ویژگی‌های ضد اکسندگی و ضد میکروبی عصاره‌های برگی گیاه تمشک سیاه (*Rubus occidentalis*) و اثر آنها بر پایداری روغن سویا

ابوالفضل فدوی*[۱]، هادی کوهساری[۲]، سید حسین حسینی قابوس[۳]

۱- عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزاد شهر، استان گلستان
۲- عضو هیات علمی گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزاد شهر، استان گلستان
۳- عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزاد شهر، استان گلستان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۸)

چکیده

امروزه یافتن منابع جدید ترکیبات ضد اکسنده در گیاهان برای بکارگیری آن‌ها به عنوان افزودنی طبیعی و جایگزین کردن آنها به جای ضد اکسنده‌های مصنوعی در مواد غذایی یکی از موضوعات مهم تحقیقات صنایع غذایی می‌باشد. در این تحقیق عصارهٔ متانولی بدست آمده از برگ سبز و سیاه شده گیاه تمشک از نظر خواص ضداکسندگی، محتوی ترکیبات فنولی و اثرات ضد میکروبی بر میکروب‌های: *انتروکوکوس فکالیس*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *شیگلا دیسانتری* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* بررسی گردید. سپس این عصاره‌ها در ۳ غلظت ۲۰۰، ٤۰۰ و ٦۰۰ppm در روغن سویای تصفیه شده بدون ضداکسنده به کار گرفته و بعد در دمای ٦۰ °C به مدت یک ماه ذخیره شدند. متعاقباً مقادیر اسیدیته، اندیس یدی و اندیس پراکسید نمونه‌های روغن تعیین گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، عصارهٔ برگی سبز به طور معنی داری قدرت ضداکسندگی (۸۷٪- ۰/۷) و محتوی ترکیبات فنولی (۱۰۳ ±۰/۱mg/g dry matter) بیشتری نسبت به عصارهٔ برگی سیاه بود. همچنین کمترین غلظت موثر عصارهٔ برگ سبز تمشک روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به میزان ۷/۱۲mg/ml و *روی باکتریهای سالمونلا تیفی موریوم* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* به میزان ۲۸/۵mg/ml بود. اما عصارهٔ برگی سیاه تمشک هیچ اثری روی میکروب‌های مورد نظر نداشت. در آزمون های کیفی روغن، با افزایش غلظت عصاره‌برگ سبز مقادیر اسیدیته و پراکسید نمونه‌ها به طور معنی داری افزایش یافت. نتایج نهایی نشان داد که روغن سویای حاوی کمترین غلظت عصارهٔ برگ‌های سبز تمشک (۲۰۰ppm) از نظر آزمون‌اسیدیته و پراکسید بهتر از روغن سویای حاوی ضداکسنده تجارتی پروپیل گالات (۲۰۰ppm) بود

کلید واژگان: عصاره برگی تمشک، قدرت ضداکسندگی، اثر ضد میکروبی، پایداری روغن سویا.

* مسئول مکاتبات: fadavi.ac.ir@gmail.com

۱- مقدمه

اکسیداسیون ترکیبات آلی، شیمیایی، بیولوژیکی و حتی عناصر معدنی سرآغاز تغییرات اساسی در ساختار مولکولی آنهاست که معمولا" منجر به تخریب مولکولی و ناپایداری آنها می گردد. این امر به خصوص در مواد غذایی و به ویژه در چربی ها منجر به ناپایداری و عدم تحمل فرایند های حرارتی گشته و منجر به تشکیل بو و مزه نامطلوب شده، کیفیت ماده غذایی را کاهش می دهد. به منظور جلوگیری از این پدیده های نامطلوب و کنترل این واکنشها از ترکیباتی به نام ضد اکسنده[1] استفاده می کنند. آنتی اکسیدان ها یا ضد اکسنده ها ترکیباتی هستند که از شروع و پیشرفت واکنشهای اکسیداسیونی که منجر به تخریب چربی ها و روغن ها می گردد جلوگیری می‌کنند. بدیهی است که رادیکال آزاد به جا مانده از ضد اکسنده، باید حتی الامکان خود سبب تولید رادیکال آزاد اسید چرب و آغاز اکسیداسیون نگردد و در ضمن سریعاً توسط اکسیژن اکسید نگردد [۱].

امروزه نقش برخی از ترکیبات فنولی با منشاء گیاهی به عنوان ضداکسنده‌های طبیعی در حذف مستقیم رادیکال های آزاد از طریق واکنش با آن ها یا احاطه کردن آن ها مشخص شده است [۲، ۳]. یک دسته از مواد غذایی که امروزه از ضداکسنده های ساختگی برای افزایش ماندگاری آنها استفاده می‌شود روغن های خوراکی با منشاء گیاهی نظیر روغن سویا، آفتابگردان، پالم، کلزا هستند که در تغذیهٔ انسان جایگاه ویژه ای دارند و در بین آن ها روغن سویا نقش مهمی در تهیه غذاها و پخت و پز ایفا می کند. امروزه محققان به دنبال یافتن راه هایی برای حفظ پایداری و کیفیت بیشتر و بهتر آن ها توسط ضداکسنده ها می باشند و در این خصوص ضداکسنده های با منشاء گیاهی که اثرات جانبی برای انسان نداشته باشد مورد توجه است. این ترکیبات علاوه بر اینکه کیفیت روغن‌ها را افزایش می‌دهند در سلامت بدن انسان نیز نقش بسزائی دارند زیرا که باعث غیرفعال شدن ترکیبات نامطلوب تولید شده طی واکنش های بیولوژیکی متابولیسم سلولی نظیر پراکسید هیدروژن، اکسیژن فعال و رادیکال های آزاد هیدروکسیل و آنیون سوپراکسید می‌گردند [٤، ٥]. لذا یافتن منبع غنی از این ترکیبات و بررسی امکان استفاده از آنها در بهبود کیفیت مواد غذایی ضروری به نظر می رسد.

تمشک از تیره گلسرخیان، جنس *رابوس*[2] بوده و سه گونه مهم آن شامل *تمشک قرمز*[3]، *تمشک سیاه*[4] و *توت سیاه*[5] می باشد. بخش‌های مختلف این گیاه از قبیل برگها، ریشه و میوه آن خاصیت درمانی داشته و سالها به عنوان یک گیاه دارویی استفاده می‌شده است [٦]. بطور مثال از دم کرده برگهای آن به عنوان کاهش دهنده ی قند خون، کاهش دهنده‌ی انقباضات عضلانی مادر حین تولد نوزاد، گلودرد و اسهال استفاده می شده است [۷]. ریشه این گیاه فعالترین بخش آن از نظر بیولوژیکی است که در کاربردهای سنتی به عنوان تمییز کننده زخم ها و تسکین گلودرد بکار گرفته می‌شد. علاوه بر این روغن هسته استخراج شده به روش سرد آن واجد خواص آنتی اکسیدانی و کی لیت کنندگی بالایی است که در محصولات دارویی نقش ضد التهابی را دارد [۸، ۹]. همچنین در مقایسه‌ای که بین عصاره های برگی تمشک، توت فرنگی و زغال اخته انجام شد از لحاظ قدرت ضد اکسندگی ترتیب آنها به صورت توت فرنگی> زغال اخته> تمشک مشخص گردید [۱۰]. عوامل ژنتیکی و فرایند رشد گیاه و میوه در ویژگی ضد اکسندگی میوه‌ی آن می‌توانند اثرگذار باشد زیرا طی آن برخی از آنتوسیانین های جدید ایجاد می شود. علاوه بر آنتوسیانین ها، الاجی‌تانین ها و تانن های شبیه پروآنتوسیانیدین نیز جزو ترکیبات ضد اکسنده غالب میوه تمشک به شمار می‌آیند [۱۱].

