



نشریه علمی پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران



جلد ۲۱ شماره ۴

سال ۱۴۰۴

شاپا: ۱۷۳۵-۴۱۶۱

شماره پیاپی ۹۴

عنوان مقالات

مقالات پژوهشی

- حفظ کیفیت میوه چیکو (*Manilkara zapota*) در مدت انبارمانی با کاربرد آمینواسیدها
(فنیل آلانین، گلوتاتیون و آل آرژنین) و تنظیم کننده رشد (ملاتونین) ۳۶۱
سلیمه ابراهیمی میمند- لیلیا جعفری- عبدالمجید میرزاعلیان دستجردی- اصغر رضائیان
- تهیه و بررسی خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و ضد میکروبی فیلم‌های نانوکامپوزیتی پلی اتیلن / پلی لاکتیک اسید
تقویت شده با نانواکسید گرافن ۳۷۹
مریم فتحی‌فر- ناصر صداقت- محمدرضا عبدالهی مقدم
- ارزیابی تأثیر ترکیب حلال و کاربرد تیمارهای کمکی در استخراج عصاره زرین گیاه
(*Dracocephalum kotschy Boiss*) به کمک حلال‌های یوتکتیک عمیق ۳۹۵
سحر کیانی- هاجر عباسی
- استخراج و آنالیز کیفی ژلاتین پای مرغ و بررسی تأثیر آن بر خواص فیزیکوشیمیایی مارشمالو ۴۱۱
فاطمه اسلامی- زینب رفتی امیری- علی معتمدزادگان- هایده گرجیان
- ارزیابی خواص پری بیوتیکی پلی ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم و لتینولا اودوس در تقویت جدایه‌های
مخموری و باکتریایی لبنی ۴۳۳
محدثه لاری پور- ندا جامعی- حورا دادگستر- جمیله نوروزی

مقالات کوتاه

- تعیین باقیمانده سم دیازینون در عسل منطقه مانه و سملقان در استان خراسان شمالی با استفاده از روش Uv-Vis ۴۵۳
زینب رحیمی- وحید حکیم‌زاده
- تأثیر شرایط استخراج بر بازده تانن و ترکیبات فنولی پوست و جفت بلوط ۴۶۵
زهرا زارع زاده- علی فروهر- حامد صابریان

نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران

با شماره پروانه ۱۳۴/۸۴۷ 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."

مهر- آبان ۱۴۰۴

شماره ۴

جلد ۲۱

صاحب امتیاز: دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول: دکتر ناصر شهنوشی

سر دبیر: دکتر مسعود باورمنش

اعضای هیئت تحریریه:

استاد، اقتصاد کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
دانشیار، میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد

استاد، میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد
استاد، میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
استاد، میکروبیولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد
دانشیار، میکروبیولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
استاد، مهندسی و خواص بیوفیزیک مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
استاد، شیمی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
استاد، میکروبیولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
استاد، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
استاد، تکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
استاد، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
استاد، مهندسی مواد غذایی، دانشگاه تبریز
استاد، بیوتکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه صنعتی شریف
دانشیار، نانو فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد
دانشیار، زیست مولکولی، بیمارستان زنان و بزرگام، ایالت متحده آمریکا
دانشیار، میکروبیولوژی غذایی، دانشگاه متروپولیتن لندن
استاد، بیوتکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
استاد، مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه آریزونا
استاد، مهندسی تولید مواد غذایی، دانشگاه فنی دانمارک
استاد، بیوتکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه صنعتی شریف
دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان
استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس.
استاد، گروه علوم تغذیه و مواد غذایی، دانشگاه پورتو، پرتغال
دانشیار، گروه علوم مولکولی، دانشکده منابع طبیعی و علوم کشاورزی، دانشگاه سوئد
دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه کشاورزی مایکل اوکپارا، ایالت ابیا، نیجریه
دانشیار گروه فناوری غذایی، مؤسسه تکنولوژی و علم هندوستان، چنای، تامیل نادو، هند

دکتر سید علی مرتضوی
دکتر فخری شهیدی
دکتر محمدباقر حبیبی نجفی
دکتر مرتضی خمیری
دکتر سید محمد علی رضوی
دکتر رضا فرحوش
دکتر بی بی صدیقه فضلای بزاز
دکتر مهدی کاشانی نژاد
دکتر آرش کوچکی
دکتر محبت محبی
دکتر بابک قنبرزاده
دکتر ایران عالمزاده
دکتر قدیر رجبزاده اوغاز
دکتر مهیار حیدرپور
دکتر حمید بهادر قدوسی
دکتر کیانوش خسروی
دکتر مرتضی عباسزادگان
دکتر محمدمامین محمدی فر
دکتر منوچهر وثوقی
دکتر هادی الماسی
دکتر میلاد فتحی
دکتر سلیمان عباسی
دکتر نونو بورخس
دکتر علی عطا معظمی
دکتر کلیفورد نکمناسو اوبی
دکتر ساموئل ایوفمی اولالکان آدیبه

ناشر: دانشگاه فردوسی مشهد

این نشریه در پایگاه‌های زیر نمایه شده است:

AGRIS, Scopus, 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 می‌شود.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

مقالات پژوهشی

- ۳۶۱ حفظ کیفیت میوه چیکو (*Manilkara zapota*) در مدت انبارمانی با کاربرد آمینواسیدها (فنیل آلانین، گلوتاتینون و آل آرژنین) و تنظیم کننده رشد (مالاتونین)
سلیمه ابراهیمی میمند- لیلا جعفری- عبدالمجید میرزاعلیان دستجردی- اصغر رمضانیان
- ۳۷۹ تهیه و بررسی خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و ضدمیکروبی فیلم‌های نانوکامپوزیتی پلی اتیلن / پلی لاکتیک اسید تقویت شده با نانواکسیدگرافن
مریم فتحی‌فر- ناصر صداقت- محمدرضا عبدالهی مقدم
- ۳۹۵ ارزیابی تأثیر ترکیب حلال و کاربرد تیمارهای کمکی در استخراج عصاره زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy Boiss*) به کمک حلال‌های بوتکتیک عمیق
سحر کیانی- هاجر عباسی
- ۴۱۱ استخراج و آنالیز کیفی ژلاتین پای مرغ و بررسی تأثیر آن بر خواص فیزیکوشیمیایی مارشمالو
فاطمه اسلامی- زینب رفتنی امیری- علی معتمدزادگان- هایده گرجیان
- ۴۳۳ ارزیابی خواص پری‌بیوتیکی پلی ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم و لنتینولا اودوس در تقویت جدایه‌های مخمری و باکتریایی لبنی
محدثه لاری پور- ندا جامعی- حورا دادگستر- جمیله نوروزی

مقالات کوتاه

- ۴۵۳ تعیین باقیمانده سم دیازینون در عسل منطقه مانه و سملقان در استان خراسان شمالی با استفاده از روش Uv-Vis
زینب رحیمی- وحید حکیم‌زاده
- ۴۶۵ تأثیر شرایط استخراج بر بازده تانن و ترکیبات فنولی پوست و جفت بلوط
زهرا زارع زاده- علی فروهر- حامد صابریان

Maintaining the Quality of Chico Fruit (*Manilkara zapota*) during Storage Using Amino Acids (Phenylalanine, Glutathione, and L-arginine) and Growth Regulator (Melatonin)

S. Ebrahimi Meymand¹, L. Jafari¹*, A. Mirzaalian Dastjerdi¹, A. Ramazanian²

1- Department of Horticulture, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

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

2- Department of Horticulture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: 09.12.2024

Revised: 28.04.2025

Accepted: 03.05.2025

Available Online: 18.08.2025

How to cite this article:

Ebrahimi Meymand, S., Jafari, L., Mirzaalian Dastjerdi, A., & Ramazanian, A. (2025). Maintaining the quality of Chico fruit (*Manilkara zapota*) during storage using amino acids (phenylalanine, glutathione, and L-arginine) and growth regulator (melatonin). *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(4), 359-376. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.91169.1389>

Introduction

Sapodilla is a tropical fruit well-known for its sweet taste and soft texture. It is a fruit that continues to ripen naturally after being harvested. Therefore, the fruit harvesting time must be chosen carefully to ensure that the fruit reaches a stage of ripeness where it has the desired flavor and quality. Sapodilla continues to ripen naturally after harvest, so selecting the right time for picking is crucial for ensuring optimal flavor and quality. Proper post-harvest handling, such as controlling temperature and humidity, can extend its shelf life. Using edible coatings or suitable packaging also helps preserve its freshness and delay spoilage. Maintaining quality and reducing post-harvest fruit deterioration is one of the significant challenges in the agricultural supply chain, requiring effective protective methods. The spoilage of sapodilla fruit is due to its sensitivity to temperature conditions and water loss. Application of amino acids can help preserve its quality and extend its shelf life. In this study, phenylalanine, glutathione, melatonin, L-arginine, and control (distilled water) were applied to evaluate post-harvest quality of sapodilla over five storage periods with three replications.

Materials and Methods

First, sapodilla fruits were harvested from an orchard located in Rodan City at the stage of commercial maturity in the second half of July. Immediately after harvesting, the fruits were transported to the Horticultural Science Laboratory at the Faculty of Agriculture, University of Hormozgan. The harvested fruits were healthy and free from pests and diseases. They were selected based on uniform shape and weight. After being washed, the fruits were disinfected in a 1% sodium hypochlorite solution for 2 minutes. Following disinfection, the fruits were dried in ambient air.

The fruits were treated with four amino acids (phenylalanine (8 mM), glutathione (0.05%), melatonin (0.5 mM) and L-arginine (1 mM)) and control (distilled water) for 10 minutes. After the treatment, they were transferred to the cold room with a temperature of 8 ± 1 C° and a relative humidity of 90 ± 5 %. The factorial experiment was conducted in five storage times (0, 10, 20 30 and 40) in three replications as a completely random design and the quality and biochemical factors of sapodilla were measured.

Results and Discussion

In this study, the weight loss of Sapodilla fruit increased with storage time, while the treatments helped prevent weight loss. At the end of the 40-day storage, the phenylalanine treatment prevented 37.9% of the weight loss compared to the control. Phenylalanine treatment prevented 92.33% of the weight loss relative to the control. The



fruit firmness decreased over time, whereas treatments helped increase this parameter. The highest and lowest firmness values at the end of the experiment were observed in the melatonin and glutathione treatments (97.67 and 66.66 N, respectively), with the control having the lowest firmness (57.55 N). Soluble solids content increased over time. The highest and lowest soluble solids were found in the control and the treatments with arginine, melatonin, and glutathione, respectively. At the end of the 40-day experiment, the arginine, melatonin, and glutathione treatments reduced soluble solids content, compared to the control by 6.98%, 6.60%, and 6.41%, respectively. The greatest and least increases in soluble solids were observed in the control and the treatments with L-arginine and glutathione, respectively. After 40 days of storage, the L-arginine and glutathione treatments reduced the decay percentage by 45.81% and 41.43%, respectively, compared to the control. Glutathione treatment increased the ascorbic acid content of sapodilla fruit at most storage times. At the end of storage (40 days), glutathione treatment increased ascorbic acid content by 56.79% compared to the control. An increase in antioxidant activity was observed in Sapodilla fruit over time. On day 30 of storage, phenylalanine treatment increased antioxidant activity by 28.67%, and on day 40, melatonin treatment showed a 30.61% increase. This increase in antioxidant activity is considered a defense response to environmental and physiological stress during storage. At the end of 40-day storage period, catalase activity increased. The highest and lowest catalase activities were observed at 33.06 and 25.22 units/mg fresh weight, respectively. By day 40, catalase activity was increased to 31.08% in the arginine treatment compared to the control.

Conclusion

In conclusion, using these treatments, particularly phenylalanine, melatonin, and glutathione, can serve as effective strategies for preserving the quality of sapodilla fruit during long-term storage and mitigating the negative effects of physiological and environmental stress. These treatments not only reduce weight loss, maintain firmness, and prevent decay, but also improve the nutritional properties and health benefits of the fruit by enhancing antioxidant activity and defense enzyme levels. In the future, further research could focus on identifying the precise mechanisms by which these compounds influence the biochemical processes in sapodilla and other fruits. Furthermore, studying the long-term effects of these treatments, as well as their interactions with various environmental and physiological factors in real-world storage conditions, could pave the way for wider adoption of these strategies in the fruit storage and packaging industry. These investigations could enhance fruit preservation methods, minimize food waste, and prolong the shelf life of fruits and decreasing postharvest loss.

Keywords: Antioxidant activity, Glutathione, L-arginine, Melatonin, Phenylalanine

مقاله پژوهشی

جلد ۲۱، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۴، ص. ۳۷۶-۳۵۹

حفظ کیفیت میوه چیکو (*Manilkara zapota*) در مدت انبارمانی با کاربرد آمینواسیدها (فنیل آلانین، گلوکاتینون و آل آرژنین) و تنظیم‌کننده رشد (ملاتونین)

سلیمه ابراهیمی میمند^۱ - لیلا جعفری^{۱*} - عبدالمجید میرزاعلیان دستجردی^۱ - اصغر رمضانیان^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۳

چکیده

فساد میوه چیکو (*Manilkara zapota*) عمدتاً به دلیل حساسیت به شرایط دمایی و کاهش رطوبت رخ می‌دهد که تأثیر منفی بر کیفیت و ماندگاری آن دارد. این پژوهش با هدف ارزیابی تأثیر آمینواسیدها و تنظیم‌کننده رشد بر حفظ کیفیت و افزایش عمر انبارمانی چیکو انجام شد. میوه‌ها به مدت ۲ دقیقه در محلول‌های فنیل آلانین (۸ میلی‌مولار)، گلوکاتینون (۰/۰۵ درصد)، ملاتونین (۰/۵ میلی‌مولار) و آل آرژنین (۱ میلی‌مولار) در مقایسه با شاهد (آب مقطر) غوطه‌ور شده و سپس در محیط خشک شدند. پس از اعمال تیمار، میوه‌ها در سردخانه با دمای 8 ± 1 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 90 ± 5 درصد نگهداری شدند. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و ارزیابی کیفیت میوه‌ها در پنج زمان انبارمانی (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز) صورت گرفت. پس از پایان دوره، میوه‌ها به مدت یک روز در دمای محیط (۲۵ درجه سلسیوس) نگهداری شدند تا تغییرات کمی آنها بررسی شود. نتایج نشان داد که تیمار فنیل آلانین توانست به میزان ۹/۳۷ درصد از کاهش وزن میوه در ۴۰ روز نگهداری جلوگیری کند و در نهایت، سفتی بافت میوه چیکو در تیمارهای ملاتونین و گلوکاتینون نسبت به شاهد به ترتیب ۲۲/۳۱ و ۱۹/۹۵ درصد در پایان آزمایش افزایش یافت. همچنین، تیمار گلوکاتینون سبب افزایش ۵۶/۷۹ درصدی میزان اسید آسکوربیک نسبت به شاهد در ۴۰ روز نگهداری میوه شد. در پایان ۴۰ روز آزمایش، تیمارهای آرژنین، ملاتونین و گلوکاتینون به میزان ۶/۹۸، ۶/۶۰ و ۶/۴۱ درصد نسبت به شاهد سبب کاهش مواد جامد محلول در میوه چیکو شدند. افزون بر این در پایان زمان نگهداری، تیمار آرژنین توانست به میزان ۳۲ درصد اسید قابل تیتر میوه را افزایش دهد. این مطالعه نشان داد که تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق می‌توانند به‌طور مؤثری بر بهبود کیفیت و حفظ خصوصیات تغذیه‌ای میوه چیکو در طول دوره نگهداری مؤثر باشند. این نتایج پتانسیل استفاده از این ترکیبات را به‌عنوان راهکارهایی برای افزایش عمر مفید و حفظ کیفیت میوه‌ها تأکید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آرژنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنیل آلانین، گلوکاتینون، ملاتونین

مقدمه

مانند سیستان و بلوچستان و هرمزگان تولید شده و در سال ۱۴۰۲ میزان برداشت آن از باغ‌های استان سیستان و بلوچستان بیش از ۱۲۰۰ تن گزارش شده است. چیکو سرشار از ترکیبات فعال زیستی، ویتامین‌ها، مواد معدنی و آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند پلی‌فنل‌ها و کاروتنوئیدها است که موجب افزایش ارزش تغذیه‌ای و کاربرد دارویی آن می‌شود (Kaur, Singh, Singh & Sharma, 2020).

چیکو یا ساپودیل (*Manilkara zapota*) یکی از میوه‌های گرمسیری ارزشمند از خانواده Sapotaceae است که به دلیل طعم مطبوع، ارزش تغذیه‌ای بالا و کاربردهای صنعتی در کشورهای مختلفی از جمله ایران کشت می‌شود (Padmaja & John, 2014; Yahia & Gutierrez-Orozco, 2011). این میوه به‌ویژه در استان‌های جنوبی

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
* - نویسنده مسئول: (Email: jafari.leila@hormozgan.ac.ir)

۲- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

از جمله مرکبات (Chen, Jiang, & Sun, 2022)، میوه توت‌فرنگی (Sun, Hao, Yang, & Chen, 2021) و میوه انگور (Li *et al.*, 2021) استفاده شده است. می‌تواند رشد میکروبی پس از برداشت را مهار کند و کیفیت محصول و انبارمانی را بهبود بخشد. میوه انار پس از تیمار با یک میلی‌مولار آرژنین سرمازدگی کمتری را نشان داد (Babalar, Pirzad, Sarcheshmeh, Talaei, & Lessani, 2018). در پژوهشی ال-آرژنین با غلظت ۱ میلی‌مولار به‌طور قابل توجهی ماندگاری و کیفیت خرما را در دمای پایین حفظ کرد (Khan, Azam, Ahmad, & Atiq, 2023).

فنیل‌آلانین یک اسیدآمین ضروری و آروماتیک است که نقش کلیدی در سنتز ترکیبات فنلی، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و لینگین دارد (Garde-Cerdán *et al.*, 2015). این ترکیب با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونولیااز، تجمع ترکیبات فنلی را تقویت کرده و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بهبود می‌بخشد (Portu, López, Santamaría, & Garde-Cerdán, 2017). در دوره پس از برداشت، کاربرد خارجی فنیل‌آلانین می‌تواند با تحریک مسیر فنیل‌پروپانویید، تنش سرما، پوسیدگی قارچی را کاهش داده و کیفیت تغذیه‌ای و حسی میوه‌ها و سبزی‌ها را حفظ کند (Jannatizadeh, Aghdam, Farmani, Maggi, & Morshedloo, 2018). تیمار فنیل‌آلانین باعث ایجاد مقاومت میوه در برابر پاتوژن‌های قارچی و کاهش پوسیدگی در انبه، آووکادو و مرکبات می‌شود (Patel *et al.*, 2020). در یک مطالعه، کاربرد ۸ میلی‌مولار فنیل‌آلانین در انبه باعث کاهش آسیب‌های ناشی از سرمازدگی، حفظ بالاتر محتوای فلاونوئیدها و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، و همچنین کاهش میزان پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید شد (Patel *et al.*, 2023).

گلوکاتایون یک آنتی‌اکسیدان قوی و جزء کلیدی مسیر ASA-GSH است که با حذف ROS از آسیب اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (Hasanuzzaman *et al.*, 2019). این مسیر شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD، CAT، POD و AP و ترکیبات غیرآنزیمی مانند گلوکاتایون و آسکوربیک اسید است که در افزایش تحمل سرما نقش دارند (Song *et al.*, 2016). آنزیم‌های چرخه گلوکاتایون-آسکوربیک اسید، مانند آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز، در کاهش تنش سرما در گیاهان مؤثر هستند (Liu Juan, Li, Liang, Jiang, & Chen, 2019). در تحقیقاتی گلوکاتایون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در میوه توت‌فرنگی (Ge *et al.*, 2019)، ماش (Nahar, Hasanuzzaman, Alam, & Fujita, 2015) و گوجه‌فرنگی (Zhou *et al.*, 2022) افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای کاربرد گلوکاتایون با غلظت ۰/۰۵ درصد از آسیب سرمازدگی در میوه‌های فلفل دلمه‌ای جلوگیری کرد (Yao *et al.*, 2021).

با این حال، چیکو به دلیل ماهیت کلماتریک و نرخ بالای متابولیسم پس از برداشت، ماندگاری کوتاهی دارد و در مدت زمان کمی دچار نرم‌شدگی، تغییر رنگ، کاهش مواد جامد محلول و فساد می‌شود. افزایش فعالیت متابولیسمی، تنفس و تولید اتیلن در طول دوره رسیدگی منجر به کاهش کیفیت و عمر پس از برداشت این میوه می‌شود (Bhutia, Pal, Sen, & Jha, 2011; da Silva Rios, Nakamoto, Braga, & da Silva, 2022; Padmaja & John, 2014). روش‌های مختلفی برای حفظ کیفیت و افزایش عمر انباری چیکو پیشنهاد شده است. انبارمانی در دمای پایین یکی از رایج‌ترین روش‌ها است، اما چیکو در دمای کمتر از ۱۴ درجه سلیسیوس مستعد سرمازدگی و کاهش کیفیت می‌شود (Yahia & Gutierrez-Orozco, 2011). امروزه افزایش ماندگاری محصول‌های باغی توسط تیمارهای ارگانیک توجه زیادی را در دنیا به خود جلب کرده است (Singh, 2023).

مالاتونین یک ترکیب آمفی‌پاتیک، با وزن مولکولی کم است که به‌عنوان محرک زیستی، آنتی‌اکسیدان و تنظیم‌کننده رشد گیاهان تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی عمل می‌کند (Hu, Luo, An, & Li, 2022). این ترکیب با افزایش آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی و حذف ROS، تحمل گیاهان را به سرما و سایر تنش‌ها بهبود می‌بخشد (Zhang *et al.*, 2015). همچنین، تیمار برون‌زا با ملاتونین می‌تواند سرمازدگی را کاهش داده و از طریق تجمع فنل‌ها و مهار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، آسیب اکسیداتیو را محدود کند (Madebo, Hu, Zheng, & Jin, 2021). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تیمار پس از برداشت ملاتونین خارجی می‌تواند تحمل سرما را افزایش داده و کیفیت بهتر میوه‌ها در انبار سرد مانند انار (Aghdam *et al.*, 2020)، گیلاس (Miranda *et al.*, 2020) و گوجه‌فرنگی (Aghdam *et al.*, 2019)، چریمویا (Medina-Santamarina, Guillén, Valero, Castillo, & Serrano, 2023) شود. در تحقیقی ملاتونین ۰/۵ میلی‌مول بر لیتر در میوه انبه، شاخص آسیب سرمازدگی، نشأت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید را کاهش داد در حالی که مقدار Fv/Fm بالاتری را حفظ کرد (Xu *et al.*, 2023).

آرژنین یک آمینواسید کاتیونی با فعالیت ضد میکروبی قوی است که از طریق ساختار غشای سلولی، بر میکروارگانیسم‌ها تأثیر می‌گذارد (Ma Qiumin, Davidson, & Zhong, 2020). این ترکیب، پیش‌ماده‌ای برای بیوسنتز پلی‌آمین‌ها و مولکول‌های سیگنال‌دهنده مانند اکسید نیتریک (NO) با حذف ROS، پیری را به تأخیر انداخته و از کاهش وزن و کم‌آبی سریع میوه‌ها جلوگیری می‌کند (Hasan *et al.*, 2019). همچنین، آرژنین با بهبود کیفیت انبارمانی محصولات باغبانی، به‌عنوان یک افزودنی غذایی ایمن شناخته شده است (Shu *et al.*, 2020). آرژنین برای نگهداری میوه‌ها و سبزی‌ها پس از برداشت

محیط (۲۵ درجه سلسیوس) قرار گرفتند. پس از آن، فاکتورهای کیفی و بیوشیمیایی چیکو اندازه‌گیری شد.

وزن میوه

میوه‌ها توسط ترازو دیجیتال با دقت ± 0.1 گرم وزن شدند تا کاهش وزن در هر دو نمونه شاهد و تیمار اندازه‌گیری شود. کاهش وزن به صورت درصد تغییرات محاسبه شد که با فرمول $(1) W_0 - W_f / W_0 \times 100$ تعیین شد. در این فرمول W_0 وزن اولیه و W_f وزن نهایی میوه است. کاهش وزن به عنوان درصدی از وزن تازه میوه‌ها محاسبه شد (Sandate-Flores et al., 2020b).

سفتی میوه

سفتی بافت میوه سفتی بافت میوه چیکو با استفاده از دستگاه سفتی‌سنج دیجیتال (Turoni Italy, 53205) با قطر پروب ۸ میلی‌متر پس از جداسازی پوست میوه در قسمت استوایی اندازه‌گیری و بر حسب نیوتن گزارش شد (Vetrekar et al., 2015).

مواد جامد محلول (Total suspended solids)

مواد جامد محلول (TSS) آب میوه با استفاده از یک رفاکتومتر دستی DBR95 (ساخت کشور تایلند) در دمای ۲۰ درجه سلسیوس اندازه‌گیری و به صورت درصد (%) در سه تکرار، با ۳ میوه در هر تکرار بیان شد (Phalake, Tetali, & Raut, 2022).

اسید قابل تیتراسیون (Titratable acid)

اسید قابل تیتراسیون (TA) براساس روش AOAC (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. ۱۰ گرم از آب میوه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و فیلتر گردید. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده با استفاده از ۰/۱ نرمال NaOH تیتر شد. پس از افزودن ۱ درصد (V/V) فنل فتالئین، تیتراسیون تا رسیدن به نقطه پایانی (ظهور رنگ صورتی روشن) انجام شد و نتایج به صورت درصد (%) در سه تکرار ثبت گردید.

درصد پوسیدگی

درصد پوسیدگی میوه به صورت مشاهده‌ای در چهار گروه جداگانه: صفر (بدون آسیب)، ۱-ضعیف (صفر تا ۵ درصد آسیب)، ۲-متوسط (۵ تا ۲۵ درصد آسیب)، ۳- تا حدودی شدید (۲۵-۵۰ درصد آسیب)، ۴- بسیار شدید (بیش از ۵۰ درصد) به صورت فرمول (۲) محاسبه شد: (تعداد میوه‌های پوسیده در هر درجه \times درجه پوسیدگی) / تعداد کل میوه در هر تکرار محاسبه شد (Gonzalez-Aguilar, Zavaleta, & Tiznado-Hernandez, 2007).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و آمینواسیدها نقش مهمی در حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری میوه‌ها پس از برداشت دارند. تنظیم‌کننده‌های رشد با تأثیر بر مسیرهای متابولیکی و افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌ها، مقاومت میوه را در برابر تنش‌های پس از برداشت بهبود می‌بخشد و از پوسیدگی زودهنگام جلوگیری می‌کند (Sharma, Pareek, Sagar, Valero, & Serrano, 2017). آمینواسیدها به عنوان پیش‌ساز ترکیبات زیستی مانند پلی‌آمین‌ها و پروتئین‌ها، موجب افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، کاهش آسیب‌های فیزیولوژیک و جلوگیری از نرم شدن و تغییر رنگ می‌شوند (Chowdhury et al., 2023). حفظ کیفیت میوه چیکو طی دوره انبارمانی از اهمیت زیادی برخوردار است. با توجه به حساسیت بالای این میوه به دمای پایین (۱۴ درجه سلسیوس) و فسادپذیری سریع آن در دمای بالاتر (۲۰ درجه سلسیوس)، که منجر به از دست دادن آب میوه و افت کیفیت می‌شود، نگهداری طولانی‌مدت چیکو در شرایط انباری با دمای بالا با چالش جدی مواجه است. تاکنون گزارش‌های محدودی درباره کاربرد آمینواسیدهایی مانند فنیل‌آلانین، گلوکاتینون و ال‌آرژنین و تنظیم‌کننده رشد گیاهی ملاتونین بر این میوه منتشر شده است. همچنین بررسی همزمان این ترکیبات در یک آزمایش واحد تاکنون گزارش نشده است. بنابراین هدف این پژوهش استفاده از آمینواسیدهای مختلف و تنظیم‌کننده رشد به منظور حفظ خصوصیات کیفی و افزایش ماندگاری میوه پس از برداشت است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری میوه و نحوه اعمال تیمار

ابتدا میوه‌های چیکو در مرحله بلوغ تجاری (نیمه دوم تیرماه) از ایستگاه تحقیقات کشاورزی میناب با طول جغرافیایی ۵۷ درجه و ۱۳ دقیقه و عرض جغرافیایی ۲۷ درجه و ۱۰ دقیقه برداشت و بی‌درنگ پس از برداشت، به آزمایشگاه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه هرمزگان منتقل شد. میوه‌های سالم، عاری از آفات و بیماری‌ها و همچنین یکنواخت از لحاظ شکل و وزن انتخاب و پس از شست و شو و گندزدایی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۲ دقیقه در مجاورت هوا خشک شدند. میوه‌ها به مدت ۲ دقیقه در محلول‌های فنیل‌آلانین (۸ میلی‌مولار)، گلوکاتینون (۰/۰۵ درصد وزنی/حجمی)، ملاتونین (۰/۵ میلی‌مولار) و ال-آرژنین (۱ میلی‌مولار) غوطه‌ور شدند و سپس در محیط خشک شدند. پس از اعمال تیمار میوه‌ها به سردخانه با دمای 1 ± 8 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 90 ± 5 درصد قرار گرفتند. این آزمایش در پنج زمان انبارمانی (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز) با سه تکرار در سردخانه نگهداری شدند و سپس یک روز در دمای

اسید آسکوربیک

مقداری از آب میوه، یک میلی‌لیتر محلول متافسفریک/اسید استیک و ۸ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد (AOAC, 1990). قدرت کاهش اسید آسکوربیک به ۲،۶-دی کلروفنول ایندوفنول (۰/۲ درصد، وزن / حجم) تا زمانی که رنگ تغییر کند آزاد شد. محتوای ویتامین ث با استفاده از استاندارد اسید آسکوربیک محاسبه شد و نتایج به صورت میلی‌گرم اسید آسکوربیک در ۱۰۰ گرم وزن تازه بیان شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

توانایی مهار رادیکال DPPH توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با روش (Sandate-Flores *et al.*, 2020a) با برخی تغییرات اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۳/۹ میلی‌لیتر محلول DPPH ساخته شده در ۹۵ درصد (v/v) متانول و ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره بود. محلول به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد.

کاتالاز

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌ها از میوه‌ها که قبلاً در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند، استفاده شد. ابتدا حدود ۰/۵ گرم از هر نمونه گیاهی در هاون و به کمک نیتروژن مایع به خوبی پودر شد و سپس ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج که شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸)، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، و ۴ درصد پلی‌وینیل پیرولیدون بود، هموژنیزه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند (Hasanuzzaman, Alam, Nahar, Ahamed, & Fujita, 2014). پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها، مایع رویی نمونه‌ها به تیوب‌های جدید منتقل و از آن برای اندازه‌گیری میزان فعالیت‌های آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز استفاده شد. آنزیم کاتالاز H_2O_2 را بدون نیاز به فاکتور احیا کننده، به اکسیژن و آب تبدیل می‌کند. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش (Hasanuzzaman *et al.*, 2014) انجام شد. بدین منظور، ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=7، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد به آن اضافه شد و میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت دو دقیقه با فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای ثبت گردید. به دلیل تجزیه H_2O_2 ، فعالیت کاتالاز بر حسب میکرومول H_2O_2 بر گرم وزن تازه در دقیقه بیان شد. غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) با استفاده از ضریب خاموشی ۰/۲۸ میلی‌مول بر سانتی‌متر مربع برای کمی‌سازی دقیق محاسبه شد.

آنالیز آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل نوع تیمار (فنیل‌آلانین، گلوکاتینون، ملاتونین و ال-آرژنین) و فاکتور دوم شامل زمان انبارمانی (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز) بود. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. برای بررسی تفاوت میان تیمارها و اثرات زمان انبارمانی، از آزمون ANOVA یک طرفه استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

کاهش وزن

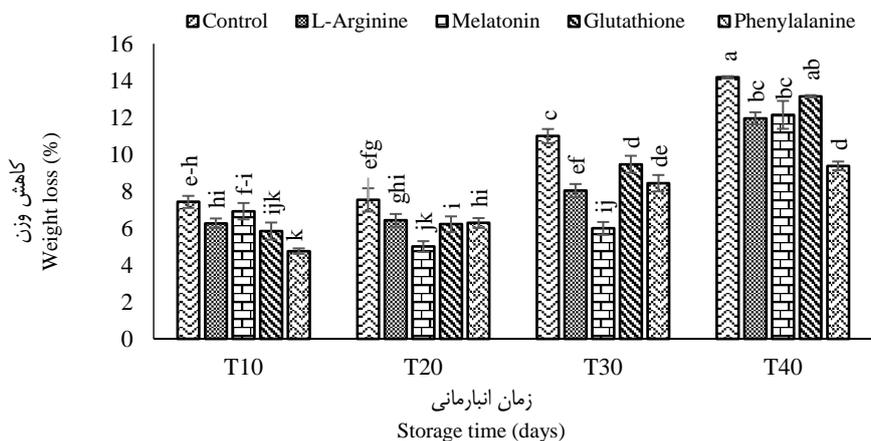
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل تیمار در زمان بر وزن میوه چیکو در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با افزایش زمان میزان کاهش وزن میوه چیکو افزایش یافت، در حالی که تیمارها از افت وزن جلوگیری کردند. در پایان آزمایش (زمان ۴۰ روز) تیمار فنیل‌آلانین به میزان ۹/۳۷ درصد از کاهش وزن میوه چیکو جلوگیری نمود (شکل ۱). تیمار فنیل‌آلانین نسبت به شاهد به میزان ۳۳/۹۲ درصد از افت وزن میوه جلوگیری کرد (شکل ۱). مشابه این نتایج در پژوهشی تیمار فنیل‌آلانین و اتیلن از کاهش وزن میوه مرکبات ناشی از سرما جلوگیری کرد (Lafuente, Zacarias, & Dupille, 2001; Martínez-Télez, Sanchez-Ballesta, & Dupille, 2001). همچنین در مطالعاتی فنیل‌آلانین از افت وزن میوه گلابی (Jinfeng) (Wang *et al.*, 2023) و توت‌فرنگی (Pang *et al.*, 2020) در مقایسه با شاهد جلوگیری کرد. تیمار فنیل‌آلانین در ۲۱ روز از کاهش وزن میوه بادمجان به میزان ۷/۵ درصد در مقایسه با شاهد جلوگیری کرد (Najafi, Barzegar, Razavi, & Ghahremani, 2021). تیمار شده با فنیل‌آلانین در غلظت ۳۰ میلی‌مولار در پایان دوره نگهداری، توانست وزن میوه را حفظ کند (Asgarian, Karimi, & Ghabooli, 2022).

فنیل‌آلانین به عنوان پیش‌ساز مهم در بیوسنتز ترکیبات فنلی (مانند فلاونوئیدها و لیگنین) عمل می‌کند. این ترکیبات به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌توانند از تخریب سلولی جلوگیری کنند و به طور مستقیم از کاهش وزن میوه جلوگیری کنند (de la Rosa, Moreno, Escamilla, Rodrigo-García, & Alvarez-Parrilla, 2019). فنیل‌آلانین می‌تواند از طریق تقویت ساختار دیواره سلولی و افزایش تشکیل لیگنین‌ها در میوه، مقاومت مکانیکی بافت را افزایش دهد. این موضوع از تغییرات فیزیکی و تخریب سریع بافت میوه جلوگیری می‌کند و باعث حفظ وزن بیشتر می‌شود (Oyom *et al.*, 2022).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر ساده و متقابل تیمارهای آرژنین، ملاتونین، گلوتاتیون، فنیل آلانین و زمان بر صفات کمی و کیفی میوه چیکو
Table 1- Variance analysis of simple and reciprocal effects of L-arginine, melatonin, glutathione and phenylalanine treatments and time on quantitative and qualitative traits of Sapodilla fruit

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares					TSS/TA	پوسیدگی Decay
		کاهش وزن Weight loss	سفتی Firmness	مواد جامدمحلول TSS	اسید قابل تیتراسیون TA			
تیمار Treatment	4	233.65**	2931.42**	93.52**	0.241**	490.66**	13.87**	
زمان Time	4	37.11**	373.09**	5.011**	0.0076**	7977.03**	188.17**	
تیمار × زمان Treatment × Time	16	53.38**	572.99**	17.36**	0.0246*	108.00**	0.142**	
خطای آزمایش Test error	50	0.540	30.51	1.19	0.00082	29.58	0.053	
ضریب تغییرات (درصد) C.V (%)	-	11.04	6.93	4.69	6.65	9.11	29.13	

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.
ns, ** and *: non-significant, significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای آرژنین، ملاتونین، گلوتاتیون و فنیل آلانین بر کاهش وزن میوه چیکو در زمان نگهداری (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز)

حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن است ($p < 0.05$). نوار خطا نشان دهنده خطای استاندارد است ($n = 3$).

Fig. 1. Comparison of the average interaction effect of L-arginine, melatonin, glutathione and phenylalanine treatments on weight loss of sapodilla fruit during storage (0, 10, 20, 30 and 40 days)

Different letters indicate significant differences between treatments based on Duncan's range test ($p < 0.05$). Error bars indicate standard error ($n = 3$).

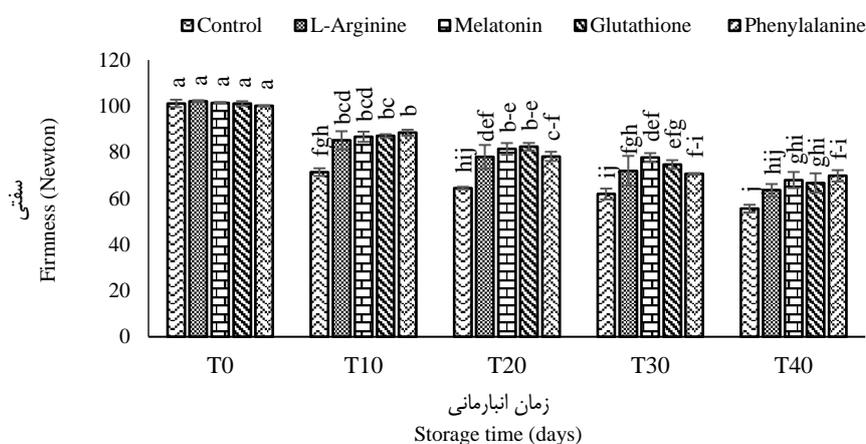
سبب کاهش نرم شدن میوه چیکو به ترتیب به میزان ۲۲/۳۱ و ۱۹/۹۵ درصد نسبت به شاهد شد (شکل ۲). سفتی میوه یک شاخص مهم از کیفیت و رسیدگی است و معمولاً با گذشت زمان و افزایش فرآیندهای نرم شدن بافت، کاهش می یابد (Tian & Xu, 2023). تیمارهای ملاتونین و گلوتاتیون نسبت به شاهد توانسته اند این کاهش را به طور قابل ملاحظه ای به تأخیر بیندازند. یکی از عوامل اصلی نرم شدن میوه ها فعالیت آنزیم هایی نظیر پلی گالاکتوروناز و پکتین متیل استراز است که باعث تخریب دیواره های سلولی و نرم شدن بافت میوه می شوند (Liu

سفتی

براساس نتایج تجزیه واریانس داده ها اثر متقابل تیمار و زمان بر سفتی میوه چیکو در سطح احتمال یک درصد معنی دار می باشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد که طی زمان نگهداری سفتی میوه کاهش یافت، در حالی که تیمارها سبب افزایش این پارامتر شدند. بیشترین و کمترین میزان سفتی در پایان آزمایش میوه به ترتیب در تیمارهای ملاتونین و گلوتاتیون (۶۷/۹۷ و ۶۶/۶۶ نیوتن) و شاهد (۵۵/۵۷ نیوتن) مشاهده شد (شکل ۲). تیمارهای ملاتونین و گلوتاتیون

طریق کاهش تولید اتیلن (که یکی از عوامل کلیدی در نرم شدن میوه است) فرآیند نرم شدن را به تأخیر بیندازد (Sun *et al.*, 2015). در تحقیقی تیمار ملاتونین ۲۰۰ میکرومول در لیتر سبب افزایش سفتی میوه پرتقال ناول شد (Ma Qiaoli *et al.*, 2021). سفتی میوه توت‌فرنگی در غوطه‌وری با تیمار ملاتونین ۰/۱ میلی‌مولار در مقایسه با شاهد مشاهده شد (Liu, Zheng, Sheng, Liu, & Zheng, 2018). در پژوهشی کاربرد ملاتونین ۰/۵ میلی‌مولار و غوطه‌وری به مدت یک ساعت سبب سفتی میوه انبه در طول ذخیره‌سازی شد (Liu *et al.*, 2020). در گزارشی تیمار گلوکاتونین ۵ میلی‌مولار سفتی میوه انبه را به ترتیب به میزان ۲۵/۹ و ۳۰/۷۰ درصد در روزهای ۴ و ۸ افزایش داد (Zhou *et al.*, 2023).

ملاتونین و گلوکاتونین به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی خود می‌توانند از تخریب غشای سلولی و فعالیت این آنزیم‌ها جلوگیری کرده و بدین ترتیب سفتی بافت را حفظ کنند (Rastegar, Khankahdani, & Rahimzadeh, 2020; Wang *et al.*, 2022). ملاتونین و گلوکاتونین می‌توانند از طریق کاهش تنش اکسیداتیو و تثبیت غشای سلولی، دیواره‌های سلولی را تقویت کنند. این تقویت باعث می‌شود که بافت میوه برای مدت طولانی‌تری سفت بماند و از نرم شدن سریع جلوگیری شود (Ding, Dai, Zhang, Bi, & Prusky, 2024; Michailidis *et al.*, 2019). ملاتونین به عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده می‌تواند به تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک از جمله رسیدگی میوه کمک کند. این هورمون گیاهی ممکن است از



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای آرژنین، ملاتونین، گلوکاتونین و فنیل آلانین بر سفتی میوه چیکو در زمان نگهداری (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز)

حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن است ($p < 0.05$). نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است ($n = 3$).

Fig. 2. Comparison of the average interaction effect of L-arginine, melatonin, glutathione and phenylalanine treatments on the soluble solids of Sapodilla fruit during storage (0, 10, 20, 30 and 40 days)

Different letters indicate significant differences between treatments based on Duncan's range test ($p < 0.05$). Error bars indicate standard error ($n = 3$).

زغال اخته سبب بهبود مواد جامد محلول شد (Wang *et al.*, 2023). در پژوهشی نتایج نشان داد استفاده از ملاتونین ۰/۱ یا ۱ میلی‌مولار سبب کاهش مواد جامد محلول میوه توت‌فرنگی و کاهش پیری میوه شد (Liu *et al.*, 2018). در تحقیقی ملاتونین ۱۰۰۰ میکرومول در لیتر نسبت به سایر دوزها سبب کاهش مواد جامد محلول در میوه شلیل در ۴۰ روز نگهداری شد (Bal, 2021). ملاتونین ۲۰۰ میکرومول در لیتر باعث کاهش قابل توجهی در میوه پرتقال ناول (Newhall) شد که نشان‌دهنده مانع از کاهش کیفیت میوه شد (Ma Qiaoli *et al.*, 2021). در تحقیقاتی تیمار گلوکاتونین ۵ میلی‌مولار باعث کاهش ۱۰/۲۵ درصدی مواد جامد محلول در انبه شد (Zhou *et al.*, 2023).

مواد جامد محلول (TSS)

برطبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها اثر متقابل تیمار و زمان بر مواد جامد محلول میوه چیکو در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). میزان TSS با گذشت زمان افزایش یافت (شکل ۳ الف). بیشترین و کمترین میزان TSS به ترتیب در شاهد و تیمارهای آرژنین، ملاتونین و گلوکاتونین مشاهده شد (شکل ۳ الف). در پایان ۴۰ روز آزمایش، تیمارهای آرژنین، ملاتونین و گلوکاتونین به میزان ۶/۹۸، ۶/۶۰ و ۶/۴۱ درصد نسبت به شاهد سبب کاهش TSS در میوه چیکو شدند (شکل ۳ الف). در مطالعه‌ای میوه‌های توت‌فرنگی تیمار شده با ۱ میلی‌مولار آرژنین سبب کاهش مواد جامد محلول در مقایسه با شاهد شد (Shu *et al.*, 2020). در تحقیقی اثر مثبت تیمار آرژنین بر میوه

اسید قابل تیتراسیون (TA)

افزایش TSS در طول زمان یکی از شاخص‌های متداول رسیدگی و تغییرات فیزیولوژیک در میوه‌ها است (Beckles, 2012). مواد جامد محلول عمدتاً شامل قندها، اسیدهای آلی و ترکیبات معدنی هستند که در نتیجه تجزیه ذخایر انرژی در طول دوره نگهداری افزایش می‌یابند (Famiani, Battistelli, Moscatello, Cruz-Castillo, & Walker, 2015). آرژنین، ملاتونین و گلوکاتینون ممکن است با کاهش سرعت تنفس میوه به تعویق افتادن فرآیندهای کاتابولیک (مثل تبدیل نشاسته به قند) کمک کنند. تنفس کمتر به معنای استفاده کمتر از ذخایر انرژی و کاهش تبدیل کربوهیدرات‌های پیچیده به مواد جامد محلول است (Kader & Yahia, 2011). ملاتونین و گلوکاتینون هر دو به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی شناخته می‌شوند که می‌توانند تنش اکسیداتیو را کاهش داده و تخریب سلولی را به تعویق بیندازند (Reiter et al., 2016). این موضوع ممکن است از تجزیه سریع ذخایر قندی جلوگیری کند و افزایش مواد جامد محلول را کاهش دهد. ال-آرژنین به‌عنوان یک آمینواسید کلیدی در مسیرهای متابولیسم نیتروژن عمل می‌کند و می‌تواند به تنظیم سنتز پروتئین‌ها و دیگر متابولیت‌های مهم بپردازد. این موضوع باعث به تأخیر افتادن تجزیه ترکیبات ذخیره‌ای و کاهش سرعت رسیدگی می‌شود (Pedrazini, Martinez, dos Santos, & Groppo, 2024).

TSS/TA

نتایج تحلیل واریانس نشان داد که اثر متقابل تیمار و زمان بر TA و TSS/TA میوه چیکو به‌ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۱). در پایان آزمایش افزایش اسید قابل تیتراسیون در میوه چیکو به‌میزان ۳۲ درصد توسط تیمار آرژنین نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۳ ب). در ۴۰ روز آزمایش، افزایش میزان TSS/TA در میوه چیکو در طی زمان مشاهده شد؛ در حالی که تیمار ال-آرژنین به میزان ۲۸/۲۹ درصد سبب کاهش این صفت در مقایسه با شاهد شد (شکل ۳ ج). افزایش نسبت TSS/TA در میوه‌ها به‌عنوان نشانه‌ای از رسیدگی تغییرات طعمی در طول زمان نگهداری شناخته می‌شود (Fawole & Opara, 2013). اما کاهش این نسبت با تیمار آرژنین در مقایسه با شاهد نشان دهنده‌ی این است که آرژنین می‌تواند با حفظ اسیدهای آلی و جلوگیری از کاهش سریع اسیدیته در طول زمان، روند رسیدگی و شیرینی نسبی میوه را کنترل کند. ال-آرژنین ممکن است به‌عنوان یک پیش‌ساز یا کوفاکتور برای آنزیم‌هایی که در سنتز اسیدهای آلی نقش دارند عمل کند. این امر منجر به افزایش سرعت و سنتز این ترکیبات در میوه می‌شود (Aguayo, Martínez-Sánchez, & ...).

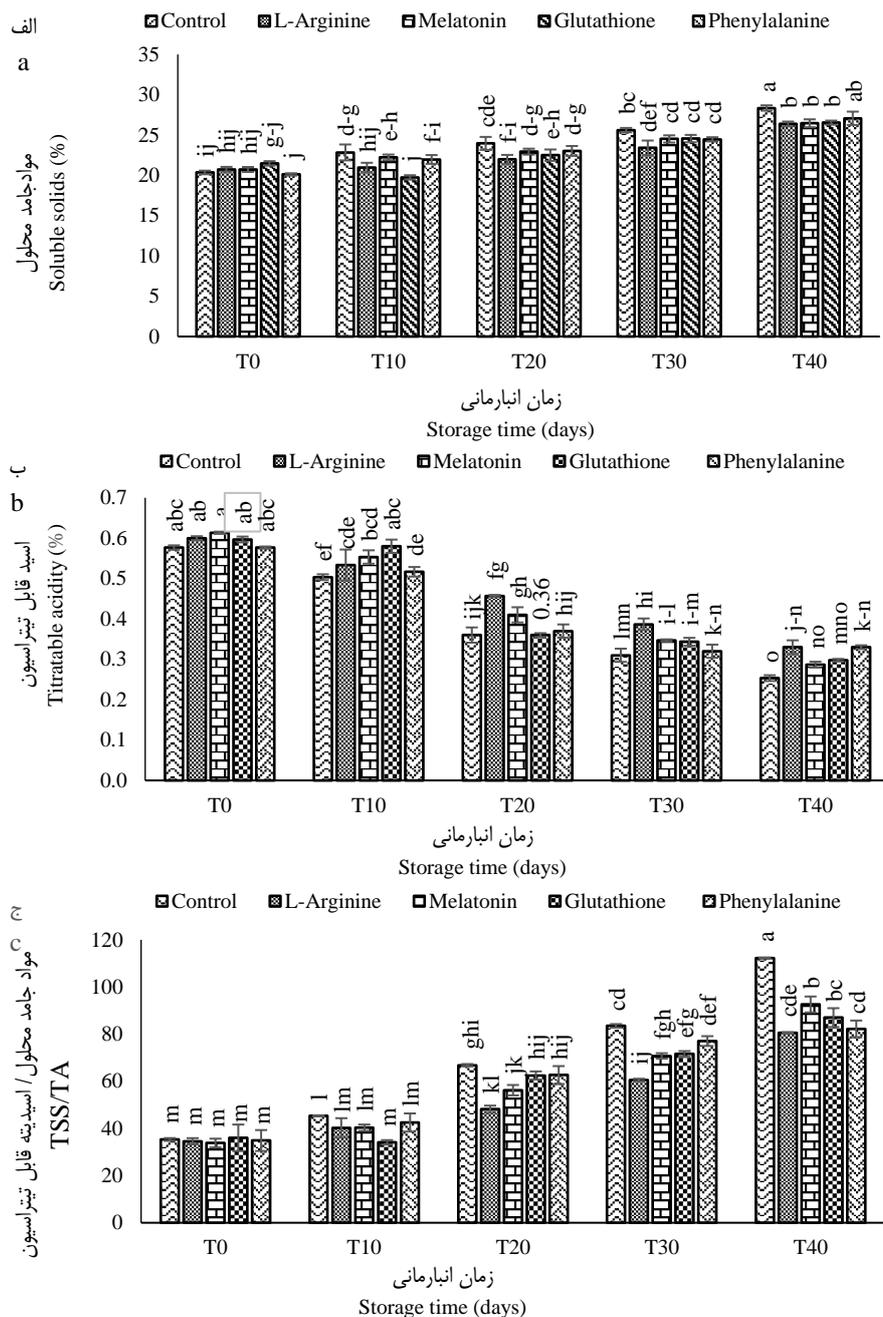
آرژنین می‌تواند بر روی مسیرهای متابولیکی مختلف تأثیر گذاشته و آن‌ها را به سمت سنتز اسیدهای آلی هدایت کند (Jiang, Sheng, Wu, Ye, & Zhang, 2021). در تحقیقی روی توت فرنگی، آرژنین یک میلی‌مولار به بهبود اسیدیته قابل تیتراسیون و افزایش مقاومت در برابر فساد کمک کرد (Shu et al., 2020). در مطالعه‌ی تیمار آرژنین باعث حفظ اسیدیته و افزایش ماندگاری میوه کیوی شد که به بهبود طعم و کیفیت در طول دوره نگهداری کمک کرد (Khan, Al Azzawi, Ali, & Yun, 2023).

درصد پوسیدگی میوه

نتایج تجزیه واریانس داده‌های جدول ۱ نشان داد که اثر متقابل تیمار و زمان بر میزان پوسیدگی میوه چیکو در سطح احتمال یک درصد به‌طور معنی‌داری تأثیرگذار بود. تیمارها در طی زمان سبب کاهش پوسیدگی میوه چیکو شدند. در پایان زمان آزمایش بیشترین و کمترین افزایش به‌ترتیب در شاهد و تیمار ال-آرژنین و گلوکاتینون مشاهده شد (شکل ۴). در ۴۰ روز نگهداری میوه چیکو تیمارهای ال-آرژنین و گلوکاتینون سبب کاهش درصد پوسیدگی در میوه چیکو به‌ترتیب به‌میزان ۴۵/۸۱ و ۴۱/۴۳ درصد در مقایسه با شاهد شد (شکل ۴). کاهش درصد پوسیدگی میوه چیکو در اثر تیمارهای ال-آرژنین و گلوکاتینون به‌دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی این ترکیبات است که از اکسیداسیون پلی‌فنل‌ها و در نتیجه درصد پوسیدگی جلوگیری می‌کنند. تیمار با گلوکاتینون در سبب و انگور باعث کاهش درصد پوسیدگی و حفظ رنگ طبیعی میوه شد که به‌دلیل مهار فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو بود (Shu et al., 2020). در تحقیقی دیگر استفاده از آرژنین در توت‌فرنگی منجر به کاهش درصد پوسیدگی شد و به حفظ رنگ و طراوت میوه در طول دوره نگهداری کمک کرد (Shu et al., 2020).

اسید آسکوربیک

بررسی داده‌های جدول ۲ نشان داد که اثر متقابل تیمار و زمان بر مقدار اسیدآسکوربیک میوه چیکو در سطح احتمال یک درصد به‌طور معنی‌داری قابل توجه بود. تیمار گلوکاتینون در اکثر زمان‌های نگهداری باعث افزایش مقدار ویژگی اسید آسکوربیک شده است. در پایان زمان نگهداری (۴۰ روز) تیمار گلوکاتینون سبب افزایش میزان اسید آسکوربیک در میوه چیکو به مقدار ۵۶/۷۹ درصد نسبت به شاهد شد (شکل ۵).

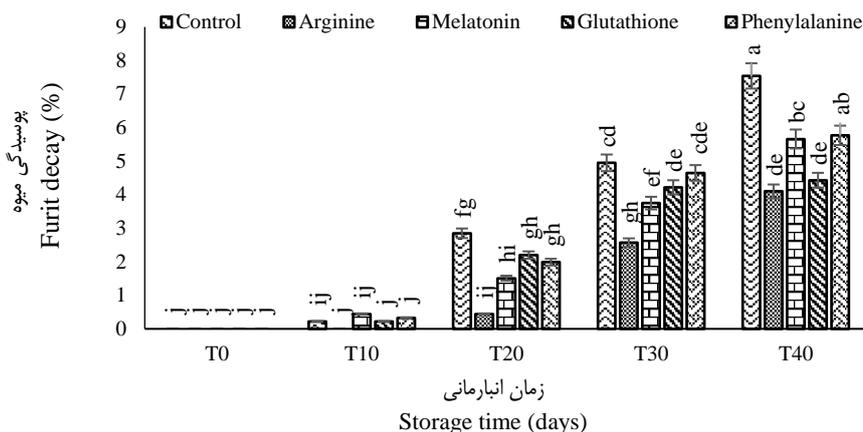


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای آرژنین، ملاتونین، گلوکاتیبون و فنیل‌آلانین بر الف) مواد جامد محلول ب) اسید قابل تیتراسیون ج) مواد جامد محلول / اسید قابل تیتراسیون میوه چیکو در زمان نگهداری (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز)

حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن است (p < 0.05). نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است (n = 3).

Fig. 3. Comparison of the average interaction effect of L-arginine, melatonin, glutathione and phenylalanine treatments on the a) soluble solids b) titratable acidity c) soluble solids / titratable acidity of Sapodilla fruit during storage (0, 10, 20, 30 and 40 days)

Different letters indicate significant differences between treatments based on Duncan's range test (p < 0.05). Error bars indicate standard error (n = 3).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای آرژنین، ملاتونین، گلوکاتینون و فنیل آلانین بر شاخص درصد پوسیدگی میوه چیکو در زمان نگهداری (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز)

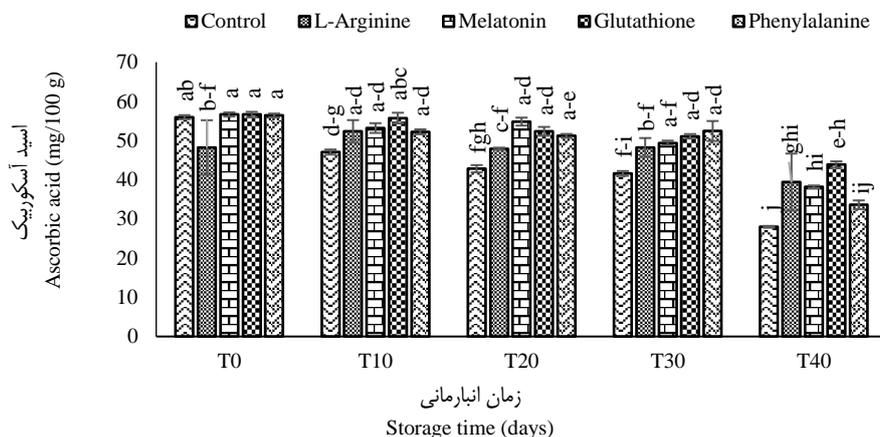
حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن است ($p < 0.05$). نوار خطا نشان دهنده خطای استاندارد است ($n = 3$).

Fig. 4. Comparison of the average interaction effect of L-arginine, melatonin, glutathione and phenylalanine treatments on fruit decay percentage of Sapodilla fruit during storage (0, 10, 20, 30 and 40 days)

Different letters indicate significant differences between treatments based on Duncan's range test ($p < 0.05$). Error bars indicate standard error ($n = 3$).

آسکوربیک در طول نگهداری شد و از تخریب آن جلوگیری کرد (Khan et al., 2023). همچنین در مطالعه‌ای دیگر روی پرتقال، تیمار گلوکاتینون از کاهش اسید آسکوربیک در طول زمان جلوگیری کرد و به حفظ کیفیت تغذیه‌ای میوه کمک نمود (Maslahati Fard & Hassanpoor, 2023).

افزایش سطح اسید آسکوربیک (ویتامین C) در میوه چیکو در اثر تیمار گلوکاتینون احتمالاً به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی گلوکاتینون و نقش آن در کاهش اکسیداسیون و حفظ ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است. گلوکاتینون می‌تواند به‌عنوان یک عامل احیاکننده عمل کرده و از تجزیه اسید آسکوربیک به‌یژه در شرایط نگهداری طولانی مدت جلوگیری کند. در میوه کیوی استفاده از گلوکاتینون باعث حفظ سطح بالای اسید



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای آرژنین، ملاتونین، گلوکاتینون و فنیل آلانین بر میزان اسید اسکوربیک میوه چیکو در زمان نگهداری (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز)

میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان دهنده خطای استاندارد است.

Fig. 5. Comparison of the average interaction effect of L-arginine, melatonin, glutathione and phenylalanine treatments on ascorbic acid of Sapodilla fruit during storage (0, 10, 20, 30 and 40 days)

The mean of similar letters does not have a significant difference at the 5% probability level. Error bar indicates standard error.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر ساده و متقابل تیمارهای آرژنین، ملاتونین، گلوکاتونین و فنیل‌آلانین بر صفات اسید آسکوربیک، آنتی‌اکسیدان و کاتالاز میوه چیکو

Table 2- Analysis of variance of simple and interaction effects of arginine, melatonin, glutathione and phenylalanine treatments on ascorbic acid, antioxidant and catalase traits of chico fruit

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares		
		اسید آسکوربیک Ascorbic acid	آنتی‌اکسیدان Antioxidant	کاتالاز Catalase
تیمار Treatment	4	733.55**	873.13**	446.52**
زمان Time	4	176.21**	250.14**	29.94**
تیمار × زمان Treatment × Time	16	171.89**	225.22**	85.13**
خطای آزمایش Test error	50	24.08	8.13	1.21
ضریب تغییرات (درصد) C.V (%)	-	10.14	5.47	4.90

ns, ** و * به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

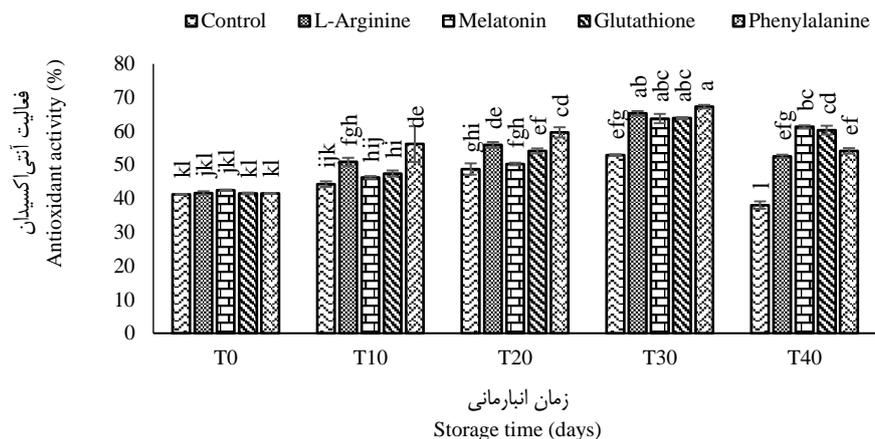
ns, ** and *: non-significant, significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively

فعالیت آنزیم کاتالاز

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل تیمار و زمان بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). در ۴۰ روز نگهداری فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت (شکل ۷). بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم کاتالاز به ترتیب به میزان ۳۳/۰۶ و ۲۵/۲۲ واحد/ میلی‌گرم وزن تازه مشاهده شد (شکل ۷). در پایان زمان نگهداری (روز ۴۰) تیمار آرژنین سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز به میزان ۳۱/۰۸ درصد در مقایسه با شاهد شد (شکل ۷). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در میوه چیکو در طول دوره نگهداری به‌عنوان یک واکنش دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد و افزایش تولید هیدروژن پراکسید (H_2O_2) است. کاتالاز به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان عمل کرده و وظیفه دارد هیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن تجزیه کند، که این امر به کاهش آسیب‌های اکسیداتیو کمک می‌کند (Ighodaro & Akinloye, 2018). تیمار آرژنین به‌طور خاص با افزایش سطح نیتریک اکسید در سلول‌ها، می‌تواند به تحریک بیان ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز منجر شود (Liang et al., 2018). نیتریک اکسید به‌عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده در گیاهان شناخته می‌شود که می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد و مکانیسم‌های دفاعی گیاه را تقویت کند (Groß, Durner, & Gaupels, 2013). مشابه این نتایج، در پژوهشی آرژنین ۱ میلی‌مولار باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در میوه توت‌فرنگی شد (Shu et al., 2020). همچنین افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در خرمالو با کاربرد ال-آرژنین ۱ میلی‌مولار مشاهده شد (Khan et al., 2023).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس جدول ۲ نشان داد که اثر متقابل تیمار و زمان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه چیکو در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در این مطالعه افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میوه چیکو در طی زمان مشاهده شد (شکل ۶). تیمار فنیل‌آلانین در روز ۳۰ نگهداری به‌میزان ۶۷/۲۸ درصد و در روز ۴۰ آزمایش میزان آنتی‌اکسیدان ملاتونین ۶۱/۳۰ درصد مشاهده شد (شکل ۶). افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میوه چیکو به‌عنوان یک پاسخ دفاعی به تنش‌های محیطی و فیزیولوژیک در طول دوره نگهداری مشاهده می‌شود. تیمار فنیل‌آلانین با تحریک سنتز ترکیبات فیتوشیمیایی، مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها می‌تواند به‌طور مستقیم و غیرمستقیم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر بگذارد. این ترکیبات به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی طبیعی عمل کرده و با کاهش تنش اکسیداتیو، به حفظ سلامت سلولی و کیفیت میوه کمک می‌کنند (Holghoomi et al., 2023). همچنین، ملاتونین به‌عنوان یک هورمون طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش دهد و در نتیجه به کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد کمک کند (Zarezadeh et al., 2022). این هورمون با تقویت مکانیسم‌های دفاعی گیاه، موجب افزایش توانایی میوه در مقابله با تنش‌های اکسیداتیو و در نهایت افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میوه چیکو می‌شود (Wang & Bi, 2021). کاربرد تیمار فنیل‌آلانین ۵ میلی‌مولار در مدت ۲۸ روز نگهداری میوه گوجه‌فرنگی سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد (Aghdam, Moradi, Razavi, & Rabiei, 2019).

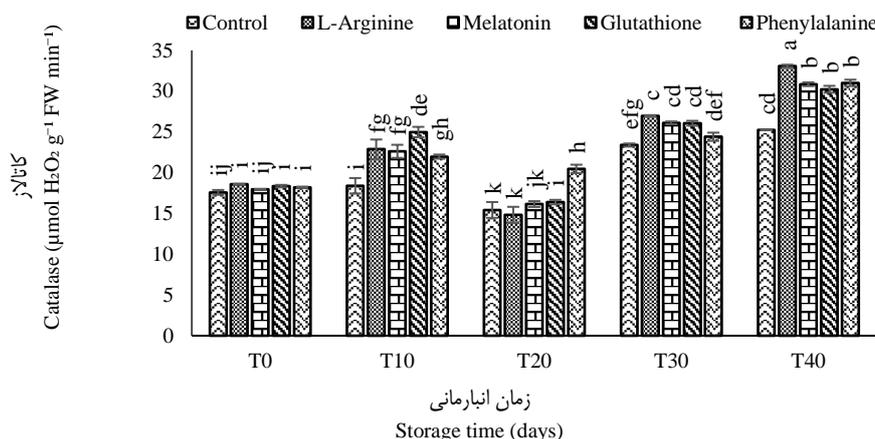


شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای آرژنین، ملاتونین، گلوکاتینون و فنیل آلانین بر آنتی اکسیدان سفتی میوه چیکو در زمان نگهداری (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ روز)

میانگین حروف مشابه اختلاف معنی داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان دهنده خطای استاندارد است.

