بررسی مقایسه‌ای استخراج عصاره فلفل قرمز به روش‌های امواج فراصوت و حرارتی و تأثیر آن بر پایداری اکسایشی روغن زیتون بکر

زهرا دهله ای[۱]، مریم فهیم دانش[۲*]، محمدعلی سحری[۳]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲* - گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرقدس، **دانشگاه آزاد اسلامی**، تهران، ایران

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۷)

چکیده

امروزه به دلیل اثرات نامطلوب ضد اکسایندههای سنتزی تمایل روز افزونی به استفاده از ضد اکسایندههای طبیعی وجود دارد. در این پژوهش، بهمنظور استخراج ترکیبات فنولیک فلفل قرمز (*Capsicum annuum*) از دو روش استخراج با امواج فراصوت و روش معمول حرارتی استفاده شد. در بخش اول تحقیق، بهمنظور ارزیابی تیمار با بیشترین درصد استخراج ترکیبات فنولی به روش امواج فراصوت از دو فاکتور زمان (۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) و نسبت فلفل به روغن (۵، ۷ و ۱۰ درصد) استفاده شد. در روش استخراج حرارتی، با ثابت نگهداشتن فاکتور زمان (٦۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد) فاکتور نسبت فلفل به روغن (۵، ۷ و ۱۰ درصد) بررسی شد. با اندازهگیری مقدار پلیفنول کل با روش فولین سیوکالتیو، اثر ضد اکسایشی دو نمونهای که بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک را داشتند (نمونه فراصوت: ۳۱٤/٦۱ ppm و نمونه حرارتی: ۲۷۲/۵۵ ppm) بررسی شد. تأثیر تیمارها در به تاخیر انداختن اکسیداسیون روغن زیتون بکر از طریق اندازهگیری شاخص پراکسید، عدد تیوباربیتوریک اسید، ارزیابی مقاومت حرارتی (رنسیمت) و پلیفنول کل طی ٤ ماه نگهداری در دمای محیط مورد بررسی قرار گرفت. بعد از چهار ماه نگهداری هر دو نمونه امواج فراصوت و حرارتی اعداد پراکسید کمتری را (به ترتیب meq O_2/kg oil ۲۰/۳۳ ، ۲۳) نسبت به نمونه شاهد (۳۵ meq O_2/kg oil) داشتند. عدد تیوباربیتوریک اسید که بیانگر محصولات ثانویه اکسیداسیون بوده، در پایان دوره در نمونههای حرارتی و فراصوت (به ترتیب ۰/۲۸ mg MDA/kg oil و ۰/۲۰) نسبت به شاهد (۰/۳۳ mg MDA/kg oil) کاهش یافت. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد اکسایشی عصارهها با روش رنسیمت نشان داد که طول دوره القاء در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد در نمونههای امواج فراصوت و حرارتی (به ترتیب ۱۳/۲٦ و ۱۲/٤۸ ساعت) نسبت به نمونه شاهد (۱۱/٤۵ ساعت) افزایش یافت. نتایج حاکی از آن بود که در پایان دوره نگهداری، ترکیبات فنولیک فلفل در روغن زیتون بکر اثر ضد اکسایشی داشته و تیمار فراصوت عصاره فلفل قرمز نسبت به تیمار حرارتی، از تأثیر ضد اکسایشی بالاتری برخوردار است.

کلید واژه گان: فلفل قرمز، ترکیبات فنولیک، استخراج با امواج فراصوت، استخراج حرارتی، روغن زیتون بکر.

* مسئول مکاتبات: m.fahimdanesh@Qodsiau.ac.ir

۱- مقدمه

امروزه مطالعه در مورد روغن‌های گیاهی، یکی از چالش‌های مهم صنایع غذایی است. با توجه به اهمیت و جایگاه روغن زیتون به‌عنوان یک منبع غنی و ارزشمند از نظر اقتصادی، در سال‌های اخیر تحقیقات انجام گرفته در زمینه فواید تغذیه‌ای آن باعث افزایش روز افزون تمایل مردم نسبت به مصرف و در نتیجه رشد تولید آن در ایران و جهان شده است. روغن زیتون یکی از اجزای مهم غذایی تشکیل دهنده رژیم غذایی مدیترانه‌ای است که با روش استخراج مکانیکی از میوه درخت *Oleae uropea* L. که متعلق به خانواده زیتون می‌باشد، به‌دست می‌آید [۱]. به‌منظور افزایش مصرف روغن زیتون، بررسی کیفیت و زمان ماندگاری و تولید محصولات متنوع و مطلوب از این روغن اهمیت می‌یابد. روغن زیتون دارای مقادیر مختلفی از اسیدهای چرب اشباع شده می‌باشد که به صورت گلیسریدها بوده و در نتیجه پایین آمدن حرارت، کم و بیش ته‌نشین می‌شوند. قسمت اعظم اسیدهای چرب روغن زیتون را اسید اولئیک در حدود ۸۰٪ و اسید لینولئیک حدود ۱۲-۷٪ تشکیل می‌دهند. روغن زیتون نسبت به سایر روغن‌ها، روغنی مناسب برای سرخ کردن عمیق می‌باشد، زیرا در این روش اکسیژن کمتری در روغن حل می‌شود و از طرفی روغن زیتون چون حاوی اسیدهای چرب چند غیراشباع کمتر در مقایسه با سایر روغن‌هاست و همچنین حاوی ضد اکسیندهای طبیعی می‌باشد، در این فرایند کمتر اکسید می‌شود [۲]. به هر حال همه روغن‌ها در معرض اکسیداسیون قرار دارند. اکسیداسیون رایج‌ترین نوع فساد روغن‌هاست که در اثر واکنش روغن‌های اشباع نشده با اکسیژن رخ می‌دهد. این واکنش منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد شده و نهایتا با بد طعمی و کاهش کیفیت و افت ارزش تغذیه‌ای روغن‌ها و چربی‌ها همراه است که یکی از اساسی‌ترین مشکلات صنعت روغن محسوب می‌شود [۳]. استفاده از ضد اکسیندهها یکی از روش‌های کنترل این مشکل می‌باشد. ضد اکسیندهها ترکیباتی هستند که با جذب رادیکال آزاد و در نتیجه ممانعت از اکسیداسیون از فساد، تغییر رنگ و یا تند شدن چربی‌ها جلوگیری می‌کنند [٤]. تحقیقات گسترده‌ای در مورد فعالیت ضد اکسایشی ادویه‌جات و گیاهان انجام شده که به‌شدت موجب افزایش تمایل مصرف کنندگان به افزودنی‌های غذایی طبیعی شده است [۵]. استفاده از گیاهان و ادویه‌جات به‌عنوان ضد اکسیندهه در غذاهای فرآوری شده، جایگزینی مناسب برای ضد اکسیندهه‌های سنتزی است. یکی از گیاهانی که امکان بررسی و مطالعه بیشتر از نظر فعالیت ضد اکسایشی و میزان ترکیبات فنولی برای آن وجود دارد فلفل قرمز می‌باشد. فلفل قرمز گیاهی است یکساله، با نام علمی *Capsicum annuum* L. و متعلق به تیره بادمجانیان[1] می‌باشد. این گیاه حاوی مقادیر بالایی از فلاونوئیدها و فنولیک-های طبیعی، مخصوصا کوئرستین[2]، لوتئولین[3] و کاپسایسینوئیدها[4] می‌باشد [٦]. گامباکورتا[5] و همکاران، در سال ۲۰۰٦، تغییرات شیمیایی و کیفی روغن زیتون فوق بکر معطر شده با گیاهان و ادویه‌ها را طی ٦ ماه نگهداری بررسی کردند. در این پژوهش اسانس روغنی گیاهانی مانند فلفل، سیر، پونه کوهی و رزماری را در سه سطح مختلف به روغن زیتون فوق بکر اضافه و پارامترهایی نظیر اسیدیته، اندیس پراکسید، K_{232} (جذب ۱٪ محلول m/v ایزواکتان در طول موج ۲۳۲ نانومتر با ۱ سانتیمتر طول سل در اسپکتروفتومتر)، K_{270} (جذب ۱٪ محلول m/v ایزواکتان در طول موج ۲۷۰ نانومتر با ۱ سانتیمتر طول سل در اسپکتروفتومتر) را انجام دادند. در پایان دوره نگهداری اندیس پراکسید و K_{232} تمام روغن‌ها کمتر از نمونه شاهد بود ولی مقادیر اسیدیته و K_{270} تغییر چندانی نشان نداد و مشابه بود. بنابراین افزودن اسانس روغنی گیاهان فوق‌الذکر پایداری روغن زیتون را افزایش داد [۷]. سیم[6] و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷، فعالیت ضداکسایشی عصاره دانه و پریکارپ فلفل قرمز را توسط مدل‌های مختلف (شامل: تست به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH، به-دام‌اندازی سوپراکسید، به‌دام‌اندازی رادیکال آنیون سوپراکسید، به-دام‌اندازی رادیکال ABTS و فعالیت چلات کردن ترکیبات آهن‌دار) به‌همراه تعیین ترکیبات فلاونوئیدی و فنولیک کل را ارزیابی کردند. نتایج حاکی از وجود مقادیر بیشتر ترکیبات فنولیک و فلانوئید در عصاره پریکارپ بوده که در به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH، رادیکال‌های هیدروکسیل و چلات

