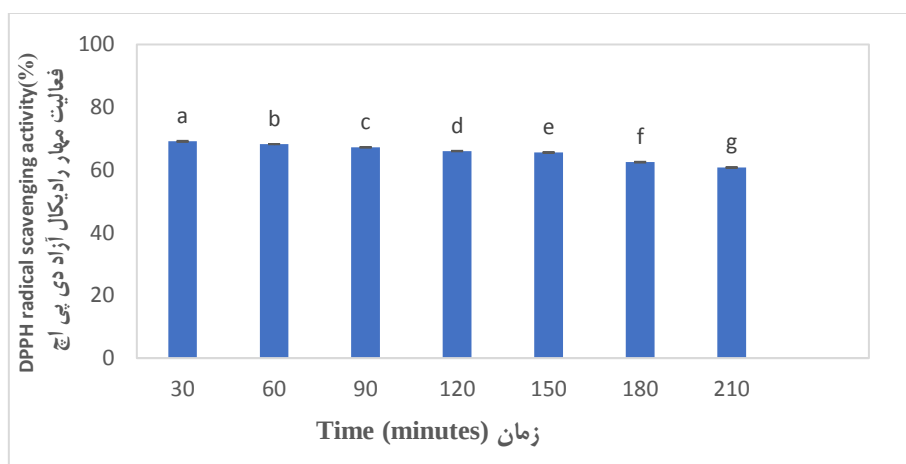
Three replications ± Mena

تأثیر زمان هیدرولیز و پیش تیمار فراصوت بر روی مهار

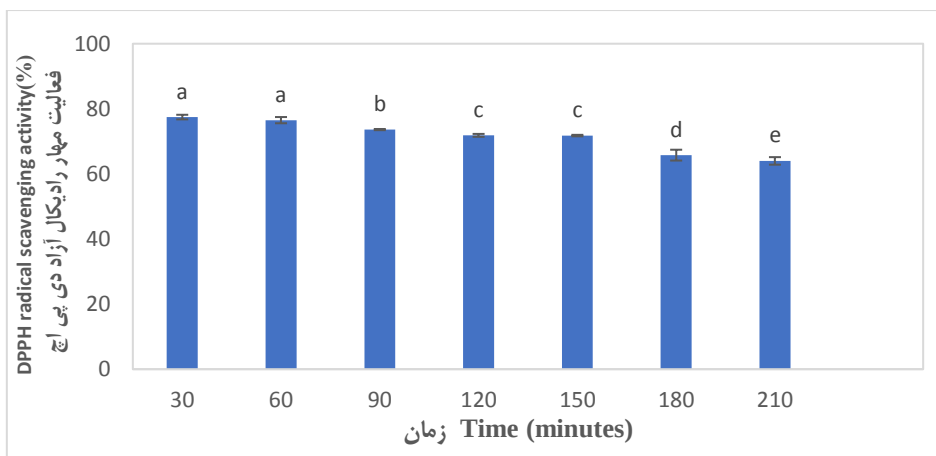
رادیکال آزاد DPPH

در شکل ۱ قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

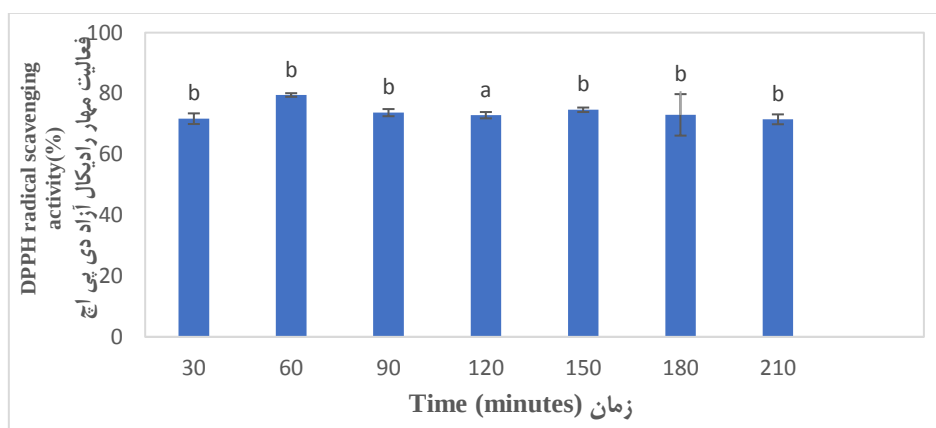
باتوجه به شکل ۱الف بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه های تیمار نشده در زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به میزان ۶۹/۱۰ درصد مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز قابلیت مهار رادیکال DPPH کاهش یافت که دلیل این کاهش پیشرفت هیدرولیز و هیدرولیز پپتیدهای با خاصیت آنتی اکسیدانی تولیدی در زمان اولیه هیدرولیز می باشد.



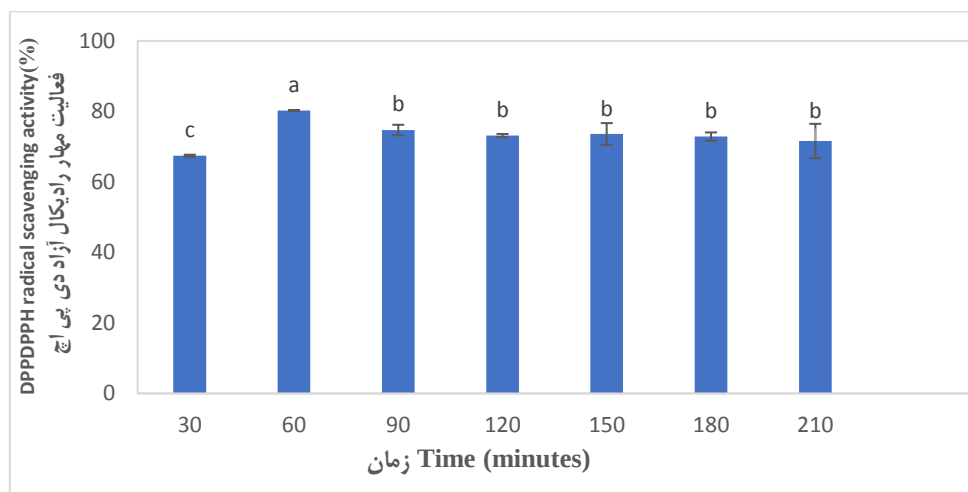
a الف



b ب



c ج



d د

شکل ۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), hydrolyzed protein with 40% ultrasound treatment (1b), hydrolyzed protein with 70% ultrasound treatment (1c) and protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

تیمارنشده و تیمار شده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به ترتیب ۶۹/۱۰ و ۷۷/۴۵ درصد مشاهده شد که نشان از افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH تحت تأثیر تیمار فراصوت بود.

با توجه به شکل ۱ج بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۷۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۷۹/۰۷ درصد مشاهده شد. همچنین بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۸۰/۲۷ درصد مشاهده شد. با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، افزایش توان تیمار فراصوت در زمان‌های ابتدایی باعث افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH گردید. در اغلب زمان‌های هیدرولیز، قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰ و ۷۰٪ بود. فراصوت موجب بهبود فعالیت به دام انداختن رادیکال‌های آزاد می‌گردد، که این امر توسط محققین مختلف گزارش شده است (Nadeem et al., 2018). پیش تیمار فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین و افزایش شدت پروتئولیز از طریق افزایش در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مستعد به هیدرولیز آنزیمی گردد؛ این امر باعث افزایش کارایی در تولید پپتیدهای زیست‌فعال می‌گردد (Kadam et al., 2018).

فرآیند فراصوت در طی هیدرولیز موجب کاهش وزن مولکولی همراه با در معرض قرارگیری مقادیر بالاتر اسیدهای آمینه آبگریز و

مشکین فر و همکاران (Meshginfar et al., 2014)، گزارش کردند که فرایند هیدرولیز باعث رها شدن پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از پروتئین می‌شود اما افزایش زمان هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم منجر به شکستن تعدادی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز می‌گردد در نتیجه از فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته می‌شود. احتمالاً پیشرفت هیدرولیز و تأثیر آنزیم بر پپتیدهای تولید شده در مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا شده است در نتیجه قابلیت آنتی‌اکسیدانی تولیدی در مراحل بعدی کاهش یافته است. در شکل ۱ب، ج و د به ترتیب قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان‌های ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

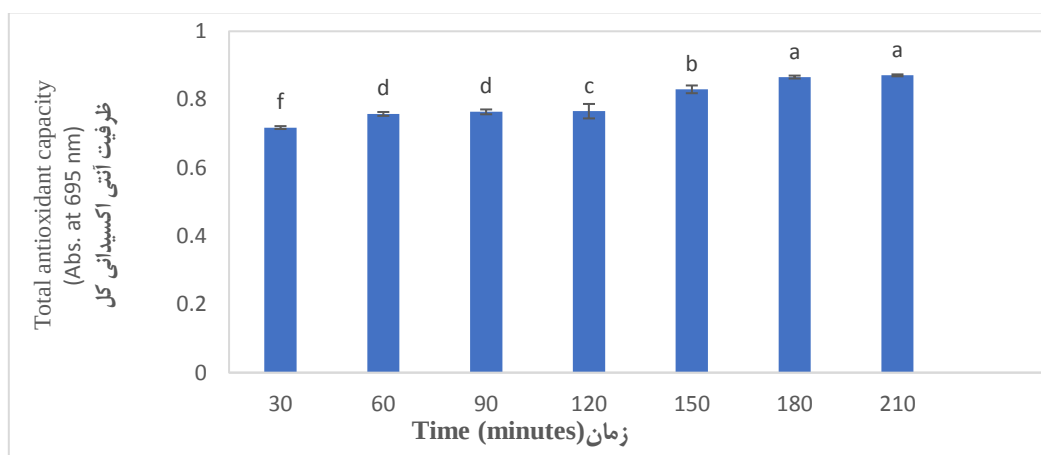
بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ در زمان ۳۰ دقیقه به میزان ۷۷/۴۵ درصد مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان‌های ابتدایی هیدرولیز در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده است. به‌طوری‌که مقادیر آن برای نمونه‌های بدون پیش تیمار فراصوت و نمونه‌های تیمار شده با فراصوت ۴۰٪ و در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب ۶۹/۱۰ و ۶۸/۲۲ درصد و ۷۷/۴۵ و ۷۶/۵۱ درصد بود. این امر نشان از افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های تیمار شده توسط فراصوت در زمان‌های ابتدایی هیدرولیز بود. همچنین بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های

پروتئینی را تغییر داده، در نتیجه مکان‌های آبریز ایزوله پروتئین گردو در معرض قرار می‌گیرند؛ که در نهایت این امر موجب افزایش سطح تماس بین آنزیم و سوبسترا شده و باعث بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گردو می‌شود (Matmaroh et al., 2011).

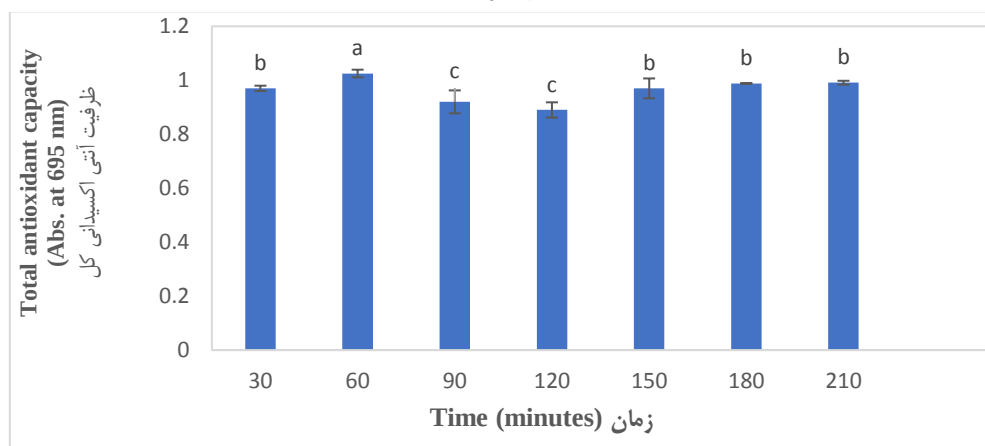
تأثیر زمان هیدرولیز و پیش‌ تیمار فراصوت بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

در شکل ۲ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌ تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

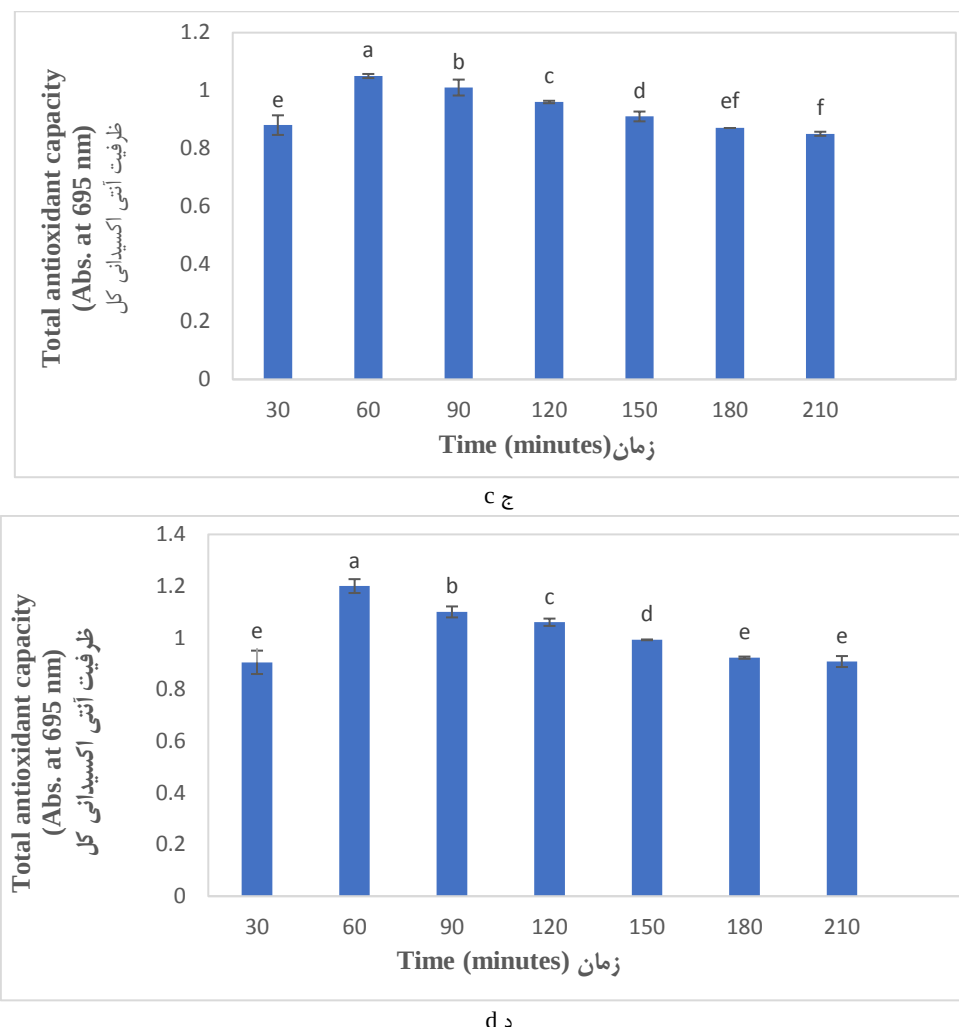
همچنین موجب تقویت برهمکنش پپتید با مولکول DPPH می‌گردد. مطالعه‌ی گورا آل‌موناسید و همکاران (Guerra-Almonacid et al., 2019)، نشان داد که پروتئین‌های هیدرولیز شده *erythrina edulis* تیمار شده با فراصوت نسبت به نمونه‌های تیمار نشده دارای بالاترین فعالیت‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به‌ترتیب با مقادیر IC_{50} در محدوده ۱۵۱/۱۳ تا ۱۷۳/۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۶۴/۵۲ تا ۷۷/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. همچنین گزارش شد، فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده گردو با تیمار فراصوت با توان ۸۰۰ وات (به مدت ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه)، ۱۲۰۰ وات (به مدت ۵، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ دقیقه)، ۱۴۰۰ وات (به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه)، و ۱۸۰۰ وات (به مدت ۲۰ دقیقه) بالاتر از نمونه شاهد بود. آن‌ها گزارش کردند که این نتایج ممکن است به دلیل تغییرات ساختاری در فراکسیون‌های ایزوله پروتئینی گردو پس از پیش‌ تیمار فراصوت باشد که باعث می‌شود فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های آن متفاوت باشد. پیش‌ تیمار فراصوت با شدت بالا می‌تواند محیط اطراف گروه‌های



الف



ب



شکل ۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Fig. 2. Total antioxidant capacity in hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 40% power (1b), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 70% power (1c) and protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

ثبات‌تر تبدیل کنند، بنابراین موجب توقف واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون می‌گردند (Aderinola *et al.*, 2019).

در شکل ۲ ب، ج و د به ترتیب ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در نمونه های تیمار شده با فراصوت با توان‌های ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در نمونه های تیمار شده با فراصوت ۴۰٪ در زمان ۶۰ دقیقه به میزان ۱/۰۲ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در زمان های هیدرولیز در نمونه های تیمار شده با فراصوت ۴۰٪ بالاتر از نمونه های تیمار نشده است. به طوری که مقادیر آن برای نمونه های

با توجه به شکل ۲ الف بالاترین میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در نمونه های تیمار نشده در زمان های هیدرولیز ۲۱۰ دقیقه به میزان ۰/۸۷ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز ظرفیت آنتی اکسیدانی کل افزایش یافت، که دلیل این افزایش پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان می‌باشد. در واقع با افزایش زمان فعالیت آنزیم پیپسین، آزاد سازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهنده گی افزایش یافته است. پیش تیمار فراصوت موجب می‌شود که در طول هیدرولیز، بخش های پروتئین های با وزن مولکولی بالا به بخش هایی با وزن مولکولی نسبتاً کوچک با ظرفیت اهدای الکترون تجزیه شوند و بنابراین می‌توانند با رادیکال های آزاد واکنش داده و آن ها را به محصولاتی با

های فعال را منتقل و در معرض قرار داده و در واکنش‌های اکسیداسیون دخالت می‌کند (Wali et al., 2017).

تأثیر زمان هیدرولیز و پیش‌ تیمار فراصوت بر روی قدرت احیاءکنندگی یون آهن

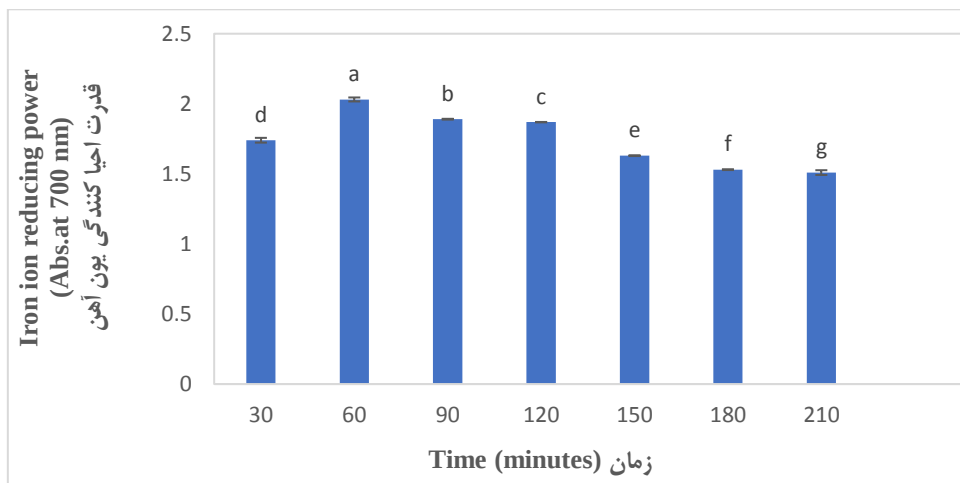
در شکل ۳ قدرت احیاءکنندگی یون آهن نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌ تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

باتوجه به شکل ۳ الف بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمارنشده در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۲/۰۳ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز ابتدا قدرت احیاءکنندگی یون آهن افزایش و سپس کاهش یافت، که دلیل این افزایش پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد. احتمالاً پیشرفت هیدرولیز و تأثیر آنزیم بر پپتیدهای تولید شده در مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهایی با قدرت احیاءکنندگی یون آهن بالا شده است در نتیجه این قابلیت در مراحل بعدی کاهش یافته است. این یافته‌ها حاکی از تأثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم پسین بر افزایش قدرت احیاءکنندگی یون آهن پروتئین اولیه می‌باشد. به‌طور کلی افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاءکنندگی شد، این امر می‌تواند به دلایل مختلفی باشد از جمله این که، افزایش میزان هیدرولیز منجر به آزاد شدن آمینواسیدهای آزاد می‌گردد که به‌عنوان منبع اضافی از الکترون‌ها و پروتون‌ها عمل می‌کنند (Zhu et al., 2008).

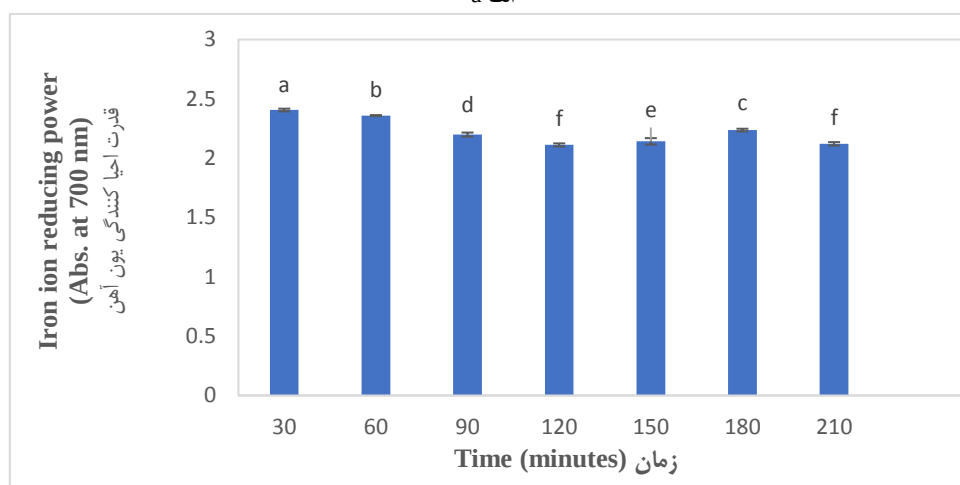
جی و همکاران (Je et al., 2009)، نشان دادند که هیدرولیز آنزیمی، سبب شکستن اتصالات مجاور اسیدهای آمینه فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان شده و به با شکسته شدن این پیوندهای پپتیدی و رها شدن آن‌ها از ساختار اصلی پروتئین‌ها، وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها کاهش می‌یابد. در ادامه افزایش زمان و پیشرفت فرآیند هیدرولیز منجر به شکسته شدن بیشتر زنجیره‌های پپتیدی شده و در نتیجه پپتیدهای با قابلیت الکترون دهی جهت احیاء یون آهن سه به یون آهن دو افزایش می‌یابند.

بدون پیش‌ تیمار فراصوت و نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ در زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه به‌ترتیب (۰/۷۵ و ۰/۷۶) و (۱/۲۵ و ۰/۹۲) (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. این امر نشان از افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های تیمار شده توسط فراصوت در زمان‌های هیدرولیز پایین‌تر بود. دلیل این امر این است که پیش‌ تیمار فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین و افزایش شدت پروتئولیز از طریق افزایش در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مستعد به هیدرولیز آنزیمی گردد. همچنین بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمارنشده و تیمار شده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به‌ترتیب ۰/۸۷ و ۱/۰۲۵ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد که نشان از افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل تحت تأثیر تیمار فراصوت بود. با توجه به شکل ۳ ج بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت ۷۰٪ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به‌میزان ۱/۰۵ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) و همچنین بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت ۱۰۰٪ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به‌میزان ۱/۲ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد. با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، افزایش توان تیمار فراصوت باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در زمان‌های هیدرولیز کوتاه‌تر گردید. در اغلب زمان‌های هیدرولیز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمارنشده و تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰ و ۷۰٪ بود. فراصوت بواسطه اثرات مکانیکی، حفرگی، اثرات گرمایی، هم‌زدن دینامیکی، تنش‌برشی و اغتشاش باعث ایجاد یک سری تغییرات شیمیایی و فیزیکی در پروتئین می‌گردد؛ این اثرات موجب شکستن پیوندهای کووالانسی، تغییر ساختار پروتئین و تسریع فرآیند هیدرولیز آنزیمی و در نتیجه افزایش ترکیب آنزیم و پروتئین‌ها می‌گردد (Zhang et al., 2017; Ding et al., 2018).

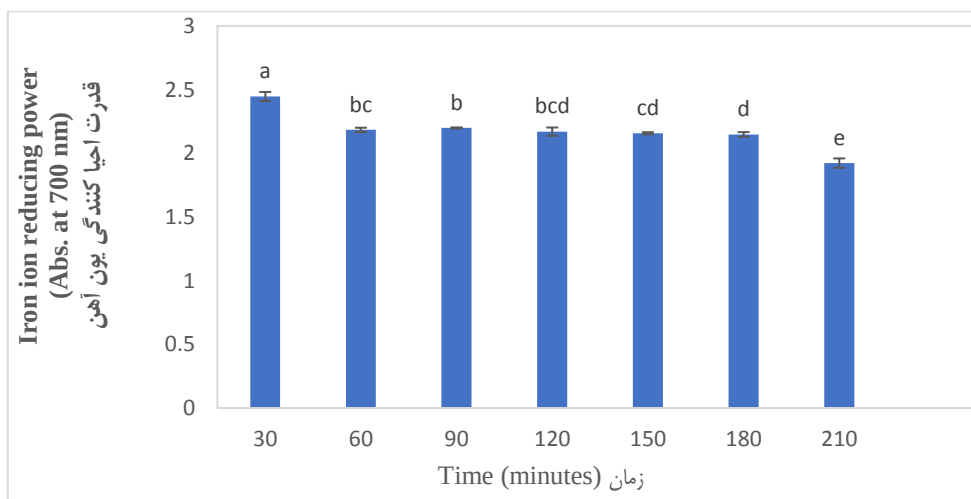
در بررسی زو و همکاران (Zou et al., 2019)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر پروتئین هیدرولیز شده مغز خوک تیمار شده با فراصوت نسبت به تیمارنشده نشان داده شد که مقادیر ABTS، DPPH، HRSA، Fe²⁺-CA و قدرت احیاء به‌ترتیب ۷۲، ۷۳، ۵۶، ۶۰ و ۶۵ درصد بود. فراصوت موجب کاهش زمان هیدرولیز و افزایش آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال می‌شود و موجب افزایش فعالیت بازدارندگی ACE و قابلیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد، پیش‌ تیمار فراصوت، اسیدآمینه



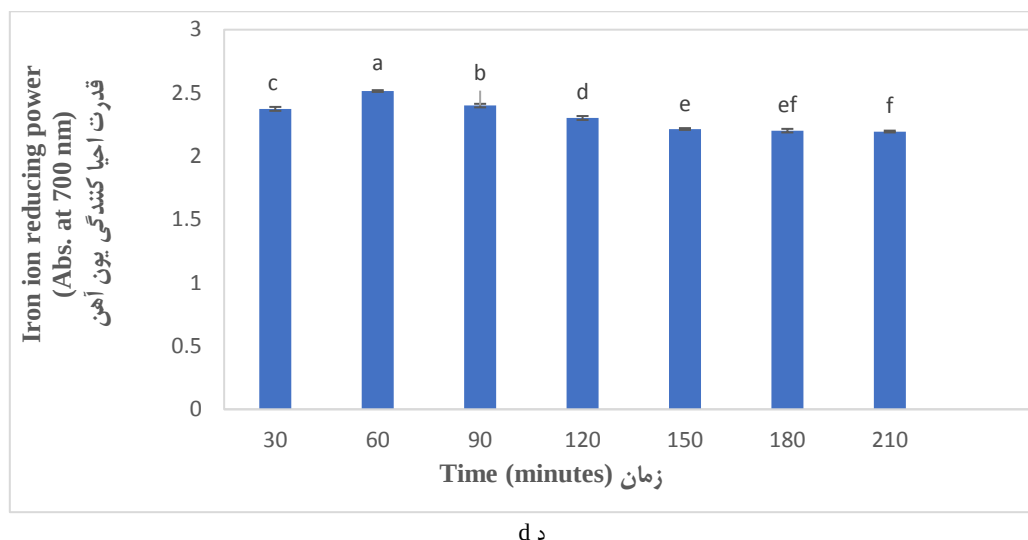
الف a



ب b



ج c



d د

شکل ۳- قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (۱الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (۱ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (۱ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (۱د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Fig. 3. The reducing power of iron ion in hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 40% power (1b), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 70% power (1c) and Protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

(Liang *et al.*, 2017)، گزارش کردند که پیش تیمار فراصوت پروتئین‌های بتا-کانگلاسینین و گلاسینین به طور قابل توجهی درجه هیدرولیز، گروه‌های SH آزاد و ظرفیت شلاته‌کنندگی یون آهن را در پروتئین‌های هیدرولیز شده افزایش داد. علاوه بر این، هضم آلکالاز به کمک پیش تیمار فراصوت به دلیل تشکیل پپتیدهای زنجیر کوتاه حاوی اسیدآمینه‌های آبگریز با وزن مولکولی بین ۲۰۰-۳۰۰۰ دالتون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ذرت را افزایش می‌دهد. مطالعات اخیر نشان داده است که پیش تیمار فراصوت می‌تواند آزادسازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئین بادام زمینی (Yu *et al.*, 2012) و گلوتن گندم (Zhu *et al.*, 2011) را تسهیل کند. به طور کلی افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاءکنندگی می‌شود که این امر می‌تواند به دلایل مختلفی باشد از جمله این که، افزایش درجه هیدرولیز منجر به در دسترس قرار گرفتن بیشتر اسیدآمینه‌های الکترون دهنده مانند لیزین، تریپتوفان و هیستیدین می‌گردد در نتیجه قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد. افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده را به رها شدن اسیدهای آمینه با قابلیت آنتی‌اکسیدانی مانند لیزین و تریپتوفان نسبت داده‌اند (Jamdar *et al.*, 2010).

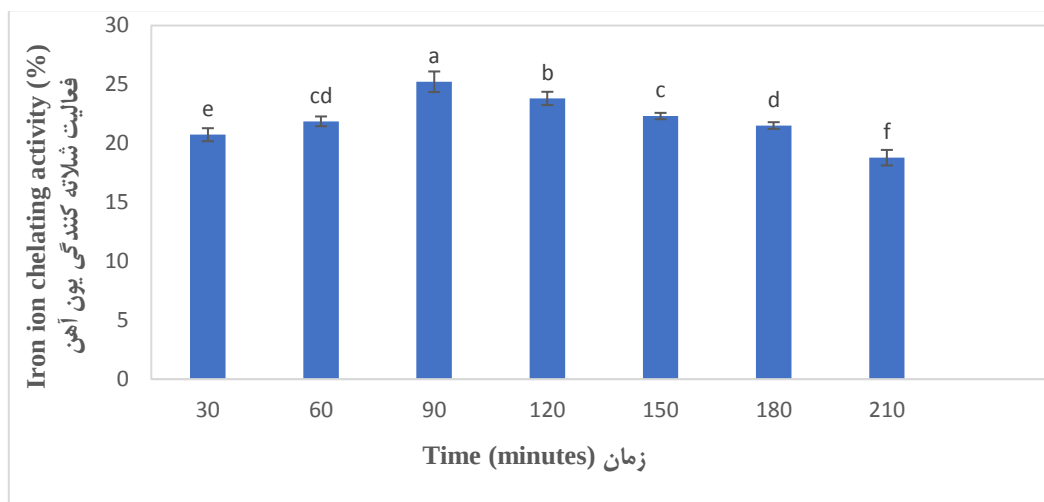
در شکل ۳ ب، ج و د به ترتیب قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان‌های ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ طی زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ در زمان ۳۰ دقیقه به میزان ۲/۴۰ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در تمام زمان‌های هیدرولیز در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده بود. همچنین بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به ترتیب ۲/۰۳ و ۲/۴۰ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد که نشان از افزایش قدرت احیاءکنندگی یون آهن تحت تأثیر تیمار فراصوت بود.