Fig. 6. Comparison of the average interaction effect of L-arginine, melatonin, glutathione, and phenylalanine treatments on antioxidant activity of Sapodilla fruit firmness during storage (0, 10, 20, 30, and 40 days)

The mean of similar letters does not have a significant difference at the 5% probability level. Error bar indicates standard error.



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای آرژنین، ملاتونین، گلوکاتینون و فنیل آلانین بر فعالیت آنزیم کاتالاز میوه چیکو در زمان نگهداری (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ روز)

میانگین حروف مشابه اختلاف معنی داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان دهنده خطای استاندارد است.

Fig. 5. Comparison of the average interaction effect of L-arginine, melatonin, glutathione and phenylalanine treatments on catalase enzyme activity of sapodilla fruit during storage (0, 10, 20, 30 and 40 days)

The mean of similar letters does not have a significant difference at the 5% probability level. Error bar indicates standard error.

نتیجه گیری

تیمار فنیل آلانین با جلوگیری از کاهش وزن میوه و حفظ سفتی بافت نقش مهمی در نگهداری کیفیت میوه ایفا کرد. تیمار ال-آرژنین با افزایش اسیدیته قابل تیتراسیون و کاهش میزان TSS/TA، به بهبود ویژگی‌های طعمی و کیفیت میوه کمک کرد. تیمار ملاتونین نیز سفتی میوه را افزایش داد و اثرات مثبت دیگری را در طول دوره نگهداری نشان داد. در این مطالعه تیمار گلوکاتینون به عنوان بهترین گزینه برای حفظ ویژگی‌های تغذیه‌ای و کیفیت کلی میوه شناسایی شد، که می‌تواند به کاهش ضایعات و افزایش رضایت مصرف کنندگان کمک شایانی کند. با توجه به نتایج این پژوهش، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از تیمارهای فنیل آلانین، آرژنین، ملاتونین و گلوکاتینون به طور مؤثری باعث بهبود و حفظ کیفیت میوه چیکو طی ۴۰ روز نگهداری در دمای سردخانه با دمای 1 ± 8 درجه سلسیوس شد. نتایج نشان داد که تمامی تیمارها به طور مؤثری بر حفظ کیفیت و افزایش عمر مفید میوه تأثیر دارند. اما تیمار گلوکاتینون به عنوان بهترین تیمار شناسایی شد. این تیمار به طور قابل توجهی موجب افزایش اسید اسکوربیک و همچنین بهبود سفتی میوه گردید.

و اعتبارسنجی، ویرایش مقاله، تأمین مالی؛ **میرزاعلیان دستجردی**: روش‌شناسی، مدیریت داده‌ها، نظارت و اعتبارسنجی، ویرایش مقاله، تأمین مالی؛ **رمضانیان**: نظارت و اعتبارسنجی، ویرایش مقاله.

منابع تأمین مالی

این کار توسط دانشگاه هرمزگان، پشتیبانی مالی شد.

تأثیر این ترکیبات بر سایر میوه‌های گرمسیری بررسی شود. همچنین، ارزیابی مکانیسم‌های مولکولی و بیوشیمیایی مرتبط با تأثیر این ترکیبات می‌تواند درک بهتری از فرآیندهای مرتبط با حفظ کیفیت پس از برداشت فراهم کند. استفاده از این تیمارها در مقیاس صنعتی و بررسی اثرات اقتصادی آن نیز می‌تواند به بهینه‌سازی فرایندهای نگهداری و کاهش ضایعات کمک کند.

میزان مشارکت

ابراهیمی میمند: تحقیق و بررسی، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز داده‌ها، آماده‌سازی پیش‌نویس؛ **جعفری**: مفهوم‌سازی، مدیریت داده‌ها، نظارت

References

- Aghdam, M.S., Luo, Z., Jannatizadeh, A., Sheikh-Assadi, M., Sharaf, Y., Farmani, B., & Razavi, F. (2019). Employing exogenous melatonin applying confers chilling tolerance in tomato fruit by upregulating ZAT2/6/12 giving rise to promotin endogenous polyamines, proline, and nitric oxide accumulation by triggering arginine pathway activity. *Food Chemistry*, 275, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.157>
- Aghdam, M.S., Luo, Z., Li, L., Jannatizadeh, A., Fard, J.R., & Pirzad, F. (2020). Melatonin treatment maintains nutraceutical properties of pomegranate fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 303, 125385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125385>
- Aghdam, M.S., Moradi, M., Razavi, F., & Rabiei, V. (2019). Exogenous phenylalanine application promotes chilling tolerance in tomato fruits during cold storage by ensuring supply of NADPH for activation of ROS scavenging systems. *Scientia Horticulturae*, 246, 818-825. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.074>
- Aguayo, E., Martínez-Sánchez, A., Fernández-Lobato, B., & Alacid, F. (2021). L-Citrulline: a non-essential amino acid with important roles in human health. *Applied Sciences*, 11(7), p.3293. <https://doi.org/10.3390/app11073293>
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Asgarian, Z.S., Karimi, R., Ghabooli, M., & Maleki, M. (2022). Effect of phenylalanine treatment on chilling tolerance and biochemical attributes of grape during postharvest cold storage. *Journal of Berry Research*, 12(4), 513-529. <https://doi.org/10.3233/JBR-220037>
- Babalar, M., Pirzad, F., Sarcheshmeh, M.A.A., Talaei, A., & Lessani, H. (2018). ArginiExogenous treatment attenuates chilling injury of pomegranate fruit during cold storage by enhancing antioxidant system activity. *Postharvest Biology Technology*, 137, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.012>
- Bal, E. (2021). Effect of melatonin treatments on biochemical quality and postharvest life of nectarines. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 288-295. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00636-5>
- Beckles, D.M. (2012). Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 63(1), 129-140. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.05.016>
- Bhutia, W., Pal, R., Sen, S., & Jha, S. (2011). Response of different maturity stages of sapota (*Manilkara achras* Mill.) cv. Kallipatti to in-package ethylene absorbent. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 763-768. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0360-x>
- Chen, S.Q., Jiang, W., & Sun, Z.D. (2022). Mechanism of fungal inhibition activity of N α -lauroyl-L-arginine ethyl ester (LAE) and potential in control of *Penicillium expansum* on postharvest citrus 'Benimadonna' (*Citrus reticulata* × *Citrus sinensis*). *Journal of Agriculture and Food Research*, 102, 4668–4676. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11827>
- Chowdhury, N.N., Islam, M.N., Jafarin, R., Rauf, A., Khalil, A.A., Emran, T.B., Aljohani, A.S., Alhumaydhi, F.A., Lorenzo, J.M., Shariati, M.A., & Simal-Gandara, J. (2023). Natural plant products as effective alternatives to synthetic chemicals for postharvest fruit storage management. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(30), 10332-10350. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2079112>
- da Silva Rios, D.A., Nakamoto, M.M., Braga, A.R.C., & da Silva, E.M.C. (2022). Food coating using vegetable sources: importance and industrial potential, gaps of knowledge, current application, and future trends. *Applied Food Research*, 2(1), 100073. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100073>
- de la Rosa, L.A., Moreno-Escamilla, J.O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271): Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>

15. Ding, R., Dai, X., Zhang, Z., Bi, Y., & Prusky, D. (2024). Composite coating of oleaster gum containing cuminal keeps postharvest quality of cherry tomatoes by reducing respiration and potentiating antioxidant system. *Foods*, 13(10), 1542. <https://doi.org/10.3390/foods13101542>
16. Famiani, F., Battistelli, A., Moscatello, S., Cruz-Castillo, J.G., & Walker, R.P. (2015). The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: occurrence, metabolism and factors affecting their contents-a review. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 21(2), 97-128. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.01.004>
17. Fawole, O.A., & Opara, U.L. (2013). Harvest discrimination of pomegranate fruit: Postharvest quality changes and relationships between instrumental and sensory attributes during shelf life. *Journal of Food Science*, 78(8), S1264-S1272. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12176>
18. Garde-Cerdán, T., Santamaría, P., Rubio-Bretón, P., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., & López, R. (2015). Foliar application of proline, phenylalanine, and urea to Tempranillo vines: Effect on grape volatile composition and comparison with the use of commercial nitrogen fertilizers. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 684-689. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.028>
19. Ge, C., Luo, Y., Mo, F., Xiao, Y., Li, N., & Tang, H. (2019). Effects of glutathione on the ripening quality of strawberry fruits. *AIP Conf. Proc.*, 2079(1). <https://doi.org/10.1063/1.5092391>
20. Gonzalez-Aguilar, G.A., Zavaleta-Gatica, R., & Tiznado-Hernandez, M.E. (2007). Improving postharvest quality of mango 'Haden' by UV-C treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.01.012>
21. Groß, F., Durner, J., & Gaupels, F. (2013). Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science*, 4, 419. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00419>
22. Hasan, M.U., Rehman, R.N.U., Malik, A.U., Haider, M.W., Ahmed, Z., Khan, A.S., & Anwar, R. (2019). Pre-storage application of L-arginine alleviates chilling injury and maintains postharvest quality of cucumber (*Cucumis sativus*). *Journal Horticulture Science Technology*, 2(4), 102-108. <https://doi.org/10.46653/jhst190204102>
23. Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., Nahar, K., Ahamed, K.U., & Fujita, M. (2014). Exogenous salicylic acid alleviates salt stress-induced oxidative damage in *Brassica napus* by enhancing the antioxidant defense and glyoxalase systems. *Australian Journal of Crop Science*, 8(4), 631-639. <https://doi.org/10.3390%2Fantiox11102010>
24. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.B., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J.A., & Fujita, M. (2019). Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, 8(9), 384. <https://doi.org/10.3390%2Fantiox8090384>
25. Holghoomi, R., Hosseini Sarghein, S., Khara, J., Hosseini, B., Rahdar, A., & Kyzas, G.Z. (2023). Foliar application of Phenylalanine functionalized multi-walled carbon nanotube improved the content of volatile compounds of basil grown in greenhouse. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(31), 77385-77407. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27748-x>
26. Hu, H., Luo, S., An, R., & Li, P. (2022). Endogenous melatonin delays sepal senescence and extends the storage life of broccoli florets by decreasing ethylene biosynthesis. *Postharvest Biology and Technology*, 188, 1.11894. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111894>
27. Ighodaro, O., & Akinloye, O. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 378-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
28. Jannatizadeh, A., Aghdam, M.S., Farmani, B., Maggi, F., & Morshedloo, M.R. (2018). β -Aminobutyric acid treatment confers decay tolerance in strawberry fruit by warranting sufficient cellular energy providing. *Scientia Horticulturae*, 240, 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.048>
29. Jiang, Y., Sheng, Q., Wu, X.Y., Ye, B.C., & Zhang, B. (2021). L-arginine production in *Corynebacterium glutamicum*: manipulation and optimization of the metabolic process. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(2), 172-185. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1844625>
30. Kader, A.A., & Yahia, E. (2011). Postharvest biology of tropical and subtropical fruits. In *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits* (pp. 79-111): Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857093622.79>
31. Kaur, J., Singh, A., Singh, B., & Sharma, S. (2020). Sapota. Antioxidants in fruits: Properties and health benefits, 181-199. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7285-2_10
32. Khan, M., Ali, S., Al Azzawi, T.N.I., & Yun, B.-W. (2023). Nitric oxide acts as a key signaling molecule in plant development under stressful conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4782. <https://doi.org/10.3390/ijms24054782>
33. Khan, M.A., Azam, M., Ahmad, S., & Atiq, M. (2023). Improvement of physicochemicals, antioxidant system and softening enzymes by postharvest L-arginine application leads to maintain persimmon fruit quality under low temperature storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(3), 2964-2977. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01835-6>

34. Lafuente, M., Zacarias, L., Martínez-Téllez, M., Sanchez-Ballesta, M., & Dupille, E. (2001). Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(12), 6020-6025. <https://doi.org/10.1021/jf010790b>
35. Li, T., Liu, Y.X., Qin, Q.X., Zhao, L., Wang, Y.T., Wu, X.M., & Liao, X.J. (2021). Development of electrospun films enriched with ethyl lauroyl arginate as novel antimicrobial food packaging materials for fresh strawberry preservation. *Food Control*, 130, 108371. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108371>
36. Liang, M., Wang, Z., Li, H., Cai, L., Pan, J., He, H., & Yang, L. (2018). l-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 115, 315-328. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.029>
37. Liu, C., Zheng, H., Sheng, K., Liu, W., & Zheng, L. (2018). Effects of melatonin treatment on the postharvest quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.016>
38. Liu, J., Li, F., Liang, L., Jiang, Y., & Chen, J. (2019). Fibroin delays chilling injury of postharvest banana fruit via enhanced antioxidant capability during cold storage. *Metabolites*, 9(7), 152. <https://doi.org/10.3390%2Fmetabo9070152>
39. Liu, J., Zhao, Y., Xu, H., Zhao, X., Tan, Y., Li, P., & Liu, D. (2021). Fruit softening correlates with enzymatic activities and compositional changes in fruit cell wall during growing in *Lycium barbarum* L. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(6), 3044-3054. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14948>
40. Liu, S., Huang, H., Huber, D. J., Pan, Y., Shi, X., & Zhang, Z. (2020). Delay of ripening and softening in 'Guifei' mango fruit by postharvest application of melatonin. *Postharvest Biology and Technology*, 163, 111136. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111136>
41. Ma, Q., Davidson, P.M., & Zhong, Q. (2020). Properties and potential food applications of lauric arginate as a cationic antimicrobial. *International Journal of Food Microbiology*, 315, 108417. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108417>
42. Ma, Q., Lin, X., Wei, Q., Yang, X., Zhang, Y.N., & Chen, J. (2021). Melatonin treatment delays postharvest senescence and maintains the organoleptic quality of 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by inhibiting respiration and enhancing antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae*, 286, 236. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110236>
43. Madebo, M.P., Hu, S., Zheng, Y., & Jin, P. (2021). Mechanisms of chilling tolerance in melatonin treated postharvest fruits and vegetables: A review. *Journal of Future Foods*, 1(2), 156-167. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.01.005>
44. Maslahati Fard, S., & Hassanpoor, H. (2023). The effect of arginine on some biochemical attributes strawberry fruit (*Fragaria* × *ananassa* cv. Albion) under deficit fertigation. *Journal of Horticultural Science*, 37(1), 135-149. <https://doi.org/10.1007/s10341-022-00679-6>
45. Medina-Santamarina, J., Guillén, F., Valero, D., Castillo, S., & Serrano, M. (2023). Melatonin treatments reduce chilling injury and delay ripening, leading to maintenance of quality in Cherimoya fruit. *International Journal of Molecular Sciences*, 14;24(4), 3787. <https://doi.org/10.3390/ijms24043787>
46. Michailidis, M., Karagiannis, E., Tanou, G., Sarrou, E., Stavridou, E., Ganopoulos, I., & Molassiotis, A. (2019). An integrated metabolomic and gene expression analysis identifies heat and calcium metabolic networks underlying postharvest sweet cherry fruit senescence. *Planta*, 250, 2009-2022. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03272-6>
47. Miranda, S., Vilches, P., Suazo, M., Pavez, L., García, K., M'endez, M.A., & Pozo, T. (2020). Melatonin triggers metabolic and gene expression changes leading to improved quality traits of two sweet cherry cultivars during cold storage. *Food Chemistry*, 319, Article 126360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126360>
48. Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., & Fujita, M. (2015). Roles of exogenous glutathione in antioxidant defense system and methylglyoxal detoxification during salt stress in mung bean. *Biologia Plantarum*, 59(4), 745-756. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0542-x>
49. Najafi, R., Barzegar, T., Razavi, F., & Ghahremani, Z. (2021). Effect of postharvest treatments of phenylalanine and hydrogen sulfide on maintaining quality and enhancing shelf life of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Horticultural Science*, 34(4), 705-717.
50. Oyom, W., Yu, L., Dai, X., Li, Y.-C., Zhang, Z., Bi, Y., & Tahergorabi, R. (2022). Starch-based composite coatings modulate cell wall modification and softening in Zaosu pears. *Progress in Organic Coatings*, 171, 107014. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.107014>
51. Patel, M.K., Fanyuk, M., Feynberg, O., Maurer, D., Sela, N., Ovadia, R., & Alkan, N. (2023). Phenylalanine induces mango fruit resistance against chilling injuries during storage at suboptimal temperature. *Food Chemistry*, 405, 134909. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134909>
52. Padmaja, N., & John, D. (2014). Preservation of sapota (*Manilkara zapota*) by edible aloe vera gel coating to maintain its quality. *International Journal of Science and Research*, 3, 177-179. <https://doi.org/10.15373/22778179/august2014/51>

53. Pang, L., Wu, Y., Pan, Y., Ban, Z., Li, L., & Li, X. (2020). Insights into exogenous melatonin associated with phenylalanine metabolism in postharvest strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 168, 111244. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111244>
54. Patel, M.K., Maurer, D., Feygenberg, O., Ovadia, A., Elad, Y., Oren-Shamir, M., & Alkan, N. (2020). Phenylalanine: A promising inducer of fruit resistance to postharvest pathogens. *Foods*, 9, 646. <https://doi.org/10.3390/foods9050646>
55. Pedrazini, M.C., Martinez, E.F., dos Santos, V.A.B., & Groppo, F.C. (2024). L-arginine: its role in human physiology, in some diseases and mainly in viral multiplication as a narrative literature review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s43094-024-00673-7>
56. Phalake, S., Tetali, S., & Raut, V. (2022). A blending of sapota and lime juice using different methods of extraction.
57. Portu, J., López, R., Santamaría, P., & Garde-Cerdán, T. (2017). Elicitation with methyl jasmonate supported by precursor feeding with phenylalanine: Effect on Garnacha grape phenolic content. *Food Chemistry*, 237, 416-422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.126>
58. Rastegar, S., Khankahdani, H.H., & Rahimzadeh, M. (2020). Effects of melatonin treatment on the biochemical changes and antioxidant enzyme activity of mango fruit during storage. *Scientia Horticulturae*, 259, 108835. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108835>
59. Reiter, R.J., Mayo, J.C., Tan, D.X., Sainz, R.M., Alatorre-Jimenez, M., & Qin, L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of Pineal Research*, 61(3), 253-278. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>
60. Sandate-Flores, L., Romero-Esquivel, E., Ontiveros, P.R., Celaya, M.F.M., Rodriguez-Rodriguez, J., Rostro-Alanis, M., & Iqbal, H.M. (2020). Physicochemical composition, antioxidant profile and anticancer potentialities of Chico (*Pachycereus weberi*) and Jiotilla (*Escontria chiotilla*) fruits extract. <https://doi.org/10.20944/preprints202001.0347.v1>
61. Sandate-Flores, L., Romero-Esquivel, E., Rodríguez-Rodríguez, J., Rostro-Alanis, M., Melchor-Martínez, E.M., Castillo-Zacarías, C., & Iqbal, H.M. (2020). Functional attributes and anticancer potentialities of chico (*Pachycereus weberi*) and jiotilla (*Escontria chiotilla*) fruits extract. *Plants*, 9(11), 1623. <https://doi.org/10.3390/plants9111623>
62. Sharma, S., Pareek, S., Sagar, N.A., Valero, D., & Serrano, M. (2017). Modulatory effects of exogenously applied polyamines on postharvest physiology, antioxidant system and shelf life of fruits: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1789. <https://doi.org/10.3390/ijms18081789>
63. Shu, P., Min, D., Ai, W., Li, J., Zhou, J., Li, Z., & Jiang, Y. (2020). L-Arginine treatment attenuates postharvest decay and maintains quality of strawberry fruit by promoting nitric oxide synthase pathway. *Postharvest Biology and Technology*, 168, 111253. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111253>
64. Singh, A.K. (2023). *Horticultural practices and post-harvest technology*. Academic Guru Publishing House.
65. Song, L., Wang, J., Shafi, M., Liu, Y., Wang, J., Wu, J., & Wu, A. (2016). Hypobaric treatment effects on chilling injury, mitochondrial dysfunction, and the ascorbate–glutathione (AsA-GSH) cycle in postharvest peach fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), 4665-4674. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00623>
66. Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Zhang, H., Li, D., Shi, J., & Ren, S. (2015). Melatonin promotes ripening and improves quality of tomato fruit during postharvest life. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 657-668. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru332>
67. Sun, Z.D., Hao, J.S., Yang, H.Q., & Chen, H.Y. (2018). Effect of chitosan coatings enriched with lauroyl arginate ethyl and montmorillonite on microbial growth and quality maintenance of minimally processed table grapes (*Vitis vinifera* L. Kyoho) during cold storage. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1853-1862. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-018-2146-x>
68. Tian, S., & Xu, H. (2023). Mechanical-based and optical-based methods for nondestructive evaluation of fruit firmness. *Food Reviews International*, 39(7), 4009-4039. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2015376>
69. Vetrekar, N., Gad, R., Fernandes, I., Parab, J., Desai, A., Pawar, J., & Umopathy, S. (2015). Non-invasive hyperspectral imaging approach for fruit quality control application and classification: case study of apple, chikoo, guava fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 6978-6989. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1838-8>
70. Wang, B., & Bi, Y. (2021). The role of signal production and transduction in induced resistance of harvested fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 5, fyab011. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyab011>
71. Wang, J., Wang, Y., Li, Y., Yang, L., Sun, B., Zhang, Y., & Yan, X. (2023). L-Arginine treatment maintains postharvest quality in blueberry fruit by enhancing antioxidant capacity during storage. *Journal of Food Science*, 88(9), 3666-3680. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16710>
72. Wang, L., Chen, S., Shao, J., Zhang, C., Mei, L., Wang, K., & Zheng, Y. (2022). Hydrogen sulfide alleviates chilling injury in peach fruit by maintaining cell structure integrity via regulating endogenous H₂S, antioxidant and cell wall metabolisms. *Food Chemistry*, 391, 133283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133283>

73. Wang, M., Li, C., Liu, J., Zhang, S., Guo, Y., Jin, Y., & Ge, Y. (2023). Phenylalanine maintains the postharvest quality of 'Jinfeng' pear fruit by modulating the tricarboxylic acid cycle and chlorophyll catabolism. *Postharvest Biology and Technology*, 204, 112479. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112479>
74. Yahia, E., & Gutierrez-Orozco, F. (2011). Sapodilla (*Manilkara achras* (Mill) Fosb., syn *Achras sapota* L.). In *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits* (pp. 351-363e): Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857092618.351>
75. Yao, M., Ge, W., Zhou, Q., Zhou, X., Luo, M., Zhao, Y., Wei, B., & Ji, S. (2021). Exogenous glutathione alleviates chilling injury in postharvest bell pepper by modulating the ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle. *Food Chemistry*, 352, 129458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129458>
76. Zarezadeh, M., Barzegari, M., Aghapour, B., Adeli, S., Khademi, F., Musazadeh, V., & Chehregosha, F. (2022). Melatonin effectiveness in amelioration of oxidative stress and strengthening of antioxidant defense system: Findings from a systematic review and dose-response meta-analysis of controlled clinical trials. *Clinical Nutrition ESPEN*, 48, 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.01.038>
77. Xu, P., Huber, D. J., Gong, D., Yun, Z., Pan, Y., Jiang, Y., & Zhang, Z. (2023). Amelioration of chilling injury in 'Guifei' mango fruit by melatonin is associated with regulation of lipid metabolic enzymes and remodeling of lipidome. *Postharvest Biology and Technology*, 198, 112233. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112233>
78. Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., & Guo, Y.-D. (2015). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 647-656. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru336>
79. Zhou, Y., Liu, J., Zhuo, Q., Zhang, K., Yan, J., Tang, B., & Liu, K. (2023). Exogenous glutathione maintains the postharvest quality of mango fruit by modulating the ascorbate-glutathione cycle. *Peer Journal*, 11, e15902. <https://doi.org/10.7717/peerj.15902>
80. Zhou, Y., Huang, X., Li, R., Lin, H., Huang, Y., Zhang, T., Mo., Y & Liu, K. (2022). Transcriptome and biochemical analyses of glutathione-dependent regulation of tomato fruit ripening. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 537-547. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2069296>

Preparation and Study the Physical, Mechanical and Antimicrobial Properties of Polyethylene/Polylactic Acid Nanocomposite Films Reinforced with Nano-graphene Oxide

M. Fathifar¹, N. Sedaqhat^{1*}, M.R. Abdollahi Moghadam²

1- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(*- Corresponding Auteur Email: sedaqhat@um.ac.ir)

2- Department of Green Food Technologies, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

Received: 06.01.2025

Revised: 15.03.2025

Accepted: 07.04.2025

Available Online: 18.08.2025

How to cite this article:

Fathifar, M., Sedaqhat, N., & Abdollahi Moghadam, M.R. (2025). Preparation and study the physical, mechanical and antimicrobial properties of polyethylene/polylactic acid nanocomposite films reinforced with Nano-graphene oxide. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(4), 377-391. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.91530.1397>

Introduction

Packaging is an intermediary between the produced food products and the customer, which maintains the quality of the product and provides the information required by the customer. The primary function of packaging is to preserve the nutritional quality of products and extend their shelf life. Conventional packaging materials, such as polyethylene, polypropylene, and polystyrene, are derived from petroleum-based sources and are widely utilized in food packaging due to their advantageous properties, including high durability, lightweight nature, cost-effectiveness, ease of manufacturing, and low water vapor permeability. However, degradation of these synthetic materials is very slowly in the environment, leading to significant ecological pollution. In response to this issue, there has been growing interest in the use of biopolymer materials as a sustainable alternative to non-biodegradable, petroleum-derived packaging. Biodegradable biopolymers offer several benefits, such as environmental degradability and lower production costs compared to synthetic polymers. Additionally, in certain applications, biopolymers can enhance product shelf life and quality, making them a promising solution for sustainable packaging.

Materials and Methods

In this study, a polylactic acid/polyethylene blend film reinforced with graphene oxide nanoparticles was produced and then its mechanical, physical, and antimicrobial properties were investigated in two phases.

Phase 1

In this phase, three-component blends of blown film-type linear low-density polyethylene, general film-type low-density polyethylene, and extruded sheet-type polylactic acid were prepared. For this purpose, 80 wt% linear low-density polyethylene with 20 wt% low-density polyethylene and part 3, 6, and 9 part per hundred (phr) polylactic acid in the presence of 0.05 phr of maleic anhydride-linked polyethylene compatibilizer were melt-blended in a high-performance twin-screw extruder. Before mixing and extruding, linear polyethylene, polyethylene, and polylactic acid granules were dried in a dryer at 80°C for 6 hours to remove moisture before the process. After mixing, a blown film was prepared from the mixture using a single-layer blown extrusion machine. In this stage, the optimal film was selected by performing various analyses.

Phase 2

The optimal film selected from the first stage was used to investigate the effect of graphene nanooxide in the second stage. For this purpose, first, graphene nanooxide with phr concentrations of 0, 1, 3 and 5 relative to the three-component mixture was well dispersed in the polylactic acid solution by ultrasonication. After drying in a



thermal oven, the solution was poured into a co-rotating twin-screw extruder along with linear low-density polyethylene, low-density polyethylene, and maleic anhydride-linked polyethylene compatibilizer for processing and granulation. After that, a nanocomposite film was prepared according to the first phase method. In order to investigate the effect of nano graphene oxide on the properties of the produced films, all relevant analyses were performed.

Results and Discussion

The results showed that with the addition of PLA to the polyethylene matrix, due to the immiscibility of these two materials, two peaks appeared at 122 and 165 °C in the thermogram of the blend, which was related to the melting temperatures of polyethylene and polylactic acid, respectively. The tensile strength and tensile modulus of the blends increased significantly with increasing PLA and GO content, so that the sample with 9 phrof polylactic acid and 5 phr of graphene oxide (LDP9-G5), had the highest tensile strength and tensile modulus, 19.2 and 224 MPa. The oxygen transfer rate decreased with increasing GO content. So that the transmission rate for sample LDP9 was 425 cm³/m².d and for samples LDP9-G1, LDP9-G3 and LDP9-G5 were 417, 402 and 380 cm³/m².d, respectively. The ultraviolet light transmittance also showed that with increasing GO content in the film, the ultraviolet light transmittance and transparency of the films decreased. The antimicrobial and antifungal test of nanocomposite films also showed a decrease in the microbial population with increasing GO concentration. Positively charged ions on the GO surface react with negative charges on the bacterial membrane and inactivate the bacterial function. Sample LDP9-G5 had the highest antifungal activity in the culture medium of *Candida albicans*. Also, the biodegradability of sample LDP9-G5 was 11% within 8 weeks.

Conclusion

According to the results obtained, it can be said that the obtained nanocomposite film showed excellent mechanical and antimicrobial properties compared to the control film sample due to the presence of graphene oxide in its structure.

Keywords: Biodegradability, Biopolymer, Packaging, Reinforced, Tensile strength

مقاله پژوهشی

جلد ۲۱، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۴، ص. ۳۷۷-۳۹۱

تهیه و بررسی خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و ضد میکروبی فیلم‌های نانوکامپوزیتی پلی اتیلن / پلی لاکتیک اسید تقویت شده با نانواکسید گرافن

مریم فتحی فر^۱ - ناصر صداقت^۱  - محمدرضا عبدالمهدی مقدم^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۸

چکیده

در سال‌های اخیر به موضوع بسته‌بندی مواد غذایی از نظر حفظ ارزش غذایی محصول و افزایش ماندگاری محصولات توجه بیشتری شده است. فیلم‌های حاصل از ترکیب نانو مواد و پلیمرها/ پلیمرهای زیستی، خواص کاربردی مناسب‌تری نسبت به پلیمرهای پایه نشان می‌دهند. بهبود خصوصیات مکانیکی و ممانعت‌کنندگی و افزایش خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها در صورت برخورداری نانو مواد از ویژگی ضد میکروبی از جمله این ویژگی‌ها می‌باشند. در این تحقیق، فیلم نانوکامپوزیتی پلی اتیلن سبک / پلی لاکتیک اسید تقویت شده با نانوذرات اکسید گرافن توسط اکسترودر فیلم دمیده تهیه شد و خواص فیزیکی مکانیکی، ممانعت‌کنندگی و ضد میکروبی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. افزودن نانواکسید گرافن در غلظت‌های یک، سه و پنج درصد وزنی باعث افزایش مقاومت کششی، مدول الاستیک، خاصیت ضد قارچی و زیست تخریب پذیری فیلم و برعکس کاهش افزایش طول در نقطه پارگی، نرخ انتقال بخار آب، نرخ انتقال اکسیژن و انتقال نور مرئی و اشعه ماوراء بنفش آن شد. فیلم آمیزه پلی اتیلن سبک / پلی لاکتیک اسید و فیلم آمیزه حاوی پنج درصد وزنی نانواکسید گرافن دارای مقاومت کششی ۱۷/۲ و ۱۹/۲ مگاپاسکال، مدول الاستیک ۲۰۰ و ۲۲۴ مگاپاسکال، قطر هاله عدم رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس صفر و هشت میلی‌متر، زیست تخریب پذیری ۱۰ و ۱۱ درصد، افزایش طول در نقطه پارگی ۱۹۸ و ۱۷۰ درصد، نرخ انتقال بخار آب ۱۸/۸ و ۱۶/۴ گرم بر متر مربع ساعت، نرخ انتقال اکسیژن ۴۲۵ و ۲۸۰ سانتی‌متر مکعب بر متر مربع روز، میزان انتقال نور مرئی ۷۳/۲ و ۱۸/۵ درصد و میزان انتقال اشعه ماوراء بنفش ۵۳/۵ و ۲۳/۵ درصد بودند.

واژه‌های کلیدی: استحکام کششی، بسته‌بندی، پلیمر زیستی، تقویت‌شده، زیست تخریب‌پذیری

مقدمه

سهولت فرآیند شدن و نفوذپذیری کم در برابر بخار آب در بسته‌بندی مواد غذایی کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده‌اند. تجزیه این مواد در طبیعت بسیار کند بوده و موجب آلودگی محیط زیست می‌شوند. در حال حاضر، استفاده از مواد پلیمر زیستی به‌عنوان روشی برای حل مشکل استفاده از مواد اولیه بسته‌بندی سنتزی زیست تخریب‌ناپذیر حاصل از مشتقات نفتی مورد توجه قرار گرفته است. پلیمرهای زیستی زیست تخریب‌پذیر مزایای مختلفی نظیر تجزیه‌پذیری و کاهش هزینه‌های تولید را نسبت به پلیمرهای سنتزی دارند و در مواردی، استفاده از این پلیمرهای زیستی می‌تواند زمان ماندگاری و کیفیت محصول را افزایش دهد. پلی لاکتیک

بسته‌بندی، واسطه‌ای بین محصولات غذایی تولیدشده و مشتری محسوب می‌شود و موجب حفظ کیفیت محصول و ارائه اطلاعات مورد نیاز مشتری می‌گردد. مهم‌ترین نقش بسته‌بندی، حفظ ارزش تغذیه‌ای محصول و افزایش زمان ماندگاری محصولات بسته‌بندی شده است. صنعت بسته‌بندی اهمیت بسیاری در اقتصاد و جوامع دارد. این صنعت از دو جهت اقتصادی و اجتماعی اهمیت دارد. مواد پلیمری حاصل از مشتقات نفتی مانند پلی اتیلن، پلی پروپیلن و پلی استایرن موادی هستند که به دلیل ویژگی‌هایی نظیر مقاومت بالا، وزن پایین، قیمت پایین،

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(Email: sedaghat@um.ac.ir)

*- نویسنده مسئول:

۲- گروه فناوری‌های سبز مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

مناسبی جهت ممانعت از ورود آلودگی به ماده غذایی ایجاد می‌گردد. اخیراً استفاده از نانوتکنولوژی و استفاده از پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر مانند PLA در فیلم پلی‌اتیلن مورد توجه قرار گرفته است (Ashfaq, Khursheed, Fatima, Anjum, & Younis, 2022; Primožic, Knez, & Leitgeb, 2021; Emamhadi et al., 2020).

استفاده از نانوتکنولوژی در بسته‌بندی‌های نوین شامل استفاده از نانو مواد، نانوفیلرها، نانو حسگرها، ترکیبات زیست‌فعال و پلیمرهای ترکیبی می‌باشد (Kaufmann & Hesselbarth, 2007; Chen et al., 2024; Faraji Kafshgari et al., 2024). تاکنون، تعداد زیادی از عوامل ضد میکروبی، از جمله نانوذرات فلزی، نانوذرات اکسید فلزی (Silva-Leyton et al., 2019) و نانو مواد کربنی (Hu et al., 2017) به‌عنوان پرکننده‌ها برای تقویت ماتریس‌های پلیمری استفاده شده‌اند. نانوذرات گرافن یکی از جدیدترین تکنولوژی‌ها و مواد نانو در زمینه صنعت بسته‌بندی می‌باشد که تأثیرات بسیار مثبتی بر روی عملکرد بسته‌بندی و حفاظت از محصولات دارد. خواص ضد میکروبی گرافن به‌عنوان یک نانو ماده نسبت به باکتری‌ها و میکروب‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است و در صنایع مختلف مانند پزشکی، بسته‌بندی، و مواد غذایی کاربردهای متعددی دارد (Alimardani, Abolmaali, & Borandeh, 2019; Kumar, Huo, Zhang, & Liu, 2019). روگووینا و همکاران (Rogovina et al., 2019) به تولید و بررسی ساختار و خواص کامپوزیت‌های پلی‌اتیلن-پلی‌لاکتیک اسید پرداختند. در این پژوهش، پودرهای آمیزه PLA با پلی‌اتیلن سبک^۳ تحت شرایط تغییر شکل‌های برشی با دمای بالا در دیسپرسر روتور^۳ به‌دست آمدند. بررسی خواص مکانیکی آمیزه‌ها نشان داد که افزایش محتوای PLA منجر به افزایش مدول الاستیک و مقاومت کششی نهایی و کاهش ازدیاد طول در هنگام شکست شد. تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده با روش DSC نشان داد که PLA و LDPE ناسازگار هستند که با ویژگی منحنی‌های ذوب و تبلور این پلیمرها همخوانی داشت (Boubekeur, Belhaneche-Bensemra, & Massardier, 2015). بوبکور و همکاران (Boubekeur et al., 2015)، پلی‌اتیلن پیوندشده با گلیسیدیل متاکریلات^۴ را به‌عنوان سازگارکننده برای مخلوط‌های LDPE/PLA انتخاب کردند و به بررسی اثر محتوای آرد ضایعات چوب^۵ بر خواص مکانیکی، حرارتی و ریخت‌شناسی LDPE/PLA پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که ادغام ضایعات آرد چوب در ماتریس LDPE/PLA/PE-g-GMA (۲۰/۸۰/۵)، مدول یانگ را بهبود بخشید، درحالی‌که مقاومت کششی و افزایش طول در نقطه شکست کاهش یافت.

اسید^۱ پلیمر زیستی است که به‌دلیل سهولت تولید و خواص مکانیکی مطلوب، به‌عنوان جایگزینی مناسب برای پلیمرهای سنتزی به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. پلی‌لاکتیک اسید یک پلی‌استر ترموپلاستیک با زنجیر خطی است که اسیدلاکتیک به‌عنوان مونومر تشکیل‌دهنده آن از تخمیر مواد اولیه گیاهی نظیر ذرت (*Zea mays* L.) به‌دست می‌آید، اما این پلیمر علی‌رغم مزایای مختلف آن، برخی ضعف‌ها در مقایسه با پلیمرهای سنتزی دارد که این ضعف‌ها، کاربرد آن را به‌عنوان جایگزین پلیمرهای با منشأ مشتقات نفتی در بسته‌بندی مواد غذایی محدود کرده است. از جمله موارد ضعف PLA می‌توان به ویژگی شکنندگی بالا، پایداری پایین حرارتی و خواص ممانعت‌کنندگی ضعیف آن در مقابل رطوبت و اکسیژن اشاره نمود (Lau, 2022; Escursell, Llorach-Massana, & Roncero, 2021; Khademi Shurmasti, Nourkami, & Momenian, 2024; Karimi Zarchi, Fathi, Raeesi Nafchi, & Safar Mohammad Luo, 2024; Swetha et al., 2023).

پلی‌اتیلن در بین پلی‌ولفین‌ها، به‌دلیل فرآیندپذیری مناسب، ایمنی تماس با ماده غذایی، دوخت‌پذیری خوب، قیمت پایین و ممانعت‌کنندگی مناسب در برابر رطوبت، به ماده بسته‌بندی با کاربرد زیاد در صنایع غذایی تبدیل شده است (Schyns, & Shaver, 2021; Yildirim et al., 2018; Faraji Kafshgari, Akbarian Meymand, & Habibi Najafi, 2024; Wyrwa & Barska, 2017). اگرچه بسته‌بندی‌های با مواد اولیه طبیعی حاصل از پلیمرهای زیستی خالص از زیست‌تخریب‌پذیری بالاتری نسبت به فیلم‌های مرکب برخوردارند، ولی خواص مکانیکی ضعیف این ترکیبات زیستی و نفوذپذیری بخار آب بالا از ضعف‌های آن‌ها محسوب می‌گردد. بدین ترتیب، با ترکیب پلیمرهای زیستی و سنتزی می‌توان از مزیت‌های هر دو دسته استفاده کرد. خاصیت ممانعت‌کنندگی این فیلم‌ها ممکن است با افزودن ترکیبات ضد میکروبی و یا آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی افزایش یابد. فیلم‌های حاصل از ترکیب نانو مواد و پلیمرهای زیستی یا به‌اصطلاح نانو کامپوزیت‌های زیستی، خواص کاربردی مناسب‌تری نشان می‌دهند. بهبود خصوصیات مکانیکی و ممانعت‌کنندگی و همچنین افزایش خاصیت ضد میکروبی (در صورت برخورداری نانو مواد از ویژگی ضد میکروبی) از جمله این ویژگی‌ها می‌باشند. استفاده از نانوتکنولوژی در بسته‌بندی مواد غذایی می‌تواند خواص کاربردی پلیمرها را بهبود و معایب آن‌ها را کاهش دهد و این عمل موجب پیشرفت در استفاده از نانوذرات و نانو کامپوزیت‌ها، جهت افزایش دامنه بسته‌بندی فعال و هوشمند شود. در این نوع بسته‌بندی هم کیفیت مواد غذایی و هم زمان ماندگاری آن‌ها افزایش می‌یابد، علاوه بر این، شرایط

4- Polyethylene grafted Glycidyl Methacrylate (PE-g-GMA)
5- Wood flour

1- Polylactic acid (PLA)
2- Low density polyethylene (LDPE)
3- Rotor disperser

مواد و روش‌ها

مشخصات مواد مصرفی در این تحقیق، همراه با نام شرکت سازنده و کاربرد هر یک از آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

با توجه به مطالعات انجام شده و عدم دریافت منابعی موثق در خصوص بررسی اثر اضافه نمودن نانواکسیدگرافن به فیلم آمیزه PLA/LLDPE/LDPE بر خواص مختلف فیلم، در این تحقیق فیلم نانوکامپوزیتی پلی اتیلن سبک/پلی اتیلن سبک خطی^۱/پلی لاکتیک اسید/نانواکسیدگرافن^۲ تهیه شد و سپس ویژگی‌های مکانیکی، فیزیکی و ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- مشخصات مواد مصرفی در تحقیق

Table 1- Specifications of materials used in the research

نام ماده Name of the substance	ویژگی Property	شرکت سازنده Manufacturer	کاربرد Application
پلی اتیلن سبک Low density polyethylene	چگالی ۰/۹۱-۰/۹۴ Density 0.91-0.94 g.cm ⁻³ نوع هموپلیمر جریان مذاب در دمای ۱۹۰ °C Homopolymer type Melt flow at 190 (2 g.10 min ⁻¹)	شرکت پتروشیمی اراک Arak Petrochemical company	ماتریس فیلم پلیمری Polymer film matrix
پلی اتیلن سبک خطی Linear low density polyethylene	چگالی ۰/۹۱-۰/۹۲ Density 0.91-0.92 g.cm ⁻³ نوع هموپلیمر جریان مذاب در دمای ۱۹۰ °C Homopolymer type Melt flow at 190 °C (2 g.10 min ⁻¹)	شرکت پتروشیمی اراک Arak Petrochemical company	ماتریس فیلم پلیمری Polymer film matrix
پلی لاکتیک اسید Polylactic acid	چگالی ۱/۲۵ Density 1.25 g.cm ⁻³ وزن مولکولی ۱۹۶۰۰۰ Molecular weight 196,000 g.mol ⁻¹ جریان مذاب در دمای ۱۹۰ °C Melt flow at 190 °C (2.5 g.10 min ⁻¹) وزن مولکولی ۴۲۳۹/۴۸ Molecular weight 4239.48 g.mol ⁻¹	شرکت Kunststoff GmbH Siemensring Kunststoff GmbH Siemensring company	فیلم زیست تخریب پذیر - عامل بهبود خواص Biodegradable film - property improvement agent
نانواکسیدگرافن Nano graphene ox	۱۵-۲۰ صفحه 15-20 plates چگالی ۱/۴۸ Density 1.48 g.cm ⁻³	Merck	عامل بهبود خواص - عامل ضد میکروبی Property-improving agent - antimicrobial agent
پلی اتیلن پیوند شده با انیدرید ^۳ مالئیک Polyethylene crosslinked with maleic anhydride	دمای جوش ۲۰۲ °C Boiling point 202 °C چگالی ۱/۴۹ Density 1.49 g.cm ⁻³	Merck	سازگار کننده Compatiblizer
کلروفرم Chloroform	دمای جوش ۶۲ °C Boiling point 62 °C	Merck	حلال Solvent

هشت ساعت با همزن مغناطیسی هم زده شد و با دستگاه هموژنایزر با سرعت ۷-۸ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه هموژن گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه تحت فرآیند التراسونیک قرار گرفت. برای تهیه نانوکامپوزیت علاوه بر تهیه محلول پلی لاکتیک اسید که اشاره شد، مقدار یک، سه و پنج phr اکسیدگرافن (نسبت به وزن مخلوط

تهیه نانوکامپوزیت PLA/GO

گرانول‌های پلی لاکتیک اسید و نانواکسیدگرافن، قبل از استفاده به مدت ۲۴ ساعت در آن خالص با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پلی لاکتیک اسید به میزان نه قسمت در ۱۰۰ قسمت مخلوط پلی اتیلن‌ها (نه قسمت در صد^۴) در ۱۰۰ میلی لیتر کلروفرم به مدت

3- Polyethylene grafted anhydride maleic (PE-g-MA)
4- Part Per Hundred (phr)

1- Linear Low Density Polyethylene (LLDPE)
2- Nano-Graphene Oxide (NGO)

پخش شد، توسط گاز حامل نیتروژن به سنسور منتقل گردید. نتایج OTR برحسب سانتی‌مترمکعب بر مترمربع روز گزارش شد. فشار جزئی اکسیژن در سمت گاز سلول انتشار معمولاً یک اتمسفر بود.

تهیه گرانول نانوکامپوزیت LDPE/LLDPE/PLA/GO

نانوکامپوزیت PLA/GO به همراه پلی‌اتیلن سبک، پلی‌اتیلن سبک خطی و سازگارکننده پلی‌اتیلن پیوندشده با مالئیک انیدرید (برابر سه phr مخلوط پلی‌اتیلن‌ها) مطابق جدول ۲ (همه مواد به صورت خشک) به اکسترودر دویچه همسوگرد (BRABENDER) ساخت کشور آلمان) با قطر ماردون ۲۵ میلی‌متر و طول ۷۵۰ میلی‌متر و با شرایط کارکرد سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه و پروفیل دمایی ۱۶۰/۱۷۰/۱۸۰/۱۹۰/۲۰۰/۲۱۰/۲۲۰ درجه سانتی‌گراد برای نواحی مختلف اکسترودر، تغذیه شدند. رشته خروجی از قالب اکسترودر در دستگاه گرانول‌ساز تبدیل به گرانول شده و سپس گرانول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون خلأ با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید.

تهیه فیلم نانوکامپوزیت LDPE/LLDPE/PLA/GO

برای تهیه فیلم نانوکامپوزیت، گرانول‌های LDPE/LLDPE/PLA/GO به‌دست‌آمده به دستگاه اکسترودر فیلم دمشی (HN-650 ساخت کشور چین) با قطر مارپیچ ۵۵ میلی‌متر و نسبت L/D: ۲۸:۱ و سرعت ۵۰ دور بر دقیقه تغذیه شدند. پروفیل دمایی مورد استفاده در اکسترودر برای همه نمونه‌ها ۱۳۰/۱۵۵/۱۷۰/۱۹۰/۲۱۰/۲۲۵/۲۳۵ درجه سانتی‌گراد برای نواحی مختلف اکسترودر بود. فیلم به‌دست‌آمده از اکستروژن، حالت مسطح و صافی داشت (سرعت دمش چهار کیلوگرم بر ساعت) و دارای ضخامت متوسط ۸۵/۷ میکرومتر بود. در ابتدا که دمای ناحیه قالب ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد، نانوکامپوزیت‌های LDPE/LLDPE/PLA/GO ویسکوزیته بالایی داشتند، از این‌رو دمای ناحیه به ۲۳۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت (Winotapun et al., 2019; Kumar & Soundararajan, 2016).

پلی‌اتیلن‌ها) در کلروفورم به مدت هشت ساعت با همزن مغناطیسی هم زده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دستگاه هموزنایزر هموزن گردید و به مدت ۳۰ دقیقه تحت فرآیند التراسونیک قرار گرفت. سپس این دو محلول با یکدیگر مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با همزن مغناطیسی و ۱۵ دقیقه دستگاه هموزنایزر و ۳۰ دقیقه فرآیند التراسونیک هموزن شدند. سپس مخلوط به‌دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در آون خلأ با دمای ۶۰ درجه خشک گردید (Winotapun et al., 2019).

آزمون کشش

به‌منظور تعیین خواص کششی، نمونه‌ها تحت آزمون کشش تک‌محوری براساس استاندارد ASTM-D882-02 واقع شدند (ASTM, 2002). نمونه‌ها به ابعاد ۰/۰۸۶ × ۵۰ × ۲۰ میلی‌متر از فیلم خروجی به‌دست‌آمده از دستگاه اکسترودر فیلم دمشی تهیه شدند. خواصی که در این آزمون مورد ارزیابی قرار گرفت، عبارت است از مقاومت کششی، مدول الاستیک (مدول کششی) و افزایش طول تا نقطه پارگی. سرعت کشش فیلم با توجه به جنس آن‌ها برابر پنج میلی‌متر در دقیقه در نظر گرفته شد. لودسل ۵۰۰۰ نیوتن برای دستگاه مورد استفاده قرار گرفت و آزمون در دمای محیط (شرایط استاندارد) انجام شد. دستگاه کشش مورد استفاده، مدل STM-50 ساخت شرکت طراحی مهندسی سنتام بود.

آزمون نرخ انتقال اکسیژن (OTR)

نرخ انتقال اکسیژن (OTR) در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد مطابق با استاندارد ASTM D3985-05، به‌وسیله Mocon Oxtran-2/21، ایالات متحده آمریکا) اندازه‌گیری شد (ASTM, 2005). نرخ انتقال اکسیژن بر اساس روش ایزواستاتیک تعیین گردید. جریان پیوسته در هر دو طرف فیلم‌ها در یک سلول آزمایش نفوذ اعمال شد تا غلظت نفوذپذیر ثابت را فراهم کند. سطح استاندارد نمونه ۱۰۰ سانتی‌مترمربع بود. اکسیژن خالص (۹۹/۸ درصد) به یک محفظه از سلول انتشار وارد شد و مولکول‌های اکسیژنی که از طریق فیلم به محفظه دیگری

جدول ۲- ترکیب درصد و کدگذاری نمونه‌ها

Table 2- Percentage composition and coding of samples

کد نمونه Sample code	مقدار LLDPE LLDPE content (percentage weight)	مقدار LDPE LDPE content (percentage weight)	مقدار PLA PLA content (phr)	مقدار GO GO content (phr)	مقدار PE-g-MA PE-g-MA content (phr)
LDP9	80	20	9	-	3
LDP9-G1	80	20	9	1	3
LDP9-G3	80	20	9	3	3
LDP9-G5	80	20	9	5	3

آزمون نرخ انتقال بخار آب (WVTR)^۱

نرخ انتقال بخار آب (WVTR) نمونه‌ها به روش وزن سنجی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۴ درصد مطابق استاندارد ASTM E96-95, 1995 اندازه‌گیری شد (ASTM, 1995). دهانه لوله‌های شیشه‌ای کوچک به قطر دو سانتی‌متر پر شده با پنج میلی‌لیتر آب مقطر توسط نمونه فیلم پوشانده شده و به خوبی مهر و موم شد و در دسیکاتورهایی با دما و رطوبت ثابت (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۴ درصد) قرار گرفت.

تغییرات وزن لوله‌های شیشه‌ای در فواصل ۳۰ دقیقه در ۲۴ ساعت کنترل شده و نرخ انتقال بخار آب از طریق معادله ۱ تعیین شد:

$$WVTR = (W_0 - W_t) / t \cdot A \quad (1)$$

که در آن، W_0 : وزن اولیه لوله مهر و موم شده، W_t : وزن لوله در زمان t و A : مساحت فیلم نمونه مورد آزمون (cm^2) است.

آزمون انتقال نور^۲

خواص نوری فیلم‌ها با اندازه‌گیری طیف انتقال در محدوده ۷۰۰-۲۰۰ نانومتر با استفاده از یک طیف‌سنج اسپکتروفوتومتر ماوراءبنفش/مرئی (مدل 8451A، ایالات متحده آمریکا) آزمایش شد. خاصیت غریبالگری نور مرئی و اشعه ماوراءبنفش فیلم‌ها با اندازه‌گیری درصد عبوری به ترتیب در ۶۶۰ نانومتر (T_{660}) و ۲۸۰ نانومتر (T_{280}) ارزیابی گردید. ابتدا نمونه فیلم به یک قطعه مستطیلی برش داده شده و مستقیماً بین دو سلول مغناطیسی اسپکتروفوتومتر قرار گرفت و سپس طیف جذبی نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰-۲۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (Wang & Rhim, 2016).

آزمون ضد میکروبی

در این آزمون، خواص ضدباکتریایی نمونه‌های فیلم (قطعات دایره‌ای شکل به قطر دو سانتی‌متر)، علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*^۳ کشت داده شده در محیط کشت جامد Colony Count Agar بعد از گذشت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. در محیط کشت مورد نظر، خاصیت ضدباکتریایی نمونه‌های فیلم با بررسی چشمی و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری که نشان از عدم رشد باکتری و میزان اثر ضدباکتریایی فیلم‌ها بود، ارزیابی شد (Huang et al., 2015).

آزمون ضدقارچی^۴

برای بررسی چسبندگی و رشد قارچ، از کشت سلول‌های مخمر *کاندیدا آلبیکنس*^۵ و *اشیریشیا کلی*^۶ استاندارد روی سطح استفاده می‌شود. تعداد سلول‌هایی که به سطح می‌چسبیدند به کمک میکروسکوپ نوری محاسبه گردید. محلول‌های تعلیقی^۷ شامل *کاندیدا آلبیکنس* و *اشیریشیا کلی* (ATCC 90028) با پنج میلی‌لیتر SDB^۸ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس از محلول PBS^۹ برای شستشوی سلول‌های کشت داده شده، استفاده گردید. برای ارزیابی چسبندگی *کاندیدا آلبیکنس* بر روی نمونه‌های فیلم، پنج میلی‌لیتر محلول تعلیقی سلولی (۱۰۴ سلول در میلی‌لیتر) به هر چاهک (جایگاه نمونه) که نمونه‌ها در آن قرار گرفته بود، اضافه شد. چسبندگی *کاندیدا آلبیکنس* و *اشیریشیا کلی* روی نمونه‌ها در طی تکان دادن مداری صفحات، پس از انکوباسیون به مدت شش ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رخ داد. مجدداً شستشوی *کاندیدا آلبیکنس* آزاد، با PBS انجام شد. برای اندازه‌گیری عددی، روش شمارش صفحه *کاندیدا آلبیکنس* مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی تشکیل زیست‌فیلم *کاندیدا آلبیکنس* روی نمونه‌ها نیز از همان روش استفاده شد، با این تفاوت که سه میلی‌لیتر SDB به نمونه‌ها اضافه و انکوباسیون در شرایط هوازی انجام شد. تکرار این آزمون‌ها با انجام هر سنجش دو بار مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون زیست‌تخریب‌پذیری

تجزیه‌پذیری زیستی نمونه‌ها به روش دفن در خاک مورد بررسی قرار گرفت و کاهش وزن نمونه‌ها به مدت تقریباً هشت هفته بررسی شد. نمونه‌ها با ابعاد 20×20 میلی‌متر مربع با وزن اولیه (m_0) در فاصله ۱۰ سانتی‌متری زیر خاک دفن شدند و به‌طور دوره‌ای توسط لجن فعال (جمع‌آوری شده از یک تصفیه‌خانه فاضلاب شهری) آبیاری شدند تا تخریب زیستی انجام شود. کمپوست با پاشیدن آب در فواصل زمانی معین مرطوب نگه داشته شد. نمونه‌های دفن شده به‌صورت دوره‌ای بازیابی شده، سپس با آب مقطر شسته شده و تا وزن ثابت خشک شدند، و در نهایت برای به‌دست آوردن وزن نهایی (m_t) وزن شدند. نتایج زیست‌تخریب‌پذیری برحسب تغییرات درصد وزن باقی‌مانده (R_w) مطابق معادله ۲ محاسبه شدند.

6- *Escherichia coli* (*E. coli*)

7- Suspension solution

8- Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

9- Phosphate- Buffered Saline (PBS)

1- Water Vapor Transmission Rate (WVTR)

2- Light transmission

3- *Staphylococcus Aureus*

4- Antifungal

5- *Candida Albicans* (*C. albicans*)

افزودن آن سبب افزایش مقاومت کششی و مدول کششی و برعکس کاهش ازدیاد طول در نقطه پارگی نمونه‌ها می‌شود. سیلوا-لیتون و همکاران (Silva-Leyton et al., 2019) نشان دادند که حضور اکسیدگرافن از غلظت یک تا پنج درصد در ماتریس پلی‌اتیلن باعث افزایش مقاومت کششی و مدول الاستیک و برعکس کاهش ازدیاد طول در نقطه پارگی شد. افزایش مدول یانگ گزارش شده توسط آن‌ها از حدود ۰/۱۵ تا ۰/۲۰ گیگاپاسکال^۱ و کاهش ازدیاد طول در نقطه پارگی از حدود ۹۰۰ تا ۶۰۰ درصد بود.

نرخ انتقال اکسیژن

میزان OTR مربوط به آمیزه LDPE/LLDPE/PLA و آمیزه‌های حاوی غلظت‌های مختلف نانواکسیدگرافن در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان نرخ انتقال اکسیژن با افزایش درصد نانواکسیدگرافن کاهش یافت، به طوری که نرخ انتقال برای نمونه LDP9 ۴۲۵ سانتی‌متر مکعب بر متر مربع روز و برای نمونه‌های LDP9-G1، LDP9-G3 و LDP9-G5 به ترتیب ۴۱۷، ۴۰۲ و ۳۸۰ سانتی‌متر مکعب بر متر مربع روز بود. حضور نانوذرات اکسیدگرافن در ماتریس پلیمری از طریق دو سازوکار باعث کاهش OTR می‌شود. مطابق آزمون پراش اشعه ایکس^۲ که نتایج آن در این مقاله آورده نشده است، افزودن اکسیدگرافن باعث افزایش بلورینگی آمیزه شده و افزایش بلورینگی باعث کاهش میزان فضای خالی بین زنجیرها و کاهش OTR می‌شود. به علاوه نانوذرات با نفوذ به درون خلل و فرج موجود بین زنجیرها مانند یک سد نفوذ گاز عمل کرده و مانع از عبور آسان اکسیژن از فیلم می‌شوند. کومار و سونداراجان (Kumar & Soundararajan, 2018) نیز در تحقیق خود کاهش نرخ انتقال اکسیژن را برای حضور نانورس در ماتریس آمیزه پلی‌اتیلن/پلی‌لاکتیک اسید (۴۰/۶۰) نشان دادند. مطابق نتایج تحقیق ذکر شده، ماتریس پلیمری و ماتریس حاوی یک، دو و سه درصد وزنی نانورس به ترتیب دارای نرخ انتقال اکسیژن ۲/۴، ۲/۴، ۱۹۸/۵، ۱۹۷/۲ و ۱۹۲/۵ سانتی‌متر مکعب بر متر مربع روز بودند.

$$R_w(\%) = \left(\frac{m_0 - m_t}{m_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

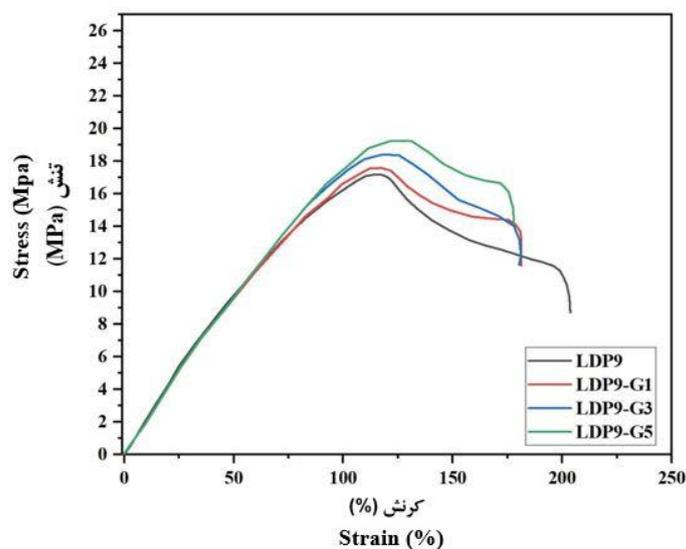
تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها در سه تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) گزارش شدند. تجزیه و تحلیل آماری از طریق طرح کاملاً تصادفی ساده و تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در سطح پنج درصد ($P < 0/05$) با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۳) انجام شد.

نتایج و بحث

خواص کششی

ویژگی‌های مکانیکی یکی از مهم‌ترین عوامل برای تعیین فیلم‌های مناسب برای بسته‌بندی مواد غذایی محسوب می‌شود. هرچه میزان مقاومت کششی و افزایش طول در نقطه پارگی یک فیلم بالاتر باشد، فیلم بسته‌بندی کارآمدتر خواهد بود. لازم به ذکر است که معمولاً افزایش مدول کششی فیلم‌ها موجب کاهش میزان افزایش طول در نقطه پارگی آن‌ها می‌شود. در شکل ۱ منحنی تغییرات تنش-کرنش برای نمونه‌های LDP9، LDP9-G1، LDP9-G3 و LDP9-G5 نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، با افزودن GO به ماتریس LDPE/LLDPE/PLA، میزان مقاومت کششی ماتریس افزایش یافت. همچنین روند افزایش مدول الاستیک و کاهش ازدیاد طول در نقطه پارگی نمونه‌ها بدین صورت بود که با افزایش ترکیب درصد GO در ماتریس، مدول الاستیک نمونه‌ها افزایش و افزایش طول در نقطه پارگی آن‌ها کاهش محسوس پیدا کرد، به طوری که میزان مدول کششی برای نمونه‌های LDP9، LDP9-G1، LDP9-G3 و LDP9-G5 به ترتیب ۲۰۰، ۲۰۸، ۲۱۶ و ۲۲۴ مگاپاسکال و مقدار افزایش طول در نقطه پارگی آن‌ها به ترتیب ۱۹۸، ۱۷۸، ۱۷۷ و ۱۷۰ درصد بود (جدول ۳). اکسیدگرافن به علت وجود گروه‌های عاملی گوناگونی که در سطح ورقه‌های خود دارد، این امکان را به وجود می‌آورد که با واسطه سازگارکننده پلی‌اتیلن پیوندشده با انیدرید مالئیک پیوندهای قوی با ماتریس پلیمری برقرار کند و از آنجاکه دارای سفتی و مدول کششی (۴۲-۶ گیگاپاسکال) (Liu, Zhang, Zhao, & Liu, 2012) بسیار بیشتر از ماتریس می‌باشد، لذا

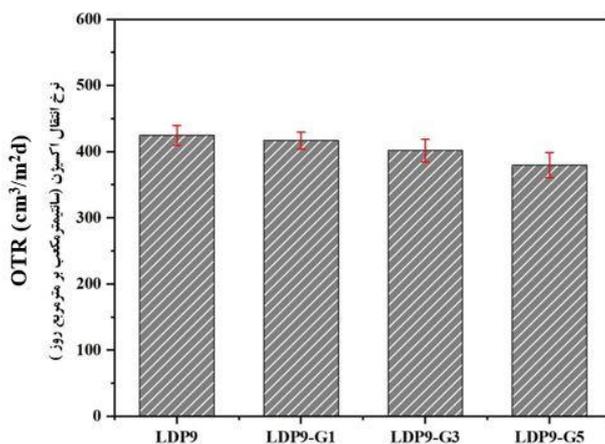


شکل ۱- منحنی تنش-کرنش مربوط به آمیزه LDPE/LLDPE/PLA و آمیزه‌های حاوی غلظت‌های مختلف GO
 Fig. 1. Stress-strain curve of LDPE/LLDPE/PLA blend and blends containing different concentrations of GO

جدول ۳- میزان مقاومت کششی، مدول کششی و افزایش طول در نقطه پارگی آمیزه LDPE/LLDPE/PLA و آمیزه‌های حاوی غلظت‌های مختلف GO

Table 3- Tensile strength, tensile modulus, and elongation at break of LDPE/LLDPE/PLA blends and blends containing different concentrations of GO

نمونه Sample	مدول کششی Tensile modulus (MPa)	مقاومت کششی Tensile strength (MPa)	افزایش طول در نقطه پارگی Elongation at break (%)
LDP9	200 ± 8	17.2 ± 0.3	198 ± 8
LDP9-G1	208 ± 12	17.7 ± 0.4	178 ± 5
LDP9-G3	216 ± 5	18.3 ± 0.5	177 ± 11
LDP9-G5	224 ± 9	19.2 ± 0.2	177 ± 4



شکل ۲- نرخ انتقال اکسیژن مربوط به آمیزه LDPE/LLDPE/PLA و آمیزه‌های حاوی غلظت‌های مختلف GO
 Fig. 2- Oxygen transfer rates of LDPE/LLDPE/PLA blends and blends containing different concentrations of GO

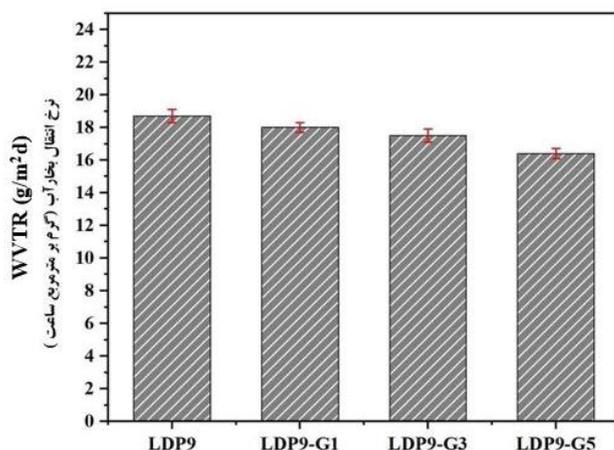
نیاز است. به منظور بررسی میزان انتقال بخار آب نمونه‌ها، آزمون WVTR مورد استفاده قرار گرفت. شکل ۳ نمودار WVTR مربوط به نمونه‌ها را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، با افزودن اکسیدگرافن به آمیزه و افزایش درصد آن، میزان WVTR کاهش پیدا

نرخ انتقال بخار آب

نفوذپذیری بخار آب در فیلم‌های بسته‌بندی عامل مهمی در ماندگاری و حفظ کیفیت مواد غذایی محسوب می‌شود، بنابراین در بسیاری از مواقع، فیلم بسته‌بندی با خاصیت سد نفوذ بخار آب بالا مورد

سیلوا- لیتون و همکاران (Silva-Leyton *et al.*, 2019)، میزان نفوذپذیری بخار آب برای ماتریس پلی‌اتیلن سبک حاوی یک درصد اکسیدگرافن ۰/۵ گرم میلی‌متر بر متر مربع روز پاسکال و برای نمونه حاوی سه درصد اکسیدگرافن ۰/۳ گرم بر متر مربع روز پاسکال گزارش شد که نشان‌دهنده پرکنندگی حفره‌های ماتریس توسط نانوذرات می‌باشد. در پژوهش کومار و سونداراجان (Kumar & Soundararajan, 2018) نیز کاهش نرخ انتقال بخار آب برای حضور نانورس در ماتریس آمیزه پلی‌اتیلن سبک/پلی‌لاکتیک اسید (۴۰/۶۰) گزارش شد. مطابق نتایج پژوهش ذکرشده، ماتریس پلیمری و ماتریس حاوی یک، دو و سه درصد وزنی نانورس به ترتیب دارای نرخ انتقال بخار آب ۰/۰۷۹۴، ۰/۰۷۳۳، ۰/۰۶۷۲ و ۰/۰۶۰۰ گرم بر متر مربع روز بودند.

