اثر روشهای مختلف استخراج بر خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره برگ شمعدانی به منظور افزایش زمان ماندگاری گوشت چرخ کرده ماهی فیتوفاگ در دمای ۴ درجه سانتی گراد

فاطمه حسینی[۱]، سید روح الله جوادیان[۲*]، سمیه بهرام[۲]

۱- دانش آموخته تکثیر و پرورش آبزیان، قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی گروه شیلات
۲- گروه شیلات، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵ /۰۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۰۹)

چکیده

در این مطالعه تاثیر روش های مختلف استخراج (فراصوت و حلال) و غلظت های مختلف عصاره (۵۰۰ppm، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰) بر میزان ترکیبات فنلی، توکوفرولی، و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ گیاه شمعدانیبه منظور به دست آوردن بهترین روش استخراج، برای افزایش ماندگاری گوشت چرخ شده فیتوفاگ نگهداری شده در یخچال بررسی شد (۳۰ روز در دمای ٤C^{o}). عصاره استخراجی به روش فراصوت میزان ترکیبات فنلی(۱۵۰۰/٦میلی‌گرم در گرم وزن خشک) بالاتری در مقایسه با عصاره استخراجی به روش حلال داشت($P<۰/۰۵$). بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره استخراجی به روش التراسوند با غلظت ۲۰۰ppmمشاهده شد (مهار رادیکال آزاد DPPH (۹۸/۰۸٪) و میزان عددی بتاکاروتن (۸۱/۹٪))($P<۰/۰۵$). سپسفعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ شمعدانی (با غلظت ppm ۲۰۰۰) برگوشت چرخ شده ماهی کپور نقره ای در دمای ٤ درجه سانتی گراد با اندازه گیری شاخص های شیمیایی شامل عدد پراکسید، مقادیر تیوباربیتوریک اسید و مجموع بازهای نیتروژنی فرار در طول دوره نگهداری ۳۰ روزه بررسی و با تیمار شاهد مقایسه شد. نتایج نشان داد نمونه های حاوی عصاره به طور معنی داری مقادیرمجموع بازهای نیتروژنی فرار فساد اکسیداسیونی کمتری (عدد پراکسید، مقادیر تیوباربیتوریک اسید کمتر) در طول دوره نگهداری نسبت به نمونه شاهد داشتند ($P<۰/۰۵$).

کلید واژگان: آنتی اکسیدان، عصاره شمعدانی، عمرماندگاری، کپور نقره ای

*مسئول مکاتبات: ro.javadian@gmail.com

۱-مقدمه

آبزیان به دلیل دارا بودن پروتئین هایی با کیفیت بالا، چربی های غیر اشباع زیاد، ویتامین و مواد معدنی به عنوان غذایی مفید برای سلامتی مورد توجه میباشند [۱]. از طرفی ماهی به دلیل ترکیب بیولوژیکی خاص خود بسیار فسادپذیر است. فساد عضله ماهی ناشی از تغییرات ایجاد شده از قبیل اکسیداسیون چربی غیر اشباع که در ماهی بیشتر از موجودات دیگر است، هیدرولیز چربی‌ها و همچنین فساد ناشی از ترکیبات پروتئینی، فساد ناشی از آنزیم‌ها و فساد میکروبی ناشی از میکروارگانیسم‌ها است [۲]. زمان ماندگاریماهی با ارزیابی شدت واکنش‌هایآنزیمی، درجهحرارت و تعداد و نوع میکروارگانیسم‌های مولد فساد تعیین می‌شود [۳]. جهت جلوگیری یا به تعویق انداختن فساد ماهی و فرآورده‌های آن راهکارهای متعدد شیمیایی، فیزیکی و میکروبی ارائه شده است که از آن جمله می‌توان به افزودن آنتی اکسیدان و استفاده از موادی مناسب با فعالیت ضد باکتریایی اشاره نمود [۳]. اما امروزه استفاده از روش‌های شیمیایی کمتر تأکید می شود، زیرا ازیک سومصرف کنندگان مواد غذایی خواستار غذاهای طبیعی با ماندگاری طولانی، همراه با کمترین تغییر در ساختار آن می‌باشند و از سوی دیگر خاصیت سرطان زایی و سمی بودن برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی نیز برای انسان به اثبات رسیده است [۳]. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با منشا گیاهی معمولا به این صورت طبقه‌بندی می‌شوند: ویتامین‌ها، ترکیبات فنولی شامل فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک و ترکیبات فرار در گیاهان و ادویه‌جات [٤]. اسانس ها و عصاره ها حاوی ترکیبات آنتی اکسیدانی مختلف و فراوانی‌اند این ترکیبات موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، مشخصا دوره اکسیداسیون کند را افزایش می‌دهند [٥]. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم ترین آن‌ها حلال و روش استخراج می باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به نوع مختلف گیاه و همچنین به مواد متشکله آن بستگی دارد [٦]. روشهای سنتی مانند روش سوکسله (حلال) که سال‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است، بسیار زمان‌بر بوده و مقدار زیادی حلال مصرف می‌کند. به همین دلیل تقاضای زیادی برای روش‌های عصاره گیری جدیدی با زمان کوتاهتر، میزان مصرف حلال کمتر و محافظ محیط زیست وجوددارد. روش‌های جدید عصاره گیری مانند عصاره گیری همراهبا امواج فرا صوت، عصاره گیری همراه با امواج مایکروویو و عصاره گیری همراه با مایع فوق بحرانی برای استخراج ترکیب‌های از گیاهان بسیار سریع و موثرعمل می‌کنند. این روش‌های جدید، پیشرفت زیادی داشته‌اند و برخی موارد استفاده از آن‌ها در استخراج مواد گیاهی گزارش شده‌اند[٦].

