

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 شمعدانی به منظور به دست آوردن بهترین روش استخراج، برای افزایش ماندگاری گوشت چرخ شده فیتوفاگ نگهداری شده در یخچال بررسی شد (۳۰ روز در دمای ۴°C). عصاره استخراجی به روش فراصوت میزان ترکیبات فنلی (۱۵۰۰/۶ میلی گرم در گرم وزن خشک) بالاتری در مقایسه با عصاره استخراجی به روش حلال داشت ($P < 0/05$). بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره استخراجی به روش التراسوند با غلظت ۲۰۰ppm مشاهده شد (مهار رادیکال آزاد DPPH (۹۸/۰۸٪) و میزان عددی بتاکاروتن (۸۱/۹٪) ($P < 0/05$). سبب فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ شمعدانی (با غلظت ۲۰۰۰ ppm) بر گوشت چرخ شده ماهی کپور نقره ای در دمای ۴ 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 مقادیر مجموع بازهای نیتروژنی فرار فساد اکسیداسیونی کمتری (عدد پراکسید، مقادیر تیوباربیتوریک اسید کمتر) در طول دوره نگهداری نسبت به نمونه شاهد داشتند ($P < 0/05$).

کلید واژگان: آنتی اکسیدان، عصاره شمعدانی، عمر ماندگاری، 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 میباشد [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 چربی ها و همچنین فساد ناشی از ترکیبات پروتئینی، فساد ناشی از آنزیم ها و فساد میکروبی ناشی از میکروارگانیسم ها است [۲]. زمان ماندگاری ماهی با ارزیابی شدت واکنش های آنزیمی، درجه حرارت و تعداد و نوع میکروارگانیسم های مولد فساد تعیین می شود [۳]. جهت جلوگیری یا به تعویق انداختن فساد ماهی و فرآورده های آن راهکارهای متعدد شیمیایی، فیزیکی و میکروبی ارائه شده است که از آن جمله می توان به افزودن آنتی اکسیدان و استفاده از موادی مناسب با فعالیت ضد باکتریایی اشاره نمود [۳]. اما امروزه استفاده از روش های شیمیایی کمتر تأکید می شود، زیرا از یک سو مصرف کنندگان مواد غذایی خواستار غذاهای طبیعی با ماندگاری طولانی، همراه با کمترین تغییر در ساختار آن می باشند و از سوی دیگر خاصیت سرطان زایی و سمی بودن برخی از نگهدارنده های شیمیایی نیز برای انسان به اثبات رسیده است [۳]. آنتی اکسیدان های طبیعی با منشا گیاهی معمولا به این صورت طبقه بندی می شوند: ویتامین ها، ترکیبات فنولی شامل فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک و ترکیبات فرار در گیاهان و ادویه جات [۴]. اسانس ها و عصاره ها حاوی ترکیبات آنتی اکسیدانی مختلف و فراوانی اند این ترکیبات موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، مشخصا دوره اکسیداسیون کند را افزایش می دهند [۵]. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم ترین آن ها حلال و روش استخراج می باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به نوع مختلف گیاه و همچنین به مواد متشکله آن بستگی دارد [۶]. روشهای سنتی مانند روش سوکسله (حلال) که سالها مورد استفاده قرار می گرفته است، بسیار زمان بر بوده و مقدار زیادی حلال مصرف می کند. به همین دلیل تقاضای زیادی برای روش های عصاره گیری جدیدی با زمان کوتاهتر، میزان مصرف حلال کمتر و محافظ محیط زیست وجود دارد.

روش های جدید عصاره گیری مانند عصاره گیری همراه با امواج فرا صوت، عصاره گیری همراه با امواج مایکروویو و عصاره گیری همراه با مایع فوق بحرانی برای استخراج ترکیب های از گیاهان بسیار سریع و موثر عمل می کنند. این روش های جدید، پیشرفت زیادی داشته اند و برخی موارد استفاده از آن ها در استخراج مواد گیاهی گزارش شده اند [۶].