کرد، به طوری که نرخ انتقال بخار آب برای نمونه‌های LDP9-، LDP9-G1، LDP9-G3 و LDP9-G5 به ترتیب ۱۸/۸، ۱۷/۵ و ۱۶/۴ گرم بر متر مربع روز بود. علت کاهش نرخ انتقال بخار آب، نقش سدکنندگی نانوذرات اکسیدگرافن در فیلم ماتریس LDPE/LLDPE/PLA در برابر نفوذ بخار آب می‌باشد. نفوذ نانوذرات به درون خلل و فرج فیلم باعث این کاهش در میزان نرخ انتقال می‌باشد. از این رو، آمیزه‌های حاوی اکسیدگرافن جهت بسته‌بندی مواد غذایی بدون تخریب هوازی برای مدت طولانی‌تر نسبت به آمیزه تنها مناسب‌تر هستند (Shankar, Bang, & Rhim, 2019; Kumar & Soundararajan, 2018). به علاوه یکی دیگر از دلایل کاهش نرخ انتقال بخار آب را می‌توان به پراکندگی خوب اکسیدگرافن در ماتریس و اثر پرپیچ‌وخم ناشی از نسبت بزرگ صفحات اکسیدگرافن نسبت داد که مسیر عبور مولکول‌های آب را طولانی‌تر کرده و نفوذپذیری بخار آب را کاهش داده است. در تحقیق



شکل ۳- میزان WVTR مربوط به آمیزه LDPE/LLDPE/PLA و آمیزه‌های حاوی غلظت‌های مختلف نانو اکسیدگرافن

Fig. 3. WVTR values of LDPE/LLDPE/PLA blends and blends containing different concentrations of nano-graphene oxide

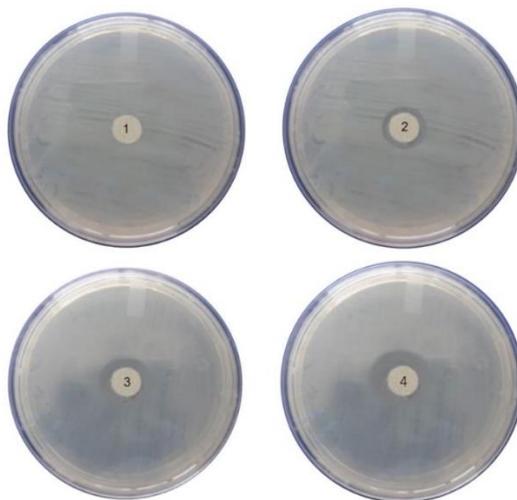
میزان انتقال نور مرئی و ماوراءبنفش به ترتیب ۶۸/۵ و ۴۵/۴، ۴۳/۲ و ۳۸/۸، ۱۸/۵ و ۲۳/۵ درصد بودند. این نتیجه نشان داد که حضور اکسیدگرافن با توجه به داشتن گروه‌های عاملی قطبی در ساختار خود باعث جذب نور ماوراءبنفش شده و از عبور آن جلوگیری می‌کند. گروه تحقیقاتی شانکار و همکاران (Shankar *et al.*, 2019)، کامپوزیت پلی‌اتیلن سبک حاوی نانوذرات اکسیدروی را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که نمونه LDPE به ترتیب دارای $T_{۲۸۰}$ و $T_{۶۶۰}$ به میزان ۶۲/۷ و ۸۵/۳ درصد و نمونه LDPE/ZnO دارای $T_{۲۸۰}$ و $T_{۶۶۰}$ به ترتیب به میزان ۵/۷ و ۵۶/۷ درصد بودند که نشان‌دهنده کاهش عبورپذیری نور در حضور نانوذرات در ماتریس بود (جدول ۴).

انتقال نور

میزان انتقال نور نمونه‌های فیلم در جدول ۴ ارائه شده است. میزان انتقال نور فیلم آمیزه LDPE/LLDPE/PLA تا حد زیادی تحت تأثیر ترکیب با اکسیدگرافن قرار گرفت. نمونه LDP9 میزان عبور نور بالایی در محدوده‌های طول موج ماوراءبنفش و مرئی نشان داد. میزان عبور نور در طول موج ۶۶۰ نانومتر ($T_{۶۶۰}$) برای این نمونه ۷۳/۲ درصد و در طول موج ۲۸۰ نانومتر ($T_{۲۸۰}$) ۵۳/۵ درصد بود. با اضافه شدن درصد اکسیدگرافن، میزان انتقال نور فیلم‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت، به طوری که LDP9-G1، LDP9-G3 و LDP9-G5 دارای

جدول ۴- میزان عبور نور مرئی و ماوراءبنفش آمیزه LDPE/LLDPE/PLA و آمیزه‌های حاوی درصد‌های مختلف GO
Table 4- Visible and ultraviolet light transmittance of LDPE/LLDPE/PLA blends and blends containing different percentages of GO

نمونه Sample	T _{۲۸۰} T ₂₈₀ (%)	T _{۲۶۰} T ₆₆₀ (%)
LDP9	53.5 ± 1.4	73.2 ± 1.7
LDP9-G1	45.4 ± 2.4	68.5 ± 1.9
LDP9-G3	38.8 ± 1.3	43.2 ± 2.3
LDP9-G5	23.5 ± 1.5	18.5 ± 1.1



شکل ۴- تصاویر هاله عدم رشد باکتری در آزمون ضد میکروبی نمونه‌های فیلم ۱: LDP9، ۲: LDP9G1، ۳: LDP9G3 و ۴: LDP9G5 علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

Fig. 4. Images of the bacterial growth inhibition zone in the antimicrobial test of film samples 1: LDP9, 2: LDP9G1, 3: LDP9G3, and 4: LDP9G5 against *Staphylococcus aureus* bacteria

خواص ضد میکروبی

جهت بررسی اثر نانواکسیدگرافن بر خواص ضد میکروبی فیلم‌ها، این آزمون در محیط کشت جامد از طریق بررسی چشمی و گزارش نمودن قطر هاله عدم رشد باکتری انجام گرفت (شکل ۴). جهت بررسی خاصیت ضد باکتری، نمونه‌ها تحت تأثیر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قرار گرفتند. طبق نتایج شکل ۴ مشاهده می‌شود که با افزایش درصد اکسیدگرافن در فیلم‌های LDP9 میزان خاصیت ضد باکتریایی نمونه‌ها افزایش یافت. به این صورت که نمونه LDP9G1 دارای سه میلی‌متر و نمونه LDP9G5 دارای هشت میلی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری بودند. این مشاهدات بیانگر این مطلب است که اکسیدگرافن دارای اثر ضد باکتریایی روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. مشابه نتایج این تحقیق، سیلوا-لیتون و همکاران (Silva-Leyton et al., 2019) نیز اثر ضد میکروبی فیلم حاوی نانواکسیدگرافن علیه باکتری‌های سالمونلا تیفی^۱ و لیستریا مونوسایتوزنتر^۲ را گزارش کردند و

نشان دادند که با افزایش میزان GO در فیلم پلی اتیلن، میزان خواص ضد میکروبی فیلم افزایش یافت.

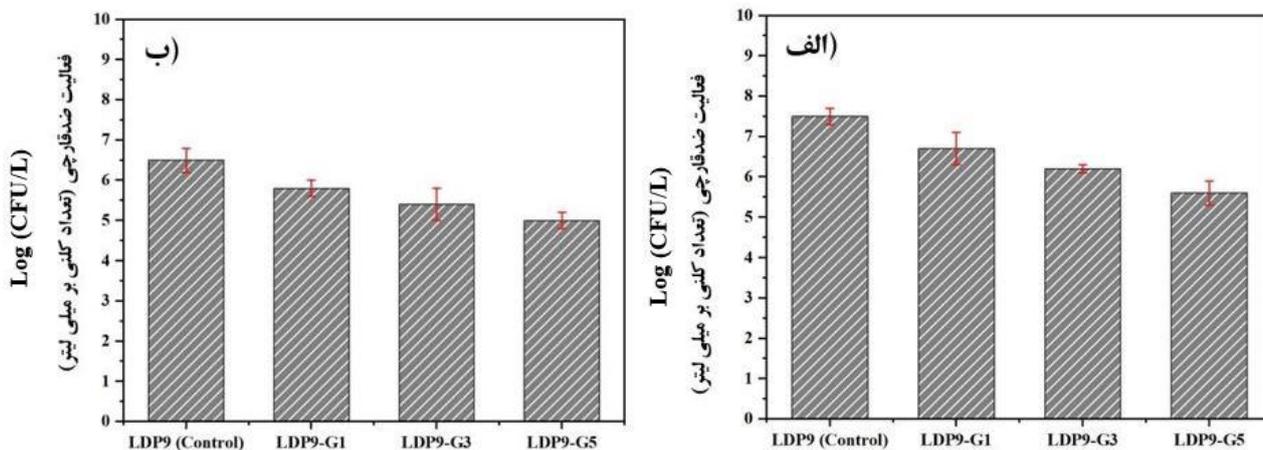
اثر ضد میکروبی ناشی از اکسیدگرافن روی باکتری‌ها می‌تواند به علت تفاوت در ساختار غشایی آن‌ها باشد. سلول‌های باکتری دارای یک لایه لیپوپلی ساکارید اضافی در دیواره سلولی بیرونی خود هستند، بنابراین منطقی است که فرض شود این لایه مکمل یک مانع اضافی برای میزان فعالیت ضد باکتری برای استافیلوکوکوس اورئوس است. احتمالاً ورقه‌های اکسیدگرافن می‌توانند به سطح سلول‌ها چسبیده و آن‌ها را بپوشانند و در نتیجه، ممکن است مکان‌های فعال آن‌ها را روی غشاها مسدود کرده و از تکثیر سلولی جلوگیری نمایند (Alimardani et al., 2019).

آزمون ضد قارچی

چسبندگی کاندیدا آلبیکنس و اشیریشیا کلی روی سطح نانوکامپوزیت‌ها، اولین مرحله تشکیل زیست‌فیلم است. میزان فعالیت

همه نمونه‌ها، میزان فعالیت ضدقارچی نانوکامپوزیت علیه باکتری *C. albicans* بیشتر از باکتری *E. coli* بود (Shankar et al., 2019; Faraji Kafshgari et al., 2024).

ضدقارچی فیلم‌های نانوکامپوزیتی حاوی GO در برابر ریزجانداران مختلف، یعنی *E. coli* و *C. albicans* در شکل ۵ ارائه شده است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت GO، خاصیت ضدقارچی فیلم علیه هر دو باکتری افزایش یافت، ضمن اینکه برای



شکل ۵- فعالیت‌های ضدقارچی نمونه‌های فیلم علیه باکتری‌های، الف: *اشریشیا کلی* و ب: *کاندیدا آلبیکنس* پس از انکوباسیون یک روزه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

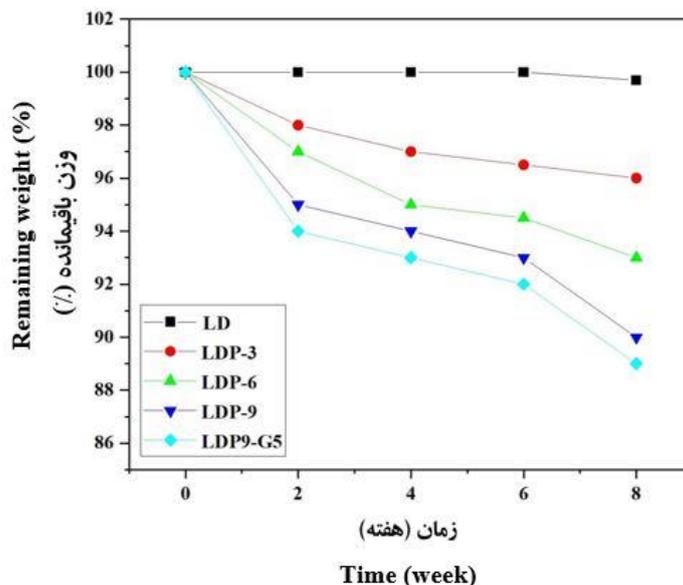
Fig. 5. Antifungal activities of film samples against bacteria, a: *Escherichia coli* and b: *Candida albicans* after 1 day incubation at 37°C

(H₂O)) تسریع می‌یابد. همچنین، در نمونه LDP9-G5، قابلیت تجزیه زیستی پس از ادغام GO در ماتریس، به مقدار بسیار کمی افزایش یافت و به میزان ۱۱ درصد رسید. این نتیجه به گروه‌های قطبی ساختار GO نسبت داده می‌شود که منجر به افزایش آب‌دوستی نمونه شده و اجازه نفوذ آسان‌تر آب را از محیط تخریب داده و باعث افزایش سرعت تخریب هیدرولیتیک زنجیره‌های پلی‌لاکتیک اسید می‌شود. بنابراین، افزایش آسیب‌پذیری آمیزه در برابر حملات ریزجانداران اساساً به دلیل نقش کاتالیزوری GO می‌باشد که باعث جذب آب بالاتر و به دنبال آن شکسته شدن زنجیره‌های پلی‌لاکتیک اسید شده و سطح تماس بزرگ‌تری بین نمونه پلیمری و محیط تخریب‌کننده ایجاد می‌کند (Medjdoub et al., 2017).

علت بهبود عملکرد فیلم ضدقارچی را می‌توان به اتصال یون‌های با بار مثبت GO به غشاء باکتریایی با بار منفی دانست، که در پی آن پروتئین اطراف باکتری را جامد کرده و آنزیم را برای تکثیر سلولی غیرفعال می‌کند (Wang et al., 2016). نمونه LDP9-G5 در هر دو محیط‌کشت باکتری دارای بیشترین فعالیت ضدقارچی بود. همچنین حضور GO نیز با تضعیف غشاء بیرونی سلول به هم‌افزایی در فعالیت ضد میکروبی کمک کرده و در نتیجه، سلول‌ها را در معرض تخریب قرار می‌دهد.

زیست‌تخریب‌پذیری

شکل ۶ تغییرات درصد وزن باقی‌مانده (R_w) در مقابل زمان تخریب شدن زیستی را برای نمونه‌های LDPE/LLDPE، LDP9 و LDP9-G5 نشان می‌دهد. فیلم آمیخته LDPE/LLDPE تقریباً هیچ کاهش وزنی را نشان نمی‌دهد. پلیمرهای نفتی شامل زنجیره‌ی کربنی هستند که از پیوندهای کربن-کربن کووالانسی به دست می‌آیند که برای تخریب آن‌ها به زمان بسیار بیشتر و/یا حضور کاتالیزور نیاز می‌باشد. اما، فیلم پلی‌لاکتیک اسید به دلیل خواص زیست‌تخریب‌پذیری خود می‌تواند زودتر در طبیعت تخریب شود. همان‌طور که شکل ۶ نشان می‌دهد، با افزودن پلی‌لاکتیک اسید به ماتریس پلی‌اتیلن، طی زمان کاهش وزن قابل‌ملاحظه‌ای در ماتریس رخ می‌دهد، به طوری که نمونه LDP9 پس از هشت هفته دارای میزان زیست‌تخریب‌پذیری حدود ۱۰ درصد بود که علت افزایش تخریب‌پذیری نمونه به دلیل تخریب هیدرولیتیکی پلی‌لاکتیک اسید می‌باشد. این نتیجه با تحقیقات مدوب و همکاران (Medjdoub, Guessoum, & Fois, 2017) نیز مطابقت دارد. آن‌ها گزارش کردند که حضور پلی‌لاکتیک اسید باعث افزایش تخریب‌پذیری زیستی فیلم LLDPE-LDPE/PLA (۵۰/۵۰) می‌شود. در درصد‌های بالاتر پلی‌لاکتیک اسید، به دلیل دسترسی آسان ریزجانداران به زنجیره‌های پلیمری از طریق حجم آزاد موجود بین آن‌ها، فرآیند تجزیه‌پذیری زیستی (آزادسازی دی‌اکسید کربن (CO₂) و آب



شکل ۶- نتایج زیست تخریب پذیری برای نمونه‌های LDPE/LLDPE، LDP9 و LDP9-G5
 Fig. 6. Biodegradability results for LDPE/LLDPE, LDP9 and LDP9-G5 samples

سپاسگزاری

از کارکنان و مسئولین حوزه معاونت پژوهشی و آموزشی دانشگاه فردوسی مشهد که در تأمین بودجه و امکانات لازم جهت اجرای این پروژه همکاری داشته‌اند تقدیر و تشکر می‌شود (کد طرح ۵۸۸۸۵).

میزان مشارکت نویسندگان

مریم فتحی فر: نوشتن - پیش‌نویس اصلی، مفهوم‌سازی، تحقیق و بررسی، نرم‌افزار، ناصر صداقت: مدیریت داده‌ها، مدیریت پروژه، نظارت، محمدرضا عبدالمهدی مقدم: تحلیل رسمی، روش‌شناسی، نظارت.

منابع تأمین مالی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد (گرنه طرح شماره ۵۸۸۸۵) انجام شد.

علاوه بر اثر فردی آن، فعل و انفعالات بین GO و همچنین گونه‌های اکسیژن فعال^۱ را برای القاء پراکسیداسیون لیپیدی و فلج کردن قابلیت‌های تکثیر *E. coli* ایجاد می‌کند (Ghosh *et al.*, 2023; Silva-Leyton *et al.*, 2019).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که فیلم‌های حاصل از ترکیب نانو مواد و پلیمرها/پلیمرهای زیستی، خواص کاربردی مناسب‌تری نسبت به پلیمرهای پایه نشان می‌دهند. بهبود خصوصیات مکانیکی و ممانعت‌کنندگی و افزایش خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها در صورت برخورداری نانو مواد از ویژگی ضد میکروبی از جمله این ویژگی‌ها می‌باشند. آمیزه پلی اتیلن/پلی لاکتیک اسید حاوی پنج درصد وزنی نانواکسید گرافن نسبت به پلیمر ماتریس و نمونه‌های حاوی یک و سه درصد وزنی نانواکسید گرافن، دارای بیشترین مقاومت کششی، مدول الاستیک، خاصیت ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، فعالیت ضد قارچی علیه *اشریشیا کلی* و *کاندیدا آلبیکنس* و همچنین بیشترین زیست تخریب پذیری و برعکس کمترین افزایش طول در نقطه پارگی، نرخ انتقال بخار آب، نرخ انتقال اکسیژن، انتقال نور مرئی و اشعه ماوراء بنفش بود.

References

- Alimardani, V., Abolmaali, S.S., & Borandeh, S. (2019). Antifungal and antibacterial properties of graphene-based nanomaterials: a mini-review. *Journal of Nanostructures*, 9(3), 402-413.
- ASTM. E 96-95. (1995). *Standard test methods for water vapor transmission of material*. In Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. <https://doi.org/10.1520/jte11977j>
- ASTM D882-02. (2002). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, ASTM International.
- ASTM D3985-05. (2005). Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor, ASTM International. <https://doi.org/10.1520/d3985-95>
- Ashfaq, A., Khursheed, N., Fatima, S., Anjum, Z., & Younis, K. (2022). Application of nanotechnology in food packaging: Pros and Cons. *Journal of Agriculture and Food Research*, 7, 100270. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100270>
- Boubekour, B., Belhaneche-Bensemra, N., & Massardier, V. (2015). Valorization of waste jute fibers in developing low-density polyethylene/poly lactic acid bio-based composites. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 34(8), 649-661. <https://doi.org/10.1177/0731684415576354>
- Chen, S., Ma, W., Xiang, H., Cheng, Y., Yang, S., Weng, W., & Zhu, M. (2016). Conductive, tough, hydrophilic poly (vinyl alcohol)/graphene hybrid fibers for wearable supercapacitors. *Journal of Power Sources*, 319, 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.04.030>
- Emamhadi, M.A., Sarafraz, M., Akbari, M., Fakhri, Y., Linh, N.T.T., & Khaneghah, A.M. (2020). Nanomaterials for food packaging applications: A systematic review. *Food and Chemical Toxicology*, 146, 111825. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111825>
- Escursell, S., Llorach-Massana, P., & Roncero, M.B. (2021). Sustainability in e-commerce packaging: A review. *Journal of Cleaner Production*, 280, 124314. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124314>
- Faraji Kafshgari, S., Akbarian Meymand, M.J., & Habibi Najafi, M. (2024). Investigating types of antimicrobial packaging systems. *Scientific Journal of Packaging Science and Art*, 14(56), 63-78. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.22286675.1402.14.56.6.6>
- Ghosh, S.K., Nath, K., Ganguly, S.S., Das, T.K., Paul, S., Ghosh, T., & Das, N.C. (2023). Improved rheological, barrier, antibacterial, and electromagnetic interference shielding properties of graphene and graphene derivatives based linear low density polyethylene nanocomposites. *Polymer Composites*, 44(9), 5702-5720. <https://doi.org/10.1002/pc.27520>
- Huang, Y., Wang, T., Zhao, X., Wang, X., Zhou, L., Yang, Y., & Ju, Y. (2015). Poly (lactic acid)/graphene oxide–ZnO nanocomposite films with good mechanical, dynamic mechanical, anti-UV and antibacterial properties. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(9), 1677-1684. <https://doi.org/10.1002/jctb.4476>
- Hu, X., Ren, N., Chao, Y., Lan, H., Yan, X., Sha, Y., Sha, X., & Bai, Y. (2017). Highly aligned graphene oxide/poly (vinyl alcohol) nanocomposite fibers with high-strength, antilultraviolet and antibacterial properties. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 102, 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2017.08.015>
- Karimi Zarchi, M., Fathi, M.R., Raeesi Nafchi, S., & Safar Mohammad Luo, S. (2024). Providing a framework for sustainable innovation in the packaging industry (case study: Yazd packaging industries). *Scientific Journal of Packaging Science and Art*, 14(56), 1-11. (In Persian with English abstract). <https://dorl.net/dor/20.1001.1.22286675.1402.14.56.1.1>
- Kaufmann, J., & Hesselbarth, D. (2007). High performance composites in spun-cast elements. *Cement and Concrete Composites*, 29(10), 713-722. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2007.06.001>
- Khademi Shurmasti, D., Nourkami, F., & Momenian, K. (2024). Physical, mechanical and antibacterial properties of active composite film containing thyme of Shiraz extract (*Zataria multiflora* Boiss.) in food packaging. *Packaging Sciences and Techniques*, 15(58), 29-36. (In Persian with English abstract). <https://dorl.net/dor/20.1001.1.22286675.1403.15.58.3.4>
- Kumar, K.A., & Soundararajan, S. (2016). Studies on mechanical, barrier, optical and physical properties of LDPE/PLA blend for packaging films. *Journal of Polymer Materials*, 33(3), 491.
- Kumar, K.A., & Soundararajan, S. (2018). Studies on the mechanical, barrier, optical, and characterization of photo-/biodegradable LDPE-PLA blend with nanoclay for packaging film application. *Polymers from Renewable Resources*, 9(3-4), 87. <https://doi.org/10.1177/2041247918799776>
- Kumar, P., Huo, P., Zhang, R., & Liu, B. (2019). Antibacterial properties of graphene-based nanomaterials. *Nanomaterials*, 9(5), 737. <https://doi.org/10.3390/nano9050737>
- Lau, J.H. (2022). Recent advances and trends in advanced packaging. *IEEE Transactions on Components, Packaging and Manufacturing Technology*, 12(2), 228-252. <https://doi.org/10.1109/TCPMT.2022.3144461>
- Liu, L., Zhang, J., Zhao, J., & Liu, F. (2012). Mechanical properties of graphene oxides. *Nanoscale*, 4(19), 5910-5916. <https://doi.org/10.1039/c2nr31164j>

22. Medjdoub, N., Guessoum, M., & Fois, M. (2017). Viscoelastic, thermal and environmental characteristics of poly (lactic acid), linear low-density polyethylene and low-density polyethylene ternary blends and composites. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 31(7), 787-805. <https://doi.org/10.1080/01694243.2016.1232547>
23. Primožic, M., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2021). Nanotechnology in food science—food packaging. *Nanomaterials*, 11(2), 292. <https://doi.org/10.3390/nano11020292>
24. Rogovina, S., Prut, E.V., Aleksanyan, K.V., Krasheninnikov, V.G., Perepelitsyna, E.O., Shashkin, D.P., Ivanushkina, N., & Berlin, A.A. (2019). Production and investigation of structure and properties of polyethylene–polylactide composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(22), 47598. <https://doi.org/10.1002/APP.47598>
25. Schyns, Z.O., & Shaver, M.P. (2021). Mechanical recycling of packaging plastics: A review. *Macromolecular rapid Communications*, 42(3), 2000415. <https://doi.org/10.1002/marc.202000415>
26. Shankar, S., Bang, Y.J., & Rhim, J.W. (2019). Antibacterial LDPE/GSE/Mel/ZnONP composite film-coated wrapping paper for convenience food packaging application. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100421. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100421>
27. Silva-Leyton, R., Quijada, R., Bastías, R., Zamora, N., Olate-Moya, F., & Palza, H. (2019). Polyethylene/graphene oxide composites toward multifunctional active packaging films. *Composites Science and Technology*, 184, 107888. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2019.107888>
28. Swetha, T.A., Bora, A., Mohanrasu, K., Balaji, P., Raja, R., Ponnuchamy, K., Muthusamy, G., & Arun, A. (2023). A comprehensive review on polylactic acid (PLA)—Synthesis, processing and application in food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 234, 123715. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123715>
29. Wang, L.F., & Rhim, J.W. (2016). Grapefruit seed extract incorporated antimicrobial LDPE and PLA films: Effect of type of polymer matrix. *Lwt*, 74, 338-345. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.066>
30. Winotapun, C., Phattarateera, S., Aontee, A., Junsook, N., Daud, W., Kerddonfag, N., & Chinsirikul, W. (2019). Development of multilayer films with improved aroma barrier properties for durian packaging application. *Packaging Technology and Science*, 32(8), 405-418. <https://doi.org/10.1002/pts.2452>
31. Wyrwa, J., & Barska, A. (2017). Innovations in the food packaging market: Active packaging. *European Food Research and Technology*, 243, 1681-1692. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2878-2>
32. Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M.K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., & Coma, V. (2018). Active packaging applications for food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 165-199. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12322>



Effect of Solvent Composition and Auxiliary Treatments on the Extraction of *Dracocephalum kotschy* Boiss Extract Using Deep Eutectic Solvents

S. Kiani¹, H. Abbasi^{1*}

1- Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

(*- Corresponding Author Email: H.abbasi@Khuisf.ac.ir)

Received: 21.01.2025

Revised: 26.04.2025

Accepted: 10.05.2025

Available Online: 18.08.2025

How to cite this article:

Kiani, S., & Abbasi, H. (2025). Effect of solvent composition and auxiliary treatments on the extraction of *Dracocephalum kotschy* Boiss extract using deep eutectic solvents. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(4), 393-407. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.91737.1403>

Introduction

Recovery of active ingredients from plants is generally carried out using solid-liquid extraction. Selecting an appropriate solvent is one of the parameters that strongly affects the extraction performance and the type of extracted compounds. So far, various solvents have been used to extract these compounds. In addition to the need for large amounts of solvent, the high consumption of organic solvents causes problems such as environmental pollution and possible destruction of active compounds. Green solvents have been considered for the extraction process to reduce the consumption of non-toxic solvents and protect the environment. Natural deep eutectic solvents (NADES) are a new class of solvents used in extraction that consist of a mixture of two or more biodegradable natural compounds with low or no toxicity. The important features of these solvents are their low toxicity, biocompatibility, simple preparation, and low cost. Given the significant advantages of these solvents, in recent years, the use of NADES in the extraction of phenolic and antioxidant compounds has been considered. Applying appropriate auxiliary treatments to the sample or the sample-solvent combination during the extraction process can improve the performance of the extraction process. The use of ultrasonic waves allows for better extraction by creating shear force, disrupting the integrity of the cell wall, and better penetration of the solvent into the tissue. Pulsed electric waves also create pores in the cell membrane without causing minimal damage to the other parts, while maintaining consistency and structure, accelerating the permeability and transport of water and dissolved substances from the cell membrane, and allowing the extraction of active substances under better conditions.

Materials and Methods

This study was conducted in 3 phases to extract the compounds of the golden plant using natural deep eutectic solvents. In the first phase, effect of the type of solvent used including carboxylic acids (citric acid and malic acid), sugars (glucose and fructose), and sugar alcohols (ethylene glycol and glycerol) on the quality of the extracted material was evaluated. In the second phase, to improve the possibility of extracting the active ingredient of this plant, the sample was treated with pulsed electric waves, and in the third phase, the extraction of phenolic compounds from the sample was carried out with the solvent type selected from the first phase under the conditions of applying and non applying ultrasonic waves. Identification of the compounds present in the extract was carried out on the selected samples using HPLC. Finally, the ability to recover the extracted compounds was carried out from the best sample. Statistical analysis of the results was carried out using a completely randomized design - factorial test with SAS VERSION 9 software.

Results and Discussion

The extract from the eutectic solvent containing ethylene glycol due to its high antioxidant activity and the extract from the eutectic solvent containing maleic acid due to its high phenolic compounds were selected as the best solvents for making the *Dracocephalum kotschy* extract. Considering the total number of identified



compounds, the content of identified compounds in the extract with a eutectic solvent containing ethylene glycol was 17000.05 $\mu\text{g/g}$, and in the extract with a eutectic solvent containing maleic acid was 10029.1 $\mu\text{g/g}$. Therefore, the content of active compounds of an extract with a eutectic solvent containing ethylene glycol was about 70% higher than the content of active compounds of an extract with a eutectic solvent containing maleic acid, and this solvent was selected for further studies. The study of the effect of applying electric pulses and ultrasonic waves on the extraction process shows that by increasing the intensity of the electric pulse and the duration of using ultrasonic waves, the content of phenolic compounds and antioxidant properties of the extract increased. Electric pulses accelerate the permeability and transport of water and dissolved substances by creating pores in the cell membrane. The change in the properties of the cell wall membrane in such a way that the substances inside the cell can be quickly and easily removed from the cell, causes the extraction to be carried out in the minimum time and energy required. The total weight of phenolic compounds identified in the extract with a eutectic solvent containing ethylene glycol with the application of auxiliary was 25275.41 $\mu\text{g/g}$, without the application of auxiliary treatments was 17000.05 $\mu\text{g/g}$, and in the sample extracted with ethanol was 21652.89 $\mu\text{g/g}$. Therefore, the application of auxiliary treatments was effective and superior to the ethanol solvent in increasing the extraction of compounds from the plant. The polyphenol content extracted with ethylene glycol-choline chloride with and without auxiliary treatments was determined as 53 and 45 percent, respectively.

Conclusion

The solvent containing choline chloride-ethylene glycol had the best conditions for extracting the active compounds of *Dracocephalum kotschyi*. Applying a 5000 W electric pulse pretreatment and using ultrasonic waves for 30 minutes in the extraction stage had a significant effect in increasing the extractability of the active compounds. Using the anti-solvent (water) precipitation method, 53% of the phenolic compounds were recovered and the eutectic solvent was returned to the system.

Keywords: Antioxidant activity, *Dracocephalum kotschyi*, Natural deep eutectic solvent, Phenolic compounds, Pulse electric field, Ultrasonic waves

مقاله پژوهشی

جلد ۲۱، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۴، ص. ۳۹۳-۴۰۷

ارزیابی تأثیر ترکیب حلال و کاربرد تیمارهای کمکی در استخراج عصاره زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy Boiss*) به کمک حلال‌های یوتکتیک عمیق

سحر کیانی^۱ - هاجر عباسی^{۱*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

چکیده

در این مطالعه، استخراج ترکیبات مؤثره زرین گیاه با استفاده از حلال‌های یوتکتیک در سه مرحله انجام شد. در مرحله اول، تأثیر ترکیبات مختلف حلال شامل کربوکسیلیک‌اسیدها (سیتریک‌اسید و مالیک‌اسید)، قندها (گلوکز و فروکتوز) و قندالکل‌ها (اتیلن‌گلیکول و گلیسرول) بر کیفیت عصاره استخراج‌شده ارزیابی شد. نسبت ترکیبات گیرنده پیوند هیدروژنی به اهداکننده پیوند هیدروژنی (کولین کلراید) ۱:۱ (مولار) در نظر گرفته شد. در مرحله دوم، به منظور بهبود استخراج عصاره، نمونه تحت تیمار با امواج الکتریکی پالسی در دو شدت میدان ۲۰۰۰ ولت و ۵۰۰۰ ولت قرار گرفت و در مرحله سوم استخراج ترکیبات با حلال منتخب از مرحله اول در شرایط اعمال و عدم اعمال امواج فراصوت در صفر، ۱۵ و ۳۰ دقیقه تحت اعمال امواج فراصوت با توان ۲۰۰ وات صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که عصاره مستخرج با حلال حاوی اتیلن‌گلیکول به دلیل بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی و عصاره مستخرج با حلال حاوی مالیک‌اسید به دلیل بالا بودن ترکیبات فنولیک به عنوان بهترین حلال‌ها انتخاب شدند. محتوای ترکیبات مؤثره عصاره مستخرج با حلال اول ۶۹/۵٪ بیشتر از حلال دوم ارزیابی شد و در این مرحله حلال یوتکتیک حاوی کولین کلراید-اتیلن‌گلیکول برای استخراج عصاره زرین گیاه انتخاب شد. با افزایش ولتاژ امواج الکتریکی پالسی بر نمونه و مدت زمان اعمال امواج فراصوت در مرحله استخراج، محتوای ترکیبات فنولیک استخراج شده آن افزایش یافت. مجموع وزنی ترکیبات شناسایی شده در عصاره مستخرج با حلال یوتکتیک حاوی اتیلن‌گلیکول با اعمال تیمارهای کمکی ۲۵۲۷۵/۴۱ و بدون اعمال تیمارهای کمکی ۱۷۰۰۰/۰۵ میکروگرم بر گرم ارزیابی شد. اعمال پیش تیمار امواج الکتریکی پالسی ۵۰۰۰ ولت و استفاده از امواج فراصوت به مدت ۳۰ دقیقه در مرحله استخراج، تأثیر معنی‌داری در افزایش قابلیت استخراج ترکیبات مؤثره زرین گیاه نشان دادند. با استفاده از روش رسوب ضد حلال، ۵۳٪ کل ترکیبات فنولیک استخراج شده با ارزیابی و حلال یوتکتیک به سیستم بازگردانده شد.

واژه‌های کلیدی: امواج الکتریکی پالسی، ترکیبات فنولیک، حلال یوتکتیک عمیق، زرین گیاه، فراصوت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

ایران است که معمولاً در ارتفاعات می‌روید (Mozaffarian, 2008). مواد مؤثره اصلی این گیاه شامل لیمونن^۲، جرانیا^۳، متیل گرانات^۴، آپیژنین^۵، لوتولین^۶، پندولیتول^۷، نرال^۸ و رزماریک اسید^۹، زانتومیکرول^{۱۰}،

زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschy Boiss* متعلق به خانواده Lamiaceae یکی از گیاهان دارویی با ارزش بومی

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
* - نویسنده مسئول: (Email: H.abbasi@Khuis.ac.ir)

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.91737.1403>

- 2- Limonene
- 3- Geranial
- 4- Methyl geranat
- 5- Apigenin
- 6- Luteolin
- 7- Penduletin
- 8- Neral
- 9- Rosmarinic acid
- 10- Xanthomicrol

آنتی‌اکسیدانی مورد توجه قرار گرفته است (Aydin, Yilmaz, & Soyлак, 2018). مطالعات نشان می‌دهد، ترکیبات فنولیک فقط تا ۹۰ روز در آب و اتانول پایدار می‌مانند، درحالی‌که NADES قابلیت تثبیت‌کنندگی بهتری برای آن‌ها دارند (Delos Angeles Fernandez, Espino, Gomez, & Silva, 2018). استخراج ترکیبات فنولیک از برگ توت با استفاده از سه گروه ترکیبات (بتائین، کولین کلراید، L-پرولین) و HBD (آمیدها، الکل‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک) نشان داد که حلال دارای کولین کلراید بالاترین راندمان استخراج ترکیبات فنولیک را دارا است. حلال‌های دارای بتائین و پس از آن حلال‌های حاوی پرولین و آب عملکرد به مراتب ضعیف‌تری در این خصوص نشان می‌دهند. به دلیل برهمکنش‌های هیدروژنی میان ملکول‌های تشکیل‌دهنده حلال و ترکیبات فنولیک، در میان ترکیبات هیدروژن گیرنده، حلال دارای سیتریک اسید راندمان استخراج بالاتری در مقایسه با سایرین نشان داد. (Zhou et al., 2018). دراستخراج ترکیبات فنولیک از نعنای نیز کولین کلراید به‌عنوان بهترین ترکیب هیدروژن دهنده، بالاترین راندمان استخراج را حاصل نمود. به‌کارگیری حلال‌های یوتکتیک متشکل از کولین کلراید و گلیسرول، بالاترین عملکرد در استخراج محتوای ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها را دارا بودند. بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره مستخرج، با استفاده از حلال دارای کولین کلراید - مالیک اسید حاصل آمد (Juric et al., 2021). استفاده از DES های حاوی اگزولیتول-کولین کلراید و ۱-۲ پروپاندیول - کولین کلراید نیز نشان داد که این حلال‌ها جایگزین مناسب و کارآمدی برای محلول متانولی جهت استخراج ترکیبات فعال زیستی روغن زیتون شامل اولاسین^۶ و اولیوکانتال^۷ می‌باشد (García, Rodríguez-Juan, Rodríguez-Gutiérrez, Julian Rios, & Fernández-Bolaños, 2018).

بررسی منابع در خصوص استخراج ترکیبات مؤثره گیاهان نشان می‌دهد که بعضا اعمال تیمارهای کمکی بر نمونه یا ترکیب نمونه و حلال درحین فرآیند استخراج می‌تواند موجبات بهبود عملکرد فرآیند استخراج را فراهم آورد. استفاده از امواج فراصوت با ایجاد نیروی برشی، اختلال در انسجام دیواره‌ی سلول و نفوذ بهتر حلال به درون بافت، امکان استخراج بهتری را فراهم می‌کند. مطالعات انجام گرفته در این خصوص بر نمونه‌های مختلف از جمله روغن زیتون، نشان از تأثیر مناسب امواج در شرایط مطلوب بر افزایش راندمان استخراج ترکیبات فنولیک دارد (García et al., 2018). امواج الکتریکی پالسی نیز با ایجاد منافذ در غشاء سلول و بدون اعمال کمترین آسیب به قسمت‌های

سیرسیماریتین^۱ و میرتنول^۲ می‌باشد (Foroozandeh & Asadi-Gharneh, 2021) و در طب سنتی از آن به‌عنوان ضد سرطان، ضد تومور، ضد التهاب، ضد اسپاسم، کاهنده تب، درد مفاصل، رماتیسم و التیام دهنده زخم استفاده می‌شود (Mozaffarian, 2008). ترکیبات این گیاه دارای خواص مهارکننده‌گی و کشندگی قارچ‌ها، باکتری‌ها و یروس‌ها هستند (Foroozandeh & Asadi-Gharneh, 2021). بازایابی مواد مؤثره گیاهان عموماً با استفاده از فرآیند استخراج جامد- مایع انجام می‌شود. انتخاب حلال مناسب از پارامترهای است که به شدت بر عملکرد استخراج و نوع ترکیبات عصاره مستخرج تأثیرگذار است. تاکنون حلال‌های مختلفی مانند اتانول، استون، متانول، هگزان و آب به‌طور جداگانه یا مخلوط با یکدیگر برای استخراج این ترکیبات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. علاوه بر نیازمندی به مقادیر زیاد حلال، مصرف بالای حلال‌های آلی مشکلاتی مانند آلودگی محیط‌زیست و تخریب احتمالی ترکیبات مؤثره را موجب می‌شود (Azmir et al., 2013).

با هدف کاهش مقدار مصرف حلال‌های غیرسمی و حفاظت از محیط‌زیست، به‌کارگیری حلال‌های سبز در فرآیند استخراج، مورد توجه قرار گرفته است. حلال‌های یوتکتیک عمیق طبیعی^۳ (NADES) دسته‌ی جدیدی از حلال‌های مورد استفاده در استخراج ترکیبات مؤثره گیاهان هستند که از مخلوط دو یا چند ترکیب طبیعی زیست‌تخریب‌پذیر با سمیت کم یا بدون سمیت تشکیل شده‌اند. این حلال‌ها عموماً شامل دو دسته ترکیبات دهنده پیوند هیدروژنی^۴ (HBD) مانند کولین کلراید، بتائین و L-پرولین و گیرنده پیوند هیدروژنی^۵ (HBA) مانند قندها، قند الکل‌ها و کربوکسیلیک‌اسیدها می‌باشند، که با ویژگی‌های متفاوت متأثر از مواد تشکیل دهنده خود مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zhang, De Oliveira-Vigier, Royer, & Jérôme, 2012). از ویژگی‌های مهم این حلال‌ها، سمیت کم، سازگاری زیستی، آماده‌سازی ساده و کم‌هزینه بودن آن‌ها می‌باشد (Dai, Spronsenb, Witkampb, Verpoortea, & Hae Choi, 2013). برهمکنش بین ملکول‌های تشکیل‌دهنده این حلال‌ها باعث محدود شدن تحرک و افزایش ویسکوزیته آنها می‌گردد. وجود مولکول‌های آب با تضعیف فعل و انفعالات میان اجزای تشکیل‌دهنده حلال، افزایش ۱۰ تا ۱۰۰ برابری رسانایی حلال را موجب می‌شود (Smith, Abbott, & Ryder, 2014; Florindo, Oliveira, Rebelo, Fernandes, & Marrucho, 2014). با توجه به مزایای قابل توجه این حلال‌ها، در سال‌های اخیر کاربرد NADES در استخراج ترکیبات فنولیک و

5- Hydrogen bond acceptor

6- Oleacein

7- Oleocanthal

1- Cirsimaritin

2- Myrtenol

3- Natural deep eutectic solvents

4- Hydrogen bond donor

مواد مورد نیاز

زرین‌گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschy* Boiss مرکز گیاهان دارویی اصفهان تهیه و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در سایه خشک گردید، سپس آسیاب و از الک دارای مش ۶۰ عبور داده شد. کولین کلراید، معرف فولین و ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت سیگما^۱ (آمریکا)، گلیسرول، اتیلن گلیکول، سیتریک اسید، مالیک اسید، ساکارز، فروکتوز از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز از جمله اتانول از شرکت پارس الکل (ایران) و کربنات سدیم از شرکت ساکو (ایران) خریداری شدند.

آماده‌سازی NADES

مطابق جدول ۱، ۶ حلال با استفاده از ترکیبات مختلف تهیه گردید. نسبت ترکیبات گیرنده پیوند هیدروژنی به اهداکنندگان پیوند هیدروژنی ۱:۱ (مولار) در نظر گرفته شد. آب به‌عنوان رقیق‌کننده برابر وزن مجموع ترکیبات افزوده گردید. ساخت حلال‌های یوتکتیک در حمام فراصوت مدل PARSONIC 15s (شرکت مهندسی پارس نهند، ایران)، دارای توان ۲۰۰ W در ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا تشکیل یک مایع شفاف انجام گرفت.

استخراج زرین‌گیاه با NADES و ارزیابی عصاره

مستخرج

جهت انجام استخراج، ۰/۲ گرم پودر زرین‌گیاه با ۴ میلی‌لیتر حلال ترکیب و در حمام آب دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت. سپس ترکیب حلال و نمونه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (Zhou et al., 2018).

محتوای کل ترکیبات فنولیک عصاره مستخرج با روش رنگ‌سنجی و در مجاورت معرف فولین-سیوکالتیو^۲ ارزیابی شد (Santos, Pinto, Silvestre, & Pascoal Neto, 2010). برای این منظور، ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتیو ۰/۱٪، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵٪ با ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره استخراج شده مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه، میزان جذب نمونه‌ها در ۷۶۰ نانومتر با استفاده از طیف‌سنج اندازه‌گیری شد. غلظت ترکیبات فنولیک موجود در عصاره‌ها بر مبنی میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه و با استفاده از منحنی استاندارد آن محاسبه شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده از زرین‌گیاه با استفاده از روش رنگ‌سنجی و با به‌کارگیری معرف DPPH اندازه‌گیری شد

دیگر، با حفظ قوام و ساختمان، نفوذپذیری و انتقال آب و مواد محلول از غشا سلولی را سرعت می‌بخشد و امکان استخراج مواد مؤثره را در شرایط بهتری فراهم می‌کند (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). در استخراج قند از چغندر قند مشاهده شد که با اعمال امواج الکتريکی پالسی، کارایی استخراج تا ۸۲٪ و خلوص عصاره مستخرج تا ۹۵-۹۸٪ افزایش می‌یابد. لذا پس از اعمال امواج الکتريکی پالسی، محتوای قند بالاتر و رنگ بهتری در نمونه‌های تحت تیمار مشاهده گردید (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). بررسی اثر میدان الکتريکی پالسی همزمان با اعمال فشار در استخراج آب سیب نیز نشان داد که افزایش فشار، همزمان با اعمال امواج الکتريکی پالسی در تولید مقادیر بالاتر آبمیوه و افزایش کیفیت آن تأثیر معنی‌داری دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که با اعمال امواج الکتريکی پالسی، تولید آبمیوه از ۱/۷ به ۷/۷٪ افزایش می‌یابد. همچنین این روش سبب غیرفعال شدن میکروارگانیزم‌ها با حفظ محتوی ترکیبات فنولیک و بدون تغییر در خصوصیات ارگانولپتیک و تغذیه‌ای محصول می‌گردد (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). اعمال امواج الکتريکی پالسی با افزایش قابلیت نفوذ حلال در سلول‌های گیاهی و جانوری، موجبات سهولت استخراج مواد درون سلولی را فراهم می‌کند. لذا از این فرآیند می‌توان به‌عنوان یک پیش‌فراوری در استخراج مواد با ارزش نظیر آنزیم‌ها، قندها و سایر ترکیبات استفاده نمود (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014).

این مطالعه با هدف استخراج ترکیبات فنولیک زرین‌گیاه با استفاده از حلال‌های یوتکتیک عمیق طبیعی در ۳ بخش انجام گرفت. در قسمت اول با هدف انتخاب بهترین ترکیب حلال، بررسی استفاده از کربوکسیلیک‌اسیدها (سیتریک اسید و مالیک اسید)، قندها (گلوکز و فروکتوز) و قند الکل‌ها (اتیلن گلیکول و گلیسرول) به‌عنوان ترکیبات هیدروژن گیرنده در کنار کولین کلراید به‌عنوان هیدروژن دهنده بر کیفیت عصاره مستخرج مورد ارزیابی قرار گرفت. در فاز دوم به‌منظور بهبود امکان استخراج ماده مؤثره این گیاه، نمونه تحت تیمار با امواج الکتريکی پالسی با ولتاژهای مختلف قرار گرفت و در مرحله سوم استخراج ترکیبات فنولیک نمونه با حلال منتخب از مرحله اول در شرایط اعمال و عدم اعمال امواج فراصوت در دو بازه زمانی صورت پذیرفت. اثر متغیرهای اعمال شده به‌صورت مستقل و متقابل ارزیابی و در نهایت قابلیت بازیابی ترکیبات استخراج شده از بهترین نمونه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

(Li, Du, Jin, & Du, 2012). برای این منظور ۰/۰۰۲ گرم DPPH

با ۴۰ میلی‌لیتر متانول برای تهیه محلول DPPH مخلوط گردید.

جدول ۱- ترکیبات مورد استفاده در تولید حلال‌های یوتکتیک جهت استخراج زین گیاه

Table 1- Compounds of eutectic solvents for the extraction of *D. kotschy*

نمونه	اهداننده پیوند هیدروژنی	گیرنده پیوند هیدروژنی
Sample	Hydrogen bond donor	Hydrogen bond acceptor
1	Choline chloride (Chcl)	Glycerol (Gly)
2	Choline chloride (Chcl)	Ethylene glycol (Eg)
3	Choline chloride (Chcl)	Malic acid (Ma)
4	Choline chloride (Chcl)	Citric acid (Ca)
5	Choline chloride (Chcl)	Sucrose (Su)
6	Choline chloride (Chcl)	Fructose (Fr)

خنک‌کننده، سیستم کنترل و مانیتورینگ هستند (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). در اعمال پیش‌تیمار پالس، ۵ گرم زین گیاه با ۵۰ میلی‌لیتر آب مخلوط و در ظرف مخصوص دستگاه (۴۰۰ سانتی‌متر مکعب) قرار گرفت. اعمال امواج الکتریکی پالسی توسط دو الکترود فولادی ضدزنگ (۵۰ سانتی‌متر مربع) به فاصله ۴ سانتی‌متر انجام گرفت. این فرآیند در دو شدت میدان ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ ولت، تعداد پالس ۱۲۰، فرکانس ۱ هرتز، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، عرض ۱۰ میکروثانیه انجام گردید. در نهایت نمونه‌ها توسط خشک‌کن انجمادی، خشک شدند (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014).

استخراج زین گیاه با حلال منتخب تحت اعمال امواج

فراصوت

جهت بررسی تأثیر فراصوت بر کیفیت عصاره مستخرج از زین گیاه با NADES منتخب، حلال یوتکتیک تهیه و استخراج نمونه در صفر، ۱۵ و ۳۰ دقیقه تحت اعمال امواج فراصوت انجام گرفت. در زمان صفر، استخراج بدون اعمال امواج فراصوت به مدت ۱ ساعت در حمام آب ۷۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در زمان ۱۵ دقیقه، استخراج نمونه به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب و ۱۵ دقیقه در حمام فراصوت انجام شد و در زمان ۳۰ دقیقه، نمونه مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب و سپس ۳۰ دقیقه در حمام فراصوت انجام شد. دما در همه فرآیندهای ذکر شده ۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. محتوای فنل، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان و پروفایل ترکیبات نمونه منتخب ارزیابی گردید (Wu, Li, Chen, Wang, & Lin, 2020).

بازیابی ترکیبات فنولیک عصاره مستخرج منتخب

به منظور بازیابی ترکیبات فنولیک از حلال یوتکتیک، از روش رسوب ضدحلال با استفاده از آب استفاده شد. به این منظور، محلول DES همراه نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. آب به آرامی به نسبت ۱:۲۰ به مواد رویی افزوده و مخلوط شد و

۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ها با ۴ میلی‌لیتر محلول DPPH مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای محیط قرار داده شدند، سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. میزان مهار رادیکال موجود با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$\% \text{ DPPH inhibition} = ((A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}) \times 100 \quad (1)$$

در رابطه بالا A control عدد جذب کنترل و A sample عدد جذب نمونه می‌باشد.

ارزیابی کمی و کیفی ترکیبات استخراج شده

پروفایل ترکیبات عصاره استخراج شده با محلول یوتکتیک دارای بالاترین محتوای ترکیبات فنولیک و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا (HPLC) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام HPLC، نمونه را با بیست برابر آب مقطر رقیق و سپس از فیلتر سلولزی با اندازه منافذ ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. در این دستگاه، ستون مورد استفاده C-18 (۲×۱۵۰ میلی‌متر)، دمای ستون ۴۰ درجه سانتی‌گراد، حجم تزریق ۵ میکرولیتر و آشکارساز مورد استفاده فتودیودی بود. فاز مایع شامل محلول ۱٪ اسید فرمیک در متانول بود که با سرعت جریان ۰/۲۵ میلی‌لیتر در دقیقه وارد ستون گردید. طول موج شناسایی فلاوانون‌ها و فلاوان‌ها ۲۸۰ نانومتر، اسید هیدروکسی‌سینامیک ۳۲۰ نانومتر، و فلاونوئیدها ۳۵۰ نانومتر در نظر گرفته شد (Juric et al., 2021).

اعمال پیش‌تیمار امواج الکتریکی پالسی

اجزای سیستم شامل منبع انرژی و محفظه تیمار (دو الکترود و مواد عایق دی‌الکتریک) است. الکترودها از جنس فولاد ضدزنگ و عایق مورد استفاده پلی‌سولفونی است. دیگر اجزای سیستم شامل پمپ برای رساندن مواد خام به محفظه تیمار، مولد تولید پالس ولتاژ بالا،

SeguraCarretero, 2020). حلال‌های یوتکتیک حاوی مالیک اسید و سیتریک اسید نیز کارایی قابل توجهی در استخراج ترکیبات فنولیک از گیاه نعناع را نشان دادند (Juric et al., 2021). در استخراج ترکیبات فنولیک از برگ گیاه نعناع نیز حلال یوتکتیک متشکل از کولین کلرید و گلیسرول بازده استخراج بالاتری نسبت به اتانول به‌عنوان حلال متعارف نشان داد.

خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده با استفاده از حلال‌های یوتکتیک در شکل ۲ نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری از این حیث میان عصاره‌های استخراج شده مشاهده می‌شود ($p \leq 0.05$). در این میان نمونه استخراج شده با حلال دارای اتیلن‌گلیکول خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر و هم‌تراز با عصاره استخراج شده با اتانول ۵۰٪ دارد. با بررسی تأثیر ترکیبات HBD مورد استفاده در این پژوهش بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده از زرین گیاه، مشاهده می‌شود که در گروه قندها، عصاره مستخرج با حلال دارای فروکتوز در مقایسه با ساکارز، در گروه قند الکل‌ها، عصاره مستخرج با حلال دارای اتیلن‌گلیکول در مقایسه با گلیسرول و در گروه کربوکسیلیک اسیدها، عصاره مستخرج با حلال دارای مالیک اسید در مقایسه با سیتریک اسید خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارند.

تأثیر تغییر ترکیبات حلال بر ویژگی‌های کیفی و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره مستخرج از منابع مختلف در دیگر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است. از جنبه امکان استخراج ترکیبات دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، گزارش شده است که حلال یوتکتیک حاوی اتیلن‌گلیکول به دلیل برهمکنش‌های بین ملکولی مناسب با اتانول برابری می‌کند (Jeong et al., 2018). در نتایج بدست آمده از استخراج عصاره‌ی نعناع با حلال یوتکتیک نیز، بالاترین قابلیت مهارکنندگی DPPH در عصاره مستخرج با حلال دارای مالیک اسید و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های استخراج شده با دو حلال یوتکتیک حاوی فروکتوز و سیتریک اسید گزارش شد (2018). با استفاده از حلال‌های یوتکتیک حاوی ساکارز و لاکتیک اسید نیز، عصاره‌ای با فعالیت آنتی‌اکسیدان بالا از زردچوبه استخراج گردید (Doldolova et al., 2021). با توجه به نتایج حاصل از این بخش، عصاره مستخرج با استفاده از حلال یوتکتیک حاوی مالیک اسید حاوی بالاترین محتوای ترکیبات فنولیک و عصاره‌ی استخراج شده از حلال یوتکتیک حاوی اتیلن‌گلیکول بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدان را نشان دادند. از این رو، ارزیابی شناسایی ترکیبات این دو نمونه انجام شد.

نمونه در دمای صفر درجه به مدت ۸ ساعت انکوبه‌گذاری شد. رسوب حاصل در خشک‌کن انجمادی خشک و توزین شد (Doldolova et al., 2021).

تجزیه و تحلیل آماری

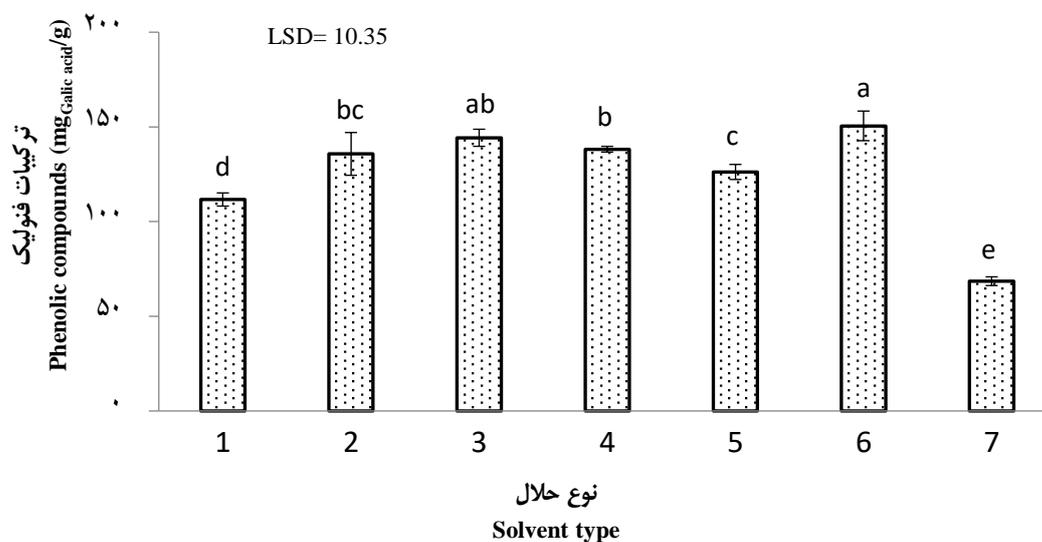
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین نتایج بر مبنی حداقل اختلاف معنادار^۱ (LSD) برای متغیرهای وابسته با استفاده از نرم‌افزار SAS version 9 (Cary, NC, USA) انجام شد. همه اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شدند. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 ترسیم شدند.

نتایج

تأثیر ترکیبات حلال بر محتوای فنلی و فعالیت

آنتی‌اکسیدانی عصاره مستخرج

مطابق نتایج ارائه شده در شکل ۱، تفاوت معنی‌داری میان حلال‌های یوتکتیک مختلف از نظر توانایی استخراج ترکیبات فنولیک از زرین گیاه وجود دارد ($p \leq 0.05$). عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی مالیک اسید دارای ترکیبات فنولیک بالاتری در مقایسه با سایر عصاره‌های مستخرج است ولی تفاوت معنی‌داری با عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی گلیسرول از این نظر ندارد ($p \leq 0.05$). اتانول به‌عنوان حلال شاهد نسبت به سایرین قدرت استخراج ترکیبات فنولیک پایین‌تری را نشان داد. در مقایسه انواع HBD مورد استفاده در این پژوهش در سه دسته کربوهیدرات‌ها، قند الکل‌ها و کربوکسیلیک اسیدها، با استفاده از فروکتوز نسبت به ساکارز، گلیسرول نسبت به اتیلن‌گلیکول و مالیک اسید نسبت به سیتریک اسید، محتوای ترکیبات فنولیک عصاره مستخرج افزایش یافت. فاکتورهای مختلفی از جمله قطبیت و pH حلال، نوع و نسبت مولی اجزای تشکیل‌دهنده حلال و ویژگی‌های فیزیکی آن از جمله ویسکوزیته با تأثیر بر حلالیت و سرعت انتقال جرم ترکیبات، بر کارایی استخراج حلال‌های یوتکتیک مؤثر هستند (Wei et al., 2015; Nam, Zhao, Lee, Jeong, & Lee, 2015). بررسی نتایج پژوهش‌های انجام گرفته در این زمینه نیز نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار نوع ترکیبات مورد استفاده در NADES بر عملکرد آنها در استخراج است. در این راستا گزارش شده است که NADES های حاوی ترکیبات اسیدی به‌عنوان HBD، به‌واسطه دارا بودن قطبیت بالاتر نسبت به حلال‌های یوتکتیک حاوی قندها و الکل‌ها مانند اتانول یا متانول، توانایی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولیک دارند (Alanon, Ivanovi'c, Gomez-Caravaca, Arraez-Roman, &

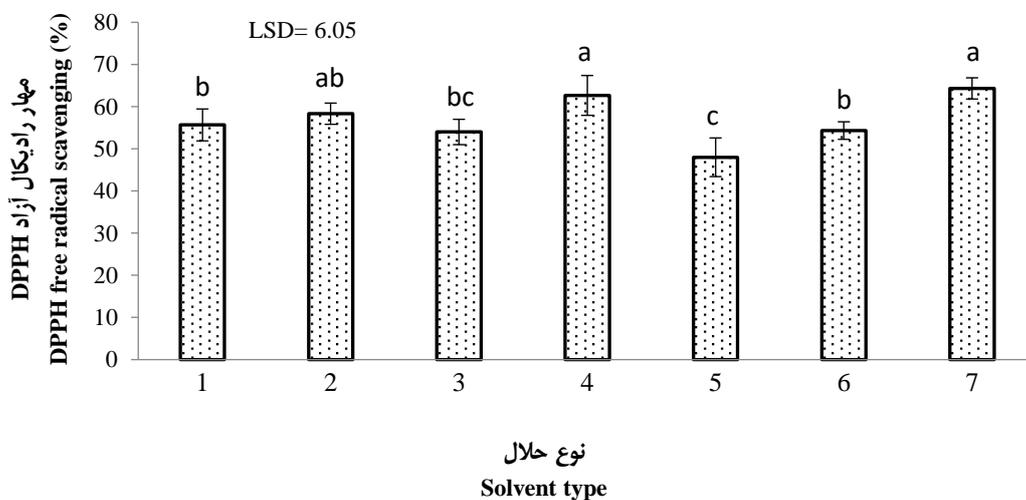


شکل ۱- تأثیر حلال‌ها بر مقدار استخراج شده ترکیبات فنولیک

(نوع حلال شامل حلال‌های یوتکتیک دارای ۱: کولین کلراید-ساکارز؛ ۲: کولین کلراید-فروکتوز؛ ۳: کولین کلراید-گلیسرول؛ ۴: کولین کلراید-اتیلن گلیکول؛ ۵: کولین کلراید-سیتریک اسید؛ ۶: کولین کلراید-مالیک اسید؛ و ۷: اتانول ۵۰٪ است)

Fig. 1. Effect of solvents on the extracted phenolic compounds

(Solvent type includes eutectic solvents with 1: choline chloride-sucrose; 2: choline chloride-fructose; 3: choline chloride-glycerol; 4: choline chloride-ethylene glycol; 5: choline chloride-citric acid; 6: choline chloride-maleic acid; 7: 50% ethanol)



شکل ۲- تأثیر نوع حلال بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مستخرج

(نوع حلال شامل حلال‌های یوتکتیک دارای ۱: کولین کلراید-ساکارز؛ ۲: کولین کلراید-فروکتوز؛ ۳: کولین کلراید-گلیسرول؛ ۴: کولین کلراید-اتیلن گلیکول؛ ۵: کولین کلراید-سیتریک اسید؛ ۶: کولین کلراید-مالیک اسید؛ و ۷: اتانول ۵۰٪ است)

Fig. 2. Effect of solvent type on the antioxidant properties of extracts

(Solvent type includes eutectic solvents with 1: choline chloride-sucrose; 2: choline chloride-fructose; 3: choline chloride-glycerol; 4: choline chloride-ethylene glycol; 5: choline chloride-citric acid; 6: choline chloride-maleic acid; 7: 50% ethanol)

گیاه *Dracocephalum kotschyi* Boiss محتوای ترکیبات فنولیک و فلاونوئید متنوعی از جمله لیمونن، رزمارینیک اسید،

ارزیابی کمی و کیفی ترکیبات عصاره‌های استخراج شده با حلال یوتکتیک منتخب

که شناسایی و تعیین غلظت ترکیبات مختلف با به کارگیری استانداردهای خارجی در سطوح متفاوت و تعیین منحنی استاندارد آنها انجام گرفت. ترکیبات مختلفی شامل لیمونن، رزمارینیک اسید، پندولیتول، اگزانتومیکرول، میرتنول، ژرانیال، نرال، متیل گرانت، آپیزنین و لوتولین که جزئیات آنها در جدول ۲ آمده است در عصاره‌های مستخرج شناسایی شدند.

پندولیتول، اگزانتومیکرول، میرتنول، ژرانیال، نرال، متیل گرانت، آپیزنین و لوتولین است و از آنجائی که ترکیبات فنولیک ساختار شیمیایی مناسبی برای حذف رادیکال‌های آزاد دارند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برای عصاره و اسانس مستخرج از این گیاه گزارش شده است. همچنین گزارشاتی مبنی بر وجود ترکیبات ضد اسپاسم و دارای خواص ضدسرطانی و ضد ویروسی برای مواد مؤثره موجود در این گیاه وجود دارد (Foroozandeh & Asadi-Gharneh, 2021). قابل ذکر است

جدول ۲- ترکیبات عصاره‌های استخراج شده از زرین گیاه

Table 2- Compounds of *Dracocephalum kotschy* extracts

ترکیبات	عصاره استخراج شده با حلال حاوی اتیلن گلیکول Extract using ethylene glycol-ChCl			عصاره استخراج شده با حلال حاوی مالیک اسید Extract using maleic acid-ChCl	
	زمان بازداری RT (min)	سطح زیرپیک Peak area (%)	غلظت Concentration (µg/g)	سطح زیرپیک (%) Peak area (%)	غلظت Concentration (µg/g)
لیمونن Limonene	15.3	435.5	45.429	565.8	36.621
رزمارینیک اسید Rosmarinic acid	04.6	18.83	4379.15	17.276	2147.17
پندولیتول Penduletin	91.6	10.238	1616.09	7.66	527.05
زانتومیکرول Xanthomicrol	21.7	4.612	317.78	-	ND
سیرسیمارین Cirsimaritin	37.8	4.966	333.48	5.977	281.31
میرتنول Myrtenol	13.9	-	ND	-	ND
جرنیال Geranial	02.10	8.743	987.38	12.709	1215.18
نرال Neral	46.10	10.378	1576.1	10.08	866.19
متیل گرانت Methyl geranat	17.12	6.128	515.98	5.532	272.2
آپیزنین Apigenin	23.15	11.46	1853.34	16.12	2136.13
لوتولین Luteolin	94.15	19.21	4991.3	15.782	1962.51
کل Total		100	17000.05	99.701	10029.1

نعنائیان از جمله *M. longifolia* نیز گزارش شده است (Bahadori, Zengin, Bahadori, Dinparast, & Movahhedin, 2018). با در نظر گرفتن مجموع ترکیبات شناسایی شده، محتوای ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی اتیلن گلیکول، ۱۷۰۰۰/۰۵ میکروگرم در هر گرم از وزن خشک عصاره و در عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی مالیک اسید، ۱۰۰۲۹/۱ میکروگرم در هر گرم از وزن خشک عصاره می‌باشد. لذا، محتوای ترکیبات فنولیک عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک

در این میان لوتولین (میکروگرم بر گرم ۴۹۹۱/۳) و رزمارینیک اسید (میکروگرم بر گرم ۴۳۷۹/۱۵)، بیشترین سهم ترکیبات مستخرج با حلال یوتکتیک حاوی اتیلن گلیکول-کولین کلراید و رزمارینیک اسید (میکروگرم بر گرم ۲۱۴۷/۱۷) و آپیزنین (میکروگرم بر گرم ۲۱۳۶/۱۳) بیشترین سهم ترکیبات مستخرج با حلال یوتکتیک حاوی مالیک اسید-کولین کلراید را به خود اختصاص می‌دهند. وجود ترکیبات مشابهی از جمله رزمارینیک اسید با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تأثیر مثبت آن در کنترل اختلالاتی مانند سرطان و دیابت در سایر گونه‌های خانواده

تنها عامل تأثیرگذار بر فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره محسوب گردد (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014).