با توجه به آلودگی‌های ماهیان فیتوفاگ داخل کشور این نیاز وجود دارد تا روشهای نوین بازدارندگی علیه فساد شیمیایی و میکروبی و بکارگیری راهکارهایی برای افزایش عمر ماندگاری آن بکار برده شود بنابراین باتوجهبه تولیدبالایماهی فیتوفاگوشیوه مصرف و نگه‌داری این ماهی که به صورت سرد می‌باشد و با عنایت به تغییرات کیفی ماهیان در هنگام نگهداری به روش سرد و مشکلات استفاده از نگه‌دارنده های مصنوعی، شناسایی بهترین روش استخراج عصاره برگ شمعدانی و کاربرد آن که نسبتا فراوان و ارزان و قابل دسترس می‌باشد، در حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری این ماهی ضرورت می‌یابد [۷].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد اولیه مورد نیاز

گیاه شمعدانی از گلخانه‌ای در شهرستان قائمشهر جمع آوری شده و پس از تایید توسط گیاه‌شناس به آزمایشگاه منتقل شدند و بعد از جداسازی برگ‌ها و شستشو با آب شیرین، با استفاده از دستگاه آون با درجه حرارت ٤٠ درجه سانتی گراد خشک شدند. سپس با استفاده از دستگاه خردکن صنعتی خرد شدند و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد.تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع آزمایشگاهی بوده و تمامی آن‌ها از شرکت مرک آلمان خریداری شد و همچنین رادیکال DPPH، بتاکاروتن، لینولئیک اسید، توئین ٤٠ و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد.

۲-۱- روش‌های استخراج عصاره

۲-۱-۱- استخراج با حلال (روش سوکسله)

پودر شمعدانی به نسبت ۱ به ۵ (۲۰ گرم نمونه با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال) با آب مخلوط و دور از نور به مدت ٤٨ ساعت در شیکر

(LABTRON Ls-100)با سرعت ۱۶۰ rpmقرار داده شدند. سپس سه مرحله سانتریفوژ شده (هر بار ۱۰ دقیقه و با ۳۰۰۰ rpm (HERMLE z200A –Germany)) و در هر مرحله فاز آبی (فاز رویی) جمع‌آوری شد، تا دیگر رسوبی در ته لوله دیده نشود. سپس فازهای آبی جمع‌آوری شده، با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شد. در ادامه توسط اواپراتور (حداکثر دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد) (TAM 2times- Iran) حلال تبخیر و عصاره آبی به‌دست آمد. عصاره‌های حاصل تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- نگهداری شدند [۸].

۲-۱-۲- استخراج به کمک فراصوت

ابتدا پودر شمعدانی به نسبت ۱ به ۵ (۲۰ گرم نمونه با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال) با آب مخلوط، سپس در حمام فراصوت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه با فرکانس ۳۴-۲۸ کیلو هرتز قرار گرفت. سپس محلول ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در ادامه توسط اواپراتور (حداکثر دما ۵۰ درجه سانتی‌گراد) (TAM 2times- Iran) حلال تبخیر و عصاره آبی بدست آمد.عصاره های حاصل تازمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- نگهداری شد [۹].

۲-۳- اندازه گیری ترکیبات فنلی کل

مقدار کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره از طریق روش طیف سنجی با معرف فولین- سیوکالتیو مورد بررسی قرار گرفت [۸] و نتایج بر اساس میلی اکی والن اسید گالیک بر گرم عصاره بیان شد.

۲-٤- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

برای نجام این آزمایش از رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. بدین منظور ۱ میلی لیتراز غلظت های مختلف عصاره به‌طور جداگانه (۵۰۰ppm، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰) با ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت۱۵دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ nm در مقابل شاهد خوانده شد. تمامی این مراحل در مورد TBHQ به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد انجام شد [۱۰].

DPPH = درصد مهار رادیکال آزاد ×۱۰۰

۲-۵- آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن- لینولئیک اسید

این آزمایش براساس روش Amarowicz و همکاران [۱۱] با اندکی تغییر انجام گرفت. برای انجام آزمایش ابتدا یک محلول پایه از بتاکاروتن- لینولئیک اسید به صورت زیر تهیه گردید: ۵ میلی گرم از بتاکاروتن در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل شد، ۶۰۰ میکرو لیتر از محلول تهیه شده به مخلوط ٤۰ میلی گرم لینولئیک اسید و ٤۰۰ میلی گرم توئین ٤۰ اضافه شد. سپس با روش تبخیر در خلاء کلروفرم جدا گردید و ۱۰۰ میلی لیتر آب اکسیژنه به آن اضافه و شدیدا هم زده شد. ۵ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل و ۲۰۰ میکرولیتر از هر عصاره به لوله آزمایش اضافه گردید. تمامی این مراحل در مورد TBHQ به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد و شاهد (محلول بتاکاروتن تهیه شده به علاوه ی حلال های مربوطه) انجام شد. جذب نوری نمونه ها با اسپکتروفتومتر در ٤۷۰ نانومتر در زمان صفر و همچنین بعد از ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری در دمای اتاق قرائت شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره به عنوان درصد بازداری بیان می‌شود.

$$\%I = [1-(As(24) - As(0)) / (Ac(24) - Ac(0))] \times 100$$

As(24): جذب نمونه بعد از ۲٤ ساعت، As(0): جذب نمونه در زمان شروع، Ac(24): جذب کنترل بعد از ۲٤ ساعت، Ac(0): جذب کنترل در زمان شروع، I% : درصد بازدارندگی پس از انجام آزمون‌های فوق بهترین عصاره برای بررسی تاثیر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آن بر روی گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ استفاده شد.