در خصوص میزان ترکیبات فلاونوئیدی، تاننی و اسید الاژیک[6] موجود در برگهای گونه‌های مختلف توت‌ها نیز تحقیقات نشان داده است که میزان فلاونوئیدها (۱/۰۵- ۰/٤٦٪) در برگ توت سیاه بیشتر از برگ تمشک بود و در تمام گونه ها ترکیبات غالب، کوئرستین[7] و کامپفرول[8] بودند. میزان اسید الاژیک پس از هیدرولیز اسیدی آن در محدوده‌ی ٦/٨٧-۲/٦۲٪ فرار داشت.

1. Antioxidant

2. Rubus
3. *R. idaeus L .*
4. *R. Occidentalis*
5. *R. ursunus*
6. Ellagic acid
7. Quercetin
8. Kaempferol

همچنین برگهای تمشک حاوی بیشترین ترکیبات تانني (۶/۸۹-۲/۰۶٪) نسبت به بقیه گونه‌ها بود [۱۲].

با وجود تحقیقات متعدد صورت پذیرفته روی شناسایی خواص ضداکسندگی قسمت های خوراکی و میوه و روغن هسته تمشک، منابع اندکی را می‌توان در مورد خصوصیات ضداکسندگی و ضد میکروبی عصاره برگی آن پیدا نمود. در این میان هیچ تحقیقی در خصوص امکان بکارگیری عصاره برگی تمشک در روغن سویا مشاهده نگردیده است. لذا ضرورت شناخت اثر ضداکسندگی این قسمت از گیاهان امری حیاتی برای استفادهٔ صنعتی و تولید ضداکسنده های گیاهی با قابلیت جایگزین با ضداکسنده های مصنوعی رایج نظیر پروپیل گالات[1] BHT, BHA, و ... می باشد و هدف از این تحقیق بررسی و مقایسهٔ خصوصیات ضداکسندگی و ضد میکروبی برگ های سبز و سیاه شدهٔ گیاه تمشک می‌باشد. ضمن این که پایداری روغن های سویای حاوی این عصاره ها که تحت فرایند دمایی قرار گرفته اند نیز بررسی می گردد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱-جمع آوری نمونه ها و تهیه برگ های خشک سبز و سیاه

برگ های گیاه تمشک سیاه در ماه شهریور چیده و جمع آوری شدند. سپس برگ ها شسته و نم گیری شدند. برای تهیه برگ‌های سبز خشک، برگ های تمیز شده در دمای ۶۰°C به مدت ۱۲ ساعت در آون قرار گرفته پس از خشک شدن به قطعات cm^2 ۰/۵ خرد گردیدند. برای تهیهٔ برگ‌های خشک سیاه، برگ های سبز تازه و تمیز را ابتدا در دمای ۴۰° C به مدت ٤ ساعت پلاسیده نموده سپس عمل مالش دهی و خرد کردن انجام گردید. برای انجام واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنها به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ °C گذاشته شده تا زمانی که واکنش ها کامل گردد. سپس دما تا ۶۰°C بالا رفت تا طی ۱۲ ساعت خشک گردند. برای تهیه عصارهٔ متانولی برگ ها، ٤۰ گرم از برگ های خشک شده با ۲۰۰ میلی لیتر متانول مخلوط گردیده و به مدت ۱۰ ساعت به حالت سکون ماند. سپس عصاره ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۲ صاف شده و با دستگاه آون تحت خلاء در دمای ۵۰°C و فشار ۵۰ میلی‌بار تغلیظ و خشک گردید. عصاره ها تهیه شده در دمای ۲۰-℃ تا زمان انجام آزمایشات نگهداری گردیدند.

۲-۲-اندازه گیری فعالیت ضداکسندگی بر اساس حذف رادیکال های DPPH[2]

در این آزمون [۱۳] ابتدا غلظت های متفاوتی از عصاره های گیاهی تهیه می گردد. سپس ۰/۳ میلی لیتر از هر کدام از آن ها را با ۲/۷ میلی لیتر محلول رادیکال های DPPH (تهیه شده در غلظت 6×10^{-3} M) مخلوط می گردد. سپس مخلوط شدیداً هم زده شده و بمدت ۳۰ دقیقه ساکن می ماند و بعد میزان جذب نوری آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه طیف نور سنج خوانده می شود. نتایج بر حسب درصد رنگبری ترکیب DPPH بر اساس رابطهٔ زیر محاسبه و گزارش می گردد:

$$\text{فعالیت ممانعت کنندگی}(\%) = (A_o - A_c)\times 100 / A_o$$

که A_o = میزان جذب نوری در نمونهٔ شاهد و A_c = میزان جذب نوری در نمونهٔ اصلی می باشد.

۲-۳- اندازه گیری میزان کل ترکیبات فنولی

روش آزمون [۱٤] بدین ترتیب است که ۳۰۰ میکرو لیتر از نمونه ها را در لولهٔ آزمایش ریخته به آن ۱/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتیو[3] (از محلول ۱۰ برابر رقیق شدهٔ آن برداشته می شود) اضافه شد. سپس ۲ میلی لیتر را محلول (وزنی/ حجمی) ۷/۵٪ سدیم کربنات به آن اضافه گردید. محلول ایجاد شده به مدت ۳۰ دقیقه ساکن گذاشته شده سپس میزان جذب نوری آن در طول موج ۷٦۵ نانومتر خوانده شد. میزان کل ترکیبات فنولی بر حسب میلی گرم اسید گالیک در هر گرم از عصارهٔ خشک شده گزارش شد و در این خصوص از رابطه (R^2=۰/۹۹۹۸) ۱٤۸x-۰/۰ y=۰/۱۱۱x استفاده گردید که y میزان جذب نور توسط محلول است و x محتوی کل فنولی بر حسب میلی گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره است.

1. Propyl Gallate

2. Diphenyl-1-picrylhydrazyl-2, 2

3. Folin – Ciocalteu

۲-٤- اندازه گیری قدرت کی لیت کنندگی[1] یون های آهن دو ظرفیتی (آزمون FIC)

روش انجام این آزمون [۱۵] بدین ترتیب است که در ابتدا محلول های ۲mM سولفات آهن ($FeSo_4$) و ۵mM معرف فروزین تهیه می گردد. هر محلول ۲۰ برابر رقیق گردید. سپس ۱ میلی لیتر از محلول رقیق شدهٔ سولفات آهن با ۱ میلی لیتر از محلول نمونه مخلوط شده و بعد ۱ میلی لیتر از محلول رقیق شدهٔ معرف فروزین به آن اضافه گردید سپس به مدت ۱۰ دقیقه به مخلوط بدست آمده استراحت داده شده و میزان جذب نوری آن در طول موج ٥٦٢ نانومتر خوانده شد. به دلیل این که نتایج این آزمون با غلظت نمونه ها مرتبط است. غلظت های متفاوتی از عصاره ها مورد بررسی قرار گرفت. نمونهٔ شاهد فاقد عصاره نیز مورد آزمون قرار می‌گیرد. نتایج این آزمون بر حسب درصد قدرت کی لیت کنندگی بر اساس رابطهٔ زیر گزارش شد.