1. Solanaceae
2. Quercetin
3. Luteolin
4. Capsaicinoid
5. Gambacorta et al
6. Sim et al

کردن یون‌های فلزی مؤثرتر است در حالی‌که عصاره دانه‌ها در به‌دام‌اندازی آنیون سوپراکسید و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مؤثرتر هستند [۸]. هانگ فنگ[7] و همکاران، در سال ۲۰۱۲، به‌منظور استخراج ماده کاپسایسینوئید فلفل قرمز از روش امواج فراصوت استفاده کردند و تأثیر پارامترهایی نظیر نوع حلال، دما، زمان استخراج و دفعات استخراج را بر میزان استخراج کاپسایسینو دهیدروکاپسایسین مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پایداری حرارتی نشان داد که با افزایش درجه حرارت تا ۷۰ درجه سانتیگراد، مقدار کاپسایسینوئید در فلفل به‌تدریج افزایش یافته اما با افزایش بیشتر درجه حرارت مقدار آن به‌تدریج کاهش یافت و طی بالا رفتن دما تا ۲۰۰ درجه سانتیگراد کاهش چشمگیری در مقدار کاپسایسینوئید رخ داد [۹].

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد اولیه

فلفل قرمز (Capsicum annuum) مورد استفاده در این طرح از مؤسسه اصلاح بذر و نهال و روغن زیتون بکر نیز از مجتمع کشت و صنعت زیتون فدک تهیه شد. مواد شیمیایی مورد استفاده نیز از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. در ابتدا، فلفل قرمز خرد شده و در آون خشک شد. نمونه‌های خشک شده تا زمان آزمایش در یخچال در دمای زیر صفر ($-18^{\circ}C$) نگهداری شدند.

۲-۲- استخراج ترکیبات فنولیک

استخراج به روش امواج فراصوت

در مرحله اول این تحقیق، به‌منظور استخراج ترکیبات پلی‌فنولی و نفوذ ترکیبات معطر فلفل قرمز به داخل روغن زیتون، از روش استخراج با امواج فراصوت استفاده شد. در این روش، فلفل آماده شده به نسبت‌های ۱:۱۰، ۱۰: ۱/۵، ۲:۱۰ (روغن: فلفل قرمز) به‌طور جداگانه با روغن زیتون بکر مخلوط شده و در دستگاه فراصوت نوع حمامی، طی سه مدت زمان ۵ دقیقه، ۱۰ دقیقه، ۲۰ دقیقه تحت شدت جریان ثابت ۶۰ Hrz و توان ۲۲۰ W قرار گرفت. میزان کل ترکیبات فنولیک به روش فولین–سیوکالتیو[8] و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری ارزیابی شد.

استخراج به روش حرارت دهی

در روش دوم تحقیق، به‌جای استخراج با امواج فراصوت، از روش حرارت‌دهی استفاده شد. در این روش نیز، فلفل به نسبت‌های ۱:۱۰، ۱۰: ۱/۵، ۲:۱۰ (روغن: فلفل قرمز) به‌طور جداگانه به روغن زیتون بکر افزوده شده و به‌منظور استخراج ترکیبات پلی‌فنولی، به‌مدت ۱ ساعت در بن‌ماری در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد تحت فرآیند حرارتی قرار گرفت و با استفاده از روش فولین–سیوکالتیو میزان پلی‌فنل‌های کل اندازه‌گیری شد.

تیمار بهینه حاصل از دو روش استخراج امواج فراصوت و حرارتی با بیشترین ترکیبات فنولیک به‌عنوان بهترین تیمار در مرحله دوم، برای ارزیابی خاصیت ضد اکسایشی انتخاب شد و یک نمونه روغن زیتون بکر بدون افزودن ضد اکسایشی به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. دو نمونه تیمار شده با فلفل و نمونه شاهد، در شیشه‌های تیره برای مدت معینی (٤ ماه) در دمای محیط قرار داده شد و در فواصل زمانی روز صفر، ماه اول، دوم، سوم و چهارم آزمون‌های مورد نظر (پلی‌فنل کل، اندیس پراکسید، عدد تیوباربیتوریک اسید و زمان پایداری حرارتی) انجام شد.