۲-٦- آماده سازی تیمارها

ماهی فیتوفاگ به وزن ۵۰±۱۰۰۰ گرم به تعداد ۱۵ عدد به صورت زنده از بازار ماهی واقع در شهرستان ساری در بهار ۱۳۹۲ خریداری شد انتخاب ماهیان به صورت تصادفی و از بین ماهیان هم اندازه و سالم صورت پذیرفت و همراه با یخ به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی قائمشهر منتقل شدند. پس از سرزنی، تخلیه امعا و احشا و استخوانگیری و شست و شو ماهیان، ماهی با استفاده از چرخ گوشت، دو مرتبه چرخ شدو عصاره برگ شمعدانی (عصاره با غلظت بهتر در آزمون‌های آنتی اکسیدانی) بر

روی گوشت چرخ شده اسپری شد و به منظور ترکیب کامل عصاره، گوشت چرخ شده ماهی با دست ورز داده شد و سپس ماهی حاوی عصاره و تمیار شاهد (بدون عصاره) در ظروف بسته بندی یکبار مصرف قرار داده شد و سپس با سلفون پوشانده شده و به یخچال منتقل شدند و به مدت ۳۰ روز در دما ۱ ±٤درجه سانتی گراد نگهداری شدند و در فواصل زمانی ٤ روزه مورد ارزیابی میکروبی و شیمیایی قرار گرفتند.

۲-۷- آزمایشات شیمیایی

آزمایش پراکسید مطابق روش پیشنهاد شده توسط Egan و همکاران [۱۲]، اسید تیوباربیوتیک اسید مطابق روش Natseba و همکاران [۱۳]، مقادیر مجموع بازهای ازته فرار به روش Jeon و همکاران [١٤]انجام گرفت.

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها، با توجه به نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت پذیرفت. از نرم افزار (SPSSversion 18) برای آنالیزداده ها و Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میزان ترکیبات فنلی کل

ترکیبات فنلی دارای خواص بیولوژیکی متعددی مانند خاصیت آنتی اکسیدانی، به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و خاصیت ضدالتهاب می‌باشند. این ترکیبات باعث جلوگیری یا به تأخیر انداختن آسیب‌های اکسیداتیو در چربی‌ها و دیگر مولکولهای مهم شده واز بوجود آمدن سرطان و بیماریهای کرونر قلب جلوگیری می‌کنند [۱۵]. اکثر آن‌ها توسط واکنشگر فولین میزان فعالیت آن‌ها تعیین می‌شود. نتایج مربوط به ترکیبات فنلی در نمودار ۱ آورده شده است. میزان ترکیبات فنلی کل تیمار استخراج التراسوند (۱۵۰۰/٦میلی‌گرم در گرم وزن خشک) بیشتر از تیمار استخراج با حلال (۱۱۸۱/۳میلی‌گرم در گرم وزن خشک) بود و بین مقادیر میزان ترکیبات فنلی این دو تیمار اختلاف معنی داری مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$).

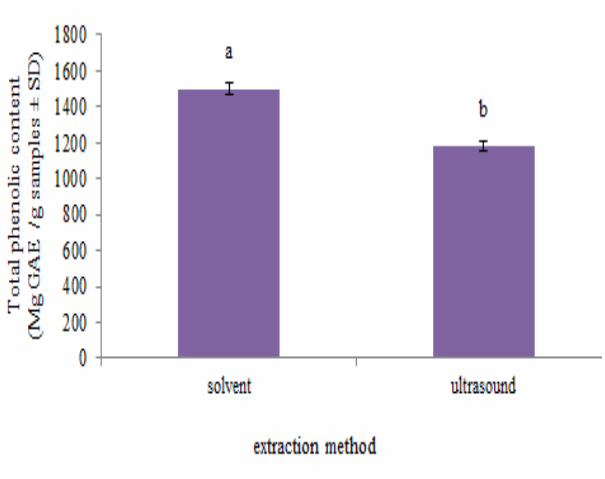

Fig 1 Effects of extracting method on the total phenolic content (TPC)
[a, b] shows significantly difference ($p< 0.05$).

حلالیت ترکیبات فنولی بسته به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون آن‌ها و بر همکنش آن‌ها با سایر ترکیبات موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است [١٦]. در فرایند استخراج با فراصوت،[1] حفره زایی ناشی از امواج فراصوت، نیروهایی ایجاد می‌کند که دیواره‌های سلول را به طور مکانیکی تجزیه میکند و انتقال مواد را بهبود می‌بخشد [۵]. نتایج مطالعه حاضر با نتایج اسماعیل زاده و همکاران [۸]هم خوانی داشت، آن‌ها اعلام نمودند مقادیر ترکیبات فنلی در روش فراصوت به طور معنی‌داری بیشتر از روش حلال بود.