قدرت کی لیت کنندگی(٪) = $(A_{control} - A_{sample}) \times ۱۰۰/ A_{control}$، که $A_{control}$: میزان جذب نوری در نمونهٔ شاهد بوده و A_{sample} : میزان جذب نوری در نمونهٔ حاوی عصاره می باشد.

۲-۵- اثر ضد باکتریایی

٦ گونه باکتری *اشریشیا کلی*[2](PTCC 1399)، *سالمونلا تیفی موریوم*[3](PTCC 1596)، *شیگلا دیسانتری*[4](PTCC 1188)، *استافیلوکوکوس اورئوس*[5](PTCC 1436)، *یرسینیا انتروکولیتیکا*[6] و *انتروکوکوس فکالیس*[7] *مقاوم* به وانکومایسین (Van R 181) ازسازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. از کشت ٢٤ ساعته باکتریهای مورد نظر در محیط کشت مولرهینتون آگار، یک لوپ به محیط کشت مایع انتقال داده و سوسپانسیونی از باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید و طبق روش چاهک [١٦] از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند برسطح محیط کشت مولرهینتون آگاربه صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن چاهک هایی با قطر ۷ میلیمتر حفر شد و با سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های‌مختلف عصاره ها در چاهک ها ریخته شد، سپس به مدت ٢٤ ساعت در۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه گذاشته شدند. پس از این مدت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد نظر به عصاره ها تعیین شد (هاله های عدم رشد بیش از۱۲ میلیمتر نشان دهنده حساسیت باکتری به عصاره می باشد).

۲-٦- میزان اسیدیته ، عدد پراکسید، عدد یدی

این آزمونها از دو جنبه اهمیت دارند اول از این جهت که به دلیل امکان حضور آنزیم های مختلف در عصاره برگی و اثرگذاری آنها روی کیفیت روغن، ناپایداری و افت کیفیت مشاهده نگردد. لذا در این خصوص، یکی از آزمونهایی که می‌تواند پایداری روغن را نشان دهد بررسی میزان اسیدیته است. این آزمون بیانگر مقدار اسیدهای چرب آزاد شده در نتیجه هیدرولیز چربی ها می‌باشد، بنابراین مقدار آن تابعی از خلوص، تازگی و درجه هیدرولیز روغن‌ها است. دوم از جنبه امکان توقف یا کند سازی اکسایش روغن ها توسط عصاره ها که در این خصوص از آزمون های کیفی از قبیل عدد یدی (روش ید هانوس)، عدد پراکسید استفاده گردید.

در این مرحله عصاره های برگی سبز و سیاه بدست آمده از برگ های گیاه تمشک در ۳ غلظت ۲۰۰، ٤۰۰ و ٦۰۰ppm به روغن سویا اضافه شد. روغن سویای مورد استفاده در این تحقیق روغن تصفیه شده فاقد ضداکسنده تجارتی بوده و از تولید همان روز کارخانهٔ تصفیهٔ روغن شرکت عالیا گلستان واقع در شهرستان کردکوی، استان گلستان تهیه گردید. به همراه نمونه های حاوی عصاره های گیاهی، نمونهٔ بازاری حاوی ضداکسنده تجارتی پروپیل گالات به غلظت ۲۰۰ppm تولید شده در همان کارخانه و نمونهٔ شاهد فاقد ضداکسنده نیز مورد بررسی قرار گرفتند. این نمونه ها در دمای ٦۰°C به مدت ۱ ماه قرار گرفتند تا بعداً از نظر آزمون های تغییرات کیفی از قبیل درصد اسیدیته[۱۷]، عدد پراکسید [۱۸]، عدد یدی (روش ید هانوس) [۱۹] مورد بررسی قرار گیرند.

1. Chelating
2. *Escherichia coli*
3. *Salmonella typhimurium*
4. *Shigella dysenteria*
5. *Staphylococcus aureus*
6. *Yercinia enthrocolitica*
7. *Entherococcus faecalis*

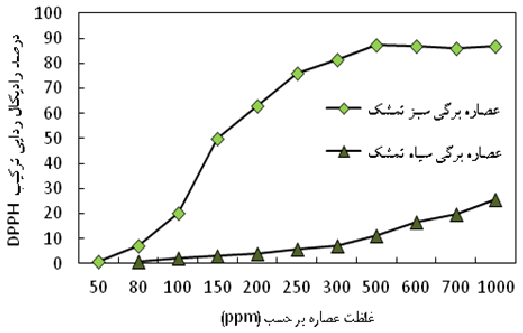
۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام شد و داده های به دست آمده توسط نرم افزار SAS آنالیز و میانگین ها در سطح ۰/۰۵ مقایسه و در نهایت نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شدند.

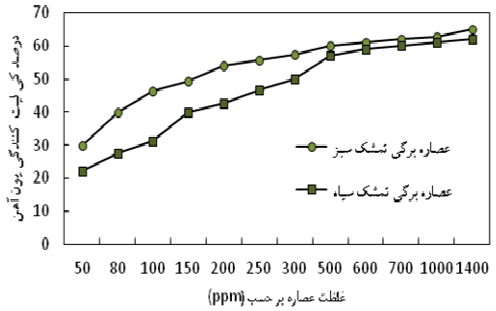
۳- نتایج و بحث

۳-۱- قدرت ضد اکسندگی

با توجه به نتایج بدست آمده (شکل ۱) مشخص گردید که قدرت ضداکسندگی عصارهٔ برگ سبز گیاه تمشک بسیار بیشتر از عصارهٔ برگی سیاه آن بوده و اختلاف آن‌ها معنی دار بود (۹۹٪). محدوده نتایج برای عصاره برگی سبز ۸۷-۰/۷٪ بوده و برای عصاره برگی سیاه این میزان بسیار کمتر از عصارهٔ برگی سبز و در محدوده ۲۵/۵-۱٪ قرار داشت که برای هر دو عصاره با افزایش میزان غلظت عصاره‌ها این مقادیر افزایش یافت. این خاصیت تا غلظت ۲۵۰ppm عصارهٔ برگ سبز، رشد صعودی و سریعی داشت که توانست تا ۷۶٪ رادیکال های آزاد DPPH را حذف و غیر فعال نماید اما از آن غلظت به بالا این فعالیت رشد اندک و ملایمی داشت و نهایتا" در غلظت ppm ۱۰۰۰ میزان رادیکال زدایی تا حد ۸۷٪ باقی ماند. این درحالی است که عصارهٔ سیاه برگی حتی تا غلظت ۱۰۰۰ppm نیز نتوانست بیش از ۲۵٪ رادیکال های آزاد را حذف نماید. نتایج ما با گزارشی که ونسکوتونیس[1] و همکاران (۲۰۰۷) در خصوص میزان ضد اکسندگی (رادیکال زدایی DPPH) عصاره اتانولی برگ تمشک نیز مطابقت داشت که ۸۲/۵- ۲۰/۵٪ بدست آورده بود. آنها ترکیبات کوئرستین گلوکورونید[2]، کوئرستین-۳-ارتو- گلوکوزید[3] و کوئرستین گلوکوزیل‌رامنوزید[4] (روتین) را در آن عصاره شناسایی نمودند[۲۰]. در ویژگی ضد اکسندگی تمشک، عوامل ژنتیکی و تغییرات رشد گیاه و میوه تاثیر گذار است زیرا که طی رشد آن برخی از آنتوسیانین های جدید ایجاد می شود. علاوه بر آنتوسیانین‌ها[5]، الاجیتانین‌ها[6] و تانن‌های شبیه پروآنتوسیانیدین[7] نیز جزو ترکیبات ضد اکسنده غالب میوه تمشک به شمار می‌آیند [۱۱]. علت بالاتر بودن خاصیت رادیکال زدایی عصاره برگ سبز را میتوان به حضور و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات فنولی در ایجاد خاصیت ضداکسندگی در این گیاه و سالم بودن ترکیبات فنولی آن ارتباط داد [۲۱]. در برگهای سیاه، واکنش های قهوه ای شدن آنزیمی باعث تبدیل گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات فنولی (توسط آنزیم های پلی فنول اکسیداز) به گروه‌های کتنی می‌گردد که این امر باعث کاهش خاصیت ضد اکسندگی آنها می گردد [۲۲]. همچنین نتایج بدست آمده از تحقیق مشابهی که روی چند رقم از میوه تمشک صورت گرفته بود نشان داد که قدرت حذف رادیکال های آزاد DPPH آنها در محدوده‌ی ۷۰/۵٪- ۵۳/۱ است که این مقادیر در مقایسه با نتایج ما، از مقادیر کمتری برخوردار است [۲۳]. در تحقیق دیگری مشخص شد که عصاره هسته تمشک کره‌ای نسبت به عصاره میوه و بخش های گوشتی آن، قابلیت حذف رادیکال های آزاد DPPH بیشتری را داشت [۲٤].