با توجه به شکل ۳ ج بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۷۰٪ در زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به میزان ۲/۴۴ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) و همچنین بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۲/۵۱ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، مشخص می‌شود که با افزایش توان فراصوت در اغلب زمان‌های هیدرولیز، قدرت احیاءکنندگی یون آهن در تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده با فراصوت ۴۰ و ۷۰٪ بود.

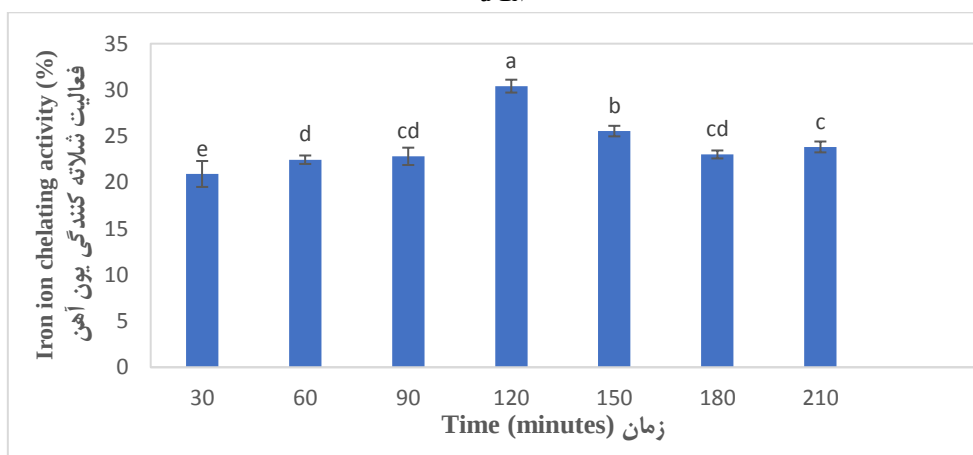
با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

تأثیر زمان هیدرولیز و پیش تیمار فراصوت بر روی قدرت شلاته کنندگی یون آهن

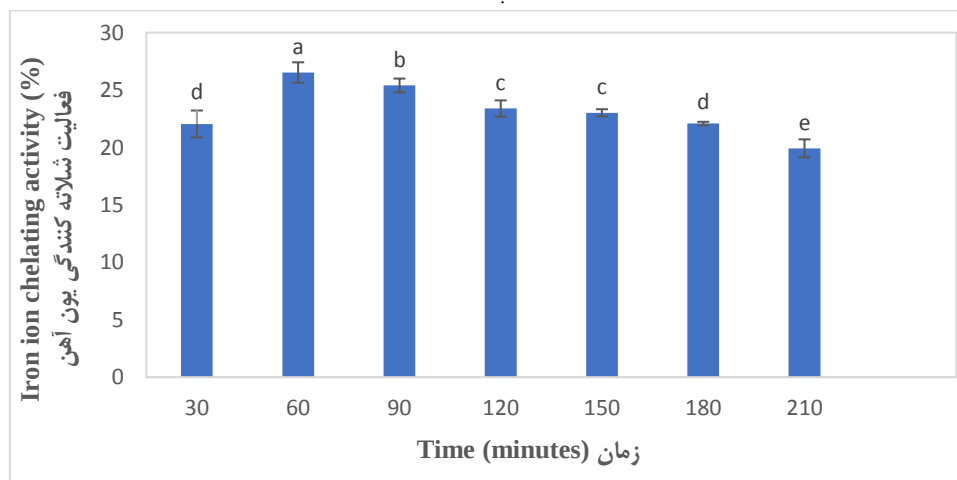
در شکل ۴ قدرت شلاته کنندگی یون آهن نمونه های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده

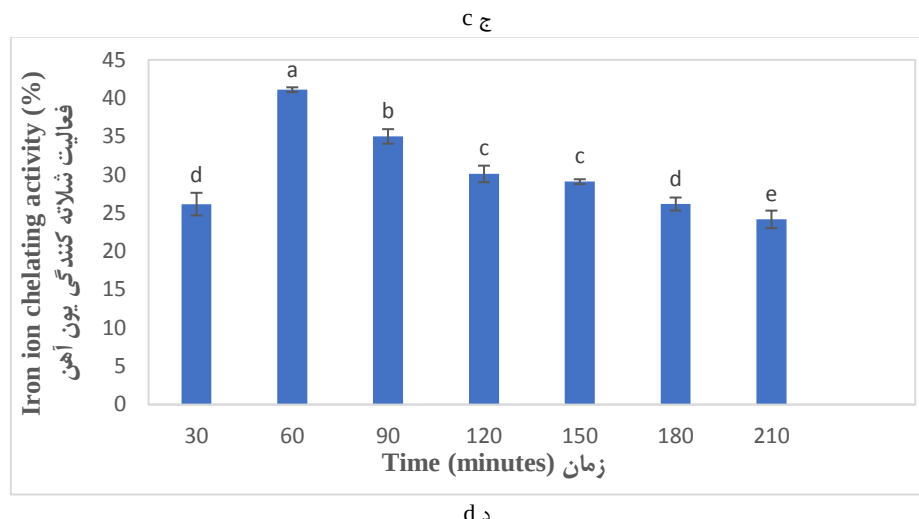


الف a



ب b





شکل ۴- قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Fig. 4. Iron ion chelating power in hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 40% power (1b), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 70% power (1c) and protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

تریپتوفان و هیستیدین می‌باشد، پپتیدهای دارای توالی هیستیدین و تریپتوفان به دلیل دارا بودن حلقه‌ی ایمیدازول، توانایی شلاته‌کنندگی و به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد را دارند بنابراین احتمالاً افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به تولید پپتیدهایی با این ترکیب شده و در نتیجه قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن توسط آن‌ها افزایش یافته است. جمدار و همکاران (Jamdar *et al.*, 2010) و کلومپونگ و همکاران (Klompong *et al.*, 2007) نیز به ترتیب افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی بادام زمینی و نوعی ماهی^۱ را با افزایش درجه هیدرولیز گزارش کردند.

در شکل ۴، ب، ج و د به ترتیب قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان‌های ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ طی زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ در زمان ۱۲۰ دقیقه به میزان ۳۰/۴۰ (جذب در ۵۶۲ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در تمام زمان‌های هیدرولیز در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده بود. همچنین بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به ترتیب ۲۵/۲۲ و

باتوجه به شکل ۴ الف بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار نشده در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه به میزان ۲۵/۲۲ (جذب در ۵۶۲ نانومتر) مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز ابتدا قدرت احیاءکنندگی یون آهن افزایش و سپس کاهش یافت، که دلیل این افزایش پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد. این یافته‌ها حاکی از تأثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم پپسین بر افزایش قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین اولیه می‌باشد. آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باند‌های پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان اسیدهای آمینه آبگریز مانند لوسین و اسیدهای آمینه آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر اسیدهای آمینه می‌گردد (Sun *et al.*, 2011). ویژگی پروتئاز بر اندازه، مقدار، ترکیب اسید آمینه آزاد و پپتیدها و توالی اسیدآمینه آن‌ها تأثیر می‌گذارد که به نوبه خود بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها تأثیر می‌گذارد. ارزیابی درصد شلاته‌کنندگی نمونه‌ها نشان‌دهنده‌ی تأثیر قابل توجه زمان هیدرولیز بر فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بود. به‌طور کلی قابلیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده تحت تأثیر نوع آنزیم، میزان هیدرولیز و ساختار آمینواسیدی پروتئین اولیه قرار دارد (Nourmohammadi *et al.*, 2017). بنابراین، آنزیم پپسین توانسته پپتیدهایی با ترکیب آمینواسیدی مناسب و با قابلیت به‌دام‌اندازی یون آهن تولید کند. علاوه بر این موارد، پروتئین قارچ‌خوراکی غنی از لیزین،

نتیجه گیری

امروزه به منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت در مقابل بسیاری از بیماری‌ها ضروری است که از اکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال آزاد به وجود آمده در فرآورده غذایی و سلول‌های زنده جلوگیری شود. از جمله راه کارهای موجود استفاده از آنتی اکسیدان هاست. از طرفی با توجه به گرایش مصرف کنندگان به سمت غذاهای فراسودمند و نگرانی‌هایی که در زمینه آنتی اکسیدان‌های سنتزی وجود دارد، منجر به افزایش توجه پژوهشگران به سمت آنتی اکسیدان‌های طبیعی گشته است. پپتیدهای زیست فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها تولید می‌شوند و دارای خواص آنتی اکسیدانی قابل توجهی هستند. روش معمول تولید این ترکیبات استفاده از هیدرولیز آنزیمی است اما فرآیندهای هیدرولیز آنزیمی دارای معایبی از جمله کارایی پایین آنزیم، زمان طولانی فرایند آنزیمی و نرخ پایین تبدیل سوبسترا به محصول می‌باشند. امروزه از روش‌های مختلف نظیر امواج فراصوت، مایکروویو، انجماد، فرایند فشار بالا، و غیره برای پیش تیمار پروتئین و رفع معایب فوق استفاده می‌شود. مکانیسم فراصوت به تأثیرات حرارتی، کاویتاسیون و کارایی مکانیکی آن نسبت داده می‌شود به طوری که می‌تواند باعث افزایش انتقال جرم و افزایش تماس بین سوبسترا و آنزیم یا تغییر در ساختار فضایی سوبسترا گردد. در این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیز شده قارچ دکمه‌ای با استفاده از آنزیم پپسین با و بدون پیش تیمار فراصوت صورت گرفت. نتایج نشان داد که نمونه‌های پیش تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ نسبت به نمونه‌های بدون پیش تیمار و پیش تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰ و ۷۰٪ بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی را دارا می‌باشند. براساس نتایج تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ و طی زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه موجب دستیابی محصولی با قابلیت آنتی اکسیدانی بالا می‌گردد و به عنوان تیمار مناسب انتخاب گردید. در نتیجه بر اساس این نتایج می‌توان بیان نمود که استفاده از پیش تیمار فراصوت با توان بالا موجب کوتاه نمودن زمان هیدرولیز جهت دستیابی به پپتیدهای با قابلیت آنتی اکسیدانی بالاتر می‌گردد و در نتیجه موجب افزایش کارایی هیدرولیز آنزیمی می‌گردد.

۳۰/۴۰٪ مشاهده شد که نشان از افزایش قدرت شلاته کنندگی یون آهن تحت تأثیر تیمار فراصوت بود.

با توجه به شکل ۴ ج بالاترین میزان قدرت شلاته کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۷۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۲۶/۵۲٪ و همچنین بالاترین میزان قدرت شلاته کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۴۱/۱۰٪ مشاهده شد با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، مشخص می‌شود که با افزایش توان فراصوت در اغلب زمان‌های هیدرولیز، قدرت شلاته کنندگی یون آهن در تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده با فراصوت ۴۰ و ۷۰٪ بود. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که پیش تیمار فراصوت باعث شکستن برهمکنش‌های قوی بین مولکولی بین ماتریس- ماده حل شده، از جمله نیروهای واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی می‌گردد (Ding et al., 2018). حفرگی صوتی موجب بهبود کیفیت انتقال بین آنزیم و سوبسترا می‌شود در نتیجه فراصوت می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین، کاهش اندازه پپتید و افزایش دسترسی آنزیم به پیوندهای پپتیدی گردد (Yang et al., 2017). آبادیا گارسیا و همکاران (Abadía-García et al., 2016)، نشان دادند که استفاده از توان بالای فراصوت موجب تغییر آرایش ساختار پروتئین و در نتیجه بهبود فرایند هیدرولیز آنزیمی می‌گردد، همچنین نشان دادند که پیش تیمار فراصوت باعث افزایش نرخ هیدرولیز می‌گردد. پژوهشگران گزارش کردند که پیش تیمار فراصوت پروتئین‌های بتا-کانگلاسینین و گلاسینین به طور قابل توجهی درجه هیدرولیز، گروه‌های SH آزاد و ظرفیت شلاته کنندگی یون آهن را در پروتئین‌های هیدرولیز شده ذرت افزایش داد، که دلیل آن افزایش نسبت‌های ماریچ α و چرخش بتا، و کاهش در صفحه بتا و نسبت ماریچ تصادفی دو بخش پروتئین پس از پیش تیمار فراصوت می‌باشد (Liang et al., 2017).

منابع

1. Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Romero-Gómez, S., Ozuna, C., & Amaya-Llano, S.L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.010>
2. Aderinola, T.A., Fagbemi, T.N., Enujiugha, V.N., Alashi, A.M., & Aluko, R.E. (2019). In vitro antihypertensive and antioxidative properties of alcalase-derived *Moringa oleifera* seed globulin hydrolysate and its membrane fractions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(2), e13862. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13862>
3. Bhat, Z.F., Kumar, S., & Bhat, H.F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377-5392. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1731-5>

4. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), 1198-1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.075>
5. Chen, L., Chen, J., Ren, J., & Zhao, M. (2011). Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2600-2609. <https://doi.org/10.1021/jf103771x>
6. Chi, C.F., Hu, F.Y., Wang, B., Li, T., & Ding, G.F. (2015). Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15, 301-313. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.045>
7. Dasgupta, N., & De, B. (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry*, 101(2), 471-474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.003>
8. Ding, Q., Zhang, T., Niu, S., Cao, F., Wu-Chen, R.A., Luo, L., & Ma, H. (2018). Impact of ultrasound pretreatment on hydrolysate and digestion products of grape seed protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 42, 704-713. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.11.027>
9. FitzGerald, R.J., & Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 33-37. <https://doi.org/10.1017/S0007114500002221>
10. Guerra-Almonacid, C.M., Torruco-Uco, J.G., Murillo-Arango, W., Méndez-Arteaga, J.J., & Rodríguez-Miranda, J. (2019). Effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant capacity and antihypertensive activity of bioactive peptides obtained from the protein hydrolysates of *Erythrina edulis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 288-296. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104787>
11. He, J. Z., Ru, Q.M., Dong, D.D., & Sun, P.L. (2012). Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules*, 17(4), 4373-4387. <https://doi.org/10.3390/molecules17044373>
12. Horwitz, W., Chichilo, P., & Reynolds, H. (1970). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.
13. Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027>
14. Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., & Ahn, C.B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42(9), 1266-1272. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.013>
15. Kadam, S.U., Tiwari, B.K., Álvarez, C., & O'Donnell, C.P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012>
16. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptocephalus*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), 1317-1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>
17. Lavi, I., Nimri, L., Levinson, D., Peri, I., Hadar, Y., & Schwartz, B. (2012). Glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* inhibit colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Journal of Gastroenterology*, 47(5), 504-518. <https://doi.org/10.1007/s00535-011-0514-7>
18. Li, X.R., Chi, C.F., Li, L., & Wang, B. (2017). Purification and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) cartilage. *Marine Drugs*, 15(3), 61. <https://doi.org/10.3390/md15030061>
19. Liang, Q., Ren, X., Ma, H., Li, S., Xu, K., & Oladejo, A.O. (2017). Effect of low-frequency ultrasonic-assisted enzymolysis on the physicochemical and antioxidant properties of corn protein hydrolysates. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2784146>
20. Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A.B., & Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129(3), 1179-1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.099>
21. Meshginfar, N., Sadeghi, M.A., Ziaifar, A.M., Ghorbani, M., & Kashaninejad, M. (2014). Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. *Journal of Food Research*, 24(2), 215-225.
22. Nourmohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Alami, M., & Sadeghi, M. (2017). The optimization of the production of anti-oxidative peptides from enzymatic hydrolysis of Pumpkin seed protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 13(1), 14-26. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i0.45423>

23. Nadeem, M., Ubaid, N., Qureshi, T.M., Munir, M., & Mehmood, A. (2018). Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 45, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.034>
24. Paisansak, S., Sangtanoo, P., Srimongkol, P., Saisavoey, T., Reamtong, O., Choowongkomon, K., & Karnchanata, A. (2020). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). *Journal Food Science and Technology*, 58(1), 85–97. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04517-z>
25. Pan, X., Zhao, Y.Q., Hu, F.Y., & Wang, B. (2016). Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage. *Journal of Functional Foods*, 25, 220-230. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.008>
26. Sun, Q., Shen, H., & Luo, Y. (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, 21, 6646-6652. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0115-0>
27. Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.D.M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52(2), 132-136. <https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i2.385>
28. Wali, A., Ma, H., Shahnawaz, M., Hayat, K., Xiaong, J., & Jing, L. (2017). Impact of power ultrasound on antihypertensive activity, functional properties, and thermal stability of rapeseed protein hydrolysates. *Journal of Chemistry*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4373859>
29. Walters, M.E. (2019). *Effects of Ultrasonication on the Antioxidant and Anti-diabetic Properties of Hydrolyzed Oat Proteins* (Doctoral dissertation, Carleton University). <https://doi.org/10.22215/etd/2019-13844>
30. Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., et al. (2018a). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops-A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>
31. Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Wang, Y., Huang, S., ... & Ye, X. (2017). Effects of low power density multi-frequency ultrasound pretreatment on the enzymolysis and the structure characterization of defatted wheat germ protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 410-420. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.001>
32. Yu, L., Sun, J., Liu, S., Bi, J., Zhang, C., & Yang, Q. (2012). Ultrasonic-assisted enzymolysis to improve the antioxidant activities of peanut (*Arachin conarachin* L.) antioxidant hydrolysate. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 9051-9068. <https://doi.org/10.3390/ijms13079051>
33. Zhang, Y., Ma, L., Cai, L., Liu, Y., & Li, J. (2017). Effect of combined ultrasonic and alkali pretreatment on enzymatic preparation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from native collagenous materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 36, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.008>
34. Zhou, C., Hu, J., Yu, X., Yagoub, A.E.A., Zhang, Y., Ma, H., ... & Otu, P.N.Y. (2017). Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. *LWT*, 77, 488-496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.048>
35. Zhu, K.X., Su, C.Y., Guo, X.N., Peng, W., & Zhou, H.M. (2011). Influence of ultrasound during wheat gluten hydrolysis on the antioxidant activities of the resulting hydrolysate. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(5), 1053-1059. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02585.x>
36. Zhu, L., Chen, J., Tang, X., & Xiong, Y.L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2714-2721. <https://doi.org/10.1021/jf703697e>
37. Zou, Y., Yang, H., Li, P.P., Zhang, M. H., Zhang, X.X., Xu, W.M., & Wang, D.Y. (2019). Effect of different time of ultrasound treatment on physicochemical, thermal, and antioxidant properties of chicken plasma protein. *Poultry Science*, 98(4), 1925-1933. <https://doi.org/10.3382/ps/pey502>



Investigating Physical and Mechanical Properties of Bionanocomposite Film Based on Flaxseed Mucilage and Cellulose Nanocrystal

E. Safaei¹, H. Lashkari^{2*}, S. Ansari³, A. Shirazinejad⁴

1- Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Sarvestan Branch, Islamic Azad University, Sarvestan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Zarrin Dasht Branch, Islamic Azad University, Zarrin Dasht, Iran

(*- Corresponding Author Email: hannan.lashkari@iau.ac.ir)

3- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

4- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Sarvestan Branch, Islamic Azad University, Sarvestan, Iran

How to cite this article:

Received: 2022.11.09	Safaei, E., Lashkari, H., Ansari, S., & Shirazinejad, A. (2023). Investigating physical and mechanical properties of bionanocomposite film based on flaxseed mucilage and cellulose nanocrystal. <i>Iranian Food Science and Technology Research Journal</i> , 19(5), 711-721. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79467.1214
Revised: 2023.01.24	
Accepted: 2023.02.05	
Available Online: 2023.02.08	

Introduction

Manufacturers are trying to replace plastic materials in the food packaging industry with biodegradable and edible films. Biodegradable edible films and coatings are mainly made from carbohydrates, lipids and proteins and their mixtures. In recent decades, various carbohydrates from plant sources have been investigated and introduced as new compounds for the preparation of these films. Flaxseed gum is a white to cream-colored powder that dissolves in water and produces a gel, and is a desirable compound for forming films and coatings. Recently, through the integration of reinforcements or fillers with at least one nanometer dimension in the substrate of one or more natural biopolymers, the physicochemical, mechanical, optical, thermal and barrier properties of pure biofilms have been improved. The use of cellulose nanoparticles in biofilms as a reinforcing agent for polymer materials leads to the creation of composite films with better quality characteristics and leads to the creation of functionalization activities in film production. Therefore, the aim of this research was to produce and characterize edible and biodegradable film based on the combination of flaxseed gum and cellulose nanocrystals.

Materials and Methods

Cellulose nanocrystals (Degree of crystallinity: 42% and average particle size: 58 nm) were extracted from cotton linters. Glycerol and other chemicals used for this research were obtained from Merck, Germany. Flaxseeds were purchased from the local market of Shiraz (Iran). Bionanocomposite films were prepared from different ratios (0:100, 30:70, 50:50, 70:30 and 100:0) of flaxseed mucilage (2% w/v) and cellulose nanocrystal (6% w/v) solutions. The prepared solutions were poured on a petri dish with a diameter of 15 cm and dried in an oven at 80°C for 4 hours. Their physical, color and mechanical properties were investigated and the best ratio was selected for the preparation of bionanocomposite film. The produced films were subjected to different analysis to determine thickness, solubility, water absorption capacity, permeability to water vapor, tensile strength, elongation at break point, and colorimetry. The microstructure of the produced film was studied using a scanning electron microscopy (SEM). The average data were analyzed by analysis of variance in a completely randomized design using SPSS 22.0 software. Differences between treatments were expressed



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79467.1214>

in Duncan's multiple range test at the 95% probability level ($p < 0.05$) and the corresponding graphs were drawn with Excel 2013.

Results and Discussion

The results of the film thickness test showed that the film containing 100% mucilage has the lowest thickness and with the addition of cellulose nanocrystals, the thickness increased significantly ($p < 0.05$). The results of the water solubility and water absorption capacity of the film samples showed that the addition of cellulose nanocrystals to the flaxseed mucilage film initially led to a significant decrease in the water solubility and water absorption capacity ($p < 0.05$), so that the lowest level of these two physical parameters were obtained in the film containing the combination of 70% flaxseed mucilage and 30% cellulose nanocrystal, and then with the increase of cellulose nanocrystals, an increase in water solubility and water absorption capacity of the films was observed. Nanocrystal cellulose at low levels (30%) acted as a filler and was uniformly dispersed in the network of the film and by filling the empty pores of the biopolymer film based on flaxseed mucilage, it caused the transfer of water vapor more complicated and reduced the permeability to water vapor. However, its higher amount increased the permeability of the film to water vapor. The results showed that by adding cellulose nanocrystal to the film based on flaxseed mucilage and increasing its amount, the brightness of the films decreased and the intensity of redness, yellowness and turbidity of the films increased significantly ($p < 0.05$). By combining flaxseed mucilage and cellulose nanocrystals in a ratio of 30:70, the best film was produced in terms of mechanical strength and stability against moisture and water vapor. The SEM image of this film showed a smooth, even surface and a uniform distribution of cellulose nanocrystals in the film network.

Conclusion

The results finally showed that the combination of flaxseed mucilage and cellulose nanocrystals in a ratio of 30:70 was able to produce a biodegradable and edible film with favorable structural and barrier properties. The characteristics of this film include; thickness (0.313mm), solubility (53.42%), water absorption capacity (44.44%), permeability to water vapor ($0.350 \text{ g.m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1} \times 10^{-10}$), tensile strength (0.973 MPa), elongation at break point (30.52%) were obtained. The colorimetric indices L^* , a^* , b^* and turbidity were determined as 79.73, 1.95, 3.48 and 1.335 mm^{-1} respectively.

Acknowledgement

The authors would like to express their sincere gratitude to Islamic Azad University, Sarvestan Branch.

Keywords: Biodegradable, Colorimetry, Microstructure, Tensile strength, Water resistance



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- آذر ۱۴۰۲ ص. ۷۱۱-۷۲۱

بررسی خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم بایونانو کامپوزیت بر پایه ی موسیلاژ کتان و نانوکریستال سلولز

الهام صفایی^۱ - حنان لشکری^{۲*} - سارا انصاری^۳ - علیرضا شیرازی نژاد^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶

چکیده

تولیدکنندگان در تلاش هستند تا فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر و خوراکی را جایگزین مواد پلاستیکی در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی کنند. هدف از این تحقیق، تولید و مشخصه‌سازی فیلم خوراکی و زیست تخریب‌پذیر بر پایه ترکیب صمغ دانه کتان و نانوکریستال سلولز بود. فیلم‌ها از نسبت‌های مختلف (۳۰:۷۰، ۵۰:۵۰، ۷۰:۳۰ و ۱۰۰:۰) محلول‌های موسیلاژ دانه کتان (۲ درصد وزنی/حجمی) و نانوکریستال سلولز (۶ درصد وزنی/حجمی) تهیه شد و خصوصیات فیزیکی، رنگی و مکانیکی آنها مورد بررسی قرار گرفت و بهترین نسبت برای تهیه فیلم بایونانو کامپوزیت انتخاب گردید. ریزساختار فیلم تولیدی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد مطالعه قرار گرفت. میانگین داده‌ها، توسط آنالیز تجزیه واریانس در طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۲،۰ تجزیه و تحلیل شدند. تفاوت‌های بین تیمارها، در آزمون چنددامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۹۵ درصد بیان گردید ($p < 0.05$) و نمودارهای مربوطه با Excel ۲۰۱۳ رسم شدند. نتایج نشان داد که با افزودن نانوکریستال سلولز به فیلم بر پایه موسیلاژ دانه کتان و افزایش میزان آن، شدت روشنایی فیلم‌ها کاهش و شدت قرمزی، زردی و کدورت فیلم‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). نتایج حاصل در نهایت نشان داد که ترکیب موسیلاژ دانه کتان و نانوکریستال سلولز در نسبت ۳۰:۷۰ توانست بهترین فیلم از لحاظ استحکام مکانیکی و پایداری در مقابل رطوبت و بخار آب را تولید کند. تصویر SEM این فیلم بیانگر سطح صاف، هموار و توزیع یکنواخت نانوکریستال‌ها در شبکه فیلم بود.

واژه‌های کلیدی: رنگ‌سنجی، ریز ساختار، زیست‌تخریب‌پذیر، مقاومت در برابر آب، مقاومت کششی

مقدمه

و زیست‌تخریب‌پذیر و پوشش‌های خوراکی را جهت بسته‌بندی مواد غذایی توسعه دهند (Espitia et al., 2014). تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که از مواد زیستی برپایه منابع گیاهی می‌توان به‌عنوان بسته‌بندی مواد غذایی برای انواع مختلف محصولات استفاده نمود (Sagnelli et al., 2017). فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی دوستدار محیط زیست اساساً از کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و پروتئین‌ها و مخلوطی از آنها تهیه می‌شوند (Gohargani et al., 2020) فیلم‌ها و پوشش‌های هیدروکلوئیدی، از پروتئین‌ها، مشتقات سلولز، پکتین و سایر

بسته‌بندی روشی است که در آن از ترکیبات مناسب جهت نگهداری و محافظت از مواد غذایی از زمان تولید تا زمان مصرف، استفاده می‌شود. بسته‌بندی‌های پلاستیکی از لحاظ فنی قابل تجزیه هستند، ولی در شرایط طبیعی، تجزیه آن‌ها بسیار طولانی‌تر از مواد زیستی صورت می‌گیرد. از این رو، تولیدکنندگان در تلاش هستند تا کاربرد مواد پلاستیکی را در صنعت بسته‌بندی کاهش داده و فیلم‌های انعطاف‌پذیر

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سروستان، دانشگاه آزاد اسلامی، سروستان، ایران

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد زرین دشت، دانشگاه آزاد اسلامی، زرین دشت، ایران

(*)- نویسنده مسئول: Email: hannan.lashkari@iau.ac.ir

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سروستان، دانشگاه آزاد اسلامی، سروستان، ایران

(Peng et al., 2011). از آنجایی که این نانوکریستال‌ها به‌طور مؤثری با پلیمرهای زیستی واکنش می‌دهند، می‌توانند به خوبی در شبکه پلیمری فیلم زیستی پراکنده و توزیع شوند (Sharmin et al., 2012). در تحقیقات پیشین از نانوکریستال‌های سلولز جهت بهبود خصوصیات پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی مختلف نظیر آلژینات (Criado et al., 2020)، صمغ ژلان (Criado et al., 2021)، ایزوله پروتئین آب‌پنیر (Sukyai et al., 2018)، کیتوزان و موم‌عسل (Wardhono et al., 2019) استفاده شده است.

بر طبق تحقیقات صورت گرفته، مطالعات محدودی در زمینه توسعه فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر ترکیبی بر پایه صمغ و نانوکریستال سلولز انجام گرفته است. بنابراین، هدف از این تحقیق، تولید و مشخصه‌سازی فیلم بر پایه ترکیب صمغ دانه کتان و نانوکریستال سلولز بود.

مواد و روش‌ها

مواد

گلیسرول و سایر مواد شیمیایی و مورد استفاده جهت انجام این تحقیق از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. دانه کتان از بازار محلی شیراز (ایران) خریداری شد.

تهیه نانوکریستال سلولز

نانوکریستال سلولز از لیتر پنبه استخراج شد. لیتر پنبه توسط قیچی به قطعات کوچک تقسیم شده و سپس در محلول ۲ درصد وزنی سود به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق و با هم‌زدن مداوم، به‌منظور حذف ناخالصی‌ها، تیمار شده و سرانجام با آب مقطر شسته شد. عمل هیدرولیز اسیدی با استفاده از اسیدسولفوریک ۶۵ درصد وزنی و با نسبت ۱۱ درصد وزنی فیبرهای پنبه صورت گرفت. هیدرولیز در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک ساعت تحت هم‌زدن مداوم انجام گرفت. سوسپانسیون حاصل با آب مقطر مخلوط شده و عمل سانتریفوژ با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. سپس سوپرناتانت تخلیه و با آب مقطر جایگزین گردید. عمل سانتریفوژ تا رسیدن pH سوپرناتانت به بالای ۴، حدوداً ۸ بار صورت گرفت (به دلیل حساسیت غشاهای دیالیز به pH پایین و از بین رفتن کارایی آن‌ها، بخشی از اسید توسط سانتریفوژ جدا می‌شود). در مرحله بعد، عمل دیالیز توسط غشاهای دیالیزی به‌منظور حذف یون‌های سولفات از محلول رویی و رساندن pH آن به حد خنثی انجام گرفت. سوسپانسیون نانوکریستال سلولز در غشاهای دیالیز ریخته شد، غشاها در داخل آب مقطر قرار داده شده و چند بار در روز آب مقطر تعویض گردید. بعد از رسیدن pH سوسپانسیون به حد خنثی، تیمار مکانیکی شدید توسط هم‌زن‌نایزر با ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت یک‌ساعت با فواصل زمانی ۱۵ دقیقه کار

پلی‌ساکاریدها (نظیر صمغ‌ها) تشکیل می‌شوند. در طی دهه‌های اخیر، پلی‌ساکاریدهای مختلفی به عنوان ترکیبات جدید جهت تهیه فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به منظور بسته‌بندی مواد غذایی بررسی و معرفی شده است (Ramos et al., 2016). کتان با نام علمی *Linum usitatissimum* L. گیاهی یکساله و متعلق به خانواده کتان (Linaceae) بوده و جزو قدیمی‌ترین محصولات کشاورزی به شمار می‌آید. دانه کتان بیضی‌شکل، صاف و در یک انتها نوک‌تیز بوده و دارای ابعاد تقریبی $1 \times \frac{2}{5} \times 5$ میلی‌متر است. از دانه کتان به‌طور مؤثری جهت جلوگیری از بیماری‌های مختلف نظیر فشار خون بسیار پایین و کلسترول پایین استفاده می‌شود، زیرا این دانه حاوی اسید آلفا-لینولئیک اسید، لیگنان‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌باشد (Tabibloghmany et al., 2013). پوسته دانه کتان دارای چهار لایه است که لایه خارجی آن از فیبر محلول تشکیل شده است و این فیبر، موسیلاژ نامیده می‌شود. موسیلاژ زمانی که در آب حل می‌شود، یک لایه ژل‌مانند را تشکیل می‌دهد (Tee et al., 2017). بنابراین، این موسیلاژ، یک ترکیب مطلوب به‌منظور تشکیل فیلم‌ها یا پوشش‌ها می‌باشد (Hernández et al., 2010). ترکیب مونوساکاریدهای موسیلاژ کتان شامل دی-زایلوز، ال-آرابینوز، ال-رامنوز، دی-گلوکز، ال-گالاکتوز و ال-گالاکتورونیک اسید است (Stewart & Mazza, 2000).