۳-۲- فعالیت رادیکال آزاد DPPH

مهار رادیکال آزاد DPPH یکی از شناخته شده ترین مکانسیم‌هایی است که به‌واسطه آن ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌توانند اکسیداسیون چربی را مهار نمایند. در این روش نتایج بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلولهای DPPH در حضور اسانس یا عصاره نسبت به محلول فاقد اسانس و عصاره بیان می‌گردد [۱۵]. عصاره‌های گیاهی به علت دارا بودن ترکیبات فنلی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ظرفیت بالایی برای اهدای اتم

1. cavitation

هیدروژن یا الکترون و الکترون آزاد می‌باشد [۱۸]. نتایج مطالعه حاضر در نمودار۲ نشان داد که روش‌های مختلف استخراج، غلظت عصاره و آنتی اکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری (p<۰/۰۵) بر میزان مهار رادیکال آزاد DPPH داشت. با افزایش غلظت عصاره فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت و بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزادDPPH در تیمار ppm ۲۰۰۰ عصاره برگ شمعدانی در روش استخراج با فراصوت (۹۸/۰۵٪) مشاهده شد (p<۰/۰۵). کمترین مقادیر عددی فعالیت رادیکال آزاد DPPHدر تیمار ۵۰۰ پی‌پی ام استخراج با حلال (۴۱/۲٪) مشاهده گردید و مقادیر آن به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود (p<۰/۰۵).

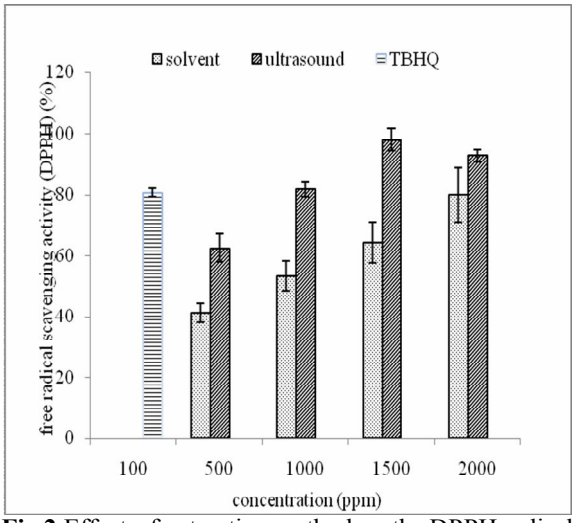

Fig 2 Effectsof extracting method on the DPPH radical scavenging activity compared to positive control (TBHQ)

علت بالا بودن میزان مهار رادیکال آزاد DPPH را در این تیمارها را می‌توان به علت بالا بودن ترکیبات فنلی در آن‌ها دانست. افزایش غلظت ترکیبات فنلی به‌طور مستقیم توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد [۱۹]. نتایج مطالعه حاضر با نتایج Džamić و همکاران (۲۰۱۴) در ارتباط با فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH توسط اسانس شمعدانی، Maleki و همکاران (۲۰۱۵) در رابطهبا عصاره کاسنی و Esmaeilzadeh و همکاران (۲۰۱۴) در ارتباط با عصاره کنجد هم‌خوانی داشت. این محققین نیز اعلام نمودند روش التراسوند فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری دارد.

۳-۳- آزمون بی رنگ شدن بتاکاروتن- لینولئیک اسید

یکی از روش‌های ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان استفاده از روش بتاکاروتن-لینولئات است. در این روش، بتاکاروتن در غیاب آنتی اکسیدان سریعاً بی‌رنگ می شود. دلیل این مساله اکسیداسیون بتاکاروتن و لینولئیک اسید و تشکیل رادیکال آزاد می‌باشد. رادیکال آزاد لینولئیک اسید پس از جدا شدن اتم هیدروژن توسط مولکول‌های فوق العاده غیر اشباع بتا کاروتن نیز اکسید شده و تا حدودی تجزیه گردیده و رنگ نارنجی آن زایل می‌گردد که این رویداد توسط متد اسپکتروفتومتری قابل ارزیابی می‌باشد. اکسیداسیون بتا کاروتن زمانی که در معرض یک آنتی اکسیدان باشد به حداقل می‌رسد [۲۲]. مقادیر عددی بتا کاروتنعصاره برگ شمعدانی در نمودار ۳ آورده شده است. با افزایش غلظت مقادیر عددی بتاکاروتن افزایش یافت و بیشترین میزان در تیمار ppm ۲۰۰۰ عصاره برگ شمعدانی در روش استخراج با فراصوت (۸۱/۹۰٪) و تیمار انتی اکسیدان سنتزی TBHQ (۸۴/۰۰٪) مشاهده شد و مقادیر آن‌ها به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود (p<۰/۰۵). علت بالاتر بودن فعالیت آنتی اکسیدانی در تیمار استخراج با فراصوت را می‌توان به دلیل بالاتر بودن ترکیبات فنلی در این روش‌ها دانست.

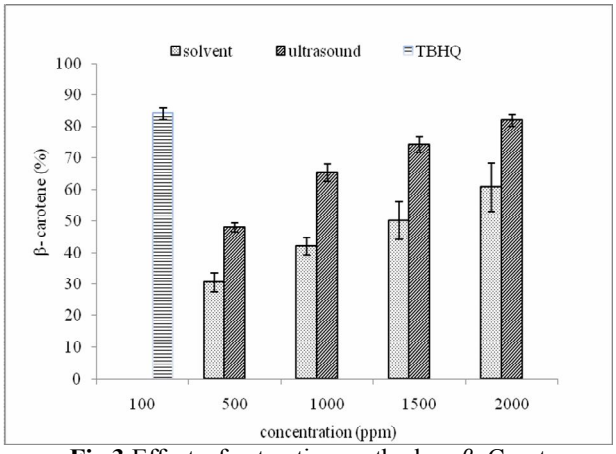

Fig 3 Effectsof extracting method on β -Carotene bleaching systemcompared to positive control (TBHQ)

مطالعات نشان می‌دهد که بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از عصارها از جمله عصاره‌های قطبی باشد. زیرا بر اساس شواهد موجود ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی اکسیدانی گیاهان وجود دارد. از طرف دیگربه نظرمرسد که ترکیبات فنلی که به صورت گسترده در گیاهان یافت می‌شوند و قدرت آنتی اکسیدانی بالایی دارند بیشتر از طریق عصاره‌های گیاهی آنها قابل استخراج باشد [۲۳]. Adewusi و Afolayan (۲۰۰۹) اعلام نمودند عصاره برگ و ریشه شمعدانی *Pelargonium reniforme* دارای فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی می باشد که به دلیل حضور ترکیبات فنولی موجود در آن می‌باشد.