شکل ۱ میزان رادیکال زدایی (۰/۰) عصارهای برگی سبز یا سیاه تمشک



شکل ۲ درصد کی لیت کنندگی یون آهن توسط عصارهای برگی سبز یا سیاه تمشک

1. Venskutonis
2. Quercetin glucuronide,
3. Quercetin-3-O-glucoside
4. Quercetin glucosylrhamnoside(rutin)
5. Anthocyanins
6. Ellagitannins
7. Proanthocyanidin-like tannins

۳-۲- قدرت کی لیت کنندگی یون آهن

نتایج بدست آمده (شکل۲) از وجود اختلاف معنی دار بین داده های عصاره برگی سبز و سیاه در این آزمون حکایت می‌کند. محدوده نتایج برای عصاره برگی سبز ۶۵-۳۰٪ بوده و برای عصاره برگی سیاه این میزان کمی کمتر از عصارهٔ برگی سبز بوده و در محدوده ۶۲-۲۲٪ قرار داشت که برای هر دو عصاره با افزایش میزان غلظت عصاره این مقادیر افزایش یافت. در این امر ترکیبات فنولی تأثیر مستقیمی ندارند و ترکیبات نیتروژن دار می‌توانند دخالت بیشتری نمایند زیرا که نقش کی لیت کنندگی آنها از ترکیبات فنولی بهتر می‌باشد. در این خصوص نتایج ما با داده‌های بدست آمده از دیگر عصاره‌های گیاهی مشابه بود [۲۵، ۲۶]. در خصوص روغن هسته تمشک (استخراج شده به روش سرد) نیز مشخص شده که آن روغن واجد خصوصیات ضد اکسندگی و کی لیت کنندگی قابل توجه است [۹].

۳-۳- میزان کل ترکیبات فنولی

در این آزمون، عصارهٔ برگی سبز حاوی ۱۰۳ ±۰/۱ mg GA/g (میلی گرم ترکیبات فنولیک معادل اسید گالیک در گرم عصارهٔ خشک) و عصارهٔ برگی سیاه تمشک حاوی ±۰/۲ mg GA/g ۴۹/۹ بودند که اختلاف معنی داری در سطح ۹۹٪ داشتند. با توجه به این که عصاره برگ سبز مقادیر بیشتری از این ترکیبات دارد داشتن قدرت ضداکسندگی بیشتر را می توان به مقدار ترکیبات فنولی مرتبط داد. کما اینکه بین میزان ترکیبات فنولی و داشتن خواص ضداکسندگی ارتباط مستقیمی وجود دارد [۲۷، ۲۸]. میزان ترکیبات فنلی در عصاره اتانولی این گیاه بسیار کمتر و در مقادیر بین ۴/۸ mg GA/g تا ۱۲ متفاوت بود [۲۰]. اما این ترکیبات در میوه آن بیشتر از برگها بوده و در چند رقم از آنها حدود (Gallic Acid equivalent Dry Weight) mg GAE/100g DW ۲۴۹۴- ۱۰۵۲ می‌باشد [۲۳].

۳-۴- اثر ضد میکروبی

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود در بین میکروارگانیسم های مورد تحقیق، عصاره متانولی برگهای سبز و سیاه تمشک اثر ضد میکروبی متفاوتی را از خود نشان دادند. در تمامی غلظت ها، بی اثر بودن هر دو عصاره سبز و سیاه روی باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *انترکوکوس فکالیس* و *شیگلا دیسانتری* کاملا مشهود می باشد. اما در خصوص سایر باکتریها یعنی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* عصاره سبز اثرات بسیار خوبی را از خود نشان داد. در میان آنها، *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به این عصاره حساسیت بیشتری داشت و با کمترین غلظت عصاره سبز (۷/۱۲mg/ml) رشد آن بخوبی (با محدوده mm ۹) متوقف گردید. این عصاره با غلظت ۵۷mg/ml و ۲۸/۵، اثر ضد میکروبی موثری به ترتیب روی میکروبهای *سالمونلا تیفی* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* داشت. همچنین با افزایش غلظت عصاره برگی سبز، محدوده ممانعت کنندگی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز به طور معنی داری افزایش یافت. عصاره برگی سیاه تمشک هیچ گونه اثر ضد میکروبی روی میکروب‌های مورد تحقیق در این پژوهش نداشت.

جدول ۱ اثر ضد باکتریایی عصاره های متانولی برگ های سبز و سیاه تمشک بر حسب قطر هاله عدم رشد به میلی‌متر با غلظت‌های مختلف بر علیه شش گونه باکتری با استفاده از روش چاهک

	غلظت عصاره برگ های سبز تمشک (mg/ml)				غلظت عصاره برگ های سیاه تمشک (mg/ml)			
باکتری	۵۷	۲۸/۵	۱۴/۲۵	۷/۱۲	۵۷	۲۸/۵	۱۴/۲۵	۷/۱۲
اشریشیا کلی	–	–	–	–	–	–	–	–
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۰^{d}	۱۵^{c}	۱۳^{b}	۹^{a}	–	–	–	–
یرسینیا انتروکولیتیکا	۱۰^{a}	۹^{a}	–	–	–	–	–	–
شیگلا دیسانتری	–	–	–	–	–	–	–	–
سالمونلا تایفی موریوم	۱۱^{ab}	۱۰^{a}	–	–	–	–	–	–
انتروکوکوس فکالیس	–	–	–	–	–	–	–	–

$^{a, b, c, d}$ داده ها با حروف متفاوت بیانگر معنی دار بودن آنهاست.

(–) محدوده ممانعت کنندگی کمتر از mm ۱: فاقد فعالیت ضد میکروبی؛ محدوده ممانعت کنندگی بین ۲-۳ میلی متر: خاصیت ضدمیکروبی ضعیف؛ محدوده ممانعت کنندگی بین ۶-۴ میلی متر: خاصیت ضدمیکروبی متوسط؛ محدوده ممانعت کنندگی بین ۹-۶ میلی متر: خاصیت ضدمیکروبی بالا؛ محدوده ممانعت کنندگی بیش از mm ۹: خاصیت ضدمیکروبی قوی.