جدول ۳- اثر اعمال امواج الکتریکی پالسی و به کارگیری امواج فراصوت بر محتوای ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدان عصاره زردچوبه گیاه
Table 3- Effect of electric pulses and ultrasonic waves on the phenolic content and antioxidant activity of *Dracocephalum kotschyi* extract

شدت امواج الکتریکی پالسی Electrical pulse intensity (V)	زمان فراصوت Ultrasonic time (min)			LSD
	0	15	30	
0	96.79±4.33 ^c	105.7±6.89 ^a	105.3±4.01 ^a	1.97
2000	100.3±4.86 ^b	94.28±2.79 ^c	103.1±5.83 ^b	
5000	40.60±11.06 ^b	49.70±11.00 ^a	30.62±2.78 ^c	0.67
	48.83±11.41 ^a	40.81±9.76 ^b	40.81±9.76 ^b	

میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت آماری معنی‌دار دارند.

Means with different letters are statistically significantly different at the 5% probability level.

حاوی اتیلن گلیکول ۶۹/۵٪ بیشتر از محتوای ترکیبات فنولیک استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی مالیک اسید است و این حلال برای مطالعات بیشتر انتخاب گردید. در پژوهشی با هدف استخراج ترکیبات فنولیک از برگ توت، گزارش شد که در میان ۲۰ حلال یوتکتیک مورد بررسی با ترکیبات متفاوت، حلال دارای کولین کلراید و سیتریک اسید به‌عنوان هیدروژن‌دهنده و هیدروژن‌گیرنده، بالاترین قابلیت استخراج را دارد (Zhou et al., 2018). در استخراج ترکیبات فنلی از نعنای وحشی با استفاده از حلال‌های یوتکتیک مشخص شد که مخلوط یوتکتیک متشکل از کولین کلراید و گلیسرول عملکرد بالاتری در استخراج فنل‌ها و فلاونوئیدها دارد و بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی نیز در عصاره مستخرج با استفاده از کولین کلراید و مالیک اسید حاصل آمد. قدرت آنتی‌اکسیدانی این عصاره از عصاره مستخرج با اتانول به‌عنوان حلال رایج نیز بالاتر ارزیابی شد (Juric et al., 2021). در استخراج کورکومین و عصاره دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان از زردچوبه، NADES، های حاوی کولین کلراید، ساکارز و لاکتیک اسید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان دادند (Doldolova et al., 2021). استفاده از NADES های حاوی کولین کلراید و اگزولیتول، در مقایسه با آب و متانول با افزایش عملکرد ۳۲-۲۰٪ در استخراج ترکیبات فعال زیستی از روغن زیتون به‌عنوان جایگزین سبز و کارآمدتر نسبت به حلال‌های آلی پیشنهاد شدند (García et al., 2016).

بررسی تأثیر پیش تیمار امواج الکتریکی پالسی و

استخراج با امواج فراصوت

بررسی تأثیر اعمال امواج الکتریکی پالسی و امواج فراصوت بر استخراج نشان می‌دهد که اثرات مستقل و متقابل این دو فاکتور بر تغییرات محتوای ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مستخرج با حلال یوتکتیک دارای اتیلن گلیکول معنی‌دار است. مقایسه میانگین اثرات مستقل این متغیرها در جدول ۳ بیانگر آن است که با افزایش ولتاژ امواج الکتریکی پالسی و مدت زمان اعمال امواج فراصوت، محتوای ترکیبات فنولیک موجود در عصاره افزایش می‌یابد. مقایسه میانگین اثر متقابل متغیرها در شکل ۳ نیز نشان می‌دهد که با افزایش اعمال زمان فراصوت و سطح ولتاژ امواج الکتریکی پالسی، افزایش استخراج ترکیبات فنولیک در عصاره معنی‌دار است. بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مستخرج از زردچوبه گیاه نشان می‌دهد که اثرات متقابل این دو پیش تیمار موجب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره می‌گردد (شکل ۴). تغییر در ساختار شیمیایی ترکیبات مؤثره در اثر اعمال امواج فراصوت و الکتریکی پالسی در مرحله استخراج، به نحوی که سطح فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها را تحت تأثیر قرار دهد، دلیل اصلی این مشاهده است. بنابراین محتوای ترکیبات فنولیک، نمی‌تواند

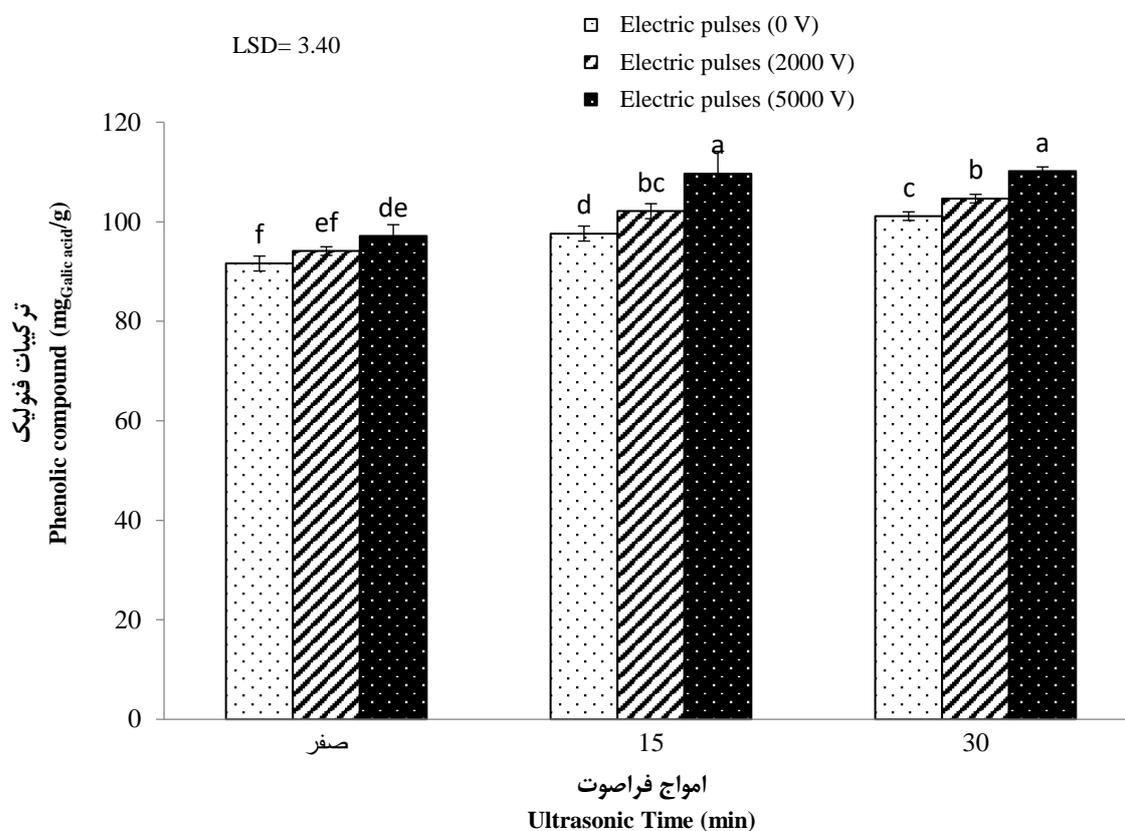
مقایسه و ارزیابی پروفایل ترکیبات عصاره مستخرج از

زرین گیاه در شرایط بهینه با نمونه شاهد

در جدول ۴ ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده با حلال های یوتکتیک منتخب با و بدون اعمال پیش تیمار امواج الکتریکی پالسی و استفاده از امواج فراصوت آمده است. ترکیبات موجود در عصاره مستخرج با استفاده از حلال اتانول نیز به عنوان شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت.

بر اساس نتایج حاصل، عصاره مستخرج با حلال یوتکتیک دارای اتیلن گلیکول، بدون اعمال امواج الکتریکی پالسی و امواج فراصوت به عنوان عصاره دارای بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی و عصاره مستخرج با این حلال به همراه اعمال پیش تیمار امواج الکتریکی پالسی ۵۰۰۰ ولت و استفاده از امواج فراصوت با توان ۲۰۰ وات و فرکانس ۲۸ کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه در مرحله استخراج به عنوان عصاره دارای بالاترین محتوای ترکیبات فنولیک منتخب و از نظر پروفایل ترکیبات مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اثر متقابل اعمال امواج الکتریکی پالسی بر نمونه و امواج فراصوت در مرحله استخراج در شکل های ۳ و ۴ زیر مشاهده می شود.

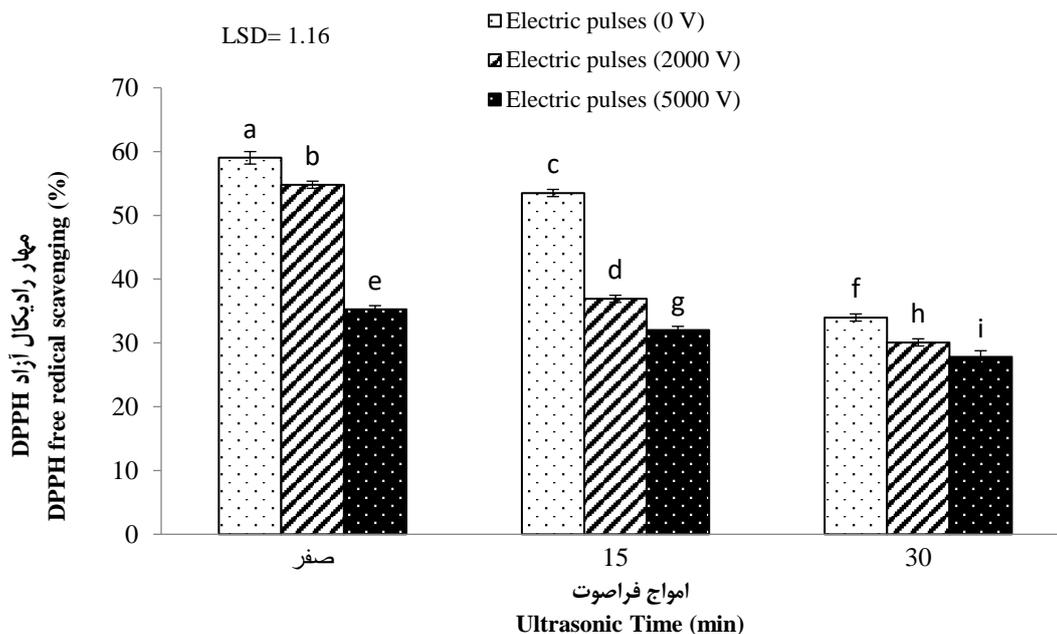


شکل ۳- اثر متقابل امواج الکتریکی پالسی و زمان اعمال امواج فراصوت بر استخراج ترکیبات فنولیک از زرین گیاه با استفاده از حلال یوتکتیک منتخب

میانگین های دارای حروف غیر مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت آماری معنی دار دارند.

Fig. 3. Effect of electric pulses and ultrasonic time on the extraction of phenolic compounds from *Dracocephalum kotschy* using the selected eutectic solvent

Means with different letters are statistically significantly different at the 5% probability level.



شکل ۴- اثر متقابل اعمال امواج الکتریکی پالسی و امواج فراصوت بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده از زیرین گیاه با حلال یوتکتیک منتخب

میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت آماری معنی‌دار دارند.

Fig. 4. Effect of applying electric pulses and ultrasonic time on antioxidant activity of *Dracocephalum kotschy* extract using the selected eutectic solvent

Means with different letters are statistically significantly different at the 5% probability level.

می‌شود (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). بررسی اثر اعمال همزمان میدان الکتریکی پالسی و فشار در استخراج آب سیب نیز نشان داد که استفاده از این تیمار کمکی در افزایش معنی‌دار کمیت و کیفیت فرآورده تولید شده مؤثر است. با اعمال امواج الکتریکی پالسی، بازده تولید آبمیوه از ۱/۷ به ۷/۷٪ افزایش یافت و آب میوه‌های تولید شده با اعمال امواج الکتریکی پالسی محتوای قند بالاتر و رنگ بهتری داشتند (Aghaei Shalmani & Salehi, 2014). امواج الکتریکی پالسی سرعت فشرده‌سازی را افزایش و امکان استخراج پلی‌فنل‌ها از انگور را افزایش می‌دهد. به عبارتی تأثیر پالس بر شدت رنگ، محتوای آنتوسیانین، پلی‌فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش‌دهنده ارزیابی شد (Vorobiev & Lebovka, 2010). مطابق نتایج پژوهش حاضر، مجموع وزنی ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی اتیلن گلیکول با اعمال تیمارهای کمکی برابر با (۲۵۲۷۵/۴۱ میکروگرم بر گرم)، بدون اعمال تیمارهای کمکی (۱۷۰۰۰/۰۵ میکروگرم بر گرم) و در نمونه استخراج شده با اتانول (۲۱۶۵۲/۸۹ میکروگرم بر گرم) ارزیابی شد. بنابراین اعمال تیمارهای کمکی در افزایش استخراج ترکیبات مؤثر از زیرین گیاه تأثیرگذار و برتر از حلال اتانول ارزیابی شد.

مطابق نتایج بدست آمده، در عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک منتخب به همراه تیمارهای کمکی، لوتولین (۶۶۸۳/۹۴ میکروگرم بر گرم) و آپیزین (۵۸۷۴/۶۴ میکروگرم بر گرم) بیشترین و متیل‌گرانث (۳۰۴/۴۷ میکروگرم بر گرم) و زانتومیکرول (۳۲۵/۴۳ میکروگرم بر گرم) کمترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره هستند. در عصاره مستخرج بدون تیمارهای کمکی، لوتولین (۴۹۹۱/۳ میکروگرم بر گرم) و رزمارینیک اسید (۴۳۷۹/۱۵ میکروگرم بر گرم) بیشترین و زانتومیکرول (۴/۶۱۲ میکروگرم بر گرم) کمترین ترکیب شناسایی شده در عصاره بود و میرتول در این عصاره قابل شناسایی نبود. در نمونه استخراج شده با اتانول که به‌عنوان حلال رایج جهت استخراج می‌باشد، نیز لوتولین (۶۶۵۱/۰۱ میکروگرم بر گرم) و آپیزین (۵۰۰۴/۲ میکروگرم بر گرم) بیشترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره بودند. امواج الکتریکی پالسی با ایجاد منافذ در غشا سلول، نفوذپذیری و انتقال آب و مواد محلول از آن را سرعت می‌بخشد. تغییر در خصوصیات غشا دیواره‌ی سلولی به‌نحوی که مواد درون سلول با سرعت و سهولت از سلول خارج شوند، موجب می‌گردد که استخراج در حداقل زمان و انرژی مورد نیاز صورت پذیرد. بررسی منابع نشان می‌دهد که در فرآیند استخراج ساکارز از چغندر قند با اعمال امواج الکتریکی پالسی، افزایش تعداد پالس، هدایت شربت را افزایش می‌دهد و به این صورت اعمال امواج الکتریکی پالسی منجر به افزایش ۸۲٪ بازده استخراج

جدول ۴- مقادیر کمی ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده از زرین گیاه با اتانول و حلال بوتنیک منتخب با و بدون اعمال تیمارهای کمکی
 Table 4- Compounds of *Dracocephalum kotschyi* extracts using ethanol and selected eutectic solvent with and without auxiliary treatments

Concentration	Retention Time (دقیقه)	عصاره مستخرج با اتانول ۵۰٪ Extract with ethanol		عصاره مستخرج با حلال بوتنیک با اعمال تیمارهای کمکی Extract with eutectic solvent with auxiliary treatments		عصاره مستخرج با حلال بوتنیک بدون اعمال تیمارهای کمکی Extract with eutectic solvent without auxiliary treatments	
		زمان بازداری (دقیقه)	سطح زیرپیک (%)	سطح زیرپیک (%)	غلظت (میکروگرم بر گرم)	غلظت (میکروگرم بر گرم)	غلظت (میکروگرم بر گرم)
ترکیبات	Retention Time	Peak area	Concentration (گرم)	Peak area (%)	Concentration (میکروگرم بر گرم)	Peak area (%)	Concentration (میکروگرم بر گرم)
لیمونن Limonene	3.15	5.736	629.64	5.777	732.41	5.435	429.45
رزقاریتیک اسید Rosmarinic acid	6.04	13.912	3146.57	12.447	2887.88	18.83	4379.15
پندولیتول Penduletin	6.91	7.144	1035.8	4.294	429.01	10.238	1616.09
زانثومیکرول Xanthomierol	7.21	4.388	370.04	3.799	325.43	4.612	317.78
سیرسیماریتین Cirsimaritin	8.37	4.328	333.33	5.115	533.79	4.966	333.48
میرتول Myrtenol	9.13	3.926	311.74	4.337	436.18	-	ND
جریشال Geranial	10.02	8.811	1320.1	11.302	2490.18	8.743	987.38
نرال Neral	10.46	11.222	2426.06	14.396	4577.48	10.378	1576.1
متیل گرانات Methyl geranat	12.17	4.844	424.4	3.832	304.47	6.128	515.98
آپیزین Apigenin	15.23	16.413	5004.2	16.608	5874.64	11.46	1853.34
لوتئولین Luteolin	15.94	19.327	6651.01	18.094	6683.94	19.21	4991.3
کل Total		100.051	21652.89	100.00	25275.41	100	17000.05

بازیابی نمونه بهینه

محتوای پلی‌فنلی عصاره ایتیلن گلیکول-کولین کلراید با و بدون استفاده از تیمارهای کمکی به ترتیب ۵۳ و ۴۵ درصد کل ترکیبات فنولیک استخراج شده بازیابی شد. بازیابی پلی‌فنول‌ها از NADES در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است. بنابراین، NADES را می‌توان چندین بار دیگر به عنوان حلال برای استخراج استفاده کرد که به دلیل هزینه کم، سمیت، انحطاط و همچنین قابلیت استفاده مجدد، این حلال‌ها در مقایسه با حلال‌های معمولی ارجحیت دارند (Paiva et al., 2014). در این راستا، استخراج بهینه کورکومینوئیدها در NADES توضیح داده شد و بازیابی کورکومینوئیدها از NADES مختلف ۳۷/۵٪ - ۴۱/۱٪ گزارش شد (Patil, Pathak, & Rathod, 2020). مهم ترین فنول‌های بازیابی شده در عصاره برگ موریس آلبا (*Morus alba* L.) به ترتیب اسید کلروژنیک (۷۰/۵٪)، اسید کاتچین (۸۰/۸٪) اسید بنزوئیک (۷۲/۶٪) و استراگالین (۶۰/۷٪) گزارش شد (Huang et al., 2017).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که حلال یوتکتیک حاوی ایتیلن گلیکول-کولین کلراید به دلیل بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بالاترین محتوای ترکیبات شناسایی شده در عصاره استخراج شده (۱۷۰۰۰/۰۵ میکروگرم در هر گرم از وزن خشک عصاره) بهترین شرایط را برای استخراج این گیاه دارا بود. اعمال پیش‌تیمار امواج الکتریکی پالسی ۵۰۰۰ ولت و تعداد پالس ۱۲۰ و استفاده از امواج فراصوت با توان ۲۰۰ وات و فرکانس ۱۲ کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه در مرحله استخراج، تأثیر

معنی‌داری در افزایش قابلیت استخراج ترکیبات مؤثره زرین‌گیاه نشان دادند. در واقع تغییر در خصوصیات سلولی به نحوی که مواد درون سلول با سرعت و سهولت از سلول خارج شوند، موجب می‌گردد که استخراج در حداقل زمان و انرژی مورد نیاز صورت پذیرد. مجموع وزنی ترکیبات مؤثره شناسایی شده در عصاره استخراج شده با حلال یوتکتیک حاوی ایتیلن گلیکول با اعمال تیمارهای کمکی برابر با (۲۵۲۷۵/۴۱ میکروگرم بر گرم) بدون اعمال تیمارهای کمکی (۱۷۰۰۰/۰۵ میکروگرم بر گرم) و در نمونه استخراج شده با اتانول (۲۱۶۵۲/۸۹ میکروگرم بر گرم) ارزیابی شد. بنابراین اعمال تیمارهای کمکی در افزایش استخراج ترکیبات مؤثر از زرین‌گیاه تأثیرگذار و برتر از حلال اتانول ارزیابی شد. با استفاده از روش رسوب ضد حلال (آب)، ۵۳٪ کل ترکیبات فنولیک استخراج شده بازیابی و حلال یوتکتیک به سیستم بازگردانده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از حلال‌های سبز و به‌کارگیری تیمارهای کمکی در بهبود عملکرد آنها می‌تواند در استخراج ترکیبات ارزشمند از گیاهان دارویی مفید باشد. اگرچه لازم است مطالعات اختصاصی در هر مورد برای انتخاب شرایط مناسب استخراج انجام گیرد و البته نیاز به بهینه‌سازی هزینه‌ها در بخش انرژی و تجهیزات وجود دارد.

میزان مشارکت و منابع تأمین مالی

این پژوهش نتایج حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم سحر کیانی است که تحت راهنمایی دکتر هاجر عباسی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) و با هزینه شخصی انجام شده است.

References

1. Aghaei Shalmani, M., & Salehi, M.A. (2014). Effect of pulsed electric field extraction efficiency, University of Guilan, Faculty of Technology and Engineering, Department of Chemistry, 02_061. <https://civilica.com/doc/343270>.
2. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., & Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
3. Aydin, F., Yilmaz, E., & Soylak, M. (2018). Vortex assisted deep eutectic solvent (DES) emulsification liquid microextraction of trace curcumin in food and herbal tea sample. *Food Chemistry*, 243, 442-447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.154>
4. Alanon, M.E., Ivanović, M., Gomez-Caravaca, A.M., Arraez-Roman, D., & Segura-Carretero, A. (2020). Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1685-1701. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.01.003>
5. Bahadori, M.B., Zengin, G., Bahadori, Sh., Dinparast, L., & Movahhedine, N. (2018). Phenolic composition and functional properties of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha* (Stapf) Briq.). *International Journal of Food Properties*, 21, 183-193. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1440238>
6. Doldolova, Kh., Bener, M., Lalikoglu, M., Selim Asçı, Y., Arat, R., & Apak, R. (2021). Optimization and modeling of microwave-assisted extraction of curcumin and antioxidant compounds from turmeric by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 353, 129337. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129337>

7. Dai, Y., Spronsenb, J., Witkampb, G., Verpoortea, R., & Hae Choi, Y. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
8. Delos Angeles Fernandez, M., Espino, M., Gomez, F.J.V., & Silva, M.F. (2018). Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. *Food Chemistry*, 239, 671-678. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.150>
9. Foroozandeh, E., & Asadi-Gharneh, H. (2021). *Dracocephalum kotschyi* Boiss.: An Iranian endemic medicinal plant; A review. *Journal of Medicinal Herbs*, 12, 9-17.
10. Florindo, C., Oliveira, F.S., Rebelo, L.P.N., Fernandes, A.M., & Marrucho, I.M. (2014). Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on choline chloride and carboxylic acids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(10), 2416-2425. <https://doi.org/10.1021/sc500439w>
11. García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Julian Rios, J., & Fernández-Bolaños, J. (2016). Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chemistry*, 197, 554-561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.131>
12. Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., & Chen, Z.G. (2017). Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 221, 1400-1405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.013>
13. Jeong, K.M., Jin, Y., Yoo, D.E., Han, S.Y., Kim, E.M., & Lee, J. (2018). One-step sample preparation for convenient examination of volatile monoterpenes and phenolic compounds in peppermint leaves using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 251, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.079>
14. Jurić, T., Mičić, N., Potkonjak, A., Milanov, D., Dodić, J., Trivunović, Z., & Popović, B. (2021). The evaluation of phenolic content, in vitro antioxidant and antibacterial activity of *Mentha piperita* extracts obtained by natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 362, 130226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130226>
15. Li, B., Du, W., Jin, J., & Du, Q. (2012). Preservation of epigallocatechin-3-gallate antioxidant properties loaded in heat treated -lactoglobulin nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3477-3484. <https://doi.org/10.1021/jf300307t>
16. Mozaffarian, V. (2008). A dictionary of Iranian plant names. Latin, English, Persian, FarhangMo'aser. 740.
17. Nam, M.W., Zhao, J., Lee, M.S., Jeong, J.H., & Lee, J. (2015). Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from Flos sophorae. *Green Chemistry*, 17(3), 1718-1727. <https://doi.org/10.1039/c4gc01556h>
18. Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., & Duar, A.R.C. (2014). Natural deep eutectic solvents-solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063-1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
19. Patil, S.S., Pathak, A., & Rathod, V.K. (2020). Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent based extraction: A greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105267. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105267>
20. Smith, E.L., Abbott, A.P., & Ryder, K.S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemistry*, 114, 11060-11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
21. Santos, S., Pinto, P., Silvestre, A., & Pascoal Neto, C. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products*, 31, 521-526. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.02.001>
22. Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2010). Enhanced extraction from solid foods and biosuspensions by pulsed electrical energy. *Food Engineering*, 2, 95-108. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9021-5>
23. Wu, L., Li, L., Chen, Sh., Wang, L., & Lin, X. (2020). Deep eutectic solvent-based ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* L. leaves: Optimization, comparison and antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 247, 117014. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117014>
24. Wei, Z.F., Wang, X.Q., Peng, X., Wang, W., Zhao, C.J., Zu, Y.G., & Fu, Y.J. (2015). Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix scutellariae*. *Industrial Crops and Products*, 63, 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.013>
25. Zhang, Q., De Oliveira-Vigier, K., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41, 7108-7146. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>
26. Zhou, P., Wanga, X., Liub, P., Huang, J., Wanga, Ch., Pana, M., & Kuanga, Z. (2018). Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. *Industrial Crops & Products*, 120, 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.071>



Extraction and Qualitative Analysis of Chicken feet Gelatin and Investigating Its Effect on the Physical and Chemical Properties of Marshmallow

F. Islami¹, Z. Raftani Amiri^{1*}, A. Motamedzadegan¹, H. Gorjian²

1- Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

(*- Corresponding Author Email: z.raftani@sanru.ac.ir)

2- Agriculture and Natural Resources Research and Education Center province, Fars, Iran

Received: 16.02.2025

Revised: 13.04.2025

Accepted: 11.05.2025

Available Online: 18.08.2025

How to cite this article:

Islami, F., Raftani Amiri, Z., Motamedzadegan, A., & Gorjian, H. (2025). Extraction and qualitative analysis of chicken feet gelatin and investigating its effect on the physical and chemical properties of marshmallow. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(4), 409-429. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.92140.1408>

Introduction

Foams are colloidal systems that are formed by the accumulation of gas bubbles separated from each other by thin liquid layers. Foams have attracted a lot of attention from the food industry and culinary arts due to their unique flavor and texture properties. Marshmallows are an aerated confectionery product that is mainly prepared from gelatin (as a foaming and gelling agent), sugar solution (including glucose syrup and sugar), flavoring, and coloring agents. Gelatins are amphiphilic macromolecules and are obtained from hydrolyzed collagens. Gelatin is a quite digestible protein and contains all essential amino acids except tryptophan. The simplest way to produce gelatin is to convert collagen into gelatin by denaturing or breaking down the collagen molecule to make it soluble in water. This process generally involves an acidic, alkaline, or enzymatic pretreatment. In food applications, gelatin can act as a foaming agent, emulsifier, biodegradable film former, colloidal stabilizer, and microencapsulating agent. Due to health, religious, and economic restrictions on the consumption of gelatin from mammals, other sources for gelatin production must have characteristics such as high amounts of by-product availability (Because continuous production in the industry is an essential economic issue) and a value close to the rheological properties of mammalian gelatin in order to be considered as an alternative suitable source for replacement. Hence, poultry by-products can be investigated as a new source of gelatin extraction.

Materials and Methods

In this study, gelatin was extracted from chicken feet using an acidic method. The gelatin production process consists of three main steps: pretreatment of raw materials, gelatin extraction, purification, and drying. Gelatin of chicken feet was used in the marshmallow product at two levels of 6 and 8 percent. Physicochemical properties of gelatin including moisture, color, gel strength, rheology, fat, protein, and ash were analyzed. In the evaluation of the marshmallow, textural components, rheology, electron microscopy, differential thermal scanning, and sensory evaluation (Appearance, color, aroma, sweetness, texture, hardness, and gumminess) were determined. The sensory evaluation was conducted on a five-point hedonic scale. Statistical analysis of this study was performed with Duncan's multiple range test using SPSS software.

Result and Discussion

In the physicochemical analysis of gelatin extracted from chicken feet, the protein content was 78.27 ± 0.445 , fat 10 ± 2 , ash 47.6 ± 0.46 and moisture $70.12 \pm 0.28\%$. In the frequency sweep test, the storage modulus was always higher than the loss modulus, indicating the high strength and viscoelastic behavior of gelatin at a given strain. In evaluating the flow behavior of gelatin obtained from chicken feet, the viscosity of the sample decreased with increasing shear rate, indicating the shear-thinning behavior of gelatin. Adding 8% gelatin to the



marshmallow sample significantly increased the hardness, gumminess, and texture adhesion indices. The Overran in the sample contained 8% gelatin was 40, and the marshmallow contained 6% gelatin was 30. The presence of more protein has a positive effect on the process of reducing surface tension, and more proteins, with the polar parts of the molecule is opened towards the water, are absorbed at the interface, creating a stabilizing layer around the bubbles, which causes more foam to form and increases overran. There was no significant difference between the samples in moisture, water activity, and color a, b indices. In terms of sensory parameters of sweetness, texture firmness, gumminess, and overall acceptance, the 8% gelatin sample was given the lowest score. In the applied frequency range, the G' modulus in all samples was higher than the G'' modulus, indicating viscoelastic behavior and gel strength at a definite strain. In all samples, the complex viscosity decreases linearly with increasing applied frequency, reflecting the shear-thinning behavior of the samples. Marshmallow consisting of 6% gelatin was determined as the selected formulation in terms of physicochemical, rheological, and sensory evaluation properties.

Conclusion

Based on the results obtained from this research and In order to optimally utilize chicken waste, this innovation can be used to produce health-oriented and cost-effective product.

Keywords: Chicken feet gelatin, Marshmallow, Rheology, Texture, Thermal properties

استخراج و آنالیز کیفی ژلاتین پای مرغ و بررسی تاثیر آن بر خواص فیزیکوشیمیایی مارشمالو

فاطمه اسلامی^۱ - زینب رفتنی امیری^{۱*} ID - علی معتمدزادگان^۱ - هایده گرجیان^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۱

چکیده

مارشمالو یک فرآورده‌ی قنادی هواده‌ی شده است که در تهیه آن عمدتاً از ژلاتین (به‌عنوان عامل کف‌کننده و ژل‌کننده)، محلول قندی (شامل شربت گلوکز و شکر)، طعم‌دهنده و رنگ‌دهنده استفاده می‌شود. ژلاتین‌ها درشت‌ترین مولکول‌های آمفیپات هستند و از هیدرولیز کلاژن‌ها به‌دست می‌آیند. ژلاتین یک پروتئین کاملاً قابل هضم است و حاوی تمام اسیدهای آمینه ضروری به جز تریپتوفان است. در این پژوهش ژلاتین پای مرغ به روش اسیدی استخراج شد و در محصول مارشمالو با دو سطح ۶ و ۸ درصد مورد استفاده قرار گرفت. در آنالیز فیزیکوشیمیایی ژلاتین استخراجی از پای مرغ، میزان پروتئین $78/27 \pm 0/445$ ، چربی 10 ± 2 ، خاکستر $6/47 \pm 0/46$ و رطوبت $12/70 \pm 0/28$ درصد بود. در آزمون روبش فرکانس، مدول ذخیره همواره بالاتر از مدول افت بود که حاکی از استحکام بالا و رفتار ویسکوالاستیک ژلاتین در کرنش معین می‌باشد. افزودن ۸ درصد ژلاتین به نمونه مارشمالو شاخص‌های سختی، صمغیت، چسبندگی در بافت را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. بین نمونه‌ها در شاخص‌های رطوبت، فعالیت آبی و شاخص a, b رنگ اختلاف معنادار وجود نداشت. از نظر پارامترهای حسی شیرینی، سفتی بافت، صمغیت و پذیرش کلی به نمونه ۸ درصد ژلاتین کمترین امتیاز اعطا شد. در محدوده فرکانس اعمال شده مدول G' در تمامی نمونه‌ها بالاتر از مدول G'' بود که بر رفتار ویسکوالاستیک و قوی بودن ژل در کرنش معین دلالت داشت. مارشمالوی متشکل از ۶ درصد ژلاتین از نظر خواص فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و ارزیابی حسی به‌عنوان فرمولاسیون منتخب تعیین گردید. با استناد به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش این نوآوری می‌تواند در جهت تولید محصولات سلامت محور و مقرون به‌صرفه در صنعت مواد غذایی کشور به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: ژلاتین، رئولوژی، مارشمالو، ویژگی‌های حرارتی

مقدمه

ژلاتین یک پلی‌پپتید با وزن مولکولی بالا است که از کلاژن، جزء پروتئینی اولیه بافت‌های همبند حیوانی که شامل استخوان، پوست و تاندون است مشتق شده است. نام ژلاتین در حدود سال ۱۷۰۰ رایج شد و از کلمه لاتین (*gelatus*) به معنی سفت یا منجمد گرفته شد. اگرچه گاهی اوقات اصطلاح ژلاتین برای اشاره به سایر ژل‌سازها استفاده می‌شود، اما اکثراً فقط برای مواد پروتئینی مشتق از کلاژن به کار می‌رود (Poppe, 1992). به‌دلیل خواص عملکردی منحصر به

فرد، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری عالی، ژلاتین‌ها به‌طور گسترده‌ای در زمینه‌های مواد غذایی، داروسازی، تصویربرداری زیستی و مهندسی بافت مورد کاوش و کاربرد قرار گرفته‌اند. ژلاتین دارای کاربردهای متنوعی در صنایع غذایی است از جمله: فرآورده‌های قنادی هواده‌ی شده (مارشمالو، پاستیل، تافی‌ها)، فرآورده‌های لبنی (ماست‌ها، شیرهای تخمیری حرارت‌دیده، دسرهای خامه‌ای)، فرآورده‌های گوشتی (امولسیون‌های گوشتی، فرآورده‌های گوشتی کنسروی)، تصفیه آبمیوه، ریزپوشانی طعم‌ها (Hosseiniparvar, Keramat, & Kadivar, 2007). این یک پروتئین با ویژگی‌های منحصر به فرد در نظر گرفته می‌شود، هم به‌دلیل توانایی آن در تشکیل ژل برگشت‌پذیر حرارتی با دمای ذوب نزدیک به دمای بدن و هم به‌دلیل حالیت آن در آب است (Zhang et al., 2022). منبع، نژاد و سن حیوانات، اندازه، تعداد، وزن مولکولی و موقعیت تجزیه

۱- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

*- نویسنده مسئول: (Email: z.raftani@sanru.ac.ir)

۲- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، شیراز، ایران

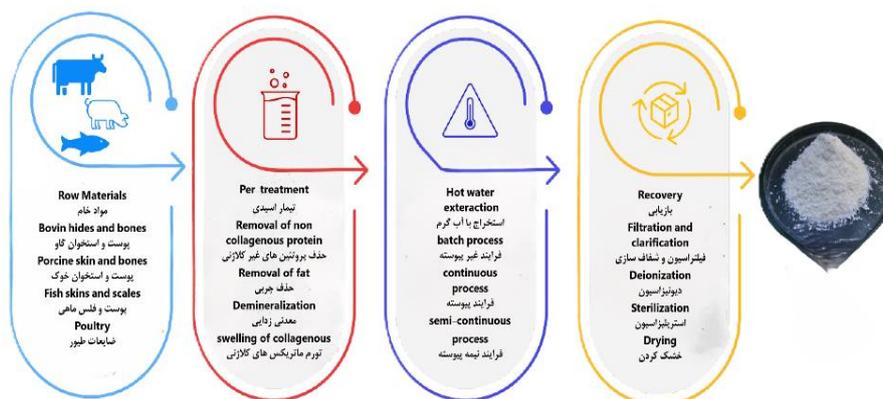
زنجیره‌های پپتیدی، نوع و غلظت بقایای اسیدآمینو موجود در ژلاتین از عوامل مهم در خواص رئولوژیکی ژلاتین است. کیفیت اسیدهای آمینو موجود در ژلاتین خواص و عملکرد منحصر به فرد ژلاتین را تعیین می‌کند. بنابراین، این پارامتر بسیاری از خواص فیزیکی و شیمیایی را تضمین می‌کند و باعث ایجاد تفاوت بین ژلاتین‌ها می‌شود که عمدتاً دارای ترکیب اسیدهای آمینو مختلف و همچنین مقدار پرولین و هیدروکسی پرولین (ایمینو اسید) هستند. هیدروکسی پرولین مشتقی از پرولین است و هر دو با تشکیل پیوندهای هیدروژنی در ساختار کلاژن، مسئول پایداری ساختار کلاژن هستند. میزان اسید ایمینو نیز مسئول دمای ذوب و ژل شدن ژلاتین است. هر چه میزان ایمینو اسید کمتر باشد، دمای ذوب و بعد ژل شدن ژلاتین کمتر می‌شود. مقدار ایمینو اسید در ژلاتین مشتق شده از پوست طیور بیشتر از پستانداران و ماهی است (مونترو و گومز گویلن (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero, & Montero, 2011)، به این نتیجه رسیدند که عامل دیگری که نقش مهمی در توسعه خواص فیزیکی، به‌ویژه قدرت ژل ایفا می‌کند، مقدار اسیدهای آمینو آبرگیز است (Abedinia et al., 2020). بیشتر ژلاتین‌های موجود از منابع پستانداران ساخته می‌شوند. اما با توجه به مسائل اجتماعی، فرهنگی و بروز مکرر بیماری‌هایی مانند انسفالوپاتی اسفنجی گاوی که باعث مشکلاتی برای سلامت انسان می‌شود، استفاده این محصولات در نهایت به فرآیند مواد غذایی محدود می‌شوند. مصرف ژلاتین پوست خوک در یهودیت و اسلام حرام شمرده می‌شود و ژلاتین گوشت گاو تنها در صورتی قابل قبول است که طبق قوانین رژیم غذایی تهیه شده باشد. بنابراین، شناسایی منابع جدید ژلاتین مانند پوست، پا و استخوان طیور برای جایگزینی منابع پستانداران افزایش یافته است (Abedinia et al., 2020). در طول چند دهه گذشته، مصرف جهانی گوشت مرغ که دارای مقدار متعادلی از اسیدهای آمینو است و هم چربی و هم کالری کمی دارد، به‌طور مداوم افزایش یافته است. طبیعتاً با افزایش مصرف گوشت مرغ، مقدار محصولات جانبی مرغ مانند پا، استخوان، قلب، جگر و سنگدان نیز افزایش می‌یابد (Choe & Kim, 2018). در سال ۲۰۱۷ گوشت طیور در جهان بیش از سال ۲۰۰۹ حدود ۲۷.۵ میلیون تن تولید داشته است که منجر به تولید حجم قابل توجهی از زباله‌های آلی در مراحل مختلف تولید شده است. به‌دلیل محتوای بالای مواد آلی، این ضایعات می‌توانند میزبان تکثیر میکروارگانیسم‌ها باشند و باعث مشکلات زیست‌محیطی ناشی از تیمار ناکافی این پسماندهای جامد صنعتی شوند. ژلاتین به‌دست‌آمده از محصولات جانبی طیور مانند پوست، بقایای استخوان‌زدایی مکانیکی و پاها دارای استحکام ژل بالا و نقطه ژل و ذوب نسبتاً برابر با ژلاتین‌های پستانداران است که آن را به‌عنوان جایگزینی برای مصرف پستانداران در صنعت

معرفی می‌کند (Abedinia et al., 2020). مارشمالو یکی از اولین شیرینی‌های شناخته شده برای بشر است و در اصل از شیر ریشه گیاه گل ختمی (*Althaea officinalis*) تهیه می‌شد. اولین مارشمالو را با جوشاندن پالپ ریشه گل ختمی با شکر تا زمانی که غلیظ شود درست می‌کردند و سپس مخلوط را صاف می‌کردند و می‌گذاشتند تا خنک شود. در سال ۲۰۰۰ قبل از میلاد، مصریان ریشه گل ختمی را با عسل ترکیب کردند و آب نباتی درست کردند که مخصوص خدایان و خانواده سلطنتی بود. شیرینی‌های مارشمالوی مدرن برای اولین بار در حدود سال ۱۸۵۰ در فرانسه ساخته شدند، زمانی که مارشمالو به‌صورت جداگانه قالبگیری شده و فرم داده می‌شد. زمانی که تولید انبوه در سال ۱۹۰۰ ممکن شد مارشمالو با بکارگیری نشاسته درسلسله مغول^۱ ساخته شد. در سال ۱۹۵۵ الکس دوماک از شرکت دوماک^۲ روش ساخت جدید به نام فرآیند اکستروژن را به ثبت رساند که تاریخچه تولید مارشمالو را تغییر داد و هنوز هم استفاده می‌شود (Du Toit, Bothma, De Wit, & Hugo, 2016). مارشمالو از جمله فرآورده‌های شیرینی‌پزی هوادهی شده موجود در بازار محسوب می‌شود. مارشمالو معمولاً با ژلاتین، شکر، شربت گلوکز و مواد طعم‌دهنده تولید می‌شود (Mardani et al., 2019). ژلاتین در شیرینی‌های هوادهی شده به‌صورت زیر استفاده می‌شود: ۱- عامل کف‌کننده، که وجود ژلاتین کشش سطحی فاز مایع را کاهش می‌دهد ۲- تثبیت‌کننده، وجود ژلاتین به دیواره‌های سلولی مقاومت مکانیکی لازم را می‌دهد تا از تغییر شکل محصول نهایی جلوگیری شود. ۳- اتصال‌دهنده، ژلاتین قادر است مقدار زیادی آب را به هم بچسباند و می‌تواند به محصول نهایی ماندگاری طولانی‌تری بدهد (Poppe, 1992). هوا از طریق هم زدن سریع، وارد ترکیب پروتئین-قند می‌شود. حضور هوا نه تنها به مخلوط حجم می‌دهد، بلکه به نرمی و سبکی بافت، تغییر رئولوژی، تغییر ظاهر، شدت طعم و حس دهانی، تغییر قابلیت هضم و ماندگاری به‌دلیل افزایش تخلخل کمک زیادی می‌کند (Periche, Castelló, Heredia, & Escriche, 2016). بنابراین هدف اصلی از این پژوهش تهیه و مقایسه‌ی خواص فیزیکی و شیمیایی مارشمالوهای تولید شده بر پایه‌ی ژلاتین پای مرغ می‌باشد.

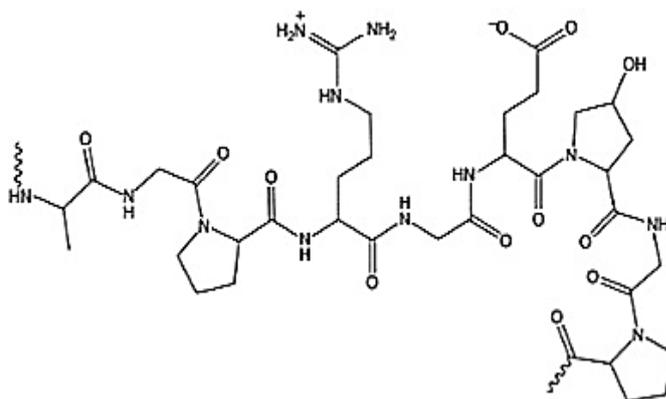
مواد و روش‌ها

مواد

شربت گلوکز مایع از برند گلشهد، اسانس نارگیل از برند زرد، شکر سفید از برند فرانسیس و پودر نشاسته ذرت از برند پاکنو و پای مرغ کشتارگاه خزر سیمرغ آسیا تهیه شدند.



شکل ۱- مراحل استخراج ژلاتین حیوانی
Fig. 1. Animal gelatin extraction steps



شکل ۲- شماتیک ساختار ملکولی ژلاتین
Fig. 2. Schematic of the molecular structure of gelatin (Qhairul et al., 2021)

ساعت با همزن مکانیکی (پارس آزما مدل M.M11، ایران) همزده شد. ژلاتین به دست آمده توسط پارچه فیلتر شد و با سود نرمال pH آن تا ۷ تنظیم شد. سپس مایع شفاف رویی ظرف را جدا و در یخچال نگهداری نموده و به مدت ۴ روز pH آن اندازه گیری گردید سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد ذوب شده و در آن (Memmert-Ufillo، آلمان) با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۸ ساعت خشک گردید در نهایت با آسیاب برقی (Sapor-LSCG 420) ساخت چین به صورت پودر در آمد و در ظروف غیرقابل نفوذ به رطوبت در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد در فریزر نگهداری شد (Rezaeizadeh & Raftani Amiri, 2017).

تهیه مارشمالو

در فرمولاسیون مارشمالوی مورد پژوهش محتوای قند در فرمولاسیون مارشمالو به ترتیب ۴۵ و ۴۵ گرم ساکارز و شربت گلوکز می باشد. همچنین، میزان ژلاتین (۶، ۸ گرم در ۱۰۰ گرم) مشخص

تهیه ژلاتین از پای مرغ

ابتدا پای مرغ وزن شده و ناخن و پوست آن جداسازی شده و سپس بدون حرارت دادن با آب سرد شسته شد، سپس به وسیله چرخه گوشت صنعتی خرد گشت. در مرحله بعد پای خرد شده با آب به نسبت ۱۱/۱:۲ (وزنی/حجمی) شسته شده تا خون و دیگر باقیمانده ها حذف شوند. به پای مرغ خرد شده، اسید هیدروکلریک ۰/۵ نرمال به نسبت ۳/۱:۲۲ (وزنی/حجمی) افزوده شد و در این حالت با مگنت مکانیکی به مدت ۲ ساعت به هم زده شد که pH آن به حدود ۱ رسید. بعد از این مدت اوسئین^۱ (تفاله) جدا شده و با آب مقطر به نسبت ۱۶/۱:۱۲ (وزنی/حجمی) در دو مرحله هر بار ۱۰ دقیقه شستشو شد تا از اسیدی بودن اوسئین کاسته شود و pH به حدود ۳ برسد. اوسئین به آب مقطر به نسبت ۱:۱ (وزنی/حجمی) و در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد اضافه شد و سپس در همین دما

1- Osein

حال خود گذاشته شد تا ژلاتین به طور کامل متورم شود. سپس در حمام آب با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شده تا ژلاتین حل شود. پس از خنک شدن تا دمای اتاق به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در حمام آب سرد با دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد در نهایت قدرت ژل ژلاتین با دستگاه (Cylinder Brookfield- TexturePro- CT V1، آلمان) پروپ (Clear Acrylic, Bloom TA10 12.7mm, 35mm)، اندازه‌گیری گردید (Sarbon *et al.*, 2013).

رنگ‌سنجی

رنگ محلول ۶/۶۷ درصد ژلاتین و رنگ پودر ژلاتین با تصویربرداری در شرایط استاندارد توسط دستگاه (IMG Pardazesh, Cam system XI اندازه‌گیری شد و شاخص‌های L^* ، a^* و b^* مورد ارزیابی قرار گرفت. شاخص L^* (طیف سیاه تا سفید) ۱۰۰-۰، فاکتور a^* (طیف رنگی سبز تا قرمز) ۱۲۰- تا ۱۲۰+ و فاکتور b^* (طیف رنگی (آبی تا زرد) ۱۲۰- تا ۱۲۰+ را نشان می‌دهند (Lassoued *et al.*, 2014).

بررسی خواص رئولوژیکی

آزمون دینامیک نوسانی برای کنترل فرآیند تشکیل ژل و خصوصیات ویسکوالاستیک ژل مورد استفاده قرار می‌گیرد. آزمایش‌ها بر اساس روش نورزیا و همکاران ۲۰۰۹، با رئومتر (Anton Pear-GMBH، آلمان) مجهز به سیرکولاتور حرارتی برای کنترل دما و استفاده از پروپ مخروط و صفحه (plate and Cone) با قطر ۵۰mm Gap. ۲۰۸μm) و زاویه ۲ درجه انجام گرفت. محلول ۶/۶۷ درصد نمونه ژلاتین بر روی صفحه رئومتر ریخته شد. آزمون روبش فرکانس؛ در محدوده فرکانس ۰/۱ تا ۱۰۰ هرتز و کرنش ثابت ۱٪ در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. آزمون روبش دما؛ با روبش گرمایی دمای ۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد (رویش سرمایی) از ۶۰-۵ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ثابت ۱ هرتز و کرنش ثابت ۰/۴٪ انجام گردید. آزمون رفتار جریانی (ویسکوزیته): سرعت برش ۱/s -۳۰۰- ۰/۰۱ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید (Rezaeizadeh & Raftani Amiri, 2017).

اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محصول

مارشمالو

اندازه‌گیری میزان رطوبت و فعالیت آبی

آنالیز میزان رطوبت و فعالیت آبی برای محصولات نهایی انجام خواهد گردید. میزان رطوبت به روش وزن‌سنجی با خشک‌کردن تا

گردید. فرمول در یک مخلوط کن حرارتی (Gosonic-ghm81) ساخت چین تهیه شد. مخلوط کردن شکر و آب (به ازای هر گرم شکر)، تا زمانی که به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه به نقطه جوش برسد. سپس ژلاتین به نسبت ۱ گرم ژلاتین به ازای ۶ گرم آب حل گشته تا مخلوطی همگن به دست آید و متعاقباً با مواد طعم دهنده و رنگ دهنده (رنگ صورتی) به شربت اضافه شد. همه مواد به مدت ۵ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۰۰ دور در دقیقه مخلوط شدند. سپس، شربت را به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۸۶۰ دور در دقیقه هم زده تا هوا به مخلوط اضافه شود، که عمدتاً بافت مارشمالو را تشکیل می‌دهد. برای اهداف قالب‌گیری، مخلوط نهایی در قالب‌های سیلیکونی با پوشش نازکی از روغن آفتابگردان ریخته شد. قالب‌های سیلیکونی استوانه‌ای شکل با قطر ۲۸ میلی‌متر و ارتفاع ۲۰ میلی‌متر می‌باشد. در نهایت قالب‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محفظه‌ای با دمای محیط قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها از قالب خارج شده و با نشاسته پوشانده شدند تا نمونه‌ها به هم نچسبند. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی (پلی‌اتیلن چند لایه) در دمای اتاق به مدت ۴۵ روز نگهداری شد.

اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ژلاتین پای

مرغ

اندازه‌گیری تقریبی ژلاتین

عملکرد ژلاتین، بر اساس وزن تر از طریق میزان ژلاتین خشک شده به وزن پای مرغ مورد استفاده در هر استخراج به دست آمد. رطوبت، خاکستر و چربی ژلاتین خشک شده با روش (AOAC, 2006) تعیین شد. میزان پروتئین خام با محاسبه مقدار نیتروژن کل ژلاتین به روش (AOAC, 2006)، تعیین و از فاکتور ۵/۴۶ برای تبدیل نیتروژن به پروتئین استفاده گردید (Sarbon, Badii, & Howell, 2013).

(۱۰۰× وزن تر پاهای مرغ / وزن خشک ژلاتین) = عملکرد

اندازه‌گیری pH

برای اندازه‌گیری pH ابتدا ۱ گرم ژلاتین در ۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد بعد از حل شدن و رسیدن دمای محلول به دمای اتاق، pH توسط دستگاه pH متر (Sartorius -MKD120100، UK، تایوان) اندازه‌گیری شد (Shyni *et al.*, 2014).

اندازه‌گیری قدرت ژل

۶/۶۷ گرم نمونه ژلاتین با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط گردید. این مخلوط در درجه حرارت اتاق به مدت ۳ ساعت به

بررسی خصوصیات رئولوژیکی

اندازه‌گیری‌های روبش دامنه (LVR) برای تعیین ناحیه ویسکوالاستیک خطی در حالت کرنش برشی کنترل شده (CSS) (۰/۰۱-۱۰۰ درصد) فرکانس ثابت (۱ هرتز) و ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از رئومتر (AntonPaar Physic, MCR301، آلمان) انجام گردید. تست‌های روبش فرکانس در یک کرنش ثابت در ناحیه LVE (۰/۵٪) در محدوده فرکانس ۰/۰۱-۱۰۰ هرتز و ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای ارزیابی خواص ویسکوالاستیک نمونه‌ها انجام شدند در آزمایش دینامیکی، لبه نمونه با لایه‌نازکی از روغن سیلیکون پوشانده شد تا از تبخیر نمونه در حین اندازه‌گیری جلوگیری شود. از نرم‌افزار (Matlab 2015a) و تجزیه و تحلیل داده‌های رئومتر، (Rheoplus/32 Version V3.40) برای تجزیه و تحلیل نتایج رئولوژیکی آزمون دینامیکی استفاده شد (Mardani et al., 2019).

اندازه‌گیری overrun

برای اندازه‌گیری سرریز، مخلوط همزده به‌طور یکنواخت در یک ظرف استوانه‌ای به حجم ۶۰۰ میلی‌لیتر ریخته شد و با استفاده از معادلات زیر محاسبه شد (Mardani et al., 2019).

$$\text{Overrun} = \frac{\text{حجم مایع اولیه (ml)} - \text{حجم کف}}{\text{حجم مایع اولیه (ml)}} \times 100 \quad (۲)$$

بررسی میکروساختار با استفاده از میکروسکوپ

الکترونی

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) برای جلوگیری از تغییر اندازه حباب‌ها و تغییر شکل، ژل تنظیم و ثابت شد. قطعات فوم ژل با استفاده از نیتروژن مایع منجمد شدند (برای جلوگیری از تغییرات ساختاری در حین خشک کردن انجمادی)، سپس به خشک‌کن انجمادی (modelVaco 5, Technology Zirbus, آلمان) منتقل شدند. پس از خشک‌شدن، تصاویر بلافاصله با استفاده از ابزار FE-SEM (Mira3 LMU, TESCAN, جمهوری چک) با یک آشکارساز الکترونی ثانویه در ولتاژ ۱۰ کیلوولت گرفته شد (Mardani et al., 2019).

ارزیابی حسی

ارزیابی ویژگی‌های حسی با استفاده از فرم‌های ارزیابی حسی و توسط ۸ نفر ارزیاب آموزش دیده انجام گردید. برای ارزیابی ویژگی‌های زیر استفاده شد: ظاهر، رنگ، عطر، شیرینی، بافت، سختی و صمغی بودن. آزمون در مقیاس هدونیک پنج نقطه‌ای امتیازدهی

وزن ثابت در آون خلأ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (AOAC, 2006) تعیین گردید. فعالیت آبی (aw) با رطوبت‌سنج تعیین شد (Rezaeizadeh & Raftani Amiri, 2017).

اندازه‌گیری pH

pH محصول با pH متر (Sartorius Uk -MKD120100) تایوان) در شربت اولیه اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری در سه تکرار انجام گردید (Periche et al., 2016).

رنگ‌سنجی

رنگ نمونه‌های مارشمالو با تصویربرداری در شرایط استاندارد توسط دستگاه (IMG Pardazesh, Cam system XI) اندازه‌گیری شد و شاخص‌های L^* ، a^* و b^* مورد ارزیابی قرار گرفت. شاخص L^* (طیف سیاه تا سفید) ۰-۱۰۰، فاکتور a^* (طیف رنگی سبز تا قرمز) ۱۲۰- تا ۱۲۰+ و فاکتور b^* (طیف رنگی (آبی تا زرد) ۱۲۰- تا ۱۲۰+ را نشان می‌دهند (Lassoued et al., 2014).

اندازه‌گیری قدرت ژل

نمونه‌ها (سیلندرهایی با قطر ۲۸ میلی‌متر و ارتفاع ۲۰ میلی‌متر) با تست (Texture Profile Analysis TPA) با استفاده از (Brookfield- TexturePro- CT V1.6) مورد بررسی قرار گرفتند. ابزارها مجهز به لودسل ۵۰ کیلوگرمی و پروب استوانه‌ای به قطر ۴۵ میلی‌متر بودند. شرایط آزمایش شامل دو چرخه متوالی فشرده‌سازی ۵۰٪ با ۱۵ ثانیه بین چرخه‌ها بود. سرعت تست ۱ میلی‌متر بر ثانیه بود (Periche et al., 2016). پارامترهای کمی استخراج شده از منحنی نیرو-زمان عبارتند از: سفتی (حداکثر نیروی پیک در طول اولین سیکل فشرده‌سازی)، فزنی بودن (ارتفاعی که نمونه در طول مدت زمانی که بین پایان چرخه اول و آغاز چرخه دوم سپری می‌شود بازیابی می‌کند)، انسجام (نسبت ناحیه نیروی مثبت در طول فشرده‌سازی دوم و فشار اول) و صمغی (سفتی × انسجام) (Mardani et al., 2019).

آنالیز کالریمتری اسکن افتراقی (DSC)

ویژگی‌های حرارتی مارشمالو با استفاده از کالریمتری اسکن افتراقی تعیین می‌گردد (دستگاه DSC شرکت صنایع گستر ایران مدل ۴۱۱). کالبراسیون تجهیزات با ایندیوم انجام شد و یک تابه خالی به‌عنوان مرجع اعمال شد. برای انجام این آزمایش، ۱۵ میلی‌گرم از هر نمونه به‌طور دقیق در تابه‌های آلومینیومی DSC وزن می‌شود و قبل از آزمایش به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید، نمونه‌ها از ۱۶ تا ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد با آهنگ گرمایش برنامه‌ریزی شده ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه اسکن شدند. شروع (To)، ذوب (Tm) دما و آنتالپی (ΔH) تعیین گشت (Mardani et al., 2019).

استخراج شده بسته به نوع، سن حیوان، مقدار کلاژن، روش استخراج و شرایط استخراج (دما، زمان و pH) و اندازه ذرات ماده اولیه بستگی دارد (Songchotikunpan, Tattiyakul, & Supaphol, 2008). ساربن و همکاران (Sarbon *et al.*, 2013)، میزان عملکرد ژلاتین پوست مرغ بر اساس وزن تر ۲/۱۶ را درصد گزارش کردند که بنا بر نتیجه این تحقیق میزان عملکرد ژلاتین پای مرغ بیشتر از پوست مرغ می‌باشد. pH ژلاتین استخراج شده قبل خشک کردن از ۱ به ۳/۰±۷/۱۱ افزایش یافت که نشان می‌دهد مرحله شست‌وشو برای کاهش اسید باقی‌مانده از مرحله تیمار اسیدی کافی بوده‌است. pH ژلاتین بعد از خشک کردن ۶/۵۵ ± ۰/۲۵ می‌باشد. چو و همکاران (Cheow, Norizah, Kyaw, & Howell, 2007) مقادیر pH را از ۳/۳۵ تا ۴/۸۷ در ژلاتین پوست ماهی گرمسیری ثبت کرد. pH محلول ژلاتین تحت تأثیر عملیات شیمیایی به کار رفته در حین استخراج قرار می‌گیرد و pH بالاتر ژلاتین احتمالاً به دلیل کفایت شست‌وشو پس از عملیات شیمیایی در طول آماده‌سازی ماده خام، قبل از استخراج است (Almeida & Lannes, 2013). در مطالعه رضایی زاده و رفتنی امیری (Rezaeizadeh & Raftani Amiri, 2017) pH ژلاتین قبل خشک کردن ۳/۷ و بعد خشک کردن ۶ بود که همسو با نتایج پژوهش حاضر بود.

سنجش رنگ

نتایج رنگ پودر ژلاتین و محلول ژلاتین در جدول ۲ گزارش شده است. رنگ این ماده پروتئینی به مواد خام مورد استفاده، روش استخراج و خشک کردن بستگی دارد. به‌طور کلی رنگ خواص عملکردی را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد و تنها برای استفاده از ژلاتین در صنعت غذا رنگ آن دارای اهمیت دارد (Shyni *et al.*, 2014). در شاخص L، نماینده طیف رنگ سیاه تا سفید بین محلول ژلاتین و پودر ژلاتین اختلاف معنی‌داری مشاهده شد که میزان روشنایی محلول ژلاتین بیشتر از پودر آن بود و شاخص‌های a نشان‌دهنده طیف رنگی سبز تا قرمز و b نشان‌دهنده طیف رنگ آبی تا زرد در پودر ژلاتین و محلول ژلاتین مورد مقایسه قرار گرفتند که بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مطالعه رضایی زاده و رفتنی امیری (Rezaeizadeh & Raftani Amiri, 2017) ارزیابی شاخص‌های رنگ (a,b,L) ژلاتین پای مرغ حاکی از وجود اختلاف معنادار در شاخص L بوده‌است که میزان L در پودر ژلاتین روند افزایشی داشته‌است و در شاخص‌های a,b اختلاف معنادار مشاهده نشده‌است.

شد. آنالیز داده‌ها برای امتیاز بسیار بد عدد ۱، بد عدد ۲، متوسط عدد ۳، خوب عدد ۴ و بسیار خوب عدد ۵ منظور گردید (Rezaeizadeh & Raftani Amiri, 2017).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایشات مربوط به ژلاتین استخراجی از پای مرغ و محصول مارشمالو در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن تجزیه و تحلیل و مقایسه خواهند شد. آزمون‌های t-test و Anova یک‌طرفه در سطح معنی‌داری $p \leq 0/05$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 انجام شد (Mardani, Yeganehzad, & Niazmand, 2022). رسم نمودارها توسط نرم‌افزار origin pro 2022 انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز ژلاتین پای مرغ

نتایج به‌دست‌آمده از ویژگی‌های ژلاتین تهیه شده از پای مرغ در جدول ۱ ارائه شده‌است. طبق تحقیقات انجام شده ژلاتین عمدتاً از پروتئین، رطوبت و مواد دیگری نظیر لیپید، خاکستر و دیگر ناخالصی‌ها در مقدار کم می‌باشد که در این پژوهش میزان تقریبی پروتئین $78/27 \pm 0/445$ و میزان چربی 10 ± 2 به‌دست آمد. مقدار خاکستر مواد غذایی به محتوای مواد معدنی، پلی‌ساکاریدها و نمک‌های موجود در آن بستگی دارد. میزان خاکستر در این تحقیق $6/47 \pm 460$ به‌دست آمد. میزان خاکستر به مواد خام اولیه، فرآیند استخراج و فیلتراسیون مرتبط است (Asgarzadeh, Atae, & Shafiur Rahman & Al-Chobkar, 2020). رحمان و محروقی (Mahrouqi, 2009) میزان خاکستر موجود در ژلاتین خوک گاو و ماهی‌هامور را به ترتیب ۰/۳۵، ۱/۳، ۲/۹۲ درصد اعلام کردند. این نتایج با نتیجه به‌دست‌آمده از تحقیق همخوانی ندارد. میزان رطوبت نه‌تنها به منبع استخراج ژلاتین بلکه به روش استخراج مرتبط بوده و به‌طور کلی ظرفیت جذب آب در مواد غذایی مختلف بر اساس نوع ترکیب اسیدهای امینه، آرایش فضایی پروتئین، میزان آبدوستی و آبگریزی آن و همچنین حضور کربوهیدرات‌های آب‌دوست تغییر می‌کند (Asgarzadeh *et al.*, 2020). میزان رطوبت ژلاتین پای مرغ استخراج شده $12/70 \pm 0/28$ شد. باتوجه به یافته‌های چریبر و گریس (Schrieber, 2007) رطوبت بهینه ژلاتین بین ۸-۱۲ درصد است و رطوبت بالاتر از ۱۶٪ به دلیل خطر به هم چسبیدن و رشد میکروبی مطلوب نمی‌باشد. میزان عملکرد ژلاتین پای مرغ به روش اسیدی بر اساس وزن تر، $3/25 \pm 1/81$ شد. بازده ژلاتین

جدول ۱- خصوصیات فیزیکیوشیمیایی ژلاتین استخراج شده از پای مرغ
Table 1- Physicochemical properties of gelatin extracted from chicken feet

آزمون Analysis	نتیجه Result
خاکستر Ash (%)	6.47± 0.46
چربی Fat (%)	10±2
پروتئین Protein (%)	78.27± 0.445
رطوبت Moisture	12.70± 0.28
یافت Texture	889.33±108.51
راندمان Yield (%)	3.25±1.81
قبل خشک کردن pH (%) pH before drying	3.44 ±0.13
بعد خشک کردن pH (%) pH after drying	6.55 ±0.25

جدول ۲- رنگ پودر و محلول ژلاتین استخراج شده
Table 2- The color of extracted gelatin powder and solution

نمونه Sample	a	b	L
پودر ژلاتین Gelatin powder	-0.56 ± 0.61	3.67±0.107	15.98 ±0.360
محلول ژلاتین Gelatin solution	-0.33 ±0.66	3.61 ±0.343	20.80 ±0.817

قدرت ژل

استحکام ژل، طبق تعریف، وزنی است که بر حسب گرم باید به وسیله پیستونی به قطر ۷.۱۲ میلی متر روی سطح ژل اعمال شود به منظور اینکه فرورفتگی به عمق ۴ میلی متر ایجاد شود. مطالعات نشان داده است که مهم ترین تفاوت در قدرت ژل ژلاتین های مختلف، تنوع آن ها در مقدار اسیدهای ایمینو است که تحت تاثیر میزان کلاژن موجود در گونه های مختلف و همچنین شرایط استخراج است. گروه های هیدروکسیل در هیدروکسی پرولین با پیوند هیدروژنی بین زنجیره ای از طریق یک مولکول آب و همچنین پیوند هیدروژنی مستقیم به گروه کربونیل نقشی در پایداری ماریپج ایفا می کنند (et al., 2014). گزارش شده است که ژلاتین های استخراج شده از بقایای جوجه یا بوقلمون بدون استخوان زدایی مکانیکی بالاترین ارزش بوم را در PG نشان می دهند. به عنوان مثال، مقادیر بوم ۲۶۰، ۲۹۴، ۳۳۸، ۳۵۵، ۴۳۹، ۵۲۰ و ۸۳۱ برای پوست اردک، ژلاتین فرآورده های جانبی مرغ، ژلاتین گوشت بوقلمون جدا شده مکانیکی، ژلاتین سر مرغ، ژلاتین استخوان مرغ، ژلاتین باقی مانده بدون استخوان مرغ، گزارش شده است (Abedinia et al., 2020). استحکام ژلاتین پای مرغ مورد آزمون در این تحقیق ۱۰۸/۵۱

به دست آمد که بنابر گزارش تحقیقات قبلی و قدرت ژل ژلاتین در این پژوهش، پای مرغ می تواند دارای میزان بالایی اسید آمینه هیدروکسی پرولین باشد. پرولین و هیدروکسی پرولین مسئول ساختار ثانویه منحصربه فرد کلاژن هستند. این اسیدهای آمینه چرخش ستون فقرات پلی پپتید را محدود می کند و در نتیجه به پایداری ماریپج سه گانه کمک می کند. گروه هیدروکسیل هیدروکسی پرولین نقش مهمی در تثبیت ماریپج سه گانه کلاژن دارد (Gómez-Guillén et al., 2011).