با توجه به آلودگی های ماهیان فیتوفاگ داخل کشور این نیاز وجود دارد تا روش های نوین بازدارندگی علیه فساد شیمیایی و میکروبی و بکارگیری راهکارهایی برای افزایش عمر ماندگاری آن بکار برده شود بنابراین با توجه به تولید بالای ماهی فیتوفاگوشیوه مصرف و نگهداری این ماهی که به صورت سرد می باشد 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 می باشد، در حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری این ماهی ضرورت می یابد [۷].

۲- مواد و روش ها

۲-۱ مواد اولیه مورد نیاز

گیاه شمعدانی از گلخانه ای در شهرستان قائم شهر جمع آوری شده و پس از تایید توسط گیاه شناس به آزمایشگاه منتقل شدند و بعد از جداسازی برگ ها و شستشو با آب شیرین، با استفاده از دستگاه آون با درجه حرارت ۴۰ 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 آن ها از شرکت مرک آلمان خریداری شد و همچنین رادیکال DPPH، بتاکاروتن، لینولئیک اسید، توتین ۴۰ و آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ از شرکت سیگما آلد ریچ خریداری شد.

۲-۱- روش های استخراج عصاره

۲-۱-۱- استخراج با حلال (روش سوکسله)

پودر شمعدانی به نسبت ۱ به ۵ (۲۰ گرم نمونه با ۱۰۰ میلی لیتر حلال) با آب مخلوط و دور از نور به مدت ۴۸ ساعت در شیکر

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 ۴۰ میلی گرم لینولئیک اسید و ۴۰۰ میلی گرم توئین ۴۰ اضافه شد. سپس با روش تبخیر در خلاء کلروفرم جدا گردید و ۱۰۰ میلی لیتر آب اکسیژنه به آن اضافه و شدیداً هم زده شد. ۵ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل و ۲۰۰ میکرو لیتر 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 ۴۷۰ نانومتر در زمان صفر و همچنین بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای اتاق قرائت شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره به عنوان درصد بازدارندگی بیان می شود.

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

As(24): جذب نمونه بعد از ۲۴ ساعت، As(0): جذب نمونه در زمان شروع، Ac(24): جذب کنترل بعد از ۲۴ ساعت، Ac(0): جذب کنترل در زمان شروع، %I: درصد بازدارندگی پس از انجام آزمون های فوق بهترین عصاره برای بررسی تاثیر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آن بر روی گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ استفاده شد.

۲-۶- آماده سازی تیمارها

ماهی فیتوفاگ به وزن 1000 ± 50 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 شد و عصاره برگ شمعدانی (عصاره با غلظت بهتر در آزمون های آنتی اکسیدانی) بر

(LABTRON Ls-100) با سرعت ۱۶۰ rpm قرار داده شدند. سپس سه مرحله سانتریفوژ شده (هر بار ۱۰ دقیقه و با ۳۰۰۰ rpm - Germany (HERMLE z200A)) و در هر مرحله فاز آبی (فاز روئی) جمع آوری شد، تا دیگر رسوبی در ته لوله دیده نشود. سپس فازهای آبی جمع آوری شده، با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شد. در ادامه توسط اوپراتور (حداکثر دما ۵۰ درجه سانتی گراد) (TAM 2times- Iran) حلال تبخیر و عصاره آبی به دست آمد. عصاره های 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 میلی لیتر حلال) با آب مخلوط، سپس در حمام فراصوت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه با فرکانس ۲۸-۳۴ کیلو هرتز قرار گرفت. سپس محلول ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در ادامه توسط اوپراتور (حداکثر دما ۵۰ درجه سانتی گراد) (TAM 2times- Iran) حلال تبخیر و عصاره آبی بدست آمد. عصاره های حاصل تا زمان 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 طیفسنجی با معرف فولین - سیوکالتیو مورد بررسی قرار گرفت [۸] و نتایج بر اساس میلی اکوی والن اسید گالیک بر گرم عصاره بیان شد.