نانوکامپوزیت‌های زیستی مفهوم جدیدی از مواد کاربردی و ترکیبی می‌باشند که از طریق تلفیق تقویت‌کننده‌ها یا فیبرهایی با حداقل یک بعد نانومتری در بستر یک یا چند پلیمر زیستی طبیعی تولید می‌گردند (Savadekar et al., 2012). نانوکامپوزیت‌ها در مقایسه با پلیمرهای زیستی خالص، دارای خصوصیات فیزیکوشیمیایی، مکانیکی، نوری، حرارتی و ممانعت‌کنندگی بهبودیافته‌ای هستند (Rhim et al., 2013). کاربرد نانوذرات سلولز در فیلم‌های زیستی به عنوان عامل تقویت‌کننده مواد پلیمری، موجب ایجاد فیلم‌های کامپوزیتی با خصوصیات کیفی بهتر شده و منجر به ایجاد فعالیت‌های عملگرایی در فیلم‌های تولیدی می‌گردد. این نانوذرات توسط کاربرد تیمارهای مکانیکی، شیمیایی و یا تیمار ترکیبی، از دیواره سلولی منابعی نظیر پالپ پنبه و چوب استخراج می‌شوند (Jensen et al., 2015). نانوذرات سلولز به‌عنوان افزودنی مطلوب جهت بهبود خصوصیات کیفی پلیمرهای زیستی مورد توجه می‌باشند، چرا که ویژگی‌های مطلوبی مانند تجدیدپذیر بودن، زیست تخریب‌پذیری، در دسترس و ارزان‌قیمت بودن، ایجاد استحکام مکانیکی بالا، دانسیته پایین داشته و امکان استخراج آن از ضایعات صنعت غذا و کشاورزی و صنعت غذا، وجود دارد (Panaitescu et al., 2015). نانوکریستال‌های سلولز بلورینگی بالایی دارند (غالباً بین ۸۵-۹۷ درصد). بلورینگی بالای کریستال‌های سلولز تأثیر مستقیمی بر خصوصیات شیمیایی، باندکنندگی آب و قدرت تورم نشان می‌دهد

توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی بر روی فیلم‌های حاصل انجام گرفت و بهترین فیلم از لحاظ خصوصیات فیزیکی و مکانیکی انتخاب گردید.

اندازه‌گیری میزان ضخامت

ضخامت فیلم‌های بایونانو کامپوزیت، با استفاده از یک میکرومتر دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان حلالیت در آب و ظرفیت جذب آب (WAC)^۱

میزان حلالیت در آب فیلم‌ها و همچنین ظرفیت جذب آب، با استفاده از روش بیان شده توسط ترابی و نافچی (Torabi & MohammadiNafchi, 2013) تعیین گردید. مقادیر حلالیت‌پذیری و ظرفیت جذب آب فیلم‌ها از طریق رابطه ۱ و ۲ محاسبه گردید:

$$(۱) \quad 100 \times \frac{\text{وزن خشک شده نهایی فیلم} - \text{وزن خشک شده اولیه فیلم}}{\text{وزن خشک شده اولیه فیلم}} = \text{درصد حلالیت}$$

$$(۲) \quad WAC = \frac{\text{وزن آب جذب شده}}{\text{وزن خشک شده فیلم}}$$

اندازه‌گیری میزان نفوذپذیری به بخار آب^۲ (WVP)

اندازه‌گیری نفوذپذیری نسبت به بخار آب براساس استاندارد ASTM E ۹۶ توسط دسیکاتور حاوی محلول فوق اشباع نیترا تمنیزیم انجام شد (ASTM, 2002). پس از محاسبه سرعت انتقال بخار آب، میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب از طریق رابطه ۳ به دست آمد، که در این رابطه: WVTR سرعت نفوذ بخار آب بر حسب گرم بر متر مربع؛ X ضخامت فیلم بر حسب متر؛ P فشار بخار آب خالص در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر حسب پاسکال؛ ΔR اختلاف رطوبت بین درون و بیرون ویال بر حسب درصد؛ WVP نفوذپذیری به بخار آب.

$$(۳) \quad WVP = \frac{WVTR \times X}{P \times \Delta R}$$

تعیین خصوصیات مکانیکی

بررسی خواص مکانیکی فیلم‌ها، بر اساس استاندارد ASTM و توسط دستگاه بافت‌سنج صورت گرفت (ASTM, 2008). بدین صورت که خصوصیات مکانیکی فیلم‌ها توسط آزمون کششی و با استفاده از دستگاه بافت‌سنج و طبق پارامترهای سل بار ۱ kN و سرعت ۵۰ mm/min ارزیابی شدند. برای هر فیلم، پنج نمونه با ابعاد ۱۵۰ × ۵۰ mm آنالیز گردید. استحکام کششی بر حسب Mpa و کشیدگی تا نقطه شکست بر حسب درصد اندازه‌گیری شد.

تعیین شاخص‌های رنگی و کدورت

کردن و ۱۵ دقیقه استراحت (به‌منظور جلوگیری از بالا رفتن دمای سوسپانسیون) انجام شد. در نهایت، سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه تحت تیمار اولتراسوند با فواصل زمانی ۱۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از هر بار تیمار اولتراسوند، آب دستگاه با آب سرد تعویض شد. به‌منظور جلوگیری از آلودگی میکروبی، چند قطره کلروفرم به سوسپانسیون (درجه ی بلورینگی: ۴۲٪ و میانگین اندازه ذرات: ۵۸ نانومتر) اضافه شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید (Roohani et al., 2008).

استخراج موسیلاژ دانه کتان

جهت استخراج موسیلاژ دانه کتان، در ابتدا ۲۴۰ گرم دانه کتان در ۹۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای اتاق به مدت ۱۸ ساعت خیسانده شد. پس از آن، ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شده و به طور مداوم به مدت ۱۵ دقیقه هم‌زده شد. در نهایت، دو بار فیلتراسیون صورت گرفت (فیلتر دارای مش ۴۰) تا صمغ جداسازی شود (Prado et al., 2018). محلول صمغ دانه کتان استخراج شده با دو برابر حجم خود اتانول ۹۵ درصد ترسیب داده شد و با استفاده از سانتریفوژ کردن در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی گردید. صمغ جداسازی شده در آون در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت خشک شد (Wang et al., 2011).

تهیه فیلم خوراکی ترکیبی برپایه موسیلاژ دانه کتان و نانوکریستال سلولز

جهت تهیه فیلم‌های بایونانو کامپوزیت مورد نظر، از روش کستینگ استفاده شد. بدین صورت که صمغ کتان در آب دیونیزه (pH=۶/۴-۷/۰) حل شد و محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شد، تا محلول صمغ کتان دارای وزن خشک ۲ درصد وزنی/حجمی حاصل آمد. برای تهیه محلول نانوکریستال سلولز نیز این نانوذرات در آب دیونیزه حل شدند تا محلولی با ۶ درصد نانوکریستال سلولز به دست آمد. محلول صمغ کتان و نانوکریستال سلولز در سطوح مختلف با یکدیگر ترکیب شدند و از گلیسرول به‌عنوان پلاستی‌سایزر (۳۰ درصد وزنی/وزنی) در محلول‌های فیلم‌سازی استفاده گردید (Prado et al., 2018). محلول‌های تهیه شده بر روی پتری‌دیش با قطر ۱۵ سانتی‌متر ریخته شدند و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در آون خشک گردیدند. در نهایت فیلم‌های خشک شده از پتری‌دیش جدا شدند (Wang et al., 2011). سپس آزمون‌های میزان ضخامت، حلالیت در آب، ظرفیت جذب آب، نفوذپذیری به بخار آب، خواص مکانیکی، شاخص‌های رنگی، کدورت و بررسی مورفولوژی

در سطح احتمال ۹۵ درصد ($p < 0.05$) انجام شد و نمودارهای مربوطه با Excel ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج و بحث

ضخامت فیلم‌های بر پایه موسیلاژ و نانوکریستال

مقادیر ضخامت فیلم‌های حاوی ترکیب سطوح مختلف موسیلاژ دانه کتان و نانوکریستال‌های سلولز در جدول ۱ آورده شده است و نشان می‌دهد که فیلم حاوی ۱۰۰ درصد موسیلاژ دارای کمترین میزان ضخامت بود (۰/۲۹۴ mm) و با افزودن نانوکریستال‌های سلولز و افزایش سطح آن در فیلم‌ها، میزان ضخامت به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$) و در فیلم حاوی ۱۰۰ درصد نانوکریستال به ۰/۳۶۴ رسید. افزایش در ضخامت فیلم‌ها در اثر افزودن نانوکریستال‌های سلولز احتمالاً در ارتباط با افزایش محتوای مواد جامد می‌باشد (de Souza Coelho et al., 2020). از سوی دیگر تحقیقات نشان داده است که این نانوکریستال‌های دارای طبیعت نسبتاً آب‌دوستی هستند که می‌توانند سبب انبساط شبکه فیلم شوند. د اولیویرا فیلهو و همکاران (de Oliveira Filho et al., 2021) افزایش در ضخامت فیلم‌های بایوکامپوزیتی در اثر افزودن نانوکریستال‌های سلولز را مشاهده کردند. این نتایج همچنین با نتایج گزارش شده در مطالعه بیضاوی و همکاران (Bayzavi et al., 2021) همخوانی داشت.

برای تعیین شاخص‌های رنگی نمونه‌های فیلم از دستگاه رنگ‌سنج (هانتربل) استفاده شد. پارامترهای دستگاه عبارتند از: شدت روشنایی یا L^* (سفید=۱۰۰ و سیاه=۰)، شدت قرمزی و سبزی یا a^* (سبز=۸۰- تا قرمز=۱۰۰) و شدت زردی و آبی یا b^* (آبی=۸۰- تا زرد=۷۰). میزان کدورت فیلم‌ها با استفاده از روش طیف‌سنجی و طبق روش بیان شده توسط یان و همکاران (Yan et al., 2011) و با استفاده از رابطه ۴ به دست آمد، که در این معادله، A_{600} میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر و X متوسط ضخامت فیلم برحسب میلی‌متر می‌باشد (Yan et al., 2011).

$$k_d = \frac{A_{600}}{X} \quad (4)$$

بررسی ریزساختار فیلم‌ها

بررسی ریزساختار فیلم‌های بایونانوکامپوزیت توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM صورت گرفت (Teymourpoue et al., 2015).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کلیه آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۳ تکرار انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های کمی از نرم‌افزار SPSS ۲۲،۰ استفاده شد. مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن و

جدول ۱- داده‌های حاصل از بررسی خواص فیزیکی فیلم‌های بر پایه موسیلاژ دانه کتان و نانوکریستال سلولز

Treatments	Thickness (mm)	Solubility (%)	Water absorption capacity (%)	Water vapor permeability ($\text{g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \times 10^{-10}$)
تیمارها	ضخامت	حلالیت	ظرفیت جذب آب	نفوذپذیری به بخار آب
T1	0.346 ± 0.003 a	64.33 ± 0.54 a	51.62 ± 0.55 a	0.379 ± 0.006 a
T2	0.327 ± 0.004 b	57.57 ± 0.63 b	48.79 ± 0.41 b	0.364 ± 0.005 b
T3	0.319 ± 0.009 bc	56.19 ± 0.71 c	46.79 ± 0.33 d	0.359 ± 0.002 c
T4	0.313 ± 0.005 c	53.42 ± 0.80 d	44.44 ± 0.59 e	0.350 ± 0.003 d
T5	0.294 ± 0.002 d	55.97 ± 0.63 c	47.86 ± 0.49 c	0.356 ± 0.002 e

*نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. وجود حداقل یک حرف لاتین مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف بین مقادیر هر ستون در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد. T: ۱۰۰ درصد نانوکریستال سلولز؛ T: ۷۰ درصد نانوکریستال+۳۰ درصد موسیلاژ کتان، T: ۵۰ درصد نانوکریستال+۵۰ درصد موسیلاژ کتان، T: ۳۰ درصد نانوکریستال+۷۰ درصد موسیلاژ کتان، T: ۱۰۰ درصد موسیلاژ کتان.

*The results are reported as mean ± standard deviation. The presence of at least one common Latin letter indicates that there is no significant difference between the values of each column at the 5% probability level. T1: 100% cellulose nanocrystals; T2: 70% cellulose nanocrystals+30% flaxseed mucilage; T3: 50% cellulose nanocrystals+50% flaxseed mucilage; T4: 30% cellulose nanocrystals+70% flaxseed mucilage; T5: 100% flaxseed mucilage.

(جدول ۱) نشان می‌دهد که افزودن نانوکریستال‌های سلولز به فیلم‌های نانوکامپوزیتی در ابتدا منجر به کاهش معنی‌دار حلالیت در آب و ظرفیت جذب آب گردید ($p < 0.05$)، به طوری کمترین میزان این دو پارامتر فیزیکی در فیلم حاوی ترکیب ۷۰ درصد موسیلاژ کتان و ۳۰ درصد نانوکریستال سلولز به دست آمد (به ترتیب ۵۳/۴۲ درصد و ۴۴/۴۴ درصد)، که این کاهش به دلیل اثر تقویت‌کنندگی نانوکریستال‌های سلولز بر روی فیلم‌های بایوپلیمری بوده و بین نانوکریستال سلولز و

حلالیت در آب و ظرفیت جذب آب فیلم‌های بر پایه موسیلاژ و نانوکریستال

حساسیت فیلم‌های بسته‌بندی در مقابل رطوبت، عامل مهمی است که موجب محدود شدن کاربرد فیلم تولیدی برای بسته‌بندی مواد غذایی مختلف (به‌ویژه انواع حساس به رطوبت) می‌گردد. نتایج حاصل از بررسی میزان حلالیت در آب و ظرفیت جذب آب نمونه‌های فیلم حاوی ترکیب سطوح مختلف موسیلاژ دانه کتان و نانوکریستال‌های سلولز

استحکام و یکپارچگی شبکه فیلم را کاهش می‌دهد و از این طریق، میزان WVP را افزایش می‌دهد که با نتایج حاصل توسط چانگ و همکاران (Chang et al., 2010) مطابقت داشت.

خواص مکانیکی فیلم‌های بر پایه موسیلاژ و نانوکریستال

یکی دیگر از پارامترهای کیفی مهم و مؤثر محصولات غذایی بسته‌بندی شده در مقابل صدمات و فشارهای وارد شده طی حمل و نقل، جابه‌جایی و انبارمانی، استحکام مکانیکی فیلم‌ها می‌باشد. خواص مکانیکی مهم فیلم‌های بایوپلیمری حاصل از ترکیب موسیلاژ دانه کتان و نانوکریستال سلولز شامل استحکام کششی و درصد کشیدگی تا نقطه شکست، در جدول ۲ نشان داده شده است. در فیلم حاوی ۳۰ درصد نانوکریستال سلولز بالاترین میزان استحکام کششی مشاهده شد (۰/۹۷۳) و افزایش سطح نانوکریستال سلولز در فیلم‌ها موجب کاهش میزان استحکام کششی و میزان کشیدگی تا نقطه شکست گردید، به طوری که فیلم حاوی ۱۰۰ درصد نانوکریستال سلولز دارای کمترین میزان استحکام کششی و درصد کشیدگی در بین فیلم‌های مورد مطالعه در این تحقیق بود (به ترتیب ۰/۶۹۱ MPa و ۲۶/۸۸ درصد). افزایش استحکام کششی و کاهش انعطاف‌پذیری فیلم‌های بایوپلیمری در اثر تلفیق سطوح پایین نانوکریستال‌های سلولز، در مطالعات صورت گرفته توسط د اولیویرا فیلهو و همکاران (de Oliveira Filho et al., 2021) و اوون و ریم (Oun & Rhim, 2016) نیز گزارش شده است. در سطوح پایین نانوکریستال‌ها می‌توانند به طور یکنواخت‌تری در شبکه فیلم پخش شوند و از طریق برقراری اتصالات هیدروژنی قوی با گروه‌های هیدروکسیل موسیلاژ دانه کتان موجب بهبود استحکام کششی فیلم‌ها و محکم‌تر شدن ساختار آن‌ها گردند که بدین طریق میزان انعطاف‌پذیری را کاهش دهند (Kumar et al., 2010). با این حال، در اثر تلفیق سطوح بالاتر این نانوکریستال‌ها، توزیع آن‌ها در ساختار فیلم یکنواخت نبوده و ساختار فیلم تضعیف می‌گردد و بنابراین فیلم‌های حاوی سطوح بالای نانوکریستال‌های سلولز از استحکام و انعطاف‌پذیری پایین‌تری برخوردار هستند. قاضنفرزاده و کدیور (Qazanfarzadeh & Kadivar, 2015) نیز اظهار داشتند که افزودن نانوکریستال‌های سلولز در ابتدا موجب افزایش استحکام و کاهش انعطاف‌پذیری فیلم‌ها گردید، ولی با به کار بردن سطوح بالای این نانوکریستال‌ها، کاهش در استحکام مکانیکی فیلم‌ها گزارش شد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. آگوستین و همکاران (Agustin et al., 2013) و سرکیرا و همکاران (Cerqueira et al., 2017) به نتایج مشابهی دست یافتند. این محققین دریافتند که با افزایش سطح نانوکریستال‌های سلولز در فیلم‌های بایوکامپوزیتی، میزان استحکام فیلم‌ها در ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت.

شبکه فیلم واکنش‌های هیدروژنی قوی برقرار می‌شود که می‌تواند موجب کاهش قابلیت انحلال و ظرفیت جذب آب فیلم‌های تولیدی گردد (Cao et al., 2008). این نتایج با نتایج ارائه شده توسط کومار و همکاران (Kumar et al., 2017) و د اولیویرا فیلهو و همکاران (de Oliveira Filho et al., 2021) مطابقت داشت. با این حال استفاده از سطوح بالاتر نانوکریستال سبب افزایش حلالیت‌پذیری در آب و ظرفیت جذب آب فیلم‌ها گردید، چرا که این نانوکریستال‌ها دارای خصوصیات آبدوستی می‌باشند و حضور مقادیر بالای آن‌ها در فیلم‌ها می‌تواند حساسیت فیلم‌ها در مقابل رطوبت را افزایش دهد. بنابراین، همانطوری که انتظار می‌رفت، بیشترین حلالیت‌پذیری در آب و ظرفیت جذب آب (به ترتیب ۶۴/۳۳ درصد و ۵۱/۶۲ درصد) در فیلم حاوی ۱۰۰ درصد نانوکریستال سلولز مشاهده گردید. افزایش حساسیت فیلم‌های بایوپلیمری در اثر تلفیق سطوح بالای نانوکریستال‌های سلولز نیز توسط سایر محققین نشان داده شده است (Agustin et al., 2013; Prado et al., 2018).

نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های بر پایه موسیلاژ و نانوکریستال

یکی از خصوصیات مهم و قابل توجه در انتخاب فیلم‌های مورد استفاده جهت بسته‌بندی مواد غذایی، نفوذپذیری به بخار آب می‌باشد و میزان آن در بسته‌بندی‌های غذایی بایستی تا حد امکان کاهش یابد (Chang et al., 2010). نتایج مربوط به اندازه‌گیری میزان WVP نمونه‌های فیلم بایونانوکامپوزیتی در جدول ۱ ارائه شده است. افزودن ۳۰ درصد نانوکریستال سلولز به فیلم بر پایه موسیلاژ دانه کتان، میزان WVP فیلم‌ها را به طور معنی‌داری کاهش داد و کمترین میزان WVP در این فیلم به دست آمد ($10^{-10} \times \text{g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$). با این حال در اثر استفاده از سطوح بالای نانوکریستال سلولز (۳۰ درصد به بالا)، میزان WVP افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$) و در فیلم حاوی ۱۰۰ درصد نانوکریستال سلولز به بیشترین میزان خود رسید ($10^{-10} \times 10^{-10} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$). نانوکریستال سلولز در سطوح پایین نقش فیلری ایفاء کرده و به طور یکنواخت در شبکه فیلم پراکنده می‌شوند و با پر کردن منافذ خالی فیلم بایوپلیمری بر پایه موسیلاژ دانه کتان، موجب پیچیده‌تر شدن مسیر عبور بخار آب می‌گردند و از این طریق میزان WVP را کاهش می‌دهند (Abdollahi et al., 2013). همچنین تحقیقات نشان داده است که استفاده از نانوکریستال‌های سلولز به عنوان یک فیلر در فیلم‌های بسته‌بندی، تحرک مولکول‌های آب را کاهش داده و بنابراین موجب کاهش WVP می‌گردد (El Miri et al., 2015). با این حال، در اثر استفاده از سطوح بالای نانوکریستال‌ها غالباً توزیع آن‌ها در شبکه فیلم یکنواخت نبوده و

جدول ۲- داده‌های حاصل از بررسی خواص مکانیکی فیلم‌های بر پایه موسیلاژ دانه کتان و نانوکریستال سلولز

Table 2- Data obtained from examining the mechanical properties of films based on flaxseed mucilage and cellulose nanocrystals

Treatments	Tensile strength (MPa)	Elongation at break point (%)
تیمارها	استحکام کششی	کشیدگی تا نقطه شکست
T1	0.691 ± 0.037 d	26.88 ± 0.81 c
T2	0.780 ± 0.051 c	28.69 ± 0.97 b
T3	0.892 ± 0.023 b	29.88 ± 1.05 ab
T4	0.973 ± 0.045 a	30.52 ± 0.59 a
T5	0.851 ± 0.034 bc	30.89 ± 0.77 a

*نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. وجود حداقل یک حرف لاتین مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف بین مقادیر هر ستون در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد. T1: ۱۰۰ درصد نانوکریستال سلولز؛ T2: ۷۰ درصد نانوکریستال+۳۰ درصد موسیلاژ کتان، T3: ۵۰ درصد نانوکریستال+۵۰ درصد موسیلاژ کتان، T4: ۳۰ درصد نانوکریستال+۷۰ درصد موسیلاژ کتان، T5: ۱۰۰ درصد موسیلاژ کتان.

*The results are reported as mean ± standard deviation. The presence of at least one common Latin letter indicates that there is no significant difference between the values of each column at the 5% probability level. T1: 100% cellulose nanocrystals; T2: 70% cellulose nanocrystals+30% flaxseed mucilage; T3: 50% cellulose nanocrystals+50% flaxseed mucilage; T4: 30% cellulose nanocrystals+70% flaxseed mucilage; T5: 100% flaxseed mucilage.

خواص رنگی فیلم‌های بر پایه موسیلاژ و نانوکریستال

رنگ فیلم‌های بسته‌بندی تأثیر قابل توجهی در پذیرش محصول توسط مصرف‌کنندگان دارد. شاخص‌های رنگی نمونه‌های فیلم شامل شدت روشنایی رنگ (L^*)، شدت قرمزی-سبزی رنگ (a^*) و شدت زردی-آبی رنگ (b^*) و همچنین میزان کدورت نمونه‌های فیلم در **جدول ۳** آورده شده است و نشان می‌دهد که با افزودن نانوکریستال سلولز و افزایش سطح آن در فیلم‌های موسیلاژ دانه کتان، شدت روشنایی رنگ فیلم‌های تولیدی کاهش و شدت زردی و قرمزی رنگ و همچنین کدورت فیلم‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$).

به طوری که بیشترین میزان L^* (۸۱/۷۰) و کمترین میزان a^* (۱/۷۲)، b^* (۲/۵۸) و کدورت ($1/179 \text{ mm}^{-1}$) در فیلم حاوی ۱۰۰ درصد موسیلاژ دانه کتان مشاهده شد و کمترین میزان L^* (۷۳/۹۶) و بیشترین میزان a^* (۲/۵۷)، b^* (۵/۲۰) و کدورت ($1/946 \text{ mm}^{-1}$) مربوط به فیلم حاوی ۱۰۰ درصد نانوکریستال سلولز بود. افزایش کدورت فیلم‌ها در اثر افزودن نانوکریستال‌های سلولز ناشی از کاهش روشنایی فیلم‌ها و خصوصیات پراکندگی نور توسط نانوکریستال‌ها می‌باشد. نانوذرات از طریق تجمع در ساختار فیلم‌ها، عبور نور از فیلم‌ها را مشکل می‌سازند (Abdollahi et al., 2013).

جدول ۳- نتایج بررسی خواص رنگی فیلم‌های بر پایه موسیلاژ دانه کتان و نانوکریستال سلولز

Table 3- Data obtained from examining the color properties of films based on flaxseed mucilage and cellulose nanocrystals

Treatments	L^*	a^*	b^*	Opacity (mm^{-1})
تیمارها	روشنایی رنگ	قرمزی-سبزی رنگ	زردی-آبی رنگ	کدورت
T1	73.96 ± 1.09 d	2.57 ± 0.11 a	5.20 ± 0.18 a	1.946 ± 0.015 a
T2	75.35 ± 0.87 c	2.40 ± 0.02 b	4.72 ± 0.14 b	1.805 ± 0.042 b
T3	76.91 ± 0.96 b	2.29 ± 0.13 b	4.19 ± 0.37 c	1.518 ± 0.016 c
T4	79.73 ± 0.99 a	1.95 ± 0.08 c	3.48 ± 0.29 d	1.335 ± 0.026 d
T5	81.70 ± 1.16 a	1.72 ± 0.06 d	2.58 ± 0.21 e	1.179 ± 0.033 e

*نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. وجود حداقل یک حرف لاتین مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف بین مقادیر هر ستون در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد. T1: ۱۰۰ درصد نانوکریستال سلولز؛ T2: ۷۰ درصد نانوکریستال+۳۰ درصد موسیلاژ کتان، T3: ۵۰ درصد نانوکریستال+۵۰ درصد موسیلاژ کتان، T4: ۳۰ درصد نانوکریستال+۷۰ درصد موسیلاژ کتان، T5: ۱۰۰ درصد موسیلاژ کتان.

*The results are reported as mean ± standard deviation. The presence of at least one common Latin letter indicates that there is no significant difference between the values of each column at the 5% probability level. T1: 100% cellulose nanocrystals; T2: 70% cellulose nanocrystals+30% flaxseed mucilage; T3: 50% cellulose nanocrystals+50% flaxseed mucilage; T4: 30% cellulose nanocrystals+70% flaxseed mucilage; T5: 100% flaxseed mucilage.

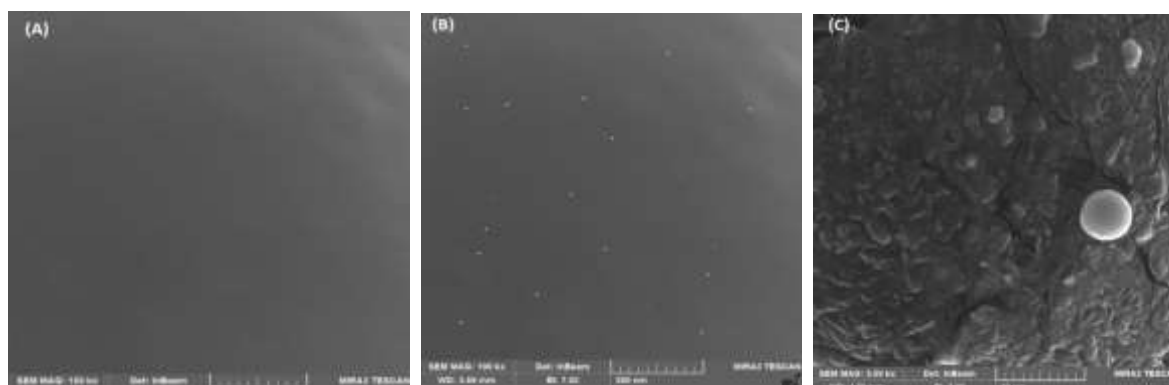
د اولیویرا فیلهو و همکاران (de Oliveira Filho et al., 2021) نیز دریافتند که افزودن نانوکریستال‌های سلولز به فیلم‌های بایوپلیمری منجر به کاهش شدت روشنایی و افزایش میزان کدورت فیلم‌های تولیدی گردید. قصفنفرزاده و کدیور (Qazanfarzadeh & Kadivar, 2015) نیز گزارش کردند که میزان کدورت فیلم‌های بر پایه ایزوله پروتئین آب‌پنیر در اثر تلفیق سطوح مختلف نانوکریستال سلولز به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیضاوی و همکاران (Bayzavi et al., 2021) نیز به طور موافق با نتایج حاصل در پژوهش حاضر مشاهده کردند که میزان روشنایی رنگ فیلم‌های بر پایه صمغ دانه به حاوی نانوکریستال‌های سلولز بالاتر از فیلم شاهد بود، ولی این فیلم‌های بایونانوکامپوزیتی دارای شدت زردی رنگ بالاتری بودند.

د اولیویرا فیلهو و همکاران (de Oliveira Filho et al., 2021) نیز دریافتند که افزودن نانوکریستال‌های سلولز به فیلم‌های بایوپلیمری منجر به کاهش شدت روشنایی و افزایش میزان کدورت فیلم‌های تولیدی گردید. قصفنفرزاده و کدیور (Qazanfarzadeh & Kadivar, 2015) نیز گزارش کردند که میزان کدورت فیلم‌های بر پایه ایزوله پروتئین آب‌پنیر در اثر تلفیق سطوح مختلف نانوکریستال سلولز به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیضاوی و همکاران (Bayzavi et al., 2021) نیز به طور موافق با نتایج حاصل در پژوهش حاضر مشاهده کردند که میزان روشنایی رنگ فیلم‌های بر پایه صمغ دانه به حاوی نانوکریستال‌های سلولز بالاتر از فیلم شاهد بود، ولی این فیلم‌های بایونانوکامپوزیتی دارای شدت زردی رنگ بالاتری بودند.

ریزساختار فیلم‌های بر پایه موسیلاژ و نانوکریستال

ریزساختار فیلم بر پایه ۱۰۰ درصد موسیلاژ دانه کتان و فیلم حاوی ۳۰ درصد نانوکریستال سلولز با استفاده از میکروسکوپ SEM مورد مطالعه قرار گرفت و تصاویر آن در شکل ۱ ارائه شده است. همانطوری که در شکل ملاحظه می‌گردد، هر دو فیلم دارای سطح صاف و یکنواختی هستند و فاقد حفره و ترک واضحی می‌باشند. در فیلم حاوی نسبت ۳۰ به ۷۰ نانوکریستال سلولز به موسیلاژ دانه کتان، نانوکریستال‌ها به طور یکنواخت در شبکه فیلم موسیلاژی پراکنده و

توزیع شدند و تجمع ذرات مشاهده نشد. دیم و همکاران (Diem et al., 2021) مشاهده کردند که در فیلم‌های بر پایه ترکیب پلی‌وینیل‌الکل و صمغ تراگاکانت، با افزودن سطوح پایین نانوکریستال سلولز، این نانوکریستال‌ها به صورت فیلر در ساختار فیلم پراکنده شدند. د اولیویرا فیلهو و همکاران (de Oliveira Filho et al., 2021) گزارش کردند که افزودن نانوکریستال سلولز به فیلم بر پایه نشاسته موجب متراکم‌تر شدن ساختار فیلم‌های تولیدی در مقایسه با فیلم فاقد نانوکریستال (شاهد) گردید، با این حال، این محققین اظهار داشتند که فیلم‌های حاوی نانوکریستال، تجمع کمی از نانوذرات مشاهده شد.