بررسی خواص رئولوژیک ژلاتین

ناحیه ویسکوالاستیک خطی

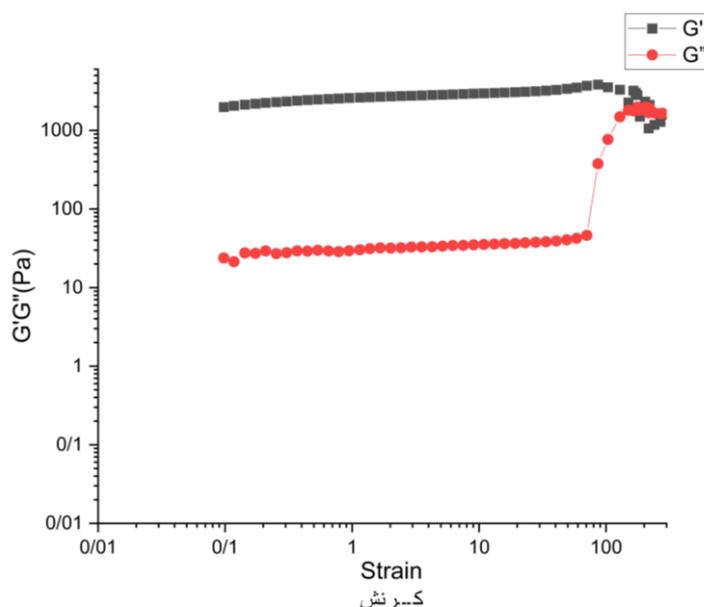
محدود ویسکوالاستیک خطی آزمونی جهت تعیین ژل های قوی از ضعیف است. بیشتر بودن ناحیه ویسکوالاستیک خطی نشانه ای پایداری بیشتر امولسیون در آزمون رویش کرنش است. در این آزمون خطوط مدول ذخیره و افت تا محدوده کرنش ۱۰۰ از حالت افقی خارج نشدند و مدول ذخیره 'G¹' بالاتر از 'G²' بود بدین معنی که ژل حالت

1- Storage modulus

2- Loss modulus

مدول‌های الاستیک و ویسکوز هم‌دیگر را قطع می‌کنند و ژل دچار تغییر شکل می‌شود.

ویسکوز ندارد و استحکام بالاتری در محدوده خطی دارد و با حذف تنش ژل به حالت اولیه خود باز می‌گردد، اما در کرنش بالاتر



شکل ۳- مدول ذخیره G' و مدول افت G'' ژل ژلاتین پای مرغ در ناحیه ویسکوالاستیک خطی

Fig. 3. Storage modulus G' and drop modulus G'' of chicken leg gelatin gel in the linear viscoelastic region

فرکانس بالاتر احتمال نزدیک شدن نمودار دو مدول ذخیره و افت وجود داشت که علت آن را تضعیف شبکه ژلی دانستند.

رویش فرکانس

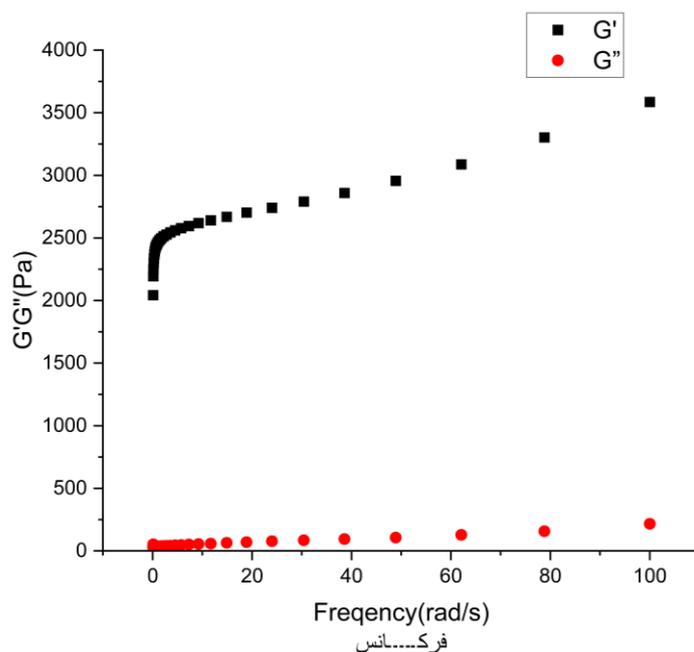
در شکل ۴ نمودار رویش فرکانس ژلاتین پای مرغ نشان داده شده است. در ژلهای قوی در تمامی گستره فرکانس‌ها مدول G' از G'' بالاتر بوده و برخلاف ژل ضعیف هر دو مدول مستقل از فرکانس هستند. ژل قوی در اثر ایجاد اتصالات عرضی به مقدار کافی بین مولکول‌های پلیمر ایجاد شده و شبکه سه بعدی تشکیل می‌شود. دو مدول G' و G'' در محدوده فرکانسی بر هم منطبق نشدند می‌توان گفت ژلاتین مورد پژوهش استحکام بالایی داشته و غنی از ایمینواسید است و در این دما الاستیک است و وابستگی کمی به فرکانس دارد و تاییدکننده آزمون ویسکوالاستیک خطی است. با افزایش غلظت، امکان ایجاد اتصالات عرضی افزایش پیدا می‌کند. همچنین معمولاً ژلهای قوی (مانند ژلاتین) دارای تنش تسلیم بسیار بالایی هستند ولی ژلهای ضعیف مانند (ژل‌گزانتان) تنش تسلیم بسیار پایینی دارند. با توجه به مطالب بالا و اینکه دو مدول G' و G'' در محدوده فرکانسی بر هم منطبق نشدند می‌توان گفت ژلاتین مورد پژوهش استحکام بالایی داشته و غنی از ایمینواسید است و در این دما الاستیک بوده و وابستگی کمی به فرکانس دارد. در مطالعه رضایی زاده و رفتنی امیری (Rezaeizadeh & Raftani Amir, 2017)، در محدوده فرکانس ۱۰۰ هرگز مدول $G' > G''$ بود و در

رفتار جریانی (ویسکوزیته)

نمودار رویش رفتار جریانی ژلاتین پای مرغ را در شکل ۵ مشاهده می‌کنید که با افزایش سرعت برش، مقدار ویسکوزیته کاهش پیدا می‌کند نمونه از نوع رقیق شونده با برش است. منحنی رویش برگشت منطبق با منحنی رویش رفت نشد یعنی هنگامی که تنش برشی اعمال شد کمی زمان نیاز است تا نمونه به حالت ابتدایی خود بازگردد. اگر منحنی‌ها برهم منطبق می‌شدند حاکی از این بود که ژل بلافاصله به حالت اولیه بازگشته است. نمونه در این تحقیق در دمای ۳۰ درجه تحت آزمون قرار گرفته است بنابراین وجود هیستریسیس و نبود انطباق منحنی‌ها طبیعتاً اتفاق می‌افتد. ویسکوزیته محلول ژلاتین غلیظ عمدتاً به برهم‌کنش‌های هیدرودینامیکی بین مولکول‌های ژلاتین بستگی دارد. مشارکت حلال (آب) و هر مولکول ژلاتین با افزایش غلظت، کمتر و کمتر می‌شود. ویسکوزیته همچنین به دما (بالاتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ویسکوزیته به صورت تصاعدی با افزایش دما کاهش می‌یابد)، به pH (ویسکوزیته در نقطه ایزوالکتریک حداقل است) و غلظت بستگی دارد (Poppe, 1992). در مطالعه رضایی زاده و رفتنی امیری (Rezaeizadeh & Raftani Amir,

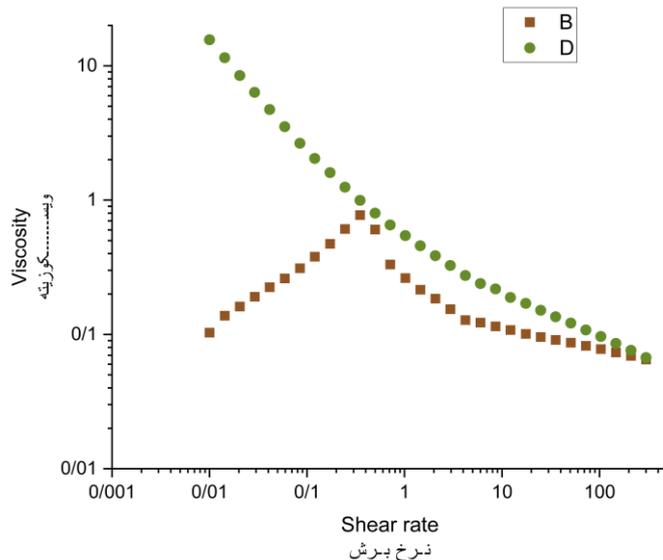
بود. با افزایش نرخ برش، ویسکوزیته نمونه نیز کاهش یافته است.

(2017) ژلاتین پای مرغ ابتدا رفتار غلیظ شونده با برش نشان داده اما از سرعت برشی ۰/۱ رفتار رئولوژیکی ژلاتین رقیق شونده با برش



شکل ۴- مدول ذخیره G' و مدول افت G'' ژل ژلاتین پای مرغ در محدوده ای از فرکانس

Fig. 4. Storage modulus G' and drop modulus G'' of chicken leg gelatin gel in a range of frequency



شکل ۵- رویش رفت و برگشت ویسکوزیته ژلاتین پای مرغ

Fig. 5. Reversing the viscosity of chicken foot gelatin

کم به هم نزدیک شده و سپس در نقطه‌ی ۳۴/۷۳ به هم برخورد کرده‌اند که این نقطه‌ی ذوب ژل است. سپس دما از ۶۰ درجه شروع به کاهش کرده تا در نقطه‌ی ۲۸/۸۹، مجدد نمودار G' و G'' همدیگر

رویش دما

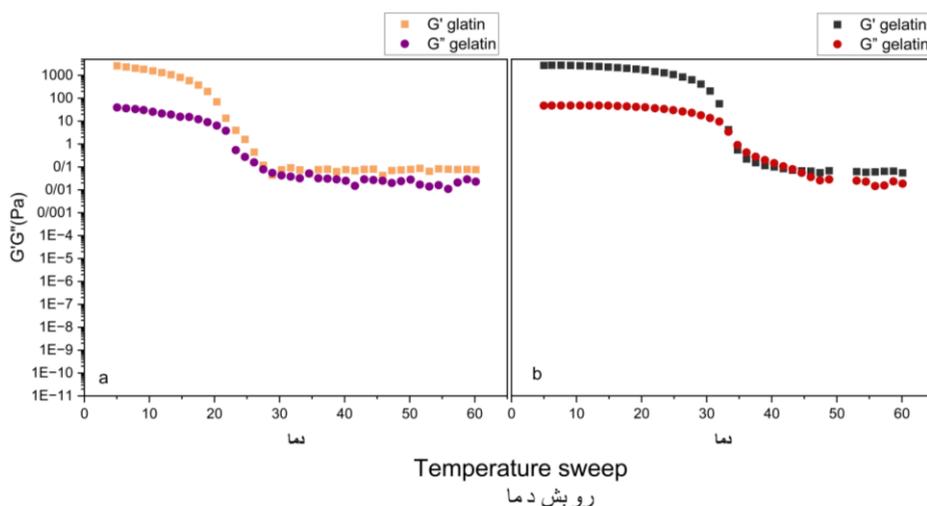
آزمون در بازه دمایی ۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. با شروع آزمون در دمای ۵ درجه با افزایش حرارت، مدول‌های G' و G'' کم

است. همچنین نقطه ذوب بالا در این مطالعه ممکن است به محتوای بالای اسیدهای ایمینو نسبت داده شود. پرولین نقش عمده‌ای در ترویج تشکیل ماریج پلی‌پرولین ایفا می‌کند (Sarbon *et al.*, 2013). بوران و همکاران (Boran, Mulvaney, & Regenstein, 2010) نشان دادند ژلاتین تهیه‌شده از پوست ماهی کپور نقره‌ای دارای دمای ژل شدن $18 \pm 0/3$ می‌باشد که در مقایسه با ژلاتین گاوی با دمای تشکیل ژل $24/1 \pm 0/1$ و ژلاتین خوک با $25/4 \pm 0/1$ بسیار کمتر است. بنابراین گزارش دمای ژل شدن ژلاتین پای مرغ در این پژوهش به دمای بستن ژل در ژلاتین حاصل از منبع خوک نزدیک است. در مطالعه عسگرزاده و همکاران (Asgarzadeh *et al.*, 2020) دمای ذوب شدن ژل ژلاتین فانوس ماهی $23 \pm 0/5$ درجه سانتی‌گراد و در پژوهش رضایی زاده و رفتنی امیری (Rezaeizadeh & Raftani Amiri, 2017) نقطه ذوب ژلاتین پای مرغ $39/64$ درجه سانتی‌گراد اعلام گردید. با توجه به این گزارشات نقطه ذوب به‌دست آمده از این پژوهش ($34/73$ درجه سانتی‌گراد) نزدیک به دمای ذوب ژلاتین استخراجی از فانوس ماهی بود.

را قطع کردند که محل تقاطع آن‌ها نقطه بستن ژل است (شکل ۶). نقطه ذوب تحت تأثیر موارد زیر است:

۱. زمان تشکیل ژل مستحکم: نشان دادند که نقطه ذوب ژلاتین با گرید بالا به شرایط در ساعت اول مستحکم شدن ژل بستگی دارد.
۲. غلظت: نقطه ذوب با افزایش غلظت ژلاتین افزایش می‌یابد.
۳. نمک‌ها: کلرید سدیم نقطه ذوب ژلاتین را کاهش می‌دهد (Poppe, 1992).

بالا بودن نقطه ذوب در ژلاتین با وزن زنجیره مولکولی آن در ارتباط است. هرچه میزان زنجیره آلفا ۱ به آلفا ۲ بیشتر باشد نقطه ذوب افزایش می‌یابد. یعنی هر چه میزان پپتیدهای کوچک‌تر از زنجیره آلفا بیشتر باشد زمان تشکیل ژل افزایش می‌یابد (Mobini, Nateghi, & Eshaghi, 2021). بنابراین می‌توان گفت در این پژوهش به دلیل افزایش میزان زنجیره آلفا نقطه ذوب افزایش یافته



شکل ۶- مدول ذخیره G' و مدول افت G'' ژل ژلاتین پای مرغ در روبش گرمایشی و سرمایشی نمودار a روبش سرمایشی و نمودار b روبش گرمایشی را نشان می‌دهد.

Fig. 6. Storage modulus " G' " and loss modulus " G'' " of chicken foot gelatin gel in heating and cooling scans. Graph a show the cooling scan and graph b shows the heating scan

جدول ۳- نتایج بررسی کیفی نمونه‌های مارشمالو

Table 3- The results of the qualitative examination of marshmallow samples

نمونه Sample	Overrun کف‌پذیری	Aw فعالیت آبی	Moisture رطوبت
مارشمالو ۶٪ Marshmallow 6%	30	0.783	33.54
مارشمالو ۸٪ Marshmallow 8%	40	0.797	33.79

نتایج بررسی محصول مارشمالو

اندازه‌گیری overrun

اورران نمونه‌های مارشمالو در جدول ۳ ارائه شده است. اورران در نمونه حاوی ۸ درصد ۴۰ و در مارشمالوی ۶ درصد ژلاتین ۳۰ بود. تشکیل فیلم بر روی حباب‌های فوم تحت تأثیر غلظت پروتئین است و فشار سطحی تابعی از ترکیب و غلظت پروتئین در سطح مشترک هوا/آب است (Alleoni, 2006). بنابراین حضور ژلاتین به میزان ۸ درصد و افزایش پروتئین در سوسپانسیون سورفاکتانت هوادهی شده می‌تواند کشش سطحی را به میزان بیشتری کاهش دهد و در طول حرکت سطحی، پروتئین‌های نیمه باز شده، پیوندهای بین مولکولی جدیدی با مولکول‌های همسایه تشکیل می‌دهند و لایه‌های منسجمی را تشکیل داده که برای تشکیل کف ضروری است. بنابراین فوم‌هایی که با غلظت بالاتری از پروتئین به دست می‌آیند به دلیل افزایش ضخامت لایه‌های سطحی، متراکم‌تر و پایدارتر هستند (Periche et al., 2016).

سنجش بافت

ویژگی‌های بافتی ماده غذایی آن دسته ویژگی‌های فیزیکی هستند که از اجزای سازنده ماده غذایی منشا گرفته و عمدتاً توسط حواس ششگانه درک می‌شود. مطابق با نتایج اثر غلظت‌های مختلف ژلاتین بر شاخص‌های بافتی مانند سختی، صمغیت، چسبندگی، قابلیت جویدن و ... مورد بررسی قرار گرفته و در جدول ۴ ارائه شدند. سفتی: مقاومت ماده غذایی نسبت به اعمال نیروی فشار به کار گرفته شده است. در فاکتور سختی بافت بین نمونه ۸ درصد ژلاتین با نمونه ۶ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در نمونه ۸٪ ژلاتین، غلظت ژلاتین بالاتر منجر به تشکیل شبکه‌های ژل قوی‌تر در بافت می‌شود (Mardani et al., 2022). ژلاتین باعث جویدن مارشمالو به وسیله تشکیل یک شبکه سه بعدی درهم پیچیده از زنجیره‌های پلیمری می‌شود. هنگامی که ژلاتین در آب گرم حل می‌شود، یک دیسپرسیون

تشکیل می‌دهد که منجر به اتصال عرضی زنجیره‌های مارپیچ شکل آن می‌شود. پیوند در شبکه پروتئین ژلاتین، به نام "مناطق اتصال" رخ می‌دهد (Du Toit et al., 2016). تان و لیم (Tan & Lim, 2008) اظهار داشتند که تشکیل شبکه ژلاتینی به سخت شدن در مارشمالو کمک می‌کند (Santoso, Pranoto, Afriyanti, & Mulyani, 2019). در فاکتور جویدن بین مارشمالوی ۶ و ۸ درصد اختلاف معنادار وجود ندارد.

الاستیسیته: توانایی نمونه برای بازگشت به حالت اولیه بعد از حذف نیروی تغییر شکل دهنده است. پیوستگی: مقاومت درونی ساختار ماده غذایی است و میزان آن به برهمکنش درون مولکولی اجزای فرمول بستگی دارد (Mojavarian, Bardani Amiri, & Shahiri Tabarestani, 2019). در پارامترهای قابلیت ارتجاع و پیوستگی بین نمونه‌ها اختلاف معناداری مشاهده نشد.

صمغی بودن: میزان تراکم ماده غذایی که در برابر جویدن مقاومت می‌کند را نشان می‌دهد. چسبندگی: کار مورد نیاز برای غلبه بر نیروی جاذبه بین ماده با سطح سایر مواد که در تماس با آن است (Mojavarian et al., 2019). فاکتورهای صمغیت و چسبندگی بین مارشمالوها اختلاف معنی‌دار بود. عامل ژلاتین و ویسکوزیته که در کف‌پذیری و در نهایت سختی بافت مؤثر بودند بر این دو مشخصه بافتی هم تأثیرگذار بوده‌اند. در مطالعه فیوضی و همکاران (Fiyuzi, Mazaheri Tehrani, & Khazaei, 2016) در فرآورده ژله خرما مشکل از نسبت‌های مشخصی از ژلاتین، زانتان و آب پنیر، افزایش غلظت ژلاتین در فرمولاسیون سبب سفتی بافت و استحکام شبکه ژلی شده‌است. در مطالعه مجاوریان و همکاران (Mojavarian et al., 2019) سفتی نمونه‌ها از ۱۸۴۳ تا ۴۱۶۰ گرم بود و میزان ژلاتین و کنستانت‌ره انگور بر مؤلفه سفتی بافت اثر افزایشی داشته‌است و ژلاتین نقش اصلی را در تشکیل ساختمان ژل و سفتی آن بر عهده داشته است.

جدول ۴- نتایج بررسی فاکتورهای بافت در آنالیز

Table 4- The results of examination of tissue factors in TPA analysis

نمونه Sample	سختی Hardness	پیوستگی Cohesiveness	قابلیت ارتجاع Springines	صمغیت Gummines	چسبندگی Adhesiveness	قابلیت جویدن Chewines
مارشمالو ۶٪ Marshmallow6%	460 ^b	0.9362 ^a	7.31 ^a	420.33 ^b	1.116 ^b	32.99 ^a
مارشمالو ۸٪ Marshmallow8%	1108.33 ^a	0.95 ^a	4.59 ^a	822.33 ^a	2.59 ^a	37.10 ^a

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۰/۰۵٪ می‌باشد.

Different letters in each column indicate a significant difference at the confidence level of 0.05%.

جدول ۵- سنجش فاکتورهای رنگ در مارشمالو
Table 5- Measurement of color factors in marshmallow

نمونه Sample	a	b	L
مارشمالو ۶٪ Marshmallow 6%	1.015 ^a	0.343 ^a	2.267 ^b
مارشمالو ۸٪ Marshmallow 8%	0.903 ^a	0.342 ^a	3.603 ^a

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۰/۰۵٪ می‌باشد.

Different letters in each column indicate a significant difference at the confidence level of 0.05%.

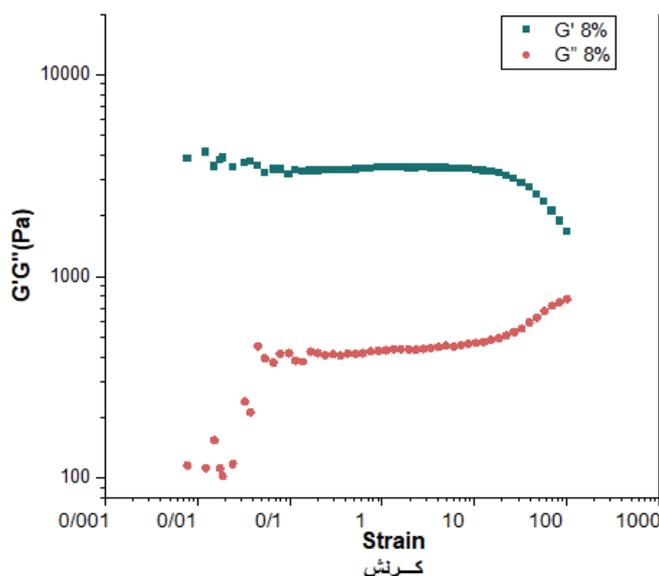
ناحیه ویسکوالاستیک خطی

برای تعیین ویژگی‌های ویسکوالاستیک نمونه‌ها از دو مدول ذخیره (بزرگی انرژی ذخیره شده در ماده) و افت (بزرگی انرژی تلف شده در ماده) استفاده می‌شود. در این آزمون ناحیه ویسکوالاستیک خطی هر قدر مدول ذخیره بالاتر از افت باشد ژل حالت ویسکوز ندارد و از حالت الاستیک قوی‌تری ژل برخوردار است و در نتیجه با افزایش فشار و نیرو جریان پیدا نمی‌کند و به فرم اولیه خود باز می‌گردد و دارای رفتار جامد گونه در محدوده ویسکوالاستیک است. با توجه به این مطالب برای نمونه ۸٪ و ۶٪ دو مدول ذخیره و افت در کرنش ۱۰۰ به هم نزدیک می‌شوند و احتمالاً در کرنش بالای ۱۰۰ همدیگر را قطع کرده و بافت نمونه دچار تغییر شود. در نمونه ۸٪ فاصله‌ی خطوط G' و G'' بیشتر از سایر مارشمالوها می‌باشد و از خصوصیت الاستیک بیشتری برخوردار است.

سنجش رنگ

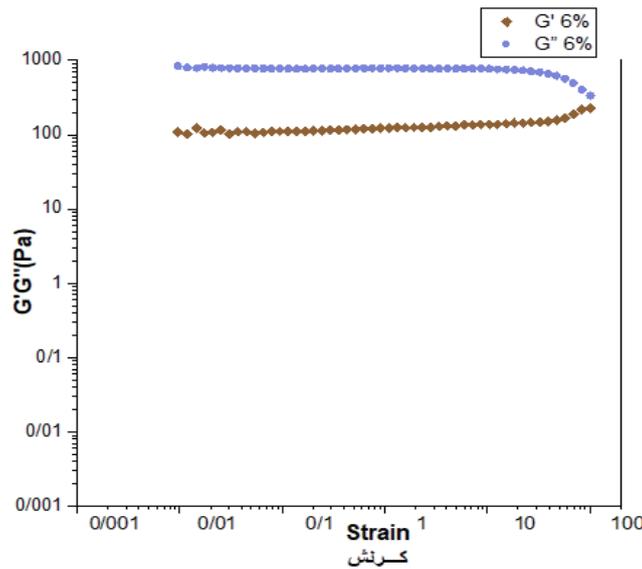
رنگ یکی از اولین ویژگی‌های ظاهری محصول می‌باشد که در جلب نظر مصرف‌کنندگان مؤثر است. نتایج آنالیز رنگ در جدول ۵ ذکر شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، فاکتور L در نمونه‌های مارشمالو حاوی شکر سفید اختلاف معنی‌دار بود که درصد ژلاتین عاملی بوده است که بر فاکتور L یا درخشندگی محصول تأثیر داشته و با افزایش ژلاتین درخشندگی هم افزایش یافته است و در فاکتورهای a و b بین نمونه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد.

بررسی خواص رئولوژیک مارشمالو



شکل ۷- مدول ذخیره G' و مدول افت G'' مارشمالوی حاوی ۸ درصد ژلاتین در ناحیه ویسکوالاستیک خطی

Fig. 7. Storage modulus G' and drop modulus G'' of marshmallows containing 8% gelatin in the linear viscoelastic region

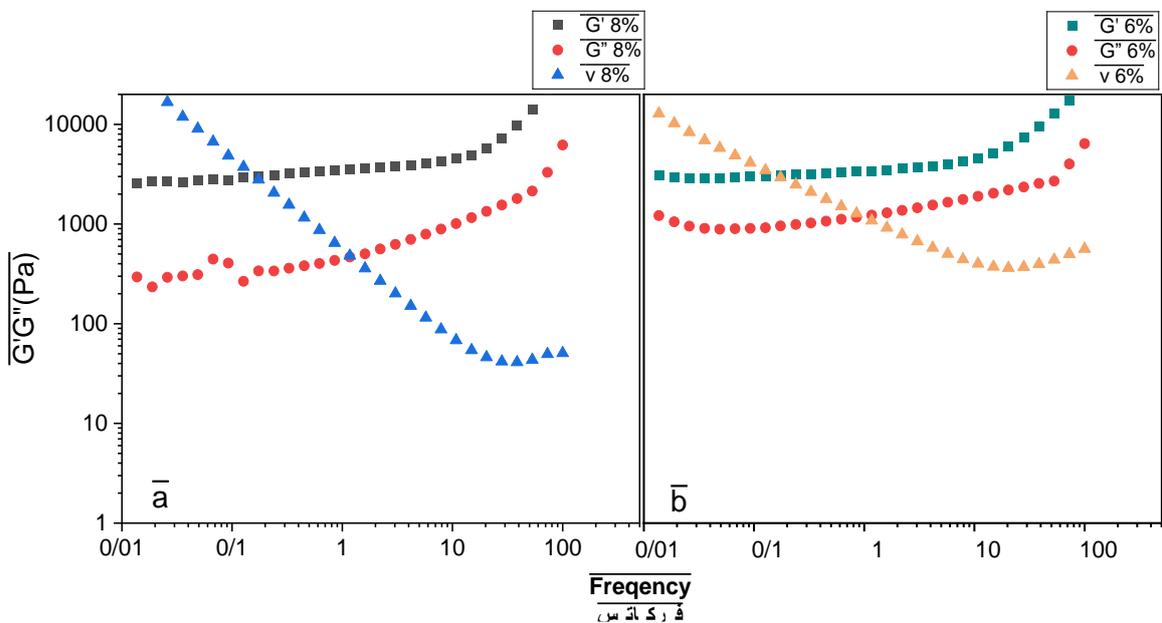


شکل ۸- مدول ذخیره G' و مدول افت G'' مارشمالوی حاوی ۶ درصد ژلاتین در ناحیه ویسکوالاستیک خطی
 Fig. 8. Storage modulus G' and drop modulus G'' of marshmallows containing 6% gelatin in the linear viscoelastic region

نشان‌دهنده رفتار کشسانی و توانایی زنجیره ملکولی آنها برای تشکیل شبکه بود (Mardani et al., 2019). در همه نمونه‌ها ویسکوزیته پیچیده بصورت خطی با افزایش فرکانس اعمال شده کاهش می‌یابد که منعکس کننده رفتار نازک شونده برشی نمونه‌هاست (Mardani et al., 2022).

رویش فرکانس

در شکل ۹ مدول ذخیره‌سازی در تمام نمونه‌ها بالاتر از مدول افت بود و در محدوده فرکانس اعمال شده هیچ نقطه متقاطع مشاهده نشد که می‌تواند به‌عنوان یک ماده ویسکو الاستیک از نوع ژل در نظر گرفته شود و مدول تلفات کمتر از مدول ذخیره‌سازی بود که



شکل ۹- مدول ذخیره G' و مدول افت G'' مارشمالوی حاوی ۸ درصد ژلاتین (نمودار a) و مارشمالوی حاوی ۶ درصد ژلاتین (نمودار b) در محدوده فرکانس ۱۰۰ هرتز

Fig. 9. Storage modulus " G' " and loss modulus " G'' " of marshmallows containing 8% gelatin (diagram a) and marshmallows containing 6% gelatin (diagram b) in the frequency range of 100 Hz

ذوب و آنتالپی نمونه‌های مارشمالو گزارش شده است. نمونه‌های مارشمالوی ۸ درصد ژلاتین و ۶ درصد ژلاتین به ترتیب بیشترین تا کمترین نقطه ذوب را داشتند. نقطه ذوب بالاتر نمونه ۸ درصد به دلیل سختی بالاتر و بافت فشرده‌تر و افزایش انرژی مورد نیاز برای ذوب مربوط می‌باشد (Mardani et al., 2022).

شکل ۱۰ ترموگرام‌های DSC نمونه‌های مارشمالو را نمایش می‌دهد که در هر کدام یک پیک اندوترم که از دمای حدود ۵۰ درجه شروع شده و تا حدود ۱۰۰ درجه ادامه داشته وجود دارد. اوج این پیک گرماگیر از همپوشانی چند فرآیند منشا می‌گیرد. ۱. تبخیر آب ۲. ذوب و تبلور مجدد کریستال‌های کوچک یا ناقص ژلاتین به اصطلاح اولین انتقال شیشه‌ای ژلاتین که با انتقال شیشه‌ای قطعات اسید آمینه در زنجیره پلی‌پپتیدی ارتباط دارد (Patil, Mark, Apostolov, 2000). هر چه محتوای آب بیشتر باشد پیک پهن‌تری تشکیل می‌شود.

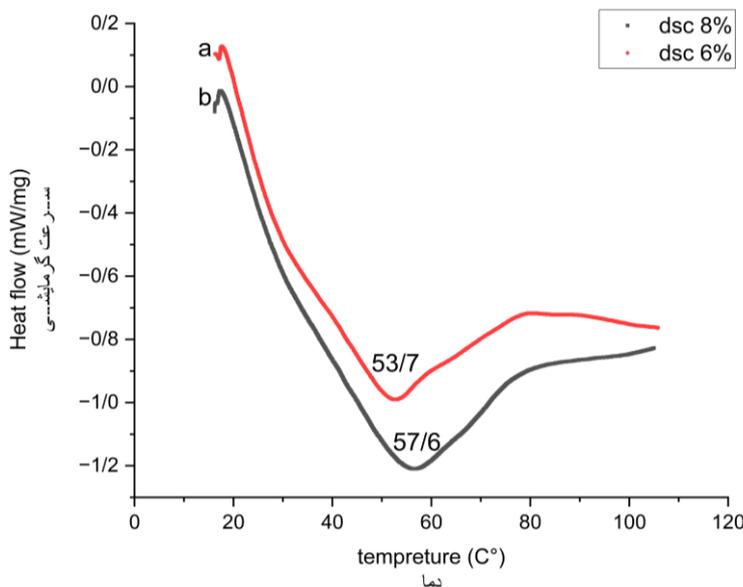
بیشترین شیب مدول‌ها مربوط به مارشمالو ۸٪ است که نشان دهنده تشکیل ژل قوی‌تر از نمونه‌های دیگر است. در فرکانس بیشتر از ۱۰ هرتز نمونه ۸ درصد رفتار الاستیک بیشتری از خود نشان داد. الاستیسیته بالا ممکن است به دلیل اورران کم، عدم تشکیل کف مناسب و بافت فشرده در محصول باشد (Mardani et al., 2019). همچنین اتصالات داخل زنجیره‌ای زمان کافی برای بازآرایی در فرکانس‌های بالا را نداشتند و خواص الاستیکی در فرکانس بالا افزایش یافته است.

آنالیز کالریمتری اسکن افتراقی DSC

ابزار محبوبی است که تغییرات خاصی را با استفاده از تابعی از دما و سرعت جریان گرما پیش‌بینی می‌کند. اندازه‌گیری نقطه ذوب و آنتالپی فوم ژل‌ها به دلیل تأثیر آنها بر حس دهان مصرف‌کننده و همچنین دمای نگهداری محصول و مقاومت در برابر پاستوریزاسیون حرارتی حائز اهمیت است (Mardani et al., 2022). جدول ۶ نقاط

جدول ۶- نتایج نقطه ذوب و آنتالپی مارشمالو
Table 6- Melting point and enthalpy results of marshmallow

نمونه Sample	نقطه ذوب Melting point	آنتالپی Enthlpy
مارشمالو ۶٪ Marshmallow6%	53.7	128.481
مارشمالو ۸٪ Marshmallow8%	57.6	449.994



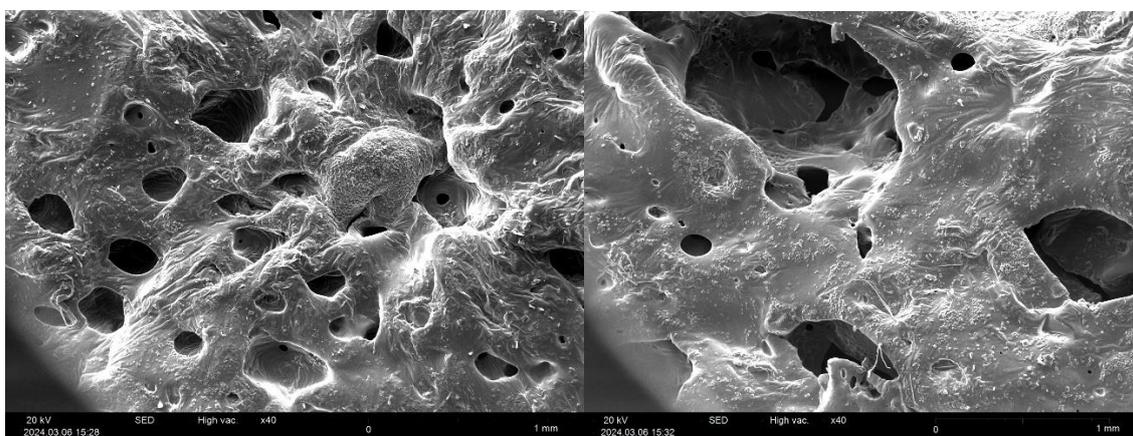
شکل ۱۰- ترموگرام DSC نمونه‌های مارشمالوی حاوی ۶ درصد (a) و ۸ درصد (b) ژلاتین پای مرغ

Fig. 10. DSC thermogram of marshmallow samples containing 6% (a) and 8% (b) chicken feet gelatin

بررسی میکروسکوپی بافت مارشمالو

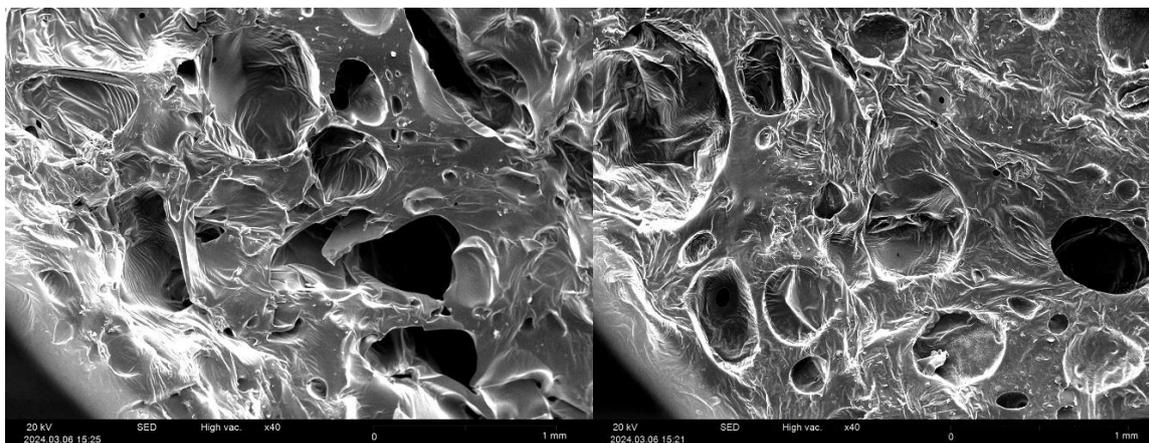
اندازه و توزیع حباب یکی از چالش‌های اصلی در تولید محصولات هوادهی است. بسیاری از نویسندگان اهمیت قطر حباب و توزیع آن در غذاهای هوادهی شده را گزارش کرده‌اند. توزیع یکنواخت سلول‌های هوای کوچک، هم آزاد شدن طعم و هم ظاهر محصول را بهبود می‌بخشد. تفاوت قطر حباب‌ها می‌تواند روی خواص مورفولوژی و بافتی یک محصول اثر بگذارد. به‌طور کلی، ساختار حباب‌ها در محصولات فوم جامد به‌عنوان سلول‌های هوا توصیف شده است که به شکل کروی هستند و توسط یک لایه از هم جدا شده‌اند (2022)

(Mardani *et al.*). با توجه به تصاویر با افزایش ژلاتین در نمونه به ۸ درصد شبکه‌ای ژلی با حباب هوای کمتر و غیر یکنواخت‌تر با قطر بیشتر تشکیل شده است که دلیل آن افزایش ویسکوزیته و قوام که مانع از ورود هوا هنگام هم زدن شده و کاهش در دسترس بودن سورفکتانت و قرار گرفتن کمتر آن در لایه سطحی و کاهش هوادهی و سختی بافت محصول می‌باشد (شکل ۱۱). در مارشمالو ۶ درصد ژلاتین وجود غلظت ساپونین و زنجیره‌های قند بیشتر در سیستم، می‌تواند اتصالات بیشتر و پوشش بهتر حباب‌ها را ایجاد کند که در بیشتر نواحی حباب‌های بیشتر و یکنواخت‌تر تشکیل شده‌اند (شکل ۱۲).



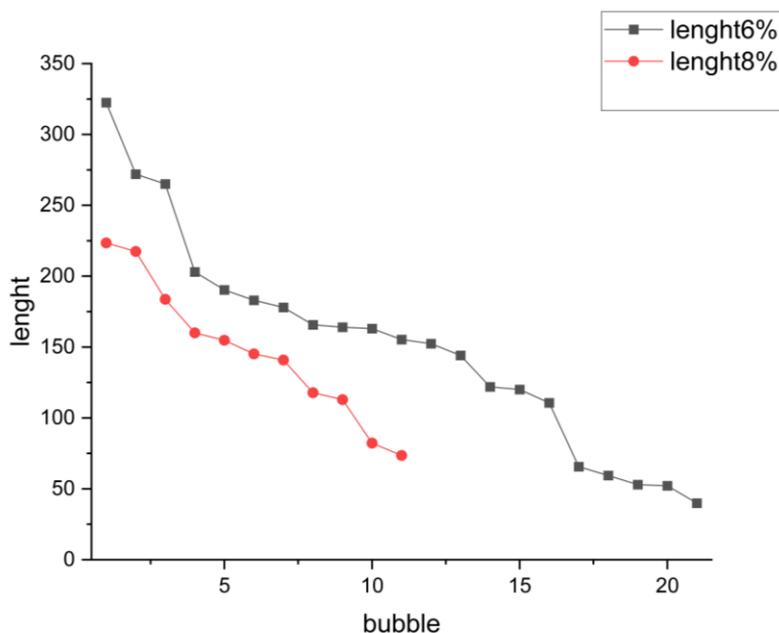
شکل ۱۱- تصویر میکروسکوپی بافت مارشمالوی حاوی ۶ درصد ژلاتین توسط میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی ۲۰

Fig. 11. Microscopic image of marshmallow tissue containing 6% gelatin by electron microscope with 20 magnifications



شکل ۱۲- تصویر میکروسکوپی بافت مارشمالوی حاوی ۸ درصد ژلاتین توسط میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی ۲۰

Fig. 12. Microscopic image of marshmallow tissue containing 8% gelatin by electron microscope with 20 magnifications



شکل ۱۳- نمودار طول حباب‌های هوای تشکیل شده در نمونه‌های مارشمالوی مورد پژوهش
 Fig. 13. Diagram of the length of air bubbles formed in the marshmallow samples under study

می‌رسد برهمکنش بین ژلاتین و گروه قندی و جذب آب به بافت انسجام و سختی بیشتری بخشیده و ساکارز به پایداری این ساختار کمک کرده است. از حیث پارامتر صمغی بودن نمونه ۸ درصد با سایر نمونه‌ها اختلاف معنی‌دار داشت و کمترین امتیاز را دریافت کرد. در شاخص ارزیابی شده عطر بین نمونه ۸ درصد و ۶ درصد ژلاتین اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در نمونه ۸ درصد، افزایش درصد ژلاتین در فرمولاسیون و سخت شدن بافت رهاش مواد طعمی کاهش داده است. در نمونه ۶ کاهش ویسکوزیته و بهبود کف‌پذیری در آزاد شدن ترکیب معطر تأثیر مثبت داشته است. از نظر ظاهری بین نمونه‌های مارشمالو شاهد و سایر نمونه‌ها اختلاف معنادار بود. فرآورده فرموله شده ۶ درصد ژلاتین در این سنجش حسی بهترین امتیاز و مطلوبیت را به‌دست آورد.

ارزیابی حسی

نتایج حاصل از سنجش حسی نمونه‌های مارشمالو در جدول ۷ گزارش شده است. اساساً اندازه‌گیری کیفیت یک فرآورده بر اساس اطلاعات دریافتی از پنج حس بینایی، بویایی، چشایی و لامسه ارزیابی حسی گفته می‌شود، که این روش بهترین راه برای ارزیابی طعم و بافت در مواد غذایی جدید به‌ویژه غذاهای ترکیبی یا فرموله شده در مراحل اولیه توسعه است (Fiyuzi et al., 2016). با توجه به یافته‌های این بررسی و تحلیل پاسخ ارزیابان درصدهای مختلف ژلاتین روی شدت رنگ نمونه اثر معناداری نداشت. از نظر مقبولیت رنگ، مارشمالو ۸ درصد با امتیاز ۴ بیشترین امتیاز را دارا شد. با افزودن ۸ درصد ژلاتین به تیمار سختی بافت به‌صورت معناداری روند افزایشی داشته است. همچنین با افزودن ۸ درصد ژلاتین به تیمار به‌صورت معنادار سختی بافت روند افزایشی داشته است. به نظر

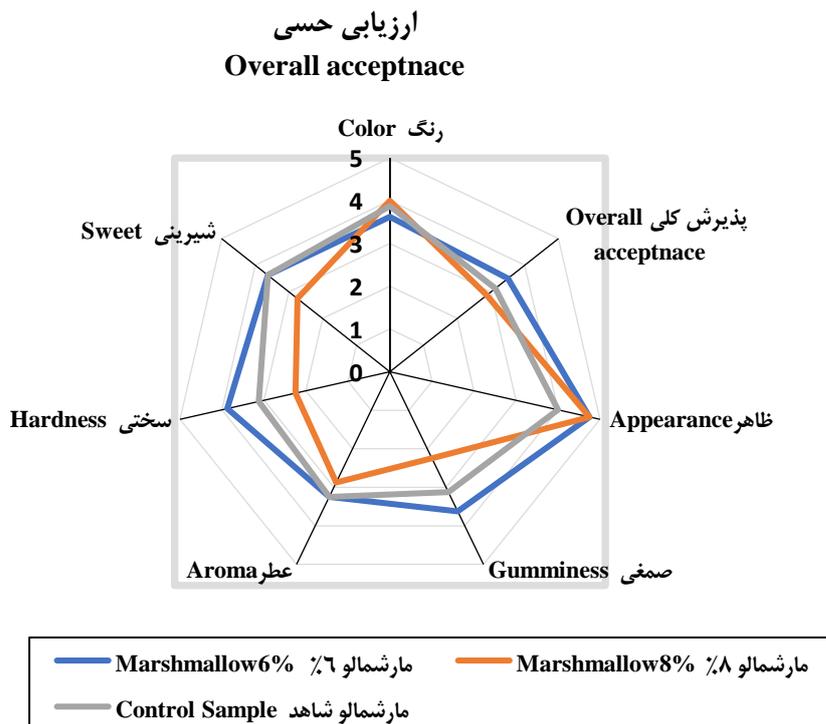
جدول ۷- نتایج ارزیابی حسی مارشمالو

Table 7- Marshmallow sensory evaluation results

نمونه Sample	رنگ Color	شیرینی Sweets	سفتی Hardness	عطر Aroma	صمغی Gumminess	ظاهر Appearance	پذیرش کلی Overall acceptance
مارشمالو ۶٪ Marshmallow 6%	3.625 ^a	3.625	3.875 ^a	3.25 ^a	3.625 ^a	4.75 ^a	3.5 ^a
مارشمالو ۸٪ Marshmallow 8%	4 ^a	2.75	2.25 ^b	2.875 ^b	2.25 ^b	4.75 ^a	2.875 ^b
مارشمالو شاهد Control sample	3.875 ^b	3.625	3.125 ^c	3.25 ^a	3.125 ^a	4 ^b	3.125 ^a

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۰/۰۵٪ می‌باشد.

Different letters in each column indicate a significant difference at the confidence level of 0.05%.



شکل ۱۴- نمودار ارزیابی حسی نمونه‌های مارشمالو
Fig. 14. Diagram of sensory evaluation of marshmallow samples

فضای متخلخلی با حباب‌های کوچک هوا مشاهده شده است که با در دسترس قرار دادن بیشتر سورفکتانت در سطح مشترک هوا و مایع با کاهش بیشتر کشش سطحی، از طریق برهمکنش‌های مولکولی هوای وارد شده به سیستم ژلی را حبس و از فروپاشی و خروج آن از سیستم جلوگیری می‌کند. مطابق با نتایج حاصل از پژوهش و افزایش ضایعات طیور، ژلاتین استخراج شده از پای مرغ از حیث کیفیت و موضوع حلال و سلامتی مصرف‌کنندگان می‌تواند در فرمولاسیون‌های حاوی ژلاتین مورد استفاده قرار گیرد.

میزان مشارکت نویسندگان

فاطمه اسلامی: تحقیق و بررسی، نرم‌افزار، منابع، نوشتن (پیش‌نویس اصلی)، مدیریت داده‌ها، روش‌شناسی، مفهوم‌سازی.
زینب رفتنی امیری: نظارت، مدیریت پروژه، اعتبارسنجی-نوشتن (بررسی و ویرایش).
علی معتمدزادگان: نظارت، مدیریت پروژه.
هایده گرجیان: نوشتن (بررسی و ویرایش)، اعتبارسنجی.

سپاسگزاری

نتیجه‌گیری

در این پژوهش جایگزینی ژلاتین پای مرغ در دو سطح (۶٪، ۸٪) در محصول مارشمالو مورد بررسی قرار گرفت و پارامترهایی مانند تأثیر ژلاتین بر بافت، رنگ، فعالیت آبی، نقطه ذوب آنالیز شدند. مطابق با نتایج، نقاط ذوب و بستن ژلاتین به ترتیب ۳۴/۷۳ و ۲۸/۸۹ به دست آمد. میزان بازده ژلاتین استحصالی $1/81 \pm 3/25$ بود. نرخ تبدیل کلاژن به ژلاتین بستگی به پارامترهای (دما، زمان، pH)، ماده خام اولیه و نحوه پیش‌تیمار آن دارد. استحکام ژلاتین پای مرغ تحت آنالیز بافت $1105 \pm 889/33$ بود که نشان‌دهنده قدرت بلوم بالا به دلیل وجود مقدار بالای اسید آمینه‌های پرولین و هیدروکسی پرولین است که باعث افزایش قدرت ژل می‌شوند. در شاخص L (نماینده طیف رنگ سیاه تا سفید) اختلاف معنی‌داری بین محلول ژلاتین و پودر ژلاتین مشاهده گردید، به طوری که میزان روشنایی محلول ژلاتین بیشتر از فرم پودری آن بود ($p < 0/05$). در محصول مارشمالو نقطه ذوب نمونه‌های ۶ و ۸ درصد به ترتیب ۵۲/۷، ۵۶/۲ به دست آمد. در فعالیت آبی و سختی بافت بین نمونه‌های ۶ و ۸ درصد ژلاتین اختلاف معنادار نبوده و دارای aw ، ۰/۷۹۷ و ۰/۷۳۴ و سختی ۲۱۴/۶۶ و ۱۱۰۸/۳۳ بودند. در تصویربرداری SEM در این نمونه

این مقاله بخشی از پایان‌نامه ارشد است که بدین‌وسیله از حمایت‌های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جهت اجرا تشکر به‌عمل می‌آید.

References

1. Abedinia, A., Nafchi, A.M., Sharifi, M., Ghalambor, P., Oladzadabbasabadi, N., Ariffin, F., & Huda, N. (2020). Poultry gelatin: Characteristics, developments, challenges, and future outlooks as a sustainable alternative for mammalian gelatin. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 14-26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.001>
2. Alleoni, A.C.C. (2006). Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*, 63, 291-298. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000300013>
3. Almeida, P.F., & Lannes, S.C.D.S. (2013). Extraction and physicochemical characterization of gelatin from chicken by-product. *Journal of Food Process Engineering*, 36(6), 824-833. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12051>
4. AOAC. (2006). Official methods of analysis of AOAC international (18th ed.). Virginia, USA: Association of Official and Analytical Chemists International. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.1380>
5. Asgarzadeh, F., Ataee, M., & Chobkar, N. (2020). Comparative comparison of the physicochemical properties of gelatin extracted from the lantern fish *Benthosema pterotum* Alcock, 1890 and bovine gelatin. *Scientific Journal of Iranian Fisheries*, 29(2), 53-63.
6. Boran, G., Mulvaney, S.J., & Regenstein, J.M. (2010). Rheological properties of gelatin from silver carp skin compared to commercially available gelatins from different sources. *Journal of Food Science*, 75(8), E565-E571. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01543.x>
7. Choe, J., & Kim, H.Y. (2018). Effects of chicken feet gelatin extracted at different temperatures and wheat fiber with different particle sizes on the physicochemical properties of gels. *Poultry Science*, 97(3), 1082-1088. <https://doi.org/10.3382/ps/pex381>
8. Cheow, C.S., Norizah, M.S., Kyaw, Z.Y., & Howell, N.K. (2007). Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *Food Chemistry*, 101(1), 386-391 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.046>
9. Du Toit, L., Bothma, C., De Wit, M., & Hugo, A. (2016). Replacement of gelatin with liquid *Opuntia ficus-indica* mucilage in marshmallows. Part1: Physical parameters. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 18, 25-39. <https://doi.org/10.56890/jpacd.v18i.51>
10. Fiyuzi, B., Mazaheri Tehrani, M., & Khazaei, E. (2016). Formulation of dates gel and condensed whey and analysis of its sensory and chemical properties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 12(1), 61-78.
11. Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.A., & Montero, M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
12. Hosseiniparvar, S.H., Keramat, J., & Kadivar, M. (2007). Optimal conditions for extracting edible gelatin from bovine bones by acidic method using response surface regression RSREG. *Soil and Water Sciences (Isfahan University of Technology)*, 11(40), 317-330.
13. Lassoued, I., Jridi, M., Nasri, R., Dammak, A., Hajji, M., Nasri, M., & Barkia, A. (2014). Characteristics and functional properties of gelatin from thornback ray skin obtained by pepsin-aided process in comparison with commercial halal bovine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 41, 309-318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.029>
14. Mardani, M., Yeganehzad, S., & Niazmand, R. (2022). Structure–function relationship of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) root extract–xanthan/guar gum mixture in a high sugar content system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(3), 1056-1065. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11441>
15. Mardani, M., Yeganehzad, S., Ptichkina, N., Kodatsky, Y., Kliukina, O., Nepovinnykh, N., & Naji-Tabasi, S. (2019). Study on foaming, rheological and thermal properties of gelatin-free marshmallow. *Food Hydrocolloids*, 93, 335-341. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.033>
16. Mobini, E., Nateghi, L., & Eshaghi, M.R. (2021). Investigation of the conditions for producing pastilles using gelatin extracted from the fish Kilika and its physicochemical, rheological, and sensory properties compared to commercial gelatin (bovine). *Iranian Journal of Food Science and Technology Research*, 17(5), 831-847. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v18i1.86414>
17. Mojavarian, S.P., Bardani Amiri, P., & Shahiri Tabarestani, M. (2019). Evaluation of sensory parameters of ginger pastille using response surface methods and principal component analysis. *Food Industry Engineering Research*, 18(1), 17-32.
18. Patil, R.D., Mark, J.E., Apostolov, A., Vassileva, E., & Fakirov, S. (2000). Crystallization of water in some crosslinked gelatins. *European Polymer Journal*, 36(5), 1055-1061. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(99\)00144-5](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(99)00144-5)

19. Poppe, J. (1992). Gelatin. In: Imeson, A. (eds) *Thickening and Gelling Agents for Food*. Springer, Boston, MA.
20. Periche, Á., Castelló, M.L., Heredia, A., & Escriche, I. (2016). *Stevia rebaudiana*, Oligofructose and isomaltulose as sugar replacers in Marshmallows: Stability and antioxidant properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(4), 724-732. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12653>
21. Qhairul, N., Mohd, I., Razali, R.S., Ismail, N.K., Ramli, R.A., Rozzamri, A., & Shaarani, S. (2021). Application of green technology in gelatin extraction. *Processes*, 9(12), 1-23. <https://doi.org/10.3390/pr9122227>
22. Rezaeizadeh, A., & Raftani Amiri, Z. (2017). Extraction and properties of chicken foot gelatin and its application in watermelon jelly. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 13(2), 322-332. <https://doi.org/10.22067/iftstr.v1395i0.48995>
23. Sarbon, N.M., Badii, F., & Howell, N.K. (2013). Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.009>
24. Schrieber, R. (2007). *Gelatine handbook: Theory and industrial practice*. John Wiley & Sons.
25. Songchotikunpan, P., Tattiyakul, J., & Supaphol, P. (2008). Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(3), 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.11.005>
26. Shafiur Rahman, M., & Al-Mahrouqi, A.I. (2009). Instrumental texture profile analysis of gelatin gel extracted from grouper skin and commercial (bovine and porcine) gelatin gels. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup7), 229-242. <https://doi.org/10.1080/09637480902984414>
27. Shyni, K., Hema, G.S., Ninan, G., Mathew, S., Joshy, C.G., & Lakshmanan, P.T. (2014). Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Food Hydrocolloids*, 39, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.008>
28. Tan, J.M., & Lim, M.H. (2008). Effects of gelatine type and concentration on the shelf-life stability and quality of marshmallows. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(9), 1699-1704. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01756.x>
29. Santoso, U., Pranoto, Y., Afriyanti, Y.T., & Mulyani, S. (2019). The physical and chemical properties of marshmallow made from Buffalo (*Bubalus bubalis*) hide gelatin compared to commercial gelatin. *Journal of Applied Food Technology*, 6(2).
30. Zhang, T., Xu, J., Zhang, Y., Wang, X., Lorenzo, J.M., & Zhong, J. (2020). Gelatins as emulsifiers for oil-in-water emulsions: Extraction, chemical composition, molecular structure, and molecular modification. *Trends in Food Science & Technology*, 106, 113-131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.005>

Evaluation of the Prebiotic Properties of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* Polysaccharides in Enhancing Dairy Yeast and Bacterial Isolates

M. Larypoor¹, N. Jameyi¹, H. Dadgostar¹, J. Nowroozi¹

1- Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
(* - Corresponding Author Email: m.larypoor@iau.ir)

Received: 07.06.2025
Revised: 01.07.2025
Accepted: 19.07.2025
Available Online: 18.08.2025

How to cite this article:

Larypoor, M., Jameyi, N., Dadgostar, H., & Nowroozi, J. (2025). Evaluation of the prebiotic properties of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* polysaccharides in enhancing dairy yeast and bacterial isolates. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(4), 431-450. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.93907.1443>

Introduction

Probiotics are live, beneficial microorganisms that, when administered in adequate amounts, provide significant health benefits to the host. They play a vital role in maintaining and restoring gastrointestinal microbiota balance, improving digestion, modulating the immune system, and protecting against pathogenic bacteria. Prebiotics are non-digestible food components—typically fibers or complex carbohydrates—that selectively stimulate the growth and activity of beneficial gut microorganisms. By fostering a favorable environment for probiotics, prebiotics indirectly promote host health.

Recently, the search for natural and cost-effective prebiotic sources has intensified. Medicinal mushrooms, particularly *Ganoderma lucidum* (reishi) and *Lentinula edodes* (shiitake), have emerged as promising candidates due to their abundance of bioactive polysaccharides. These polysaccharides not only exhibit prebiotic potential but also possess antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory properties.

This study aimed to investigate the prebiotic properties of polysaccharides extracted from *G. lucidum* and *L. edodes*. Specifically, we evaluated their ability to stimulate the growth and metabolic activity of probiotic yeast and bacterial isolates obtained from traditional and industrial dairy products. These natural polysaccharides may contribute to the development of novel synbiotic products with enhanced health benefits.

Materials and Methods

Twenty dairy product samples were collected and subjected to microbial isolation to obtain yeast and bacterial strains with probiotic potential. Isolates were identified using morphological, biochemical, and molecular techniques, including PCR and sequencing.

Polysaccharides were extracted from the mycelium of *G. lucidum* and *L. edodes* via lyophilization and aqueous extraction. Carbohydrate content was determined using the phenol-sulfuric acid assay, while antioxidant capacity was assessed using the DPPH free radical scavenging method. FT-IR spectroscopy was employed to characterize chemical structures.

The prebiotic effects of the mushroom polysaccharides were evaluated by supplementing sugar-free culture media with these extracts. Growth and metabolic activity of selected probiotic isolates were compared to the controls supplemented with glucose and inulin. Enzymatic and acid digestion assays were also performed to assess the stability of the polysaccharides under simulated gastrointestinal conditions.

Results and Discussion

Multiple yeast and bacterial isolates were obtained from the dairy samples. Following biochemical screening, four isolates—A3, A10, B1, and B3—were selected for detailed analysis based on their probiotic potential. Antibiogram testing revealed varied resistance and sensitivity profiles.

Molecular identification showed that isolate A10 was closely related to *Candida tropicalis*, while A3 matched



Saccharomyces cerevisiae. Among the bacterial isolates, B1 was identified as *Lactobacillus casei* and B3 as *Lactobacillus acidophilus*.

Polysaccharides extracted from *G. lucidum* and *L. edodes* exhibited lower reducing sugar content compared to inulin, indicating a more complex carbohydrate structure and greater resistance to enzymatic breakdown. Antioxidant assay demonstrated that, while inulin had the highest free radical scavenging activity, the mushroom polysaccharides also showed significant antioxidant properties.

FT-IR spectra confirmed the presence of characteristic polysaccharide functional groups, such as hydroxyl, carboxyl, and glycosidic linkages, consistent with previous findings on medicinal mushroom polysaccharides.

When added to sugar-free media, polysaccharides from both mushrooms stimulated the growth of probiotic isolates, though to a lesser extent than glucose and inulin. This suggests that while these fungal polysaccharides act as prebiotics, their fermentability and utilization by probiotics may differ from conventional prebiotics.

Optimal growth conditions for the probiotic isolates were observed at pH 5 and 37°C. The ability of these isolates to thrive under such conditions, along with their positive response to mushroom polysaccharides, underscores the potential of these compounds as functional prebiotic ingredients.

This study highlights the promising prebiotic and antioxidant properties of polysaccharides extracted from *G. lucidum* and *L. edodes*. These natural compounds supported the growth of beneficial probiotic yeasts and bacteria isolated from dairy products, suggesting their potential as synbiotic supplements.

Conclusion

Incorporating mushroom-derived polysaccharides into functional foods and dietary supplements could enhance gastrointestinal microbiota balance and promote overall health. However, further research involving in vivo animal models and human clinical trials is necessary to fully validate the health benefits and safety of these polysaccharides. Such studies will help clarify their mechanisms of action, determine optimal dosages, and assess long-term effects, paving the way for their application in health-promoting dietary and medicinal products.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, Prebiotic, Probiotic, Polysaccharide

ارزیابی خواص پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم و لنتینولا ادودس در تقویت جدایه‌های مخمری و باکتریایی لبنی

محدثه لاری پور^{۱*} - ندا جامعی^۱ - حورا دادگستر^۱ - جمیله نوروزی^۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۸

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زا و مفیدی هستند که به سلامت بدن، بالاخص سلامت دستگاه گوارش و بهبود عملکرد سیستم ایمنی کمک می‌کنند. پری‌بیوتیک‌ها فعالیت جمعیت خاصی از پروبیوتیک‌ها در روده بزرگ را تحریک می‌کنند که به تولید متابولیت‌هایی مانند اسیدهای چرب کوتاه زنجیره منجر می‌گردد. استفاده از منابع پری‌بیوتیکی طبیعی ارزان قیمت، از جمله قارچ‌های دارویی می‌تواند در کیفیت زندگی مؤثر باشد. در این مطالعه ۲۰ نمونه مختلف لبنیات سنتی و کارخانه‌ای تهیه و آزمایشات مورفولوژی، بیوشیمیایی، پروبیوتیکی و مولکولی بر روی آن‌ها انجام گردید. پلی‌ساکاریدهای لنتینولا ادودس و گانودرما لوسیدوم با لیوفیلیزاسیون میسلیم استخراج و خواص و ویژگی‌های آن‌ها با تست‌های فنل-سولفوریک اسید، دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرسرخ بررسی گردید. سپس پلی‌ساکاریدهای استخراج شده به محیط‌کشت بدون قند اضافه و اثرات آن‌ها بر جدایه‌ها بررسی گردید. بر اساس الگوهای فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی، ۴ جدایه باکتریایی و مخمری با توان پروبیوتیکی با درصد تشابه حدود ۹۹/۶٪، جدایه A10 به‌عنوان *کاندیدا تروپیکالیس* سویه ۱۶۹۱، جدایه A3 به‌عنوان *ساکارومایسس سرویزیه*، جدایه B1 به‌عنوان *لاکتوباسیلوس کارژی* سویه ۱۱۹۷، جدایه B3 به‌عنوان *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* شناسایی شدند. پلی‌ساکاریدهای جدا شده ویژگی‌های مطلوبی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تجزیه‌پذیری اسیدی و آنزیمی و توانایی پری‌بیوتیک قابل مقایسه یا حتی بهتر از اینولین را نشان دادند. بر اساس نتایج این مطالعه، پلی‌ساکاریدهای جدا شده به‌طور هم‌زمان می‌توانند گزینه مناسبی برای بهبود عملکرد میکروبیوتای دستگاه گوارش و اثرات سلامتی‌بخش باشند. این امر نیاز به مطالعات بیشتر در مدل‌های حیوانی و انسانی دارد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، پلی‌ساکارید، گانودرما لوسیدوم، لنتینولا ادودس

مقدمه

سرطان، سندرم روده تحریک‌پذیر^۴، آرتریت روماتوئید، آکنه، زخم معده، چاقی و فشار خون بالا شود (Appanna & Appanna, 2018). از این رو توسعه و تعدیل میکروبیوتای دستگاه گوارش با استفاده از عوامل مؤثری از جمله مواد غذایی تخمیری و فراسودمند و مکمل‌های پروبیوتیکی و پری‌بیوتیکی مورد توجه قرار گرفته‌است (Holscher, 2017; Umu et al., 2017). جمعیت میکروارگانیسم‌ها در حفظ تعادل

میکروبیوتای^۲ دستگاه گوارش مجموعه‌های پیچیده و پویا از میکروارگانیسم‌ها است که با ارائه عملکردهای متابولیکی، ایمنی‌شناسی و حفاظتی متنوع، نقش اساسی در حفظ سلامت انسان ایفا می‌کند (Holscher, 2017; Umu, Rudi, & Diep, 2017). اختلال در تعادل جمعیت میکروبی میکروبیوتای و روابط آن‌ها به‌عنوان دیس‌بیوز^۳ نامیده می‌شود، این وضعیت می‌تواند منجر به ایجاد بیماری‌هایی مانند

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
(*) نویسنده مسئول: (Email: m.larypoor@iau.ir)

نیستند، این ترکیبات پایدار باقی‌مانده و به‌عنوان ترکیبات غیر قابل هضم و ارزان قیمت، می‌توانند کاندید مناسبی برای منابع پری‌بیوتیکی باشند (Chou, Sheih, & Fang, 2013; Synytsya et al., 2009). از جمله خواص مورد بررسی برای منابع پری‌بیوتیکی، بررسی تأثیر این منابع بر پروبیوتیک‌های کلیدی بیفیدوباکترها^۲ و لاکتوباسیلوس‌ها^۳ می‌باشد (Manzanares, Lemieux, Langlois, & Wischmeyer, 2016; Pandey, Naik, & Vakil, 2015). به محصولات تهیه شده از پروبیوتیک و پری‌بیوتیک، سین‌بیوتیک^۴ گفته می‌شود (Synytsya et al., 2009). افزودن پری‌بیوتیک به محصولات پروبیوتیکی موجب افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها شده و ماندگاری محصولات را نیز افزایش می‌دهد، در همین راستا استفاده از فرآورده‌های سین‌بیوتک مورد توجه قرار گرفته‌است (Astashkina et al., 2014). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که پلی‌ساکاریدهای قارچی مستخرج از قارچ‌هایی مانند *لنتینولا ادودس*^۵، *گانودرما لوسیدوم*^۶، *پلوروتوس*^۷، *ترملا فوسیفورمیس*^۸ و *آگاریکوس بیسپوروس*^۹ می‌توانند فعالیت پری‌بیوتیکی داشته‌باشند (Giavasis, 2014; Synytsya et al., 2009).