۳-٤- بررسی تغییرات شیمیایی ماهی

۳-٤-۱- مقادیرعدد پراکسید

جهت تعیین هیدروپراکسیدها به عنوان محصول اولیه اکسیداسیون چربی در گوشت از شاخص پراکسید استفاده می‌شود. هرچند پراکسید ترکیبی بدون طعم و بو است که مصرف کنندگان قادر به تشخیص آن نمی‌باشند، ولی موجب تولید ترکیبات ثانویه نظیر آلدئیدها و کتون‌ها می‌شود که تندی اکسیداتیو در محصول را به دنبال دارد [۳۷]. در مطالعه حاضر مقادیر عدد پراکسید (نمودار ٤) در تمامی تیمارها تا روز ۱۵ ام افزایش و سپس کاهش و مجددا افزایش یافت و این افزایش در تیمار شاهد بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). افزایش اکسیداسیون لیپیدی در طول زمان می‌تواند به‌علت رهایی بیشتر آهن آزاد و پراکسیدانهای دیگر در اثر تجزیه بیشتر در طول ذخیره سازی از ماهیچه باشد [۲٦]. و کاهش عدد پراکسید پس از حداکثر مقدار خود در روز ۱۵ ام ممکن است به علت بی ثباتی هیدروپراکسید و تبدیل آن به ترکیبات ثانویه اکسیداسیون می‌باشد [۲۷]. در مجموع بیشترین مقادیر عدد پراکسید در روز ۳۰ ام در تیمار شاهد مشاهده شد (٦/۳ میلی اکی والان/ کیلوگرم چربی) ($P<۰/۰۵$) و مقادیر عدد پراکسید در روز ۳۰ ام در تیمار حاوی عصاره ۲/۹۳ میلی اکی والان بوده است.

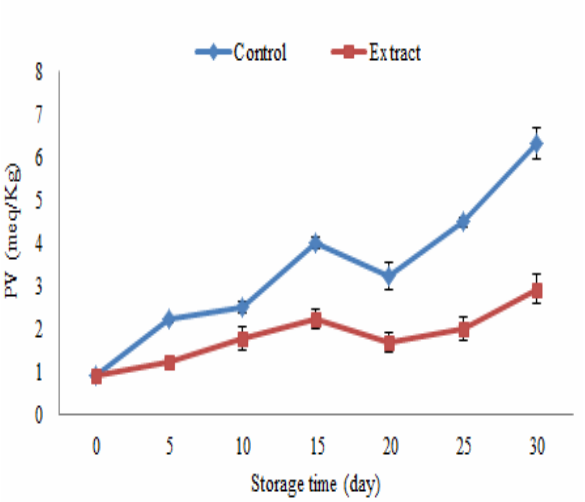

Fig 4 Changes in peroxide value (PV)of minced fish during storage

تیمارهای حاوی عصاره برگ شمعدانی به علت دارا بودن ترکیبات فنلی درای خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشند. همچنین عصاره‌ها توانایی شکستن رادیکال‌های آزاد، به وسیله دادن یک اتم هیدروژن را دارا می‌باشد و به علت دارا بودن ترکیبات فنولی نظیر تیمول و کاراکرول دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشد که فساد اکسیداتیو در فیله‌ها را به تاخیر می‌اندازد [۲۸]. نتایج مطالعه حاضر با نتایج اعتمادی و همکاران (۱۳۸۷) و حسنی و جوادیان (۲۰۱۵) هم‌خوانی دارد.

۳-٤-۲- مقادیر تیوباربیوتیک اسید

به منظور ارزیابی درجه اکسیداسیون چربی در ماهیان به طور وسیعی از شاخص تیوباربیتوریک اسید استفاده می‌شود [۱۵]. که میزان محصولات ثانویه اکسیداسیون به ویژه آلدهیدها را نشان می‌دهد. روند افزایش این شاخص‌ها در طول مدت نگهداری ممکن است به دلیل افزایش آهن آزاد و دیگر پراکسیدان‌ها در ماهیچه باشد، همچنین آلدهیدها به عنوان محصول ثانویه اکسیداسیون از شکست هیدروپراکسایدها ایجاد می‌شوند [۳۲]. با افزایش زمان مقادیر تیوباربیوتیک اسید در تمامی تیمارها افزایش یافت و این افزایش در تیمار شاهد بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). افزایش مقدار اسید تیوبابیتوریک طی نگهداری در دمای یخچال همچنین ممکن است ناشی از دهیدروژن شدن جزئی بافت ماهی و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع باشد [۳۵].در روز سی ام نگهداری تیمار حاوی عصاره به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود ($P<۰/۰۵$). به طوریکه میزان TBAدر تیمار شاهد