۲-۴- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

برای انجام این آزمایش از رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. بدین منظور ۱ میلی لیتر از غلظت های مختلف عصاره به طور جداگانه (۵۰۰ ppm، 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 مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد و سپس جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۱۷ nm در مقابل شاهد خوانده شد. تمامی این مراحل در مورد TBHQ به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد انجام شد [۱۰].

$DPPH = 100 \times$ درصد مهار رادیکال آزاد

میزان ترکیبات فنلی این دو تیمار اختلاف معنی داری مشاهده گردید ($p < 0.05$).

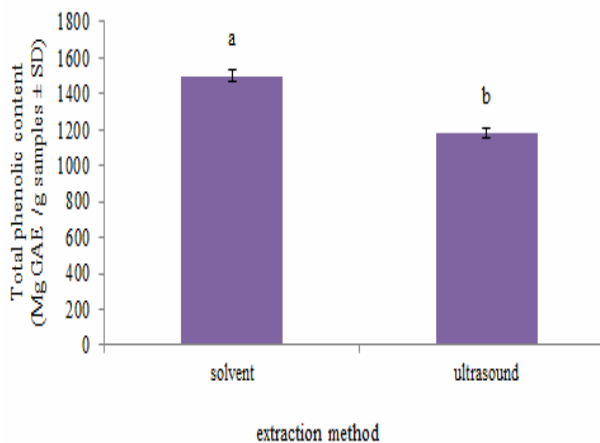


Fig 1 Effects of extracting method on the total phenolic content (TPC)

^{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 [۱۶]. در فرایند استخراج با فراصوت، 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.

۲-۳- فعالیت رادیکال آزاد DPPH

مهار رادیکال آزاد DPPH یکی از شناخته شده ترین مکانسیم‌هایی است که به واسطه 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

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 تیمار 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 1 ± 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند و در فواصل زمانی ۴ روزه مورد ارزیابی میکروبی و شیمیایی قرار گرفتند.

۲-۷- آزمایشات شیمیایی

آزمایش پراکسید مطابق روش پیشنهاد شده توسط Egan و همکاران [۱۲]، اسید تیوباریبوتیک اسید مطابق روش Natseba و همکاران [۱۳]، مقادیر مجموع بازهای ازته فرار به روش Jeon و همکاران [۱۴] 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 داده‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت پذیرفت. از نرم افزار (SPSS version 18) برای آنالیز داده‌ها 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 و از 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 (۱۵۰/۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) بیشتر از تیمار استخراج با حلال (۱۱۸/۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) بود و بین مقادیر

1. cavitation

کنجد هم‌خوانی داشت. این محققین نیز اعلام نمودند روش التراسوند فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد.

۳-۳- آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن - لینولئیک

اسید

یکی از روش‌های ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان استفاده از روش بتاکاروتن-لینولئات است. در این روش، بتاکاروتن در غیاب آنتی‌اکسیدان سریعاً بی‌رنگ می‌شود. 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 فوق‌العاده غیر اشباع بتاکاروتن نیز اکسید شده و تا حدودی تجزیه گردیده و رنگ نارنجی آن زایل می‌گردد که این رویداد توسط متد اسپکتروفتومتری قابل ارزیابی می‌باشد. اکسیداسیون بتاکاروتن زمانی که در معرض یک آنتی‌اکسیدان باشد به حداقل می‌رسد [۲۲]. مقادیر عددی بتاکاروتن‌عصاره 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 آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ (۸۴/۰۰٪) مشاهده شد و مقادیر آن‌ها به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($p < 0.05$). علت بالاتر بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار استخراج با فراصوت را می‌توان به دلیل بالاتر بودن ترکیبات فنلی در این روش‌ها دانست.