۲-۳- بررسی اثر ضد اکسایشی

پس از تهیه روغن‌های مورد نظر، به منظور بررسی تأثیر ضد اکسایشی فلفل قرمز و مقایسه دو روش استخراج آزمون‌های زیر انجام گرفت.

۲-۳-۱- اندازه گیری پلی فنول کل

میزان کل ترکیبات فنولیک فلفل قرمز با روش فولین–سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. در این روش معرف فولین در حضور ترکیبات فنولیک در محلول قلیایی، احیا و رنگ آبی در محلول تولید می‌شود. شدت رنگ را می‌توان در طول موج ۷٦۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین کرد [۱۰].

۲-۳-۲- اندازه گیری عدد پراکسید

پراکسید اصلی‌ترین محصول ابتدایی در اکسیداسیون می‌باشد. اندیس پراکسید در روغن‌ها میزان اکسیژن ترکیب شده با روغن یا چربی را نشان می‌دهد که منجر به تولید پراکسید می‌شود.

7. Hong-feng et al
8. Fulin-Ciocalteu

همچنین تعیین این اندیس جهت ارزیابی درجه فساد چربی و روغن‌ها به‌کار می‌رود. این عدد معمولا بر حسب میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن بیان می‌شود. برای انجام آزمون پراکسید از روش استاندارد ایران به شماره ٤١٧٩ استفاده شد [١١].

٢-٣-٣- اندازه‌گیری اندیس تیوباربیتوریک اسید[9]

اندیس تیوباربیتوریک میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدهید موجود در ١٠٠٠ گرم چربی است. در میان محصولات اکسیداسیون روغن که برای آزمون ضد اکسایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد، مالون آلدهید[10] به‌طور گسترده‌ای به‌منظور ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی ترکیبات شیمیایی در اکسیداسیون روغن مورد استفاده قرار می‌گیرد. محصولات حاصل از اکسیداسیون چربی‌های غیراشباع با TBA ایجاد کمپلکس رنگی می‌نماید. آزمون تیوباربیتوریک اسید طبق استاندارد ملی ایران به شماره ١٠٤٩٤ استفاده شد [١٢].

٢-٣-٤- اندازه‌گیری پایداری اکسایشی با روش رنسیمت

روش رنسیمت محصولات ثانویه حاصل از اکسیداسیون روغن‌ها را اندازه‌گیری می‌نماید و روشی است که بر مبنای آن می‌توان پایداری اکسیداسیون روغن‌ها را پیش‌بینی کرد. زمان مقاومت به اکسید شدن با استفاده از دستگاه رنسیمت (در درجه حرارت ١١٠ درجه سانتیگراد با جریان هوای ٢٠ لیتر در ساعت) ارزیابی شد [١٣].

روش آماری

نتایج داده‌های این پژوهش، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد بررسی قرار گرفت. برای تحلیل نتایج داده‌ها از روش مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی دانکن ($P<0.05$) و آزمون همبستگی استفاده گردید. برای رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزار SPSS نسخه ١٦ استفاده گردید.

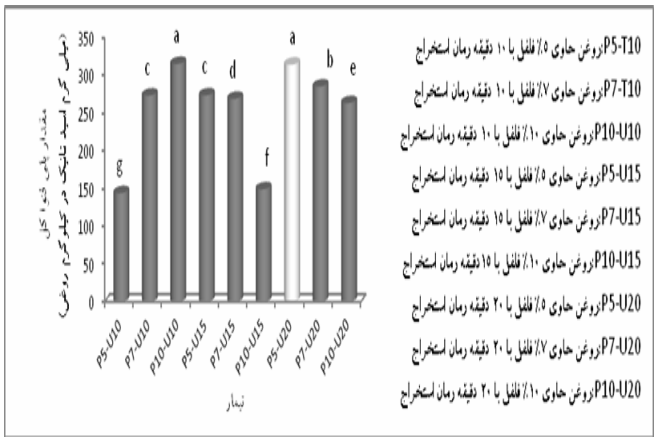
9. Thiobarbituric acid (TBA)
10. Malonaldehyde

٣- نتایج و بحث

٣-١- نتایج بررسی اثر متقابل زمان استخراج و درصد فلفل، بر میزان استخراج پلی‌فنول از فلفل قرمز در روش استخراج با امواج فراصوت در مرحله اول

با توجه به نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین دانکن که در نمودار ١ ارائه گردیده است، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده می‌شود، به‌جز تیمارهای P5-U20 و P10-U10 که که تفاوت معنی‌داری باهم ندارند. بین دو تیمار P7-U10 و P5-U15 نیز از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. با کاهش زمان استخراج به ١٠ دقیقه، استخراج بهینه با افزایش نسبت فلفل به روغن صورت می‌پذیرد. اما وقتی زمان استخراج به ٢٠ دقیقه افزایش می‌یابد، استخراج بهینه پلی‌فنول با کاهش نسبت فلفل به روغن، انجام می‌شود. احتمالا با افزایش زمان استخراج علاوه بر ترکیبات فنلی آزاد شده، ترکیبات ناخواسته دیگری نیز به روغن راه یابند که ممکن است طی برهم کنش با پلی‌فنول‌ها، این اثر را نشان دهد، زیرا طی تخریب سلولی ناشی از امواج فراصوت بسیاری مواد دیگر نیز به‌طور غیرانتخابی به روغن راه می‌یابد [١٤]. طبق نتایج حاصل از باربرو و همکاران[11] در سال ٢٠٠٦، با افزایش زمان استخراج، میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنولی فلفل قرمز افزایش می‌یابد، احتمالا با افزایش زمان استخراج بخشی از ترکیبات ضد اکسایشی تخریب شوند. در واقع هیچ بهبود قابل توجهی در میزان این ترکیبات، با بالا بردن زمان استخراج وجود ندارد [١٥]. در نهایت به دلیل تندی بیش از حد و عدم مقبولیت از سوی مصرف کننده، روغن حاوی ١٠٪ فلفل انتخاب نشد و تیمار حاوی ٥٪ فلفل به عنوان بهترین تیمار به‌منظور بررسی خاصیت ضد اکسایشی در مرحله دوم انتخاب شد.