شکل ۱- تصاویر SEM: (A) بخش سطحی فیلم بر پایه ۱۰۰ درصد موسیلاژ دانه کتان؛ (B) بخش سطحی از فیلم حاوی ۳۰ درصد نانوکریستال سلولز، (C) بخش عرضی فیلم حاوی ۳۰ درصد نانوکریستال سلولز

Fig. 1. SEM images: (A) Surface section of film based on 100% flaxseed mucilage; (B) Surface section of film containing 30% cellulose nanocrystals; (C) Cross section of film containing 30% cellulose nanocrystals

می‌توان از طریق مخلوط کردن موسیلاژ دانه کتان و محلول نانوکریستال سلولز در نسبت ۳۰:۷۰ تولید نمود و از این فیلم زیست تخریب‌پذیر می‌توان جهت بسته‌بندی محصولات غذایی، به ویژه انواع حساس به رطوبت استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که فیلم بایونانوکامپوزیتی دارای خصوصیات مکانیکی و پایداری مطلوب در برابر رطوبت و بخار آب را

منابع

1. Abdollahi, M., Alboofetileh, M., Rezaei, M., & Behrooz, R. (2013). Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 416-424. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.006>
2. Agustin, M.B., Ahmmad, B., De Leon, E.R.P., Buenaobra, J.L., Salazar, J.R., & Hirose, F. (2013). Starch-based biocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals from garlic stalks. *Polymer Composites*, 34(8), 1325-1332. <https://doi.org/10.1002/pc.22546>
3. American Society for Testing and Materials (ASTM), (2002). Standard test methods for water vapor transmission of materials (E 96-00). In: Annual book of ASTM Standards (pp. 1048-1053). Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
4. American society standard testing and materials (ASTM), (2008). Standard test method for tensile properties of plastics: D 638-08. Philadelphia.
5. Bayzavi, T., Ansari, S., & Danesh, N. (2020). Preparation of composite films from quince seed mucilage and nanocrystalline cellulose and studying their properties. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 17, 93-108.
6. Cao, X., Chen, Y., Chang, P.R., Muir, A.D., & Falk, G. (2008). Starch-based nanocomposites reinforced with flax cellulose nanocrystals. *Express Polymer Letters*, 2(7), 502-510. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2008.60>

7. Cerqueira, J.C., Penha, J.D.S., Oliveira, R.S., Guarieiro, L.L.N., Melo, P.D.S., Viana, J.D., & Machado, B.A.S. (2017). Production of biodegradable starch nanocomposites using cellulose nanocrystals extracted from coconut fibers. *Polímeros*, 27, 320-329.
8. Chang, P.R., Jian, R., Zheng, P., Yu, J., & Ma, X. (2010). Preparation and properties of glycerol plasticized-starch (GPS)/cellulose nanoparticle (CN) composites. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 301-305. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.007>
9. Criado, P., Frascini, C., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2020). Cellulose nanocrystals (CNCs) loaded alginate films against lipid oxidation of chicken breast. *Food Research International*, 132, 109110. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109110>
10. Criado, P., Frascini, C., Shankar, S., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2021). Influence of cellulose nanocrystals gellan gum-based coating on color and respiration rate of *Agaricus bisporus* mushrooms. *Journal of Food Science*, 86(2), 420-425. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15580>
11. de Oliveira Filho, J.G., Albiero, B.R., Cipriano, L., de Oliveira Nobre Bezerra, C.C., Oldoni, F.C.A., Egea, M.B., & Ferreira, M.D. (2021). Arrowroot starch-based films incorporated with a carnauba wax nanoemulsion, cellulose nanocrystals, and essential oils: A new functional material for food packaging applications. *Cellulose*, 28(10), 6499-6511. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03945-0>
12. de Souza Coelho, C.C., Silva, R.B.S., Carvalho, C.W.P., Rossi, A.L., Teixeira, J.A., Freitas-Silva, O., & Cabral, L.M.C. (2020). Cellulose nanocrystals from grape pomace and their use for the development of starch-based nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 1048-1061. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.046>
13. Diem, L.N., Banerjee, I., Pal, K., Sukatta, U., Rugthaworn, P., & Sukyai, P. (2021). Evaluation in cellulose nanocrystals effectiveness on composite film based wound dressing from poly (vinyl alcohol) and gum tragacanth, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1094285/v1>
14. El Miri, N., Abdelouahdi, K., Barakat, A., Zahouily, M., Fihri, A., Solhy, A., & El Achaby, M. (2015). Bio-nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals: Rheology of film-forming solutions, transparency, water vapor barrier and tensile properties of films. *Carbohydrate Polymers*, 129, 156-167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.051>
15. Espitia, P.J.P., Du, W., de Avena-Bustillos, R.J., de Soares, N.F.F., & McHugh, T.H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties: A review. *Food Hydrocolloids*, 35, 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.005>
16. Gohargani, M., Lashkari, H., & Shirazinejad, A. (2020). Study on biodegradable chitosan-whey protein-based film containing bionanocomposite TiO₂ and *Zataria multiflora* essential oil. *Journal of Food Quality*, 2020, 8844167. <https://doi.org/10.1155/2020/8844167>
17. Hernández, C., Pérez-Cabrera, L.E., & González-Martínez, C. (2010). Development of linseed-mucilage edible coatings and its application to extend fresh-cut cucumber shelf-life. In *Innovations in Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries*; AMECA Inc.: Queretaro, Mexico, pp. 321-334.
18. Jensen, A., Lim, L.T., Barbut, S., & Marcone, M. (2015). Development and characterization of soy protein films incorporated with cellulose fibers using a hot surface casting technique. *LWT- Food Science and Technology*, 60, 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.027>
19. Kumar, P., Sandeep, K.P., Alavi, S., Truong, V.D., & Gorga, R.E. (2010). Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion, *Journal of Food Engineering*, 100(3), 480-489. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.035>
20. Kumar, A., Rao, K.M., & Han, S.S. (2017). Development of sodium alginate-xanthan gum based nanocomposite scaffolds reinforced with cellulose nanocrystals and halloysite nanotubes. *Polymer Testing*, 63, 214-225. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.08.030>
21. Oun, A.A., & Rhim, J.W. (2016). Isolation of cellulose nanocrystals from grain straws and their use for the preparation of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 150, 187-200. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.020>
22. Panaitescu, D. M., Frone, A. N., Ghiurea, M. & Chiulan, I. (2015). Influence of storage conditions on starch/PVA films containing cellulose nanofibers. *Indian Crop Products*, 70, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.028>
23. Peng, B.L., Dhar, N., Liu, H.L., & Tam, K.C. (2011). Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: a nanotechnology perspective. *Canadian Journal of Chemistry and Engineering*, 89, 1191-1206. <https://doi.org/10.1002/cjce.20554>
24. Prado, N.S., da Silva, I.S.V., Silva, T.A.L., de Oliveira, W.J., de Castro Motta, L.A., Pasquini, D., & Otaguro, H. (2018). Nanocomposite films based on flaxseed gum and cellulose nanocrystals. *Materials Research*, 21(6), 1-9.

25. Qazanfarzadeh, Z., & Kadivar, M. (2015) Investigation of the effect of cellulose nanocrystal on physical properties of whey protein isolates bionanocomposite films. *Innovative Food Technologies*, 2(4), 75-85. <https://doi.org/10.22104/jift.2015.205>
26. Ramos, M., Valdes, A., Beltran, A., & Garrigos, M.C. (2016). Gelatin-based films and coatings for food packaging application: A review. *Coatings*, 6, 41. <https://doi.org/10.3390/coatings6040041>
27. Rhim, J.W., Park, H.M., & Ha, C.S. (2013). Bionanocomposites for food packaging applications. *Progress Polymer Science*, 38, 1629-1652. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008>
28. Roohani, M., Habibi, Y., Belgacem Naceur, M., Ebrahim, G., Karimi, A.N., & Dufresne, A. (2008) Cellulose whiskers reinforced polyvinyl alcohol copolymers nanocomposites. *European Polymer Journal*, 44: 2489-2498. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.05.024>
29. Sagnelli, D., Hooshmand, K., Kemmer, G.C., Kirkensgaard, J.J.K., Mortensen, K., Giosafatto, C.V.L., Holse, M., Hebelstrup, K.H., Bao, J., & Stelte, W. (2017) Cross-linked amylose bio-plastic: A transgenic-based compostable plastic alternative. *International Journal of Molecule Science*, 18, 2075. <https://doi.org/10.3390/ijms18102075>
30. Savadekar, N.R., Karande, V.S., Vigneshwaran, N., Bharimalla, A.K., & Mhaske, S.T., (2012). Preparation of nano cellulose fibers and its application in kappacarrageenan based film. *International Journal of Biology and Macromolecules*, 51, 1008-1013. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.014>
31. Sharmin, N., Khan, R., Salmieri, S., Dussault, D., Bouchard, J., & Lacroix, M. (2012). Mechanical and barrier properties of methylcellulose- based films grafted with trimethylolpropane trimethacrylate by gamma radiation: effect of filling with cellulose nanocrystals. *JFOR*, 2, 24-31.
32. Stewart, S., & Mazza, G. (2000). Effect of flaxseed gum on quality and stability of a model salad dressing. *Journal of Food Quality*, 23, 373-390. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2000.tb00565.x>
33. Sukyai, P., Anongjanya, P., Bunyahwuthakul, N., Kongsin, K., Harnkarnsujarit, N., Sukatta, U., & Chollakup, R.J.F.R.I., (2018). Effect of cellulose nanocrystals from sugarcane bagasse on whey protein isolate-based films. *Food Research International*, 107, 528-535. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.052>
34. Tabibloghmany, F., Hojjatoleslami, M., Farhadian, F., & Ehsandoost, E. (2013). Effect of Linseed (*Linum usitatissimum* L.) hydrocolloid as edible coating on decreasing oil absorption in potato chips during Deep-fat frying. *International Journal of Agricultural Crop Science*, 6, 63-69.
35. Tee, Y., Wong, J., Ching Tan, M., & Talib, R.A. (2017) Development of edible film from flaxseed mucilage. *Bioresources*, 11, 10286-10295.
36. Teymourpour, Sh., Abdorreza, M.N. & Fariborz, N. (2015) Functional, thermal, and antimicrobial properties of soluble soybean polysaccharide biocomposites reinforced by nano TiO₂. *Carbohydrate Polymers*, 134, 726-731. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.073>
37. Torabi, Z., & MohammadiNafchi, A. (2013). The effects of SiO₂ nanoparticles on mechanical and physicochemical properties of potato starch films. *Journal of Chemical Health Risks*, 3(1). <https://doi.org/10.22034/jchr.2018.544018>
38. Wang, Y., Li, D., Wang, L., Yang, L. & Ozkan, N. (2011). Dynamic mechanical properties of flaxseed gum based edible films. *Carbohydrate Polymers*, 86, 499-504. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.079>
39. Wardhono, E.Y., Pinem, M.P., Kustiningsih, I., Agustina, S., Oudet, F., Lefebvre, C., & Guénin, E. (2019). Cellulose nanocrystals to improve stability and functional properties of emulsified film based on chitosan nanoparticles and beeswax. *Nanomaterials*, 9(12), 1707. <https://doi.org/10.3390/nano9121707>
40. Yan, Q., Hou, H., Guo, P., & Dong, H. (2011). Effects of extrusion and glycerol content on properties of oxidized and acetylated corn starch-based films. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 707-712. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.048>

Evaluation of the Fouling Phenomenon During Membrane Clarification of Apple Juice Using Scraped Surface Membrane Unit

S. Yassari¹, H. Mirsaeeaghazi^{2*}, L. Roozbeh Nasiraie³, A. Fadavi⁴

1 and 3- Ph.D. Student and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Iran, respectively.

2 and 4- Associate Professors, Department of Food Technology, Faculty of Agricultural Technology (Aburaihan), College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Pakdasht, Iran

(* - Corresponding Author Email: mirsaeed@ut.ac.ir)

Received: 2022.11.29
Revised: 2023.03.08
Accepted: 2023.04.17
Available Online: 2023.04.25

How to cite this article:

Yassari, S., Mirsaeeaghazi, H., Roozbeh Nasiraie, L., & Fadavi, A. (2023). Evaluation of the fouling phenomenon during membrane clarification of apple juice using scraped surface membrane unit. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5), 723-743. (In Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79693.1217>

Introduction

As a useful fruit for humans, apple (*Malus domestica*) is a good source of antioxidants, minerals, ascorbic acid, vitamins, polyphenols, fibers and other essential elements with medicinal properties. Improving the storage time of apple juice and maintaining the stability of extracts with high Brix value (during transportation and storage) and its marketability by removing the remaining water as well as reducing the turbidity, viscosity and brown color caused by colloidal suspended solids. Large (pectin, protopectin, pigments, polymeric carbohydrates, tannin, starch, cellulose, hemicellulose, fibers, etc.) is of great importance. Due to the presence of colloidal suspended solid particles and compounds that settle over time (mold, bacteria, plant cell fragments, pectin-tannin complex), apple juice must be clarified before concentration. Due to the high-energy consumption, time-consuming, degradation of thermo-sensitive components, and reduction of nutritional value in traditional methods, recently, the use of membrane concentration in food and beverage production holds great potential. Despite all the benefits of membrane processes, one of the critical problems is permeate flux decline due to the concentration polarization and membrane fouling. In this study, an innovative mechanical motion was developed to remove the cake deposits on the membrane surface towards mitigating adverse effects of polarization and fouling.

Materials and Methods

Membrane scraped surface module was designed and made with polyethylene material. The membrane was enclosed between the lower and upper parts of the module. These two parts are connected with screws and create a cylindrical part. Also, two caps are pressed axially to this cylindrical part by a metal frame to eliminate any unwanted leakage. The rotor shaft was coupled with an electric motor and the rotation of the output shaft was regulated by an inverter. A pump transferred the fresh fruit juice to the module through the inlet port and then it was divided into two output streams, permeate and retentate. The permeate was collected from the bottom of the module for further investigation and the retentate was returned to the juice tank. A polyethersulfone (PES) membrane with molecular weight cut-off (MWCO) of 4 kDa was used to clarify apple juice. Effects of the blade rotation speed (0, 600, 1400 and 2200 rpm), transmembrane pressure (TMP) (0.5, 1 and 1.5 bar), feed flow rate (FFR) (10, 15 and 20 ml/s) and the distance of the blade from the membrane surface (2 and 5 mm) on volumetric concentration factor (VCF) and fouling phenomenon were evaluated.



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79693.1217>

Hermia model was used to study the main fouling mechanism and it was verified by scanning electron microscopy (SEM) images.

Results and Discussion

Results showed that rotating the blade with speed of 600 rpm at TMP of 0.5 bar, FFR of 10 ml/s and 2 mm distance from the membrane surface had the best performance in VCF and reducing fouling. The main mechanism of fouling was cake formation. Rotation of the blade decreases the intensity of cake formation and its thickness on the membrane surface and enhances the standard pore blocking. Also increasing the blade rotation speed changes the main fouling mechanism to the standard pore blocking due to the cake disintegration on the membrane surface and the penetration of fine particles into the membrane pores. As a result, the rotation of blade had a significant positive effect on increasing the VCF. On the other hand, the total resistance decreased with the rotation of the blade and by increasing the distance of blade from the membrane surface, the intensity of cake formation reduced. Also, the SEM images showed that in without blade rotation mode, the accumulation of cake particles on the membrane surface is thicker and denser than in with blade rotation mode. On the other hand, the low thickness of the cake layer formed on the membrane surface in the process of blade rotation is due to the turbulences resulting from the rotating blade. These observations confirm the results of the Hermia model in the previous sections.

Conclusion

In conclusion, the TMP 0.5 bar, FFR of 10 ml/s, blade rotation speed of 600 rpm with a distance of 2 mm from membrane surface were considered as the best conditions for ultrafiltration of apple juice using scraped-surface membrane unit.

Keywords: Apple juice, Concentration polarization, Fouling, Membrane clarification, Scraped surface, VCF



مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲، ص. ۷۴۳-۷۲۳

مطالعه پدیده گرفتگی در شفاف‌سازی غشایی آب سیب به کمک سامانه غشایی سطح تراش

سیما یساری^۱ - حسین میرسعیدقاضی^{۲*} - لیلا رزوبه نصیری^۳ - علی فدوی^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۸

چکیده

شفاف‌سازی آب میوه جهت بهبود خواص فیزیکوشیمیایی و بازارپسندی مهم است. به دلیل مصرف بالای انرژی، زمان‌بر بودن، تخریب ترکیبات حساس به حرارت و کاهش ارزش تغذیه‌ای در روش‌های سنتی، امروزه برای شفاف‌سازی آب میوه فرآیندهای غشایی به کار گرفته شده است. یکی از مشکلات مهم فرآیندهای غشایی، کاهش شار تراوه ناشی از قطبش غلظتی و گرفتگی غشا می‌باشد. در این مطالعه، یک روش مکانیکی جدید برای ایجاد تلاطم در جریان به منظور کاهش اثرات نامطلوب قطبش غلظتی و گرفتگی غشا ایجاد شد. بدین منظور، از غشا اولترافیلتر با جنس پلی‌اتر سولفون (PES^۴) و حد وزن مولکولی (MWCO) ۴ کیلو دالتون درون سامانه غشایی با تیغه‌های تراشیده سطح جهت شفاف‌سازی آب سیب استفاده شد. اثر پارامترهای عملیاتی شامل سرعت دوران تیغه‌ها (۰، ۶۰۰، ۱۴۰۰ و ۲۲۰۰ دور بر دقیقه)، فشار (TMP^۶) (۰/۵، ۱ و ۱/۵ بار)، سرعت جریان^۷ (FFR) (۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌لیتر بر ثانیه) و فاصله تیغه از سطح غشاء (۲ و ۵ میلی‌متر) بر فاکتور غلظت حجمی (VCF^۸)، مقاومت گرفتگی، زمان وقوع هر کدام از مکانیسم‌های گرفتگی و مورفولوژی لایه کیک بررسی شد. طبق نتایج انجام فرایند در فشار ۰/۵، سرعت جریان ۱۰ میلی‌لیتر بر ثانیه، سرعت دوران تیغه‌ها ۶۰۰ دور بر دقیقه و فاصله ۲ میلی‌متری تیغه‌ها از سطح غشا بهترین تأثیر را بر VCF و کاهش گرفتگی داشت. مکانسیم اصلی گرفتگی در فرآیند، تشکیل لایه کیک بود. چرخش تیغه‌ها شدت تشکیل لایه کیک و ضخامت آن بر سطح غشا را کاهش داده و منجر به افزایش سهم گرفتگی استاندارد شد.

واژه‌های کلیدی: آب سیب، شفاف‌سازی غشایی، سامانه سطح تراش، قطبش غلظتی، گرفتگی، فاکتور غلظت حجمی

مقدمه

اسید آسکوربیک، ویتامین‌ها، پلی‌فنل‌ها، فیبرها و سایر عناصر ضروری با خواص دارویی هست (Candrawinata et al., 2013 Khanali et al., 2020). بهبود مدت زمان انبارداری آب سیب و حفظ پایداری عصاره‌ها با ارزش بریکس بالا (طی حمل و نقل و ذخیره‌سازی) و بازارپسندی آن، از طریق حذف آب باقیمانده همچنین کاهش کدورت،

ایران به عنوان یکی از بزرگترین تولیدکنندگان سیب با تولید بیش از ۵٪ سیب جهان، سالانه حدود ۲۰۹۶۷۴۹ تن سیب را تأمین می‌کند (FAO, 2017). سیب (*Malus domestica*) به عنوان یک میوه مفید برای سلامت انسان‌ها حاوی منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها، مواد معدنی،

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکترای تخصصی علوم و مهندسی صنایع غذایی و استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد واحد نور، نور، ایران

۲ و ۴- دانشیاران گروه فناوری صنایع غذایی، دانشکده فناوری کشاورزی (ابوریحان)، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

(*)- نویسنده مسئول: Email: mirsaeed@ut.ac.ir

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79693.1217>

4- Polyether sulfone

5- Molecular weight cut off

6- Trans membrane pressure

7- Feed flow rate

8- Volumetric concentration factor

نموده و پارامترهای عملیاتی و پدیده گرفتگی را مورد ارزیابی قرار داده است (جدول ۱). به عنوان مثال، فوکوموتو و همکاران (Fukumoto *et al.*, 1998) از فرآیندهای میکروفیلتراسیون با غشا با اندازه منافذ ۰/۲ میکرومتر و فراپالایش با غشاهایی از جنس سرامیکی با اندازه منافذ ۰/۲ میکرومتر در مازول لوله‌ای برای شفاف‌سازی آب سیب استفاده نمودند و گزارش کردند که غشاهای UF تحت شرایط بهینه (فشار ۴۱۴ کیلوپاسکال، سرعت ۸ متر بر ثانیه و دمای ۵۰ درجه سلسیوس) منجر به شار بیشتر و گرفتگی غشایی کمتر در مقایسه با غشاهای MF^۲ (میکروفیلتراسیون) شد. ولادیساولیویچ و همکاران (Vladislavljević *et al.*, 2003) تأثیر پارامترهای عملیاتی مانند سرعت جریان (FFR)، فشار (TMP) و دما را بر مقاومت گرفتگی طی شفاف‌سازی آب سیب با استفاده از غشاهای سرامیکی UF ارزیابی کردند. نتایج نشان داد هر دو مقاومت کل و مقاومت گرفتگی با افزایش FFR کاهش یافت؛ زیرا افزایش FFR ضریب انتقال جرم را افزایش داده و قطبش غلظتی و تجمع رسوب باقیمانده در سطح غشا را کاهش داد. تغلیظ آب سیب با استفاده از غشاهای مختلف نانوفیلتراسیون (NF^۳) در مازول لوله‌ای و صفحه‌ای در فشارهای پایین (۸-۱۲ بار) توسط وارچوک و همکاران (Warczok *et al.*, 2004) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که گرفتگی غیر قابل برگشت آب سیب نسبتاً کم است. دبروین و همکاران (de Bruijn *et al.*, 2006) مطالعه‌ای را برای تجزیه و تحلیل مکانیسم‌های گرفتگی طی فرایند UF آب سیب انجام دادند. آنها دریافتند که وقتی فرایند UF تحت TMP ۱۵۰ کیلوپاسکال و FFR ۷ متر بر ثانیه انجام می‌شود با کاهش تدریجی لایه کیک همراه است. اما در این مورد TMP نباید از فشار بحرانی تجاوز کند. همچنین شار بحرانی نباید بیشتر از $250 \text{ Lm}^{-2}\text{h}^{-1}$ باشد. در این شرایط محققان نوع جدیدی از گرفتگی را توصیف کردند که در آن مسدود شدن منافذ غشایی در دهانه‌ی منافذ و تشکیل لایه کیک در سطح غشا بطور همزمان اتفاق می‌افتد. این نوع مدل گرفتگی پیش‌بینی می‌کند که تشکیل لایه کیک در FFR ۷/۴ متر بر ثانیه و TMP ۱۵۰ کیلوپاسکال یا FFR ۷ متر بر ثانیه و TMP ۱۲۰ کیلوپاسکال انجام نمی‌شود. تحت چنین شرایطی گرفتگی داخلی غشا تنها مکانیزمی بود که شار نفوذی را کاهش می‌داد. ژائو و همکاران (Zhao *et al.*, 2014) فرایند فراپالایش با یک غشا سرامیکی و اندازه منافذ ۰/۰۵ میکرومتر همراه با روش فرایند فشار بالا (HPP^۴) در فشار ۵۰۰ مگاپاسکال به مدت ۶ دقیقه و روش دمای بالا-زمان کوتاه (HTST^۵) در دمای ۱۱۰°C به مدت ۸/۶ ثانیه برای آب سیب تازه را مورد ارزیابی قرار دادند. آنها

ویسکوزیته و رنگ قهوه‌ای تیره ناشی از مواد جامد معلق کلوییدی بزرگ (پکتین، پروتوپکتین، رنگدانه‌ها، کربوهیدرات‌های پلیمریک، تانن، نشاسته، سلولز، همی سلولز، فیبرها و ...) از اهمیت زیادی برخوردار است (Bhattacharjee *et al.*, 2010; Onsekizoglu *et al.*, 2017a). به دلیل وجود چنین ذرات جامد معلق کلوییدی و ترکیباتی که با گذر زمان ته‌نشین می‌شوند (همی سلولز، پروتئین، قطعات سلول گیاهی، کمپلکس پکتین-تانن) آب سیب باید قبل از تغلیظ، شفاف‌سازی شود (Massini *et al.*, 2018; Ahmad *et al.*, 2020). روش‌های مرسوم شفاف‌سازی آب میوه‌ها پیش تیمار آنزیمی، تبخیر حرارتی و تشکیل لخته توسط مواد کمکی و پکتین‌زدایی است (Gulec *et al.*, 2017; Onsekizoglu *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2020). با این حال، مصرف بالای انرژی، زمان‌بر بودن، سختی کار، تخریب اجزای حساس به حرارت نظیر ترکیبات فنولی و رنگدانه، تغییرات عطر و طعم و کاهش ارزش غذایی از معایب اصلی روش‌های فوق می‌باشد (Bahçeci, 2012). در سال‌های اخیر، از فن‌آوری جداسازی غشایی جهت شفاف‌سازی آب میوه‌ها به صورت موفقیت آمیزی استفاده شده‌است. جداسازی غشایی به دلیل کیفیت بالای محصول، بهره‌وری بالا و عملکرد آن در دمای محیط می‌تواند تأثیر مثبتی بر مصرف انرژی و کاهش هزینه عملیاتی داشته باشد (Castro-Muñoz *et al.*, 2018).

فراپالایش (UF^۱) یکی از فن‌آوری‌های غشایی با نیروی محرکه فشار است که می‌تواند به منظور شفاف‌سازی آب میوه استفاده شود (Cai *et al.*, 2020). محدودیت اصلی فرایند UF کاهش شار تراوه به دلیل قطبش غلظتی و گرفتگی غشا می‌باشد (Iltam and Singh, 2015; Castro-Muñoz *et al.*, 2018). گرفتگی منجر به کاهش نفوذپذیری غشا و همچنین نیاز به تمیز کردن و تعویض مکرر غشا می‌گردد و در نتیجه افزایش هزینه عملیاتی یا کاهش بهره‌وری را در پی خواهد داشت (Lu *et al.*, 2021; Dornier *et al.*, 2018; Castro-Muñoz *et al.*, 2019).

در طول چند دهه‌ی گذشته، تلاش‌های متعددی برای بهبود کارایی و کاهش گرفتگی غشا در شفاف‌سازی آب میوه از جمله روش‌های شیمیایی-قلیایی/اکسیدانی (Cheng *et al.*, 2021)، پیش تیمار آنزیمی پکتینولیتیک آب میوه‌ها (Gokmen & Cetinkaya, 2007; Echavarria *et al.*, 2011)، روش‌های فیزیکی و مکانیکی انجام شده است (Zarouk *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2017).

مطالعات متعددی انجام شده است که تأثیر فرآیندهای غشایی مختلف با مدول‌های غشایی گوناگون بر فراوری آب سیب را بررسی

4- High-pressure processing
5- High-temperature short time

1- Ultrafiltration
2- Microfiltration
3- Nanofiltration

منجر به کاهش گرفتگی غشا شد. همچنین آنها دریافتند که در روش RDM به کمک فرایالایش گرفتگی دو مرحله‌ای بود، گرفتگی در مرحله اول سرعت پایینی داشت و در مرحله دوم سرعت بالاتری داشته و به سمت تشکیل لایه کیک پیش رفت. در نتیجه در میان فن‌آوری‌های توسعه یافته، سامانه‌های فرایالایش با کمک RDM نسبت به بقیه تکنولوژی‌ها بهتر بوده، چون هزینه عملیاتی UF را کاهش داده و اثرات نامطلوب گرفتگی غشایی را کم می‌کند (Luo et al., 2013).

همانگونه که اشاره شد پدیده گرفتگی غشا مهمترین چالش در برابر صنعتی شدن فرایند شفاف‌سازی غشایی آب میوه‌ها است و علی‌رغم مطالعات مختلفی که در راستای کاهش آن صورت پذیرفته، استفاده محدودی از فنون مکانیکی برای جلوگیری از این پدیده شده است. مشابهت مشکل گرفتگی در سامانه‌های غشایی و معطل گرفتگی در مبدل‌های حرارتی باعث شد نویسندگان مقاله حاضر به فکر استفاده از ایده مورد استفاده در مبدل‌های حرارتی سطح تراش به منظور کاهش گرفتگی در سامانه‌های غشایی افتاده و اقدام به طراحی و ساخت سامانه غشایی سطح تراش نمایند. البته ماهیت متفاوت سامانه نظیر ورودی خروجی‌های متفاوت و لزوم آب‌بندی سامانه طراحی شده پس از نصب غشا، طراحی و ساخت آن را از آنچه در خصوص مبدل‌های حرارتی سطح تراش انجام شد، متمایز می‌نمود. لذا در این تحقیق، با الهام از مبدل‌های حرارتی سطح تراش، سامانه غشایی سطح تراش طراحی و ساخته شد. این سامانه به جهت داشتن یکسری تیغه‌های تراشیده برای افزایش آشفته‌گی جریان جهت کاهش پلاریزاسیون غلظتی و گرفتگی غشا و در نهایت بهبود فرایند شفاف‌سازی غشایی آب سیب استفاده شد و پدیده گرفتگی در حین فرایند مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت. همچنین اثر عملیاتی پارامترهای مختلف مانند سرعت چرخش تیغه‌ها، FFR، TMP و فاصله تیغه از سطح غشا بر مقاومت‌های گرفتگی و مکانیسم آنها در طول فرایالایش آب سیب مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی آب سیب

سیب تازه (واریته گرانته اسمیت) از بازار محلی تهران تهیه شد و پس از شستشوی کامل و پوست‌گیری، آب آن توسط دستگاه آبمیوه گیری خانگی (Parskhazar, model Tiger, Iran) استخراج شد.

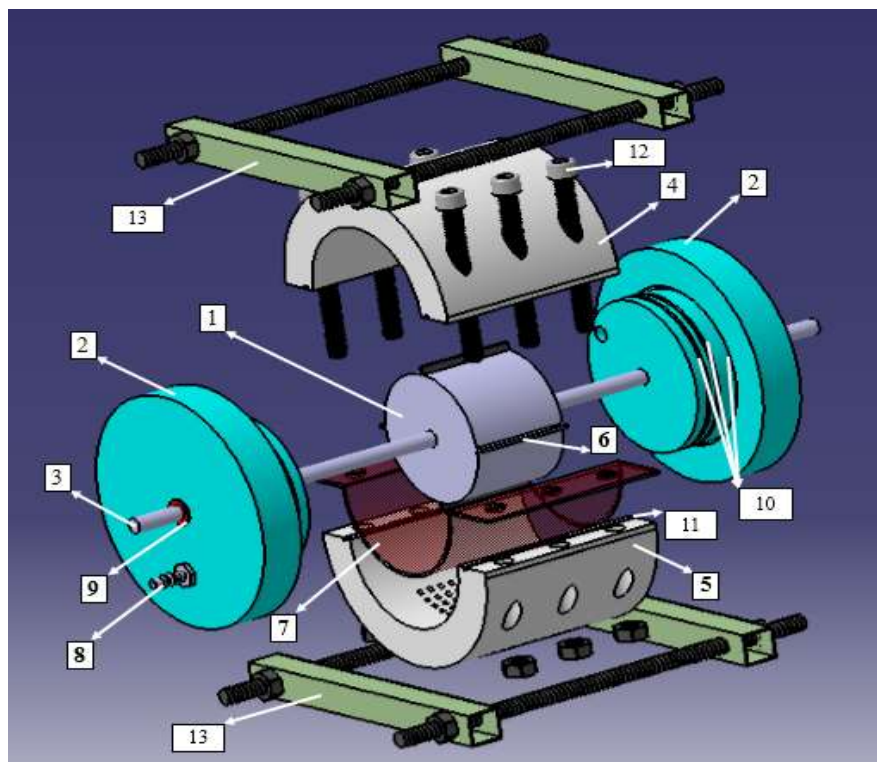
گزارش کردند که UF+HPP می‌تواند به‌عنوان تیمار بهتری برای فراوری آب سیب استفاده شود. سرکار (Sarkar, 2015) از یک سیستم فرایالایش با غشا پلی‌اتر سولفون با حد وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون با کمک میدان الکتریکی برای بررسی اثر میدان الکتریکی جریان مستقیم (DC) بر شار نفوذی آب سیب تیمار شده با آنزیم استفاده کرد. آنها افزایش شار $\frac{35}{8}\%$ را با اعمال میدان الکتریکی ۴۰۰ ولت بر متر برای مقادیر ثابت سرعت جریان $\frac{0}{75}$ متر بر ثانیه مشاهده کردند. همچنین در فشار انتقال غشایی $\frac{5}{52}$ بار شفافیت آب سیب بطور قابل توجهی افزایش یافت. زروک و همکاران (Zarouk et al., 2020) به بررسی اثر میدان مغناطیسی بر بازده و مکانیسم گرفتگی طی شفاف‌سازی غشایی آب انار پرداختند. در این روش از ترکیب سامانه تولید میدان مغناطیسی و میکروفیلتراسیون جهت کاهش گرفتگی غشا استفاده شد. نتایج آنها نشان داد، میدان مغناطیسی می‌تواند میزان مقاومت کل غشا را تا حدود ۵۰٪ کاهش دهد. با توجه به تجزیه و تحلیل مکانیسم گرفتگی غشا در ابتدای فرایند، با افزایش شدت میدان مغناطیسی گرفتگی‌های میانی و استاندارد مکانیسم غالب بودند اما با گذر زمان تشکیل لایه کیک مکانیسم غالب شد.