میزان غلظت های ممانعت کنندگی رشد در تحقیق ما بالاتر از سایر تحقیق‌ها است. بطور مثال پودر حاصل از هسته های میوه تمشک با غلظت $\bar{=}$ ۱۶۰ g/ml توانست از رشد میکروب اشرشیاکلی جلوگیری نماید [۲۹]. این امر می‌تواند بخاطر تجمع بیشتر فلاون، کوئرسیتین و نارینجین موجود در میوه تمشک نسبت به برگهای آن گیاه باشد زیرا که آنها در جلوگیری از رشد میکروب ها تاثیر به سزائی از خود نشان می‌دهد. در تحقیقی که رائوها[1] و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام دادند [۳۰]، آنها مشخص کردند که عصاره تمشک حاوی ترکیبات فنولی ضد میکروبی است که بر علیه باکتریهای *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشرشیا کلی*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* موثر است. همچنین در تحقیق دیگری که روی خصوصیات ضد میکروبی در بخش های میوه، پالپ و مارک تمشک انجام شد مشخص شد که عصاره آبی- استونی میوه، پالپ و مارک تمشک فعالیت ضد میکروبی قویتری نسبت به عصاره آبی- متانولی داشتند که تاثیر پذیری گرم مثبت ها بیشتر از گرم منفی ها بود [۳۱]. در خصوص اثرات ضد میکروبی تمشک کره‌ای، عصاره بخش گوشتی گیاه در مقایسه با عصاره هسته آن، بر ضد باکتری‌های *پروپیونی باکتریوم آکنه* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* اثرات قوی‌تری داشت [۲٤].

تحقیقات پیشین نشان داده است که به طور کلی باکتریهای گرم مثبت نسبت به عصاره های گیاهی حساس تر از باکتریهای گرم منفی می باشند که با توجه به گرم مثبت بودن *استافیلوکوکوس اورئوس*، موید نتیجه ما نیز میباشد. این پدیده ممکن است به علت تحمل ذاتی گرم منفی ها به ترکیبات گیاهی باشد [۳۲].

مطالعات مختلف نشان داده است که دیواره سلولی باکتریهای گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی بیوتیکها، ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی [۳۲] و حتی بسیاری از داروهای گیاهی حساسیت زیادی دارند [۳۳، ۳٤]. وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی دیواره و نیز فضای پری پلاسمیک از دلائل مهم این مقاومت نسبی گرم منفی ها می باشد [۳۵].

از نتایج بدست آمده در این تحقیق چنین برداشت می‌گردد که واکنش‌های قهوه ای شدن آنزیمی باعث کاهش اثر ضدمیکروبی عصاره ها گردیدند زیرا طی این واکنش ها، ترکیبات فنولی اکسیده شده و پلیمریزاسیون آنها اتفاق می افتد که این اتفاقات باعث درگیر شدن گروه های فعال ترکیبات فنولی با یکدیگر، کاهش قدرت یونی و کاهش حلالیت آنها می‌گردد [۲۲]. تمامی انواع واکنش‌های قهوه‌ای شدن باعث کاهش این خاصیت نمی‌گردد. در خصوص واکنشهای قهوه ای شدن غیر آنزیمی مایلارد، خاصیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد [۳٦]. زیرا فعالیت کی لیت کنندگی محصولات حاصل از این واکنشها افزایش میابد که طی این پدیده، یونهای فلزی و کمپلکس های فعال با آنها پیوند برقرار می کنند [۳۷]. این محصولات فعالیت ضداکسندگی نداشته ولی دیگر ضداکسنده ها را در برابر تخریب حفظ می کنند. فعالیت ضد میکروبی این محصولات در امولسیون ها قویتر از مواد غذایی خشک است [۳۸].

۳-۵- خواص کیفی روغن سویای حاوی عصاره‌های برگی در مقایسه با نمونه‌های شاهد و نمونه بازار

۳-۵-۱- اندیس اسیدی

در جدول ۲ نتایج بدست آمده در این آزمون آورده شده است. محدوده‌ی اسیدیته برای روغن‌های حاوی عصاره برگی سیاه ۰/٤٪ الی ۰/٤٦٪ و برای نمونه‌های حاوی عصاره برگی سبز ۰/۲۸٪ الی ۰/۳۱٪ بود. بر این اساس نه تنها میزان اسیدیته روغن‌های حاوی عصاره برگی سبز با نمونه‌های حاوی عصاره برگی سیاه، اختلاف معنی داری (۹۵٪) داشتند بلکه بین نمونه روغن فاقد ضد اکسنده با دیگر نمونه‌های روغن نیز اختلاف‌ها معنی‌دار (۹۵٪) بود. نمونه فاقد ضد اکسنده دارای بالاترین اسیدیته بوده (۰/۹۵٪)که این نتیجه بیانگر اثر مثبت عصاره ها در جلوگیری از افزایش اسیدیته می‌باشد. در بین دو گروه عصاره‌ها، از نظر میزان اسیدیته، کیفیت روغنهای حاوی عصاره برگی سبز بهتر از نمونه‌های حاوی عصاره سیاه بود، اما اسیدیته نمونه حاوی ٦۰۰ppm عصاره برگی سبز در مقایسه با نمونه‌های بازاری اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشت. به عبارت دیگر با افزایش غلظت عصاره‌برگ سبز مقادیر اسیدیته نمونه‌ها افزایش ناچیزی داشت که علت آن را می‌توان به حضور برخی از آنزیم‌های لیپولیتیک عصاره‌ها [۳۹] ارتباط داد. همچنین علت این افزایش

1. Rauha

اندک را به وجود ترکیبات واجد فعالیت ضد اکسندگی ارتباط داد که مانع از افزایش بیش از حد اسیدیته در نمونه‌ها گردیدند. بنابراین این‌طور نتیجه گیری می‌گردد که حضور برخی از آنزیم‌های واجد خاصیت لیپولیتیک در عصاره‌ها می‌تواند در خنثی کردن خاصیت ضد لیپولیتیکی این ترکیبات ضد اکسنده موثر باشد.

۳-۵-۲- اندیس یدی

سانتی گرم ید جذب شده توسط یک گرم چربی را عدد یدی گویند. در شرایط مساعد، هالوژنها جذب اسیدهای چرب اشباع نشده‌ی موجود در روغنها می‌شوند. در حالی که روغنهای اشباع شده چنین خاصیتی ندارند. مقدار هالوژن افزوده شده، تعداد اتصالهای اشباع نشده را بطور تقریبی نشان می‌دهد. بنابراین، عدد یدی شاخصی از تعداد پیوندهای دوگانه می‌باشد[٤٠]. نتایج آورده شده در جدول ۲ نشان می‌دهد که محدوده عدد یدی برای روغن‌های حاوی عصاره برگی سبز ۱۷۰ الی ۱۹۰ و برای نمونه‌های حاوی عصاره برگی سیاه ۱۵۲ الی ۱٦۲ (گرم چربی/سانتی‌گرم ید جذب شده) بوده است. مقادیر عدد یدی مربوط به تمامی نمونه‌های روغن با هم اختلاف معنی داری (۹۵٪) داشتند. کمترین این مقدار را در نمونه بدون ضد اکسنده و بیشترین آن را در نمونه بازاری می‌توان دید. در این آزمون عصاره‌های برگی سیاه توانایی کمتری در حفظ پیوندهای دوگانه تری گلیسریدها را داشتند و عدد یدی نمونه روغن حاوی ppm ٦۰۰ عصاره برگی سبز به میزان ۱۹۰ نزدیک به نمونه روغن بازار که ۱۹۵ (گرم چربی/سانتی‌گرم ید جذب شده)است بود. در هر دو سری از نمونه‌های حاوی عصاره ها، با افزایش غلظت عصاره، میزان اندیس یدی افزایش یافت که این امر بیانگر تاثیر ترکیبات فنولی عصاره در جلوگیری از ازبین رفتن باندهای دوگانه اسیدهای چرب تری گلیسریدها است و در این میان تاثیر عصاره سبز بدلیل دارا بودن ترکیبات فنولی بیشتر نقش بارزتری را ایفا نمود. نزدیکترین مقدار عدد یدی (۱۹۰) در نمونه‌های حاوی عصاره برگی سبز به عدد یدی نمونه روغن بازاری (۱۹۸) مربوط به روغن حاوی ppm ٦۰۰ عصاره سبز بود.