11. Barbero et al



نمودار ۱ مقایسه میانگین محتوای پلی‌فنول تیمارهای امواج فراصوت

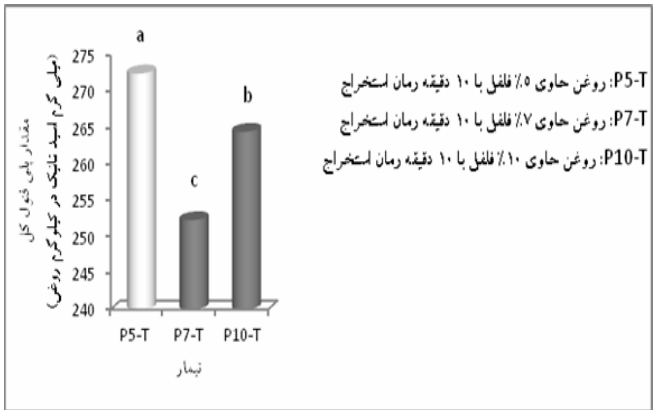
حروف متفاوت نشان دهنده ی اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ ٪ می باشد

بررسی تأثیر درصد فلفل افزوده شده به روغن، بر میزان ترکیبات پلی‌فنولی فلفل قرمز در روش استخراج حرارتی

با توجه به نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین دانکن که در نمودار ۲ ارائه شده است، همه تیمارها در روش حرارتی، در میزان ترکیبات پلی‌فنول تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری با یکدیگر داشتند. نتایج به‌دست آمده از آزمون اندازه‌گیری پلی‌فنول کل در تیمارهای استخراج شده به‌روش حرارتی، حاکی از آن است که با افزایش نسبت فلفل به روغن، راندمان استخراج ترکیبات پلی‌فنول به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. به‌طوریکه تیمار با کمترین میزان فلفل (۵٪) محتوی بیشترین مقدار ترکیبات فنولی می‌باشد. طبق گزارشات ترکمن و همکاران[12] در سال ۲۰۰۵، حرارت دادن باعث افزایش ٪ ۲۶-۲ محتوای فنول کل فلفل قرمز می‌شود. حرارت باعث افزایش ظرفیت ضد اکسایشی فلفل تا سه برابر خواهد شد. افزایش مقدار کاپسایسینوئید، به‌عنوان یکی از پلی‌فنل‌های اصلی فلفل، در روغن زیتونی که تحت تیمار حرارتی قرار گرفته به عوامل مختلفی، از جمله: آبگیری از ماتریکس غذایی، بهبود راندمان استخراج این ترکیبات توسط تخریب سلولی ایجاد شده در طول فرایند حرارتی، آزاد شدن کاپسایسینوئید کنژوگه شده و غیرفعال شدن آنزیم غیرفعال کننده کاپسایسینوئید از قبیل پراکسیداز نسبت داده شده

12. Turkmen et al

است [۱۶، ۱۷]. تیمار حاوی ۵٪ فلفل با دارا بودن بیشترین ترکیبات فنولیک به‌عنوان نمونه انتخابی به‌منظور انجام آزمون‌های مربوط به بررسی خاصیت ضد اکسایشی، انتخاب می‌شود.



نمودار۲ مقایسه میانگین محتوای پلی فنول تیمارهای حرارتی

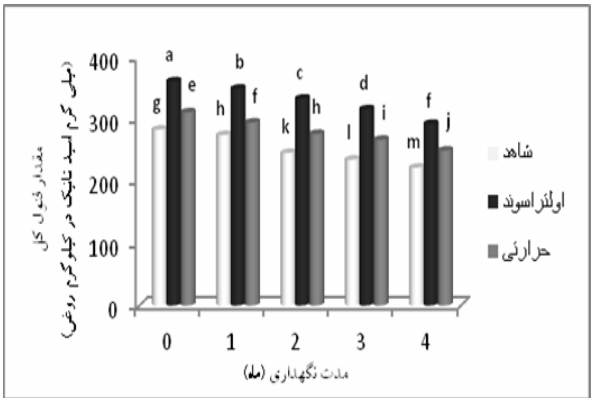
حروف متفاوت نشان دهنده ی اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ ٪ می باشد

۳-۱- آزمون های انجام شده روی روغن زیتون در مرحله دوم پژوهش

بررسی نتایج اندازه گیری میزان ترکیبات فنولیک در طول نگهداری

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، میزان فنول کل در روغن با اضافه کردن فلفل قرمز به طور چشمگیری افزایش یافته است، همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود از لحاظ آماری کلیه تیمارها نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ در میزان فنول کل داشتند و در کل دوره نگهداری میزان ترکیبات فنولیک استخراج شده با هر دو روش امواج فراصوت و حرارتی در روغن زیتون حاوی فلفل به‌طور معنی‌داری با نمونه شاهد اختلاف دارد و میزان فنول کل در روغن با اضافه کردن فلفل قرمز به طور چشمگیری افزایش یافته است ($P<0/05$). در روش استخراج با امواج، امواج فراصوت از طریق تخریب دیواره سلولی فلفل، بدون آسیب رساندن و از بین بردن پلی‌فنل‌ها، باعث انتشار این مواد به داخل روغن زیتون می‌شود. امواج فراصوت دیواره‌های سلولی را به‌طور مکانیکی می‌شکنند و انتقال مواد را بهبود می‌بخشد. این امواج

همچنین از طریق کاهش اندازه ذرات، سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار روغن در بافت فلفل افزایش می‌یابد [۹]. اما در روش حرارتی میزان ترکیبات فنولیک نسبت به نمونه فراصوت کمتر است. در عین حال پلی‌فنول‌های تیمار حرارتی به‌طور معنی‌داری بیشتر از نمونه شاهد می‌باشد. افزایش مقدار ترکیبات فنولی روغن زیتون حاوی فلفل طی حرارت‌دهی، به کم آبی ماتریکس سلولی و توانایی استخراج بهتر ترکیبات فنولیک از فلفل نسبت داده شده است [۱٦]. همچنین حرارت از طریق غیرفعال کردن آنزیم پلی-فنول‌اکسیداز، از تخریب پلی‌فنول‌ها جلوگیری می‌کند [۱۸]. از طرف دیگر، سرعت استخراج پلی‌فنول‌ها در نمونه حاوی فلفل، در زمان-های مختلف نزدیک به‌هم است و بیشترین استخراج در ماه صفر صورت می‌گیرد. می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در لحظه نخست استخراج، امواج فراصوت از طریق باز کردن منافذ سلولی باعث انتقال بهتر ترکیبات از فلفل به روغن می‌شود. در زمان صفر، سرعت انتقال ترکیبات فنولی به داخل روغن، به دلیل اختلاف شیب غلظت، بسیار بالا می‌باشد [۱۹]. اما با گذشت زمان و در طی نگهداری، از مقدار ترکیبات فنولیک کاسته می‌شود. کاهش مقدار پلی‌فنول‌ها با گذشت زمان، احتمالا به‌دلیل استفاده شدن از آن‌ها در حفظ روغن در برابر واکنش‌های اکسیداتیو است [۲۰].