محققان از فن‌آوری فرایالایش با کمک ماژول دیسکی دوار (RDM^۱) برای فراوری آب کاسنی، آب چغندر قند، آب یونجه، تغلیظ عصاره قهوه، پروتئین شیر، بازیابی مخمر، نوشیدنی‌های الکلی، تولید آب آشامیدنی و فاضلاب لبنیات استفاده کردند (Laurio et al., 2021; Szerencsés et al., 2021; Zhu et al., 2013, 2016; Zhang et al., 2017). در این روش که لایه نگهدارنده غشا به صورت مکانیکی حرکت داده می‌شود، در مایعات نزدیک سطح غشا باعث ایجاد سرعت برشی بالاتر می‌شود. در مقایسه با فرایندهای غشایی مرسوم، این روش می‌تواند شدت جداسازی را با برداشتن عوامل گرفتگی و حذف آنها از سطح غشا افزایش دهد و منجر به کاهش موثر لایه پلاریزاسیون غلظتی و گرفتگی غشا شود (Szerencses et al., 2021). ژو و همکاران (Zhu et al., 2014) روش RDM به کمک فیلتراسیون ته بسته (مخزن ۱۸۰ میلی لیتر) را با روش RDM به کمک غشا UF ۵۰ کیلو دالتون برای شفاف‌سازی آب کاسنی مقایسه کردند، روش اول تحت شرایط بهینه TMP $\frac{3}{34}$ بار و سرعت چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه از لحاظ فیلتراسیون بهتر عمل کرده است، و مزایایی نظیر خلوص بیشتر با شار تراوه $167/9 \text{ L.m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ، انرژی ویژه $169/4 \text{ kwh.m}^{-3}$ ، نسبت کاهش حجم (VRR^۲) و کدورت کمتر ($\frac{2}{4}$ NTU) داشت و

جدول ۱- مطالعات انجام شده در مورد فرآیندهای غشایی آب سیب

Table 1- Literature review on the membrane processing of apple juice

Membrane system سیستم غشایی	Membrane type نوع غشا	Optimal operating parameters			Fouling resistance مقاومت گرفتگی	Fouling mechanism مکانیسم گرفتگی	Ref. منبع
		TMP (bar) فشار	FFR (m/s) دبی	Temperature (°C) دما			
Tubular لوله‌ای	Ceramic, 50 & 300 kDa	2	0.5	20	√	×	Vladislavljevic <i>et al.</i> (2003)
Tubular لوله‌ای	PVDF, 18 kDa	2.5	1	50	×	×	Yazdanshenas <i>et al.</i> (2005)
Tubular لوله‌ای	Ceramic, 15 & 50 kDa	1.5	7	55	×	√	Bruijn <i>et al.</i> (2006)
Plate & frame قاب و صفحه	PES, 50 kDa	1-3	2.5	50	×	×	He <i>et al.</i> (2007)
Flat plate صفحه‌ای	PES, 10 & 100 kDa	1-3	0.1	25	×	×	Onsekizoglu <i>et al.</i> (2010)
Plate & frame قاب و صفحه	PES 200 cm ² , UF 10 kDa	3	-	40	√	×	Bahçeci (2012)
Tubular ceramic UF-membrane غشا فرایالایش سرامیکی لوله‌ای	100 (1-channel) -300 (3-channels) Zirconium dioxide (ZrO ₂)	3.5	13.5 L/h	50	×	×	Echavarría <i>et al.</i> (2012)
Tubular لوله‌ای	Polymeric, 0.3 µm	2	-	-	×	×	Aguar <i>et al.</i> (2012)
Dead-end filtration فیلتراسیون انتها بسته	Polyamide, 0.2-0.45 µm, mix of cellulose acetate and cellulose nitrate, 0.45 µm	0.69-3.45	-	-	√	×	Fuenmayor <i>et al.</i> (2014)
Electro- Ultrafiltration الکترو-فرایالایش							
Plasma modified membrane ultrafiltration فرایالایش با غشا پهنود یافته توسط پلاسما	PS, 228 cm ² , 30 kDa PS, 0.0140 cm ² , 100 kDa	2.76-6.9 2.5	0.6-1.0 -	55 -	√ √	×	Sarkar (2015) Gulec <i>et al.</i> (2018)
UF system سامانه فرایالایش	PES-10 kDa	7.5	10 L/h	25	×	×	Cai <i>et al.</i> (2020)
Scraped surface ultrafiltration فرایالایش با سامانه سطح تراش	PES-4 kDa	0.5	10 ml/s	25	√	√	Current study مطالعه حال حاضر



شکل ۱- نقشه انفجاری قسمت‌های مختلف ماژول طراحی شده، (۱) رتور، (۲) در پوش، (۳) محور، (۴) پوسته بالایی ماژول، (۵) پوسته پایینی سوراخ‌دار ماژول، (۶) تیغه، (۷) غشا، (۸) درگاه (سرشستگی)، (۹) آب‌بند (کاسه نمد)، (۱۰) آرنینگ، (۱۱) آب‌بند طولی، (۱۲) پیچ، (۱۳) قاب تحکیم‌کننده

Fig. 1. The exploded parts of designed module 1) Rotor, 2) Cap, 3) Shaft, 4) Upper part of module, 5) Lower meshed part of module, 6) Blade, 7) Membrane, 8) Port, 9) Packing, 10) O ring, 11) Longitudinal sealing, 12) Bolt, 13) Pressurized frame

از اثر دورانی تیغه‌ها و پمپ، از غشا و سپس از پوسته سوراخ‌دار پایینی ماژول گذر نموده که تراوه فرایند را ایجاد می‌نمود. مابقی خوراک با توجه به ساختار، به عنوان ناتراوه از درگاه دیگر به مخزن آب میوه بازگردانده شد. تراوه برای بررسی بیشتر توزین و جمع‌آوری شد.

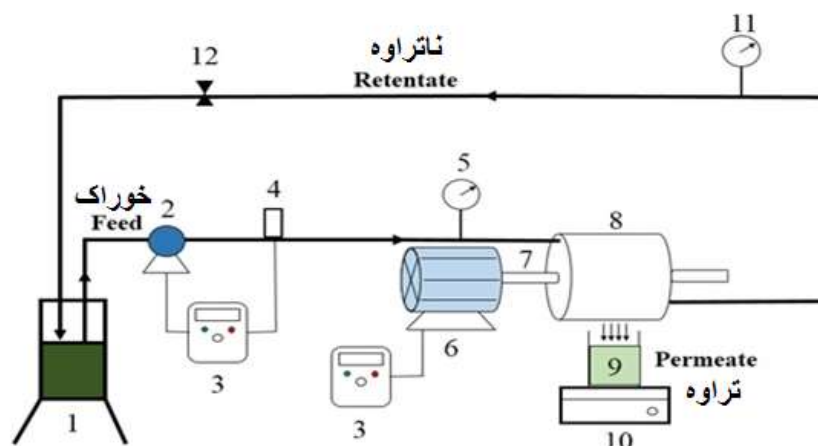
سامانه شفاف‌سازی غشایی

شماتیک کل اجزا سامانه در شکل ۲ نمایش داده شده است. غشا صفحه‌ای پلی‌اتر سولفون (PES) با اندازه منفذ ۴ کیلو دالتون با سطح فعال $10^{-2} \times 1/12$ متر مربع در یک ماژول سطح تراش در مقیاس آزمایشگاهی استفاده شد. در این سامانه، جریان خروجی از ماژول با یک شیر دستی تنظیم و با استفاده از فلومتر اندازه‌گیری شد و فشار با استفاده از یک اینورتر کوپل شده به ترانس‌میتور تنظیم شد. یک پمپ پره‌ای دوار (PROCON, Series 2, Milano, Italy) برای انتقال آب میوه به ماژول غشایی استفاده شد و ناتراوه به مخزن تغذیه برگشت داده شد. یک ترازوی دیجیتال (A&D CO., LTD, EK-2000, Japan) با دقت ۰/۱ گرم برای اندازه‌گیری وزن تراوه استفاده شد. فشار خوراک و ناتراوه با استفاده از دو فشارسنج اندازه‌گیری شد.

ماژول سطح تراش ساخته شده

ماژول غشایی سطح تراش با جنس پلی‌اتیلن طراحی و ساخته شد (شکل ۱). غشاء بین پوسته پایین و بالایی مدول محصور گردید. این دو قسمت با پیچ به هم متصل شده و قسمت استوانه‌ای را تشکیل دادند. بین این دو قسمت، آب‌بندی طولی قرار گرفت تا از نشت مایع از بین این دو قطعه جلوگیری گردد. برای بستن دو انتهای این استوانه و تشکیل محفظه بسته، دو درپوش و روی بدنه این درپوش‌ها آرنینگ برای جلوگیری از نشتی در نظر گرفته شد. برای جلوگیری از حرکت طولی درپوش‌ها و آب‌بندی بهتر، دو قاب فلزی (یکی بالا و دیگری پائین محور) به صورت محوری این دو درپوش را توسط چهار پیچ به استوانه فشرده کرد تا هرگونه حرکت محوری درپوش‌ها و نشتی ناخواسته را از بین ببرد. محور روتور با یک جفت‌کننده^۱ با الکتروموتور (Motogen, Tabriz, Iran) درگیر شد. سرعت دوران محور خروجی موتور توسط یک اینورتر (SV004ic5-1, Korea) تنظیم گردید. یک پمپ پره‌ای دوار (PROCON, Series 2, Milano, Italy)، آب میوه تازه را از طریق درگاه ورودی واقع بر روی درپوش به درون ماژول منتقل نمود. مقداری از آب میوه ورودی در اثر دوران روتور و فشار ناشی

1- Coupling



شکل ۲- شماتیکی از سامانه فرایالایش سطح تراش (۱- مخزن تغذیه ۲- پمپ ۳- اینورتور ۴- ترانسسمیتر ۵- فشارسنج ورودی ۶- الکتروموتور ۷- جفت کننده ۸- مازول سطح تراش ۹- مخزن تراوه ۱۰- ترازو ۱۱- فشارسنج خروجی ۱۲- شیر تنظیم دبی جریان)
Fig. 2. Schem of scraped-surface membrane ultrafiltration system: 1- Feed tank, 2- Pump, 3- Inverter, 4- Transmitter, 5- Input pressure gauge, 6- Electromotor, 7- Shaft, 8- Scraped surface module, 9- Permeate tank, 10- Balance, 11- Output pressure gauge, 12- Flow control valve

محاسبه مقاومت‌های مختلف غشا

مقاومت کل غشاء از مقاومت‌های مختلفی تشکیل شده که در رابطه زیر به آن‌ها اشاره شده است:

$$R_t = R_m + R_c + R_{firr} + R_{frev} \quad (2)$$

که در آن R_m مقاومت غشاء تازه، R_c مقاومت لایه کیک، R_{frev} مقاومت گرفتگی قابل برگشت و R_{firr} مقاومت گرفتگی غیر قابل برگشت است که همه مقاومت‌ها بر حسب m^{-1} محاسبه و گزارش شدند. برای محاسبه‌ی هر کدام از مقاومت‌ها، بعد از فرآیند به ترتیب مراحل شستشو با آب، شستشو با سود ۰/۵ درصد و شستشو با اسید استیک ۰/۱ درصد همگی در کمترین فشار و بیشترین دبی به مدت نیم ساعت انجام شده و مقدار مقاومت‌ها به شیوه‌ی زیر محاسبه شد.

مقاومت داخلی غشاء (R_m) مقاومتی است که توسط خود غشاء در

برابر عبور ترکیبات اعمال می‌شود و از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$R_m = \frac{1}{\mu_w L_p^0} \quad (3)$$

که در آن μ_w ویسکوزیته آب (Pa.s) و L_p^0 نفوذپذیری هیدرولیک غشاء تازه ($m \text{ Pa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) است که از معادله ۴ بدست می‌آید.

$$L_p^0 = \frac{J_w}{\Delta P} \quad (4)$$

که در آن J_w شار آب در غشاء تازه ($m \text{ s}^{-1}$) و ΔP فشار انتقال غشائی بر حسب Pa می‌باشد.

مقدار مقاومت کل (R_t) از رابطه زیر بدست آمد:

$$R_t = \frac{1}{\mu_w \times L_p} \quad (5)$$

متغیرهای مورد بررسی در آزمون‌ها

متغیرهای انتخاب شده عبارتند از:

- فشار جریان در سه سطح (۱/۵ و ۱ و ۰/۵ بار)
- دبی جریان در سه سطح (۱۵، ۱۰ و ۵ میلی لیتر بر ثانیه)
- سرعت دوران تیغه مرکزی در چهار سطح (۰، ۶۰۰، ۱۴۰۰ و ۲۲۰۰ دور بر دقیقه). یک سرعت سنج نوری- مکانیکی (Lutron, DT-2236, Taiwan) برای تعیین سرعت روتور استفاده شد.
- فاصله نوک تیغه تا سطح غشاء در دو سطح (۲ و ۵ میلی متر)

تئوری

فاکتور غلظت حجمی (VCF)

VCF یک پارامتر عملیاتی بسیار مهم جهت کاربرد تکنولوژیکی صنعتی می‌باشد (Echavarría et al., 2011) که بازده کلی فرآیند فرایالایش را در حین شفاف سازی آب میوه نشان می‌دهد. این فاکتور به صورت حجم اولیه آب میوه تقسیم بر حجم ناتراوه در زمان‌های مختلف تعریف شده و با استفاده از معادله (۱) محاسبه می‌شود.

$$VCF = 1 + \frac{V_p}{V_r} = \frac{V_f}{V_r} \quad (1)$$

در این رابطه V_p ، V_r و V_f به ترتیب حجم اولیه تغذیه، تراوه و ناتراوه بر حسب m^3 می‌باشند (Echavarría et al., 2011).

بسته به شرایط در هر زمان یک مکانیسم غالب است (Mirzaeighazi et al., 2010; Sarlaki et al., 2020). برای اینکه بدانیم در هر زمان کدام مکانیسم غالب است هم‌رابطه‌ای را به شکل زیر ارائه نموده است:

$$\frac{d^2t}{dv^2} = k \left(\frac{dt}{dv} \right)^i \quad (11)$$

در رابطه بالا t زمان، k ضریب گرفتگی، i اندیس بلوکه شدن و v حجم تراوه است. مقدار i نشان‌دهنده مکانیسم بلوکه شدن است. بدین صورت که:

(الف) اگر $i=0$ باشد، مکانیسم غالب تشکیل کیک است.

(ب) اگر $i=1$ باشد، مکانیسم غالب بلوکه شدن میانی است.

(ج) در صورتی که $i = 1.5$ باشد، بلوکه شدن استاندارد مکانیسم غالب است.

(د) زمانی که $i=2$ باشد، مکانیسم غالب بلوکه شدن کامل است (Hermia, 1982)

مطالعه ریزساختار توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

مطالعه ریز ساختاری غشا به منظور بررسی لایه گرفتگی روی غشا و در عرض آن انجام شد. عکسهایی از سطح یا برش عرضی غشاء قبل و بعد از فرآیند توسط میکروسکوپ الکترونی نوع SEM (مدل XL30 ساخت شرکت فیلیپس از کشور هلند) تهیه شد. روش نشان دادن طلا ترسیب بخار فیزیکی بود. نام دستگاه لایه نشانی طلای مورد استفاده روکش دهنده سریع (بال تکنولوژی، مدل SCDOOS، سوئیس) بود.

آزمون آماری

تمام آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و مقادیر میانگین گزارش شده است. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد. نرم‌افزار Minitab 15 برای مقایسه داده‌ها با استفاده از آزمون‌های چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

آنالیز فاکتور غلظت حجمی (VCF)

اثرات پارامترهای عملیاتی فشار (TMP)، سرعت جریان (FFR)، سرعت چرخش تیغه‌ها و فاصله تیغه از سطح غشا بر فاکتور غلظت حجمی (VCF) طی فرآیند شفاف‌سازی آب سیب به کمک ماژول سطح تراش در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که میزان VCF با افزایش سرعت چرخش تیغه تا ۲۲۰۰ دور در دقیقه، تا مقدار ۱/۶۳ افزایش یافت (شکل ۳-الف) که ناشی از تلاطم بالاتر جریان در داخل ماژول است که منجر به قطبش غلظتی پایین‌تر و در نتیجه

که در آن L_p^1 نفوذپذیری هیدرولیک غشاء بعد از فرآیند با آب سیب است و از رابطه‌ی زیر بدست می‌آید:

$$L_p^1 = \frac{J_w}{\Delta P} \quad (6)$$

که در آن J_w^1 شار آب بعد از فرآیند با آب سیب می‌باشد.

مقدار مقاومت گرفتگی غیر قابل برگشت (R_{frr}) از رابطه زیر بدست آمد:

$$R_m + R_{frr} = \frac{1}{\mu_w L_p^4} \quad (7)$$

$$L_p^4 = \frac{J_w^4}{\Delta P} \quad (8)$$

که در آن L_p^4 نفوذپذیری هیدرولیک اندازه‌گیری شده بعد از شستشو با اسید است که در آن J_w^4 شار آب بعد از شستشو با اسید می‌باشد.

مقدار مقاومت گرفتگی قابل برگشت (R_{frev}) از رابطه زیر بدست می‌آید:

$$R_m + R_{frev} + R_{frr} = \frac{1}{\mu_w L_p^4} \quad (9)$$

که در آن L_p^2 نفوذ پذیری هیدرولیک اندازه‌گیری شده بعد از شستشو با آب است.

تنها مقاومت باقیمانده مقاومت کیک است که از کم نمودن مجموع مقاومت‌های داخلی غشاء، گرفتگی قابل برگشت و گرفتگی غیرقابل برگشت از مقاومت کل بدست می‌آید (Mirzaeighazi et al., 2010).

$$R_c = R_t - R_{frev} - R_{frr} - R_m \quad (10)$$

مکانیسم‌های گرفتگی

چهار مکانیسم اصلی برای گرفتگی غشا وجود دارد که شامل بلوکه شدن کامل، بلوکه شدن میانی، تشکیل کیک و بلوکه شدن استاندارد می‌باشند.

هرمیا (Hermia, 1982) قانونی را ایجاد نمود که با استفاده از آن می‌توان تشخیص داد که کدامیک از مکانیسم‌های بالا غالب است. بر طبق این قانون از ساختار منحنی تغییرات حجم تراوه (v) نسبت به زمان (t) می‌توان به مکانیسم گرفتگی غالب در فرآیند پی برد. بدین صورت که:

(الف) در صورتی که منحنی t/v نسبت به v خطی باشد مکانیسم تشکیل کیک مکانیسم غالب است.

(ب) در صورتی که منحنی t/v نسبت به t خطی باشد مکانیسم بلوکه شدن استاندارد غالب است.

(ج) زمانی که بلوکه شدن میانی مکانیسم غالب است منحنی $\ln(t)$ نسبت به v خطی خواهد بود.

سه قانون بالا مکانیسم گرفتگی غالب را در کل فرآوری نشان می‌دهد اما در هر فرآیند تمامی مکانیسم‌ها می‌توانند تأثیرگذار باشند و

نتیجه یک لایه ضخیم و فشرده کیک ایجاد شده و شار تراوه عمدتاً توسط لایه کیک کنترل می‌شود و مستقل از نفوذپذیری غشا است. بنابر این نرخ‌های برشی بالاتر می‌تواند تجمع املاح در سطح غشا را کاهش دهد و در نتیجه مقاومت کل را کاهش دهد که منجر به این می‌شود که شار تراوه در TMP ثابت متناسب با سرعت چرخش شود. با این حال نرخ برش بیش از حد، هدر رفت انرژی و سایش تجهیزات را به همراه دارد.

طبق بررسی کسانو و همکاران (Cassano et al., 2018) یک رابطه خطی بین VCF و ترکیبات فعال زیستی بازیافتی در آب میوه شفاف شده وجود دارد. همچنین اچاواریا و همکاران (Echavarría et al., 2012) بالاترین VCF را به میزان ۱/۵۸ برای فرآیند فرآپالایش و اسمز معکوس آب سیب گزارش دادند که از VCF حاصل در تحقیق حاضر در دور بالای تیغه کمتر بود. در مطالعه‌ای دیگر باتاچاری و همکاران (Bhattacharjee et al., 2017b) بر روی آب هندوانه نشان دادند که پس از رسیدن VCF نهایی به ۲، شار تراوه اولیه از $L.m^{-2}h^{-1}$ به $1.8 \times 10^{-1} L.m^{-2}h^{-1}$ (۴۲٪) کاهش یافت. در این مطالعه بالاترین میزان VCF ۱/۶۳ تحت TMP ۰/۵ بار و سرعت دوران تیغه‌ها ۲۲۰۰ دور در دقیقه با زمان فرآیند ۱ ساعت به دست آمد. مقدار بیشتر VCF در این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات بر روی آب سیب نشان دهنده‌ی پلاریزاسیون غلظتی کمتر و گرفتگی کمتر در فرآیند بوده که عملکرد خوب واحد غشایی سطح تراش را در شفاف‌سازی آب سیب ثابت می‌کند.

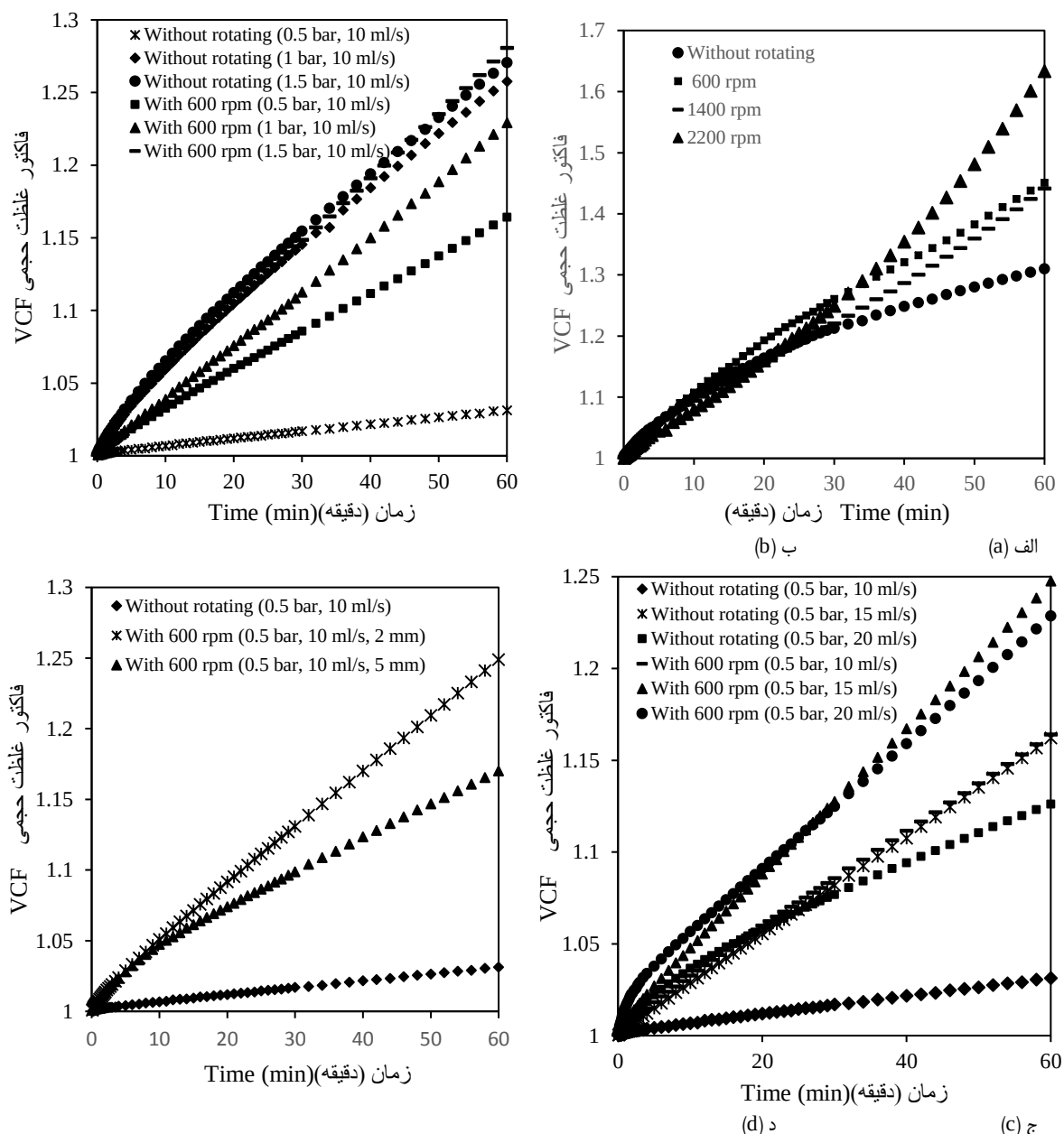
آنالیز مقاومت‌های گرفتگی

بررسی مقاومت‌های مختلف نشان داد که تمامی مقاومت‌ها در فرآیند UF با چرخش تیغه در مقایسه با شرایط بدون چرخش پایین‌تر بوده است (شکل ۴). مطالعه اثر بخشی فشار بر تغییرات مقاومت‌ها نشان داد که در شرایط بدون چرخش تیغه با FFR ثابت 10 ml s^{-1} مقاومت کل، مقاومت برگشت‌پذیر و مقاومت غیرقابل برگشت با افزایش TMP از ۰/۵ بار به ۱ بار، کاهش یافت. اما با افزایش TMP از ۱ بار به ۱/۵ بار، تمامی مقاومت‌های ذکر شده به همراه مقاومت کیک افزایش یافت. اما با اعمال چرخش تیغه به میزان ۶۰۰ دور در دقیقه در TMP ۰/۵ بار، مقاومت کل به اندازه ۷۱/۷۸٪ کاهش یافت.

گرفتگی غشایی کمتر در سرعت چرخش بالاتر می‌شود. مطالعات نشان داده است که شار تراوه در شفاف‌سازی آب میوه‌ها توسط سامانه UF تحت تأثیر VCF قرار می‌گیرد. VCF‌های بالا را می‌توان در آب میوه‌هایی با پالپ کمتر مانند آب سیب و آب انگور به راحتی بدست آورد. برای آب میوه‌هایی با پالپ بالا، مانند میوه‌های استوایی مقایسه VCF پایین‌تر است. بازده آب میوه بازیابی شده $(1 - \frac{1}{VCF})$ یک پارامتر اقتصادی در صنایع است (Cassano et al., 2018). مطالعه اخیر نشان داد که طراحی و ساخت ماژول‌های سطح تراش می‌تواند در افزایش VCF کمک شایانی بنماید.

بررسی اثر فشار (TMP) بر میزان اثر بخشی چرخش تیغه در سامانه سطح تراش بر راندمان فرایند نشان داد که در TMP پایین (۰/۵ بار) با سرعت چرخش ۶۰۰ دور در دقیقه تیغه‌ها، VCF بطور قابل توجهی بالاتر از حالت بدون چرخش در شرایط یکسان است. این تفاوت در فشارهای بالاتر مشاهده نشد (شکل ۳-ب). همچنین مطالعه اثر دبی جریان بر میزان اثر بخشی سامانه نشان داد که چرخش تیغه‌ها در سامانه طراحی شده در مواقعی که دبی جریان پایین باشد بیشتر است (شکل ۳-ج). دلیل این نتیجه را می‌توان در افزایش تلاطم جریان به واسطه دبی‌های بالای حجمی دانست که می‌تواند اثر بخشی چرخش تیغه‌ها در سامانه طراحی شده را کاهش دهد. با بررسی اثر فاصله لبه تیغه با سطح غشا مشاهده شد که کاهش این فاصله می‌تواند اثر بخشی آن در افزایش VCF را بهبود بخشد. به عبارت دیگر در سامانه‌هایی که فاصله لبه تیغه با سطح غشا کمتر است اثر بخشی چرخش تیغه بر راندمان سامانه بیشتر می‌شود. دلیل این مشاهده را می‌توان تمرکز تلاطم جریان ایجاد شده توسط تیغه در حجم کنترل محدودتر و البته نزدیکتر به لایه مرزی سطح غشا دانست (شکل ۳-د).

لو و همکاران (Lou et al., 2013) دریافتند در سرعت چرخشی ۲۰۰۰ و ۱۵۰۰ دور در دقیقه طی فرآیند UF آب کاسنی به کمک RDM، میزان VCF با اندازه منافذ افزایش یافت. در حالی که در شرایط ۵۰۰ دور در دقیقه تقریباً مستقل از غشا بود. آنها اظهار داشتند این پدیده را می‌توان با مکانیسم‌های گرفتگی در نرخ‌های برشی مختلف توضیح داد. بر این اساس در سرعت چرخش بالا، از آنجایی که لایه کیک ناچیز است شار تراوه تحت تأثیر نفوذپذیری غشا هست (اندازه منافذ، آب دوستی) در حالی که در سرعت چرخش پایین رسوبات مانند پکتین، پروتئین و مواد جامد معلق به راحتی بر روی غشا رسوب می‌کنند و در



شکل ۳- تأثیر پارامترهای مختلف بر فاکتور غلظت حجمی (VCF) در طی فرآیند فرایایش آب سیب به کمک سامانه سطح تراش: (الف) سرعت چرخش تیغه‌ها، (ب) فشار، (ج) سرعت جریان، (د) فاصله تیغه‌ها از سطح غشا

Fig. 3. Effect of different parameters on volumetric concentration factor (VCF) during UF-processing of apple juice with scraped-surface system; a: blade speed, b: TMP, c: FFR and d: blade distance from membrane surface

نتیجه ذرات بیشتری به سمت سطح غشا حرکت می‌کنند که باعث کاهش اثر بخشی تلاطم حاصل از چرخش تیغه و در نتیجه افزایش مقاومت‌های فوق می‌شود. این نتایج مطابق با نتایج نوربخش و همکاران (Nourbakhsh *et al.*, 2014)، حجت‌پناه و همکاران (Hojjatpanah *et al.*, 2011)، میرسعیدقازی و همکاران (Mirsaeedghazi *et al.*, 2010) بود.

همچنین مقاومت برگشت‌پذیر، مقاومت غیرقابل برگشت و همچنین مقاومت کیک به ترتیب ۸۱/۴۸، ۸۶/۳ و ۳۴/۸۷ درصد کاهش نشان دادند. لازم به ذکر است مقاومت کل، مقاومت کیک و مقاومت غیرقابل برگشت در TMP ۱/۵ بار به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از TMP ۰/۵ بار در حالت چرخش تیغه ۶۰۰ دور در دقیقه بود. دلیل این پدیده این است که با افزایش TMP نیروی محرکه بیشتر شده و در

بررسی شد. مطالعه اثر سرعت جریان بر میزان اثر بخشی سامانه نشان داد که اثر چرخش تیغه‌ها در سامانه طراحی شده در مواقعی که سرعت جریان پایین باشد بیشتر است. نتایج نشان داد که، با کاهش سرعت جریان، کارایی چرخش تیغه در کاهش مقاومت کل، مقاومت کیک، مقاومت برگشت‌پذیر و مقاومت برگشت‌ناپذیر افزایش می‌یابد. بنابر این بهترین عملکرد اثربخشی چرخش تیغه در سرعت جریان 10 ml s^{-1} به دست آمد. دلیل این نتیجه را می‌توان در افزایش تلاطم جریان به واسطه سرعت جریان‌های بالا دانست که می‌تواند اثربخشی چرخش تیغه در سامانه طراحی شده را کاهش دهد (شکل ۴-ب).

اثر FFR بر مقاومت کل نشان داد که در TMP ثابت (0.5 بار) در هر دو حالت با چرخش و بدون چرخش تیغه، ابتدا مقاومت کل با افزایش FFR تا 15 ml s^{-1} کاهش یافت، در حالی که با افزایش FFR از 15 ml s^{-1} به 20 ml s^{-1} مقاومت کل افزایش یافت (شکل ۴-ب). این ممکن است به این دلیل باشد که نیروهای مماسی قابل توجهی ذرات رسوب شده بر روی سطح غشا را جارو می‌کنند. این مطلب را میرسعیدقازی و همکاران (Mirsaeedghazi et al., 2010) و صالحی‌نیا و همکاران (Salehinia et al., 2021) در شفاف‌سازی غشایی آب انار گزارش کردند.