جدول ۲ آزمون های کیفی صورت پذیرفته روی روغن سویای فاقد ضداکسنده، روغن سویای تجاری حاوی ppm۲۰۰ ضداکسنده پروپیل گالات، روغن سویای فاقد ضداکسنده غنی شده با عصاره ها

آزمون	روغن فاقد ضداکسنده	روغن حاوی ppm۲۰۰ پروپیل گالات	انواع روغن های سویا	غلظت عصاره ها (ppm)		
			انواع روغن های فاقد ضداکسنده حاوی عصاره برگی تمشک	۲۰۰	٤۰۰	٦۰۰
اسیدیته (٪)	۰/۹۵^{e}	۰/۳۲^{d}	حاوی عصاره برگی سیاه تمشک	۰/٤^{a}	۰/٤۱^{a}	۰/٤٦^{b}
			حاوی عصاره برگی سبز تمشک	۰/۲۸^{c}	۰/۲۹^{c}	۰/۳۱^{d}
اندیس یدی (گرم چربی/سانتی گرم ید جذب شده)	۱۰۵^{a}	۱۹۸^{h}	حاوی عصاره برگی سیاه تمشک	۱۵۲^{b}	۱۵۷^{c}	۱٦۳^{d}
			حاوی عصاره برگی سبز تمشک	۱۷۰^{e}	۱۸۵^{f}	۱۹۰^{g}
اندیس پراکسید (میلی اکی والان در کیلوگرم روغن)	۱٦۵^{h}	۹۵^{f}	حاوی عصاره برگی سیاه تمشک	۱۱۲^{g}	۹۲^{e}	۸۸^{d}
			حاوی عصاره برگی سبز تمشک	٤۰^{a}	٦۵^{b}	۷۲^{c}

a, b, c, d, e, f, h داده ها با حروف متفاوت بیانگر معنی دار بودن آنهاست و داده ها میانگین سه تکرار می‌باشند.

۳-۵-۳- اندیس پراکسید

پراکسید محصول اولیهٔ اکسیداسیون مواد چرب است و بطور کلی هر قدر که درجه غیر اشباع روغن ها بیشتر باشد روغن و یا ماده چرب آمادگی بیشتری برای اکسیداسیون دارد. وقتی که میزان پراکسید به حد معینی برسد تغییرات مختلفی صورت گرفته و

مواد فرار آلدئیدی و کتونی ایجاد می‌شوند که در ایجاد بو و طعم نامطبوع مواد چرب موثر هستند [٤٠].

نتایج بدست آمده از این آزمون (جدول۲) نشان دهنده معنی دار (۹۵٪) بودن مقادیر پراکسید نمونه‌های روغن در بین همدیگر می‌باشد. بالاترین میزان اندیس پراکسید در نمونه روغن بدون ضد اکسنده به میزان ١٦٥(میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) و کمترین آن در نمونه روغن حاویppm ۲۰۰ عصاره برگی سبز به میزان٤٠ (میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) دیده شد که این نتیجه بیانگر اثر مثبت و معنی دار عصاره ها در جلوگیری از افزایش اسیدیته می‌باشد. محدوده‌ی اندیس پراکسید برای روغن‌های حاوی عصاره برگی سبز ٤٠ الی ۷۲ و برای نمونه‌های حاوی عصاره برگی سیاه ۸۸ الی ۱۱۲(میلی اکی والان در کیلوگرم روغن) بود که این امر بیانگر اثر مطلوب عصارهٔ برگی سبز است. در بین این دو گروه، اختلاف معنی داری (۹۵٪) بین مقادیر اندیس پراکسید در روغن‌های حاوی عصاره برگی سبز با نمونه‌های حاوی عصاره برگی سیاه وجود داشت. نکته جالب توجه این است که در آزمون پراکسید با افزایش غلظت عصارهٔ برگی سیاه، این اندیس کاهش می‌یابد که این امر قابل انتظار است اما در مورد عصارهٔ برگی سبز بر عکس بوده و با افزایش غلظت عصاره اندیس پراکسید افزایش می یابد. با وجود این افزایش، میزان پراکسید در روغن حاویppm ٦٠٠ عصاره برگی سبز هنوز بسیار کمتر از روغن بازاری است. نتایج بدست آمده از آزمون های درصد اسیدی و اندیس یدی با نتایج Farag و همکاران [٤١] مطابقت داشت. علت پایین بودن عدد پراکسید در نمونه‌های روغن حاوی مقدار کم عصاره را می‌توان در ۲ احتمال جستجو نمود. احتمال اول می‌تواند در تجزیه پراکسیدهای تولیدی باشد که با توجه به دمای ٦٠℃ بکار گرفته شده در این تحقیق، این احتمال بعید است زیرا که در مطالعه اثر دما و زمان بر روند تولید و شکست هیدروپراکسید روغن سویای حاوی ppm ۱۰۰ آنتی اکسیدان TBHQ[1] که در دماهای ۷۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ١٦٠ درجه سانتیگراد در بازه‌های زمانی مختلف نگهداری شدند مشخص شده که به طور کلی با افزایش زمان نگهداری، عدد پراکسید افزایش می یابد ولی با افزایش دما بر سرعت شکست پراکسیدها افزوده می‌شود و علی رغم اکسیداسیون شدیدتر، اعداد پراکسید کمتری به دست می آید [٤٢] بطوری که پس از ۲۵ روز، روغن حاوی دمای ۷۰ ℃ نسبت به روغن حاوی دمای ۸۰ ℃ میزان عدد پراکسید آنها بترتیب ۲۳۹ و ۱۵۱ (کیلوگرم/میلی اکی والان گرم) بود. احتمال دوم را می‌توان در دارا بودن خاصیت پرو اکسیدانی سایر ترکیبات موجود در عصاره های گیاهی به همراه ترکیبات ضد اکسنده باشد که توانایی تولید هیدروپراکسیدهای آزاد را دارند. این نکته که افزودن بیشتر مقادیر عصاره های گیاهی در روغن سویا باعث کاهش ماندگاری آن روغن (در مقایسه با مقادیر کمتر آن عصاره) می‌گردد در گزارش سایر محققان نیز آمده است. پریزن و همکاران در سال ۱۳۹۰[٤٣] جهت ارزیابی مقاومت حرارتی روغن سویای حاوی مقادیر متفاوت عصاره‌ی متانولی برگ سنا (با دارا بودن قدرت آنتی اکسیدانی ٦٣٪ در غلظت ppm۷۵۰) از آزمون رنسیمت استفاده نمودند. نتایج آنها نشان داد که در محدوده‌ی غلظت ppm ۷۵۰-۲۵۰ با افزایش غلظت عصاره، پایداری نمونه ها افزایش می‌یابد ولی با افزایش غلظت از ۷۵۰ به۳۰۰۰ ppm میزان پایداری و طول دوره‌ی القای نمونه های روغن، به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. در تحقیق ما عصاره برگی سبز تمشک با غلظت ppm ۲۰۰ ، ٦٣٪ قدرت آنتی اکسیدانی داشت.