لنتینولا ادودس

لنتینولا ادودس که تحت عنوان شیتاکه نیز شناخته می‌شود، اولین ماکروقارچ دارویی است که به عرصه بیوتکنولوژی نوین وارد شده‌است و دومین قارچ خوراکی محبوب با محتوای بالایی از ترکیبات زیست‌فعال از جمله پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌باشد (Bisen, Baghel, Sanodiya, Thakur, & Prasad, 2010; Raghukumar, 2008). به همین دلیل یکی از با ارزش‌ترین قارچ‌های دارویی است. از جمله ترکیبات پلی‌ساکاریدی زیست‌فعال این قارچ می‌توان به لنتینان اشاره نمود که دارای خواص ضد توموری، ضد ویروسی و ضد میکروبی می‌باشد (Hearst et al., 2009; Lindequist, 2024). همچنین *لنتینولا ادودس* در بیماری‌های مرتبط با ضعف در سیستم ایمنی کاربرد داشته و خواص تعدیل‌کنندگی بر سیستم ایمنی دارد، از این‌رو ترکیبات مختلف این قارچ در مطالعات گسترده‌ای مورد بررسی قرار می‌گیرد (Bisen et al., 2010; Lindequist, 2024). پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از *لنتینولا ادودس* اثرات تعدیل‌کننده سیستم ایمنی و توانایی تغییر مفید ترکیب میکروبیوتای روده را نشان داده‌اند. آن‌ها با افزایش تولید سیتوکین و بازیابی نسبی پروفایل‌های میکروبیوتای

میکروبیوتا نقش بسزایی دارند از این رو پروبیوتیک‌ها^۱ به‌عنوان میکروارگانیزم‌های زنده‌ای که اگر به تعداد کافی مورد استفاده قرار بگیرند، اثرات سلامت‌بخش در میزبان از خود بروز می‌دهند، نقش کلیدی در بسیاری از مطالعات دارند (Astashkina, Khudyakova, & Kolbysheva, 2014). از طرفی دیگر میکروبیوتای دستگاه گوارش همواره در حال رشد بوده و تحت تأثیر عوامل مختلف ژنتیکی، فیزیولوژیکی و محیطی قرار دارد (Holscher, 2017; Umu et al., 2017). رژیم غذایی به‌عنوان یک عامل محیطی کلیدی مؤثر بر میکروبیوتای دستگاه گوارش، شناخته می‌شود، چراکه تأمین مواد مغذی و انرژی از جمله اقدامات همزیستی بین میکروارگانیزم‌ها و میزبان می‌باشد (Holscher, 2017; Umu et al., 2017). در واقع، مصرف مواد غذایی خاص می‌تواند راهی برای تعدیل میکروبیوتا و حفظ جمعیت پروبیوتیک‌ها باشد (Holscher, 2017). پری‌بیوتیک یک ماده تخمیری انتخابی است که از طریق ایجاد تغییراتی بر میکروبیوتای دستگاه گوارش اثرات مفیدی در حفظ سلامتی میزبان از جمله تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، کاهش کلون‌زایی پاتوژن‌ها، تحریک سیستم ایمنی، افزایش جذب مینرال‌ها، کاهش ریسک سرطان روده، عوامل مرتبط با چاقی و سندروم متابولیک و بهبود حساسیت به انسولین را دارد (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, & Bressollier, 2013; Synytsya et al., 2009). انواع مختلفی از پری‌بیوتیک‌ها شناسایی شده‌اند از آن‌ها می‌توان به اینولین، صمغ‌های فیبری، رافینولین، پیرو دکسترین، زایلان، استاکیوز، مالتودکسترین، لاکتیلول، گزیلواولیگوساکارید، لاکتوسوکروز، رافینوز، لاکتولوز و فروکتوالیگوساکارید اشاره نمود (Synytsya et al., 2009). پیشرفت‌های اخیر در این حوزه، توجه دانشمندان را به بررسی منابع جدید پری‌بیوتیکی جلب نموده‌است، قارچ‌ها از دیرباز به لحاظ خواص دارویی در کشورهای شرق آسیا مورد توجه قرار داشته‌اند. مطالعات گسترده‌ای خواص دارویی قارچ‌های ماکروسکوپی را بررسی و اثبات نموده‌اند (Gao, Zhou, Chen, Dai, & Ye, 2002; Moradali et al., 2007). قارچ‌ها به دلیل داشتن کربوهیدرات‌هایی نظیر کیتین، همی سلولز، ماناز، زیلان و گالاکتان بهترین کاندید به‌عنوان منبع پری‌بیوتیکی می‌باشند. پلی‌ساکاریدهای قارچ‌ها از ترکیبات شیمیایی متفاوتی تشکیل شده‌اند، اکثر پلی‌ساکاریدهای قارچ‌ها به‌صورت گلوکان‌های خطی و زنجیره‌دار با پیوندهای بتاگلیکوزیدی مختلفی می‌باشند. از آن جایی که آنزیم‌های گوارشی قادر به تجزیه پیوندهای بتاگلوکوزیدی

6- *Ganoderma lucidum*
7- *Pleurotus*
8- *Tremella fusiformis*
9- *Agaricus bisporus*

1- Probiotic
2- Bifidobacteria
3- Lactobacillus
4- Synbiotic
5- *Lentinula edodes*

پگاه، پاژن و هراز) در ظروف استریل جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. سوسپانسیون اولیه بر اساس نوع فرآورده در محلول رقیق کننده (رینگر) تهیه شد. از نمونه‌ها رقت‌های سریالی تا رقت ۰/۰۰۱ تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های لینی رقیق شده با رقت ۰/۰۰۱ به منظور جداسازی مخمر بر روی محیط مخمر گلوکز کلرامفنیکل آگار^۲ به صورت چمنی کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت حداقل ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. همچنین به منظور جداسازی باکتری ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های لینی رقیق شده با رقت ۰/۰۰۱ بر روی محیط کشت MRS آگار، برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک به‌ویژه لاکتوباسیلوس‌ها، کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در جار بی‌هوازی نگهداری شدند (Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer, & Stackebrandt, 2006).

شناسایی مورفولوژی جدایه‌ها و تهیه کشت خالص

بررسی کلنی‌ها بر اساس رنگ، اندازه و مورفولوژی انجام گردید. سپس برای تشخیص اولیه جدایه‌های مخمری از رنگ‌آمیزی با لاکتوفل کاتن بلو^۳ و برای بررسی جدایه‌های باکتریایی از رنگ‌آمیزی گرم استفاده گردید. سپس کشت خالص از جدایه‌ها تهیه و نگهداری گردید (Madigan, Bender, Buckley, Sattley, & Stahl, 2018).

تست تخمیر قند و جذب ازت جدایه‌ها

جدایه‌ها به منظور بررسی تخمیر قند و جذب ازت به ترتیب بر روی محیط حاوی قند و محیط حاوی نیترات کشت داده شدند. محیط تخمیر قند از قندهای گلوکز، ساکارز، مالتوز، مانیتول، سوربیتول و آرابینوز و معرف فنل رد با pH حدود ۷ تهیه شد. جدایه‌های باکتریایی و مخمری پس از کشت به مدت ۴۸ ساعت به ترتیب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از دوره انکوباسیون مشاهده‌ی تغییر رنگ محیط، ثبت گردید (Cappuccino & Sherman, 2013).

تست تولید آسکواسپور و اوره آز برای جدایه‌های

مخمیری

به منظور بررسی تولید آسکواسپور و اوره آز در جدایه‌های مخمری، به ترتیب از رنگ آمیزی با رنگ مالاشیت گرین^۴ با استفاده از حرارت و کشت در محیط اوره و انکوباسیون به مدت ۴ ساعت، استفاده گردید (Madigan et al., 2018).

جوانی، رشد میکروبه‌های مفید را افزایش داده و پاسخ‌های ایمنی را، به‌ویژه در مدل‌های پیری، بهبود می‌بخشند (Xu, Yang, Ning, & Zhang, 2015; Yin et al., 2023).

گانودرما لوسیدوم

گانودرما لوسیدوم که تحت عنوان ری‌شی نیز شناخته می‌شود، به جهت دارا بودن خواص دارویی مختلف از جمله کاهش فشار و قند خون، تقویت سیستم ایمنی، خواص ضد میکروبی و ضد سرطانی از شاخص‌ترین قارچ‌های دارویی به شمار می‌آید (Chen & Zhang, 2025; Moradali et al., 2007). از مهم‌ترین مواد فعال بیولوژیک موجود در گانودرما لوسیدوم می‌توان به تری‌ترپنوئیدها، پلی‌ساکاریدها، استرول‌ها، استروئیدها و پروتئین‌ها اشاره نمود (Gao et al., 2002; Moradali et al., 2007). خواص دارویی متعددی به پلی‌ساکاریدهای مستخرج از این قارچ اطلاق می‌شود. α/β گلوکان، گلیکوپروتئین‌ها و هتروپلی‌ساکاریدها مهم‌ترین پلی‌ساکاریدهای شناسایی شده از این قارچ می‌باشند (Rousta et al., 2024; Synytsya et al., 2009). در بررسی‌های گوناگونی نشان داده شده است که این پلی‌ساکاریدها تکثیر باکتری‌های تولیدکننده اسید چرب با زنجیره کوتاه^۱ (SCFA) را افزایش می‌دهند، عملکرد سد روده را بهبود می‌بخشند و التهاب را کاهش می‌دهند و در نتیجه به بهبود سلامت متابولیک و تنظیم ایمنی کمک می‌کنند (Delzenne & Bindels, 2015; Zheng et al., 2024).

با توجه به افزایش غذاهای فراسودمند مشتق شده از قارچ‌های دارویی، زمینه تحقیقاتی مهمی در علوم مواد غذایی و داروسازی فراهم آمده است (Rousta et al., 2024; Synytsya et al., 2009). به همین منظور این مطالعه با هدف بررسی خواص پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای قارچ‌های خوراکی-دارویی به‌عنوان منبعی طبیعی بر جدایه‌های بومی با خواص پروبیوتیکی و ارائه یک مکمل غذایی پری‌بیوتیکی مؤثر در بهبود عملکرد میکروبیوتا و به منظور ارتقا سلامتی انجام شده است. در این مطالعه خواص پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم و لنتینولا اودوس بر روی رشد پروبیوتیک‌های جدا شده از محصولات لینی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌ها از محصولات لینی

۲۰ نمونه از فرآورده‌های لینی سنتی (شامل ۴ نمونه شیر، ۲ نمونه دوغ و ۴ نمونه ماست از فروشگاه‌های مربوطه در شهر تهران) و کارخانه‌ای (شامل ۳ نمونه شیر، ۳ نمونه دوغ و ۴ نمونه ماست از برند

3- Lactophenol cotton blue
4- Malachite green

1- Short-chain fatty acids
2- Yeast Glucose Chloramphenicol Agar (YGC)

تست کاتالاز و اکسیداز برای جدایه‌های باکتریایی

به‌منظور تست کاتالاز از مجاورت باکتری با آب اکسیژنه ۳ درصد و به‌منظور تست اکسیداز از مجاورت باکتری با کاغذ صافی آغشته به معرف تترامیلین پارافینیلین دی آمین دی هیدروکلراید^۱ استفاده و به ترتیب تولید حباب و تغییر رنگ بررسی و ثبت گردید (Zhao *et al.*, 2024).

تعیین خواص پروبیوتیکی جدایه‌ها

بررسی رشد در دماهای مختلف

به‌منظور بررسی مقاومت جدایه‌ها در برابر دما، کشت تازه‌ای از جدایه‌ها با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه و در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. سپس در فواصل زمانی ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان جذب در طول موج ۶۲۵ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانش گردید (Fontana, Bermudez-Brito, Plaza-Diaz, Munoz-Quezada, & Gil, 2013; Gomes & Malcata, 1999).

بررسی مقاومت به شرایط اسیدی و قلیایی

به‌منظور بررسی مقاومت جدایه‌ها در برابر شرایط اسیدی و قلیایی، به‌ترتیب pH محیط کشت با استفاده از هیدروکلریک اسید ۱ نرمال و سدیم هیدروکسید، در pH های ۱/۵، ۲، ۳ و ۵ تنظیم گردید. کشت تازه‌ای از جدایه‌ها در محیط کشت‌ها تهیه و گرماگذاری گردید. سپس در فواصل زمانی ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان جذب در طول موج ۶۲۵ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانش گردید (Cook & Gilbert, 1969; Zhao *et al.*, 2024).

بررسی مقاومت به نمک‌های صفراوی

به‌منظور بررسی مقاومت جدایه‌ها به نمک‌های صفراوی، محیط کشت‌های پایه مورد استفاده حاوی ۰/۳ درصد نمک‌های صفراوی (سدیم کولات و سدیم دزوکسیکولات) تهیه گردید (Gao *et al.*, 2002). کشت تازه‌ای از جدایه‌ها در محیط کشت‌ها تهیه و گرماگذاری گردید. سپس در فواصل زمانی ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان جذب در طول موج ۶۲۵ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانش گردید (Cook & Gilbert, 1969).

تست آنتی‌بیوگرام

به‌منظور انجام این تست ابتدا، سوسپانسیون استاندارد با کدورت معادل نیم مک فارلند از کشت تازه جدایه‌ها در آب مقطر استریل تهیه و میزان جذب در طول موج ۶۲۵ nm خوانش گردید. کشت چمنی از سوسپانسیون جدایه‌های مخمری بر روی محیط YGC تهیه و دیسک گذاری سه دیسک ضد قارچ فلوکونازول^۲، کتوکونازول^۳ و آمفوتریبسین^۴ انجام گردید. همچنین کشت چمنی از سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی بر روی محیط MRS آگار تهیه و دیسک گذاری با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین^۵، کلیندامایسین^۶، جنتامایسین^۷، سفتازیدیم^۸، کلرامفنیکل^۹، استرپتومایسین^{۱۰} و ونکومایسین^{۱۱} و لووفلوکسازین^{۱۲} انجام گردید. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و ثبت گردید (Mohanty & Ray, 2016; Wayne, 2010).

شناسایی مولکولی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای

پلیمرز (PCR)^{۱۳}

به‌منظور شناسایی مولکولی جدایه‌های دارای توان پروبیوتیکی، DNA جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت زیست فناوری پیشگام، ایران) استخراج گردید، سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی برای توالی 16S rRNA برای جدایه‌های باکتریایی به‌صورت ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. همچنین واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 برای توالی ITS برای جدایه‌های مخمری، به‌صورت ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۷ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. توالی‌یابی نمونه‌ها به روش سنجر توسط شرکت Bioneer، کره انجام گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده‌است. (Diosma, Romanin, Rey-Burusco, Londero, & Garrote, 2014; Zhao *et al.*, 2024).

- 7- Gentamicin
- 8- Ceftazidime
- 9- Chloramphenicol
- 10- Streptomycin
- 11- Vancomycin
- 12- Levofloxacin
- 13- Polymerase Chain Reaction (PCR)

- 1- N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)
- 2- Fluconazole
- 3- Ketoconazole
- 4- Amphotrypsin B
- 5- Tetracycline
- 6- Clindamycin

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از PCR
Table 1- Sequences of primers used in molecular identification of isolates using PCR

توالی Sequence	نام / نوع پرایمر Primer name/type	توالی پرایمر Primer sequence
ITS	ITS1 پیشرو Forward	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS4 پسرو Reverse	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
16 S rRNA	پیشرو Forward	5'-AGAGTTTGATCCATGGCTCAG-3'
	پسرو Reverse	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

مربع تقسیم و خشک گردید. در نهایت اختلاف وزن خیس و خشک و میزان بازده حاصل شد (Zhao, Dong, Chen, & Hu, 2010).

استخراج و خالص‌سازی پلی ساکارید از لنتینولا اودوس

و گانودرما لوسیدوم

به منظور استخراج پلی ساکارید، مقدار ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌ها به صورت مجزا توسط ۱ لیتر آب مقطر دیونیزه به مدت ۱۷۰ دقیقه با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد با استفاده از بن ماری تیمار گردید، در ادامه نیز به وسیله سانتریفیوژ (۲۵۰۰ دور در ۱۰ دقیقه) سوپرناتانت جداسازی شده و به وسیله دستگاه تبخیر کننده دوار به ۳۰ درصد حجم اولیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد تغلیظ یافت و مایع تغلیظ شده با یک حجم از معرف Sevag (کلروفرم: ۱ - بوتانول با نسبت، ۵ به ۱) به منظور حذف پروتئین‌ها تیمار گردید و بعد از هم‌زدن به وسیله سانتریفیوژ ۲۵۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. لایه پایینی حاوی پلی ساکارید استخراج شده پروتئین زدایی شده با سه حجم از اتانول خالص دیالیز و به شدت هم‌زده و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد و پلی ساکارید خام به وسیله سانتریفیوژ با تعداد دور ۲۵۰۰ دور در ۱۵ دقیقه به دست آمد و به منظور خالص شدن بیشتر لیوفیلیزه گردید (Ren, Xu, Lu, & Yin, 2018). جهت خالص‌سازی بیشتر پلی ساکارید استخراج شده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینواتیل سفادکس A-25 استفاده گردید. جهت پک نمودن این ستون، ابتدا مقدار ۵ گرم از پودر خشک وزن شده و داخل بافر اتصال دهنده به منظور افزایش حجم مدت یک شبانه روز قرار داده شد با سپری شدن این مدت به آرامی به نحوی که در ستون حباب هوا ایجاد نشود به داخل ستون متصل شده به گیره نگهدارنده، هدایت گردید و بعد از قرارگیری درست، شستشو نمونه با حدود ۳ الی ۴ برابر حجم ستون با

تهیه و کشت قارچ

قارچ‌های لنتینولا اودوس و گانودرما لوسیدوم به شرکت قارچ ایران زمین تهیه شد. سپس میسلیوم هر دو قارچ در محیط جامد، PDA کشت داده شد تا کشت انبوهی از هر دو قارچ در اختیار باشد. سپس میسلیوم قارچ لنتینولا اودوس و گانودرما لوسیدوم در دو محیط کشت مایع، PDB و محیط ترکیبی تلقیح شده و به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه انکوبه گردید (محیط ترکیبی شامل ۳۰ گرم در لیتر گلوکز، ۲ گرم در لیتر پپتون، ۳ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۵ گرم در لیتر $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۵ گرم در لیتر KH_2PO_4 ، ۱ گرم در لیتر MgSO_4 و به مقدار ۰/۰۰۲ گرم در لیتر ویتامین B1). سپس بیومس و تراکم میسلیوم قارچ مورد بررسی قرار گرفت (Stamets, 2011; Zarmi et al., 2022).

لیوفیلزاسیون میسلیوم و جسم بارده^۱ قارچ

به منظور خشک نمودن میسلیوم و جسم بارده قارچ از تکنیک لیوفیلزاسیون و با استفاده از دستگاه فریزدرایر^۲ آزمایشگاهی (Telstar Lyo Quest، اسپانیا) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا میسلیوم کشت داده شده سه مرتبه با آب مقطر با هدف خارج شدن محیط کشت شستشو شده و قبل از خشک شدن توزین و وزن آن ثبت گردید، سپس میسلیوم بعد از فریز کردن در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، آماده انجام فرآیند می‌گردد. فرآیند لیوفیلزاسیون به مدت ۲۴ ساعت در فشار ۶۵ بار در دمای ۶۰- درجه سانتی گراد و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انجام گرفت. سپس به منظور حذف ضایعات شستشو، به وسیله مقداری اتانول ۷۰ درصد در سطح استریل و به ابعاد ۱×۱ سانتی متر

دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، سود (NaOH) و آنزیم پانکراتین (Pancreatin, Sigma-Aldrich, P1750) با pH برابر ۷/۴ تهیه شد. همچنین برای شبیه‌سازی ترکیبی شیره معده و روده، دو محلول فوق به نسبت ۳۹:۶۱ با pH برابر ۴/۵ ترکیب شدند. پلی‌ساکارید استخراج شده و اینولین به ترکیبات فوق اضافه شده و در انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرماگذاری گردید، سپس سانتریفوژ شده و از بافر رویی برای اندازه‌گیری قند آزاد نمونه برداری شد. از روش دی‌نیترو سالیسیلیک اسید (DNS)^۲ برای اندازه‌گیری قند آزاد استفاده شد. درصد هیدرولیز بر اساس میزان قند آزاد شده نسبت به قند کل گزارش شد (Fan, Mazza, & Liao, 2010; Jain, Jain, Gupta, & Ahirwar, 2007).

بررسی خصوصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج شده

به این منظور، ۰/۲ گرم از پلی‌ساکارید با ۵ میلی‌لیتر متانول مخلوط و توسط انکوباتور شیکردار به مدت ۳ ساعت مخلوط گردید. سپس در ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی مورد استفاده قرار گرفت. از محلول ۱۰۰۰ میکرومولار اسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای بررسی اثر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج شده محدوده غلظتی ۰/۰۵-۰/۰۴ g/mL نمونه تهیه گردید و سپس عملیات هم‌زدن و سانتریفوژ کردن انجام گردید. برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)^۳ استفاده شد، سپس جذب در ۵۱۷ nm خوانش و با استفاده از فرمول زیر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی محاسبه گردید (Fan et al., 2010).

$$\text{Scavenging activity\%} = \frac{(\text{Abs} [\text{blank}] - \text{Abs} [\text{sample}])}{\text{Abs} [\text{blank}]} \times 100$$

Absblank: جذب محلول متانولی DPPH بدون نمونه پلی

ساکاریدی

Abs sample: جذب محلول متانولی DPPH با نمونه پلی

ساکاریدی

بررسی تأثیر پلی‌ساکارید استخراج شده بر رشد

باکتری پروبیوتیک

باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان باکتری شاخص انتخاب شد. از محیط MRS بدون قند حاوی ۲ درصد (w/v) پلی‌ساکارید استخراج شده، محیط حاوی ۲ درصد گلوکز و محیط حاوی ۲

لودینگ بافر فسفات سالین با pH حدود ۴/۵، انجام گرفت. سپس نمونه استخراج شده به منظور خالص‌سازی در داخل این ستون با ابعاد ۵/۱ × ۱۰ سانتی متر اعمال شد. به این صورت که ستون با یک شیب خطی از محلول ۱۰ × ۰/۲ مولار NaCl با جریانی با سرعت ۰/۴۴ میلی‌لیتر در دقیقه شسته و فراکشن‌های خروجی با میکروتیوپ به مقدار ۲ میلی‌لیتر در هر یک جمع‌آوری و به منظور تعیین غلظت مورد بررسی واقع گردید. سپس میزان بازیابی پلی‌ساکاریدها با وزن نمودن محصول نهایی و مقایسه با وزن اولیه محاسبه گردید (Nielsen, 2009).

اندازه‌گیری غلظت کلی پلی‌ساکارید استخراج شده

به منظور تعیین غلظت پلی‌ساکارید استخراجی از روش فنول - سولفوریک اسید استفاده گردید. ۵۰ میکرولیتر از نمونه به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهکی منتقل شده و به سرعت مقدار ۱۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک غلیظ به هر یک از چاهک‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه توسط شیکر، مخلوط گردید. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از فنول ۵ درصد در آب اضافه و ۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و بعد از کمی خنک شدن مجدداً در یک حمام آب دیگر معادل با دمای محیط ۵ دقیقه قرار گرفت و میزان جذب ماورابنفش نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ nm توسط دستگاه الایزایدر خوانش گردید (Masuko et al., 2005).

شناسایی خصوصیات ساختاری پلی‌ساکارید استخراج شده با روش تبدیل فوریه مادون قرمز^۱

شناسایی ساختار پلی‌ساکارید استخراج شده با استفاده از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) با استفاده از دستگاه اسپکترومتر مجهز به سیستم ATR انجام گردید (Norajit, Kim, & Ryu, 2010).

بررسی پلی‌ساکارید استخراج شده از نظر هضم اسیدی

و آنزیمی

برای بررسی مقاومت به هضم اسیدی و آنزیمی پلی‌ساکارید استخراج شده، از شبیه‌سازی شیره‌های گوارشی استفاده گردید. از ترکیب اینولین تجاری به عنوان پری‌بیوتیک شاخص برای مقایسه استفاده گردید. جهت شبیه‌سازی شرایط معده، محلول شیره معده شامل کلرید سدیم (NaCl)، اسید کلریدریک (HCl) و آنزیم پیپسین (Pepsin, Sigma-Aldrich, P6887) با pH برابر ۰/۲ ± ۰/۵ تهیه گردید. برای شبیه‌سازی شرایط روده، محلول شیره روده شامل پتاسیم

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

1- Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

2- 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

نمونه استاندارد مخمر، جدایه A10 و جدایه A3 در pH~5، دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد و سازگاری بهتری داشتند. همچنین توانایی رشد در حضور نمک‌های صفاوی را دارند، اما رشد آن‌ها کاهش یافت. همچنین در pH حدود ۳ ابتدا رشد خوبی داشته اما بعد از گذشت حدود ۶ ساعت رشد کاهش یافت. جدایه A3 در pH حدود ۲ نسبت به سویه استاندارد نسبتاً رشد بهتری داشت. نتایج بررسی مقاومت نمونه‌های مخمری به حرارت، pH اسیدی و نمک صفاوی در شکل ۱ نشان داده شده است. نمونه استاندارد باکتریایی، جدایه B1 و جدایه B3 در pH حدود ۵، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بهترین سازگاری را داشتند. همچنین توانایی رشد در حضور نمک‌های صفاوی را دارند، اما رشد آن‌ها کاهش یافت. در مجموع جدایه‌های مخمری و باکتریایی در همه pH های مورد بررسی رشد داشتند. اکثر جدایه‌ها بهترین رشد را در pH حدود ۵ داشتند. جدایه‌های مخمری در pH حدود ۳ نسبت به جدایه‌های باکتریایی رشد بهتری داشتند. جدایه‌های مخمری در دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد و سازگاری بهتری نسبت به دمای ۴۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد داشتند. جدایه‌های باکتریایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بهترین سازگاری را داشتند. نتایج مربوط به رشد در حضور نمک صفاوی نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد نظر توانایی رشد داشته، اما رشد آن‌ها نسبت به کنترل کاهش داشته است. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل (n=3) انجام شده و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار در شکل ۲ نشان داده شده است.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از PCR انجام گردید. تصاویر ژل داگ حاصل از PCR جدایه‌های مخمری و باکتریایی به ترتیب در شکل a^۳ و b^۳ آورده شده است. نتایج بلاست توالی در پایگاه داده NCBI نشان داد که با درصد تشابه حدود ۹۹/۶ درصد، جدایه A10 به عنوان *کاندیدا تروپیکالیس* سویه ۱۶۹۱، جدایه A3 به عنوان *ساکارومایسس سرویزیه* ۲۴، نمونه استاندارد مخمر به عنوان *ساکارومایسس سرویزیه*، جدایه B1 به عنوان *لاکتوباسیلوس کازئی* سویه ۲۱۹۷، جدایه B3 به عنوان *لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس* ۴ و نمونه استاندارد باکتری به عنوان *لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس* سویه JCM 1132^۵ شناسایی شدند. نتایج توالی یابی در جدول ۴ بیان شده است. همچنین درخت فیلوژنی با استفاده از روش Maximum Likelihood با نرم‌افزار مگا ۷ رسم گردید که در شکل c^۳ و d^۳ نشان داده شده است.

درصد اینولین استفاده گردید. سوسپانسیون باکتری *لاکتوباسیلوس*، جدایه‌های باکتریایی و جدایه‌های مخمری با غلظت معادل نیم مک فارلند به نسبت ۲ درصد (v/v) به محیط‌های مذکور اضافه گردید. از نمونه‌های کشت داده شده در فواصل زمانی ۲، ۴، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه‌برداری شده و میزان جذب در طول موج ۶۲۰nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانش گردید (Gomes & Malcata, 1999).

آنالیز آماری

دسته‌بندی نتایج و رسم نمودارها یا استفاده از برنامه اکسل ۲۰۱۶ و آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۵ انجام گردید.

نتایج و بحث

جداسازی جدایه‌ها و بررسی خصوصیات مورفولوژی

از ۲۰ نمونه لبنی اولیه، پس از شناسایی اولیه مورفولوژی، ۱۰ جدایه مخمری (A1-A10) و ۴ جدایه باکتریایی (B1-B4) بدست آمد و از آن‌ها کشت خالص تهیه گردید. نمونه‌ها شامل ۶ جدایه مخمری از شیر، ۴ جدایه مخمری از ماست، ۱ جدایه باکتریایی از دوغ، ۲ جدایه باکتری از شیر و ۱ جدایه باکتریایی از ماست می‌باشند.

تست‌های بیوشیمیایی (جذب و تخمیر قند، جذب ازت،

اوره آن، کاتالاز و اکسیداز)

نتایج تست‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها در جدول ۲ بیان شده است. بر اساس نتایج به دست آمده ۴ جدایه A3، A10، B1 و B3 به منظور انجام تست‌های آتی انتخاب گردیدند.

تست آنتی‌بیوگرام

قطر هاله عدم رشد در ۴ جدایه منتخب A3، A10، B1 و B3 اندازه گیری شده، با نقاط برش (Breakpoints) مشخص شده در جداول CLSI 2023 مقایسه و طبقه‌بندی S, I, R انجام گردیده و در جدول ۳ گزارش گردید.

تعیین خواص پروبیوتیکی جدایه‌ها (مقاومت جدایه‌ها به

حرارت، pH اسیدی و نمک صفاوی)

4- *Lactobacillus acidophilus*

5- *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132

1- *Candida tropicalis* 1691

2- *Saccharomyces cerevisiae*

3- *Lactobacillus casei* 1197

جدول ۲- نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها
Table 2- Results of biochemical tests of isolates

نتایج تخمیر کربوهیدرات جدایه‌ها
Results of carbohydrate fermentation of isolates

کربوهیدرات Carbohydrate جدایه‌ها Isolates	سوربیتول Sorbitol	مانیتول Mannitol	مالتوز Maltose	آرابینوز Arabinose	ساکارز Sucrose	گلوکز Glucose	دکسترین Dextrin
A1	+	-	-	-	+	+	-
A2	-	+	-	-	+	+	+
A3	-	-	+	-	+	+	+
A4	-	-	+	-	-	+	-
A5	-	+	+	-	+	+	-
A6	-	+	+	-	+	+	+
A7	-	-	+	+	+	+	-
A8	-	-	+	-	+	+	-
A9	+	-	+	+	+	+	-
A10	-	-	+	-	+	+	-
B1	-	+	-	-	+	+	+
B2	-	+	-	+	-	+	+
B3	-	-	+	-	+	+	-
B4	-	-	+	-	+	+	+

نتایج آزمایش کاهش نیتрат و آزمایش اوره‌آز جدایه‌های مخمر
Results of the nitrate reduction test and the urease test of yeast isolates

جدایه‌ها Isolates	آزمایش کاهش نیترات Nitrate Reduction Test	آزمایش اوره‌آز Urease Test
A1	+	+
A2	+	+
A3	+	-
A4	-	-
A5	-	+
A6	+	+
A7	-	+
A8	-	+
A9	+	-
A10	+	-

نتایج آزمایش کاتالاز و اکسیداز جدایه‌های باکتریایی
Catalase and oxidase test results of bacterial isolates

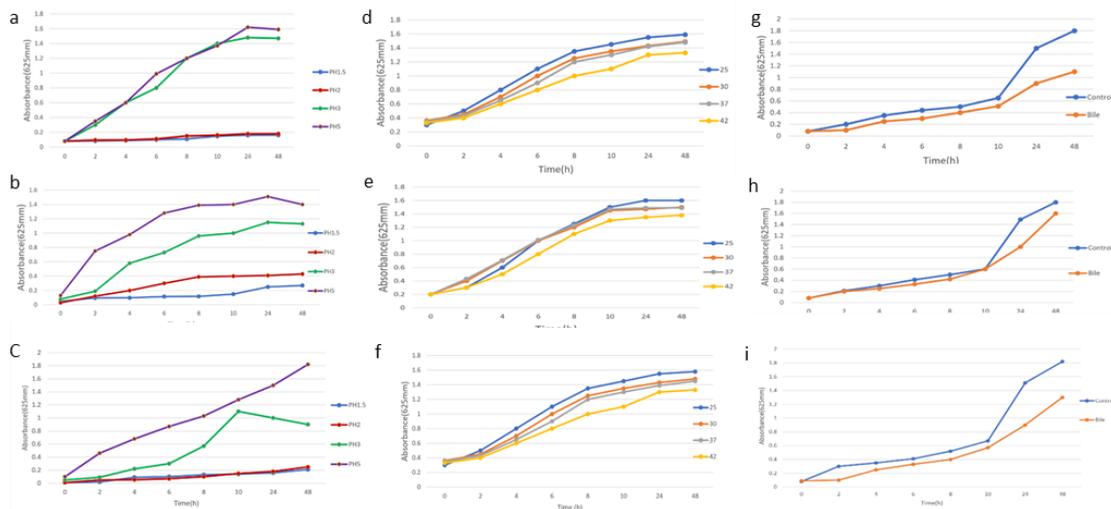
جدایه‌ها Isolates	آزمایش کاتالاز Catalase Test	آزمایش اکسیداز Oxidase Test
B1	-	-
B2	+	-
B3	-	-
B4	+	+

جدول ۳- نتایج آنتی بیوگرام جدایه‌ها
Table 3- Antibiogram results of isolates

جدایه‌ها Isolates	A3	A10	B1	B3
کتوکونازول Ketoconazole	S	S	-	-
فلوکونازول Fluconazole	R	R	-	-
آمفوتریپسین B Amphotrypsin B	I	I	-	-
تتراسایکلین Tetracycline	-	-	S	S
جنتامایسین Gentamicin	-	-	S	I
استرپتومایسین Streptomycin	-	-	R	R
ونکومایسین Vancomycin	-	-	R	R
کلیندامایسین Clindamycin	-	-	I	S
سفازیدیم Cefazidime	-	-	R	R
لووفلوکساسین Levofloxacin	-	-	R	I
کلرامفنیکل Chloramphenicol	-	-	S	S

*S: حساس، R: مقاوم، I: نسبتاً حساس

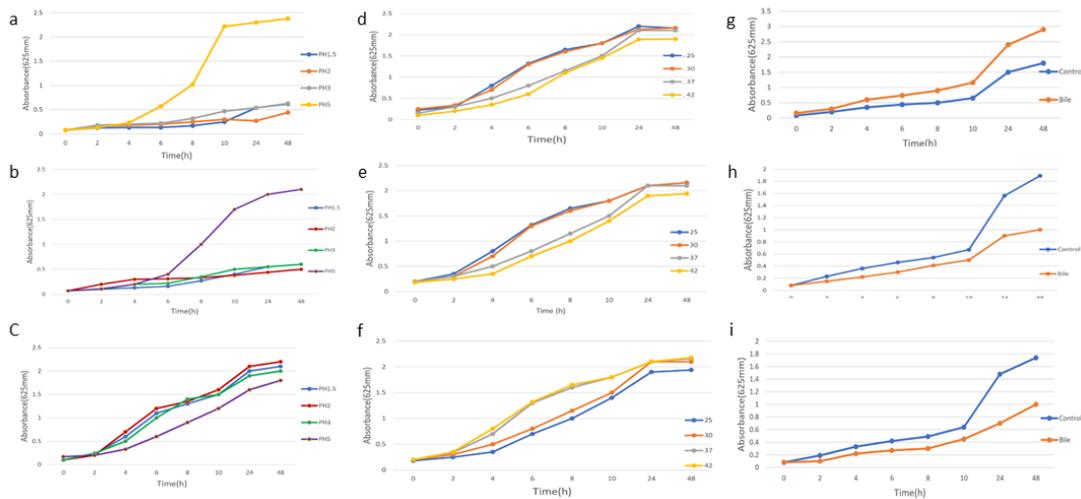
*S: Susceptible, R: Resistant, I: Intermediately Susceptible



شکل ۱- a. بررسی مقاومت در برابر pH های مختلف در نمونه مخمر استاندارد، b. در جدایه A3، c. در جدایه A10، d. مقاومت در برابر دماهای مختلف در نمونه مخمر استاندارد، e. در جدایه A3، f. در جدایه A10، g. مقاومت در برابر نمک‌های صفراوی در نمونه مخمر استاندارد، h. در جدایه A10، i. در جدایه A3

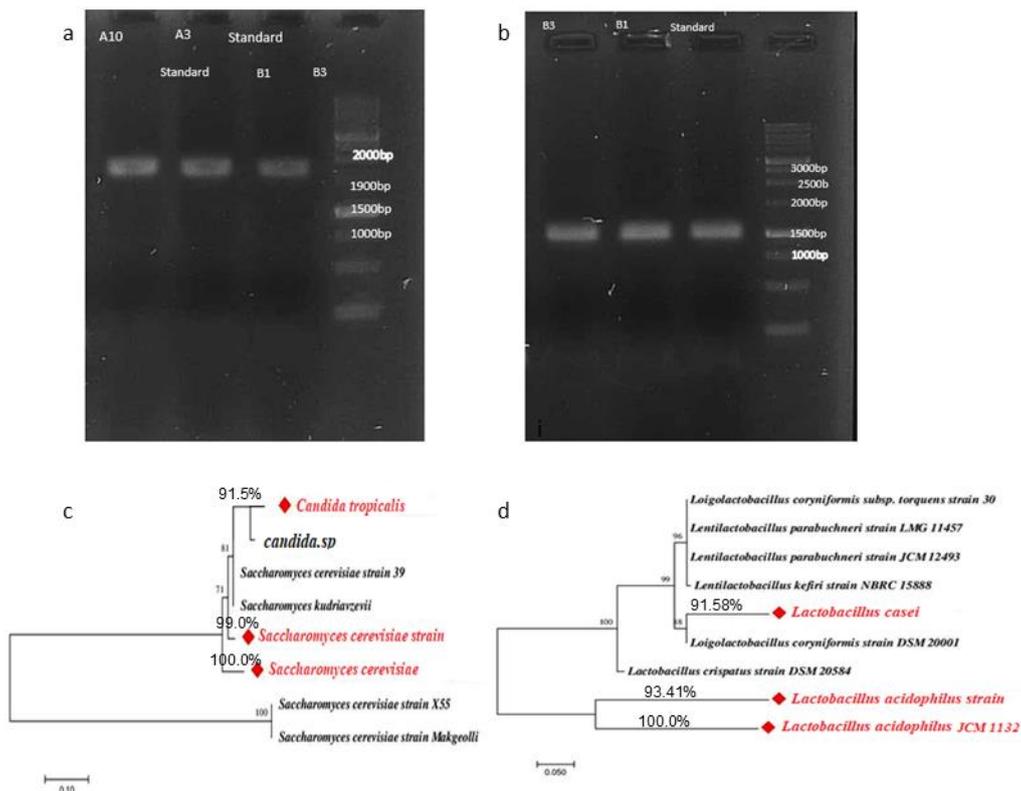
(داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (n=3) نمایش داده شده‌اند).

Fig. 1. a. Study of resistance to different pH in the standard yeast sample, b. In isolate A3, c. In isolate A10, d. Resistance to different temperatures in the standard yeast sample, e. In isolate A3, f. In isolate A10, g. Resistance to bile salts in the standard yeast sample, h. In isolate A3, i. In isolate A10 (The data are presented as mean \pm standard deviation (n=3)).



شکل ۲- a. بررسی مقاومت در برابر pH های مختلف در نمونه باکتری استاندارد، b. در جدایه B1، c. در جدایه B3، d. مقاومت در برابر دماهای مختلف در نمونه باکتری استاندارد، e. در جدایه B1، f. در جدایه B3، g. مقاومت در برابر نمک های صفراوی در نمونه باکتری استاندارد، h. در جدایه B1، i. در جدایه B3

Fig. 2. a. Study of resistance to different pH in the standard bacteria sample, b. In isolate B1, c. In isolate B3, d. Resistance to different temperatures in the standard bacteria sample, e. In isolate B1, f. In isolate B3, g. Resistance to bile salts in the standard bacteria sample, h. In isolate B1, i. In isolate B3



شکل ۳- شناسایی مولکولی جدایه‌ها. a. تصاویر ژل داگ حاصل از PCR از مخمر و b. جدایه‌های باکتریایی. c. درخت فیلوژنتیک جدایه‌های مخمر، d. درخت فیلوژنتیک جدایه‌های باکتریایی

Fig. 3. Molecular identification of isolates. a. Images of PCR-derived gel doc of yeast and b. bacterial isolates. c. Phylogenetic tree of yeast isolates, d. Phylogenetic tree of bacterial isolates

جدول ۴- نتایج تعیین توالی جدایه‌ها و نمونه استاندارد
Table 4- Sequencing results of isolates and the standard sample

نمونه Sample	شناسایی شده Identified	شباهت Similarity	طول توالی Sequence length	شماره دسترسی Accession number	شناسه شناسایی RID
B1	<i>Lactobacillus casei</i>	91.58%	1486	MW-073405.1	KUGW7ABS016
B3	<i>Lactobacillus acidophilus strain</i>	93.41%	1104	CP-025428.1	KUDZCWFJ013
سویه باکتری استاندارد Standard bacterial strain	<i>Lactobacillus acidophilus JCM 1132</i>	100.00%	1176	CP025428	KU794UGF016
A3	<i>Saccharomyces cerevisiae strain</i>	99.0%	781	MT136553.1	KV0CA4FB01R
A10	<i>Candida tropicalis</i>	91.50%	1295	KT-807957.1	KV0GZAJA016
سویه مخمر استاندارد Standard yeast strain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100.0%	2158	MH047190.1	KV2HHGVR013

*جزئیات تعیین توالی: تعیین توالی با دستگاه‌های Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzer، شرکت Bioneer، کره، به روش سنگر
*Sequencing details: Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers Sequencing Bioneer, Korea, Sanger method

میزان بازیابی پلی ساکاریدها

میزان بازیابی پلی ساکاریدهای خالص نهایی حدود ۷ (w/w)٪ نسبت به وزن خشک نمونه اولیه محاسبه گردید.

میزان غلظت پلی ساکاریدهای استخراج شده

میزان غلظت پلی ساکاریدهای استخراج شده با استفاده از روش فنول - سولفوریک اسید بررسی و جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانش گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، جذب پلی ساکارید استخراج شده از گانودرما لوسیدوم معادل ۰/۲۸ و غلظت آن معادل ۹۳/۳ μg/mL و جذب پلی ساکارید استخراج شده از لنتینولا ادودس معادل ۰/۴۵ و غلظت آن معادل ۱۴۴ μg/mL بدست آمد.

بررسی پلی ساکاریدهای استخراج شده از نظر هضم

اسیدی و آنزیمی

جدول ۵- نتایج اندازه‌گیری با استفاده از روش DNS

Table 5- Measurement results using the DNS method

نمونه Sample	جذب نوری OD	جذب در طول موج ۵۴۳ نانومتر در بافر ۱ Absorbance at 543 nm in buffer 1	جذب در طول موج ۵۴۳ نانومتر در بافر ۲ Absorbance at 543 nm in buffer 2
اینولین Inulin		0.22	0.40
پلی ساکارید گانودرما لوسیدوم <i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharides		0.17	0.35
پلی ساکارید لنتینولا ادودس <i>Lentinula edodes</i> polysaccharides		0.15	0.21

میزان قند احیاء کننده در محیط با استفاده از تست DNS بررسی گردید که در جدول ۵ ذکر شده است. جذب جذب نوری به دست آمده در طول موج ۵۴۳ نانومتر، نشان دهنده میزان قند احیاء کننده آزاد شده پس از هضم اسیدی و آنزیمی پلی ساکاریدها می باشد. بر اساس داده‌ها، در هر دو بافر آزمایشی، اینولین بالاترین میزان جذب نوری (۰/۲۲) و در نتیجه بیشترین مقدار احیاء کننده را نشان داد. این موضوع بیانگر تجزیه پذیری بالای اینولین در درمان اسیدی و آنزیمی است. پس از آن، پلی ساکارید گانودرما لوسیدوم با ۰/۱۷ و ۰/۳۵ قرار دارد که نشان می دهد این پلی ساکارید نسبت به اینولین مقاوم تر است اما همچنان تا حدی تجزیه می شود. کمترین میزان جذب و قند احیاء کننده مربوط به پلی ساکارید لنتینولا ادودس (۰/۱۵) است که بیانگر مقاومت بالاتری دارد که در برابر هضم و تجزیه می باشد.

بررسی خصوصی آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج

شده

خصوصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید با استفاده از DPPH بررسی گردید. در بین ۲ نوع پلی‌ساکارید آزمایش شده و اینولین، بیشترین فعالیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد DPPH به ترتیب مربوط به اینولین، پلی‌ساکارید *لنتینولا ادودس* و *گانودرما لوسیدوم* می‌باشد. نتایج تحلیل آماری بر اساس آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با سطح معنی

داری ($p < 0.05$) نشان داد که تفاوت مشاهده شده در درصد فعالیت‌های بین اینولین (۵۸٪)، پلی‌ساکارید *لنتینولا ادودس* (۴۱٪) و *گانودرما لوسیدوم* (۴۰٪) از نظر آماری معنی‌دار است ($p < 0.05$). این یافته حاکی از آن است که اینولین به‌طور معنی‌داری فعالیت‌های ضد اکسیدانی نسبت به دو پلی‌ساکارید قارچی دارد، اما تفاوت میان دو پلی‌ساکارید قارچی از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). نتایج تست DPPH در جدول ۶ آورده شده است.

جدول ۶- نتایج جذب محلول DPPH متانولی با نمونه پلی‌ساکارید

Table 6- Results of the adsorption of methanolic DPPH solution with the polysaccharide sample

نمونه Sample	جذب نوری OD	درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی Percentage of antioxidant activity	جذب محلول متانول DPPH Absorbance of DPPH methanol solution
اینولین Inulin		58	0.073
پلی‌ساکارید <i>گانودرما لوسیدوم</i> <i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharides		40	0.10
پلی‌ساکارید <i>لنتینولا ادودس</i> <i>Lentinula edodes</i> polysaccharides		41	0.11

نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C-H کششی آلکان‌ها، پیک در ناحیه cm^{-1} ۱۶۴۳ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C=C کششی آلکن‌ها، پیک در نواحی cm^{-1} ۱۵۰۰-۱۰۰۰ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C-H و N-H آلکان‌ها و آمین‌های نوع اول و پیک در نواحی cm^{-1} ۱۰۰۰-۵۰۰ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C-H آلکن‌ها می‌باشد. نتایج به‌دست آمده، نشان داد نمونه‌های تولید شده مطابقت فراوانی با نمونه‌های به‌دست آمده از سایر تحقیقات مربوط به آزمون FT-IR داشتند.

بررسی تأثیر پلی‌ساکارید استخراج شده بر رشد

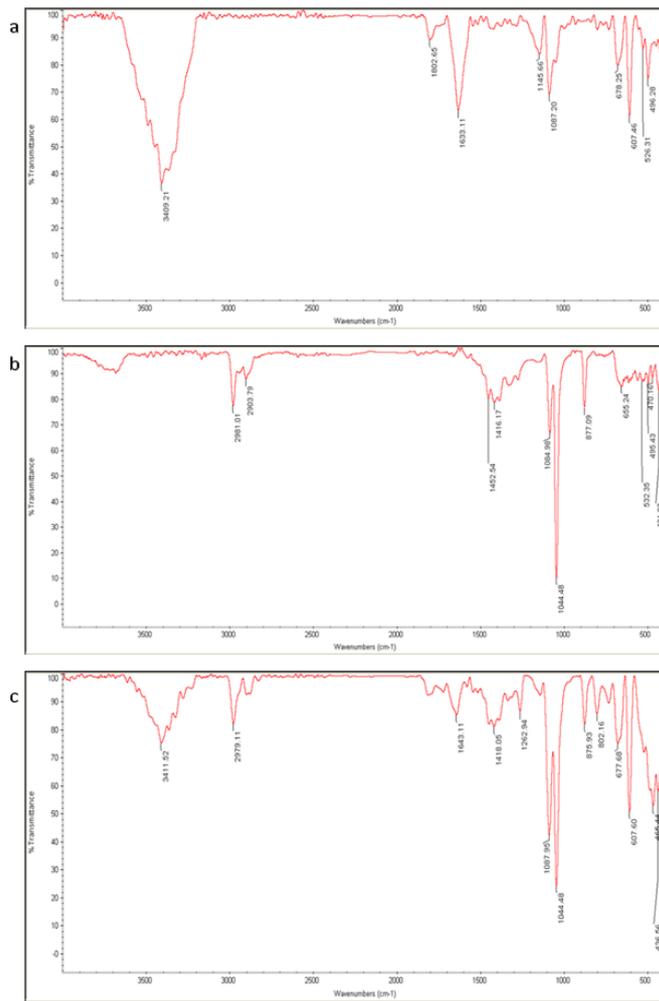
جدایه‌های مخمری و سویه‌های استاندارد

جهت انجام آزمایش از روش فاکتوریل استفاده شد، به گونه‌ای که اثر هم افزایی هر کدام از مؤلفه‌های موجود در آزمایش به‌صورت تکی، دوتایی و سه تایی مورد بررسی قرار گرفت. به‌دلیل وجود دو متغیر حالت‌های مختلفی برای ترکیب آنها وجود داشت که تمامی حالت‌ها بررسی شده است. تأثیر پلی‌ساکاریدها بر روی یک باکتری پروبیوتیک استاندارد (لاکتوباسیلوس/اسیدفیلوس) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در شکل ۵a نشان داده شده است. همچنین تأثیر پلی‌ساکاریدها بر روی مخمر استاندارد و دو جدایه A10 و A3 به ترتیب در شکل‌های ۵b، ۵c و ۵d نشان داده شده است.

شناسایی خصوصیات ساختاری پلی‌ساکارید استخراج

شده با روش FT-IR

طیف FT-IR به‌دست آمده از پلی‌ساکارید استخراج شده از *لنتینولا ادودس* در شکل ۴a نشان داده شده است. پیک در ناحیه cm^{-1} ۳۴۰۹ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های N-H کششی آمین‌های نوع اول، در نواحی cm^{-1} ۱۸۰۲ نشان‌دهنده‌ی C=O کششی اسید هالید، در ناحیه cm^{-1} ۱۶۳۳ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C=C کششی آلکن‌ها و در نواحی cm^{-1} ۶۰۰-۵۰۰ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C-H خمشی آلکن‌ها می‌باشد. طیف FT-IR به‌دست آمده از پلی‌ساکارید استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شکل ۴b نشان داده شده است. در این نمونه، پیک در نواحی cm^{-1} ۳۰۰۰-۲۸۴۰ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C-H کششی آلکان‌ها، پیک در ناحیه cm^{-1} ۱۴۵۲ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C-H خمشی آلکان‌ها، پیک در نواحی cm^{-1} ۱۴۰۰-۱۰۰۰ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C-F کششی ترکیب فلوره، پیک در ناحیه cm^{-1} ۸۷۷ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C=C خمشی آلکن‌ها و پیک در نواحی cm^{-1} ۶۰۰-۵۰۰ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های C-I کششی ترکیبات هالیدی می‌باشد. طیف FT-IR به‌دست آمده از ترکیب پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* و *لنتینولا ادودس* در شکل ۴c نشان داده شده است. در این نمونه، پیک در ناحیه cm^{-1} ۳۴۱۱ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های N-H کششی آمین‌های نوع اول، پیک در ناحیه cm^{-1} ۲۹۷۹



شکل ۴- طیف FT-IR پلی ساکارید استخراج شده از a. *لنتینولا ادودس*، b. *گانودرما لوسیدوم* و c. ترکیبی از پلی ساکارید استخراج شده از *لنتینولا ادودس* و *گانودرما لوسیدوم*

Fig. 4. FT-IR spectrum of polysaccharide extracted from a. *Lentinula edodes*, b. *Ganoderma lucidum*, c. Combination of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes*

ساکاریدهای قارچی ($p < 0.05$) وجود داشته است. پلی ساکارید گانودرما لوسیدوم در تمام موارد عملکرد بهتری نسبت به پلی ساکارید لنتینولا ادودس داشت (مثلاً $\text{Max OD} = 0.65$ در باکتری). اختلاف بین دو پلی ساکارید در جدایه A10 معنی دار ($p < 0.05$) بود. از طرفی دیگر، جدایه A3 بالاترین پاسخ را به اینولین نشان داد ($\text{Max OD} = 0.72$) در حالی که جدایه A10 کمترین حساسیت به پلی ساکاریدها را داشت ($\text{Max OD} = 0.59$ برای پلی ساکارید لنتینولا ادودس).

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که وجود پلی ساکارید بر روی رشد نمونه‌ها تأثیر مثبت داشته و همچنین همان طور که مشاهده می‌شود اینولین و گلوکز در مقایسه با پلی ساکاریدها بیشترین تأثیر را بر رشد نمونه‌ها داشته‌اند. نرخ رشد (Slope) و حداکثر جذب نوری (Max OD) برای هر یک از تیمارها در جدول ۷ به صورت کمی ارائه شده است. بالاترین مقادیر Slope و Max OD در تمامی نمونه‌ها متعلق به تیمارهای گلوکز و اینولین است (مثلاً $\text{Slope} = 0.024$ برای مخمر استاندارد تحت گلوکز) و اختلاف معنی دار بین گلوکز/اینولین با پلی

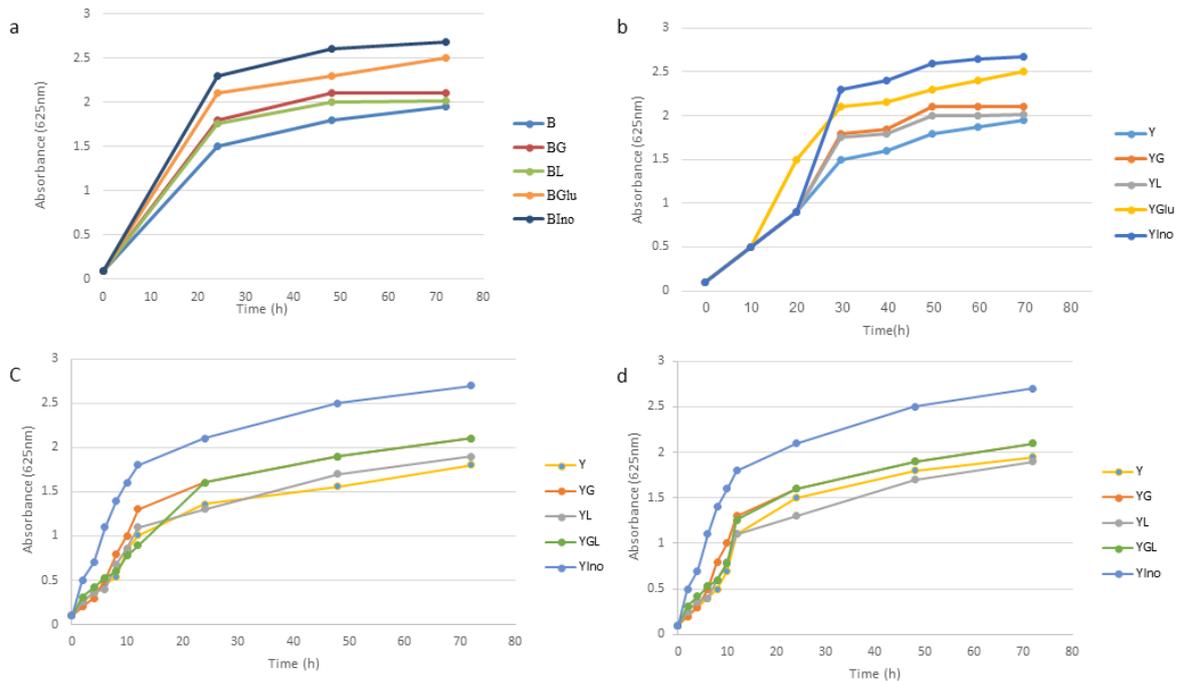
جدول ۷- مقایسه کمی پارامترهای رشد تحت تأثیر تیمارهای مختلف

Table 7- Quantitative comparison of growth parameters affected by different treatments

نمونه Sample	تیمار Treatment	نرخ رشد Slope	حداکثر OD Max OD
سویه استاندارد باکتریایی Standard strain of bacterial	GL	0.021 ± 0.001	0.85 ± 0.03
	Ino	0.018 ± 0.002	0.78 ± 0.02
	G	0.015 ± 0.001	0.68 ± 0.01
	L	0.014 ± 0.001	0.65 ± 0.02
سویه استاندارد مخمر Standard strain of yeast	GL	0.024 ± 0.002	0.82 ± 0.03
	Ino	0.019 ± 0.001	0.74 ± 0.02
	G	0.016 ± 0.001	0.63 ± 0.01
	L	0.015 ± 0.001	0.61 ± 0.01
جدایه A3 Isolate A3	GL	0.023 ± 0.002	0.80 ± 0.02
	Ino	0.018 ± 0.001	0.72 ± 0.02
	G	0.015 ± 0.001	0.64 ± 0.01
	L	0.014 ± 0.001	0.62 ± 0.01
جدایه A10 Isolate A10	GL	0.022 ± 0.001	0.79 ± 0.02
	Ino	0.017 ± 0.001	0.70 ± 0.01
	G	0.014 ± 0.001	0.61 ± 0.01
	L	0.013 ± 0.001	0.59 ± 0.01

* (G): پلی ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم، L: پلی ساکاریدهای لنتینولا ادودس، GL: گلوکز و Ino: اینولین)

*(G: *Ganoderma lucidum* polysaccharides, L: *Lentinula edodes* polysaccharides, GL: Glucose and Ino: Inulin)



شکل ۵- تأثیر پری بیوتیک‌ها بر رشد a. سویه استاندارد پروبیوتیک باکتریایی، b. سویه استاندارد پروبیوتیک مخمر، c. جدایه A3، d. جدایه A10 (B: باکتری، Y: مخمر، G: پلی ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم، L: پلی ساکاریدهای لنتینولا ادودس، GL: گلوکز و Ino: اینولین)

Fig. 5. Effect of prebiotics on the growth of a. Standard strain of bacterial probiotic, b. Standard strain of yeast probiotic, c. Isolate A3, d. Isolate A10 (B: bacteria, Y: yeast, G: *Ganoderma lucidum* polysaccharides, L: *Lentinula edodes* polysaccharides, GL: Glucose and Ino: Inulin)

گزارش‌های قبلی مبنی بر مزایای سویه‌های بومی می‌باشد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا با خواص سلامت‌بخش قابل توجه هستند که از منابع مختلفی از جمله مواد غذایی تخمیری و لبنی جداسازی می‌شوند (Baenas et al., 2024; Roberfroid,)

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از جدایه‌های بومی، به دلیل سازگاری بیشتر با میکروبیوتای منطقه‌ای، می‌تواند اثربخشی بالاتری نسبت به سویه‌های تجاری داشته باشد، که این موضوع مطابق با

مرتبط با چاقی بررسی گردید و تأثیر پری‌بیوتیک‌ها بر افزایش باکتری‌های مفید مانند گونه‌های بیفیدوباکتر و آکرمانسیا^۴ که نقش مهمی در سلامت متابولیک دارند را تأیید نمود (Delzenne & Bindels, 2015).

این مطالعه با تمرکز بر بررسی اثرات پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای قارچ‌های گانودرما لوسیدوم و لنتینولا اودوس بر جدایه‌های پروبیوتیکی بومی از نمونه‌های لبنی، نوآوری قابل توجهی در حوزه سلامت و تغذیه ایجاد کرده‌است. برخلاف اکثر مقالات که عمدتاً به بررسی خواص پروبیوتیک‌ها یا پری‌بیوتیک‌های تجاری مانند اینولین پرداخته‌اند، این پژوهش به شناسایی و ارزیابی ترکیبات طبیعی و کمتر شناخته شده‌ای پرداخته که علاوه بر اثرات پری‌بیوتیکی، خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به نمونه‌های تجاری دارند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیب جدایه‌های پروبیوتیکی بومی با پلی‌ساکاریدهای قارچی می‌تواند منجر به توسعه محصولات سین‌بیوتیک طبیعی و مقرون‌به‌صرفه با اثرات سلامت‌بخش بالاتر شود. این نوآوری، علاوه بر تأکید بر کاربردهای عملی، نیاز به مطالعات تکمیلی در مدل‌های حیوانی و انسانی را نیز برجسته می‌کند که می‌تواند مسیر تحقیقات آینده را به سمت کاربردهای بالینی و تجاری هموار سازد.

نتیجه‌گیری

چهار جدایه با توان پروبیوتیکی بالا (دو جدایه مخمری و دو جدایه باکتریایی) از ۲۰ نمونه محصولات لبنی سنتی و صنعتی شناسایی شدند. به‌دنبال بررسی خواص بیوشیمیایی و مولکولی این ۴ جدایه بومی، A3 و A10 به ترتیب سوبه‌ای از ساکارومایسس سرویزیه و کاندیدا ترئوپیکالیس و جدایه‌های باکتریایی B1 و B3 به ترتیب لاکتوباسیلوس کارئی و سوبه‌ای از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شناسایی شدند و می‌توان آن‌ها را با انجام آزمایشات دیگر به‌عنوان یک محصول پروبیوتیک بومی معرفی نمود. بر اساس داده‌های به‌دست‌آمده، رشد جدایه‌های پروبیوتیکی در حضور پلی‌ساکاریدهای قارچی در برخی موارد تا ۱۰٪ بیشتر از اینولین (پری‌بیوتیک تجاری) در ۱۲ ساعت مشاهده شد که از نظر آماری معنادار بود ($P < 0.05$)، به همین ترتیب می‌توان بیان نمود که پلی‌ساکاریدهای جدا شده قابلیت پری‌بیوتیکی قابل مقایسه و حتی بهتر از اینولین (پری‌بیوتیک تجاری) دارا می‌باشند. همچنین نتایج حاصل از بررسی خصوصیات عملکردی پلی‌ساکاریدهای جدا شده، نشان می‌دهند که این ترکیبات فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به اینولین و تجزیه‌پذیری قابل قبولی در درمان اسیدی و آنزیمی را دارا هستند. براساس نتایج این مطالعه پلی‌ساکاریدهای جدا شده با دارا بودن

(2000). با گسترش دانش در این حوزه، پری‌بیوتیک‌ها نیز به‌عنوان ترکیبات غیرقابل هضم که به‌صورت انتخابی توسط میکروبیوتا مصرف می‌شوند و اثرات مفیدی بر سلامت دارند، مورد توجه قرار گرفتند (Baenas et al., 2024). پری‌بیوتیک‌ها ترکیبات غیر قابل هضمی هستند که به‌صورت انتخابی مورد استفاده میکروبیوتا قرار گرفته و اثرات مفیدی بر سلامتی می‌گذارند (Baenas et al., 2024; Roberfroid, 2000). قارچ‌ها از جمله منابع قابل توجه پری‌بیوتیک‌ها هستند (Huchchannavar, Hasan, Kumar, & Gupta, 2024). از جمله این منابع پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم و لنتینولا اودوس هستند که با دارا بودن خواص ضد سرطانی و تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، منجر به افزایش کیفیت زندگی می‌گردند و از همین رو اهمیت بالایی دارند (Alinia-Ahandani, Fazilati, Alizadeh, & Boghozian, 2018; Muszyńska, Pazdur, Lazur, & Sułkowska-Ziaja, 2017). استفاده از ترکیبات طبیعی، در دسترس، ارزان قیمت و بدون عوارض جانبی نظیر پلی‌ساکاریدهای قارچی که خواص درمانی داشته‌باشند، می‌تواند رویکردی ارزشمند در بهبود سلامت باشد (Gao et al., 2002). در مطالعه‌ای الیگوساکاریدهای استخراج شده از پلی‌ساکارید اسپورودرم گانودرما لوسیدوم در مقایسه با گروه کنترل در تخمیر میکروبیوتای روده، فراوانی برخی از باکتری‌های مفید افزایش و برخی از باکتری‌های مضر را کاهش داد (Yang et al., 2020). همچنین، پلی‌ساکارید مستخرج شده از اندام میوه‌ای گانودرما لوسیدوم با غنی‌سازی ویژه با باکترئیدس اوتوس^۱ و باکترئیدس یونیفورمیس^۲ در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم تنوع میکروبی و نسبت باکتری‌ها به فیرمیکوت‌ها^۳ را بهبود بخشیده و باکترئیدس اوتوس و باکترئیدس یونیفورمیس را به شدت غنی کرده‌است (Yang et al., 2022). در مطالعه‌ای دیگر، اثرات هتروپولی‌ساکارید مستخرج شده از اندام میوه‌ای لنتینولا اودوس بر پاسخ ایمنی موش‌های مسن ارزیابی گردید و نشان داده شد که بر افزایش ایمنی و بهبود سلامت روده اثرات مفیدی داشته است (Xu et al., 2015). در مطالعه‌ای، خواص بیفیدوژنیک و تأثیر تخمیر بیفیدوباکتریایی بر مولکول‌ها و فعالیت‌های ایمنی پلی‌ساکاریدهای لنتینولا اودوس ارزیابی گردید. تخمیر بیفیدوباکترها باعث کاهش قابل توجه وزن مولکولی هر دو بخش پلی‌ساکاریدهای لنتینولا اودوس و منجر به فعالیت تحریک‌کننده سیستم ایمنی بالاتر در سلول‌های ماکروفاژ RAW 264.7 گردید (Huang et al., 2024). همچنین، اهمیت استفاده از پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم به‌عنوان پری‌بیوتیک‌های طبیعی برای پیشگیری و درمان اختلالات متابولیک

3- Firmicutes

4- Akkermansia sp.