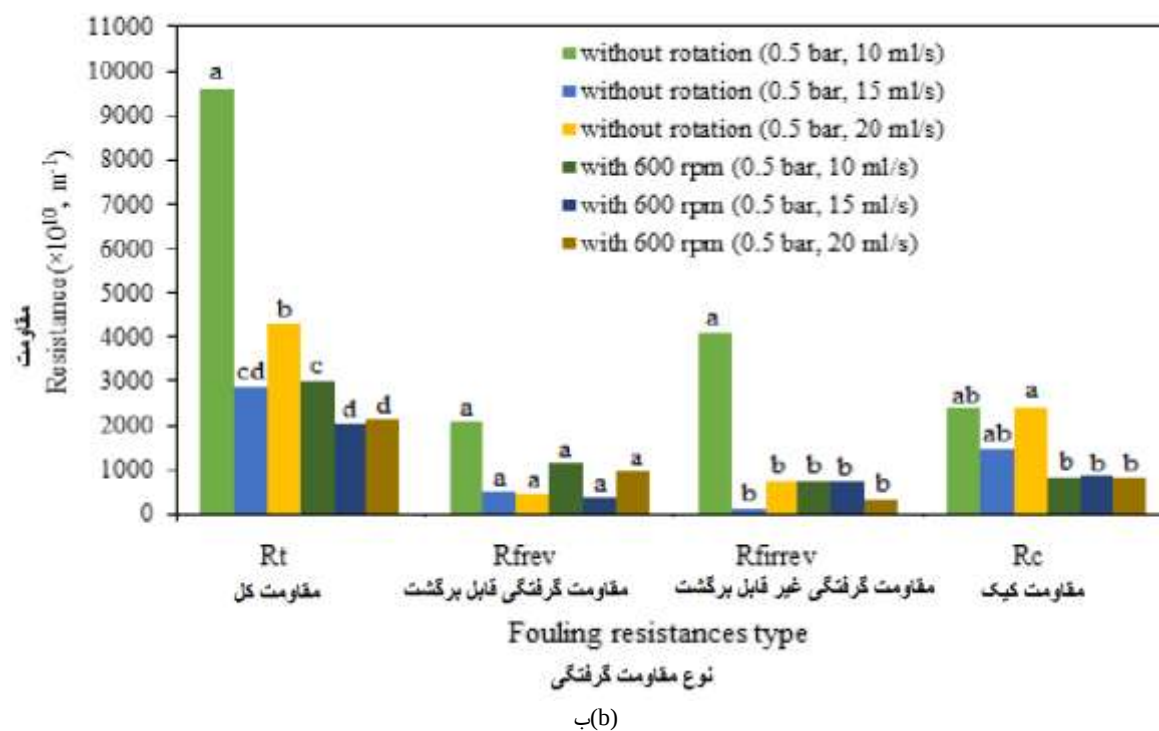
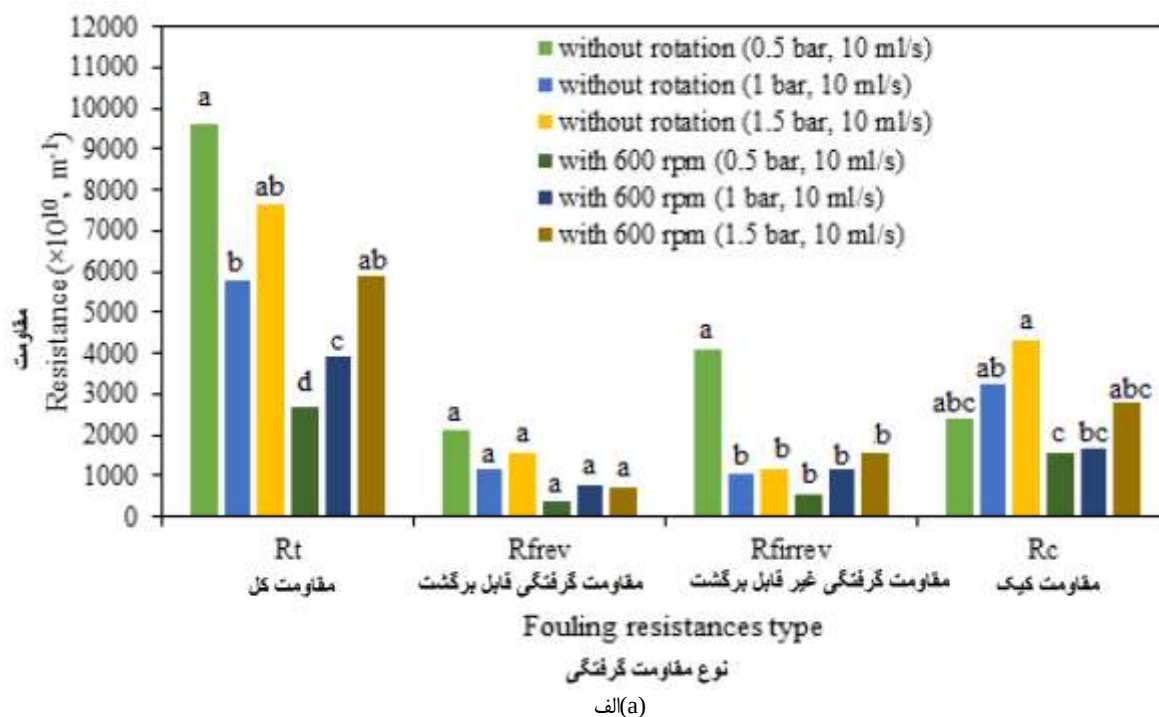
بررسی اثر سرعت چرخش تیغه در سامانه طراحی شده بر مقاومت‌های مختلف نشان داد که چرخش تیغه‌ها باعث کاهش مقاومت کل و اکثر مقاومت‌ها شده است اما افزایش سرعت چرخش تیغه تفاوت معنی‌داری در مقاومت کل نشان نداد (شکل ۴-ج). قاعدتاً رفتار مشابهی بر هر کدام از مقاومت‌ها حاکم بود. دلیل این امر این بود که در پایین‌ترین سرعت دوران تیغه‌ها کفایت اثر بخشی چرخش آن‌ها بر کاهش پلاریزاسیون غلظتی حاصل شد. لو و همکاران (Lou et al., 2013) گزارش کردند که افزایش سرعت چرخش دیسک در فرآیند RDM به کمک UF برای شفاف‌سازی آب کاسنی، منجر به افزایش شار تراوه شده و پلاریزاسیون و گرفتگی را کنترل کرد. آنها دریافتند که سرعت چرخش 1000 دور در دقیقه از نظر انرژی به صرفه بوده و برای کنترل رسوب لازم است ولی افزایش سرعت چرخش به 2000 دور در دقیقه باعث حذف لایه گرفتگی می‌شود.

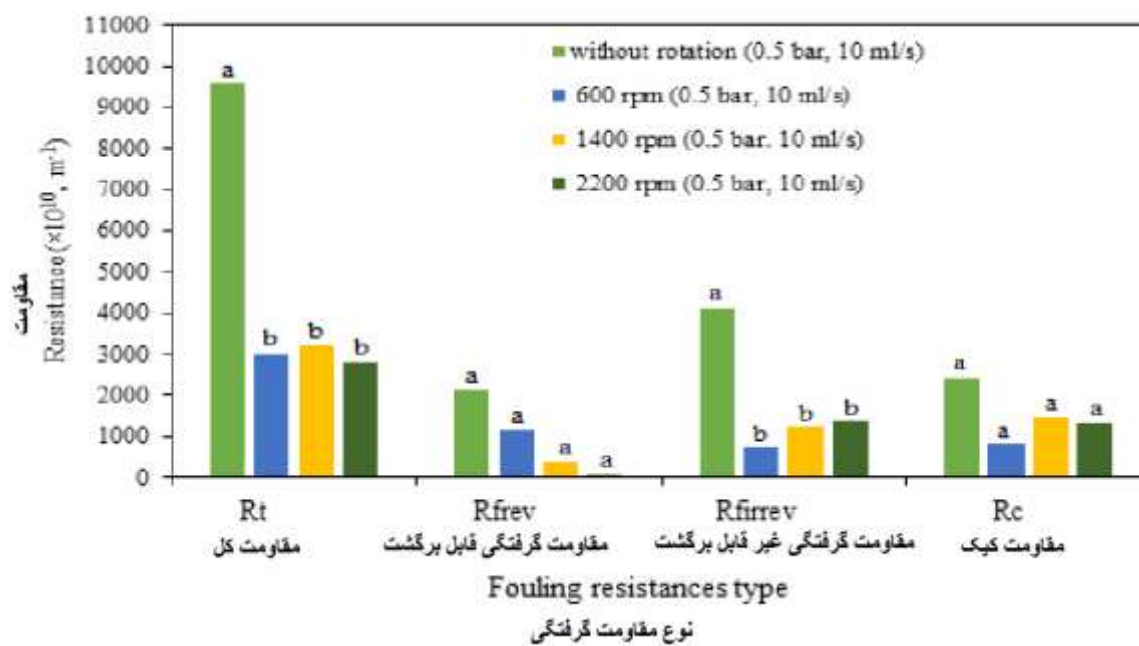
مطالعه اثر فاصله لبه تیغه تا سطح غشا نشان داد که با افزایش این فاصله مقاومت کیک دچار افزایش شد اما سایر مقاومت‌ها تغییر معنی‌داری را نشان ندادند. دلیل این امر تمرکز تنش حاصل از چرخش تیغه در حجم کنترل کوچکتری در فرایند با تیغه نزدیک‌تر به سطح غشا بود (شکل ۴-د).

نوربخش و همکاران (Nourbakhsh et al., 2014) اثرات TMP را بر مقاومت گرفتگی طی میکروفیلتراسیون آلوی قرمز و هندوانه ارزیابی کردند و متوجه شدند که مقاومت‌های کیک، برگشت‌پذیر و برگشت‌ناپذیر با افزایش TMP بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابند. در مطالعه‌ای دیگر، کاسانو و همکاران (Cassano et al., 2007) مشاهده کردند که سهم مقاومت برگشت‌پذیر در مقایسه با مقاومت غیرقابل برگشت در فرایلاش آب کیوی بسیار مهم‌تر بوده است. گولک و همکاران (Gulec et al., 2018) گزارش کردند که میزان مقاومت برگشت‌پذیر در شفاف‌سازی غشایی آب سیب توسط UF زیاد است. آنها بیان کردند که 86% از مقاومت کل به مقاومت برگشت‌پذیر مربوط بوده در حالی که 6% از مقاومت کل به مقاومت غیرقابل برگشت مربوط است که نشان دهنده میزان جذب کمتر رسوب‌ها در داخل منافذ غشا است.

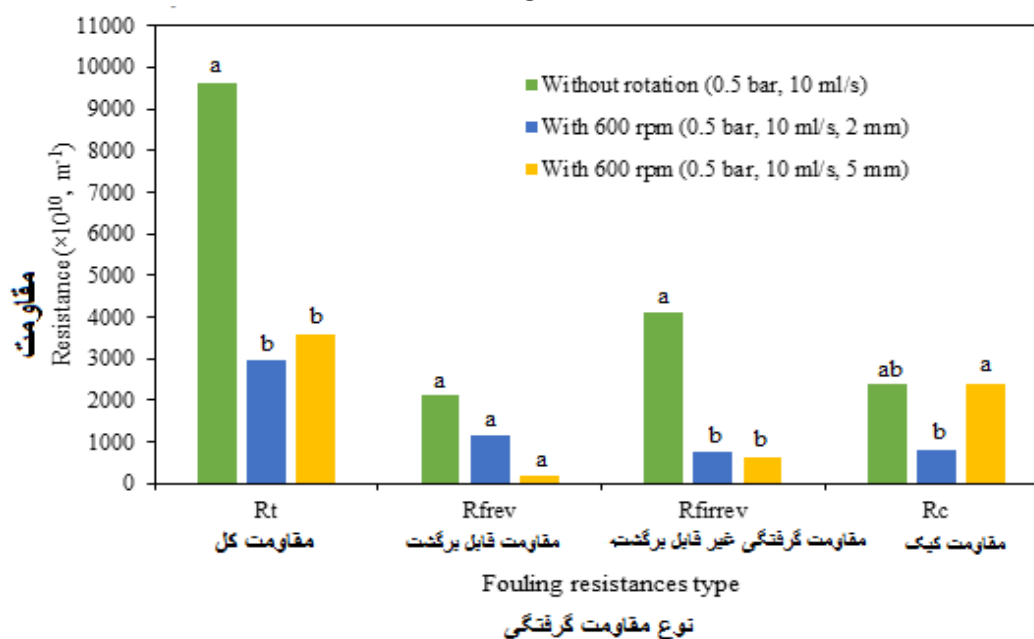
در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که بیشترین کاهش در مقاومت کل در سرعت چرخش تیغه‌ها 2200 دور در دقیقه به میزان $70/96\%$ و کمترین میزان کاهش در مقاومت کل در سرعت چرخش تیغه‌ها 1400 دور در دقیقه به میزان $66/66\%$ دیده شد. همچنین بیشترین کاهش در مقاومت برگشت‌پذیر در سرعت چرخش تیغه‌ها 2200 دور در دقیقه به میزان $98/8\%$ و کمترین کاهش در مقاومت برگشت‌پذیر در سرعت چرخش تیغه‌ها 600 دور در دقیقه به میزان 46% بود. بیشترین کاهش در مقاومت برگشت‌ناپذیر در سرعت چرخش تیغه‌ها 600 دور در دقیقه به میزان $81/69\%$ و کمترین میزان کاهش گرفتگی برگشت‌ناپذیر در سرعت چرخش تیغه‌ها 2200 دور در دقیقه به میزان $66/47\%$ بود. بیشترین کاهش در مقاومت کیک در سرعت چرخش تیغه‌ها 600 دور در دقیقه به میزان $68/86\%$ و کمترین کاهش در مقاومت کیک در سرعت چرخش تیغه‌ها 1400 دور در دقیقه به میزان $38/66\%$ بود (شکل ۴-ج). بطور خلاصه مقاومت کل با اعمال چرخش تیغه کاهش یافت. دلیل این امر می‌تواند پایداری بخشی از مقاومت برگشت‌پذیر در داخل دیوار منافذ و روی سطح غشا به دلیل نیروی اعمال شده توسط چرخش تیغه بر روی سطح غشا باشد. یافته‌های مطالعه حاضر نیز توسط گولک و همکاران (Gulec et al., 2018)، کاسانو و همکاران (Cassano et al., 2018)، میرسعیدقازی و همکاران (Mirsaeedghazi et al., 2010)، صالحی‌نیا و همکاران (Salehinia et al., 2021) در شفاف‌سازی غشایی آب سیب، پرتقال خونی و انار تأیید شد.

اثر سرعت جریان بر میزان اثربخشی چرخش تیغه‌ها، در سه سرعت جریان (10 ml s^{-1} ، 15 ml s^{-1} و 20 ml s^{-1} و فشار 0.5 بار) در دو حالت بدون چرخش تیغه و اعمال چرخش تیغه به میزان 600 دور در دقیقه





ج(c)



د(d)

شکل ۴- اثرات الف) فشار، ب) سرعت جریان، ج) سرعت چرخش تیغه، د) فاصله تیغه از سطح غشا بر مقاومت‌های گرفتگی مختلف در شفاف‌سازی غشایی آب سیب با استفاده از سامانه سطح تراش

Fig. 4. Effects of a: TMP, b: FFR, c: blade speed and d: blade distance from membrane surface on different fouling resistances during membrane clarification of apple juice with scraped surface unit

مکانیسم‌های غالب گرفتگی

به منظور بررسی مکانیسم‌های غالب گرفتگی در کل فرایند رابطه بین حجم تراوه (V) و زمان شفاف‌سازی (t) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در اکثر موارد منحنی t/V به V خطی‌تر از منحنی

t/V به t و $\ln(t)$ به V می‌باشد (جدول ۲). از این رو مکانیسم اصلی گرفتگی در فرایند آب سیب تشکیل لایه کیک می‌باشد. همچنین استفاده از تیغه چرخان با سرعت چرخش ۶۰۰ دور در دقیقه، مکانیسم غالب گرفتگی طی شفاف‌سازی غشایی آب سیب را تغییر چندانی نداد.

البته قابل ذکر است مقادیر R^2 مرتبط با همبستگی منحنی رسم شده با یک منحنی خطی در حالت چرخش تیغه‌ها با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه نسبت به حالت بدون چرخش تیغه کاهش یافت که این امر نشان دهنده کاهش شدت مکانیسم تشکیل کیک در گرفتگی است. مطالعه

نشان داد در سرعت چرخش تیغه بالاتر (۱۴۰۰ و ۲۲۰۰ دور در دقیقه) مکانیسم غالب گرفتگی از نوع استاندارد بود که نشان می‌دهد سرعت زیاد چرخش تیغه منجر به تلاطم بالای جریان و ممانعت از تشکیل کیک روی غشاء و نفوذ ذرات ریز به داخل غشاء شده است.

جدول ۲- رابطه بین حجم تراوه و زمان فرآیند برای تعیین مکانیسم غالب گرفتگی در فرآیندهای فرایالایش آب سیب با استفاده از سامانه سطح تراش

Table 2- Relation between permeate volume (v) and process time (t) to determine the dominant fouling mechanisms in scraped-surface membrane unit during UF processing of apple juice

Blade distance (mm) فاصله تیغه ها	TMP (bar) فشار	FFR (ml/s) سرعت جریان	Blade speed (rpm) میزان دور تیغه	R ² to fit each chart with linear line ضریب همبستگی			Type of fouling mechanism نوع مکانیسم گرفتگی
				t/v vs. v (cake formation)	t/v vs. t (standard pore blocking)	Ln(t) vs. v (intermediate pore blocking)	
2	0.5	10	No rotation بدون چرخش	0.929267	0.816267	0.876467	Cake formation تشکیل کیک
		15		0.8339	0.7527	0.8043	
		20		0.9966	0.8448	0.9489	
	1	10	600	0.9816	0.8184	0.929	Cake formation تشکیل کیک
	1.5			0.9862	0.8287	0.9316	
	0.5			0.83005	0.7686	0.7865	
	15	0.8862		0.7792	0.834	Standard pore blocking استاندارد	
	20	0.9198		0.814	0.8498		
	1	10	1400	0.7795	0.7539		0.7436
	1.5			0.946	0.8063	0.8832	
	0.5			0.3351	0.7107	0.3399	
			2200	0.6983	0.7392	0.6814	
5	0.5	10	600	0.9817	0.8362	0.919	Cake formation تشکیل کیک

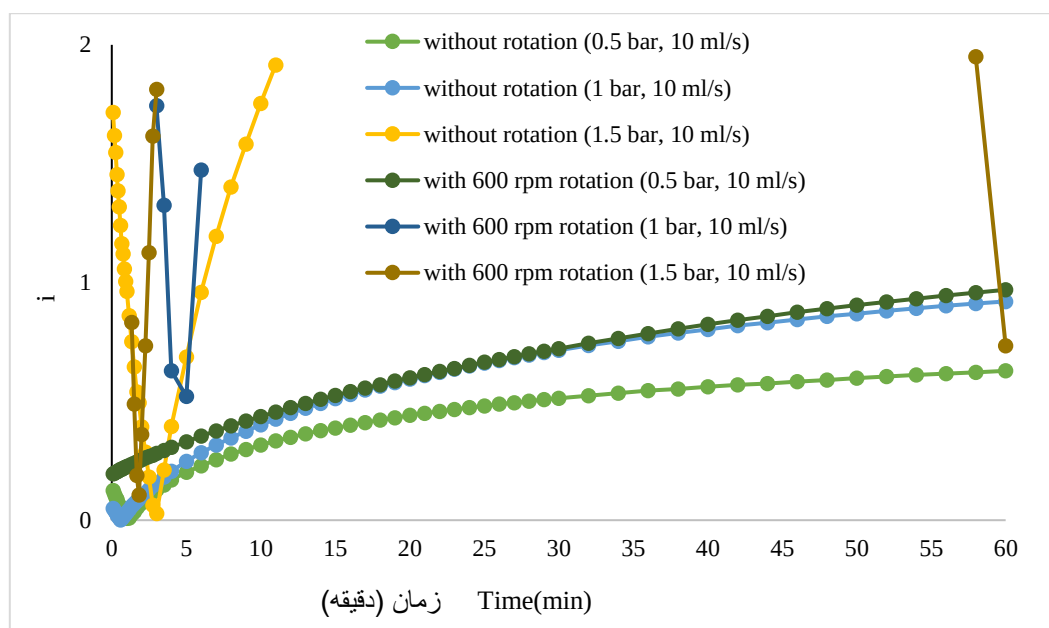
مطالعه اندیس بلوکه شدن

از آنجایی که کاهش سریع شار تراوه در طول فرایالایش توانایی کارخانه را در سطح تجاری در شفاف‌سازی آب میوه‌ها محدود می‌کند (Onsekizoglu, 2010)، باید تلاشی برای درک و مدل‌سازی مکانیسم کاهش شار انجام شود و بهبود عملکرد فرآیند باید به گونه‌ای باشد که بتوان آن را به لحاظ اقتصادی در خط تولید آب میوه پیاده‌سازی کرد. اندیس بلوکه شدن برای مطالعه نوع مکانیسم غالب گرفتگی در هر نقطه از فرآیند محاسبه شد. نتایج نشان داد که در فرایند بدون چرخش تیغه مکانیسم غالب بر فرایند در کل طول زمان آن مکانیسم تشکیل کیک است اما با شروع چرخش تیغه و بخصوص با افزایش سرعت چرخش آن در همان دقایق ابتدایی فرایند مکانیسم غالب گرفتگی از تشکیل کیک به سمت بلوکه شدن‌های میانی، استاندارد و کامل پیش می‌رود (شکل ۵ الف - د). این اتفاق می‌تواند به دلیل از بین بردن کیک روی غشاء توسط دوران تیغه و نفوذ ذرات آبمیوه به منافذ غشاء باشد. شرایط در فشارهای مختلف و فواصل متفاوت تیغه تا سطح غشاء تغییر نکرده و مکانیسم‌های گرفتگی رفتاری شبیه به آنچه در ابتدا

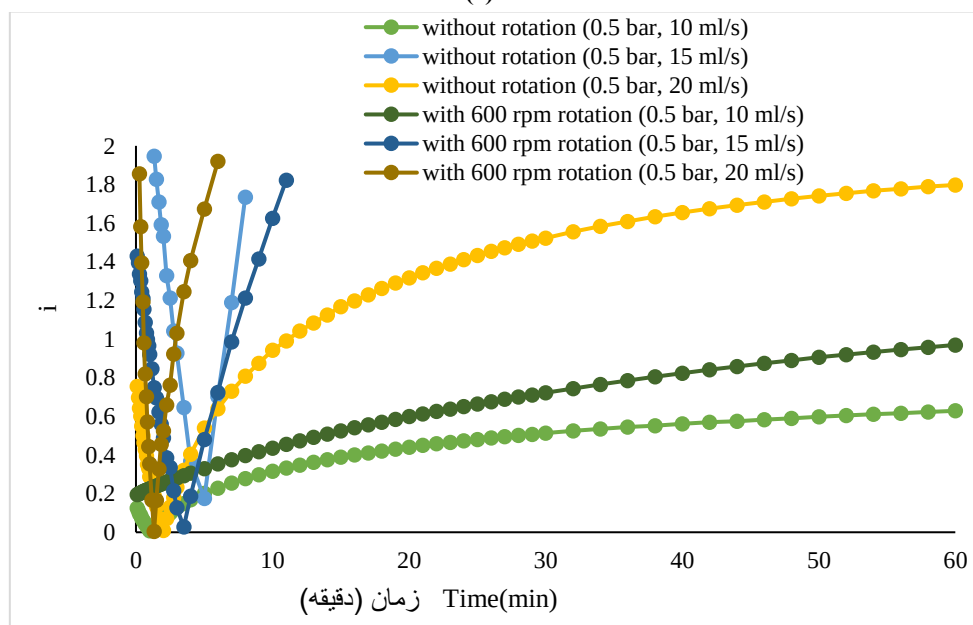
در نتیجه مکانیسم غالب گرفتگی در اکثر شرایط براساس مدل هرمیا تشکیل لایه کیک بود که مشابه نتایج بدست آمده توسط ژو و همکاران (Zhu et al., 2013) برای فرایالایش آب کاسنی به کمک RMD، وارما و سرکار (Verma & Sarkar, 2015) برای فرایالایش آب سیب، نوربخش و همکاران (Nourbakhsh et al., 2014) برای شفاف‌سازی آب آلو قرمز، داوولیورا و همکاران (de Oliveira et al., 2012) برای ریزپالایش آبمیوه پشن فروت، ناد و همکاران (Nadi et al., 2012) در فیلتراسیون آب پرتقال سانتریفیوژ شده و تحت تیمار آنزیمی قرار گرفته، رای و همکاران (Rai et al., 2007) در فرایالایش با جریان عرضی آب موسامبی پکتین‌زدایی شده، دباروس و همکاران (De Barros et al., 2003) طی فرایالایش آب آناناس پیش تیمار شده با آنزیم توسط غشاء فیبر توخالی PS، میرسعیدقازی و همکاران (Mirsaeedghazi et al., 2010) برای فرایالایش آب انار و علی‌اصغری اقدم و همکاران (Aliasghari Aghdam et al., 2015) طی شفاف‌سازی غشایی آب انار به کمک فراصوت بود.

از تشکیل لایه ضخیم کیک و به دنبال آن پیدایش سایر مکانیسم‌های گرفتگی است که البته شدت تلاطم حاصله به اندازه تلاطم حاصل از چرخش تیغه نبوده است در نتیجه رسیدن به زمان وقوع گرفتگی میانی، استاندارد و کامل با افزایش FFR کاهش می‌یابد که نشان دهنده کاهش ضخامت لایه کیک با افزایش FFR است (Hemmati *et al.*, 2021; Conidi *et al.*, 2020; Aliasghari Aghdam *et al.*, 2015).

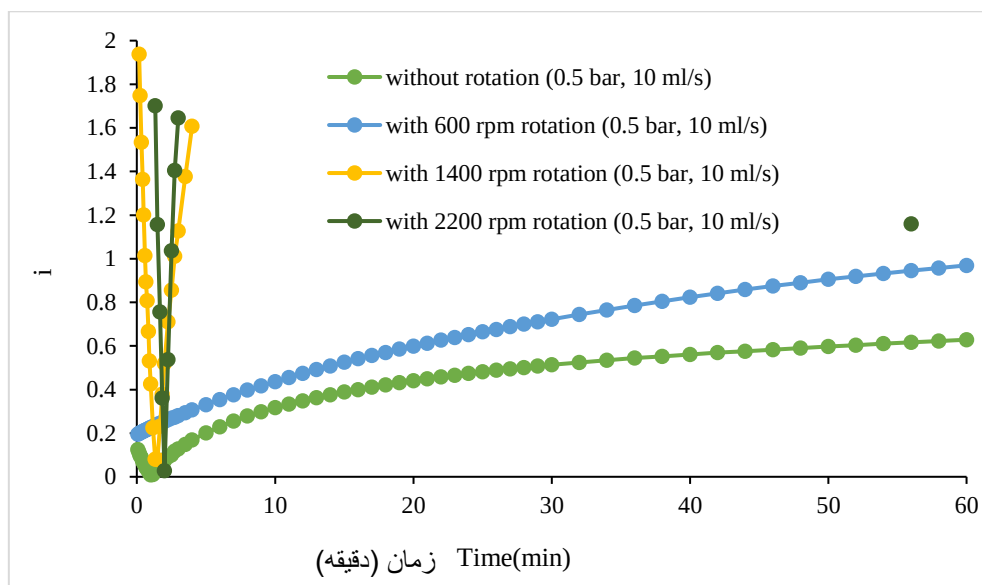
ذکر شد دارند. اما در سرعت جریان‌های بالا مکانیسم گرفتگی حتی در حالت بدون چرخش تیغه به سمت مکانیسم‌های بلوکه شدن میانی، استاندارد و کامل پیش می‌رود اما با این تفاوت که پیدایش بلوکه شدن کامل در حالت بدون چرخش تیغه و در سرعت جریان بالا در اواخر فرایند اتفاق می‌افتد اما در حالت با چرخش خیلی سریعتر و در دقایق اولیه فرایند بلوکه شدن کامل حادث خواهد شد (شکل ۵-ب). دلیل این امر اثر بخشی سرعت جریان بالا در تراشیدن سطح غشا و ممانعت



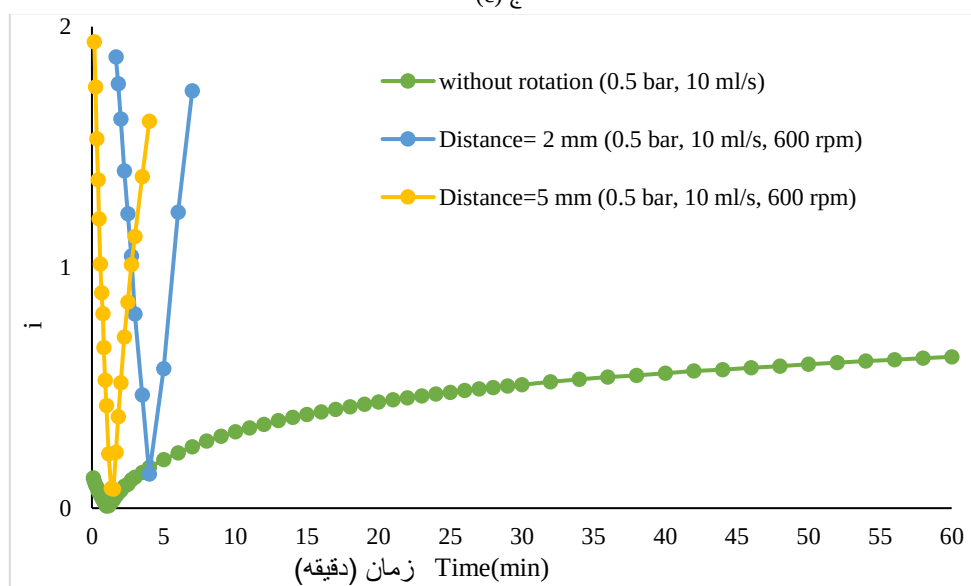
(a) الف



(b) ب



(ج)



(د)

شکل ۵- اثرات الف) فشار، ب) سرعت جریان، ج) سرعت دوران تیغه، د) فاصله تیغه از سطح غشا بر شاخص گرفتگی (i) در فرایند فراپالایش آب سیب به کمک سامانه سطح تراش

Fig. 5- Effects of a: TMP, b: FFR, c: blade speed and d: blade distance from membrane surface on fouling index (i) during ultrafiltration of apple juice with scraped surface unit

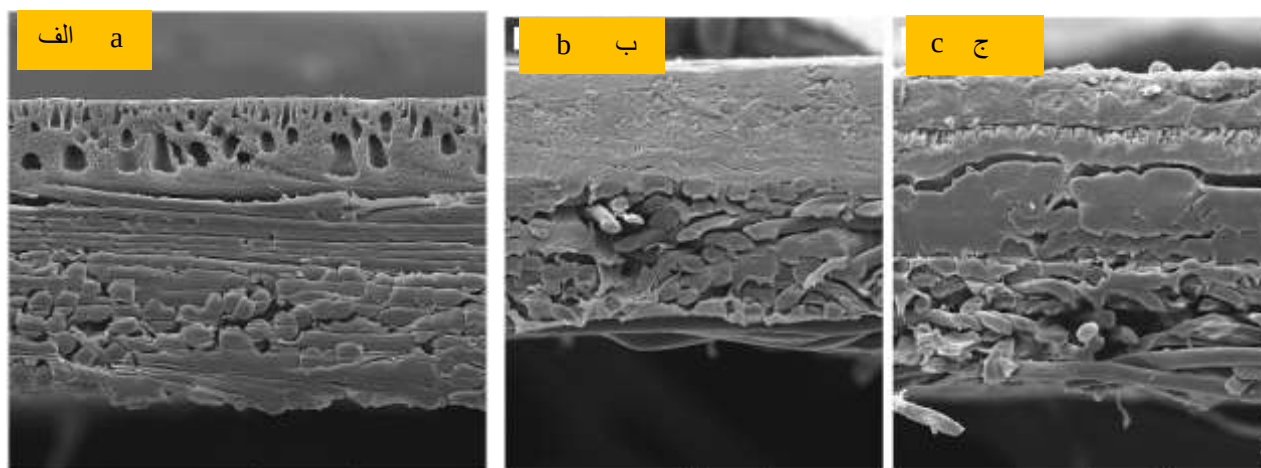
مطالعات ریزساختاری غشا

برای بررسی ریزساختاری گرفتگی غشا، سطح مقطع عرضی غشاهای تازه و فرایند شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با بزرگنمایی ۶۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۶-۲ سطح مقطع غشاء تازه را قبل از فرایند نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود تمام منافذ باز هستند و هیچ لایه اضافی روی سطح غشا دیده نمی‌شود. پس از فرایند شفاف‌سازی غشایی آب سیب، سطح مقطع آن

مجدداً مورد بررسی قرار گرفت که تصاویر آن در شکل ۶-۲ و شکل ۶-۳ به ترتیب برای در حالت با چرخش و بدون چرخش تیغه قابل مشاهده است. همانطور که مشاهده می‌شود، در حالت بدون چرخش تیغه، تجمع ذرات کیک بر روی سطح غشاء ضخیم‌تر و متراکم‌تر از حالت با چرخش تیغه است. از طرف دیگر، ضخامت کم لایه کیک تشکیل شده بر روی سطح غشاء در فرایند با چرخش تیغه به دلیل تلاطم‌های حاصل از تیغه چرخان است. این مشاهدات نتایج حاصل از

زبری سطح غشا را با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی اندازه‌گیری کردند و نتیجه گرفتند که غشاهایی با سطح آبگریزتر و زبرتر پتانسیل گرفتگی بالاتری نسبت به غشاهایی با سطح آبدوست و صاف برخوردار بودند.