٤/٢٤ میلی گرم مالون در آلدئید/ کیلوگرم چربی بود و در تیمار حاوی عصاره ١/٤٥ میلی گرم مالون در آلدئید/ کیلوگرم چربیبود پایین بودن میزان TBA در نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان می‌تواند به دلیل اثر آنتی‌اکسیدان در کاهش تیوباربیوتیک باشد چراکه بر اساس مکانیسم یک مولکولی و دو مولکولی، زمانیکه مقادیر هیدروپراکسید کم باشد سرعت تشکیل این ترکیبات سریعتر از شکستگی آن‌ها است [٣٣]. حداکثر محدوده مجاز تیوباربیوتیک چربی ماهی ١-٢میلی گرم مالون دی آلدئید/کیلوگرم چربی گزارش شده که برای مصرف انسان قابل قبول می‌باشد [٣٤] در مطالعه حاضر ماهی حاوی عصاره شمعدانی از محدوده مجاز TBA برخوردار بودند.احمدی و همکاران (٢٠١٤) نیز اعلام نمودند افزایش میزان TBA در تیمارهای حاوی عصاره کندتر از تیمار شاهد بود.

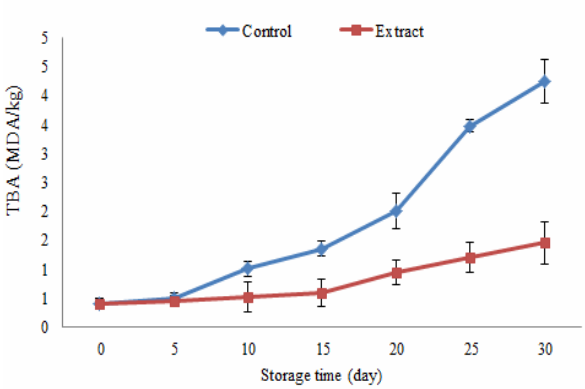

Fig 5 Changes in Thiobarbituric acid (TBA) of minced during storage

٣-٤-٣- مقادیر بازهای نیتروژنی فرار

تغییرات مقادیر بازهای نیتروژنی فرار یکی از ویژگی‌های مرتبط با تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی می‌باشد که به طور وسیعی به عنوان یک شاخص مفید برای تشخیص تازگی غذاها مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان این شاخص در گونه‌های مختلف متفاوت بوده و به گونه، سن، محل پرورش و جنس بستگی دارد. با افزایش زمان مقادیر بازهای نیتروژنی (نمودار ٦) در هر دو تیمار افزایش یافت (P<٠/٠٥). افزایش میزان بازهای نیتروژنی فرار ممکن است به دلیل فرایندهای آنزیمی مختلف نظیر آمین‌زدایی اسیدهای آمینه آزاد، تجزیه نوکلئوتیدها و اکسیداسیون آمین‌ها باشد [١٤]. در روز سی‌ام نگهداری تیمار حاوی عصاره به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود (P<٠/٠٥). به‌طوریکه میزان بازهای نیتروژنی فراردر تیمار شاهد ٦٦/٤٥ میلی گرم/ صد گرم بود و در تیمار حاوی عصاره ٤٤/٣٨ میلی گرم/ صد گرم بود.علت این امر کاهش جمعیت باکتری تیمارهای مذکور و یا کاهش توانایی اکسایشی باکتری‌ها در جدا کردن آمین‌ها از ترکیبات نیتروژنی غیر فرار و یا هر دو عامل در نتیجه اثر عصاره برگ شمعدانی بر باکتری‌های موجود در گوشت چرخ شده نسبت داد [٢]. محمدزاده و همکاران (١٣٩٣) نیز اثر ضد باکتریایی اسانس برگ شمعدانی معطر را بر میکروارگانیسم‌های بیماریزای مواد غذایی مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان دادکه اسانس برگ شمعدانی توانست به خوبی باکتریهای گرم مثبت و منفی را مهار کند. نتیجه تحقیق حاضر با نتایج Džamić و همکاران (٢٠١٤) و جوادیان و همکاران (٢٠١٦) مطابقت داشت.

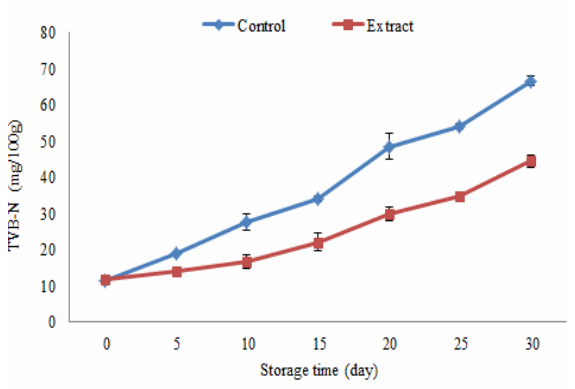

Fig 6 Changes in total volatile basic nitrogen (TVB-N) of minced fish during storage

طبق گزارشات موجود میزان ٣٥ میلی گرم در ١٠٠ گرم گوشت بالاترین سطح مورد قبول برای مجموع بازهای ازته فرار است [٣٧]. با توجه به این گزارش‌ها تیمار شاهد تنها تا ١٠ روز و تیمار حاوی عصاره تا ٢٥ روز از محدوده قابل قبولی برخوردار بود.