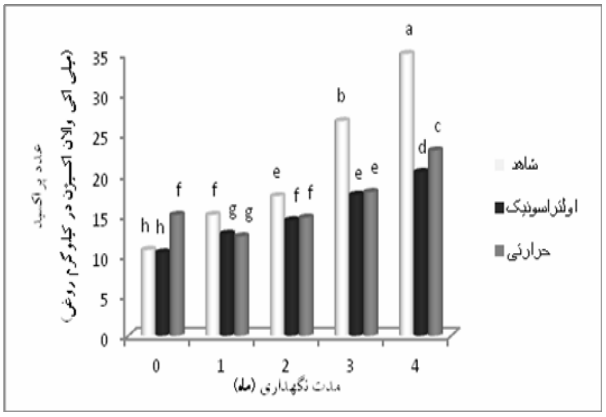
نمودار ۳ مقایسه میانگین ترکیبات پلی‌فنولی نمونه‌ها در زمان‌های مختلف نگهداری

حروف متفاوت نشان دهنده ی اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ ٪ می باشد

بررسی نتایج آزمون پراکسید

با توجه به نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین دانکن که در نمودار ٤ ارائه گردیده است، تیمار شاهد (نمونه روغن زیتون بدون افزودن فلفل) با تیمارهای حاوی فلفل، در طول زمان نگهداری طی چهار ماه، در میزان عدد پراکسید اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری داشتند. اما بین تیمارهای فراصوت و حرارتی اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود، به‌جز ماه چهارم که این دو نسبت به یکدیگر و نسبت به نمونه شاهد، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در میزان پراکسید داشتند. نتایج حاکی از آن است که با افزودن فلفل به روغن زیتون مقدار پراکسید در نمونه حاوی فلفل نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته و عدد پراکسید در این تیمار مقاومت بیشتری در مقابل افزایش نشان می‌دهد. کاهش اندیس پراکسید در اثر افزودن فلفل قرمز را می‌توان به ترکیبات فنولیک و سایر ترکیبات ضد اکسایشی موجود در فلفل نسبت داد. ترکیبات فنولیک با داشتن خاصیت ضد اکسایشی، بیشترین اهمیت را در پایداری اکسیداتیو روغن دارند. ترکیبات پلی‌فنولی با از دست دادن یک اتم هیدروژن به صورت رادیکال آزاد درآمده، از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند. در روغن زیتون محتوی فلفل استخراج شده به روش حرارتی، میزان پراکسید در زمان صفر نگهداری، به‌طور معنی-داری افزایش و پس از آن، در ماه اول کاهش یافت. علت افزایش میزان اندیس پراکسید در زمان صفر استفاده از حرارت به‌منظور استخراج ترکیبات فنولیک فلفل می‌باشد. زیرا حرارت از عوامل تأثیرگذار در تسریع اکسیداسیون می‌باشد. پس از گذشت یک ماه، سرعت تشکیل هیدروپراکسیدها کمتر از سرعت تجزیه آنهاست. بنابراین شاخص پراکسید در مقایسه با ماه صفر کاهش یافت. ولی با گذشت زمان سرعت تشکیل هیدروپراکسیدها افزایش یافته و بیش از سرعت تجزیه آنهاست و شاخص پراکسید افزایش می‌یابد. احتمال دیگر در بیان دلیل کاهش پراکسید در ماه اول مربوط به شکست پراکسید و هیدروپراکسیدها و تبدیل آنها به ترکیبات ثانویه نظیرآلدئیدها، کتون‌ها و کتواسیدها می‌باشد، درنتیجه کاهش میزان اندیس پراکسید را به دنبال داشته است [٤]. اما در ادامه نگهداری، بعد از یک ماه، مقدار پراکسید افزایش می‌یابد و با یک شیب ملایمی یک روند صعودی تا پایان دوره چهارم دارد. با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها، تفاوت بین تیمارها بیشتر مشهود است. بنابر

گزارشات ارائه شده توسط ایادی و همکاران[13] در سال ۲۰۰۹، میزان پراکسید روغن زیتون با افزودن گیاهان و ادویه‌های ضد اکسایشی کاهش می‌یابد. که این گزارش با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد [۲۱]. استفاده از روش امواج فراصوت باعث کاهش بیشتر اندیس پراکسید نسبت به روش حرارتی شد. در روش امواج فراصوت به‌دلیل استخراج بیشتر ترکیبات پلی‌فنولیک، تأثیر این ترکیبات در از بین بردن رادیکال‌های آزاد بیشتر است. در نتیجه کاهش اندیس پراکسید مشهودتر است و با گذشت زمان اندیس پراکسید با شیب ملایم‌تری افزایش می‌یابد.

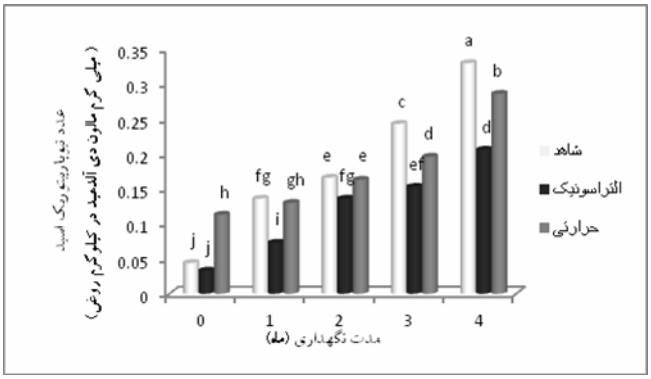


نمودار ٤ مقایسه میانگین شاخص پراکسید نمونه‌ها در زمان‌های مختلف نگهداری

حروف متفاوت نشان دهنده ی اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ ٪ می باشد

بررسی نتایج اندازه‌گیری عدد تیوباربیتوریک اسید (TBA)