مدل هرمیا در بخش‌های قبل را تایید می‌کند. منافذ مسدود شده و لایه ای از ذرات رسوب کرده توسط وارچوک و همکاران (Warczok et al., 2004)، با استفاده از SEM طی فرایند نانوفیلتراسیون در طول تغلیظ آب سیب مشاهده شد. گولک و همکاران (Gulec et al., 2017) گرفتگی غشایی را در فرایلاش آب سیب تجزیه و تحلیل کردند. آنها



شکل ۶- برش عرضی غشاء با بزرگنمایی ۶۰۰ الف): غشای تازه قبل از فرآیند، ب) غشا بعد از فرآیند UF با چرخش تیغه ج) غشا بعد از فرآیند UF بدون چرخش تیغه

Fig. 6- Cross-sectional view of the membrane (a: before the process, b: after the process in rotating blade mode and c: after the process in non-rotation mode)

نتیجه‌گیری

کیک به بلوکه شدن‌های میانی، استاندارد و کامل تغییر می‌کند. همچنین مطالعات مقاومت‌های مختلف نشان داد که مقاومت کل و مقاومت کیک با چرخش تیغه کاهش یافت. در نتیجه، شرایط TMP/۵۰ بار، FFR ۱۰ میلی‌لیتر بر ثانیه، سرعت چرخش تیغه ۶۰۰ دور در دقیقه و فاصله تیغه ۲ میلی‌متر از سطح غشا به‌عنوان بهترین شرایط از لحاظ عملکرد گرفتگی غشایی و راندمان فرایند برای فرایلاش آب سیب با استفاده از سامانه سطح تراش معرفی شد.

با توجه به نتایج حاصله چرخش تیغه تأثیر مثبت و معناداری بر افزایش VCF فرایند داشته است. مکانیسم گرفتگی غالب در فرایند فرایلاش آب سیب به کمک سامانه سطح تراش در اکثر شرایط تشکیل لایه کیک بود، اما با افزایش سرعت چرخش تیغه‌ها و به دلیل ایجاد تلاطم در جریان و در نتیجه کاهش ضخامت لایه کیک در سطح غشا و نفوذ ذرات ریز به داخل منافذ آن، نوع گرفتگی از تشکیل لایه

منابع

1. Aguiar, I.B., Miranda, N.G., Gomes, F.S., Santos, M.C., de GC Freitas, D., Tonon, R.V., & Cabral, L.M. (2012). Physicochemical and sensory properties of apple juice concentrated by reverse osmosis and osmotic evaporation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 137-142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.05.003>
2. Ahmad, S., Marson, G.V., Zeb, W., Rehman, W.U., Younas, M., Farrukh, S., & Rezakazemi, M. (2020). Mass transfer modelling of hollow fiber membrane contactor for apple juice concentration using osmotic membrane distillation. *Separation and Purification Technology*, 250, 117209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117209>
3. Aliasghari Aghdam, M., Mirsaedghazi, H., Aboonajmi, M., & Kianmehr, M.H. (2015). Effect of ultrasound on different mechanisms of fouling during membrane clarification of pomegranate juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 30, 127-131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.05.008>
4. Bahçeci, K.S. (2012). Effects of pretreatment and various operating parameters on permeate flux and quality during ultrafiltration of apple juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(2), 315-324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02841.x>

5. Bhattacharjee, C., Saxena, V.K., & Dutta, S. (2017a). Fruit juice processing using membrane technology: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 136–153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.002>
6. Bhattacharjee, C., Saxena, V.K., & Dutta, S. (2017b). Watermelon juice concentration using ultrafiltration: Analysis of sugar and ascorbic acid. *Food Science and Technology International*, 23(7), 637–645. <https://doi.org/10.1177/1082013217714672>
7. Cai, M., Xie, C., Lv, Y., Yang, K., & Sun, P. (2020). Changes in physicochemical profiles and quality of apple juice treated by ultrafiltration and during its storage. *Food Science & Nutrition*, 8(6), 2913–2919. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.1593>
8. Candrawinata, V.I., Golding, J.B., Roach, P.D., & Stathopoulos, C.E. (2013). From apple to juice—The fate of polyphenolic compounds. *Food Reviews International*, 29(3), 276–293. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.790049>
9. Cassano, A., Conidi, C., & Drioli, E. (2018). Membrane-based operations and integrated membrane systems in fruit juice processing:, in: Drioli, E., Giorno, L., Macedonio, F. (Eds.), De Gruyter, pp. 255–288. <https://doi.org/doi:10.1515/9783110281392-008>
10. Cassano, A., Donato, L., & Drioli, E. (2007). Ultrafiltration of kiwifruit juice: Operating parameters, juice quality and membrane fouling. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 613–621. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.020>
11. Castro-Muñoz, R. (2019). Separation, fractionation and concentration of high-added-value compounds from agro-food by-products through membrane-based technologies, in: Ferranti, P., Berry, E.M., Anderson, J. R. B. T.-E. of F. S. and S. (Eds.), . Elsevier, Oxford, pp. 465–476. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22282-8>
12. Castro-Muñoz, R., Boczkaj, G., Gontarek, E., Cassano, A., & Fila, V. (2020). Membrane technologies assisting plant-based and agro-food by-products processing: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 219–232. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.003>
13. Castro-Muñoz, R., & Fila, V. (2018). Membrane-based technologies as an emerging tool for separating high-added-value compounds from natural products. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 8–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.017>
14. Cheng, M., Xie, X., Schmitz, P., & Fillaudeau, L. (2021). Extensive review about industrial and laboratory dynamic filtration modules: Scientific production, configurations and performances. *Seperation and Purification Technology*, 265, 118293. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118293>
15. Conidi, C., Castro-Muñoz, R., & Cassano, A. (2020). Membrane-based operations in the fruit juice processing industry: A Review. *Beverages*, 6(1), 18. <https://doi.org/10.3390/beverages6010018>
16. De Barros, S.T.D., Andrade, C.M.G., Mendes, E.S., & Peres, L. (2003). Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 215(1-2), 13–224. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(02\)00615-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0376-7388(02)00615-4)
17. de Bruijn, J., & Bórquez, R. (2006). Analysis of the fouling mechanisms during cross-flow ultrafiltration of apple juice. *LWT-Food Science and Technology*, 39(8), 861–871. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.06.014>
18. de Oliveira, R.C., Docê, R.C., & de Barros, S.T.D. (2012). Clarification of passion fruit juice by microfiltration: Analyses of operating parameters, study of membrane fouling and juice quality. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 432–439. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.021>
19. Dornier, M., Belleville, M.P., & Vaillant, F. (2018). Membrane technologies for fruit juice processing. In *Fruit preservation* (pp.211-248). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3311-2_8
20. Echavarría, A.P., Falguera, V., Torras, C., Berdún, C., Pagán, J., & Ibarz, A. (2012). Ultrafiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of fruit juices at pilot plant scale. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 189–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.008>
21. Echavarría, A.P., Torras, C., Pagán, J., & Ibarz, A. (2011). Fruit juice processing and membrane technology application. *Food Engineering. Reviews*, 3(3), 136–158. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9042-8>
22. Fao, I.F.A.D., & UNICEF, W. (2017). The state of food security and nutrition in the world. *Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
23. Fuenmayor, C.A., Lemma, S.M., Mannino, S., Mimmo, T., & Scampicchio, M. (2014). Filtration of apple juice by nylon nanofibrous membranes. *Journal of Food Engineering*, 122, 110–116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.038>
24. Fukumoto, L.R., Delaquis, P., & Girard, B. (1998). Microfiltration and Ultrafiltration ceramic membranes for apple juice clarification. *Journal of Food Science*, 63(5), 845–850. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb17912.x>

25. Gökmen, V., & Çetinkaya, Ö. (2007). Effect of pretreatment with gelatin and bentonite on permeate flux and fouling layer resistance during apple juice ultrafiltration. *Journal of food engineering*, 80(1), 300–305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.04.060>
26. Gulec, H.A., Bagci, P.O., & Bagci, U. (2017). Clarification of apple juice using polymeric ultrafiltration membranes: A comparative evaluation of membrane fouling and juice quality. *Food and Bioprocess Technology*, 10(5), 875–885. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1871-x>
27. Gulec, H.A., Bagci, P.O., & Bagci, U. (2018). Performance enhancement of ultrafiltration in apple juice clarification via low-pressure oxygen plasma: A comparative evaluation versus pre-flocculation treatment. *LWT*, 91, 511–517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.082>
28. He, Y., Ji, Z., & Li, S. (2007). Effective clarification of apple juice using membrane filtration without enzyme and pasteurization pretreatment. *Separation and Purification Technology*, 57(2), 366–373. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.04.025>
29. Hemmati, A., Mirsaeedghazi, H., & Aboonajmi, M. (2021). The effect of ultrasound treatment on the efficiency of membrane clarification of carrot juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1), e15001. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.15001>
30. Hermia, J. (1982). Constant pressure blocking filtration laws: application to power-law non-Newtonian fluids. *Chemical Engineering*, 60(3), 183–187.
31. Hojjatpanah, G., Emam-Djomeh, Z., Ashtari, A.K., Mirsaeedghazi, H., & Omid, M. (2011). Evaluation of the fouling phenomenon in the membrane clarification of black mulberry juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(7), 1538–1544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02651.x>
32. Ilame, S.A., & Singh, S. (2015). Application of membrane separation in fruit and vegetable juice processing: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(7), 964–987. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.679979>
33. Khanali, M., Kokei, D., Aghbashlo, M., Nasab, F.K., Hosseinzadeh-Bandbafha, H., & Tabatabaei, M. (2020). Energy flow modeling and life cycle assessment of apple juice production: Recommendations for renewable energies implementation and climate change mitigation. *Journal of Cleaner Production*, 246, 118997. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118997>
34. Laurio, M.V.O., Yenkie, K.M., & Slater, C.S. (2021). Optimization of vibratory nanofiltration for sustainable coffee extract concentration via response surface methodology. *Separation Science and Technology*, 1–19. <https://doi.org/10.1080/01496395.2021.1879858>
35. Lu, C., Bao, Y., & Huang, J.Y. (2021). Fouling in membrane filtration for juice processing. *Current Opinion in Food Science*, 42, 76–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.05.004>
36. Luo, J., Zhu, Z., Ding, L., Bals, O., Wan, Y., Jaffrin, M.Y., & Vorobiev, E. (2013). Flux behavior in clarification of chicory juice by high-shear membrane filtration: evidence for threshold flux. *Journal of Membrane Science*, 435, 120–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.01.057>
37. Massini, L., Rico, D., & Martin-Diana, A.B. (2018). Chapter 4- Quality attributes of apple juice: Role and effect of phenolic compounds. In *Fruit Juices* (pp. 45–47). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00004-7>
38. Mirsaeedghazi, H., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S.M., Aroujalian, A., & Navidbakhsh, M. (2010). Clarification of pomegranate juice by microfiltration with PVDF membranes. *Desalination*, 264(3), 243–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.03.031>
39. Nandi, B.K., Das, B., & Uppaluri, R. (2012). Clarification of orange juice using ceramic membrane and evaluation of fouling mechanism. *Journal of Food Process Engineering*, 35(3), 403–423. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00597.x>
40. Nourbakhsh, H., Emam-Djomeh, Z., Mirsaeedghazi, H., Omid, M., & Moieni, S. (2014). Study of different fouling mechanisms during membrane clarification of red plum juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(1), 58–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.12274>
41. Onsekizoglu, P., Bahceci, K.S., & Acar, M.J. (2010). Clarification and the concentration of apple juice using membrane processes: A comparative quality assessment. *Journal of Membrane Science*, 352(1–2), 160–165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.02.004>
42. Rai, P., Majumdar, G.C., Gupta, S.D., & De, S. (2007). Effect of various pretreatment methods on permeate flux and quality during ultrafiltration of mosambi juice. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 561–568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.10.024>
43. Salehinia, S., Mirsaeedghazi, H., & Khashehchi, M. (2021). The effect of laser on the efficiency of membrane clarification of pomegranate juice. *Journal of Food Science and Technology*, 58(5), 1682–1692. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04678-x>

44. Sarkar, B. (2015). Enhanced cross-flow ultrafiltration of apple juice using electric field. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1372–1384. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.12356>
45. Sarlaki, E., Paghaleh, A.S., Kianmehr, M.H., & Vakilian, K.A. (2020). Chemical, spectral and morphological characterization of humic acids extracted and membrane purified from lignite. *Chemistry and Chemical Engineering*, 14(3), 353–361. <https://doi.org/10.23939/chcht14.03.353>
46. Szerencsés, S.G., Beszédes, S., László, Z., Veréb, G., Szalay, D., Hovorkáné Horváth, Z., Hodúr, C., Rákhely, G., & Kertész, S. (2021). Assessment of vibration amplitude and transmembrane pressure on vibratory shear enhanced membrane filtration for treating dairy wastewater. *Acta Alimentaria*, 50(1), 42–53. <https://doi.org/10.1556/066.2020.00123>
47. Verma, S.P., & Sarkar, B. (2015). Analysis of flux decline during ultrafiltration of apple juice in a batch cell. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 147–157. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.03.002>
48. Vladislavljević, G.T., Vukosavljević, P., & Bukvić, B. (2003). Permeate flux and fouling resistance in ultrafiltration of depectinized apple juice using ceramic membranes. *Journal of Food Engineering*, 60(3), 241–247. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00044-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00044-X)
49. Warczok, J., Ferrando, M., López, F., & Güell, C. (2004). Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressures. *Journal of Food Engineering*, 63(1), 63–70. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00283-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00283-8)
50. Yazdanshenas, M., Tabatabaenezhad, A.R., Roostaazad, R., & Khoshfetrat, A.B. (2005). Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration. *Separation and Purification Technology*, 47(1-2), 52–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.06.004>
51. Zarouk, S., Mirsaedghazi, H., & Massah, J. (2020). The effect of magnetic field on efficiency and fouling mechanisms during membrane clarification of pomegranate juice. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering(IJCCE)*. <https://doi.org/10.30492/ijcce.2020.123797.4057>
52. Zhang, W., Ding, L., Grimi, N., Jaffrin, M.Y., & Tang, B. (2017). Application of UF-RDM (Ultrafiltration Rotating Disk Membrane) module for separation and concentration of leaf protein from alfalfa juice: Optimization of operation conditions. *Separation and Purification Technology*, 175, 365–375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.11.059>
53. Zhao, L., Wang, Y., Qiu, D., & Liao, X. (2014). Effect of ultrafiltration combined with high-pressure processing on safety and quality features of fresh apple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 7(11), 3246–3258. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1307-9>
54. Zhu, Z., Ladeg, S., Ding, L., Bals, O., Moulai-Mostefa, N., Jaffrin, M.Y., & Vorobiev, E. (2014). Study of rotating disk assisted dead-end filtration of chicory juice and its performance optimization. *Industrial Crops and Products*, 53, 154–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.030>
55. Zhu, Z., Luo, J., Ding, L., Bals, O., Jaffrin, M.Y., & Vorobiev, E. (2013). Chicory juice clarification by membrane filtration using rotating disk module. *Journal of Food Engineering*, 115(2), 264–271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.028>
56. Zhu, Z., Mhemdi, H., Zhang, W., Ding, L., Bals, O., Jaffrin, M.Y., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2016). Rotating disk-assisted cross-flow ultrafiltration of sugar beet juice. *Food and Bioprocess Technology*, 9(3), 493–500. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1644-3>



Investigating of Tomato Pastes Microbial Contamination in Iran and Isolation and Identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by PCR Method

M. Atharinia¹*, N. Zonourian², S. Davarzani³

1 and 3- Faculty Member and Expert of Food Microbiology, Microbiology and Biology Research Group, Food Technology and Agricultural Products Research Center, Standard Research Institute, Karaj, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: atharinia_m@standard.ac.ir)

2- Kermanshah Standard General Office, Kermanshah, Iran

How to cite this article:

Received: 2022.12.11
Revised: 2023.02.06
Accepted: 2023.02.12
Available Online: 2023.02.19

Atharinia, M., Zonourian, N., & Davarzani, S. (2023). Investigating of tomato pastes microbial contamination in Iran and Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by PCR method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5), 745-755. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79840.1222>

Introduction

Tomato paste is one of the processed tomato products that has a long shelf life and is used as an important food ingredient all over the world. According to global statistics, Iran is among the top ten producers of tomato paste in the world, Iran ranks fourth to fifth in the world in the field of aseptic paste production. *Alicyclobacillus* bacteria are considered as a risk for pasteurized acidic food industries. These bacteria enter the product through soil-contaminated fruits, production equipment of the factories and finally produce metabolites such as guaiacol, causing an unpleasant taste in the product.

Materials and Methods

In order to investigate the microbial contamination of canned tomato paste in the country, 46 samples of canned tomato paste in the amount of 184 cans of 800 grams were purchased from the market. Regarding the purchase of samples from the market, we tried to buy a different production date and production series for each sample (approximately 4 cans for each brand from each production series). The purchased samples were sent to the Microbiology Department of the Standard Research Institute laboratory for microbiology tests. At the same time, the culture media of thermophilic bacteria (Orange Serum Agar, Thermoacidurans Agar from 4 available brands) were tested for performance control. The canned tomato paste samples were incubated at $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 14 days and $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 7 days.

Results and Discussion

The contents of both examined samples were tested separately for thermophilic bacteria, mesophilic bacteria, mold and yeast. Out of the 46 samples prepared with different production dates and production series, which were 46 cans of tomato paste, 28 samples were positive in terms of contamination with thermophilic bacteria. According to the number of contaminated samples, it was found that 60.86% of the samples were contaminated. Colonies grown on Thermoacidurans Agar medium were examined morphologically. For further investigations, gram staining was performed. All the stained colonies morphologically showed the form of gram-positive rod-shaped bacilli. Biochemical tests including catalase and oxidase were performed to identify *Alicyclobacillus* species. All the grown colonies were catalase positive and oxidase negative. The final identification of the species was done by performing molecular tests based on specific primers designed from *Alicyclobacillus* gene. These tests were performed in three stages: genomic DNA



extraction, polymerase chain reaction and electrophoresis. Using the PCR method, the grown colonies were analyzed for two types of bacteria, *Alicyclobacillus acidocaldarius* and *Bacillus coagulans*. According to the results obtained from sequencing with designed primers in the NCBI database, it showed 100% similarity with the registered sequences, which are all different strains of the *Alicyclobacillus acidocaldarius* species. None of the colonies were detected as *Bacillus coagulans* species. Since *Alicyclobacillus acidocaldarius* was isolated from soil for the first time, the presence of these bacteria in the product indicates the contamination of raw materials with soil.

Conclusion

In this research, the presence of *Alicyclobacillus* bacteria in canned tomato paste was confirmed. Due to the high heat resistance of this bacteria, there is a possibility of the presence of *Alicyclobacillus* in the all stages of tomato paste production, which have entered the product through the soil, and $95^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ pasteurization temperature in 30 minutes is not effective in removing this bacteria completely. Most acidophilus thermophilic bacteria, such as *Alicyclobacillus* family, are not pathogenic bacteria. Their presence in food may make the food taste bad or smelly, but it does not pose a risk to the health of the consumer. Therefore, in order to reduce the risk of spoilage and to prevent the growth of bacterial spores in the product, it is essential not to expose the product to high temperatures for a long time. It is also necessary to perform rapid cooling after heat treatment and keep the product at a temperature below 30°C .

Acknowledgement

This article is the result of a common research project of Microbiology and Biology Research Group of Standard Research Institute and Kermanshah Standard Regional Research Group. We hereby thank and appreciate the cooperation of the microbiology research group of the Standard Research Institute and the Kermanshah General Directorate of Standards. We are also very grateful to Rogin Talk Company as the employer of this project.

Keywords: *Alicyclobacillus acidocaldarius*, PCR, Thermophilic bacteria, Tomato paste

مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲، ص. ۷۴۵-۷۵۵

بررسی آلودگی میکروبی کنسروهای رب گوجه‌فرنگی در ایران و جداسازی و شناسایی

Alicyclobacillus acidocaldarius به روش PCR

معصومه اطهری نیا^{۱*} - نسرين ذوالنوریان^۲ - ساره داورزنی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۳

چکیده

رب گوجه‌فرنگی یکی از فرآورده‌های فراوری شده گوجه‌فرنگی است که ماندگاری طولانی دارد و به‌عنوان یک ماده غذایی مهم در سراسر جهان استفاده می‌شود. بر اساس آمارهای جهانی، ایران جزو ده تولیدکننده برتر رب گوجه‌فرنگی در جهان است، ایران در زمینه تولید رب گوجه‌فرنگی در رتبه چهارم تا پنجم جهان قرار دارد. باکتری *Alicyclobacillus* به‌عنوان یک خطر برای صنایع غذایی پاستوریزه اسیدی در نظر گرفته می‌شود. این باکتری‌ها از طریق میوه‌های آلوده به خاک، تجهیزات تولید کارخانه‌ها وارد محصول شده و در نهایت متابولیت‌هایی مانند گایاکول تولید می‌کند و باعث ایجاد طعم نامطبوع در محصول می‌شود. به‌منظور بررسی آلودگی میکروبی کنسروهای رب گوجه‌فرنگی در کشور، ۴۶ نمونه کنسرو رب گوجه‌فرنگی به میزان ۱۸۴ قوطی ۸۰۰ گرمی از بازار خریداری شد. در خصوص خرید نمونه از بازار، سعی شد برای هر نمونه تاریخ تولید و سری ساخت متفاوتی خریداری شود (۴ قوطی کنسرو برای هر برند از هر سری تولید). نمونه‌های خریداری شده برای انجام آزمایش‌های مربوطه به آزمایشگاه گروه میکروبیولوژی پژوهشگاه استاندارد ارسال شد. هم‌زمان، محیط‌کشت‌های TAA، OSA برای کنترل عملکرد مورد آزمون قرار گرفتند. نمونه‌های کنسرو رب گوجه‌فرنگی در دمای $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۱۴ روز و دمای $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند. محتویات هر دو نمونه آزمون به‌طور جداگانه برای باکتری‌های ترموفیل، باکتری‌های مزوفیل، کپک و مخمر مورد آزمون قرار گرفتند. از ۴۶ نمونه تهیه شده با تاریخ‌های و سری‌های ساخت متفاوت، ۲۸ نمونه از نظر آلودگی به باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل مثبت بودند. با توجه به تعداد نمونه‌های آلوده مشخص شد که ۶۰٫۸۶ درصد از نمونه‌ها آلوده با باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل بودند. کلنی‌های رشدیافته روی محیط کشت TAA از نظر مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی‌های بیشتر رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. تمام کلنی‌های رنگ‌آمیزی شده از نظر مورفولوژیکی شکل باسیل‌های میله‌ای شکل گرم مثبت را نشان دادند. شناسایی گونه‌های *Alicyclobacillus* بوسیله آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز و اکسیداز انجام گرفت. تمام کلنی‌های رشد یافته کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند. شناسایی نهایی گونه با انجام آزمون‌های مولکولی بر اساس آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از ژن *Alicyclobacillus* انجام شد. این آزمون‌ها در سه مرحله استخراج DNA ژنومی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و الکتروفورز انجام شد. با استفاده از روش PCR، کلنی‌های رشدیافته از نظر دو نوع باکتری *Alicyclobacillus acidocaldarius* و *Bacillus coagulans* مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی با آغازگرهای طراحی شده در پایگاه داده NCBI، شباهت ۱۰۰ درصدی با توالی‌های ثبت شده که همگی سویه‌های مختلف گونه *Alicyclobacillus acidocaldarius* هستند، نشان داد. هیچ‌یک از کلنی‌ها به‌عنوان گونه *Bacillus coagulans* شناسایی نشد. از آنجایی که باکتری *Alicyclobacillus acidocaldarius* برای اولین بار از خاک جدا شد، وجود این باکتری‌ها در محصول نشان‌دهنده آلودگی مواد اولیه به خاک است. در این تحقیق وجود باکتری آلیسایکلوباسیلوس در کنسرو رب گوجه‌فرنگی تایید شد. با توجه به مقاومت حرارتی بالای این باکتری، احتمال وجود باکتری‌های آلیسایکلوباسیلوس در تمامی مراحل تولید رب گوجه‌فرنگی که از طریق خاک وارد محصول شده‌اند، وجود دارد و دمای پاستوریزاسیون ($95^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ در ۳۰ دقیقه) در از بین بردن کامل این باکتری مؤثر نیست. اکثر باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل مانند خانواده *Alicyclobacillus* باکتری‌های بیماری‌زا نیستند و وجود آنها در غذا ممکن است طعم بد یا بدبوی غذا را ایجاد کند، اما خطری برای سلامت مصرف کننده ندارد.

واژه‌های کلیدی: باکتری ترموفیل، رب گوجه‌فرنگی، *Alicyclobacillus acidocaldarius* PCR

۱ و ۳- به‌ترتیب هیأت علمی و کارشناس مسئول گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیولوژی، پژوهشکده صنایع غذایی و فرآورده‌های کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران
(*)- نویسنده مسئول: (Email: atharinia_m@standard.ac.ir)

۲- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، اداره کل استاندارد استان کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

مقدمه

رب گوجه‌فرنگی یکی از محصولات فرآوری شده گوجه‌فرنگی است که ماندگاری بالایی دارد و به‌عنوان یک ماده غذایی مهم در سراسر جهان استفاده می‌شود. شیوع فساد در رب، تفاله و آب گوجه‌فرنگی تقریباً هر سال رخ می‌دهد. ارگانیسم ایجاد کننده این نوع فساد برای اولین بار توسط Berry در سال ۱۹۳۱ جداسازی و به‌عنوان *B. thermoacidurans* نامگذاری شد (Berry, 1933).

در سال ۱۹۸۶ گزارشی مبنی بر فساد آب سیب پاستوریزه صنعتی در آلمان منتشر شد که در طی آن مشخص شد باکتری‌های ترموفیل در این فساد نقش دارند. پژوهش‌های بعدی انجام شده روی این میکروارگانیسم‌ها مشخص کرد که امکان زنده‌مانی آنها بعد از پاستوریزاسیون وجود دارد (Splittstoesser, 1998). گستره دمایی 70°C – 20°C و pH حدود ۲٫۵ برای رشد این باکتری‌ها مناسب می‌باشد (Karavaiko et al., 2005).

این میکروارگانیسم‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۶۷ در ژاپن از چشمه‌های آب گرم جدا شدند (Uchino, 1967). اولین گزارش از جداسازی اسپور باکتری‌های ترمواسیدوفیل از غذاهای اسیدی فاسد تیمار شده با حرارت، در سال ۱۹۸۲ در آلمان اعلام شد (Cerny, 2018). این میکروارگانیسم‌ها ابتدا در جنس *Bacillus* قرار گرفتند، اما در سال ۱۹۹۲ ایجاد یک جنس جدید به نام *Alicyclobacillus* پیشنهاد شد که شامل گونه‌های *Alicyclobacillus acidoterrestris*، *Alicyclobacillus cycloheptanicus* (Berkeley, 1994) و این جنس شامل باکتری‌های گرمادوست و اسیددوست، گرم مثبت، هوازی، غیربیماری‌زا و تولیدکننده اندوسپور می‌باشد (Chang & Kang, 2004). گونه‌های *Alicyclobacillus* به‌عنوان باسیل‌های گرم مثبت، گرما دوست، اسیدوفیل، تشکیل دهنده اسپور، دارای اسیدهای چرب حلقوی به‌عنوان جزء اصلی غشای سلولی مشخص می‌شوند (Lee et al., 2010; Goto et al., 2007). اسپورها می‌توانند از عملیات حرارتی مرسوم مورد استفاده در فرآوری مواد غذایی محصولات اسیدی زنده بمانند و ترکیباتی مانند گایاکول (۲- متوکسی فنول) (Pettipher, 1997) و ۲،۶- دیبروموفنول (Baumgart, 1997) تولید کنند که هر دو مسئول تشکیل بوی فنولیک یا ضد عفونی کننده در نوشیدنی‌های اسیدی هستند (Durak et al., 2010; Goto et al., 2008; Wang et al., 2013). منشأ اصلی این باکتری‌ها خاک می‌باشد و از طریق میوه‌های آلوده به خاکی که فرآیند شستشو را به‌خوبی سپری

نکرده‌اند، به خط تولید و تجهیزات واحدهای تولیدی وارد می‌شوند (Chang & Kang, 2004). طی بررسی‌ها مشخص شده است که این باکتری‌ها بیماری‌زا نیستند ولی مواد حاصل از فعالیت زیستی آنها باعث تغییر طعم و بو همراه با رسوب یا بدون رسوب، تغییر رنگ محصول و ایجاد کدورت می‌شود. این امر باعث غیرقابل مصرف شدن محصول و خسارت به تولیدکنندگان می‌شود (Splittstoesser et al., 1998). آلیسایکلوباسیلوس‌ها در فعالیت آبی (a_w) بیشتر از ۰٫۹ قادر به رشد هستند. همچنین این باکتری‌ها باعث متابولیسم کردن قندها بدون تولید گاز می‌شوند (Yokota et al., 2007). طی پژوهش‌های بیشتری که انجام شد گونه‌های *Alicyclobacillus* را در آب‌میوه‌های پاستوریزه، پالپ میوه‌ها، آب‌میوه‌های گازدار، آب ایزوتونیک و کنسرو گوجه‌فرنگی شناسایی کردند (Walls & Chuyate, 2000).

تشخیص فساد ناشی از این میکروارگانیسم دشوار است. وجود این باکتری در آب میوه طبیعی ممکن است تولید رسوب کم کند، ولی تولید گاز نمی‌کند. اغلب، تنها شواهد تغییر مزه دارویی یا فنی در فرآورده است (Walls, 1998). کشف برخی از اندوسپورهای *Alicyclobacillus* به‌عنوان تنها سلول‌های میکروبی موجود در محصولات فاسد شده، نشان می‌دهد که رشد میکروبی و متعاقب آن تشکیل متابولیت‌ها قبل از پاستوریزاسیون اتفاق افتاده است. جوانه‌زنی اسپور *Alicyclobacillus* تنها در صورتی رخ می‌دهد که شرایط محیطی مناسب ایجاد شود. به‌همین دلیل، موارد فساد تایید شده تعداد کمی است (Cocconi et al., 2018). با توجه مشاهده آلودگی‌های متعدد به باکتری‌های ترموفیل در کنسروهای رب گوجه‌فرنگی و مشکلات پیش آمده برای صنعت، پژوهش حاضر به‌منظور پایش و بررسی آلودگی میکروبی کنسروهای رب گوجه‌فرنگی تولید داخل کشور در تمامی برندها و احتمال شناسایی باکتری *acidocaldarius* در آنها و تشخیص نهایی آن توسط آزمایش‌های مولکولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت و کنترل عملکرد آنها

در این پژوهش، محیط‌کشت‌های TAA و OSB^۲ از چهار برند Himedia، Q-Lab، Liofilchem و Ibresco خریداری شد. جهت بررسی صحت عملکرد و تعیین کارایی بهتر محیط کشت‌ها آزمون کنترل عملکرد به روش کیفی تک لوله‌ای انجام شد (ISO 11133, 2014).

1- Thermoacidurans agar

2- Orang Serum Broth

پایان دوره گرمخانه‌گذاری بر روی محیط‌کشت TAA (هر ۴ برند، برای هر نمونه ۸ پلیت) کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۴۸h گرمخانه‌گذاری شد. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی شد (INSO 2326, 2016).