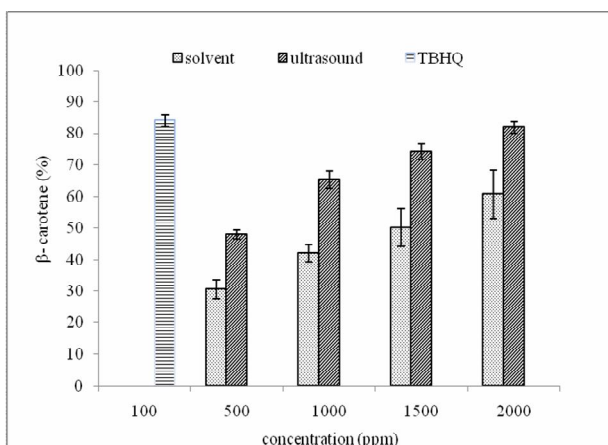


Fig 3 Effects of extracting method on β -Carotene bleaching system compared to positive control (TBHQ)

هیدروژن یا الکترون و الکترون آزاد می‌باشد [۱۸]. نتایج مطالعه حاضر در نمودار ۲ نشان داد که روش‌های مختلف استخراج، غلظت عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری ($p < 0.05$) بر میزان مهار رادیکال آزاد DPPH داشت. با افزایش غلظت عصاره فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت و بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار ppm ۲۰۰۰ عصاره برگ شمعدانی در روش استخراج با فراصوت (۹۸/۰۵٪) مشاهده شد ($p < 0.05$). کمترین مقادیر عددی فعالیت رادیکال آزاد DPPH در تیمار ۵۰۰ پی‌پی‌ام استخراج با حلال (۴۱/۲٪) مشاهده گردید و مقادیر آن به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود ($p < 0.05$).

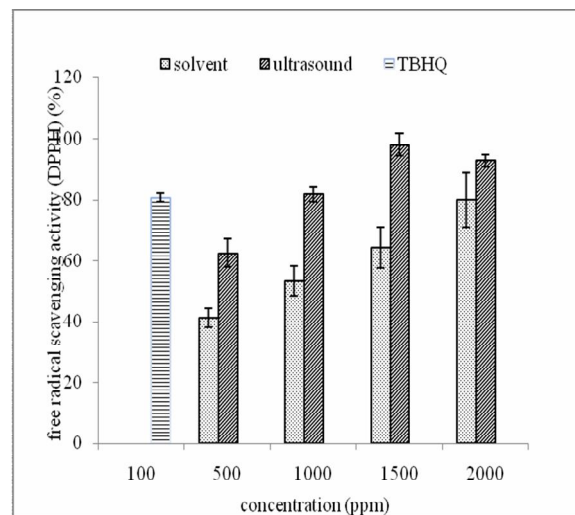


Fig 2 Effects of extracting method on the DPPH radical scavenging activity compared to positive control (TBHQ)

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 به طور 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 رابطه با عصاره کاسنی و Esmailzadeh و همکاران (۲۰۱۴) در ارتباط با عصاره

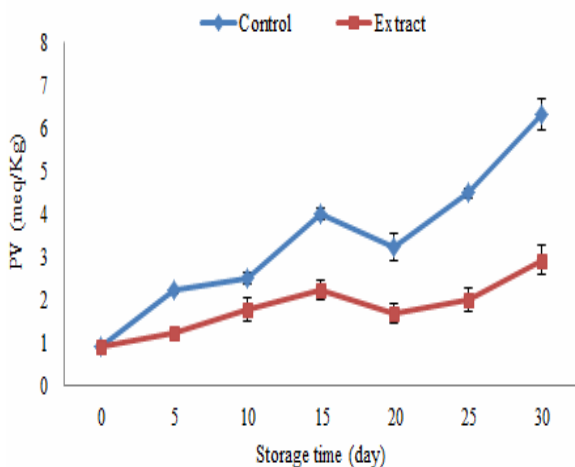


Fig 4 Changes in peroxide value (PV) of minced fish during storage

تیمارهای حاوی عصاره برگ شمعدانی به علت دارا بودن ترکیبات فنلی دارای 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.