٤- نتیجه گیری کلی

روش فراصوت یک روش ارزان، ساده و موثر بوده و افزایش بازده عصاره گیری و افزایش سرعت واکنش مهم‌ترین محاسن این روش به شمار می‌رود. در این مطالعه عصاره برگ شمعدانی به روش‌های حلال و فراصوت استخراج شدو میزان ترکیبات فنلی و آنتی اسیدانی عصاره‌های به‌دست آمده سنجیده شد. نتایج مطالعه حاضر

نشان داد که ترکیبات فنلی و آزمون‌های آنتی اکسیدانی تحت تاثیر روش استخراج عصاره بوده است. بیشترین مقادیر ترکیبات فنلی، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بی رنگ شدن بتاکاروتن- لینولئیک اسید در غلظت ppm ۲۰۰۰ عصاره استخراجی به کمکم فراصوت مشاهده گردید . لذا با توجه به اثرات سوء نگهدارنده‌های مصنوعی عصاره برگ شمعدانی استخراجی با روش فراصوت در غلظت ppm ۲۰۰۰ بهگوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ در دمای ٤ درجه سانتی افزوده شد و با نمونه‌های فاقد عصاره در زمان های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روز مقایسه گردید.کمترین میزان پراکسید، تیوباربیتوریک اسید، بازهای ازته فرار در تیمار گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ حاوی عصاره برگ شمعدانی مشاهده شد. بنابراین با توجه به خواص آنتی اکسیدانی و کنترل فساد شیمیایی در گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگمی‌تواناذعانناموده‌که عصاره برگ شمعدانی پتانسیل لازم را به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در گوشت و فرآورده های شیلاتی را دارد.

۵- منابع

[1] Venugopal, V. 2006. Seafood Processing, CRC Press Publishing.

[2] Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry, 120: 193–198.

[3] Burt, S. 2004. Essentialoils: their antibacterial propertied and potential application in foods-a review. International Journal of Food Mashinicrobiology, 94 (3): 223- 253.

[4] Lee, S.J., Umano, K., Shibamoto, T., Lee, K.G. 2005.Identification of volatitle components in basil (Ocimum basilicum L.) and thyme leaves (Thymusvulgaris L.) and their antioxidant properties. Journal of Food Chemistry, 91: 131 - 7.

[5] Mohagheghi Samarin, A., Poor Azarang, H., Akhlaghi, H., Elhami Rad, A., Hematyar, N. 2008. Antioxidant activity of potato (Solanum tuberosum, raja) peel extract. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology, 3(3):23-32.

[6] Zolfaghari, B., Yegdaneh, A. 2010. Recent advances in extraction methods of medicinal components. Journal of Herbal Drugs, 1(1): 50-54.

[7] Rostamzadeh, H., Mousavi, S.M. 2015. Chemical and microbial changes in silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) fillet during storage in refrigerator. Journal of Aquatics Nutrition and Biochemistry, 1(3): 1-12.

[8] Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., Amiri, Z. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. Journal of Food Science andNutriation, 2: 426- 435.

[9] Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M. 2006. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from Melilotus officinalis (L.) Pallas Alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. Journal of Chromatography A, 1125:147-151.

[10] Mozdastan, Sh., Ebrahimzadeh, M.A., Khalili, M. 2015. Comparing the Impact of Different Extraction Methods on Antioxidant Activities of Myrtle (Myrtus communis L.).Journal of Univresity MedicineScience, 25 (127):10-24.

[11] Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A. 2004. Freeradical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies.Journal of Food Chemistry, 84: 551–562.

[12] Egan, H., Kirk, R.S., Sawyer, R. 1997. Person's chemical Analysis of Food. 9th Edition Longman scientific and technical, 609-634.

[13] Natseba, A., LwaliRda, I., Kakura, E., MuyaBja, C.K., Muyoaga, J.H. 2005. Effect of prefreezingicing duration on quality changes in frozen Nile perch (Lates niloticus). Journal of Food ResearchInternational, 38: 469-474.

[14] Jeon, Y.J., Kamil, J.Y., Shahidi, F. 2002. Chitosan as an Edible Invisible Film for Quality Presevation of Herring and Atlantic Cod.Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 5167-5178.

[15] Cai, Y., Luo, Q., Sun., M., Corke., H. 2004. Antioxidant activity and phenoliccompounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer.Journal of Life Science, 74: 2157-2184.

[16] Suzuki, M., Watanabe,, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y., Tsuji, K. 2002.