جستجوی کپک و مخمر

۲ میلی‌لیتر از هر آزمایش مخلوط‌شده به دو لوله، (هر لوله ۲ ml) دارای محیط‌کشت OSB افزوده شد. پس از مخلوط کردن محیط‌کشت و نمونه، لوله‌ها در دمای $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان دوره گرمخانه‌گذاری با توجه به اینکه رب گوجه‌فرنگی باعث بوجود آمدن کدورت در محیط‌کشت می‌شود بنابراین برای تمامی لوله‌ها، با استفاده از لوپ سترون بر روی محیط‌کشت^۲ SDA کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۵ روز گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی شد (INSO 2326, 2016).

شناسایی به روش مولکولی

شناسایی نهایی گونه‌ها با انجام آزمون‌های مولکولی براساس پرایمر اختصاصی طراحی شده با Primer3 Input (version 0.4.0) طبق جدول ۱ انجام شد. این آزمایش‌ها در سه مرحله استخراج DNA، انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و الکتروفورز انجام شد (Groenewald et al., 2009). فرمول مواد مورد استفاده برای واکنش PCR در جدول ۲ آورده شده است. برنامه دمایی استفاده شده برای PCR در جدول ۳ آورده شده است. الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد انجام شد. با استفاده از روش PCR، کلنی‌های رشد کرده از لحاظ تشخیص برای دو گونه باکتری *Alicyclobacillus acidocaldarius* و *Bacillus coagulans* مورد بررسی قرار گرفتند (شکل‌های ۱ و ۲). آزمایش‌های مولکولی گونه رفرنس *Alicyclobacillus* همزمان انجام شد و پس از به‌دست آوردن باند قابل قبول محصولات PCR، توالی یابی و عملیات BLAST در NCBI صورت گرفت و شناسایی نمونه‌ها تا مرحله جنس و گونه انجام شد.

به‌همین منظور از ۵ سویه *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* جهت کنترل کیفی محیط کشت OSB، از سوش‌های *Bacillus coagulans*, *Leuconostoc mesenteroids* جهت کنترل کیفی محیط کشت TAA و از سوش‌های *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus brasiliensis* جهت کنترل کیفی محیط کشت SDA استفاده شد. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری محیط‌های کشت از لحاظ عدم رشد، رشد ضعیف، رشد خوب بررسی شدند. برای آزمون قابلیت انتخابی از *E. coli* ATTC 11778 با نتیجه مهار کامل استفاده شد.

روش آزمون

۴۶ نمونه کنسرو رب گوجه‌فرنگی به تعداد ۱۸۴ قوطی ۸۰۰ گرمی از سطح بازار خریداری شد. سپس نمونه‌ها در دو دمای $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۱۴ روز و دمای $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شد (INSO 2326, 2016). پس از پایان دوره گرمخانه‌گذاری و رسیدن دمای نمونه‌ها به دمای محیط، وضع ظاهری کلیه نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده از نظر وجود نشتی و یا بادکردگی بررسی شد. همچنین تمامی نمونه‌ها از لحاظ pH فرآورده مورد بررسی قرار گرفت.

جستجوی باکتری‌های مقاوم به اسید مزوفیل

۲ میلی‌لیتر از هر آزمایش مخلوط شده به دو لوله، (هر لوله ۲ ml) دارای محیط‌کشت OSB (از هر ۴ برند محیط کشت، برای هر نمونه ۸ لوله) افزوده شد. پس از مخلوط کردن محیط‌کشت و نمونه، لوله‌ها در دمای $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان دوره گرمخانه‌گذاری با توجه به اینکه رب گوجه‌فرنگی باعث بوجود آمدن کدورت در محیط‌کشت می‌شود، بنابراین برای تمامی لوله‌ها، با استفاده از لوپ سترون بر روی محیط‌کشت^۱ OSA کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۴۸h گرمخانه‌گذاری شد. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها از نظر رشد کلنی بررسی شد (INSO 2326, 2016).

جستجوی باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل

۲ میلی‌لیتر از هر آزمایش مخلوط شده به دو لوله، (هر لوله ۲ ml) دارای محیط‌کشت OSB (از هر ۴ برند محیط کشت، برای هر نمونه ۸ لوله) افزوده شد. پس از مخلوط کردن محیط‌کشت و نمونه، لوله‌ها در دمای $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری شدند. پس از

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی طراحی شده

Table 1- Designed specific primers

آغازگر Primer	توالی‌های نوکلوتیدی Nucleotide Sequences	اندازه توالی Sequence Size
Alicy. Acidocaldarius -F	5' GTTGGACCGGCAGATCAC -3'	680
Alicy. Acidocaldarius -R	5' GAGCGCCTTTTGAATGTACG -3'	680

جدول ۲- فرمول استفاده شده برای مخلوط واکنش PCR

Table 2- The formula used for the PCR reaction mixture

Ingredient ترکیبات	Conc. غلظت	Volume(μl) حجم
ddwater اب دوبار تقطیر	-----	4
Master mix مخلوط واکنش	2X	5
Primer F آغازگر F	10 μM	0.5
Primer R آغازگر R	10 μM	0.5
Template DNA تمپلت DNA		0
Sum مجموع		10

جدول ۳- برنامه دمایی استفاده شده

Table 3- Temperature program used

PCR program Temp(°C) برنامه دمایی (°C) PCR	Time زمان
Initial denaturation دنا تورا سیون اولیه	95 (3 دقیقه (min)
Denaturation دنا تورا سیون	95 25 ثانیه (Secend)
Annealing آنلینگ	60 25 ثانیه (Secend)
Extension گسترش	72 25 ثانیه (Secend)
Number of Cycles تعداد چرخه	35
Final extension گسترش نهایی	72 5 دقیقه (min)

تجزیه و تحلیل آماری

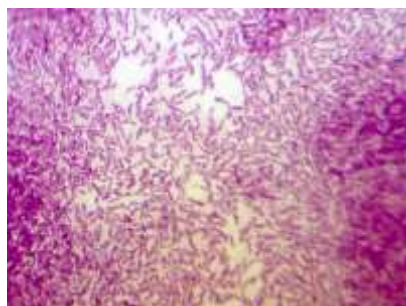
داده‌های به دست آمده از پژوهش توسط آزمون‌های آماری توصیفی و استنباطی در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. رسم نمودارها توسط نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ انجام شد.

نتایج و بحث

از تعداد ۴۶ نمونه تهیه شده با تاریخ تولید و سری ساخت‌های متفاوت، در مجموع تعداد ۱۸۴ قوطی کنسرو رب گوجه‌فرنگی، تعداد ۲۸ نمونه از لحاظ آلودگی به باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل مثبت بودند. با توجه به تعداد نمونه‌های آلوده مشخص شد که ۶۰/۸۶ درصد از نمونه‌ها دارای آلودگی به باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل هستند. هیچ یک از نمونه‌ها آلودگی به باکتری‌های مقاوم به اسید مزوفیل و

بررسی مورفولوژیکی

کلنی‌های رشد کرده روی محیط‌کشت TAA از لحاظ مورفولوژیکی بررسی شدند. برای بررسی‌های بیشتر رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. تمامی کلنی‌های رنگ‌آمیزی شده از لحاظ مورفولوژیکی شکل باسیل‌های استوانه‌ای گرم مثبت (شکل ۱) را نشان دادند.



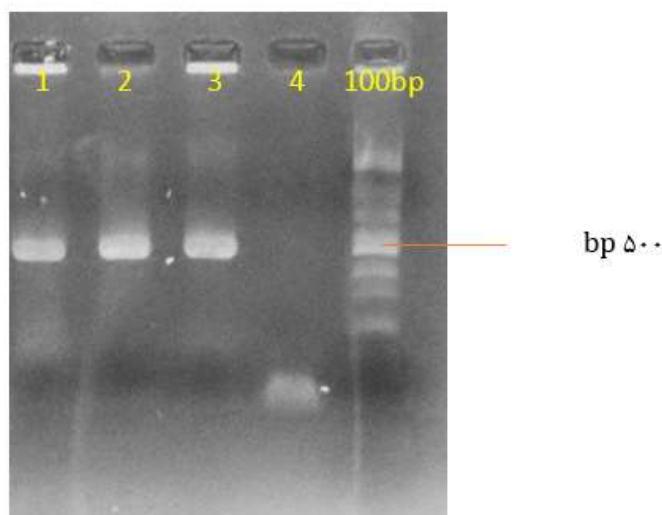
شکل ۱- باسیل‌های گرم مثبت استوانه‌ای مشاهده شده در رنگ‌آمیزی گرم
Fig. 1. Cylindrical Gram-positive bacilli observed in Gram staining

از سویه‌ها گونه *Bacillus coagulans* تشخیص داده نشدند. (در نمونه‌های ۸۰ و ۲۵ کشت روی پلیت کلنی‌های تیپیک و مناسب مشاهده شد و در کشت مایع کدروت ناشی از رشد باکتری به‌صورت کاملاً مشخص و واضح به‌دست آمد (شکل ۲)، بنابراین به‌صورت تصادفی به‌عنوان نمونه‌های منتخب جهت انجام آزمون‌های مولکولی انتخاب شدند).

نتایج آزمون‌های مولکولی

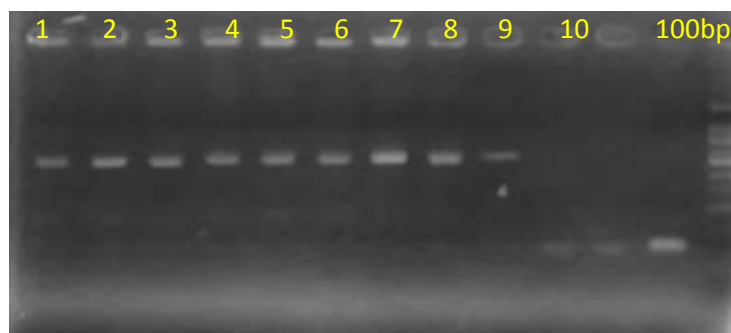
طبق نتایج به‌دست آمده حاصل از توالی‌یابی با پرایمر طراحی شده در داده پایگاه NCBI، مشابهت ۱۰۰ درصد با توالی‌های ثبت شده را نشان داد (شکل ۳) که همگی سویه‌های مختلف از گونه باکتریایی *Alicyclobacillus acidocaldarius* می‌باشند. هیچ‌کدام

Alicy (541, 60)	
V. No.	S.N.
شماره باند	شماره نمونه
1	Colony 80 (1) کلنی ۸۰ (۱)
2	Liquid 80 (2) مایع ۸۰ (۲)
3	Colony 25(3) کلنی ۲۵ (۳)
4	C- کنترل منفی



شکل ۲- باندهای به‌دست‌آمده در ژل الکتروفورز برای نمونه‌های منتخب ۸۰ و ۲۵، باند شماره ۴ کنترل منفی می‌باشد
Fig. 2. The bands obtained in electrophoresis gel for selected samples 80 and 25, band number 4 is the negative control

Alicy (541, 60)	
V. No.	S.N.
شماره باند	شماره نمونه
1	Colony 6، کلنی ۶
2	Colony 12، کلنی ۱۲
3	Colony 14، کلنی ۱۴
4	Colony 25، کلنی ۲۵
5	Colony 40، کلنی ۴۰
6	Colony 47، کلنی ۴۷
7	Colony 51، کلنی ۵۱
8	Colony 72، کلنی ۷۲
9	Colony 80، کلنی ۸۰
10	C-، کنترل منفی



شکل ۳- باندهای به دست آمده در ژل الکتروفورز برای نمونه‌های منتخب طبق جدول بالا، باند شماره ۱۰ کنترل منفی می‌باشد
Fig. 3. Bands obtained in gel electrophoresis for selected samples according to the table above, band number 10 is the negative control

منفی بودند (Franceschini et al., 2015). باکتری‌های *Alicyclobacillus* در تمامی مراحل تولید رب گوجه‌فرنگی از پوره تا محصول نهایی حضور دارند. این موضوع با پژوهشی که توسط بختیاری و همکاران (Bakhtiyari et al., 2018) انجام شد، تایید گردید. همچنین در پژوهش گروین والد و همکاران (Groenewald et al., 2009) نیز تایید شد. مشاهدات دیگر توسط دین هارد و همکاران در سال ۱۹۸۷ نشان داد که باکتری‌های *Alicyclobacillus acidoterrestris* در دمای کمتر از 35°C و تا حدود 55°C رشد می‌کرد و *Alicyclobacillus acidocaldarius* در دمای 35°C تا بالاتر از 55°C هم رشد می‌کرد (Deinhard et al., 1987). لوتیسی و همکاران (Lottici et al., 2006)، گونه‌هایی از *Alicyclobacillus* را از گوجه‌فرنگی و فرآورده‌های میوه‌ای جدا کردند که گونه‌های جدا شده از فرآورده‌های گوجه‌فرنگی از نوع *Alicyclobacillus acidocaldarius* و گونه‌های جدا شده از فرآورده‌های میوه‌ای *Alicyclobacillus acidoterrestris* بودند. گونه‌های *acidocaldarius* در دمای 37°C ، 44°C و 55°C و 65°C رشد کردند، ولی گونه‌های *acidoterrestris* در دماهای 37°C ، 44°C و 50°C رشد کردند. همچنین نتیجه اندازه‌گیری مقاومت حرارتی نشان داد که گونه‌های جدا شده از گوجه‌فرنگی مقاومت حرارتی زیادی داشتند و D_{105} معادل $15/3$ ، $5/09$ و $6/34$ دقیقه را نشان دادند، همچنین خصوصیات بیوشیمیایی، آزمایش‌های جوانه‌زنی اسپور در محیط‌های مختلف و مقاومت حرارتی سویه‌ها را نیز مورد بررسی قرار دادند (Lottici et al., 2006). متابولیت غالب در ارتباط با باکتری

نتایج کنترل عملکرد محیط‌کشت‌های OSB, TAA

پس از بررسی پلیت‌های مربوط به محیط‌کشت OSB مشخص شد که دو برند Ibresco, Quelab بهترین کیفیت و برندهای HiMEDIA و Liofilchem در رده‌های بعدی قرار دارند. و پس از بررسی پلیت‌های مربوط به محیط‌کشت TAA مشخص شد که همگی محیط‌های کشت دارای کیفیت مناسب بودند.

بحث

باکتری‌های *Alicyclobacillus* به عنوان یک مخاطره برای صنایع غذاهای اسیدی پاستوریزه به شمار می‌آیند. این باکتری‌ها از طریق میوه‌های آلوده به خاک، به تجهیزات تولید کارخانه‌ها، در نهایت به محصول راه یافته و با تولید متابولیت‌هایی نظیر گایاکول باعث ایجاد طعم نامطلوب در محصول می‌شوند (Wisse, 1998). دمای پاستوریزه معمول نمی‌تواند این باکتری را از بین ببرد، بسته به نوع فرآورده، دمای نگهداری و تعداد اولیه باکتری در میلی‌لیتر، ایجاد طعم بد یا بوی نامطبوع می‌تواند در نتیجه تکثیر باکتری‌ها و تشکیل مواد از نوع فنول مانند گایاکول باشد (Baumgart, 2003). باکتری *Alicyclobacillus acidocaldarius* توسط اوسوپال و همکاران (Osopale et al., 2016) از آب پرتغال جداسازی شد. در پژوهشی دیگر که توسط فرانسس چینی و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد از ۲۵ نمونه رب گوجه‌فرنگی و پوره گوجه‌فرنگی، ۱۶ نمونه (۶۴ درصد) در مجموع از نظر حضور باکتری‌های *Alicyclobacillus* مثبت و ۳۶ درصد نمونه‌ها

همچنین بختیاری و همکاران (Bakhtiyari et al., 2018) مشخص کردند که با توجه با مقاومت حرارتی بالای این باکتری، احتمال وجود باکتری‌های *Alicyclobacillus* در تمام مراحل تولید رب گوجه‌فرنگی وجود دارد و دمای پاستوریزاسیون $95^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ درجه در زمان ۳۰ دقیقه در حذف کامل این باکتری موثر نمی‌باشد.

بیشتر باکتری‌های ترموفیل اسیددوست مانند خانواده *Alicyclobacillus* جز باکتری پاتوژن قرار نمی‌گیرند. وجود آنها در مواد غذایی ممکن است باعث بدطعم و یا بدبو شدن مواد غذایی شود ولی خطری برای سلامت مصرف‌کننده ایجاد نمی‌کند. بنابراین به‌منظور کاهش خطر فساد و به‌منظور جلوگیری از رشد اسپور باکتری در صورت وجود در فرآورده، قرار نگرفتن فرآورده به مدت طولانی در دماهای بالا از اهمیت اساسی برخوردار است. همچنین انجام خنک‌سازی سریع پس از عملیات حرارتی و نگهداری محصول در دمای کمتر از 3°C درجه ضروری است. در خصوص استفاده از روش‌های مختلف مانند اشعه UV برای از بین بردن اسپورهای این باکتری به‌خصوص در فرآورده‌های اسیدی مانند رب گوجه‌فرنگی نیاز به بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تری می‌باشد که امید است در آینده مورد پژوهش قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مشترک گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیولوژی پژوهشگاه استاندارد و گروه پژوهشی منطقه ای استاندارد کرمانشاه می‌باشد. بدین‌وسیله از همکاری گروه پژوهشی میکروبیولوژی پژوهشگاه استاندارد و اداره کل استاندارد کرمانشاه تشکر و قدردانی می‌نماییم. همچنین از شرکت رژین‌تاک به عنوان کارفرمای این طرح نیز کمال تشکر را داریم.

Alicyclobacillus گایاکول (۲-متوکسی فنل) می‌باشد که بو و طعم مشابه ترکیبات دارویی و مواد ضدعفونی‌کننده و همچنین بوی فنلی دارد. در مطالعه انجام شده روی سویه‌های بومی جدا شده از فرآورده های گوجه‌فرنگی ثابت شد که باکتری‌های دارای خواص ترموفیل مانند *Alicyclobacillus acidocaldarius* در دمای 65°C و 70°C رشد می‌کنند و در دمای 30°C رشد نخواهند کرد (et al., 2015) Franceschini).

در پژوهش حاضر تمامی سویه‌های جدا شده براساس انجام آزمون PCR و توالی‌یابی گونه *Alicyclobacillus acidocaldarius* تشخیص داده شد و با توجه به اینکه این باکتری در ابتدا از خاک جداسازی گردیده (Albuquerque et al., 2000) حضور آن در گونه های شناسایی شده این پژوهش ممکن است حاکی از آلودگی مواد اولیه به خاک باشد. همچنین توالی‌هایی با طول ۵۰۰ bp – ۴۷۱ سکانس شدند و درصد مشابهت این ایزوله‌ها با گونه‌های ثبت شده در پایگاه NCBI ۱۰۰ درصد مشخص شد. در تحقیقی که توسط گروئن والد و همکاران (Groenewald et al., 2009) انجام شد نتیجه توالی‌یابی قطعات ۱۱۱۹ – ۷۷۸ bp در سه جدایه از خاک، شبکه‌های سرکه و پوره گلابی پیش پاستوریزه شده درصد مشابهت ۹۹ درصد – ۹۸٫۹ درصد را با سویه *Alicyclobacillus acidocaldarius* نشان داد. از آنجاکه باکتری‌های *Alicyclobacillus acidocaldarius* اولین بار از خاک جداسازی شدند وجود این باکتری‌ها در محصول حاکی از آلودگی مواد اولیه به خاک می‌باشد. در تحقیقی که توسط دوپرادو و همکاران (Do prado et al., 2019) روی تاثیر اشعه UV-C بر گونه‌های *Alicyclobacillus* در آب پرتقال انجام گرفت مشخص شد که استفاده از UV-C باعث کاهش تعداد اسپور و تشکیل بیوفیلیم بر روی گونه‌های تحت آزمون به‌ویژه گونه‌های *A. acidocaldarius* شده است.

منابع

1. Albuquerque, L., Rainey, F. A., Chung, A.P., Sunna, A., Nobre, M.F., Grote, R., ... & Da Costa, M.S. (2000). *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 451-457. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-451>
2. Bakhtiyari, Sh., Edalatn Dovom, M.R., Habibi Najafi, M.B., & Yavarmanesh, M. (2018). Isolation and identification of *Alicyclobacillus* spp. from different steps in the production line of tomato paste using culture-dependent and molecular methods and Evaluation of brix effect on *Alicyclobacillus* growth, *Food Science and Technology*, 15(9), 421-435.
3. Berry, R.N. (1933). Some new heat resistant, acid tolerant organisms causing spoilage in tomato juice. *Journal of Bacteriology*, 25(72).
4. Baumgart, J., Husemann, M., & Schmidt, C. (1997). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: occurrence, significance and detection in beverages and beverage base. *Flussiges Obst*, 64, 178-180.
5. Baumgart, J. (2003). Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. In *Progress in Industrial Microbiology*, 37, 161-166. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80014-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80014-0)

6. Berkeley, R.C.W., & Ali, N. (1994). Classification and identification of endospore-forming bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 1S-8S.
7. Chang, S.S., & Kang, D.H. (2004). *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology*, 30(2), 55-74. <https://doi.org/10.1080/10408410490435089>
8. Cocconi, E., Franceschini, B., & Previdi, M. P. (2018). Identification of spoilage by *Alicyclobacillus* bacteria in tomato-based products by UHPLC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 53(9), 903-910. <https://doi.org/10.1002/jms.4270>
9. Cerny, G., Hennlich, W., & Poralla, K. (1984). Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganism. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 179, 224-227.
10. Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., & Altan, E. (1987). *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 10(1), 47-53. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(87\)80009-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(87)80009-7)
11. Do Prado, D.B., dos Anjos Szczepa, M.M., Capeloto, O.A., Astrath, N.G.C., Dos Santos, N.C.A., Previdelli, I.T.S., ... & de Abreu Filho, B.A. (2019). Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and biofilms of *Alicyclobacillus* spp. in industrialized orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108238. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108238>
12. Durak, M.Z., Churey, J.J., Danyluk, M.D., & Worobo, R.W. (2010). Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 142(3), 286-291. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.003>
13. Franceschini, B., Manganeli, E., Bloise, C., & Previdi, M. P. (2015). Tomato products spoilage by *Alicyclobacillus* spp: growing ability of spores naturally present as a function of the total soluble solids and isolates characterization. *Journal Food Process Beverages*, 3(1), 6.
14. Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Fujita, R., An, S.Y., ... & Yokota, A. (2007). Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(6), 1276-1285. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64692-0>
15. Goto, K., Nishibori, A., Wasada, Y., Furuhashi, K., Fukuyama, M., & Hara, M. (2008). Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards. *Letters in Applied Microbiology*, 46(3), 289-294. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02307.x>
16. Groenewald, W. H., Gouws, P. A., & Witthuhn, R. C. (2009). Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology*, 26(1), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.008>
17. INSO 2326, (2016). Microbiology of Canned foods- Commercial sterility- Specifications and test methods.
18. INSO 761, (2016). Canned tomato paste-Specifications and Test Methods.
19. ISO 11133, (2014). Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
20. Lee, S.Y., Ryu, S.R., & Kang, D.H. (2010). Treatment with chlorous acid to inhibit spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in aqueous suspension and on apples. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2), 164-169. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02874.x>
21. Lottici, C., Previdi, M.P., & Bolzoni, L. (2006). Characterization and study of alicyclobacilli isolated from tomato products [vegetable and fruit products; biological contamination]. *Industria Conserve (Italy)*.
22. Osopale, B.A., Witthuhn, C.R., Albertyn, J., & Oguntinyinbo, F.A. (2016). Culture dependent and independent genomic identification of *Alicyclobacillus* species in contaminated commercial fruit juices. *Food Microbiology*, 56, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.014>
23. Karavaiko, G.I., Bogdanova, T.Y.I., Tourova, T.Y.P., Kondrat'eva, T.F., Tsaplina, I.A., Egorova, M.A., ... & Zakharchuk, L.M. (2005). Reclassification of '*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans*' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 941-947. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63300-0>
24. Pettipher, G.L., Osmundson, M.E., & Murphy, J.M. (1997). Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology*, 24(3), 185-189. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00373.x>
25. Splittstoesser, D.F. (1998). Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 18, 585-587.

26. Yokota, A., Fujii, T., & Goto, K. (2007). *Alicyclobacillus*. Springer, New York.
27. Walls, I., & Chuyate, R. (2000). Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. *Journal of AOAC International*, 83(5), 1115-1120. <https://doi.org/10.1093/jaoac/83.5.1115>
28. Uchino, F., & Doi, S. (1967). Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(7), 817-822. <https://doi.org/10.1080/00021369.1967.10858890>
29. Walls, I. (1998). *Alicyclobacillus*-historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy Food Environ. Sanitation*, 18, 499-503. <https://doi.org/10.1080/10408410490435089>
30. Wisse, C.A. (1998). Isolation and enumeration of sporeforming, thermo-acidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. *Dairy Food Environment Sanitation*, 18, 504-509. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80014-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80014-0) Get rights and content
31. Wang, Z., Wang, J., Yue, T., Yuan, Y., Cai, R., & Niu, C. (2013). Immunomagnetic separation combined with polymerase chain reaction for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice. *PloS One*, 8(12), e82376. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80014-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80014-0)

Contents

Evaluation of the Importance of Multi-objective Particle Swarm Algorithm Parameters in Optimizing the Solutes Rejection of Camel Milk Ultrafiltration Using Partial Least Squares Regression	577
S.M.A. Razavi, M. Kashaninejad	
Investigating the Physicochemical Properties of Healthy Yogurt Containing Bitter Gourd Powder	593
Z. Mohkami, H.Ghorbani Ghouszdi, F. Bidarnamani, Y. Shiri	
Evaluation of Changes in Some Textured and Qualitative Properties of Cake Enriched with Wheat Germ	607
S.M. Sadeghi, M. Tayefe, L. Fadayi Eshkiki, K. Ghiasvand	
Pre-harvest Application of Chitosan with Carvacrol on Biochemical, Qualitative and Shelf Life Characteristics of Strawberry (<i>Fragaria × ananassa</i> Duch)	617
Z. Ghasemi Arshad, A. Ehtesham Nia, E. Hazbawi, H. Mumivand, M. Soleimani Aghdam	
Preparation of Biopolymer Based on Agar Extracted from Persian Gulf Red Algae <i>Acanthophora</i> and Evaluation of Its Properties	635
P. Dianat, M. Haji Abdolrasouli, M. Yousefzadi	
Cell Culture of <i>Spirulina</i> Microalgae (<i>Spirulina platensis</i>) and Comparison the Efficiency of Enzymatic, Ultrasound, Freeze-defrosting and Mineral Solvent Methods in Extraction of Phycocyanin Pigment	649
R. Safari, S. Reyhani Poul	
Increasing the Production of Carotenoids in <i>Chlorella sorokiniana</i> IG-W-96 by Changing the Concentration of Nutrients and Phytohormones	663
Z. Noruzi Motlagh, M.A. Mahdavi, R. Gheshlaghi	
Effect of Edible Coatings of Alginate and <i>Oliveria decumbens</i> Essential Oil on Physicochemical, Microbial and Sensory Properties of Grated Carrots During Shelf Life	675
A. Hosseini, N. Zamindar, Y. Esmaeili	
The Effect of Ultrasound Pretreatment on Hydrolysis Time by Pepsin Enzyme to Produce Antioxidant Peptides from Edible Mushroom (<i>Agaricus bisporus</i>) Protein	693
I. Izanloo, A.R. Sadeghi Mahoonak	
Investigating Physical and Mechanical Properties of Bionanocomposite Film Based on Flaxseed Mucilage and Cellulose Nanocrystal	711
E. Safaei, H. Lashkari, S. Ansari, A. Shirazinejad	
Evaluation of the Fouling Phenomenon During Membrane Clarification of Apple Juice Using Scraped Surface Membrane Unit	723
S. Yassari, H. Mirsaedghazi, L. Roozbeh Nasiraie, A. Fadavi	
Investigating of Tomato Pastes Microbial Contamination in Iran and Isolation and Identification of <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> by PCR Method	745
M. Atharinia, N. Zonourian, S. Davarzani	

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Vol. 19

No. 5

2023

Published by:	Ferdowsi University of Mashhad, (College of Agriculture), Iran
Executive Manager:	N. Shahnoushi, Department of Agricultural Economics, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
Editor-in-Chief:	M. Yavarmanesh, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
Editorial Board:	
Mortazavi, Seyed A.	Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
Shahidi, F.	Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Habibi najafi, M.	Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Razavi, Seyed M. A.	Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Kashaninejad, M.	Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences & Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, Iran
Khomeiri, M.	Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences & Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, Iran
Farhoosh, R.	Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Fazli Bazzaz, S.	Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Koocheki, A.	Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Mohebbi, M.	Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Ghanbarzadeh, B.	Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran
Alemzadeh, I.	Professor, Department of Food Chemical Engineering, Faculty of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran
Rajabzadeh, GH.	Associate Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
Heydarpour, M.	Associate Professor, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, United States America
Ghoddusi, H. B.	Associate Professor, School of Human Sciences, London Metropolitan University, England
Khosravidarani, K.	Professor, Department of Food Industry, School of Nutrition Sciences & Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Abbaszadegan, M.	Professor, Director Water & Environmental Technology Center, Arizona State University, United States of America
Mohammadifar, M. A.	Associate Professor, Research Group for Food Production Engineering, Technical University of Denmark, Denmark
Vosoughi, M.	Professor, Department of Food Chemical Engineering, Faculty of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran
Almasi, H.	Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Urmia University, Urmia, Iran
Fathi, M.	Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
Abbasi, S.	Professor, Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Borges, N.	Professor, Faculty of Nutrition and Food Sciences, University of Porto, Portugal
Moazzami, Ali A.	Doctor of Philosophy, Department of Molecular Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural, Swedish University, Sweden
Publisher	Ferdowsi University of Mashhad
Address:	College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
P.O.BOX:	91775- 1163
Fax:	(98)051-38787430
E-Mail:	ifstrj@um.ac.ir
Web Site:	https://ifstrj.um.ac.ir

Contents

Evaluation of the Importance of Multi-objective Particle Swarm Algorithm Parameters in Optimizing the Solutes Rejection of Camel Milk Ultrafiltration Using Partial Least Squares Regression	577
S.M.A. Razavi, M. Kashaninejad	
Investigating the Physicochemical Properties of Healthy Yogurt Containing Bitter Gourd Powder	593
Z. Mohkami, H.Ghorbani Ghouszdi, F. Bidarnamani, Y. Shiri	
Evaluation of Changes in Some Textured and Qualitative Properties of Cake Enriched with Wheat Germ	607
S.M. Sadeghi, M. Tayefe, L. Fadayi Eshkiki, K. Ghiasvand	
Pre-harvest Application of Chitosan with Carvacrol on Biochemical, Qualitative and Shelf Life Characteristics of Strawberry (<i>Fragaria × ananassa</i> Duch).....	617
Z. Ghasemi Arshad, A. Ehtesham Nia, E. Hazbawi, H. Mumivand, M. Soleimani Aghdam	
Preparation of Biopolymer Based on Agar Extracted from Persian Gulf Red Algae <i>Acanthophora</i> and Evaluation of Its Properties.....	635
P. Dianat, M. Haji Abdolrasouli, M. Yousefzadi	
Cell Culture of <i>Spirulina</i> Microalgae (<i>Spirulina platensis</i>) and Comparison the Efficiency of Enzymatic, Ultrasound, Freeze-defrosting and Mineral Solvent Methods in Extraction of Phycocyanin Pigment	649
R. Safari, S. Reyhani Poul	
Increasing the Production of Carotenoids in <i>Chlorella sorokiniana</i> IG-W-96 by Changing the Concentration of Nutrients and Phytohormones.....	663
Z. Noruzi Motlagh, M.A. Mahdavi, R. Gheshlaghi	
Effect of Edible Coatings of Alginate and <i>Oliveira decumbens</i> Essential Oil on Physicochemical, Microbial and Sensory Properties of Grated Carrots During Shelf Life.....	675
A. Hosseini, N. Zamindar, Y. Esmacili	
The Effect of Ultrasound Pretreatment on Hydrolysis Time by Pepsin Enzyme to Produce Antioxidant Peptides from Edible Mushroom (<i>Agaricus bisporus</i>) Protein	693
I. Izanloo, A.R. Sadeghi Mahoonak	
Investigating Physical and Mechanical Properties of Bionanocomposite Film Based on Flaxseed Mucilage and Cellulose Nanocrystal	711
E. Safaei, H. Lashkari, S. Ansari, A. Shirazinejad	
Evaluation of the Fouling Phenomenon During Membrane Clarification of Apple Juice Using Scraped Surface Membrane Unit723	
S. Yassari, H. Mirsaeedghazi, L. Roozbeh Nasiraie, A. Fadavi	
Continue Content in cover	