اندیس TBA بیانگر میزان محصولات ثانویه اکسیداسیون و محصولات حاصل از تجزیه هیدروپراکسید به‌ویژه مالون آلدهید می‌باشد. هیدرو پراکسیدها در مرحله گسترش، از رادیکال‌های آزاد تولید شده در مرحله مقدماتی حاصل می‌شوند. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، در زمان صفر، با افزایش میزان عدد پراکسید در روغن زیتون حاوی فلفل استخراج شده به روش حرارتی، مقدار اندیس تیوباربیتوریک اسید نیز افزایش یافته است. افزایش شاخص TBA در ماه صفر در نمونه حرارتی، بیانگر گسترش واکنش اتواکسیداسیون و افزایش محصولات ثانویه به‌ویژه مالون‌آلدهید و ترکیبات کربونیل با گذشت زمان می‌باشد، در واقع بخشی از هیدرو پراکسیدهای تشکیل شده در مرحله انتشار شکسته شده و به محصولات ثانویه تبدیل می‌شوند. اما به‌دلیل وجود ترکیبات ضد اکسایشی در روغن، این افزایش در میزان مالون آلدهید در ماه‌های دوم، سوم و چهارم با شیب ملایم‌تری طی می‌شود و روند افزایش شاخص TBA در نمونه‌های حاوی فلفل نسبت به نمونه شاهد با سرعت کمتری صورت می‌گیرد. در مقایسه تیمارها در ماه چهارم نگهداری، مشاهده می‌شود اندیس TBA تیمارهای مختلف از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری داشته و در بین تیمارها، تیمار شاهد بالاترین اندیس TBA را دارد. در نمونه شاهد، به علت تولید مقادیر بیشتری هیدرو پراکسید، طبیعتا میزان مالون آلدهید تولید شده نیز بیشتر خواهد بود. اما در نمونه‌های حاوی فلفل به‌دلیل حضور ترکیبات فنولی و سایر ترکیبات ضد اکسایشی مقدار هیدرو پراکسید تولید شده کمتر و در پی آن مقدار ترکیبات ثانویه کمتری نیز تولید می‌شود. در نمونه فراصوت به‌دلیل بالاتر بودن مقدار پلی-فنول استخراجی، مقدار هیدروپراکسیدهای تولید شده و به طبع آن مقدار مالون آلدهید تولید شده کمتر از نمونه استخراج شده به روش حرارتی می‌باشد. بنابراین این تیمار نسبت به تیمار حرارتی اثر آنتی-اکسیدانی بیشتری را داشته است.



نمودار ۵ مقایسه میانگین عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌ها در زمان-های مختلف نگهداری

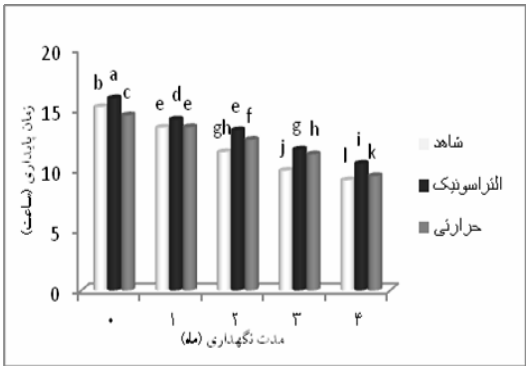
حروف متفاوت نشان دهنده ی اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ ٪ می باشد

بررسی نتایج زمان پایداری (رنسیمت) در طول نگهداری

اطلاعات مربوط به تجزیه واریانس و مقایسه میانگین که در نمودار ٦ ارائه گردیده است، نشان می دهد که در تیمار شاهد و نمونه تیمار شده با فلفل قرمز، اختلاف معنی‌داری در میزان زمان پایداری

13- Ayadi et al

تیمارها در سطح ۱٪ ایجاد گردیده است و تمامی تیمارها از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نسبت به یکدیگر داشتند. در آزمون رنسیمت پلی‌فنول‌های فلفل سرعت اکسیداسیون روغن زیتون را کاهش داده و بنابراین طول دوره القاء پراکسیداسیون روغن افزایش یافت. بیشتر بودن طول دوره القاء نشان دهنده بالاتر بودن فعالیت ضد اکسایشی می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مشاهده می‌شود که با افزودن فلفل قرمز به‌عنوان ضد اکساینده به روغن زیتون پایداری روغن افزایش یافت ($P<0/05$). به‌طوری‌که تیمار استخراج شده به‌روش امواج فراصوت در تمامی دوره‌های نگهداری، بیشترین دوره القاء را در مقایسه با سایر تیمارها داشته است و پس از آن، دوره القاء در نمونه حرارتی در مقایسه با نمونه شاهد بیشتر است. نتایج به‌دست آمده از آزمون رنسیمت با نتایج حاصل از پراکسید و پلی‌فنول هم‌خوانی دارد.

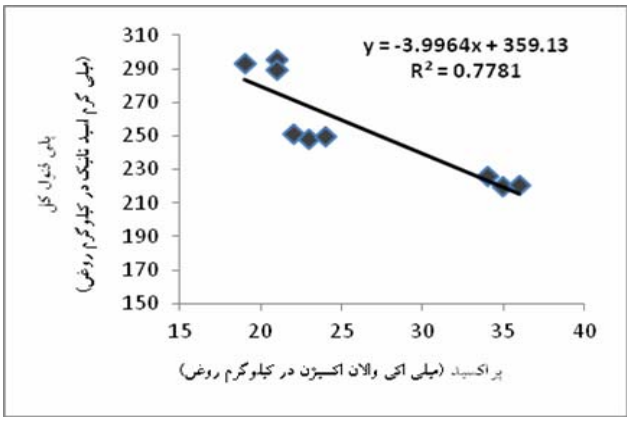


نمودار ٦ مقایسه میانگین زمان پایداری نمونه‌ها در زمان‌های مختلف نگهداری

حروف متفاوت نشان دهنده ی اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ ٪ می باشد

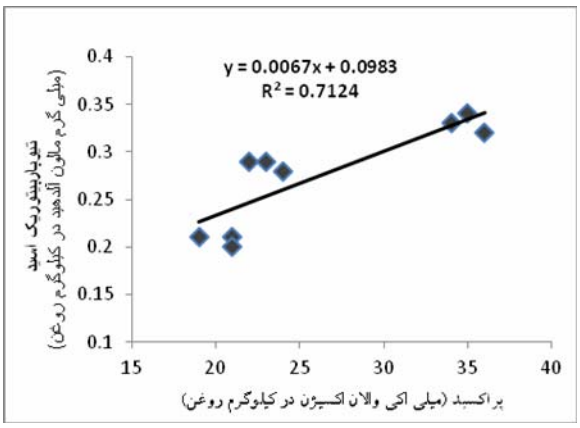
نتایج بررسی همبستگی میان شاخص های اندازه گیری اکسیداسیون و پلی‌فنول کل در تیمارهای روغن زیتون

در نمودارهای زیر، همبستگی میان اندیس‌های اکسیداسیون (پراکسید، تیوباربیتوریک اسید و زمان پایداری) و پلی‌فنول کل در ماه چهارم مورد ارزیابی قرار گرفته است. برای تعیین ارتباط میان این شاخص‌ها، از تحلیل رگرسیون خطی استفاده شد. نتایج این پژوهش، همانطور که در نمودار ۷ دیده می‌شود، نشان داد که در ماه چهارم، میزان پلی‌فنول موجود در روغن زیتون به صورت خطی، معکوس و قوی با عدد پراکسید ارتباط دارد. طبق این نتایج، با افزایش میزان پلی‌فنول کل در نمونه‌ها مقدار عدد پراکسید کاهش می‌یابد. بنابراین پلی‌فنول‌ها به عنوان عوامل ضد اکسایشی، در پایداری روغن زیتون و ممانعت از اکسیداسیون و افزایش اندیس پراکسید مؤثر می‌باشند. ترکیبات فنولیک قادرند با دادن اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد تشکیل شده در روغن، باعث کاهش سرعت واکنش‌های زنجیری در طی فرایند اکسیداسیون روغن شوند. ترکیبات پلی‌فنولی با کاهش سرعت اکسیداسیون باعث افزایش زمان پایداری روغن نیز می‌شوند.