An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 49: 507-511.
[17] Ferreres, F., Sousa, C., Valento, P., Seabra, R.M.., Pereira, J.A., Andrade, P.B.. 2007. Tronchuda cabbage(Brassica oleracea L. var. costata DC) seeds: phytochemical characterization and antioxidant potential.Journal of FoodChemistry, 101: 549-558.
[18] Shon, M.Y., Kim, T.H., Sung, N.J. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of Phellinus baumii extracts. Journal ofFood Chemistry, 82:593–597.
[19] Sanchez-Moreno, C., Larrauri J.A., Saura-Calixto, F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International, 32:407–412.
[20] Džamić, A.M., Soković, M.D., Ristić, M.S., Grujić, S.M., Mileski, K.S. Marin, P.D. 2014. Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of Pelargonium graveolens essential oil.Journal of Applied Pharmaceutical Science, 4 (3): 001-005.
[21] Maleki, M., Ariaii. P., Fallah., H. 2016. Effects of Celery Extracts on the Oxidative Stability of Canola Oil Under Thermal Condition: Antioxidant Effect of Celery Extract on Canola Oil". Journal of Food Processing and Preservation, 40 (3): 531- 540.
[22] Mohdaly, M., Sarhan, M.A., Mahmoud, A., Ramadan, M., Smetanska, I. 2010. Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection. Journal of Food Chemistry, 12:1019-1026.
[23] Chatchawan, C., Soottawat, B., Jakul, H., Nattiga, S. 2008. Antioxidant components and properties of five long- grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailands. Journal of Food Chemistry,111 (3): 636-641.
[24] Adewusi, E.A., Afolayan, A.J. 2009. Safety evaluation of the extract from the roots of Pelargonium reniforme Curtis in male wistar rats. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 3(8): 368-373.
[25] Ozyurt, G., Polat, A., Tokur, B. 2007. Chemical and sensory changes in frozen (-18ºC) wild sea bass (Dicentrarchus labrax) captured at different fishing seasons. International Journal of Food Science and Technology, 42: 887–893.
[26] Vidya, S. R. G., Srikar, L. N. 1996. Effect of preprocess ice storage on the lipid changes of Japanese threadfin bream (Nemipterusjaponicas) mince during frozen. Asian Fisher Sci, 9: 109-114.
[27] Pereira de Abreu, D.A., Paseiro, L., Maroto, J., Cruz, M. 2011. Natural antioxidant active packaging film and its effect onlipid damage in frozen blue shark (Prionace glauca). Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12: 50–55.
[28] Maghsoudlou, Y., Asgharpoor, A., Ariaiee, P. 2013. Effect of Satureja khosestanicaessential oil on bacterial, chemical and sensory properties of frankfurter sausages.Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology, 2(3):279-294.
[29] Etemadi, H., Rezaei, M., Abedian Kenary, A.H. 2008. Antibacterial and antioxidant potential of rosemary extract (Rosmarinus officinalis) on shelf life extension of Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Journal of Food Science and Technology, 5 (19): 67-77.
[30] Hasani, O., Javadian, S. R. 2015. Effect of Encapsulated Bitter Orange Peel Extract and BHT on the Quality of Common Carp Fillet during Refrigerated Storage. International Journal of Food Engineering, 12(3): 303-310
[31] Nishimoto, J., Suwetja, I.K. Miki., H. 1985. Estimation of keepimg freshness period and practical storage life of mackerel muscle during storage at low temperatures. Memoirs of the Faculty of Fisheries kagoshima university, 34(1): 89-69.
[32] Gomes, H.A., Silva, E.N., Nascimento, M.R.L., Fukuma, H.T. 2003. Evaluation of the 2- thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. Journal of Food Chemistry, 80: 433-437.
[33] Ben-Gigirey, B., De Sousa, J.M., Villa, T.G., Barros-velazqez, J. 1999 .Chemical changes and visualappearance of albacore tuna as related to frozen storage . Journal of Food Science, 64: 20-24.
[34] Lakshmanan, P.T. 2000. Fish spoilage and quality assessment. In: Iyer TSG, Kandoran MK, Thomas M, Mathew PT (Eds.) Quality

assurance in seafood processing (pp. 26–40). Cochin: Society Fisher Techno (India).
[35] Ahmadi, M., Razavilar, V., Motallebi, A.A., Esmaeilzadeh Kenari, R., Kkhanipour, A. 2014. Effects of Hydroalcoholic and Water Extracts of Nettle Leaf (Urtica dioica L.) on Chemical Properties of Superchilled Minced Meat of Common Kilka (Clupeonella cultriventris caspia). Journal of Food Quality and Hazards Control, 1: 85-88.
[36] Javadian, S.R., Shahoseini, S.R., Ariaii, P. 2016.The effects of liposomal encapsulated thyme extract on the quality of fish mince and Escherichia coli O157: H7 inhibition during refrigerated storage, Journal of Aquatic Food Product Technology, doi.org/10.1080/10498850.2015. 1101629.
[37] Ozyurt, G., Polat, A. Tokur, B. 2007. Chemical and sensory changes in frozen (-18ºC) wild sea bass (Dicentrarchus labrax) captured at different fishing seasons. International Journal of Food Science and Technology, 42: 887–893.
[38] Mohammadzade, H., Mohammadi Sani, A., Shoeibi, S. 2014. Antibacterial characteristics of Pelargonium graveolens L. Hérit essential oil against food-borne pathogens. Journal of Food Microbiology, 1(2): 35-42.

The effect of different extraction method on the antioxidant activity of geranium leaf extract to extend the shelf-life of minced silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage at 4º C

Hoseini, F. [1], Javadian, S. R. [2*], Bahram, S. [2]

1. Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran
2. Student of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

(Received: 2016/10/10 Accepted:2018/07/31)

The effect of extraction methods (ultrasound and solvents) and different concentration of extract (500, 1000, 1500 and 2000 ppm) on the phenolic compounds and antioxidant activities of geranium leafextracts was evaluated to determine the most suitable extraction method for extendshelfof minced silver carp during refrigerated storage (30 days at 4ºC). Ultrasound extract was found to have higher phenols compounds (1500.6 mg/g sample) as compared with solvent extract ($P< 0.05$). The highest antioxidant activitywas found in ultrasound extract at 2000 ppm concentration (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl [DPPH] and β- carotene 98.08 % and 81.9%, respectively)($P< 0.05$). Then, theantioxidant effects of geranium leafextracts on quality of minced silver carpduring 30 days at child storage were examined bybiochemical parameter such as Peroxide value (PV), Thiobarbithic acid (TBA), total volatile base nitrogen (TVB-N).Samples treated with extract showed significantly ($P< 0.05$) lower TVB-N content and lipid oxidation (as reflected by lower PV and TBA values) during the storage period as compared with the control.

Key word: Antioxidant, Geranium leaf extract, Shelf life, Silver carp

* Corresponding Author E-Mail Address: ro.javadian@gmail.com