مشابه عصاره برگی تمشک، عصاره استخراجی از تفاله انگور نیز در رقابت با آنتی اکسیدانهای سنتزی (در نگهداری روغن سویا) عملکرد بهتری داشت. در این خصوص نتایج حاصل از تحقیق ۱۳ روزه نگهداری روغن سویای حاوی ppm ۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰، و ۳۵۰ عصاره استخراجی از تفاله انگور نشان داد که در غلظت ۱۵۰ پی پی ام، عصاره دارای فعالیت مناسبی در مهار اکسیداسیون روغن سویا بود و از نظر آماری تفاوت معنی داری بین سطوح ppm۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ مشاهده نشد. این عصاره ها حتی از غلظتppm ۲۰۰ آنتی اکسیدان های سنتزی، اثر بهتری داشتند [٤٤]. در نگهداری روغن سویا با دمای ٦٠ ℃ به مدت ٢٤ روز، اثر عصاره پوست پرتقال نیز بررسی شده است که مشخص شد غلظت ppm ۱۰۰۰ عصاره پوست پرتقال با ppm ۲۰۰ آنتی اکسیدان سنتزی BHT[2] مشابه بود [٤٥]. همچنین طی بررسی که

1 *tert*-butylhdroquinone

2 Butylated hydroxytoluene

روی میزان فساد اکسیداسیونی روغن سویای حاوی ترکیبات فنولی هسته انار نگهداری شده در دمای ۶۰°C به مدت ۱۲روز انجام گرفت، مشخص شد که نمونه حاوی ۳۵۰ ppm ترکیبات فنولی هسته انار در مقایسه با نمونه‌های حاوی ۲۰۰ ppm آنتی اکسیدان تجارتی BHA[1] دارای مقادیر پراکسید (بترتیب ۶۰/۶۹ در برابر ۶۲ میلی اکی والان پراکسید در ۱۰۰۰ گرم) کمتری بودند [٤٦] که با مقایسه با نتایج ما (عدد پراکسید ٤٠ در برابر ۹۰ میلی اکی والان پراکسید در ۱۰۰۰ گرم بترتیب برای تیمار حاوی ۲۰۰ppm عصاره سبز برگی و روغن حاوی ۲۰۰ppm پروپیل گالات)، مشخص می‌شود که عصاره سبز برگی تمشک اثر نگهدارندگی بهتری روی روغن سویا دارد.

٤- نتیجه گیری

واکنشهای قهوه‌ای شدن آنزیمی روی خواص ضد میکروبی و رادیکال زدایی برگ گیاه تمشک اثرات منفی زیادی از خود بر جا گذاشت که منجر به کاهش معنی دار این ویژگی‌ها گردید. این امر به دلیل از بین رفتن ترکیبات موثره و دخیل در آن خواص است که طی اکسیداسیون و پلیمریزاسیون آنها صورت می‌گیرد. اما در خصوص ویژگی کی‌لیت‌کنندگی یون آهن در عصاره متانولی برگ تمشک، واکنش‌های قهوه‌ای شدن تاثیر زیادی نداشت. نتایج حاصل از بررسی کیفیت نمونه‌های روغن سویای حاوی عصاره های برگی سبز و سیاه تمشک نشان داد که روغن حاوی ۲۰۰ppm عصاره سبز برگی بهترین اثر نگهدارندگی روی روغن سویا را دارد زیرا در مقایسه با نمونه بازاری (حاوی ۲۰۰ppm آنتی اکسیدان تجارتی پروپیل گالات) و دیگر نمونه های مورد آزمون، حاوی اندیس اسیدی و عدد پراکسید پایین تری بود. لذا با توجه به نتایج به دست آمده می توان گفت که برگ‌های سبز تمشک می‌تواند به عنوان یکی از منابع مهم آنتی اکسیدان طبیعی، توانایی واکنش با رادیکال های حاصل از اکسیداسیون لیپید ها را داشته و موجب قطع واکنش های زنجیری و افزایش زمان اکسیداسیون کند و کاهش سرعت اکسیداسیون خود به خودی شده و پس از آزمایش های تکمیلی سم شناسی و... به مواد غذایی به خصوص روغن های خوراکی اضافه شود.

1 Butylated hydroxyanisole

٤- منابع

[1] Fatemi, H., 2002. Food Chemistry. 3rd Edn. The Sahami Enteshar Press Company, Tehran, Iran.

[2] Lewis, N. G. (1993). Plant phenolics. In R. G. Alscher & J. L. Hess (Eds.), Antioxidants in higher plant (pp. 135–169). Boca Raton, FL: CRC Press.

[3] Rao, M. V., Paliyath, G., & Ormrod, D. P. (1996). Ultraviolet-B- and Ozone-Induced Biochemical Changes in Antioxidant Enzymes of Arabidopsis thaliana. Plant Physiology, 110(1), 125-136.

[4] Cerutti, P. (1991). Oxidant stress and carcinogenesis. European journal of clinical investigation, 21(1), 1-5.

[5] Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. . (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. Methods in Enzymology, 186, 1–85.

[6] Blumenthal, M. (1998). The Complete Commission German E. Monographs. Texas, USA: American Botanical Council.

[7] Fentrow, C. W. A., J. R. . (1999). Professionals Handbook of Complementary & Alternative Medicines. Pennsylvania, USA: Springhouse.

[8] Oomah, B. D., Ladet, S., Godfrey, D. V., Liang, J., & Girard, B. (2000). Characteristics of raspberry (Rubus idaeus L.) seed oil. Food Chemistry, 69(2), 187-193.

[9] Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., & Yu, L. (2005). Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. Journal of agricultural and food chemistry, 53(3), 566-573.

[10] Buřičová, L., Andjelkovic, M., Čermáková, A., Reblova, Z., Jurček, O., Kolehmainen, E., Verhe, R., & Kvasnička, F. (2011). Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry, and raspberry leaves. Czech J. Food Sci, 29(2), 181-189.

[11] Beekwilder, J., Jonker, H., Meesters, P., Hall, R. D., van der Meer, I. M., & Ric de Vos, C. (2005). Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. Journal of

and composition of raspberry (Rubus idaeus) leaves from different locations in Lithuania. Fitoterapia, 78(2), 162-165.

[21] Catherine, A., Rice-Evans, C. A., Nicholas, J.M., George, P. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine, 20, 933-956.

[22] Pokorny´, J., & Schmidt, S. (2001). . (2001). Natural antioxidant functionality during food processing. . In J. Pokorny´, N. Yanishlieva, & M. Gordon (Eds.), Antioxidants in food (pp. 331-354). Boca Raton: CRC Press.

[23] Pantelidis, G., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., & Diamantidis, G. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. Food Chemistry, 102(3), 777-783.

[24] Lee, K., Kim, S., & Pyo, B. (2011). Comparison of Fatty Acids and Antibacterial Activity against Pathogen of Acne in Different Parts of Ripened Black Raspberry (Rubus coreanus Miquel). Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition, 40.

25. Wong, L. F. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of Alpinia species. Monash University Malaysia.

[26] Chan, E., Lim, Y., & Omar, M. (2007). Antioxidant and antibacterial activity of leaves of Etlingera species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. Food Chemistry, 104(4), 1586-1593.

[27] Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of agricultural and food chemistry, 49(11), 5165-5170.