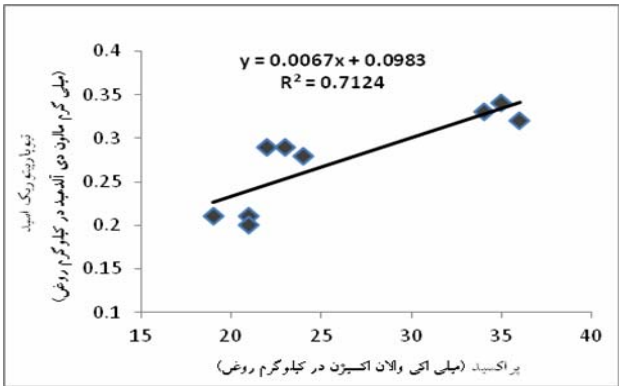
نمودار ۷ همبستگی میزان پلی‌فنول کل با اندیس پراکسید در ماه چهارم نگهداری

از سوی دیگر، با توجه به نمودار ۸ ترکیبات فنولیک و عدد تیوباربیتوریک اسید همبستگی معکوس و قوی با یکدیگر دارند. طبق این نتایج، با افزایش میزان ترکیبات فنولیک حاصل از فلفل قرمز، میزان این اندیس در ماه چهارم کاهش یافته است. هیدروپراکسیدهای تولید شده در طی اکسیداسیون اساسا مواد ناپایداری هستند که تحت اثر عواملی مانند حرارت به سرعت تجزیه می‌شوند. آلدهید ممکن است خود اکسید شده و به اسیدهای کربوکسیلیک تبدیل شود. همان‌طور که در بالا اشاره شد ترکیبات فنولیک از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد، از تشکیل این واکنش-های زنجیره‌ای جلوگیری می‌کنند.



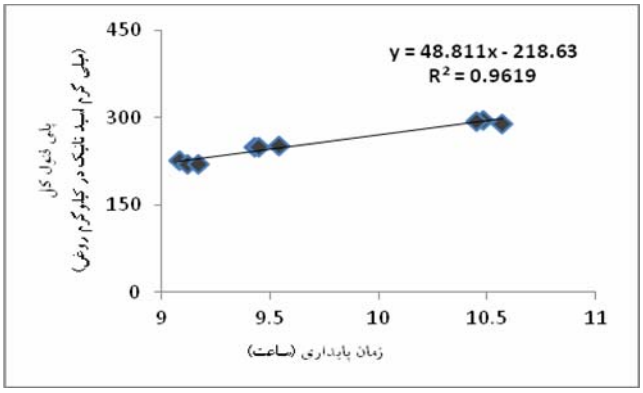
نمودار ۸ همبستگی میزان پلی فنول کل با تیوباربیتوریک اسید در ماه چهارم نگهداری

طبق نمودار ۹ همچنین همبستگی مستقیم و قوی بین این دو اندیس پراکسید و تیوباربیتوریک اسید، به‌عنوان شاخص‌های اصلی اکسایش مشاهده می‌شود. وجود همبستگی و ارتباط بین عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید به خوبی قابل توجیه است. روند تغییرات عدد پراکسید و عدد تیوباربیتوریک اسید در طی دوره اکسیداسیون با یکدیگر هم‌خوانی داشت که بیانگر ناپایدار بودن پراکسیدها و شکست آنها به فرآورده های ثانویه طی مراحل بعدی اکسایش است.



نمودار ۹ همبستگی اندیس پراکسید با عدد تیوباربیتوریک اسید در ماه چهارم نگهداری

طبق نتایج حاصل از پژوهش، و بر اساس نمودار ۱۰، همبستگی مستقیم و قوی میان پلی‌فنول کل با زمان پایداری روغن زیتون وجود دارد و با افزایش میزان ترکیبات پلی‌فنولی به‌عنوان عوامل ضد اکساینده در روغن زیتون، زمان پایداری روغن افزایش می‌یابد. ترکیبات پلی‌فنولی با کاهش سرعت اکسیداسیون باعث افزایش زمان پایداری روغن زیتون می‌شوند.



نمودار ۱۰ همبستگی زمان پایداری با پلی فنول کل در ماه چهارم نگهداری

٤- نتیجه گیری کلی

باتوجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، افزودن فلفل قرمز به روغن زیتون تأثیر مثبتی بر پایداری اکسایشی محصول نهایی داشته است. بررسی شاخص‌های اکسایشی روغن زیتون بکر حاوی ۵٪ فلفل استخراج شده به دو روش حرارتی و امواج فراصوت نشان داد که در نتیجه استفاده از فلفل به‌عنوان منبع غنی از ضد اکساینده در روغن زیتون بکر، پایداری روغن زیتون در برابر اکسیداسیون افزایش یافته و فلفل توانسته است از طریق کند کردن پیشرفت اکسیداسیون، باعث افزایش ماندگاری روغن زیتون شود.

نتایج آزمون پراکسید نشان داد که میزان پراکسید در زمان صفر، در نمونه حرارتی به‌طور معنی‌داری بالاتر از نمونه امواج فراصوت و شاهد می‌باشد. اما نمونه‌های شاهد و امواج فراصوت اختلاف معنی-داری با یکدیگر نداشتند. در انتهای دوره نگهداری، اندیس پراکسید نمونه‌های حاوی فلفل استخراج شده با هر دو روش فراصوت و حرارتی، به‌طور معنی‌داری کمتر از نمونه شاهد می‌باشد. طبق نتایج به‌دست آمده از آزمون تیوباربیتوریک اسید، در تمامی دوره‌ها، کمترین میزان این اندیس در نمونه استخراج شده به روش امواج فراصوت مشاهده شد و این اندیس در نمونه شاهد به طور معنی-داری بیشتر از نمونه‌های حاوی فلفل بود. بررسی نتایج حاصل از آزمون رنسیمت نشان می‌دهد که بالاترین زمان پایداری مربوط به نمونه حاوی فلفل استخراج شده به روش امواج فراصوت می‌باشد و

اختلاف معنی‌داری بین این تیمار و تیمارهای حرارتی و شاهد وجود دارد. نتایج حاصل از همبستگی نیز نشان می‌دهد، بین شاخص‌های اکسایش (شاخص پراکسید، عدد تیوباربیتوریک اسید و پایداری حرارتی) و پلی‌فنول کل ارتباط قوی وجود دارد. از سوی دیگر، اندازه‌گیری ترکیبات پلی‌فنولی نشان داد که روش استخراج امواج فراصوت نسبت به روش حرارتی، به‌عنوان یک روش کارآمد، باعث بهبود استخراج این ترکیبات شده و راندمان استخراج با این روش بالاتر است و نمونه فراصوت حاوی بیشترین ترکیبات فنولی می‌باشد.