1- Bacteroides ovatus

2- Bacteroides uniformis

خصوصیات زیست‌فعالی، می‌توانند گزینه مناسبی برای بهبود کیفیت مواد غذایی و افزایش اثرات سلامتی‌بخش آن‌ها باشند. به‌منظور ارزیابی جامع‌تر و دقیق‌تر اثرات بالینی این ترکیبات، انجام مطالعات تکمیلی شامل بررسی جذب زیستی، آزمون‌های ایمنی و تحلیل پاسخ‌های ایمنی موضعی در مدل‌های حیوانی و انسانی اکیداً توصیه می‌شود.

مشارکت نویسندگان

محدثه لاری پور: مدیریت پروژه، مدیریت داده‌ها، تحلیل رسمی، نظارت و نوشتن - بررسی و ویرایش. **ندا جامعی:** تحقیق و بررسی، روش‌شناسی، مفهوم‌سازی و منابع. **حورا دادگستر:** تحقیق و بررسی و نوشتن - پیش‌نویس اصلی. **جمیله نوری:** نظارت و اعتبارسنجی.

منابع تأمین مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی خاصی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیر انتفاعی دریافت نکرد.

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال بالاصح دانشکده علوم زیستی که در انجام فعالیت‌ها و امور آزمایشگاهی این تحقیق، کمال همکاری و مساعدت را مبذول فرموده‌اند، سپاسگزاری می‌گردد.

فهرست علائم اختصاری

L. edodes: *Lentinula edodes*
 G. lucidum: *Ganoderma lucidum*
 B: bacteria
 A and Y: yeast
 G: *Ganoderma lucidum* polysaccharides
 L: *Lentinula edodes* polysaccharides
 GL: Glucose
 Ino: Inulin
 PCR: Polymerase Chain Reaction
 OD: Optical density
 FT-IR: Fourier Transform Infrared Spectrometer

References

- Alinia-Ahandani, E., Fazilati, M., Alizadeh, Z., & Boghuzian, A. (2018). The introduction of some mushrooms as an effective source of medicines in Iran Northern. *Biology and Medicine*, 10(5), 1-5. <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000451>
- Appanna, V.D., & Appanna, V.D. (2018). Dysbiosis, probiotics, and prebiotics: in diseases and health. *Human Microbes-The Power within: Health, Healing and Beyond*, 81-122. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7684-8_3
- Astashkina, A.P., Khudyakova, L., & Kolbysheva, Y.V. (2014). Microbiological quality control of probiotic products. *Procedia Chemistry*, 10, 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.10.014>
- Baenas, I., Camacho-Barcia, L., Miranda-Olivos, R., Solé-Morata, N., Misiólek, A., Jiménez-Murcia, S., & Fernández-Aranda, F. (2024). Probiotic and prebiotic interventions in eating disorders: A narrative review. *European Eating Disorders Review*, 32(6), 1085-1104. <https://doi.org/10.1002/erv.3069>
- Bisen, P., Baghel, R.K., Sanodiya, B.S., Thakur, G.S., & Prasad, G. (2010). *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 17(22), 2419-2430. <https://doi.org/10.2174/092986710791698495>
- Cappuccino, J.G., & Sherman, N. (2013). *Microbiology: a laboratory manual*: Pearson Higher Ed.
- Chen, Z., & Zhang, H. (2025). The interaction between *Ganoderma lucidum* polysaccharides and gut microbiota: Implications for immune health. *Medicinal Plant Research*, 15. <https://doi.org/10.5376/mpr.2025.15.0001>
- Chou, W.T., Sheih, I.C., & Fang, T.J. (2013). The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. *Journal of Food Science*, 78(7), M1041-M1048. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12160>
- Cook, A., & Gilbert, R. (1969). The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 32(1), 96-102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1969.tb02193.x>
- Delzenne, N.M., & Bindels, L.B. (2015). *Ganoderma lucidum*, a new prebiotic agent to treat obesity? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(10), 553-554. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.137>
- Diosma, G., Romanin, D.E., Rey-Burusco, M.F., Londero, A., & Garrote, G.L. (2014). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 43-53. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (2006). *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria* (Vol. 1): Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x>

13. Fan, H., Mazza, G., & Liao, X. (2010). Purification, composition and antioxidant activity of polysaccharides from wolfberry, cherry, kiwi and cranberry fruits. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2(1), 9-17.
14. Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(S2), S35-S50. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004011>
15. Gao, Y., Zhou, S., Chen, G., Dai, X., & Ye, J. (2002). A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Extract (Ganopofy) in patients with advanced cancer. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4(3). <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v4.i3.30>
16. Giavasis, I. (2014). Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 162-173. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.010>
17. Gomes, A.M., & Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 139-157. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00033-3)
18. Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B.C., Maeda, Y., Goldsmith, C.E., & Moore, J.E. (2009). An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15(1), 5-7. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2008.10.002>
19. Holscher, H.D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, 8(2), 172-184. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>
20. Huang, L.X., Gu, F.T., Zhu, Y.Y., Zhao, Z.C., Li, J.H., & Wu, J.Y. (2024). Bifidogenic properties of polysaccharides isolated from mushroom *Lentinula edodes* and enhanced immunostimulatory activities through Bifidobacterial fermentation. *Food Bioscience*, 62, 105121. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105121>
21. Huchchannanavar, S., Hasan, W., Kumar, D., & Gupta, S. (2024). *Prebiotic potential of mushroom-derived compounds*. In *Mushroom Magic* (pp. 228-243): CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003570257-14>
22. Jain, S.K., Jain, A., Gupta, Y., & Ahirwar, M. (2007). Design and development of hydrogel beads for targeted drug delivery to the colon. *Aaps Pharmscitech*, 8(3), 56. <https://doi.org/10.1208/pt0803056>
23. Lindequist, U. (2024). Medicinal mushrooms as multicomponent mixtures—demonstrated with the example of *Lentinula edodes*. *Journal of Fungi*, 10(2), 153. <https://doi.org/10.3390/jof10020153>
24. Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, W., & Stahl, D. (2018). Brock biology of microorganisms 15th edn, 71–74. In: Pearson Higher Ed.
25. Manzanares, W., Lemieux, M., Langlois, P.L., & Wischmeyer, P.E. (2016). Probiotic and synbiotic therapy in critical illness: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, 20, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1434-y>
26. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y.C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69-72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
27. Mohanty, D., & Ray, P. (2016). Evaluation of probiotic and antimicrobial properties of lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 230-234. <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i11.12683>
28. Moradali, M.F., Hedjaroude, G.A., Mostafavi, H., Abbasi, M., Ghods, S., & Sharifi-Tehrani, A. (2007). The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran. *Mycotaxon*, 99, 251-270. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v7.i4.70>
29. Muszyńska, B., Pazdur, P., Lazur, J., & Sułkowska-Ziaja, K. (2017). *Lentinula edodes* (Shiitake)—biological activity. *Medicina Internacia Revuo*, 28(108), 189-195.
30. Nielsen, S.S. (2009). Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. In *Food analysis laboratory manual* (pp. 47-53): Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6
31. 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>
32. Pandey, K., Naik, S., & Vakil, B. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577-7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
33. Raghukumar, C. (2008). Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. *Fungal Diversity*, 31, 19-35.
34. Ren, G., Xu, L., Lu, T., & Yin, J. (2018). Structural characterization and antiviral activity of lentinan from *Lentinus edodes* mycelia against infectious hematopoietic necrosis virus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 1202-1210. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.132>
35. Roberfroid, M.B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1682S-1687S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1682S>

36. Rousta, N., Aslan, M., Yesilcimen Akbas, M., Ozcan, F., Sar, T., & Taherzadeh, M.J. (2024). Effects of fungal based bioactive compounds on human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(20), 7004-7027. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2178379>
37. Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.-M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>
38. Stamets, P. (2011). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*: Ten speed press.
39. Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., & Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 548-556. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021>
40. Umu, Ö.C., Rudi, K., & Diep, D.B. (2017). Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 28(1), 1348886. <https://doi.org/10.1080/16512235.2017.1348886>
41. Wayne, P. (2010). Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI)(2020) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Background, Organization, Functions, and Processes. *Journal Clinical Microbiology*, 58(3), 01864-0186419. <https://doi.org/10.1128/jcm.01864-19>
42. Xu, X., Yang, J., Ning, Z., & Zhang, X. (2015). *Lentinula edodes*-derived polysaccharide rejuvenates mice in terms of immune responses and gut microbiota. *Food & Function*, 6(8), 2653-2663. <https://doi.org/10.1039/C5FO00689A>
43. Yang, K., Zhang, Y., Cai, M., Guan, R., Neng, J., Pi, X., & Sun, P. (2020). In vitro prebiotic activities of oligosaccharides from the by-products in *Ganoderma lucidum* spore polysaccharide extraction. *RSC Advances*, 10(25), 14794-14802. <https://doi.org/10.1039/C9RA10798C>
44. Yang, L., Kang, X., Dong, W., Wang, L., Liu, S., Zhong, X., & Liu, D. (2022). Prebiotic properties of *Ganoderma lucidum* polysaccharides with special enrichment of *Bacteroides ovatus* and *B. uniformis* in vitro. *Journal of Functional Foods*, 92, 105069. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105069>
45. Yin, C., Li, C., Ma, K., Fan, X., Yao, F., Shi, D., & Gao, H. (2023). The physicochemical, antioxidant, hypoglycemic and prebiotic properties of γ -irradiated polysaccharides extracted from *Lentinula edodes*. *Food Science and Biotechnology*, 32(7), 987-996. <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01234-5>
46. Zarmi, A.H., Tasharofi, Z., Alvandi, H., Barshan-tashnizi, M., Ebrahimi-Hosseinzadeh, B., & Hosseini, Z.B.M. (2022). A kinetic modeling of growth and mycelial exopolysaccharide production by *Lentinus edodes* (Shiitake edible mushroom): Enhancemet of production in volatile co-cultures for shiitake edible mushroom. *Applied Food Biotechnology*, 9(1), 67-78. <https://doi.org/10.17474/artvinofd.953998>
47. Zhao, J., Zhao, J., Zang, J., Peng, C., Li, Z., & Zhang, P. (2024). Isolation, identification, and evaluation of lactic acid bacteria with probiotic potential from traditional fermented sour meat. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1421285. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1421285>
48. Zhao, L., Dong, Y., Chen, G., & Hu, Q. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 783-789. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.029>
49. Zheng, M., Pi, X., Li, H., Cheng, S., Su, Y., Zhang, Y., & Jiang, Y. (2024). *Ganoderma* spp. polysaccharides are potential prebiotics: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(4), 909-927. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2110035>

Determination of Diazinon Residue in Honey Samples from Mane and Samalqan Region in North Khorasan Province Using UV-Vis Spectrophotometry

Z. Rahimi¹, V. Hakimzadeh^{2*}

1- Department of Food Science and Technology, Qu.C., Islamic Azad University, Quchan & Quality Control Manager at Shahd Shafa Samalqan Cooperative Company, Ghazi City, Maneh and Samalqan County, North Khorasan Province, Iran

2- Department of Food Science and Technology, Qu.C., Islamic Azad University, Quchan, Iran

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

Received: 16.09.2024

Revised: 22.04.2025

Accepted: 06.05.2025

Available Online: 18.08.2025

How to cite this article:

Rahimi, Z., & Hakimzadeh V. (2025). Determination of diazinon residue in honey samples from Mane and Semelqan region in North Khorasan province using UV-Vis spectrophotometry. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(4), 451-462. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.89540.1368>

Introduction

In 2023, North Khorasan province hosted 188,000 bee colonies, producing over 2,900 tons of honey. Approximately 20% of the honey in the province is produced in the Mane and Semelqan region, which is rich in orchards and agricultural fields. To increase agricultural production, various pesticides are widely used in this area, thereby increasing the potential for contamination of bees and their products, which are often located near these fields. Pesticides residues have been reported to be toxic, carcinogenic, and capable of causing chromosomal changes (Demirhan *et al.*, 2019). They can also affect the endocrine, reproductive, and nervous systems (Brander, Gabler, Fowler, Connon, & Schlenk, 2016; Watermann *et al.*, 2016; Febvey, Schüz, & Bailey, 2016). Diazinon, an organophosphorus insecticide, is classified in the second category of the World Health Organization's classification and is considered a relatively dangerous pesticide (Taghavi, Naghipour, Mohagheghyan, & Jamali, 2007). This study aims to investigate the residual levels of diazinon in honey produced in the Mane and Semelqan region, including Buor Buor village (cotton flower honey), Chakhmaghloo village (kanar honey), Keshanak village (spring honey), and Darkesh village (thyme honey), with the goal of evaluating the safety of honey produced in this region.

Materials and Methods

Honey samples were collected in the spring (May) and winter (March) of 2023. To prepare the honey samples for determining diazinon pesticide residue, the method of Jimenez, Bernal, & Lorente, (2000) was used. A standard dilution of diazinon was prepared at concentrations of 0.12, 0.06, 0.024, 0.012, and 0.006 ppm. The absorption spectrum of the diluted solutions was then recorded using an ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrometer in the wavelength range of 200 to 400 nm. Based on the spectral results, the maximum absorption wavelength (λ_{max}) of diazinon was determined to be 292 nm. The best-fit equation with a correlation coefficient ($R^2 = 0.9905$) was calculated. Data were analyzed using a completely randomized design with five replicates for each season (spring and winter) through the GLM procedure of SAS 9.1 statistical software (SAS, 2009).

Result and Discussion

The results showed that the amounts of diazinon in the honey samples from Buor Buor, Darkesh, Keshanak, and Chakhmaghloo villages were 3.46, 2.73, 1.81, and 1.49 ppm, respectively. The diazinon residue in the honey from Buor Buor (3.46 ppm) and Darkesh (2.37 ppm) villages was significantly higher than the diazinon residue in



the honey from Chakhmaghloo (1.49 ppm) and Keshanak (1.81 ppm) villages ($P < 0.001$). Additionally, the residual amount of diazinon in honey harvested in the spring was 4.23 ppm, significantly higher than in the winter samples, which had 0.34 ppm ($P < 0.001$). Unfortunately, the residual amount of diazinon pesticide in all honey samples from different regions of Mane and Semelqan exceeded the standard limit set by authorities in Iran and Europe.

Conclusion

It can be concluded that the honey from Mane and Semelghan region contains higher levels of diazinon residue compared to the standard limit, which can be attributed to the spraying of pesticides in orchards and fields. Additionally, the lower pesticide residue in the winter honey samples may be due to manual feeding of bees, reduced agricultural activity during the winter season, and possibly the washing off of pesticide residues by rainfall. Therefore, considering the higher levels of diazinon residue in the honey samples compared to the permissible limit, and the higher amount in this residue during the spring season, it is recommended to strengthen the monitoring of pesticide application in agricultural fields surrounding beekeeping areas, particularly in the spring. Additionally, educating farmers on the proper use of pesticides, informing beekeepers about high-risk areas, and regularly screening honey samples can help reduce the risks associated with pesticide residues. Investigating safer alternatives to diazinon and establishing regional regulations are also among recommended measures to improve food safety and protect consumer health.

Keywords: Calibration curve, Diazinon, Honey, Mane and Samalqan

مقاله کوتاه پژوهشی

جلد ۲۱، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۴، ص. ۶۶۲-۶۵۱

تعیین باقیمانده سم دیازینون در عسل منطقه مانه و سملقان در استان خراسان شمالی با استفاده از روش Uv-Vis

زینب رحیمی^۱ و وحید حکیم‌زاده^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۶

چکیده

این پژوهش به منظور تعیین میزان باقیمانده سم دیازینون در عسل‌های تولیدی در منطقه مانه و سملقان واقع در استان خراسان شمالی انجام شد. نمونه‌های عسل در فصل بهار (اواسط خرداد) و زمستان (اواسط اسفند) سال ۱۴۰۲ جمع‌آوری و میزان جذب سم دیازینون در طول موج ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر به روش Uv-Vis با رسم منحنی استاندارد بررسی شد. نتایج نشان داد که مقادیر سم دیازینون در نمونه عسل‌های روستای بوروبور، درکش، کشانک و چخماقلو به ترتیب عبارت از ۳/۴۶، ۲/۷۳، ۱/۸۱ و ۱/۴۹ ppm بودند. همچنین نتایج نشان داد که مقدار باقیمانده سم دیازینون در عسل برداشت شده در فصل بهار (۴/۲۳ ppm) در مقایسه با نمونه‌های برداشت شده در فصل زمستان (۰/۳۴ ppm) به طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.01$). به طور کلی نتایج نشان داد که عسل‌های منطقه مانه و سملقان دارای باقیمانده سم دیازینون بالاتری در مقایسه با میزان استاندارد ملی ایران (۰/۰۵ ppm) است. از این رو می‌توان عنوان کرد وجود باغات میوه و مزارع کاشت گوجه در اطراف مناطق نمونه‌برداری عسل، می‌تواند از عوامل وجود این سم در عسل‌ها باشد. از طرفی کاهش سم در نمونه‌های عسل زمستانه ناشی از تغذیه دستی زنبورها، کاهش کشت و کار در این فصل و احتمالاً شستشوی سموم پراکنده شده توسط بارندگی باشد.

واژه‌های کلیدی: دیازینون، عسل، مانه و سملقان، منحنی استاندارد

مقدمه

مانه و سملقان در بین شهرستان‌های استان خراسان شمالی در کشور ایران، وسعت بالایی داشته که به دلیل وجود منابع آب کافی و خاک حاصلخیز، موجب رونق کشاورزی در این شهرستان شده است. عمده‌ترین محصولات زراعی تولیدی این منطقه شامل گندم و جو، دانه‌های روغنی مانند آفتابگردان و کلزا، پنبه، حبوباتی مانند عدس، نخود و لوبیا و محصولاتی همچون برنج، پیاز و یونجه، برخی گیاهان دارویی و همچنین زعفران می‌باشد. محصولات باغی همچون هلو، گیلاس، زردآلو، انگور، شلیل، آلبالو، گلابی، سیب، گردو و بادام و همچنین هندوانه، خیار و گوجه‌فرنگی از دیگر محصولاتی است که در

این منطقه در حال کشت می‌باشد (Research and Training Center of the Agricultural Jihad Organization, 2024). به گزارش سازمان جهاد کشاورزی استان خراسان شمالی، تعداد ۱۸۸ هزار کلنی زنبور عسل در استان خراسان شمالی وجود دارد که پیش‌بینی می‌شود تا پایان سال ۱۴۰۳ مقدار ۲۹۰۰ تن عسل از سطح زنبورستان‌های استان برداشت شود (Research and Training Center of the Agricultural Jihad Organization, 2024).

ارزش غذایی و دارویی عسل بر کسی پوشیده نیست و عسل به طور گسترده در درمان عفونت‌ها و بیماری‌های مزمن به کار می‌رفته است. عسل با داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان و مدیر کنترل کیفی شرکت تعاونی شهدهشقای سملقان، استان خراسان شمالی، شهرستان مانه و سملقان، شهر قاضی، ایران

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

گزارش شده است (Gunat, Lekduhur, Eneji Ishaq, & Rufus, 2021; Ben Mukiibi *et al.*, 2021; Eissa, El-Sawi, & Zidan, 2014; Berg *et al.*, 2018; Sheldon, Pinion, Jr., Klyza, & Zimeri, 2019). حشره‌کش دیازینون سمی ارگانوفسفره می‌باشد که در رده ۲ طبقه‌بندی سازمان بهداشت جهانی قرار داشته و جزء آفت‌کش‌های نسبتاً خطرناک محسوب می‌شود (Taghavi *et al.*, 2007). دیازینون، سمی حشره‌کش، نماتدکش و کنه‌کش، غیرسیستمیک، نفوذی، تماسی، گوارشی و تنفسی ارگانوفسفره است. این ترکیب با طیفی وسیع، علیه انواع آفات برگ‌خوار، ساقه‌خوار و ریشه‌خوار مکنده و خاکزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. یک مایع بدون رنگ مایل به قهوه‌ای تیره است و با اسامی تجارتي بازودین^۱، سارولکس^۲، نوسیدول^۳ و دیازول^۴ و با فرمولاسیون‌های گرانول ۵ و ۱۰٪ و امولسیون ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد به شکل پودر و قرص ۴۰ درصد نیز عرضه می‌شود (Eissa *et al.*, 2014). در میان مواد شیمیایی کشاورزی، باقیمانده آفت‌کش‌های فسفره به علت تأثیر بر فعالیت کولین استراز (آنزیمی که برای عملکرد شبکه‌های عصبی نیاز می‌باشد) عمده‌ترین خطر را متوجه انسان می‌کنند. با توجه به آمار جهانی بیشترین میزان مرگ و میر توسط آفت‌کش‌ها مربوط به سموم فسفره می‌باشد (Khazaei, Khorasani, Talebi Jahromi, & Ehtesham, 2010). در خصوص ردیابی بقایای آفت‌کش‌ها در عسل، در دنیا پژوهش‌هایی انجام پذیرفته است و تعدادی پژوهش نیز در ایران انجام شده است. طالبی چهرمی و همکاران (Talebi Jahromi, 2001) باقیمانده کومافوس در عسل زنبورستان‌های استان تهران را مورد اندازه‌گیری قرار دادند. عیسی و همکاران (Eissa *et al.*, 2014) باقیمانده ۴۶ سم مختلف را در عسل مورد اندازه‌گیری قرار دادن که طبق نتایج، در بین سموم مورد اندازه‌گیری دیکوفول در بین تمام نمونه‌ها یافت شد. دیازینون نیز در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد، اما مقدار آن از حداکثر حد مجاز روزانه^۵ پایینتر بود. بارگانسکا و همکاران (Bargańska, 2014) (Ślebioda, & Namieśnik, 2014)، باقیمانده ۱۹ سم مختلف را در عسل مورد اندازه‌گیری قرار دادند که در نمونه‌های آزمایشی این محققین باقیمانده سموم دیازینون، که مورد بررسی در این تحقیق می‌باشد نیز مشاهده شد. ال ناگار و همکاران (Al Naggar *et al.*, 2015) باقیمانده ۱۴ حشره‌کش ارگانوفسفره (OP) را در عسل و گرده نمونه‌های بهار و تابستان سال ۲۰۱۳ از ۵ استان میانی مصر جمع‌آوری کردند و با روش LC/MS-MS بقایای سموم را اندازه‌گیری نمودند. طبق نتایج، بیشترین سموم شناسایی شده شامل پروفنوفوس،

جلوگیری از بیماری‌ها نقش بسزایی دارد، برای اهداف تغذیه‌ای و دارویی استفاده می‌شود و می‌توان از آن برای درمان عفونت زخم‌ها و سرطان استفاده کرد. عسل برای درمان سرفه و گلودرد، زخم معده، گوش درد، سرخک و بیماری‌های چشمی استفاده می‌شود. تغذیه کودکان با عسل به بهبود حافظه کمک کرده و منجر به کاهش اضطراب و افزایش عملکرد و رشد بهتر در طول زندگی افراد می‌شود (Zacharis, Rotsias, Zachariadis, & Zotos, 2012; Kamkar & Khodabakhshian, 2017; Shakoori *et al.*, 2024).

عسل می‌تواند بشدت در معرض آلودگی‌های محیطی قرار گیرد. حتی مقادیر کمی از آلاینده‌ها در محیط، مانند باقیمانده‌های آفت‌کش‌ها، می‌توانند وارد دستگاه گوارش زنبور عسل شده و در طول فرآوری وارد عسل شوند. از آنجایی که سموم دفع آفات در مزارع کشاورزی و باغ‌ها برای کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی به‌طور گسترده استفاده می‌شود و کندوها اغلب در کنار مزارع و باغ‌ها یافت می‌شوند، احتمال آلودگی زنبورها و در نتیجه عسل بسیار زیاد است. درحالی‌که استفاده از پیرتروئیدها و کاربامات‌های سنتتیک به‌عنوان حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و قارچ‌کش‌ها در حال افزایش است، اما استفاده از کلرهای ارگانیک (عمدتاً به‌عنوان حشره‌کش در محصولات غذایی) از زمان ممنوعیت آنها در سال ۱۹۹۹ به شدت کاهش یافته است (Ntow, 2008; Darko & Akoto, 2008). با این حال، بقایای آفت‌کش‌های آلی کلره به دلیل مقاومت مجدد در برابر ماندن در محیط و استفاده غیرقانونی، هنوز در محیط و در انواع مختلف غذاها شناسایی می‌شوند. حتی نسل جدید آفت‌کش‌ها (پیرتروئیدهای مصنوعی، ارگانوفسفره‌ها و کاربامات‌ها) به اندازه ارگانوکلریدهای نسل اول پایدار نیستند، اما سمیت حاد بسیار بالایی دارند. آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در برخی مناطق حتی در میوه‌ها و سبزیجاتی که وارد بازار می‌شوند یافت شده است (Darko & Akoto, 2008). همه آفت‌کش‌ها سمی هستند و بسیاری از آنها پتانسیل بالایی برای سرطان‌زایی دارند و حتی ممکن است باعث انحرافات کروموزومی شدید شوند (McDougal & Safe, 1998). آفت‌کش‌ها همچنین می‌توانند با اختلالات عدد درون ریز، اندام‌های تولید مثل، باروری و سیستم عصبی تداخل داشته باشند (Brander *et al.*, 2016; Agbohessi *et al.*, 2015; Febvey *et al.*, 2016; Sturza, Silver, & Xu, 2016).

مطالعات نشان دادند که آفت‌کش‌های مختلف (آترازین، سیپرترین، DDT، DDT-توتال، دیازینون، دیکوفول، دیلدین، اندوسولفان، گلیفوسیت، هگزاکلروبنزن، هگزاکلروسیکلو هگزان-توتال، لیندان، مالاتیون و p,p'-DDD + DDT در عسل و محصولات آن

4- Diazol
5- MRL

1- Basudin
2- Sarulex
3- Neocidol

مدت نیم ساعت قرار گرفتند تا عسل کاملاً در آب حل و محلولی همگن و یکنواخت حاصل گردید. سپس هر یک از نمونه‌ها به وسیله کاغذ صافی واتمن صاف شده و در ادامه ۵۰ سی‌سی حلال دی کلرومتان، به محلول باقیمانده زیر صافی اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه توسط همزن مغناطیسی همزده شدند. محلول هر ارلن به‌طور جداگانه داخل لوله آزمایش ریخته شد. پس از مدتی محتوای هر لوله دو فاز شد که یکی مایع زرد رنگ در بالا (مخلوط آب و عسل) و دیگری دی کلرومتان در پایین لوله‌ها بود. برای هر نمونه، مایع زرد رنگ، به وسیله پیپتور برقی جدا گردید و به آن ۵۰ سی‌سی هگزان نرمال اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه توسط شیکر هم زده شد. در این حالت در هر ظرف، هگزان نرمال در بالا و مایع زرد رنگ در پایین ظرف قرار گرفتند. در ادامه هگزان نرمال جدا گردید و به مایع زرد رنگ، دی کلرومتان اضافه شد و در دستگاه روتاری قرار داده شدند. پس از خشک شدن مایع درون بالن، به نمونه‌ها ۲۵ سی‌سی استات اتیل اضافه شد. در ادامه نمونه‌ها درون ویال‌های شیشه‌ای ریخته و برای قرائت جذب آن در طول موج ماکزیمم بدست آمده از نمودار استاندارد به دستگاه UV-Vis منتقل شد (Jiménez et al., 2000).

رسم نمودار استاندارد

به منظور تهیه منحنی استاندارد و تعیین معادله رگرسیون، ابتدا مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از سم دیازینون با خلوص ۹۸ درصد (Diazinon, Sigma Aldrich, Germany) تهیه گردید. سپس رقیق‌سازی از محلول غلیظ به گونه‌ای انجام شد تا رقت‌های ۰/۱۲، ۰/۰۶، ۰/۰۲۴، ۰/۰۱۲ و ۰/۰۰۶ ppm تهیه شود. سپس طیف جذبی محلول‌های رقیق‌سازی شده با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی ماوراء بنفش و مرئی (UV-Vis) در بازه طول موج‌های ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر ثبت گردید. از روی طیف‌های حاصل بیشینه طول موج (لاندا ماکس) دیازینون بدست آمد که برابر با ۲۹۲ نانومتر بود (شکل ۱). سپس با توجه به جذب محلول‌های فوق در ۲۹۲ نانومتر منحنی کالیبراسیون (منحنی جذب بر حسب غلظت) رسم شد و طبق آن بهترین معادله خط راست با ضریب همبستگی ($R^2=0.9905$) بدست آمد (شکل ۲).

سنجش سم در نمونه‌ها به روش UV-Vis

در مطالعه حاضر بعد از آماده‌سازی، نمونه‌های عسل (که در مرحله آماده‌سازی نمونه‌ها اشاره شد)، محلول‌های بدست آمده داخل دستگاه طیف‌سنجی (Beckman DU640 UV/Vis, Markham, Canada) قرار داده شدند و جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۹۲ نانومتر قرائت شد. این جذب در معادله بهترین خط راست استاندارد قرار داده شد و مقدار دیازینون در هر نمونه بدست آمد (شکل ۳ و ۴).

کلرپایرفوس، مالاتیون و دیازینون بودند. دارکو و همکاران (Darko, AddaiTabi, Kodwo Adjaloo, & Sheringham, 2017) باقیمانده سموم مختلف را در عسل‌های تولید شده در غنا مورد بررسی قرار دادند که طبق نتایج، باقیمانده سم دیازینون کمتر از حداکثر حد مجاز روزانه‌ی اعلام شده از طرف اتحادیه اروپا بود. مطالعات در زمینه بررسی مقدار باقیمانده سموم در عسل در کشور ما بسیار محدود و تا جایی که نویسنده مطلع است در استان خراسان شمالی هیچ مطالعه‌ای انجام نشده است. لذا این پژوهش به منظور بررسی میزان باقیمانده سم دیازینون در عسل‌های تولید شده در منطقه مانه و سملقان در استان خراسان شمالی شامل روستای بور بور (عسل گل پنبه)، روستای چخماقلو (عسل کنار)، روستای کشانک (عسل بهاره) و روستای درکش (عسل آویشن) و با هدف تأمین سلامت مصرف‌کنندگان داخلی و ایجاد زمینه کنترل کیفی این محصول جهت صادرات، به روش طیف‌سنجی UV-Vis که در تحقیقات پیشین نیز برای اندازه‌گیری دیازینون به کار رفته و دارای دقت و صحت قابل قبولی بوده، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

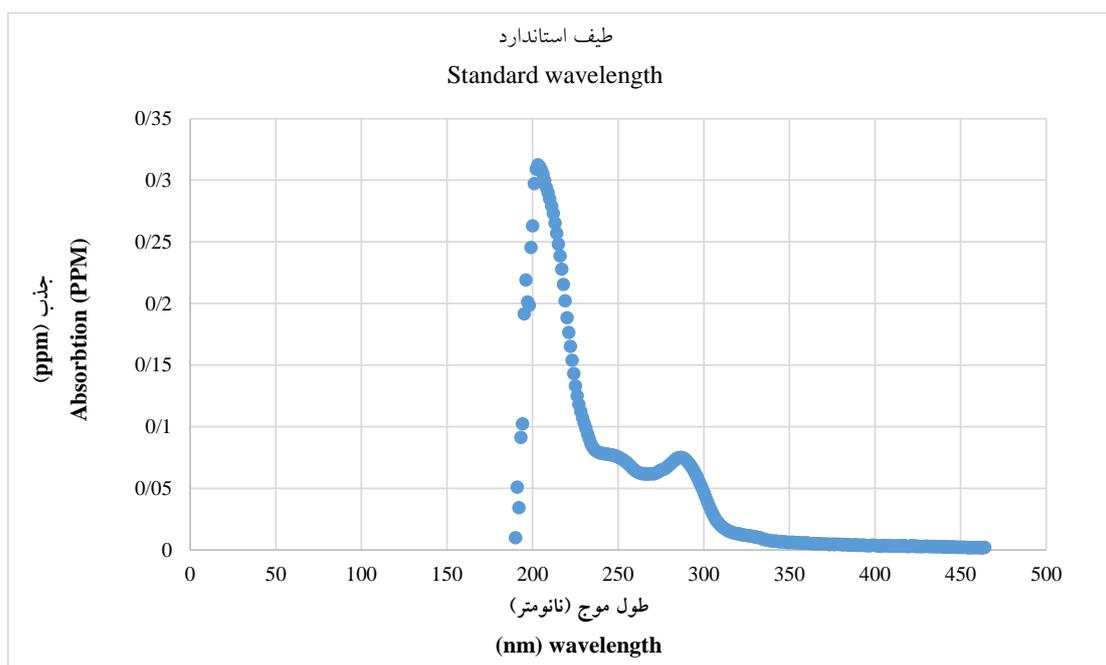
در شهرستان مانه و سملقان، مناطقی که هر سال میزبان تعداد بسیار زیادی کندوی زنبور عسل می‌باشد شامل روستاهای جوزک، درکش، کشانک واقع در دامنه رشته کوه آلاداغ و روستاهای زرد، کاستان و چخماقلو واقع در دامنه رشته کوه قورخود و روستای بور بور واقع در مزارع و دشت‌های وسیع مانه و سملقان می‌باشد. تعدادی از این مناطق بر اساس نزدیکی و سهل‌الوصول بودن برداشت نمونه انتخاب و نمونه‌برداری عسل از کندوها انجام شد.

نمونه‌برداری

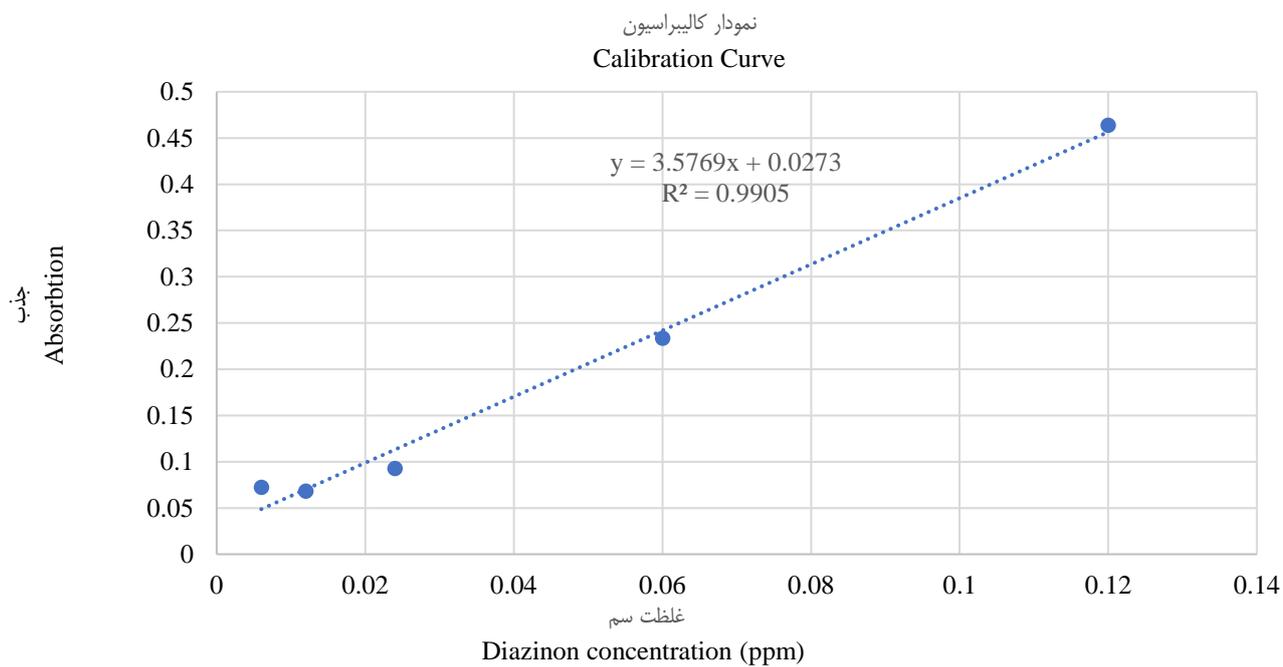
نمونه‌های عسل مورد استفاده در این پژوهش از مناطقی شامل روستای بور بور (عسل گل پنبه)، روستای چخماقلو (عسل کنار)، روستای کشانک (عسل بهاره) و روستای درکش (عسل آویشن) جمع‌آوری شدند به طوری که از هر منطقه ۵ نمونه به صورت تصادفی از کندوهای مختلف و در ۲ نوبت در سال به ترتیب در اواسط خرداد (فصل بهار) و اواسط اسفند (فصل زمستان) تهیه و جهت آنالیز باقیمانده سم دیازینون مورد بررسی قرار گرفتند.

آماده‌سازی نمونه‌ها

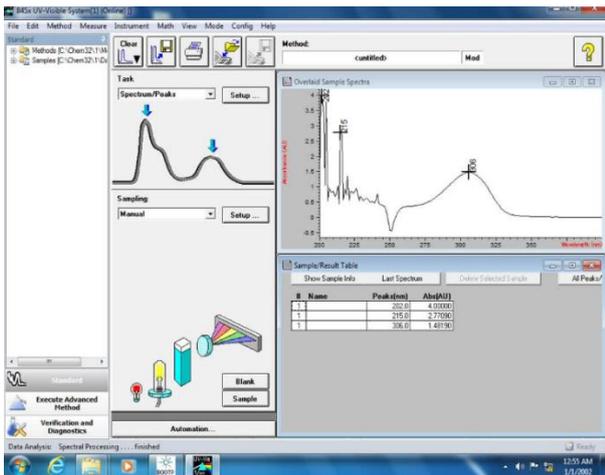
به منظور تعیین باقیمانده سم دیازینون در نمونه‌های عسل، ۵۰ گرم از هر نمونه به وسیله ترازو توزین و در یک ارلن درب‌دار قرار گرفت. سپس ۲۰۰ سی‌سی آب مقطر به هر ظرف اضافه شد. ارلن‌ها داخل یک حمام آب شیک‌دار در دمای ۵۰ الی ۶۰ درجه سانتی‌گراد به



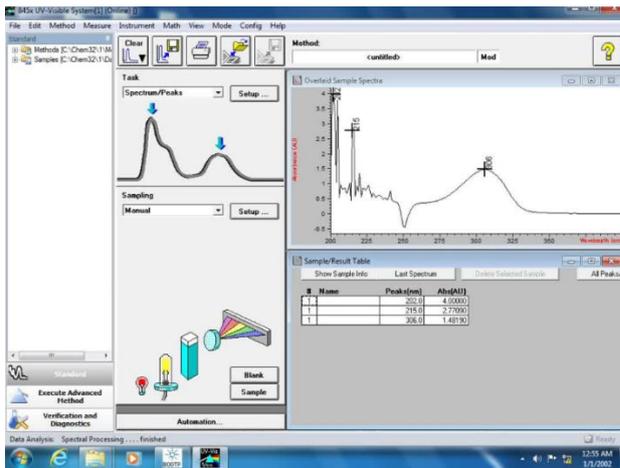
شکل ۱- طیف استاندارد
Fig. 1. Standard spectrum wavelength



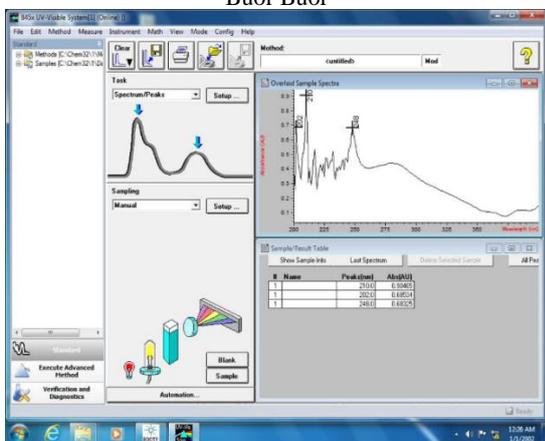
شکل ۲- منحنی کالیبراسیون استاندارد
Fig. 2. Standard calibration curve



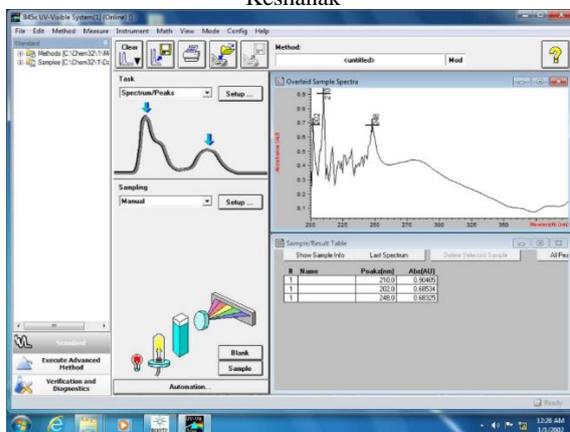
روستای بور بور
Buor Buor



روستای کشانک
Keshanak



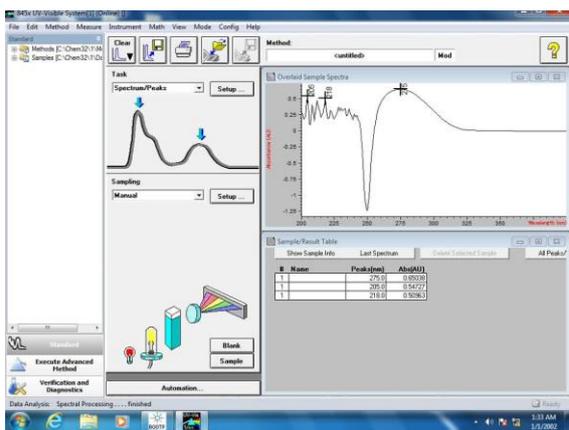
روستای درکش
Darkesh



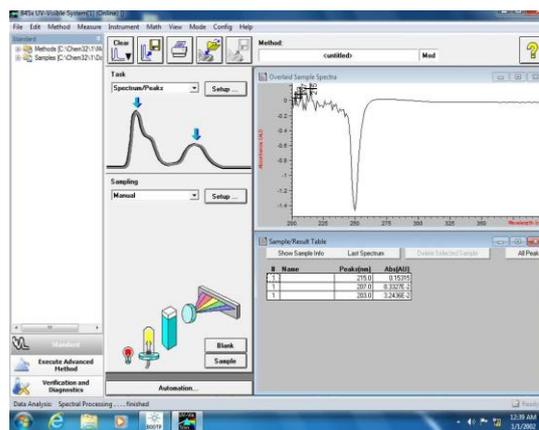
روستای چخماقلو
Chakhmaghloo

شکل ۳- طیف جذب باقیمانده سم دیازینون در عسل مناطق مختلف مانه و سملقان

Fig. 3. Wavelength of residual diazinon in honey from different regions of Mane and Samalaqan



بهار
Spring



زمستان
Winter

شکل ۴- طیف جذب باقیمانده سم دیازینون در عسل برداشت شده در فصل بهار و زمستان
Fig. 4. Wavelength of residual diazinon in honey harvested in spring and winter

تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌های این تحقیق، از آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد و مقایسه میانگین‌های میزان باقیمانده سم در ۴ سطح منطقه (بوربور، کشانک، درکش و چخماقلو) و همچنین میزان باقیمانده‌ی سم در دو فصل بهار و تابستان توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ با استفاده از نرم‌افزار Excel (office 2019) صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

میزان باقیمانده سم دیازینون در مناطق مختلف

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که میانگین مقادیر سم دیازینون در نمونه‌های روستای بوربور، درکش، کشانک و چخماقلو به ترتیب از بیشترین تا کمترین شامل ۳/۴۶، ۲/۷۳، ۱/۸۱ و ۱/۴۹ ppm بود. باقیمانده سم دیازینون در روستای بوربور (۳/۴۶ ppm) و درکش (۲/۳۷ ppm) به‌طور معنی‌داری از باقیمانده سم دیازینون در روستای چخماقلو (۱/۴۹ ppm) و کشانک (۱/۸۱ ppm) بالاتر بود ($P < 0.001$) (شکل ۵). بیشترین حد مجاز باقیمانده سم دیازینون بر اساس کدکس اتحادیه اروپا ۰/۰۱ ppm و استاندارد کلی ایران ۰/۰۵ ppm است که متأسفانه مقدار باقیمانده سم دیازینون در تمام نمونه‌های روستای چخماقلو، سملقان و سملقان بیشتر از حد مجاز بود. در همین راستا مطالعه مروری اشرف و همکاران (Ashraf et al., 2023) اظهار کرده است که مقدار باقیمانده سم دیازینون در روستای گل پنبه در مصر بین ۰/۰۵ تا ۰/۰۹ میلی‌گرم در کیلوگرم بوده که نسبت به حد مجاز بالاتر بود. در مطالعات بلاسکو و همکاران نیز (Blasco et al., 2004) مقدار باقیمانده سموم آفت‌کش‌های مختلف شامل آلفا، بتا و گاما هگزاکلوروسیکلوپنتان، هگزاکلوروبنزن، آلدین در روستای برداشت شده از مناطق مختلف اسپانیا از حد اتحادیه اروپا بالاتر بود که این نتایج هشدار بر کاهش مصرف آفت‌کش‌ها در این منطقه قلمداد شد. طالبی جهرمی و همکاران (Talebi Jahromi et al., 2001) نیز باقیمانده سم کومافوس در روستای زنبورستان‌های استان تهران را مورد اندازه‌گیری قرار دادند که نتایج مطالعات آنها نشان داد در تمامی نمونه‌های روستای باقیمانده سم مذکور قابل اندازه‌گیری بود. بارگانسکا و همکاران (Bargańska et al., 2014)، باقیمانده ۱۹ سم مختلف را در روستای مورد اندازه‌گیری قرار دادند. در نمونه‌های آزمایشی این محققین باقیمانده سموم دیازینون، آلاکلر، کاربوفوران، کومافوس، هپتوفوس، متیداتیون، پروفونفوس و تیوماتاکسام مشاهده شد. دارکو و همکاران (Darko et al., 2017) باقیمانده سموم مختلف را در روستای تولید شده در غنا مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج این محققین، باقیمانده

سمومی مانند دیازینون، مالاتیون، کلروپایریفوس، فن والریت و دی متوات در حد ۰/۰۱ mg/kg یا کمتر اندازه‌گیری شد که این مقدار کمتر از حداکثر حد مجاز بود. در مطالعه‌ای توسط باقری و همکاران (Bagheri et al., 2019) مقدار باقیمانده سم دیازینون در روستای زنبور عسل در منطقه بندرعباس و مشکین شهر اندازه‌گیری شد. نتایج این محققین نشان داد که اگرچه باقیمانده سم دیازینون در خود زنبور عسل در بندرعباس و مشکین شهر به ترتیب ۰/۰۱۷ و ۰/۰۰۵ ppm بود، اما هیچ اثری از باقیمانده سم در محصول عسل وجود نداشت و این محققین، عسل این مناطق را یک عسل کاملاً امن از لحاظ مصرف انسانی گزارش کردند. بر اساس مطالعات اخیر، استفاده بی‌رویه از آفت‌کش‌ها برای مزارع کشاورزی نزدیک به کندوهای زنبور منجر به وجود بقایای سموم آفت‌کش در عسل شده است که می‌تواند به دلیل انتقال این آلودگی به عسل و مصرف طولانی مدت عسل‌های آلوده، اثرات سو و خطرناکی مانند سرطان بر سلامت انسان داشته باشد (Ashraf et al., 2023).

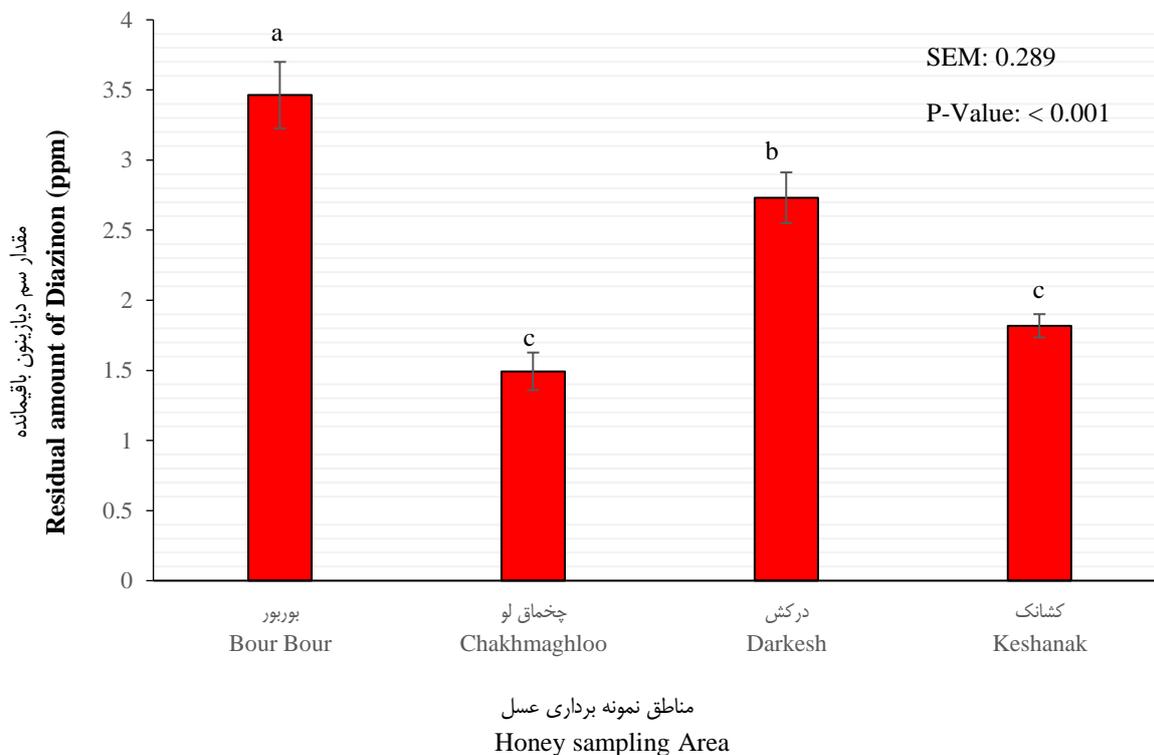
میزان باقیمانده سم دیازینون در فصول مختلف

نتایج مطالعه حاضر بر اساس میزان سم باقیمانده در فصل بهار و زمستان نشان داد که مقدار باقیمانده سم دیازینون در عسل برداشت شده در فصل بهار ۴/۲۳ ppm (اواسط خرداد) در مقایسه با نمونه‌های برداشت شده در فصل زمستان ۰/۳۴ ppm (اواسط اسفند) به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.001$) (شکل ۶). اگر چه مقدار سم در نمونه‌های فصل زمستان به‌طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های فصل بهار بود، با این حال باز هم نسبت به کدکس اتحادیه اروپا و استاندارد ملی ایران بیشتر بود.

ال ناگار و همکاران (Al Naggar et al., 2015) باقیمانده ۱۴ حشره‌کش ارگانوفسفره (OP) را در عسل، گرده و زنبور عسل (Apis mellifera L) و خطر بالقوه آنها برای کلنی‌های زنبور عسل را در مصر مورد بررسی قرار دادند. نمونه‌ها در بهار و تابستان سال ۲۰۱۳ از ۵ استان میانی مصر جمع‌آوری شدند و با روش LC/MS-MS بقایای سموم را اندازه‌گیری کردند. طبق نتایج، بیشترین سموم شناسایی شده شامل پروفونفوس، کلروپایریفوس، مالاتیون و دیازینون بودند، اما در مقابل، اتوپروپ، فورات، کومافوسوکلروپایریفوساکنون شناسایی نشدند. میزان باقیمانده سموم مشاهده شده در عسل از ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ در فصل بهار و از ۰/۰۲ تا ۰/۲ ppm در فصل تابستان گزارش گردید. در راستای مطالعه حاضر، این محققین گزارش کردند که آفت‌کش‌ها بیشتر در نمونه‌های جمع‌آوری شده در تابستان مشاهده شدند. همچنین نکته قابل توجه مطالعه این محققین آن بود که گرده‌ها از بیشترین مقادیر

مصر نشان دادند که مقادیر بقایای آفت‌کش‌ها در عسل در فصل پاییز و زمستان بسیار بالاتر از عسل فصل بهار و تابستان بود که می‌تواند به شرایط کشت و کار و آب و هوایی منطقه بستگی داشته باشد.

سم اورگانوفسفره نسبت به خود عسل برخوردار بودند. با این حال ناصر و همکاران (Nasser *et al*, 2024) اخیراً در مطالعات خود بر خلاف نتایج دیگران، روی ارزیابی طیف وسیعی از آفت‌کش‌ها و بقایای آن روی محصولات زنبور عسل شامل موم، گرده و عسل در نواحی مختلف

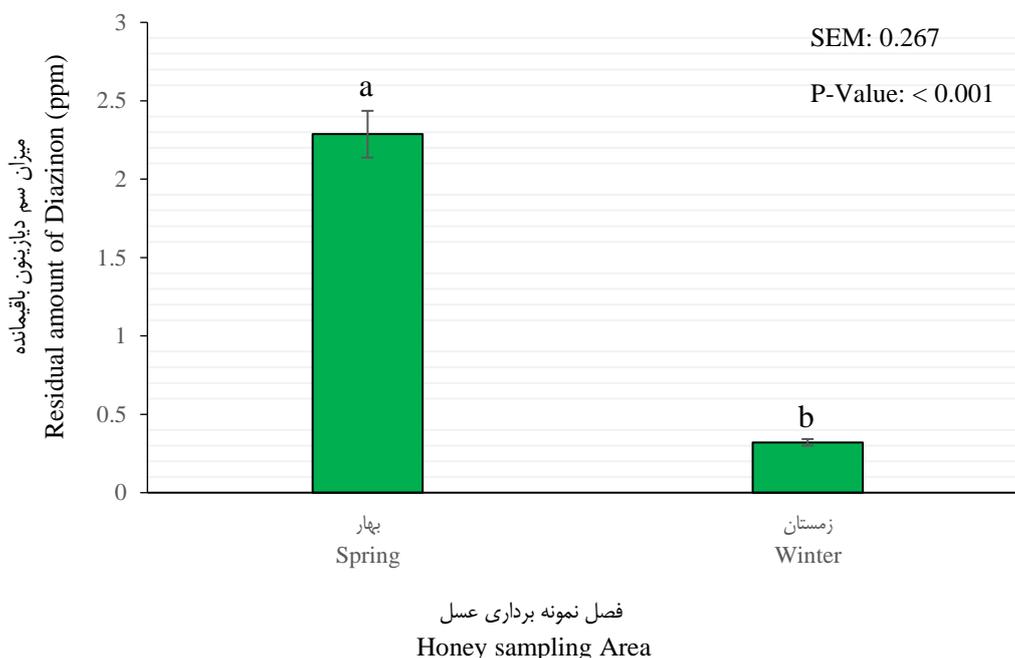


شکل ۵- غلظت باقیمانده سم دیازینون در عسل مناطق مختلف مانه و سملقان

Fig. 5. Concentration of residual diazinon in honey from different regions of Mane and Samalagan

اما در فصل پاییز کاهش فعالیت زنبورها و کمتر شدن منابع شهد، کاهش مصرف سموم در کشاورزی نسبت به فصول بهار و تابستان و گذشت زمان باعث تجزیه‌ی تدریجی باقی‌مانده برخی سموم در کندو می‌شود که همگی منجر به کاهش تدریجی باقیمانده سم در عسل می‌شود. اما در صورتی‌که زنبورها هنوز از منابع آلوده تغذیه کنند، مقداری از سموم ممکن است باقی بماند، اما میزان آن نسبت به تابستان کاهش می‌یابد. در زمستان زنبورها عمدتاً از ذخایر عسل خود تغذیه می‌کنند و تماس کمتری با منابع جدید شهد دارند. در این دوره سموم جدیدی به کندو وارد نمی‌شود و تجزیه تدریجی سموم باقی‌مانده در عسل و موم اتفاق می‌افتد. معمولاً باقیمانده سم در پایین‌ترین حد خود قرار دارد، مگر اینکه از تغذیه مصنوعی آلوده (مثلاً شربت شکر حاوی بقایای سموم) استفاده شود.

اثرات فصل بر میزان باقیمانده سموم در عسل به عوامل متعددی بستگی دارد که شامل الگوی مصرف آفت‌کش‌ها، شرایط آب‌وهوایی، چرخه فعالیت زنبورها، و میزان تجزیه سموم در محیط است. دلایل افزایش آلودگی سموم در عسل فصل بهار می‌تواند به اوج فعالیت زنبورها و جمع‌آوری شهد از گیاهان، استفاده گسترده از آفت‌کش‌ها در کشاورزی برای کنترل آفات بهاری طی چندین مرحله تکرار سم‌پاشی و احتمال تماس زنبورها با گل‌هایی که تازه سم‌پاشی شده‌اند، ارتباط داشته باشد. همچنین مطالعات نشان دادند که در تابستان نیز زنبورها همچنان در اوج فعالیت هستند و از گل‌های مختلفی تغذیه می‌کنند. برخی کشاورزان برای کنترل آفات در مزارع و باغات دوباره از سموم استفاده می‌کنند. دمای بالا ممکن است سرعت تبخیر یا تجزیه برخی سموم را افزایش دهد، اما برخی سموم پایدار باقی می‌مانند. لذا میزان باقیمانده سموم ممکن است افزایش یابد، به‌ویژه اگر کندوها نزدیک به زمین‌های کشاورزی باشند.



شکل ۶- غلظت باقیمانده سم دیازینون در عسل برداشت شده در فصل بهار و زمستان
Fig. 6. Concentration of residual diazinon in honey harvested in spring and winter

نتیجه گیری

زنبورداران، و غربالگری منظم عسل‌های تولیدی می‌تواند در کاهش مخاطرات ناشی از باقی‌مانده سموم مؤثر باشد. بررسی جایگزین‌های کم‌خطرتر برای دیازینون و تدوین مقررات منطقه‌ای نیز از دیگر اقدامات پیشنهادی در راستای ارتقای ایمنی غذایی و حفظ سلامت مصرف‌کنندگان است.

میزان مشارکت و منابع تأمین مالی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم **زینب رحیمی** تحت راهنمایی دکتر **وحید حکیم زاده** در دانشگاه آزاد قوچان به شماره ثبت ۱۶۲۸۸۶۰۸۴، تاریخ ثبت ۱۴۰۲/۱۱/۱۰، محل ثبت سامانه پژوهشیار و تأمین‌کننده منابع مالی آن شرکت تعاونی شهرداری سملقان می‌باشد.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، باقیمانده سم دیازینون در مناطق مختلف شهرستان مانه و سملقان بالاتر از حد مجاز اتحادیه اروپا مشاهده شد. مقدار باقیمانده سم در روستاهای بوربور و درکش بیشتر از روستاهای کشانک و چخماق لو بود. همچنین مقدار باقیمانده سم در عسل‌های برداشت شده در فصل بهار نسبت به عسل برداشت شده در فصل زمستان بسیار بالاتر بود که نشان‌دهنده استفاده بی‌رویه سموم در سم‌پاشی درختان و شکوفه‌ها در فصل بهار است. بنابراین با توجه به بالاتر بودن میزان باقیمانده سم دیازینون در عسل‌های برداشت‌شده نسبت به حد مجاز و نیز مشاهده افزایش این میزان در فصل بهار، پیشنهاد می‌شود نظارت بر مصرف آفت‌کش‌ها در مزارع اطراف زنبورستان‌ها به‌ویژه در فصل بهار تشدید شود. همچنین، آموزش کشاورزان در خصوص مصرف صحیح سموم، اعلام مناطق پرخطر به

References

- Agbohessi, P.T., Toko, I.I., Atchou, V., Tonato, R., Mandiki, S.N., & Kestemont, P. (2015). Pesticides used in cotton production affect reproductive development, endocrine regulation, liver status and offspring fitness in African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 167, 157–172. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.10.002>
- Al Naggar, Y., Codling, G., Vogt, A., Naiem, E., Mona, M., Seif, A., & Giesy, J.P. (2015). Organ phosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1876-2>

3. Ashraf, S.A., Mahmood, D., Elkhalfifa, A.E.O., Siddiqui, A.J., Khan, M.I., Ashfaq, F., Patel, M., Snoussi, M., Kieliszek, M., & Adnan, M. (2023). Exposure to pesticide residues in honey and its potential cancer risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 180, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114014>
4. Bagheri, F., Vatandoost, M., Shayeghi, M., Rassi, Y., Hanafi-Bojd, A.A., Rahimi-Foroushani, A., Razavi, A., & Nikpour, F. (2019). Detection of diazinon residue in honey and honey bee (*Apis mellifera*) in Bandar-Abbas and Meshkinshahr, Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 13(2), 185-190. <https://doi.org/10.18502/jad.v13i2.1244>
5. Bargańska, Z., Ślebioda, M., & Namieśnik, J. (2014). Determination of pesticide residues in honeybees using modified QUEChERS sample work-up and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecules*, 19, 2911-2924. <https://doi.org/10.3390/molecules19032911>
6. Ben Mukiiibi, S., Nyanzi, S.A., Kwetegyeka, J., Olisah, C., Taiwo, A.M., Mubiru, E., Tebandeke, E., Matovu, H., Odongo, S., Abayi, J.J.M., Chelangat Ngeno, E., Sillanpää, M., & Ssebugere, P. (2021). Organochlorine pesticide residues in Uganda's honey as a bioindicator of environmental contamination and reproductive health implications to consumers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 214, 112094. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112094>
7. Berg, C.J., King, H.P., Delenstarr, G., Kumar, R., Rubio, F., & Glaze, T. (2018). Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer off-site by bees. *PLoS One*, 13(7), e0198876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198876>
8. Blasco, C., Lino, C.M., Picó, Y., Pena, A., Font, G., & Silveira, M.I.N. (2004). Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. *Journal of Chromatography A*, 1049, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.049>
9. Brander, S.M., Gabler, M.K., Fowler, N.L., Connon, R.E., & Schlenk, D. (2016). Pyrethroid pesticides as endocrine disruptors: Molecular mechanisms in vertebrates with a focus on fishes. *Environmental Science Technology*, 50, 8977-8992. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02253>
10. Darko, G., & Akoto, O. (2008). Dietary intake of organophosphorus pesticide residues through vegetables from Kumasi, Ghana. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3703-3706. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.049>
11. Darko, G., AddaiTabi, J., Kodwo Adjaloo, M., & Sheringham, B.L. (2017). Pesticide residues in honey from the major honey producing forest belts in Ghana. *Journal of Environmental and Public Health*, 20(17), 1-6. <https://doi.org/10.1155/2017/7957431>
12. Demirhan, O., Muhsin, A., Saliha, C., Nur, U., Hetinel, N., Tunç, E., & Demirhan, O.F. (2019). Chromosomal Aberrations in agricultural farmers exposed to pesticides. *Advances in Toxicology and Toxic Effects*, 3, 15-22. <https://doi.org/10.17352/atte.000005>
13. Eissa, F., El-Sawi, S., & Zidan, N.E. (2014). Determining pesticide residues in honey and their potential risk to consumers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 23(5), 1573-1580.
14. Febvey, O., Schüz, J., & Bailey, H.D. (2016). Risk of central nervous system tumors in children related to parental occupational pesticide exposures in three European case-control studies. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 58(10), 1046-1052. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000852>
15. Jimenez, J.J., Bernal, J., & Lorente, J. (2000). Determination of rotenone residues in raw honey by solid-phase extraction and highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 871, 67-73. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01063-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01063-8)
16. Gunat, J., Lekduhur, P.O.O., Eneji Ishaq, S., & Rufus, S.A. (2021). Analysis of selected pesticide residues and heavy metals in honey obtained from plateau state, Nigeria. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 11, 1-13. <https://doi.org/10.4236/jasmi.2021.111001>
17. Kamkar, A., & Khodabakhshian, S. (2017). Determination of the total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of Sabalan Honey. *Journal of Veterinary Research*, 72(1), 61-53. (In Persian).
18. Khazaei, S.H., Khorasani, N., Talebi Jahromi, K., & Ehtesham, M. (2010). Investigation of the groundwater contamination due to the use of diazinon insecticide in Mazandaran province (Case Study: Mahmoud Abad City). *Journal of Natural Environment*, 63(1), 23-32. (In Persian)
19. McDougal, A., & Safe, S. (1998). Induction of 16 α -2-hydroxyestronone metabolite ratios in MCF-7 cells by pesticides, carcinogens, and antiestrogens does not predict mammary carcinogens. *Environ Health Perspect*, 106, 203-206. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106203>
20. Ntow, W.J. (2008). The use and fate of pesticides in vegetable-based agroecosystems in Ghana, *Taylor and Francis/Balkema. The Netherlands*. p. 120. <https://doi.org/10.18174/1586>
21. Research and Training Center of the Agricultural Jihad Organization, (2024). <https://nkhorsan.areeo.ac.ir/falR/nkhorsan.areeo.ac>
22. SAS Institute. (2009). SAS/STAT Users Guide. SAS Inst., Inc., Cary, NC.