۳-۴-۲- مقادیر تیوباریوتیک اسید

به منظور ارزیابی درجه اکسیداسیون چربی در ماهیان به طور وسیعی از شاخص تیوباریوتیک 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 هیدروپراکسیدها ایجاد می‌شوند [۳۲]. با افزایش زمان مقادیر تیوباریوتیک اسید در تمامی تیمارها افزایش یافت و این افزایش در تیمار شاهد بیشتر بود ($P < 0/05$). افزایش مقدار اسید تیوباریوتیک 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 ($P < 0/05$). به طوریکه میزان TBA در تیمار شاهد

مطالعات نشان می‌دهد که بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از عصاره‌ها 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 دیگر به نظر می‌رسد 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]. Afolayan و Adewusi (۲۰۰۹) اعلام نمودند عصاره برگ و ریشه شمعدانی *Pelargonium reniforme* دارای فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی می‌باشد که به دلیل حضور ترکیبات فنولی موجود در آن می‌باشد.

۳-۴-۳- بررسی تغییرات شیمیایی ماهی

۳-۴-۳-۱- مقادیر عدد 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 آلدهیدها و کتون‌ها می‌شود که تندی اکسیداتیو در محصول را به دنبال دارد [۳۷]. در مطالعه حاضر مقادیر عدد پراکسید (نمودار ۴) در تمامی تیمارها تا روز ۱۵ ام افزایش و سپس کاهش و مجدداً افزایش یافت و این افزایش در تیمار شاهد بیشتر بود ($P < 0/05$). افزایش اکسیداسیون لیپیدی در طول زمان می‌تواند به علت رهایی بیشتر آهن آزاد و پراکسیدان‌های دیگر در اثر تجزیه بیشتر در طول ذخیره سازی از ماهیچه باشد [۲۶]. و کاهش عدد پراکسید پس از حداکثر مقدار خود در روز ۱۵ ام ممکن است به علت بی‌ثباتی 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 (۶/۳ میلی اکی والان/ کیلوگرم چربی) ($P < 0/05$) و مقادیر عدد پراکسید در روز ۳۰ ام در تیمار حاوی عصاره ۲/۹۳ میلی اکی والان بوده است.

تیمار شاهد بود ($P < 0/05$). به طوریکه میزان بازهای نیتروژنی فرار در تیمار شاهد ۶۶/۴۵ میلی گرم/صد گرم بود و در تیمار حاوی عصاره ۴۴/۳۸ 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 [۲]. محمدزاده و همکاران (۱۳۹۳) نیز اثر ضد باکتریایی اسانس برگ شمعدانی معطر را بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مواد غذایی مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که اسانس برگ شمعدانی توانست به خوبی باکتریهای گرم مثبت و منفی را مهار کند. نتیجه تحقیق حاضر با نتایج Džamić و همکاران (۲۰۱۴) و جوادیان و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت.

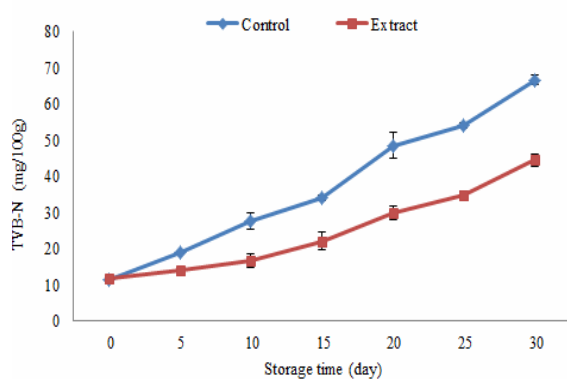


Fig 6 Changes in total volatile basic nitrogen (TVB-N) of minced fish during storage

طبق گزارشات موجود میزان ۳۵ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت بالاترین سطح مورد قبول برای مجموع بازهای ازته فرار است [۳۷]. با توجه به این گزارش‌ها تیمار شاهد تنها تا ۱۰ روز و تیمار حاوی عصاره تا ۲۵ روز از محدوده قابل قبولی برخوردار بود.