[28] Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (Sorghum bicolor) and sorghum products. Journal of agricultural and food chemistry, 51(23), 6657-6662.

[29] Luther, M., Parry, J., Moore, J., Meng, J., Zhang, Y., Cheng, Z. and Yu, L. (2007). Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and agricultural and food chemistry, 53(9), 3313-3320.

[12] Gudej, J., & Tomczyk, M. (2004). Determination of Flavonoids, Tannins and Ellagic acid in leaves fromRubus L. species. Archives of pharmacal research, 27(11), 1114-1119.

[13] Hatano, K. (1988). Yasuhara, & Okuda (1988) T. Hatano, H. Kagawa, T. Yasuhara, T. Okuda. Two new flavonoids and other constituents I licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 36(6), 2090-2097.

[14] Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of agricultural and food chemistry, 47(10), 3954-3962.

[15] Singh, N., & Rajini, P. (2004). Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. Food Chemistry, 85(4), 611-616.

[16] Indu, M., Hatha, A., Abirosh, C., Harsha, U., & Vivekanandan, G. (2006). Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of Escherichia coli, Salmonella, Listeria monocytogenes and Aeromonas hydrophila. Brazilian Journal of Microbiology, 37(2), 153-158.

[17] AOAC, I. (1990). AOAC International accreditation criteria for laboratories performing food microbiological and chemical analyses in foods, feeds, and pharmaceutical testing. No;925.41, P. 612 (Vol. 2). USA: AOAC International.

[18] AOAC, I. (1990). AOAC International accreditation criteria for laboratories performing food microbiological and chemical analyses in foods, feeds, and pharmaceutical testing. No;965.33, P. 612. (Vol. 2). USA: AOAC International. .

[19] AOAC, I. (1990). AOAC International accreditation criteria for laboratories performing food microbiological and chemical analyses in foods, feeds, and pharmaceutical testing. NO; 920.158, P. 612. USA: AOAC International.

[20] Venskutonis, P., Dvaranauskaite, A., & Labokas, J. (2007). Radical scavenging activity

antimicrobial properties. Food Chemistry, 104(3), 1065-1073.
[30] Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen M.,, Hopia A.,, Kähkönen M.,, Kujala, T. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology, 56, 3-12.
[31] Bobinaitė, R., Viškelis, P., Šarkinas, A., & Venskutonis, P. (2013). Phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of raspberry fruit, pulp, and marc extracts. CyTA-Journal of Food(ahead-of-print), 1-9.
[32] Norajit, K. (2007). Antimicrobial effect of five Zingiberaceae Essential oils. Molecules, 12, 2047-2060.
[33] Schlievert, P., Deringer, J., Kim, M., Projan, S. and Novick, R. . (1992). Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. Antimicrob Agents Chemother, 36, 626-631.
[34] McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clinical microbiology reviews, 12(1), 147-179.
[35] Priscila G Mazzola , A. M. M. a. T. C. P. (2006). Chemical resistance of the gram negative bacteria todifferent sanitizers in a water purification system. BMC Infectious Disease, 6, 131-137.
[36] Einarsson H, E. T. a. N. I. (1988). Inhibitory mechanism of Maillard reaction products. Microbios, 53, 27-36.
[37] Kajimoto, G. Y., H. (1975). Relationship between the reaction of melanoidin and metal in oil system and effect of melanoidin-metal complex on the rancidification of oil. Yukagaku, 24, 297-300.
[38] R., S. C. a. L. C. (1995). Interaction between the Maillard reaction and lipid oxidation in model systems during high temperature treatment. Ital J Food Sci, 7, 189-196.
[39] Lee, M. R., Winters, A. L., Scollan, N. D., Dewhurst, R. J., Theodorou, M. K., & Minchin, F. R. (2004). Plant‐mediated lipolysis and proteolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(13), 1639-1645.
[40] Gunstone, F. D. (2004). Rapeseed And Canola Oil: Production. Processing, Properties, And Uses: CRC Press.
[41] Farag, R., Badei, A., & El Baroty, G. (1989). Influence of thyme and clove essential oils on cottonseed oil oxidation. Journal of the American Oil Chemists Society, 66(6), 800-804.
42. Navab Daneshmand, F., Ghavami, M. 2012. The Effect of Temperature and Time on the Production and Decomposition of Hydroperoxides in Canola and Soybean Oils. Food Technology & Nutrition. 9 (1): 61-73.
[43] Parizan, T., Elhamirad A. H. , Astiri, S. H., Armin, M. 2011. Investigation of the antioxidant activity of the methanolic extract of the leave of senna itulical and its effect on stability of soybean oil. Journal of food science and technology. 3(1): 51-59.
[44] Rouzbehan,Y., Alipour, D., Barzegar, M., Azizi, MH. 2008. Antioxidant activity of phenolic compounds of grape pomace (Research note). Journal of Food Science and Technology. 5 (3); 69-74.
[45] Gharekhani M, Ghorbani M, Gharekhani A, Sadeghi mahoonak A, Jabrayili S, Ghasemi Y. 2011. Effect of Phenolic Extracts of Peel and Pulp of Tampson Orange with Different Rootstocks on the Inhibition of soybean oil Oxidation. JMP. 2 (38): 55-66.
[46] Samadloiy, H. R.; Azizi M. H.; Barzegar, M. 2008. Physico-chemical quality of seeds of pomegranate cultivars (Punica granatum L.) grown in Iran and antioxidative activity of their phenolic component. Journal of Food Science and Technology. 45: 190–192.

Antioxidant and antimicrobial characteristics of black Raspberry (*Rubus occidentalis*) leaves extract and its effect on stability of soybean oil

Fadavi, A.[1 *], Kohsari,H.[2], Hoseini Ghaboos, H.[1]

1. Department of Food Science and technology, Islamic Azad University, Azadshahr branch, Iran.
2. Department of basic Science, Islamic Azad University, Azadshahr branch, Iran

(Received: 93/2/23 Accepted: 93/7/8)

Nowadays, finding new resources of vegetal antioxidants in order to use them in food (as an additive or alternative with artificial antioxidants) is an important research subject in the field of food science and technology. In this research methanolic extracts of green and black raspberry leaves were examined in antioxidant properties, total phenolic content (TPC) and antimicrobial activity against *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Entherococcus faecalis, Salmonella typhimurium, Yercinia enthrocolitica* and *Shigella dysenteria*. then, three concentrations of each extract (200, 400, and 600 ppm) were applied in free antioxidant-purified soybean oil. The oils were kept in 60 °C for a period of one month. After storage, Peroxide index, Iodine index, and Acidity value of oil samples were determined. According to the results, in all concentration of extracts, green leaves extract (GLE) had more antioxidant activity (0.7-87%) and TPC (103±0.1 mg/g dry matter) significantly than black leaves extract (BLE). In antimicrobial activity, GLE in the minimum concentration of 7.12 mg/ml had an antimicrobial effect on *Staphylococcus aureus and in* the minimum concentration of 28.5 mg/ml inhibited the growth of *Salmonella typhimurium, Yercinia enthrocolitica.* But BLE did not show any effects on growth of investigated microbes. In the quality tests of oil samples, with an increase in the concentration of GLE, acidity, Iodine index, and peroxide index increased significantly. At the end, it was concluded that oil samples containing 200 ppm, had better quality and stability than samples containing 200 ppm Propyl Gallate (market soybean oil).

Key words: Raspberry leaves extract, Antioxidative activity, Antimicrobial effect, Soybean oil stability

* Corresponding Author E-mail Address: fadavi.ac.ir@gmail.com