23. Shakoori, Z., Salaseh, E., Mehrabian, A.R., Minai Tehrani, D., Famil Dardashti, N., & Salmanpour, F. (2024). The amount of antioxidants in honey has a strong relationship with the plants selected by honey bees. *Scientific Reports–Nature*, 14, 351. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-51099-9>
24. Sheldon, M., Pinion C. Jr., Klyza, J., & Zimeri, A.M. (2019). Pesticide contamination in central Kentucky urban honey: a pilot study. *Journal of Environmental Health*, 82(1), 8-13. WOS:000473553900001
25. Sturza, J., Silver, M.K., & Xu, L. (2016). Prenatal exposure to multiple pesticides is associated with auditory brainstem response at 9 months in a cohort study of Chinese infants. *Environment International*, 92, 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.035>
26. Taghavi, K., Naghipour, D., Mohagheghyan, A., & Jamali, M. (2007). Determine the amount of three pesticides in the Sefid Rood River and drinking water in Rasht in 2006. 12th National Conference on Environmental Health. Shahid Beheshti University of Medical Sciences. (In Persian)
27. Talebi Jahromi, K., Ebadollahi, A.R., MirHadi, S.A., Madani, R., & Emami, B. (2001). Determination of Coumaphos residue in honey from some apiaries in Tehran province. *Applied Entomology and Phytopathology*, 6(8), 73-83.
28. Watermann, B.T., Albanis, T.A., Galassi, S., Gnass, K., Kusk, K.O., Sakkas, V.A., & Wollenberger, L. (2016). Effects of anti-androgens cyproterone acetate, linuron, vinclozolin, and p,p'-DDE on the reproductive organs of the copepod *Acartia tonsa*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 51(13), 1111–1120. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1199769>
29. Zacharis, C.K., Rotsias, I., Zachariadis, P.G., & Zotos, A. (2012). Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides residues in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 134, 1665–1672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.073>

The Effect of Extraction Conditions on the Yield of Tannins and Phenolics from Acorn Shell and Cupule

Z. Zarezade¹, A. Forouhar², H. Saberian^{3*}

1- Department of Chemical Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

2- Department of Food Science and Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

3- Department of Agro-Industrial Waste Processing, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR) at IUT, Isfahan, Iran

(*- Corresponding Author Email: Saberian@acecr.ac.ir)

Received: 10.05.2025

Revised: 09.06.2025

Accepted: 17.06.2025

Available Online: 18.08.2025

How to cite this article:

Zarezade, Z., Forouhar, A., & Saberian, H. (2025). The effect of extraction conditions on the yield of tannins and phenolics from acorn shell and cupule. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(4), 463-476. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.93451.1432>

Introduction

Acorn, a traditional component of the human diet, is a rich source of bioactive compounds, especially polyphenols and tannins, which possess antioxidant, antibacterial, and antiviral properties. These compounds have extensive applications in the food, pharmaceutical, and chemical industries. However, their yield and purity depend highly on extraction conditions, including solvent type and polarity, temperature, extraction time, particle size, and solid-to-solvent ratio. Solvent extraction is the most widely used among various extraction techniques due to its simplicity and efficiency. Given the limited data on tannins from native acorns in Chaharmahal and Bakhtiari Province, this study aims to evaluate the effect of solvents with varying polarity and pH on tannin extraction. The purity of extracted tannins was also determined using HPLC. The findings of this research could serve as a basis for optimizing the extraction of valuable compounds from acorn and facilitating the industrial utilization of these native resources.

Materials and Methods

To extract tannins from acorn shell, cupule, and shell-cupule mix, the samples were ground and passed through a 40-mesh sieve. Extraction was carried out using three types of solvents: distilled water, 40% ethanol solution, and 0.22% sodium hydroxide solution. The process was performed at two temperatures (60°C and 90°C) with a solid-to-liquid ratio of 1:10, for one hour under continuous stirring. The resulting extracts were filtered and then dried at 50°C. To determine the actual extraction yield in alkaline-treated samples, the amount of sodium hydroxide was quantified by titration with HCl, and its mass was subtracted from the dry extract weight to obtain the real extraction yield. Total phenolic content was measured using the Folin-Ciocalteu method by determining absorbance at 760 nm. Tannin content was estimated by subtracting non-tannin phenolics from total phenolics using PVPP as an adsorbent. In this method, PVPP was added to the extract, and after centrifugation, non-tannin phenolics were separated, allowing tannin content to be calculated by difference. HPLC analysis was performed using a C18 column and a detector set at 280 nm to confirm the presence of tannins. Tannic acid was used as the standard, and separation was achieved using a gradient of formic acid and acetonitrile. Statistical analyses were conducted using SPSS, and graphs were plotted using Excel.

Results and Discussion

The effects of solvent type and extraction temperature were examined for tannin extraction. The results indicated that increasing the temperature from 60°C to 90°C enhanced extraction yields for both distilled water and 0.22%



sodium hydroxide solution. However, the effect of temperature increase was significantly more pronounced under alkaline conditions. Higher temperatures improve solvent penetration, reduce viscosity, and accelerate the diffusion of bioactive compounds, which markedly boosts tannin extraction in combination with an alkaline solvent. Regarding solvent type, ethanol demonstrated superior performance in tannin extraction. Due to its dual nature (polar and non-polar), ethanol efficiently extracted a broad spectrum of phenolic compounds. The average tannin yield using ethanol was around 51.41%, which surpassed other treatments, including alkaline extraction at high temperature (48.06%). This highlights ethanol's strong capacity to extract condensed tannins, which are abundant in acorns. Moreover, ethanol tended to extract fewer impurities, such as carbohydrates, than polar solvents like sodium hydroxide, thereby increasing the purity of the tannin extracts. Further analysis of the total phenolic content revealed that the source material (cupule or shell) and solvent type significantly influenced the extraction yield. The highest total phenolic content (61.22%) was obtained from the cupule using sodium hydroxide, significantly exceeding other materials and treatments. This confirms the cupule's richness in phenolic compounds, though given its lower proportion in the acorn structure, using a blend of cupule and shell is more practical. Additionally, ethanol and sodium hydroxide achieved higher yields than water, underscoring the beneficial role of alkaline and semi-polar solvents in phenolic compound release. Further specific analysis of tannin extraction also showed that ethanol-based treatments yielded the highest results. The use of 40% ethanol nearly doubled the tannin yield compared to aqueous and alkaline treatments. This high efficiency is attributed to the better solubility of tannins in polar-organic solvents like ethanol. On the other hand, extraction with sodium hydroxide at lower temperatures (60°C) resulted in lower yields, emphasizing the combined effect of temperature and solvent on extraction efficiency. HPLC analysis for tannic acid quantification confirmed that the tannin content of the shell-cupule mix and cupule alone was 48.06% and 61.23%, respectively. These findings emphasize the practical value of using a shell-cupule mixture as an industrial tannin source, as it not only contains a substantial amount of tannin but also offers better availability and a higher weight proportion compared to the cupule alone.

Conclusion

This study highlights the significant influence of extraction conditions, particularly solvent type and temperature, on the extraction yield of tannins and phenolic compounds from acorn resources. Alkaline extraction at elevated temperatures was more effective for tannin extraction from the shell-cupule mix, while ethanol exhibited high efficiency due to its semi-polar nature. Although the acorn cupule is richer in total phenolics, the higher abundance of the cupule-shell blend in the fruit makes it a more practical target for industrial tannin production.

Keywords: Acorn, Polyphenolic compounds, Solvent extraction, Tannin

تأثیر شرایط استخراج بر بازده تانن و ترکیبات فنولی پوست و جفت بلوط

زهرا زارع زاده^۱ - علی فروهر^۲ - حامد صابریان^{۳*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۷

چکیده

این پژوهش با هدف بهینه‌سازی استخراج تانن و ترکیبات فنولی از بلوط (پوست و جفت) انجام شد. در مرحله نخست، بازده استخراج عصاره فنولی از مخلوط پوست و جفت با استفاده از حلال‌های مختلف (آبی، قلیایی و اتانول) و در دو دمای ۶۰ و ۹۰ درجه سلسیوس مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس، محتوای فنول کل و تانن عصاره‌های استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش دما، به‌ویژه در حضور حلال قلیایی (سود ۰/۲۲٪)، بازده استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت را به‌طور معنی‌داری از ۳۰/۸۰ به ۳۹/۶۴٪ افزایش داد. اتانول نیز در مقایسه با آب، بازده استخراج بالاتری را نشان داد. آنالیز ترکیبات فنولی کل نشان داد که جفت بلوط به‌طور قابل توجهی غنی‌تر از پوست است و استخراج با اتانول و استخراج قلیایی در دمای بالا، بالاترین بازده فنول کل را به همراه داشت. با این حال، برای استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت، اتانول با بازده ۵۱/۴۱٪ کارآمدترین حلال بود. ارزیابی تانن با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مقادیر بالاتری را نسبت به روش‌های شیمیایی نشان داد و میزان تانن در مخلوط پوست و جفت (۴۸/۰۶٪) و جفت (۶۱/۲۳٪) را تأیید کرد.

واژه‌های کلیدی: استخراج با حلال، بلوط، تانن، ترکیبات پلی فنولی

مقدمه

پوشانده است (Salarkarimi, Varidi, & Varidi, 2019). مساحت جنگل‌های کهگیلویه و بویراحمد، بیش از ۸۷۰ هزار هکتار می‌باشد و ۸۰ درصد جنگل‌های آن را درختان بلوط تشکیل می‌دهد (حدود ۷۰ میلیون اصله درخت). سالانه حدود ۲۶۰ هزار تن بلوط در جنگل‌های استان کهگیلویه و بویراحمد تولید می‌شود که حدود ۷۰ هزار تن آن به صورت سنتی برداشت می‌شود. استان‌های ایلام، چهارمحال و بختیاری، فارس، کردستان و لرستان نیز درصد قابل توجهی از جنگل‌های بلوط کشور را در خود جای داده‌اند. هر درخت بلوط در سال‌های میوه‌دهی خود حداقل ۱۵ کیلوگرم میوه تولید می‌کند (Ghaderi, Ghahfarokhi, Sadeghi Mahoonak, Alami, Azizi, & Ghorbani, 2012) و با توجه به عدم باردهی همه درختان، میزان تولید سالیانه میوه بلوط در کشور حداقل حدود یک میلیون تن می‌باشد. تنوع

بلوط به‌عنوان یکی از منابع غذایی مهم از دوران باستان در رژیم غذایی انسان نقش داشته است. این میوه در قاره‌های مختلف از جمله اروپا، آسیا، آفریقای شمالی و آمریکای شمالی و شرقی به‌صورت گسترده مصرف می‌شود و در برخی مناطق تا ۲۰ درصد از سبد غذایی جوامع را تشکیل می‌دهد (Iranmanesh & Goujani, 2015). در ایران، وارپته های *Q. macranthera*، *Q. libani*، *Q. infectoria*، *Q. brantii* و *Q. castaneifolia* به‌طور گسترده پراکنده شده‌اند (Pourhashemi & Sadeghi, 2020). جنگل‌های بلوط به‌طور گسترده در نواحی غرب، جنوب غرب، شمال و شمال غرب گسترش یافته و بیشترین تعداد این درختان در دامنه رشته کوه‌های زاگرس و در غرب دیده می‌شوند. ۴/۵ میلیون هکتار از ۵/۵ میلیون هکتار جنگل‌های زاگرس را درختان بلوط

۱- گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- گروه پژوهشی فراوری پسماند و ضایعات کشاورزی، جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

* نویسنده مسئول : (Email: Saberian@acecr.ac.ir)

انتخابی بودن، حلالیت ترکیب هدف، هزینه و ایمنی انجام شود. به‌طور کلی، حلال‌هایی با قطبیت نزدیک به ترکیب هدف، بازده استخراج بالاتری دارند (Zhang, Lin, & Ye, 2018).

استخراج به‌عنوان گام اولیه در جداسازی ترکیبات ارزشمند از مواد خام است و برای استخراج ترکیبات، از روش‌های متنوعی همچون استخراج با حلال، تقطیر، پرس مکانیکی، و تصعید بهره گرفته می‌شود. در این میان، استخراج با حلال به‌دلیل سادگی و کارایی بالا، پرکاربردترین روش محسوب می‌شود. مکانیسم این فرآیند شامل سه مرحله اصلی است: نفوذ حلال به درون ماتریس جامد ماده خام، حل شدن ترکیبات هدف در حلال و انتشار ترکیبات حل شده به بیرون از ماتریس. در نهایت، ترکیبات استخراج شده جمع‌آوری و خالص‌سازی می‌شوند. کارایی این فرآیند به عواملی مانند دمای استخراج، زمان تماس و نوع حلال وابسته است (Du, Zhao, Song Zhang, & Wang, 2011; Zhu et al., 2024).

حیدری و زارعی (Heidari & Zarei, 2016) در پژوهشی میزان تانن موجود در درختان بلوط مناطق جنگلی در ناحیه زاگرس یاسوج را به کمک فراصوت و حلال آب بررسی نموده و نشان دادند که پوست درخت بلوط دارای ۵ تا ۷ درصد تانن می‌باشد (Heidari & Zarei, 2016). همچنین جهان‌شاهی و همکاران (Jahanshahi, Tabarsa, 2016) در پژوهشی میزان تانن موجود در پوست درختان بلوط منطقه جنگلی استان گلستان را با استفاده از حلال‌های آب، متانول، و مخلوط آب-متانول (۱:۱) و به کمک دستگاه سوکسله مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان تانن استخراج شده (حدود ۱۴٪) مربوط به حلال آب-متانول (۱:۱) بود (Jahanshahi et al., 2011). در پژوهشی دیگر ترکمان و همکاران (Torkaman & Seyam, 2009) میزان تانن موجود در پوست پنج گونه درختی شامل گردوی سیاه، بلوط، توسکا، ممرز و راش را بررسی نمودند. نتایج نشان داد بیشترین میزان مواد استخراجی (۲۹/۸٪) و تانن (حدود ۵۰٪ از مواد استخراجی) مربوط به پوست گردوی سیاه بود، درحالی که کمترین میزان به راش (۱۶/۷٪ مواد استخراجی) تعلق داشت (Torkaman & Seyam, 2009). با توجه به کمبود داده‌های علمی در مورد استخراج تانن از بلوط‌های بومی منطقه چهارمحال و بختیاری (*Quercus brantii*) (Heidari & Zarei, 2016)، این پژوهش در راستای بررسی تأثیر انتخاب حلال (از منظر قطبیت و pH) و دمای استخراج مناسب در مرحله استخراج طراحی شد. همچنین، تأثیر حلال‌های مختلف با قطبیت و pH متفاوت بر بازده استخراج تانن ارزیابی شد. علاوه بر این، خلوص تانن‌های استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد سنجش قرار گرفت.

کاربردهای بلوط در صنایع غذایی قابل توجه است؛ از جمله تولید نان، کیک، نوشیدنی‌های مشابه قهوه (Claudia, 2013) و همچنین فرآورده‌های نوینی مانند نودل، توفو و سس بر پایه بلوط (Pasqualone et al., 2019). با وجود تولید سالانه حدود یک میلیون تن میوه بلوط در ایران، این محصول عمدتاً به‌عنوان خوراک دام استفاده می‌شود. البته پژوهش‌های جدید نشان‌دهنده پتانسیل بلوط برای استخراج ترکیبات ارزشمندی مانند پلی‌فنول‌هاست (Das, Islam, Faruk, Ashaduzzaman, & Dungani, 2020).

پلی‌فنول‌ها به‌عنوان ترکیبات زیست‌فعال نقش کلیدی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی، از جمله بیماری عروق کرونر و سکتة قلبی ایفا می‌کنند. مکانیسم این اثرات عمدتاً به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد نسبت داده می‌شود (Bertelli et al., 2021). این ترکیبات که متنوع‌ترین گروه آنتی‌اکسیدان‌های غذایی محسوب می‌شوند، با مقدار مصرف توصیه‌شده روزانه حدود ۱ گرم، از اسیدهای فنلی ساده تا تانن‌های پلیمریزه شده را شامل می‌شوند (Pietta, Minoggio, & Bramati, 2003). تانن‌ها به‌عنوان دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی، نقش دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا، حشرات و جانوران گیاهخوار دارند (Das et al., 2020). میزان این ترکیبات در گیاهان متأثر از عوامل جغرافیایی، گونه‌شناسی و سن درخت است و معمولاً در پوست درختان غلظت بالاتری دارد. ساختار شیمیایی تانن‌ها شامل گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل است که قابلیت تشکیل کمپلکس با ماکرومولکول‌ها را فراهم می‌کند (Dehghanian et al., 2022). از جمله منابع غنی تجاری تانن‌ها می‌توان به پوست درختان بلوط و شاه‌بلوط اشاره کرد که به‌دلیل محتوای بالای این ترکیبات از اهمیت اقتصادی برخوردارند.

در مقیاس صنعتی، استخراج با آب (به روش خیساندن) برای جداسازی ترکیبات از پوست درختان رایج است (Bitwell, Indra, Luke, & Kakoma, 2023). تانن‌ها به‌دلیل خواص منحصر به فرد، کاربردهای فراوانی در صنایع گوناگون دارند. این کاربرد‌ها شامل استفاده از این ترکیبات به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و عامل شفاف‌کننده در نوشیدنی‌ها، استفاده در تولید لاستیک (به‌عنوان منعقدکننده پلیمرها) و چسب، استفاده در برخی داروها با اثربخشی در مهار ویروس HIV، فعالیت ضدتوموری، ضدباکتریایی، و ضدویروسی (Khanbabae & Van Ree, 2001). با وجود کاربردهای گسترده، ناهمگن بودن ساختار تانن‌ها و وجود ناخالصی‌ها در فرآیند استخراج، چالش‌های عمده‌ای برای تولید تجاری ایجاد می‌کند. عواملی مانند اندازه ذرات، دما، فشار، زمان استخراج، نوع حلال، و نسبت جامد به حلال بر کیفیت و خلوص محصول نهایی تأثیر مستقیم دارند (Das et al., 2020). انتخاب حلال مناسب نیز از جمله شاخص‌های کلیدی است که باید بر اساس قطبیت،

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی مواد اولیه

استخراج تانن از پوست، جفت و مخلوط پوست و جفت بلوط منطقه چهارمحال و بختیاری (*Quercus brantii*) انجام شد. بنابراین در ابتدا،

پوست و جفت بلوط جدا شد و مطابق شکل ۱، سه نمونه بلوط بدون پوست، جفت بلوط و میوه بلوط حاصل شد.

برای کاهش اندازه ذرات و ایجاد یکنواختی سه نمونه پوست، جفت و مخلوط پوست و جفت، از آسیاب (مدل TS-2500 ساخت شرکت توس شکن خراسان، ایران) و الک شماره ۴۰ استفاده شد.



شکل ۱- قسمت‌های مختلف بلوط، الف) پوست بلوط، ب) جفت بلوط و ج) میوه بلوط
Fig. 1. Different parts of oak: (a) acorn shell, (b) acorn cupule, and (c) acorn fruit (acorn)

استخراج

فرآیند استخراج با استفاده از محلول سود ۰/۲۲ درصد، آب مقطر و محلول ۴۰ درصد اتانول در شرایط دمایی مطابق جدول ۱ استفاده شد. نسبت جامد به مایع ۱ گرم به ۱۰ میلی‌لیتر و زمان استخراج ۱ ساعت

به همراه هم زدن مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه محلول استخراج شده از کاغذ صافی عبور داده و عصاره استخراج شده در دمای ۵۰ درجه سلسیوس در آون خشک شد (Rahnemoun, Sarabi Jamab, Javanmard Dakheli, Bostan, & Safari, 2018).

جدول ۱- حلال‌های مورد استفاده و دمای استخراج تانن

ردیف No.	نوع حلال Distilled water	دما Temperature (°C)
1	آب خالص Distilled water	90
2	آب خالص Distilled water	60
3	محلول ۴۰ درصد اتانول 40% ethanol solution	60
4	محلول آبی ۰/۲۲ درصد هیدروکسید سدیم 0.22% aqueous sodium hydroxide solution	90
5	محلول آبی ۰/۲۲ درصد هیدروکسید سدیم 0.22% aqueous sodium hydroxide solution	60

تعیین بازده استخراج

پس از انجام استخراج و عصاره‌گیری، در مورد نمونه استخراج شده با سود، به‌منظور تعیین میزان هیدروکسید سدیم موجود در محلول

عصاره، ۲۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره با هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار تیترا شد و میزان هیدروکسید سدیم موجود از رابطه زیر محاسبه شد:

$$N_{\text{NaOH}} \times 25 = 0/1 \times V_{\text{HCl}}$$

اندازه‌گیری تانن به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی

بالا

همچنین برای تعیین ترکیبات تاننی در عصاره استخراجی از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. برای این آزمایش، ۱ میلی‌گرم عصاره در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید. سپس این مخلوط با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد و به سیستم HPLC تزریق گردید. تانیک اسید به‌عنوان نشانگر شیمیایی در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در حالت فاز معکوس روی ستون C18 با استفاده از روش شستشوی تدریجی دوگانه و آشکارساز ماوراء بنفش انجام شد. سیستم گرادیدانی شامل دو حلال بود: حلال A شامل ۰/۱ درصد اسید فرمیک و حلال B نیز محلول ۰/۱ فرمیک به همراه استونیتریل با نرخ جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه پمپ شدند. فرآیند گرادیدان از ۰/۹۵٪ محلول A آغاز شد و در نهایت به ۰/۵٪ محلول B رسید. دمای ستون در ۳۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. پیک‌های نمونه با محلول استاندارد تانیک اسید در ۲۸۰ نانومتر که از آزمایش به‌دست آمد، مقایسه شدند. غلظت تانیک اسید با استفاده از منحنی‌های کالیبراسیون مناسب محاسبه شد (Arina & Harison, 2019).

روش آماری تحلیل داده‌ها

نتایج آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0.05$) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 انجام شد.

نتایج و بحث

آنالیز وزنی قسمت‌های مختلف بلوط

پس از جداسازی قسمت‌های مختلف بلوط، هر کدام وزن شده است. وزن هر قسمت از بلوط و در نتیجه درصد وزنی هر قسمت در جدول ۲ بیان شده است. طبق نتایج بیان شده در جدول ۲، حدود ۳۰٪ از مخلوط پوست و جفت را جفت تشکیل داده است که عدد قابل توجهی است.

در مرحله نخست، از مخلوط پوست و جفت برای استخراج استفاده شد. ارزیابی بازده استخراج تانن از نمونه‌ها با استفاده از حلال‌ها و شرایط مختلف استخراج، بینش ارزشمندی درباره تأثیر قطبیت حلال، اثرات دما و نقش pH در مورد بازده استخراج از منابع کشاورزی ارائه می‌کند (Zhang et al., 2018). نتایج حاصل از بررسی تأثیر دما و نوع حلال بر استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت (شکل ۲)، نشان داد که

سپس با ضرب مولاریته هیدروکسید سدیم در جرم مولکولی آن و حجم عصاره بدست آمده از استخراج، وزن هیدروکسید سدیم موجود در عصاره تعیین شد. با کم کردن وزن هیدروکسید سدیم محاسبه شده از وزن عصاره خشک، وزن عصاره خالص بدست آمده با حلال هیدروکسید سدیم، محاسبه شد. در سایر تیمارها (که از حلال‌هایی غیر از سود استفاده شده بود)، عصاره توزین شد تا در ادامه برای محاسبه بازده استخراج مورد استفاده قرار گیرد. بازده استخراج در تیمارهای مورد بررسی، با تقسیم وزن عصاره خالص در هر نمونه بر میزان ماده اولیه بر اساس فرمول زیر تعیین شد:

$$\text{بازده استخراج} = \frac{\text{گرم عصاره بدست آمده}}{\text{گرم ماده اولیه}} \times 100$$

اندازه‌گیری میزان فنول کل

۵۰ میکرولیتر از محلول عصاره استخراج شده با ۱۲۵۰ میکرولیتر از فولین سیوکالتو رقیق شده با آب (۵ برابر رقیق شده) مخلوط شد و به مدت ۱ دقیقه در محیط تاریک نگه داری شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد کربنات سدیم به آن اضافه شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. در نهایت میزان فنول کل بر اساس میلی‌گرم تانیک اسید به ازای هر گرم نمونه گزارش شد. برای منحنی کالیبراسیون از محلول تانیک اسید با غلظت‌های ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد (Payab, Chaichi, Nazari, & Maleki, 2019).

اندازه‌گیری تانن‌ها با استفاده از پلی‌ونیل پلی‌پروپیلین

(PVPP)

۰/۰۵ گرم پودر PVPP به ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر محلول عصاره اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط مخلوط شد و ۳۰ دقیقه زمان ماند داده شد تا تانن‌ها با PVPP کمپلکس تشکیل دهند. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. در این حالت PVPP همراه با تانن‌ها رسوب می‌کند و ترکیبات غیرتاننی فنولیک در محلول باقی می‌مانند. پس از سانتریفیوژ کردن، از روشی که در تعیین میزان فنول کل بکار گرفته شد، استفاده و ترکیبات فنول کل (این بار بدون ترکیبات تانن) اندازه‌گیری شد. از اختلاف فنول کل، با و بدون افزودن PVPP در وزن یکسان از نمونه، میزان تانن مشخص می‌شود (Valizadeh Yonjalli, Mirzaei Aghjehgheshlagh, Mahdavi, Navidshad, & Staji, 2020).

می‌کند. نقش قدرت یونی در فرآیند استخراج تانن قابل توجه است، زیرا بر حلالیت و برهم‌کنش‌های مولکولی تأثیر می‌گذارد (Hosseinzadeh, Khorsandi, & Hemmaty, 2013). قبلاً بلکول و همکاران (Blackwell, Herald, Bean, & Gadgil, 2012) نیز نشان داده بودند که شرایط قلیایی نسبت به استفاده از آب مقطر بازده بالاتری را در استخراج ترکیبات فنولی از سورگم نشان داده است که نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند. سود در محیط استخراج، احتمالاً از طریق افزایش انحلال ترکیبات فنولی، شکستن پیوندهای دیواره سلولی و آزادسازی بهتر تانن‌ها، اثر قابل توجهی در فرآیند استخراج دارد. استفاده از اتانول به‌عنوان حلال نیز بازده بالاتری را نسبت به استفاده از آب نشان می‌دهد. این تأثیر را می‌توان به ماهیت شیمیایی این حلال‌ها از منظر میل به استخراج طیف گسترده‌ای از ترکیبات فنولی براساس قطبیت آنها، ربط داد. ترکیبات فنولی، گستره وسیعی از ترکیبات با ساختارهای مختلف و اغلب قطبی هستند اگرچه به دلیل اتصال آنها با مولکول‌های غیر قطبی، ممکن است این دسته از ترکیبات فنولی با حلال‌هایی با قطبیت کمتر بهتر استخراج شوند. آزاده دل و همکاران (Azade del, Hanachi, & Saboora, 2016) نشان دادند که استخراج ترکیبات فنولی از پسته با افزایش قطبیت حلال کاهش پیدا می‌کند.

بنابراین باتوجه به بازده بالای استخراج سود، حلال سود ۰/۲۲ درصد در دمای ۹۰ درجه برای استخراج ترکیبات پوست و جفت به صورت منفرد، استفاده شد. مطابق شکل ۲-ب، مشخص است که میزان ترکیبات قابل استخراج فنولی در جفت بلوط به شکل معنی‌داری از پوست بلوط بیشتر است. این مشاهده و از سویی دیگر میزان کمتر جفت (۹/۶٪) در ساختار میوه بلوط، استفاده مخلوط پوست و جفت بلوط (۳۱/۹۵٪) را با هدف استخراج تانن توجیه می‌کند زیرا پس از پوست گیری بلوط با دستگاه، مخلوط پوست و جفت حاصل می‌شود که سهولت دسترسی دارد و می‌تواند برای استخراج استفاده شود.

ترکیبات فنولی کل

در طی فرآیند استخراج بسته به شرایط فرآیند، ناخالصی‌هایی نیز وارد محصول می‌گردد. میزان ناخالصی‌ها به عوامل فرآیند از قبیل اندازه ذرات، دما، فشار، زمان، نوع حلال و نسبت جامد به حلال بستگی دارد. قبلاً مشخص شده است که دما و نسبت جامد به حلال، محتوای کربوهیدرات را در تانن‌های استخراج شده کنترل می‌کند (Das et al., 2020). از این رو، استخراج تانن‌ها باید با کنترل دقیق عوامل عملیاتی انجام شود.

افزایش دما از ۶۰ به ۹۰ درجه سلسیوس منجر به افزایش بازده استخراج در هر دو نوع حلال شد، اما شدت این افزایش با استفاده از حلال قلیایی (سود ۰/۲۲ درصد) نسبت به آب مقطر بیشتر بود. دماهای بالاتر در فرآیند استخراج منجر به افزایش حلالیت ترکیبات زیست فعال شده و سرعت انتشار این ترکیبات از ماده اولیه به درون حلال را نیز بهبود می‌دهد (Spigno, Tramelli, & De Faveri, 2007).

جدول ۲- آنالیز وزنی قسمت‌های مختلف بلوط

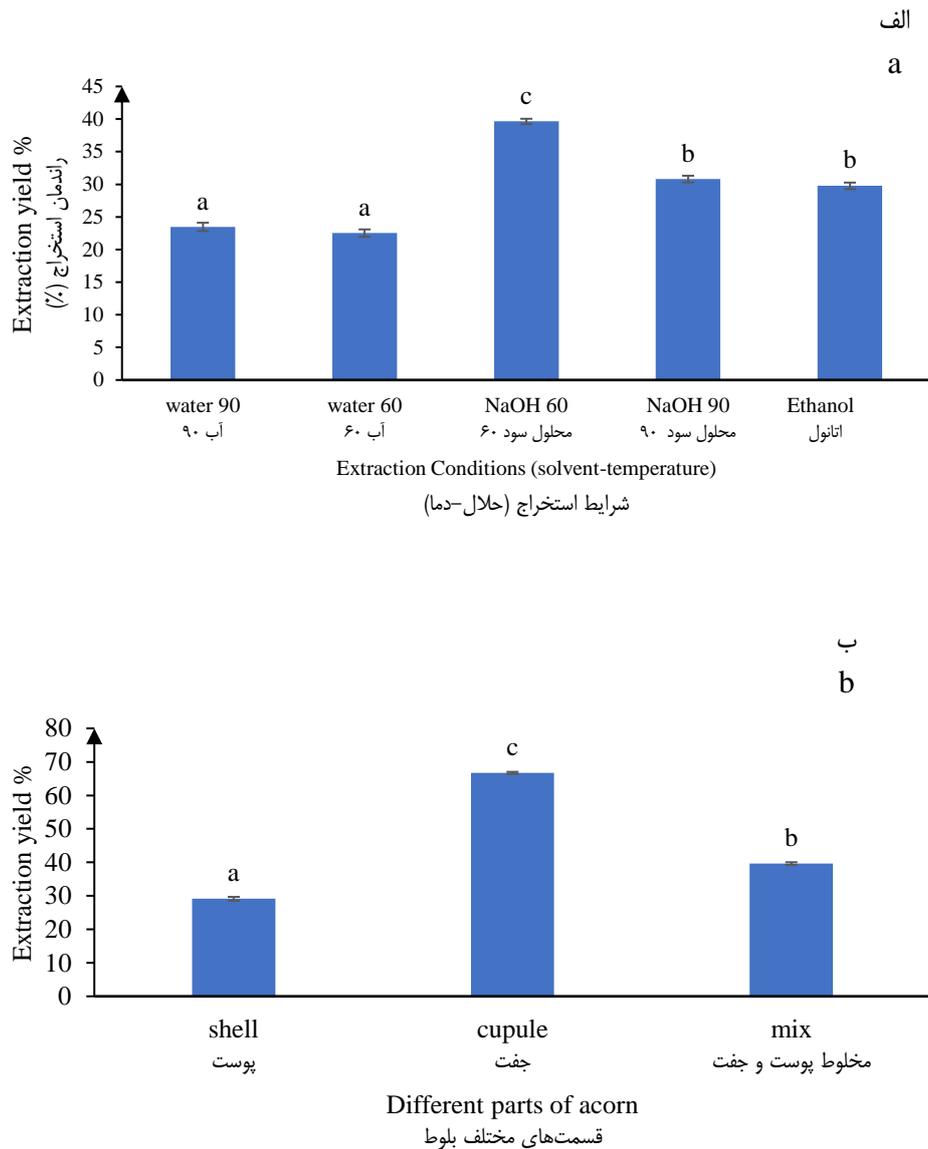
Table 2- Weight analysis of different acorn parts

نمونه Sample	درصد وزنی Weight percentage
پوست بلوط Acorn shell	22.37 ± 0.50
جفت بلوط Acorn cupule	9.60 ± 1.90
مخلوط پوست و جفت Mixed of shell and cupule	31.95 ± 1.63
مغز بلوط Acorn kernel	67.25 ± 1.62

هنگامی که حلال مورد استفاده آب مقطر بود، با افزایش دما، بازده استخراج از ۲۲/۵۲ به ۲۳/۴۷ واحد افزایش یافت. این تفاوت هرچند از نظر عددی قابل مشاهده است، اما از نظر آماری معنی‌دار نبود که می‌تواند ناشی از محدودیت در حلالیت تانن‌ها در آب خالص در این بازه دمایی یا پایداری ساختارهای گیاهی در برابر آب داغ باشد. در مقابل، در تیماری که از حلال سود ۰/۲۲ درصد استفاده کرد، بازده استخراج از ۳۰/۸۰ به ۳۹/۶۴ واحد افزایش یافت، که افزایشی کاملاً معنی‌دار محسوب می‌شود. این یافته نشان می‌دهد که در حضور یک حلال قطبی دما می‌تواند نقشی مهم در برهمکنش حلال با بافت لیگنوسولوزی ماده اولیه در راستای آزاد سازی ترکیبات فنولی و احتمالاً غیر فنولی داشته باشد.

افزایش دما موجب افزایش نفوذپذیری حلال، کاهش ویسکوزیته و تسهیل انتقال جرم می‌شود که در ترکیب با محیط قلیایی، اثر هم‌افزایی قابل ملاحظه‌ای بر استخراج تانن‌ها دارد (Spigno et al., 2007). با این حال قبلاً گزارش شده است که دمای بالا در فرآیند استخراج، میزان حل شدن و انتشار ترکیبات هدف را افزایش می‌دهد. هرچند که دماهای بسیار بالا ممکن است با تخریب ترکیبات زیست‌فعال همراه شده و از سویی دیگر منجر به ورود ناخالصی‌های نامطلوب به عصاره‌ها گردد (Zhang et al., 2018).

مطابق شکل ۲-الف، هنگامی که از محلول سود به‌عنوان حلال استفاده می‌شود، نسبت به pH خنثی (حلال آبی) بازده بالاتری ایجاد



شکل ۲- مقایسه بازده استخراج عصاره فنولی از بلوط (الف: شرایط متفاوت استخراج از مخلوط پوست و جفت و ب: بازده استخراج از جفت، پوست و مخلوط پوست و جفت با محلول سود ۹۰ درجه سلسیوس)

نتایجی که با حروف کوچک متفاوت در ستون‌های شکل ۲ مشخص است، بر اساس آزمون توکی، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

Fig. 2. Phenolic extract yield from acorn: (a) Different extraction conditions from mix (b) Extraction yield from sell, cuple and mix. of them using 90°C NaOH solution. Small letters in the column indicate significant difference according to Tukey's test.

همانطور که در شکل ۳-الف نشان داده شده است، در میان روش‌های مختلف استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت، بیشترین بازده مربوط به استخراج با اتانول و سود ۰/۲۲ درصد در دمای ۹۰ درجه سلسیوس بود که به ترتیب بازدهی ۵۱/۴۱ و ۴۸/۰۶٪ را نشان داد و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. این موضوع اهمیت حلال‌های آلی نیمه‌قطبی مانند اتانول را در استخراج ترکیبات فنولی که دارای

نتایج استخراج فنول کل از مخلوط پوست و جفت با حلال‌های مختلف در شکل ۳-الف آورده شده است. نتایج استخراج فنول کل از پوست و جفت بلوط به صورت منفرد و با حلال سود در شکل ۳-ب نشان داده شده است. معادله منحنی استاندارد اسید تانیک نیز به صورت $Y=388.12 X - 47.65$ ($R^2= 0.998$) بدست آمد.

مولکول‌ها و ایجاد تعادل مناسب بین بخش‌های آب‌دوست و آب‌گریز، محیط بهینه‌ای برای استخراج این ترکیبات فراهم می‌کند (Makkar, 2003). همچنین این افزایش میزان استخراج تانن را می‌توان به ویژگی‌های شیمیایی اتانول نسبت داد. اتانول یک حلال نیمه‌قطبی است و توانایی استخراج ترکیبات فنولی و تانن‌های قابل حل در هر دو فاز آبی و آلی را دارد. بسیاری از تانن‌ها (به‌ویژه تانن‌های کندانس شده موجود در بلوط) در حلال‌های قطبی-آلی همچون اتانول محلول‌ترند. قبلاً در پژوهش‌هایی بازده بالاتر استحصال تانن با بکارگیری اتانول نسبت آب به‌عنوان حلال گزارش شد است (Azizah & Azizah, 2021).

در مقابل، تیمار قلیایی با وجود کارایی مشابه با اتانول در استخراج ترکیبات فنل کل، مقدار تانن آن به‌طور معنی‌داری کمتر بود. این اختلاف احتمالاً به‌دلیل تخریب ساختاری تانن‌ها در pH بالا و تشکیل کمپلکس‌های نامحلول بین تانن‌ها و یون‌های فلزی می‌باشد (Jian & Zhang, 2022; Zhang, Guan, Zhang, & Tang, 2023). همچنین حلال قطبی نه تنها تانن‌ها را استخراج می‌کند، بلکه سایر اجزای قطبی مانند کربوهیدرات‌ها و مواد معدنی را نیز حل می‌کند، به‌طوری‌که تانن استخراج‌شده حاوی انواع مختلفی از ناخالصی‌ها است (Kusuma, Wulandari, Nurfitriani, & Awaludin, 2022).

تیمار آبی کمترین بازده استخراج را در استخراج تانن نشان داد. این نتایج با مطالعات قبلی، همانند پژوهش مختارپور و همکاران (Mokhtarpour, Naserian, Valizadeh, Mesgaran, & Pourmollae, 2014) از ضایعات پسته، که محدودیت‌های حلالیت ترکیبات فنولی و تانن‌ها را در محیط کاملاً آبی گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد. احتمالاً عدم توانایی در شکستن پیوندهای فنول-پروتئین و فنول-پلی‌ساکارید از مهم‌ترین دلایل این بازده پایین محسوب می‌شوند (Mokhtarpour et al., 2014).

امکان استفاده از تانن در کاربردهای مختلف تا حد زیادی به خلوص آنها بستگی دارد. نوع حلال، کنترل دما، نسبت جامد به حلال، اندازه ذرات، منابع و زمان استخراج به دستیابی به کیفیت بهتر تانن‌ها کمک می‌کند (Das et al., 2020). معمولاً کربوهیدرات‌ها در طول فرآیند استخراج، به همراه تانن‌ها استخراج شده که کاربردهای آنها را محدود می‌کند.

اندازه‌گیری تانن با روش HPLC

با توجه به میزان بالای ترکیبات فنولی در جفت بلوط و همچنین سهولت دسترسی و درصد بالای وزنی مخلوط پوست و جفت بلوط، این دو منبع برای سنجش تکمیلی میزان تانن با روش HPLC انتخاب شدند. نتایج حاصل از آنالیز HPLC (شکل ۵) که به‌منظور اندازه‌گیری

ساختارهای متنوع قطبی و غیرقطبی هستند، برجسته می‌سازد. اتانول با داشتن توانایی حلالیت دوگانه، قادر به استخراج مؤثرتر طیف وسیع‌تری از ترکیبات فنولی است (Lee et al., 2024). علاوه بر این، این مشاهده اثر مثبت محیط قلیایی در دمای بالا در آزادسازی ترکیبات فنولی متصل به دیواره سلولی را نشان می‌دهد. شرایط قلیایی اغلب برای استخراج ترکیبات فنولی و تانن‌ها مناسب‌تر از شرایط خنثی یا اسیدی هستند. در مطالعه‌ای توسط بوراس و همکاران (Bouras et al., 2015) مشخص شد که استفاده از شرایط قلیایی نسبت به استفاده از آب مقطر به‌طور قابل توجهی کارایی استخراج ترکیبات فنولی از پوست درخت بلوط را بهبود می‌بخشد؛ که نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند. همچنین مشخص است که استفاده از آب خالص، حتی در دمای بالا، توان کمتری در استخراج مؤثر ترکیبات فنولی نسبت به حلال‌های قوی‌تر دارد، بنابراین نقش pH در استخراج با حلال نیز در این مطالعه برجسته شده است.

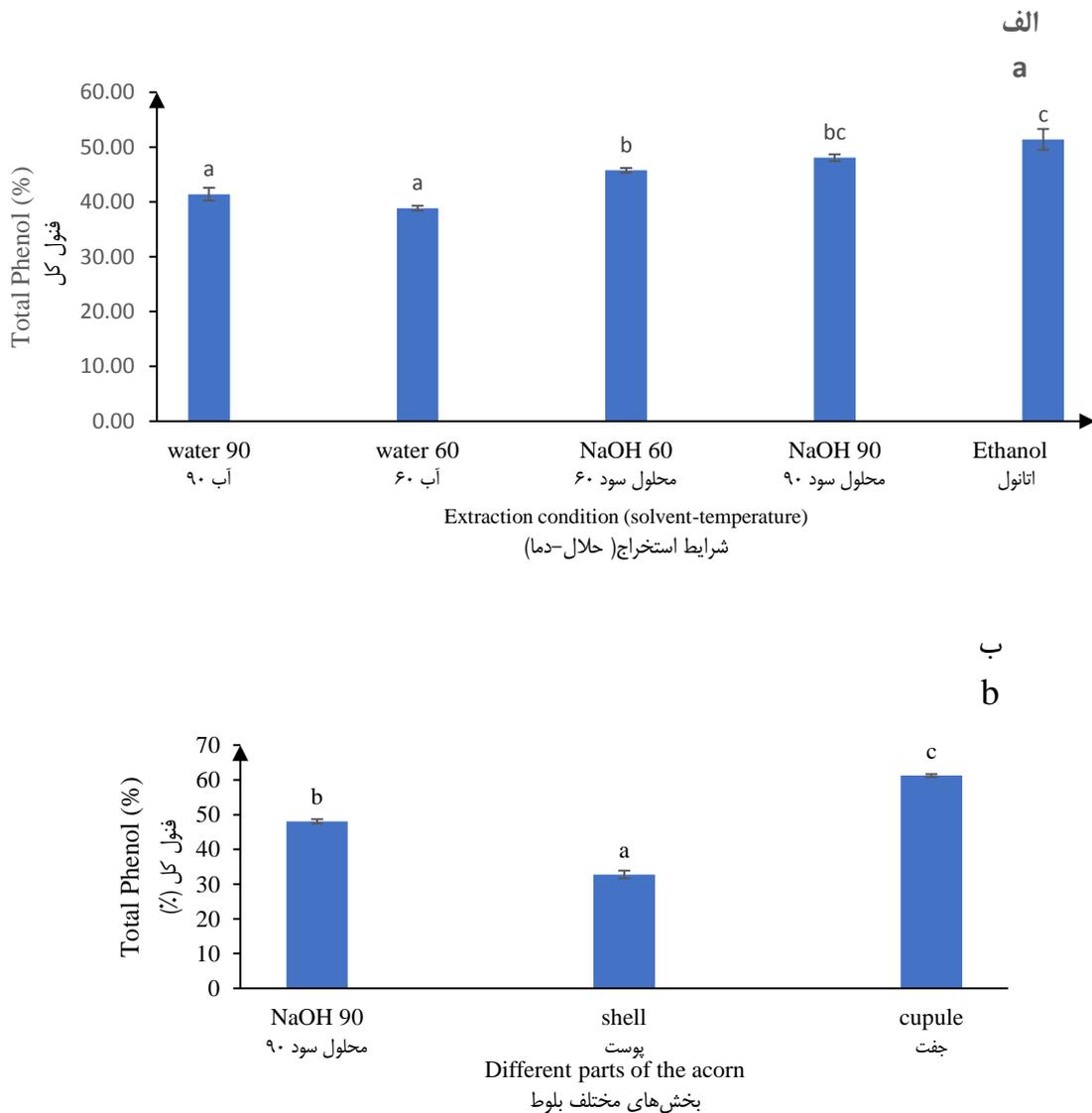
بنابراین با توجه به بازده بالای استخراج اتانول و سود و قیمت ارزانتر سود، حلال سود ۲۲/۰ درصد در دمای ۹۰ درجه برای استخراج ترکیبات فنولی پوست و جفت به‌صورت منفرد، استفاده شد. در بین تیمارهای بررسی‌شده، جفت بلوط (cupule) با میانگین استخراج ۶۱/۲۲ درصد با بکارگیری حلال قلیایی، بالاترین میزان استخراج فنول کل را نشان داده است. این مقدار به‌طور معنی‌داری از سایر منابع بیشتر است و نشان‌دهنده‌ی غنای بالای جفت از منظر ترکیبات فنولی است. به‌عبارتی، استفاده از جفت به‌تنهایی نسبت به مخلوط پوست و جفت بلوط، کارایی به مراتب بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی دارد. هرچند همان‌گونه که در جدول ۱ نیز نشان داده شده است، جفت درصد کمی از میوه بلوط را تشکیل می‌دهد. همچنین براساس نتایج مشخص شد که، کمترین میزان ترکیبات فنولی در بخش پوست قرار دارد.

اندازه‌گیری تانن با روش PVPP

محتوای تانن عصاره‌های استخراج شده از مخلوط پوست و جفت با استفاده حلال‌هایی از هر سه گروه حلال آبی، اتانولی و سود با بالاترین بازده، با استفاده از روش مرسوم PVPP مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس شکل ۴ مشخص است که با بکارگیری اتانول به‌عنوان حلال، بازده استخراج تانن افزایش می‌یابد. مقدار تانن استخراج‌شده با اتانول ۴۰ درصد (۳۲/۲۵٪) تقریباً بیش از سه برابر تیمارهای آبی (۸/۹۱٪) و قلیایی (۹/۷۷٪) می‌باشد. این نتیجه کارایی بالای اتانول (در مقایسه با آب و سود به‌عنوان حلال) در استخراج تانن را نشان می‌دهد. در بخش قبل نیز بازده استخراج ترکیبات فنول کل با استفاده از اتانول، میزان بالایی را نشان داد. تشابه در روند استخراج تانن و ترکیبات فنول کل، تأیید می‌کند که اتانول با حفظ یکپارچگی ساختاری

از استاندارد اسید تانیک برای تعیین زمان بازداري ترکیبات تانني استفاده گردید. بر اساس داده‌های به‌دست آمده، میزان تانن در مخلوط پوست و جفت ۴۸/۰۶٪ و در جفت به تنهایی ۶۱/۲۳٪ اندازه‌گیری شد.

اسید تانیک در نمونه‌های جفت و مخلوط پوست و جفت بلوط انجام شد، نشان داد که روش HPLC در مقایسه با روش‌های شیمیایی متداول، مقادیر بالاتری از تانن را اندازه‌گیری می‌کند. در این آزمایش

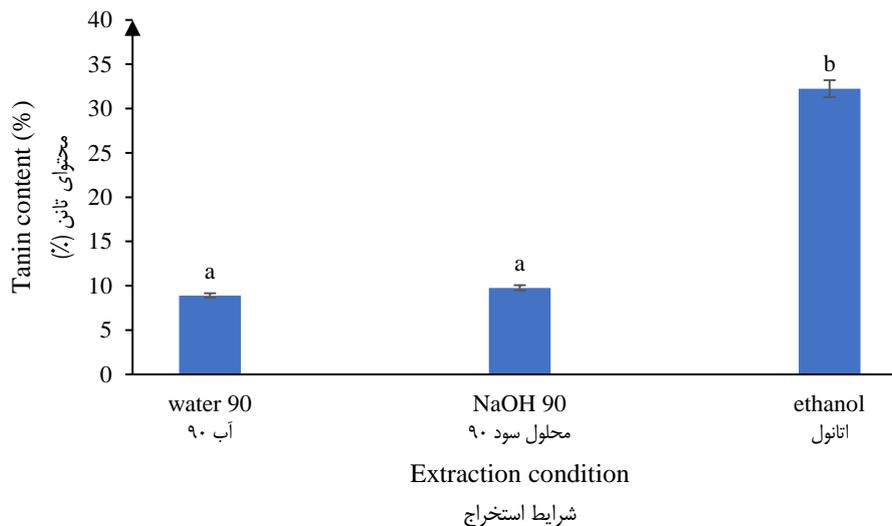


شکل ۳- نتایج استخراج فنول کل -بخش الف: از مخلوط پوست و جفت با حلال‌های مختلف. بخش ب: از پوست، جفت و مخلوط پوست و جفت با استفاده از محلول سود

نتایجی که با حروف کوچک متفاوت در ستون مشخص است، بر اساس آزمون توکی، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) در شکل می‌باشد.

Fig. 3. Total phenol extraction results: (a) From mix using different solvents (b) From shell, cupule and mix. Of them using NaOH solution

Results followed by different small letters in the column indicate significant difference ($p < 0.05$) according to Tukey's test.



شکل ۴- تأثیر شرایط استخراج بر میزان تانن کل

نتایجی که با حروف کوچک متفاوت در ستون مشخص است، بر اساس آزمون توکی، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.01$) می‌باشد.

Fig. 4. Effect of extraction conditions on total tannin content

Results followed by different small letters in the column indicate significant difference ($p < 0.01$) according to Tukey's test.

در نظر گرفتن عواملی نظیر خلوص، سهولت دسترسی و فراوانی منابع و همچنین کاربرد در صنایع غذایی و دارویی یا شیمیایی صورت گیرد. همچنین پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی، خلص‌سازی تانن استخراجی جهت کاربردهای دارویی و صنعتی در دستور کار قرار گیرد.

منابع تأمین مالی

این مقاله با حمایت مالی بنیاد ملی نخبگان ایران و جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان (ACECR)، در قالب طرح احمدی روشن با عنوان «کسب دانش فنی تولید انواع محصولات با ارزش افزوده از بلوط» با کد ۷۳۱۰۱۵ طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۲ انجام شده است. بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از سازمان‌های مذکور ابراز می‌داریم.

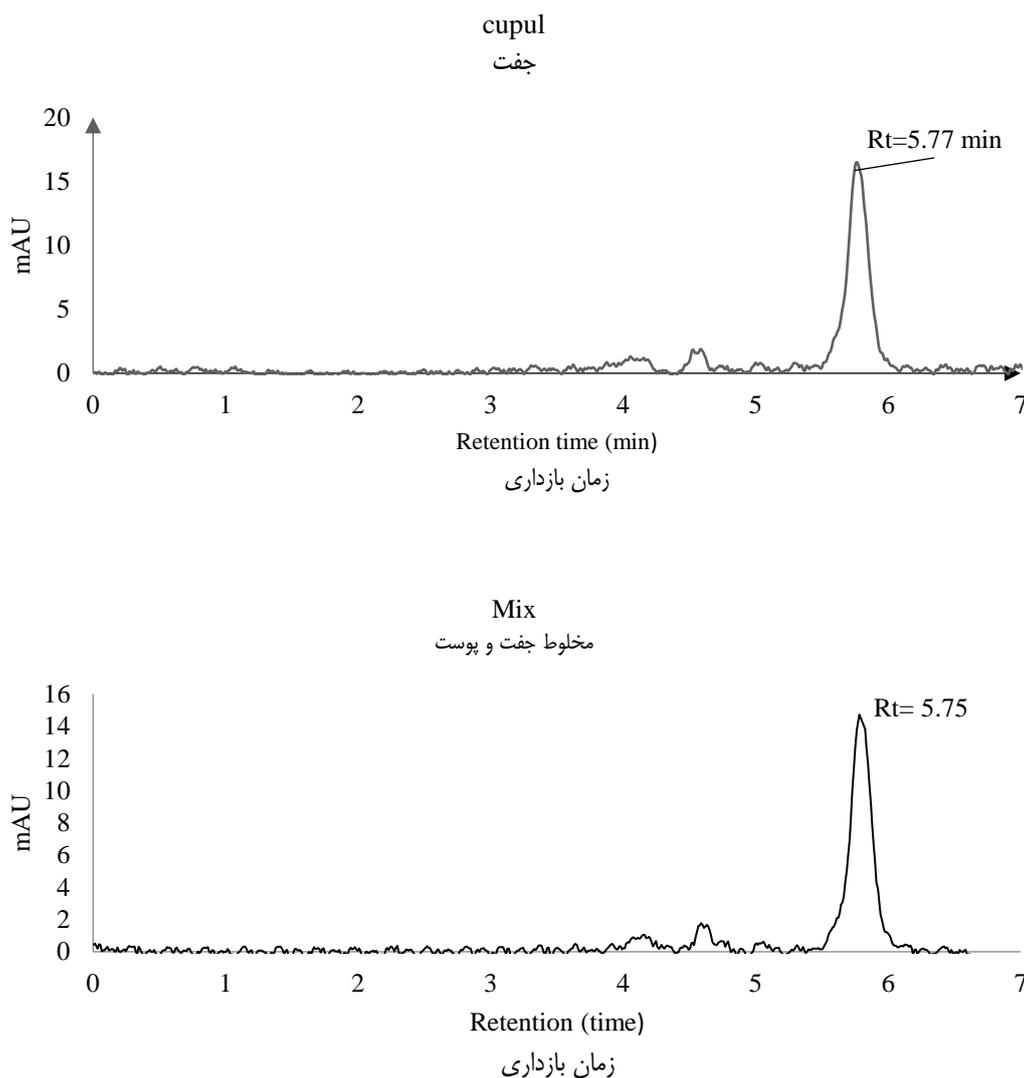
مشارکت نویسندگان

زهرا زارع‌زاده: مدیریت داده‌ها، تحلیل رسمی، تحقیق و بررسی.
علی فروهر: مدیریت داده‌ها، تحلیل رسمی، نوشتن - پیش‌نویس اصلی.
حامد صابریان: نوشتن - بررسی و ویرایش، مدیریت پروژه، روش‌شناسی.

اگرچه مقدار تانن در جفت بلوط به تنهایی بیشتر بود، اما از نظر کاربردهای صنعتی، استفاده از مخلوط پوست و جفت احتمالاً گزینه مطلوب‌تری محسوب می‌شود. چون درصد وزنی بالاتری دارد و از توجیه اقتصادی بهتری برخوردار است و موجب افزایش بازدهی کلی فرآیند می‌گردد. تفاوت مقادیر اندازه‌گیری شده بین روش HPLC و روش‌های شیمیایی را می‌توان به عواملی همچون قدرت تفکیک بالاتر HPLC در شناسایی انواع تانن‌ها، عدم تداخل ترکیبات مزاحم در روش کروماتوگرافی و حساسیت بیشتر دستگاه HPLC در اندازه‌گیری نسبت داد. این یافته‌ها به وضوح اهمیت انتخاب روش آنالیزی مناسب و همچنین مزایای استفاده از مخلوط پوست و جفت بلوط را در کاربردهای صنعتی نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بازده استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت بلوط به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر نوع حلال و دمای استخراج قرار دارد. به‌طور خاص، استخراج با اتانول ۴۰٪ منجر به بازده حدود ۳۲ درصدی شد، در حالی که بازده استخراج با سود ۲۲٪ در ۹۰ درجه سلسیوس به حدود ۴۸ درصد افزایش یافت. اتانول به دلیل ماهیت نیمه‌قطبی خود، کارایی بالایی (۳۲٪) در استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت بلوط نشان داد. جفت بلوط منبع غنی‌تری از ترکیبات فنولی کل است، اگرچه مخلوط پوست و جفت سهولت و فراوانی بیشتری دارد. در نهایت، انتخاب منبع و روش استخراج باید با



شکل ۵- میزان تانن جفت و مخلوط پوست و جفت و عصاره بر اساس تانیک اسید
 Fig. 5. Tannin content of cupule and mix based on tannic acid equivalent

References

1. Arina, M.I., & Harisun, Y. (2019). Effect of extraction temperatures on tannin content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* (Manjakani). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101104. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101104>
2. Azade del, S., Hanachi, P., & Saboora, O. (2016). Investigation of soluble and insoluble tannins and anthocyanins assay in two Cultivar pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 14(63), 179-186. (In Persian with English abstract)
3. Azizah, Y.N., & Azizah, M. (2021). Proximate composition of dried powder of *Passiflora foetida* leaves and fruits and its phytochemical content of crude aqueous and ethanol extract. *Universiti Malaysia Terengganu Journal of Undergraduate Research*, 3(4), 99-108. <https://doi.org/10.46754/umtjur.2021.10.011>
4. Bertelli, A., Biagi, M., Corsini, M., Bains, G., Cappellucci, G., & Miraldi, E. (2021). Polyphenols: From theory to practice. *Foods*, 10(11), 2595. <https://doi.org/10.3390/foods10112595>
5. Bitwell, C., Indra, S.S., Luke, C., & Kakoma, M.K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>

6. Blackwell, D.L., Herald, T.J., Bean, S.R., & Gadgil, P. (2012). Alkaline extraction of phenolic compounds from intact sorghum kernels. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(12), 2671-2675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03138.x>
7. Bouras, M., Chadni, M., Barba, F.J., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Quercus bark. *Industrial Crops and Products*, 77, 590-601. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.018>
8. Claudia, P. (2013). Acorn bread: A traditional food of the past in Sardinia (Italy). *Journal of Cultural Heritage*, 14(3), S71-S74. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2012.11.012>
9. Das, A.K., Islam, M.N., Faruk, M.O., Ashaduzzaman, M., & Dungani, R. (2020). Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*, 135, 58-70. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.008>
10. Dehghanian, Z., Habibi, K., Dehghanian, M., Aliyar, S., Lajayer, B.A., Astatkie, T., & Keswani, C. (2022). Reinforcing the bulwark: unravelling the efficient applications of plant phenolics and tannins against environmental stresses. *Heliyon*, 8(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09094>
11. Du, G., Zhao, H., Song, Y., Zhang, Q., & Wang, Y. (2011). Rapid simultaneous determination of isoflavones in *Radix puerariae* using high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with novel shell-type column. *Journal of Separation Science*, 34(19), 2576-2585. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100295>
12. Ghaderi Ghahfarokhi, Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M., Azizi, M.H., & Ghorbani, M. (2012). Study on antioxidant activities of phenolic extracts from fruit of a variety of Iranian acorn (*Q. castaneifolia* var *castaneifolia*). *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 9(35), 45-56. (In Persian with English abstract)
13. Heidari, F., & Zarei, R. (2016). *Study of Tannin Levels in Oak Trees in the Zagros Region, Yasuj Forest Areas* International Conference on Research in Science and Technology. (In Persian)
14. Hosseinzadeh, R., Khorsandi, K., & Hemmaty, S. (2013). Study of the effect of surfactants on extraction and determination of polyphenolic compounds and antioxidant capacity of fruits extracts. *PloS One*, 8(3), e57353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057353>
15. Iranmanesh, Y., & Goujani, H.J. (2015). Investigation of extractable oil from Brant's oak (*Quercus brantii* Lindl.) acorn in Chaharmahal and Bakhtiari forests. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 23(3), 527-535.
16. Jahanshahi, S., Tabarsa, T., Asghari, Z., & Resalati, H. (2011). Investigation of the amount of tannic acid in bark oak (*Quercus castanifolia*). *Iranian Journal of Wood and Paper Industries*, 1(1), 27-35. (In Persian)
17. Jian, X., & Zhang, J. (2022). Component and structure of *Aspergillus flavipes* sp. Biodegraded bayberry tannins: a potential routine for condensed tannin cleaner degradation and disposal. *ACS Omega*, 7(7), 5809-5816. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05768>
18. Khanbabaee, K., & Van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports*, 18(6), 641-649.
19. Kusuma, S., Wulandari, S., Nurfitriani, R., & Awaludin, A. (2022). The potential solvent for tannin extraction as a feed additive made of coffee husk (*Coffea canephora*) using Soxhlet Method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 980(1), 012024. <https://doi.org/10.1088/1755-0120/980/1/012024>
20. Lee, J.-E., Jayakody, J.T.M., Kim, J.-I., Jeong, J.-W., Choi, K.-M., Kim, T.-S., & Ryu, B. (2024). The influence of solvent choice on the extraction of bioactive compounds from Asteraceae: A comparative review. *Foods*, 13(19), 3151. <https://doi.org/10.3390/foods13193151>
21. Makkar, H.P. (2003). Treatment of plant material, extraction of tannins, and an overview of tannin assays presented in the manual. In *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage – A Laboratory Manual* (1st Edition ed., pp. 43-48). Springer Science. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0273-7_2
22. Mokhtarpour, A., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Mesgaran, M.D., & Pourmollae, F. (2014). Extraction of phenolic compounds and tannins from pistachio by-products. *Annual Research & Review in Biology*, 4(8), 1330. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2014/7793>
23. Pasqualone, A., Makhlouf, F.Z., Barkat, M., Difonzo, G., Summo, C., Squeo, G., & Caponio, F. (2019). Effect of acorn flour on the physico-chemical and sensory properties of biscuits. *Heliyon*, 5(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02242>
24. Payab, M., Chaichi, M.J., Nazari, O.L., & Maleki, F.Y. (2019). Tannin extraction from oak gall and evaluation of anti-oxidant activity and tannin iron chelation compared with deferoxamine drug. *Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry*, 5(2), 18-25. <https://doi.org/10.11648/j.jddmc.20190502.11>
25. Pietta, P., Minoggio, M., & Bramati, L. (2003). Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 28, 257-312. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80143-6](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80143-6)
26. Pourhashemi, M., & Sadeghi, S.M.M. (2020). A review on ecological causes of oak decline phenomenon in forests of Iran. *Ecology of Iranian Forests*, 8(16), 148-164. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4111111>

27. Rahnemoon, P., Sarabi Jamab, M., Javanmard Dakheli, M., Bostan, A., & Safari, O. (2018). Comparison of two methods of solvent extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(5), 939-952. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101331>
28. Salarkarimi, V., Varidi, M.J., & Varidi, M. (2019). The effect of chestnut (*Quercus brantii*) flour substitution on the physicochemical and sensory properties of burgers. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 8(1), 15-30.
29. Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
30. Torkaman, J., & Seyam, S. (2009). Measurement of tannin in treebarks of Oak, Beech, Alder, Horn beam and Black Walnut [Research]. *Journal of Medicinal Plants*, 8(29), 58-63.
31. Valizadeh Yonjalli, R., Mirzaei Aghjehgheshlagh, F., Mahdavi, A., Navidshad, B., & Staji, H. (2020). The effects of tannin extract and linseed oil on yield, physicochemical characteristics and fatty acid profile of ewe milk. *International Journal of Dairy Technology*, 73(4), 656-666. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12716>
32. Zhang, L., Guan, Q., Zhang, H., & Tang, L. (2023). Effect of metal ions on the interaction of condensed tannins with protein. *Foods*, 12(4), 829. <https://doi.org/10.3390/foods12040829>
33. Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20.
34. Zhu, Y., Ouyang, H., Lv, Z., Yao, G., Ge, M., Cao, X., & He, J. (2024). Simultaneous determination of multiple components in rat plasma by UPLC-MS/MS for pharmacokinetic studies after oral administration of Pogostemon cablin extract. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1293464. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1293464>

Contents

Research Articles

Maintaining the Quality of Chico Fruit (*Manilkara zapota*) during Storage Using Amino Acids (Phenylalanine, Glutathione, and L-arginine) and Growth Regulator (Melatonin) 359
S. Ebrahimi Meymand, L. Jafari, A. Mirzaalian Dastjerdi, A. Ramazanian

Preparation and Study the Physical, Mechanical and Antimicrobial Properties of Polyethylene/Polylactic Acid Nanocomposite Films Reinforced with Nano-graphene Oxide 377
M. Fathifar, N. Sedaqhat, M.R. Abdollahi Moghadam

Effect of Solvent Composition and Auxiliary Treatments on the Extraction of *Dracocephalum kotschy* Boiss Extract Using Deep Eutectic Solvents 393
S. Kiani, H. Abbasi

Extraction and Qualitative Analysis of Chicken feet Gelatin and Investigating Its Effect on the Physical and Chemical Properties of Marshmallow 409
F. Islami, Z. Raftani Amiri, A. Motamedzadegan, H. Gorjian

Evaluation of the Prebiotic Properties of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* Polysaccharides in Enhancing Dairy Yeast and Bacterial Isolates 431
M. Larypoor, N. Jameyi, H. Dadgostar, J. Nowroozi

Short Articles

Determination of Diazinon Residue in Honey Samples from Mane and Samalqan Region in North Khorasan Province Using UV-Vis Spectrophotometry 451
Z. Rahimi, V. Hakimzadeh

The Effect of Extraction Conditions on the Yield of Tannins and Phenolics from Acorn Shell and Cupule 463
Z. Zarezade, A. Forouhar, H. Saberian

Iranian Food Science and Technology Research Journal

Vol. 21

No. 4

2025

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, Swedish University, Sweden
Dr. Nkemnaso Obi C.	Department of Microbiology, Michael Okpara University of Agriculture, Umudike, Abia State, Nigeria
Dr. Olalekan Adeyeye S.A.	Department of Food Technology, Hindustan Institute of Technology and Science, Chennai, Tamil Nadu, India
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



Ferdowsi University
of Mashhad

Iranian Food Science and Technology Research Journal



Vol.21

No.4

2025

ISSN:1735-4161

Contents

Research Articles

Maintaining the Quality of Chico Fruit (*Manilkara zapota*) during Storage Using Amino Acids (Phenylalanine, Glutathione, and L-arginine) and Growth Regulator (Melatonin) 359
S. Ebrahimi Meymand, L. Jafari, A. Mirzaalian Dastjerdi, A. Ramazanian

Preparation and Study the Physical, Mechanical and Antimicrobial Properties of Polyethylene/Polylactic Acid Nanocomposite Films Reinforced with Nano-graphene Oxide..... 377
M. Fathifar, N. Sedaqhat, M.R. Abdollahi Moghadam

Effect of Solvent Composition and Auxiliary Treatments on the Extraction of *Dracocephalum kotschy* Boiss Extract Using Deep Eutectic Solvents..... 393
S. Kiani, H. Abbasi

Extraction and Qualitative Analysis of Chicken feet Gelatin and Investigating Its Effect on the Physical and Chemical Properties of Marshmallow 409
F. Islami, Z. Raftani Amiri, A. Motamedzadegan, H. Gorjian

Evaluation of the Prebiotic Properties of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* Polysaccharides in Enhancing Dairy Yeast and Bacterial Isolates 431
M. Larypoor, N. Jameyi, H. Dadgostar, J. Nowroozi

Short Articles

Determination of Diazinon Residue in Honey Samples from Mane and Samalqan Region in North Khorasan Province Using UV-Vis Spectrophotometry 451
Z. Rahimi, V. Hakimzadeh

The Effect of Extraction Conditions on the Yield of Tannins and Phenolics from Acorn Shell and Cupule..... 463
Z. Zarezade, A. Forouhar, H. Saberian