۴- 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 شد و میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اسیدانی عصاره‌های به دست آمده سنجیده شد. نتایج مطالعه حاضر

۴/۲۴ میلی گرم مالون در آلدئید/کیلوگرم چربی بود و در تیمار حاوی عصاره ۱/۴۵ میلی گرم مالون در آلدئید/کیلوگرم چربی بود پایین بودن میزان TBA در نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان می‌تواند به دلیل اثر آنتی‌اکسیدان در کاهش تیوباریوتیک باشد چراکه بر اساس مکانیسم یک مولکولی و دو مولکولی، زمانیکه مقادیر هیدروپراکسید کم باشد سرعت تشکیل این ترکیبات سریعتر از شکستگی آن‌ها است [۳۳]. حداکثر محدوده مجاز تیوباریوتیک چربی ماهی ۱-۲ میلی گرم مالون دی آلدئید/کیلوگرم چربی گزارش شده که برای مصرف انسان قابل قبول می‌باشد [۳۴]. در مطالعه حاضر ماهی حاوی عصاره شمعدانی از محدوده مجاز TBA برخوردار بودند. احمدی و همکاران (۲۰۱۴) نیز اعلام نمودند افزایش میزان TBA در تیمارهای حاوی عصاره کندتر از تیمار شاهد بود.

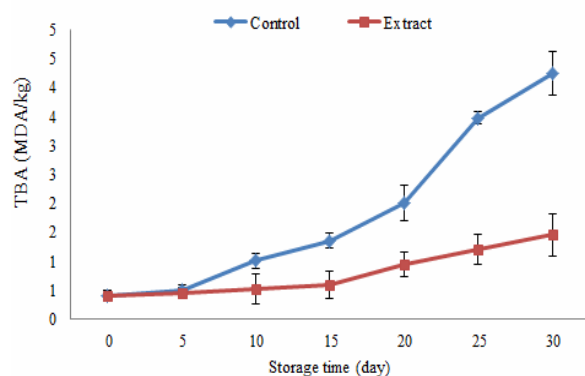


Fig 5 Changes in Thiobarbituric acid (TBA) of minced during storage

۳-۴-۳- 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 ۶) در هر دو تیمار افزایش یافت ($P < 0/05$). افزایش میزان بازهای نیتروژنی فرار ممکن است به دلیل فرایندهای آنزیمی مختلف نظیر آمین‌زدایی اسیدهای آمینه آزاد، تجزیه نوکلئوتیدها و اکسیداسیون آمین‌ها باشد [۱۴]. در روز سی‌ام نگهداری تیمار حاوی عصاره به طور معنی‌داری کمتر از

- 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] Esmailzadeh 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 and Nutrition*, 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 University Medicine Science*, 25 (127):10-24.
- [11] Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A. 2004. Free radical 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 prefreezing duration on quality changes in frozen Nile perch (*Lates niloticus*). *Journal of Food Research International*, 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 phenolic compounds 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. 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 ۲۰۰۰ ppm عصاره استخراجی به کم کم فراصوت مشاهده گردید. لذا با توجه به اثرات سوء نگهدارنده‌های مصنوعی عصاره برگ شمعدانی استخراجی با روش فراصوت در غلظت ۲۰۰۰ ppm به‌گوشه چرخ شده ماهی فیتوفاگ در دمای ۴ 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، تیوباریتوریک 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 فیتوفاگمی توانادعا نمود که 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. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3): 223-253.
- [4] Lee, S.J., Umano, K., Shibamoto, T., Lee, K.G. 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* 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

- 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 (*Nemipterus japonicus*) 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 on lipid 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 khosestanica essential 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 keeping 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-velazquez, J. 1999. Chemical changes and visual appearance 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 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 Food Chemistry*, 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 of Food 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., Sootawat, B., Jakul, H., Nattiga, S. 2008. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. *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 (-18°C) wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) captured at

- 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 (-18°C) 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.
- assurance in seafood processing (pp. 26–40). Cochin: Society Fisher Techno (India).
- [35] Ahmadi, M., Razavilar, V., Motallebi, A.A., Esmailzadeh 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

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 4° 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 leaf extracts was evaluated to determine the most suitable extraction method for extend shelf of minced silver carp during refrigerated storage (30 days at 4°C). 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 activity was 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, the antioxidant effects of geranium leaf extracts on quality of minced silver carp during 30 days at child storage were examined by biochemical parameter such as Peroxide value (PV), Thiobarbitic 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