۵- سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات رئیس محترم شورای ملی زیتون، جناب آقای سید احمد بلند نظر و جناب آقای مهندس حامد صفافر کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. همچنین از همکاری پژوهشکده غذایی سازمان ملی استاندارد ایران که امکانات مورد نیاز را فراهم نمودند نیز صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

٦- منابع

[1] Shahidi F, 2005, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6 edn, New Jarsey: Wiley-Interscience Publishing, 3616 p.

[2] Nawar WW, 1984, Chemical changes in lipids produced by thermal processing, Chemical Education, 61: 299-302.

[3] Aparicio R, Roda L, Albi MA, Gutierrez F. 1999. Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 4150-4155.

[4] Fatemi H, 2001, Food Chemistry, Tehtan, Public Sahami, 480 (In Persian).

[5] Madsen HL, Serensen B, Skibsted LH, Bertelsen G, 1998, The antioxidative activity of summer savory (*Saturejahortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinusoficinalis* L.) in dressing stored exposed to light or in darkness, Journal of Food Chemistry, 63: 173-180.

[6] Materska M, Perucka I, 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(5): 1750-6.

[7] Gambacorta G, Faccia M, Pati S, Lamacchia C, Baiano A, La Note E, 2007. Changes in the chemical and sensorial profile of extra virgin olive oils flavored with herbs and spices during storage, Journal of Food Lipids, 14: 202-215.

[8] Sim KH, Sil HY, 2008, Antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum* L.) pericarp and seed extracts, Journal of Food Science and Technology, 43: 1813–1823.

[9]Hong-feng J, De-chuan P, Ai-hua l, Jiang-hong H, Zu-ming C, Zhi-fei H, 2012. Ultrasound-Assisted Extraction and Heat Stability of Capsaicinoids from Doubanjiang (Bean Paste), Journal of Food Science, 33(4): 104-108.

[10] Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P,Gargova S, 2007, Antioxidant activity of ginger extract (Zingiberofficinale), Journal of Food Chemistry, 102: 764-70.

[11] Iranian International standard No 4179: 1st Edition Method of determination for peroxide edible oils and fats (Persian).

[12] Iranian International standard No 10494: 1st Edition Method of determination for Thiobarbituric acid edible oils and fats (Persian).

[13] Tabee E, Azadmard-Damirchi S, J.gerstad M and Dutta PC, 2008, Effects of α-tocopherol on oxidativestability and phytosterol oxidation during heating in Some regular and high-Oleic vegetable oils. Journal of the American Oil Chemists 'Society, 85: 857–867.

[14] Toma M, Vinatour M, Paniwnyk L, Mason TJ, 2001, Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, Journal of Ultrasonics Sonochemistry, 8: 137-142.

[15] Barbero GF, Palmam, Barroso CG, 2006, Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J], Analytica Chimica Acta, 578(2): 227-233.

[16] Choe E, Min DB, 2006, Mechanisms and factors for edible oil oxidation, Journal of Food Science and Food Safety, 5: 169-186.

[17] Turkmen N, Sari F, Velioglu YS, 2005, The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables, Journal of Food Chemistry, 93: 713-718.

[18] ChuahAM, Lee YC, Yamaguchi T, Takamura H, Yin LJ, Matoba T, 2008, Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers, Journal of Food Chemistry, 111: 20–28.

[19] Boonkird S, Phisalaphong C, Phisalaphong M, 2008, Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from Capsicum frutescens on a lab- and pilot-plant scale, Journal of Ultrasonics Sonochemistry, 15(6): 1075-1079.

[20] Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Gomez JA, Huertas JR, Mataix J, 2002, Role of vitamin E and phenolic compound in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying, Journal of Food Chemistry, 76: 461-468.

[21] Ayadi MA, Grati-Kamoun N, Atti, H, 2009, Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants, Journal of Food and Chemical Toxicology, 47: 2613–2619.

Comparative investigation of red pepper (*Capsicum annuum* L.) extraction by ultrasonic and thermal methods and effect of it's extract on oxidative stability of virgin olive oil.

Dehlei, Z. [1], Fahimdanesh, M. [2*], Sahari, M. A. [3]

1.Department of Food science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University,Tehran, Iran

2*. Department of Food science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University,Tehran, Iran

3. Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

(Received: 93/4/23 Accepted: 93/8/7)

Recently there has been a tendency towards natural antioxidants due to the undesirable effects of synthetic antioxidants. In the present study Ultrasonic and Thermal methods were used to extract the components of Red Pepper (*Capsicum annuum*). In the first section of the research, in order to evaluate the treatment with the highest percentage extraction of phenolic compounds in Ultrasonic method, two factors, time (10, 15 and 20 minutes) and a pepper to oil ratio (5, 7 and 10%) were used. In the Thermal Extraction Method, pepper to oil ratio (5, 7 and 10%) was assessed with constant time factor (60 minutes in 80 ºC). Amount of phenolic components were measured by Folin–Ciocalteu method. Phenolic components of ultrasonic and thermal sample were determined 314.61 and 272.55 respectively. Retarding effect of treatments on the oxidation of virgin olive oils were studied through measuring of acidity index, Thiobarbituric acid number and evaluating thermal stability (Rancimat) and polyphenol content by keeping them in ambient temperature for four months. After four months, both the Ultrasonic sample and Thermal sample showed less peroxide (23 and 20/33 meq O_2/kg oil respectively) compared to the control sample (35 meq O_2/kg oil). Thiobarbituric acid, that indicate secondary oxidation products, showed a decrease in Ultrasonic and Thermal samples (0/28 and 0/20 respectively) compared to the control sample (0/33) at the end of period. The result from assessing the antioxidant activity of extracts by Rancimat method showed that the length of induction period in Ultrasonic and thermal samples (12/48 and 13/26 respectively) were increased compared to the control sample at 110 ºC. At the end of the four months, It was proved that Phenolic components of pepper in virgin olive oil has an antioxidant effect, and Ultrasonic treatment of red pepper extract compared to thermal treatment, has more antioxidant effect.

Keywords: Red pepper, Polyphenolic component, Ultrasonic extraction, Thermal extraction, Virgin Olive Oil.

* Corresponding Author E-Mail Address fahimdanesh78@yahoo.com: