# اثر دمای طولانی مدت بر روی فعالیت ضداکسایشی، ترکیبات فنولی و رنگ عسل گونه یونجه ایرانی: تجزیه و تحلیل سینتیکی

محمد ملاویسی[۱]، عادل بیگ بابایی[۲*]، احسان اکبری[۳]، مصطفی شهیدی[۴]

۱- دانشجوی دکتری، شیمی مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
۲- استادیار، شیمی مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
۳- دانشجوی دکتری، شیمی مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
٤- استادیار، شیمی مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

**(تاریخ دریافت: ۹۷ /۰۹/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۰۱)**

## چکیده

در این مطالعه سینتیک تغییرات فعالیت ضداکسایشی کل توسط ارزیابی رادیکال DPPH، تشکیل رنگدانه قهوه‌ای (BPF) و فنول کل با معرف فولین-سیوکالتیو در عسل یونجه حرارت دیده در دماهای مختلف (٤٥، ٥٥ و ٦٥ درجه سانتیگراد) طی ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان فعالیت ضداکسایشی، BPF و مقدار فنول کل با افزایش دما و زمان روند افزایشی دارند. همچنین بررسی سینتیک تغییرات BPF و فنول کل نشان داد که این پارامترها از سینتیک مرتبه صفر پیروی می‌کنند و مقدار انرژی فعال سازی به ترتیب ۸٦/۱ و ۷۱/۷ کیلوژول بر مول در ٤٥-٦٥ درجه سانتیگراد به دست آمد. با این حال، به دلیل تنوع فعالیت ضداکسایشی در دماهای مختلف، سینتیک مرتبه دوم، مرتبه اول و مرتبه صفر به ترتیب در دماهای ٤٥، ٥٥ و ٦٥ درجه سانتیگراد بدست آمد. حرارت دادن عسل در ٦٥ درجه سانتی گراد موثرتر از ٤٥ و ٥٥ درجه سانتیگراد برای هر سه پارامتر بود. نتایج نشان داد که فعالیت ضداکسایشی با افزایش هر دو فاکتور قهوه‌ای شدن و فنول کل نمونه در ارتباط بود و همچنین با افزایش قهوه‌ای شدن مقدار فنول کل افزایش می‌یابد به طوریکه بیشترین مقدار فنول مربوط به تیره ترین نمونه عسل است.

**کلید واژگان:** عسل یونجه، سینتیک، آنتی اکسیدان، فنول کل

* مسئول مکاتبات: a.beigbabaei@rifst.ac.ir

## ۱- مقدمه

عسل یک محصول غذایی مفید و یک اکسیر پرارزش بوده که از قرن ها پیش بعنوان عالی‌ترین و مقوی‌ترین غذاها شناخته شده است. هم چنین هزاران سال است که با هدف درمان جراحات و بیماری‌ها مورد استفاده بشر قرار گرفته است. شواهد تاریخی موید آن است که مصریان، آشوریان و یونانیان از جمله اقوام کهنی هستند که از عسل همراه با گیاهان دارویی و یا به تنهایی برای بهبود امراض بهره جسته اند [۱].

آنتی اکسیدان‌ها، موادی هستند که قادرند با آثار ناشی از فرآیند فیزیولوژیک اکسیداسیون در بافت‌ها مقابله کنند. شواهد بسیار زیادی وجود دارد که اثرات سوء تغذیه‌ای آنتی اکسیدان های مصنوعی اضافه شده به مواد غذایی را تأیید می کنند. علاوه بر این خطر آسیب کبدی و ایجاد سرطان درحیوانات آزمایشگاهی از معایب استفاده از آنتی اکسیدان های ساختگی است. بنابراین نیاز به آنتی اکسیدان های قوی با سمیت کمتر و اثر بخشی بیشتر یک ضرورت اجتناب ناپذیر است. برخی تحقیقات وجود مواد آنتی اکسیدان موجود در عسل را اثبات نموده‌اند [۲].

فعالیت ضداکسایشی عسل های طبیعی به طور گسترده به ترکیب شیمیایی آنها مانند فنولیک ها، فلاونوئیدها، آنزیم ها، اسیدهای آلی، آمینو اسیدها، محصولات واکنش میلارد، آسکوربیک اسید، کاروتنوئیدها وابسته است [۳]. بنابراین فنولیک ها یا پلی فنول ها یکی از مهم ترین طبقه از ترکیبات پیدا شده در عسل هستند. غلظت کلی فنول‌ها در عسل به مقدار زیادی وابسته به منبع گیاهی آنها است. چون محتوی ترکیبات فنولیک معمولا در عسل های روشن در مقایسه با عسل های با رنگ تیره تر پایین تر است، سطوح بالا پلی-فنول‌ها در همه عسل‌ها ممکن است همراه با رنگ تیره‌تر آنها باشد [٤].

در حین فرایند حرارتی روی مواد غذایی، برخی تغییرات شیمیایی اتفاق می‌افتد. یکی از آنها قهوه ای شدن غیر آنزیمی واکنش میلارد است که هنگامی رخ می‌دهند که قند ها با اسید آمینه های آزاد متراکم شده و منجر به تشکیل انواع رنگدانه قهوه ای می‌شوند [٥]. اعتقاد بر این است که محصولات واکنش میلارد (MRPs[1]) به عنوان آنتی اکسیدان فعال هستند. بنابراین، از دست رفتن آنتی اکسیدان های طبیعی در طی حرارت به دلیل تشکیل آنتی اکسیدان های حاصل از محصولات واکنش میلارد می‌تواند به حداقل برسد و یا با تشکیل آنتی اکسیدان های غیر مغذی مانند MRPs جبران شود [٦].

گزارش شده است که خواص ضداکسایشی MRPs از سوی خواص فیزیکی و شیمیایی سیستم و شرایط فرایند به شدت تحت تاثیر قرار می‌گیرد. پلی فنول ها، اسید آسکوربیک و دیگر ترکیبات کربونیل حتی اگر در طول واکنش‌های اکسیداتیو تشکیل شوند می‌توانند خودشان در واکنش میلارد شرکت کنند [٦]. ترکیبات هتروسیکلیک مانند پیرول‌ها، فوران نامحلول[2] (فوران نامحلول را می توان از پنتوز با اسید و گرما تولید کرد) و تیوفین های تشکیل شده در طول واکنش میلارد اکسیداسیون هگزانال را به مقدار قابل توجه مهار می‌کنند [۷] اما، قهوه‌ای شدن به طور مستقیم به خواص مهار رادیکال آزاد MRPs تشکیل شده در شرایط حرارت طولانی مدت در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در سیستم-های مدل ارتباط ندارد [۸].

عسل عمدتاً شامل گلوکز، فروکتوز، مالتوز، ساکارز، آب و دیگر اجزای جزئی از جمله پروتئین‌ها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، فلاونوئیدها و استیل کولین است [۹] و بنابراین در اثر حرارت واکنش میلارد که حاصل واکنش قند احیا کننده با اسید آمینه بوده خصوصا در حرارت های بالا می‌تواند اتفاق افتد. عسل به دلیل تغییر تمایل به تبلور یا تاخیر در از دست دادن ظاهر اولیه و هم چنین برای از بین بردن میکروارگانیسم‌های آلوده کننده تحت تیمارهای حرارتی قرار می‌گیرد. حرارت دادن عسل معمولا به دو روش مختلف انجام می گیرد یکی در اتاق های تهویه مناسب هوا در ٥٠-٤٥ درجه سانتیگراد طی ۷-٤ روز و دیگری در آب گرم [۱۰]. کیفیت عسل می‌تواند با حرارت در طول فرایند یا با کهنگی در طول ذخیره سازی تحت تاثیر قرار گرفته باشد. یکی از اثرات تیمارهای حرارتی واکنش قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی میلارد است [۱۱]. بسته به منبع تغذیه زنبور (گل های مختلف)، عسل شامل چندین فلاونوئید مانند آپیگنین، پینوکمبرین، کامفرول، کوئرستین، گالانجین، کیریسین، هسپرتین و اسیدهای فنولی مانند

1. Maillard reaction products.

2. Unsubstituted furan

الاجیک، کافئیک، P-کوماریک و اسید فرولیک است، که بسیاری از آنها خواص ضداکسایشی دارند [۱۲]. با این حال، داده‌های بسیار محدودی نشان می دهند که رابطه بین فعالیت ضداکسایشی، ترکیبات فنولیک موجود در عسل و تشکیل رنگدانه قهوه‌ای (BPF[1]) به عنوان تابعی از زمان حرارت در دماهای مختلف وجود دارد. هدف اصلی از این مطالعه تعیین تغییرات در فعالیت ضداکسایشی، فنول کل و رنگ عسل در طی عملیات حرارتی و تعیین پارامترهای سینتیکی برای این سه عامل و ارتباط آنها با همدیگر است.

## ۲- مواد و روش

### ۲-۱- آماده سازی نمونه

عسل یونجه (۸۰° BX) به طور مستقیم از تولید کننده تهیه شد. نمونه‌های عسل (۵ گرم) داخل لوله های آزمایش در سه نسخه ریخته شده و درب آن ها، محکم بسته شد. سپس نمونه ها در یک دستگاه انکوباتور در ٤٥ و ٥٥ و ٦٥ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ روز ذخیره شدند. در فواصل ٤٨ ساعت سه لوله از هر درجه حرارت، خارج به سرعت بر روی یخ سرد شد و در منفی ٢٤ درجه سانتیگراد تا زمان تجزیه و تحلیل ذخیره شدند. یک گرم نمونه در ۵ میلی لیتر آب مقطر با استفاده از یک مخلوط کن حل شده و محلول ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شدند. محلول های سانتریفیوژ شده با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شده و برای فعالیت ضداکسایشی و BPF و فنول کل آنالیز شدند.

### ۲-۲- تعیین فعالیت ضداکسایشی کل

فعالیت آنتی اکسیدانی توسط روش ژانگ و هامازو با استفاده از رادیکال آزاد ۲،۲، دی فنیل -۲ - پیکریل - هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۳]. هر عصاره دقیقا به بریکس ٤ با آب مقطر (DW) با استفاده از یک رفرکتومتر دیجیتال مدل Atago-5000A رقیق شدند. ۰/۵ میلی لیتر از عصاره عسل با کسر ۱/۵ میلی لیتر از رادیکال DPPH ۰/۱ میلی مولار (سیگما) در متانول مخلوط شد. DW برای کنترل عصاره استفاده می شود. مخلوط واکنش هم زده شد و اجازه داده شد در ۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی به مدت ٦٠ دقیقه نگه داشته شد. جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر با استفاده از متانول به عنوان استاندارد اندازه گیری شد.

فعالیت ضداکسایشی به عنوان درصد مهار رادیکال DPPH بیان شد و با استفاده از معادله ۱ تعیین شد.

معادله ۱

$$AA(\%) = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100.$$

### ۲-۳- تشکیل رنگدانه قهوه ای

BPF با اندازه گیری جذب عصاره رقیق بریکس ٤ در طول موج ٤٢٠ نانومتر با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفتومتر برای هر دما و زمان تیمار آزمایشی اندازه گیری شده بود [١٤].

### ۲-٤- اندازه گیری فنول کل

مقدار فنول کل در نمونه های عسل با اندکی تغییر در روش فولین-سیکالتیو اندازه گیری گردید [۸]. در این روش، در لوله آزمایش به مقدار ۰/۱ میلی لیتر از هر عسل ( با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) با محلول اتانولی استاندارد اسید گالیک (غلظت ۳۰۰-۲۵ میکروگرم) ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین - سیوکالته رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰ و ۰/٤ میلی لیتر سدیم کربنات ۷/۵٪ اضافه و مخلوط شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط آزمایشگاه، جذب نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (فارماسیا مدل ال کا بی نوواَ اسپکت II ساخت انگلستان) در طول موج ٧٦٥ نانومتر قرائت گردید. مقادیر فنول کل در نمونه های عسل با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی گرم اسید گالیک در گرم عسل بیان گردید.

### ۲-۵- محاسبات سینتیک

آنالیزهای رگرسیون (نمودار سیگما ٤١) برای تعیین ثابت های سرعت برای فعالیت ضداکسایشی، فنول کل و BPF انجام شد. انرژی فعال سازی (Ea) از ضرایب سرعت در دماهای مختلف با استفاده از معادله آرنیوس محاسبه شد [۱۵].

مدل های کلی سنتیکی مرتبه صفر، اول و دوم جهت بدست آوردن سنتیک فعالیت آنتی اکسیدان، فنول کل و قهوه ای

1. Brown pigment formation

شدن به ترتیب در معادلات ۲، ۳ و ٤ در نمونه عسل یونجه ارائه می گردند.:

معادله ۲ $[A]_0 - [A] = kt$

معادله ۳ $[A] = [A]_0 \exp(-kt)$

معادله ٤ $1/[A] - 1/[A]_0 = kt$

تاثیر دما بر روی $k$ از طریق معادله ٥ (معادله آرنیوس) بدست آمد، انرژی فعالسازی ($Ea$) برای تشکیل هر پارامتر از طریق رگرسیون خطی نمودار $\ln k$ در برابر $1/T$ تعیین گردید.

معادله ٥ $(\ln k = \ln k_0 - Ea/RT)$

مدل های رگرسیونی مربوط به هر کدام از پارامترها در دماهای مختلف از طریق نرم افزار Excel و طبق رسم نمودار غلظت در برابر زمان ارائه می گردند. مدل های اولیه توسط رسم نمودار غلظت، لگاریتم غلظت و معکوس غلظت در برابر زمان آنالیزها برای هر کدام از پارامتر ها و دماهای مختلف به ترتیب برای مرتبه های صفر، اول و دوم در نرم افزار Excel بدست آمد.

مدل های رگرسیونی نهایی از طریق تطبیق و تجزیه و تحلیل مدل های اولیه بدست آمده توسط نرم افزار Excel با معادلات کلی مرتبه صفر، اول و دوم ارائه شده در معادلات ۲، ۳ و ٤ بدست آمد.

مرتبه واکنش ها از طریق مقایسه ضرایب همبستگی ($R^2$) در نمودار های مختلف رسم شده طبق معادلات کلی سنتیکی بدست آمد. بطوریکه بیشترین ضریب همبستگی بدست آمده از رسم رگرسیون خطی تعیین کننده مرتبه آن واکنش می باشد [١٦].

## ۳- بحث و نتایج

### ۳-۱- فعالیت آنتی اکسیدان، BPF و فنول کل

شکل های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب تغییرات در فعالیت ضداکسایشی، BPF و فنول کل در نمونه های عسل در معرض تیمار حرارتی در دمای ٦٥-٤٥ درجه سانتی گراد برای زمان های مختلف را نشان می دهند. نتایج نشان داد که فنول کل و BPF به طور منظم طی ۱۰ روز در دماهای ٤٥، ٥٥ و ٦٥ درجه سانتی گراد افزایش یافت و فعالیت ضداکسایشی ۱۰ روز در دماهای ٤٥ و ٥٥ و همچنین ۸ روز در ٦٥ درجه سانتی گراد در نسبت‌های مختلف افزایش یافته است. با افزایش دما هر سه فعالیت ضداکسایشی، BPF و فنول کل افزایش یافته است. این افزایش در نمونه های حرارت داده شده در ٦٥ درجه سانتیگراد نسبت به ٤٥ و ٥٥ درجه سانتیگراد قابل توجه تر بود، که وابستگی زیاد فعالیت ضداکسایشی، BPF و فنول کل را به زمان و دمای حرارت دهی نشان می دهد.

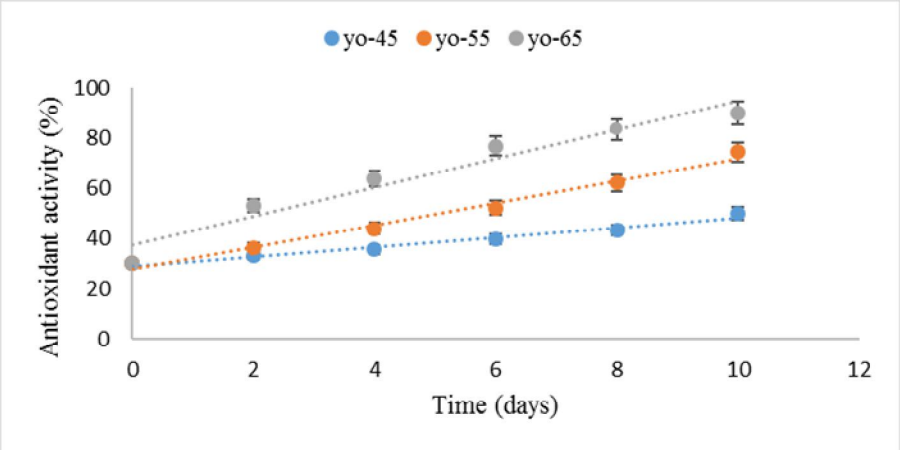


**Fig 1** Antioxidant activity of honey as a dependent of heating time at 45, 55, 65 °C.

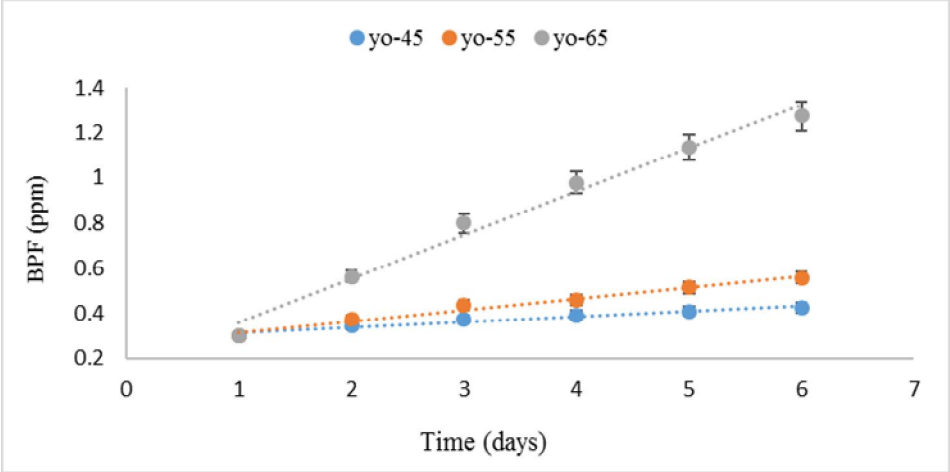


**Fig 2** BPF of honey as a dependent of heating time at 45, 55, 65 °C.

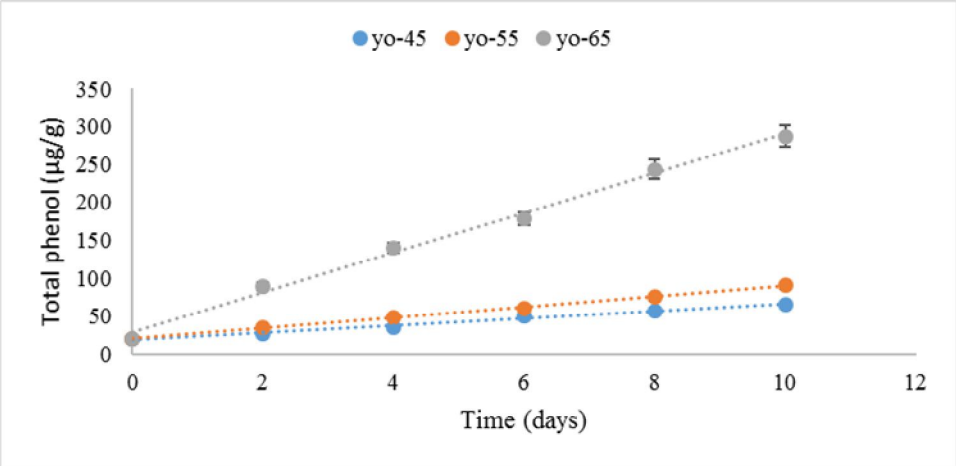


**Fig 3** TPC of honey as a dependent of heating time at 45, 55, 65 °C.

## ۳-۲- ارتباط بین فعالیت ضداکسایشی و قهوه‌ای شدن

همان طور که در جدول ۱ مشخص است ضریب همبستگی بالای ضداکسایشی در برابر BPF در دماهای مختلف نشان می‌دهد که همبستگی بالایی بین ظرفیت آنتی اکسیدان و BPF وجود دارد. در شکل ٤، افزایش در فعالیت ضداکسایشی به همراه افزایش در قهوه‌ای شدن نمونه ها ناشی از MRPs دیده می شود، خصوصیات آنتی اکسیدان قبلا برای غذا و سیستم های مدل گزارش شده بود [٦ و ١٧].

**Table 1** Regression equations and correlation coefficients ($R^2$) of antioxidant activity as a dependent of BPF for heated instances at different temperatures.

| Temperature (°C) | Regression equations | $R^2$ |
|---|---|---|
| 45 | y = 149.16x – 17.307 | 0.8849 |
| 55 | y = 172.67x – 26.164 | 0.9538 |
| 65 | y = 40.399ln(x) + 77.028 | 0.9910 |

y: antioxidant activity (%)
x: BPF (ppm)

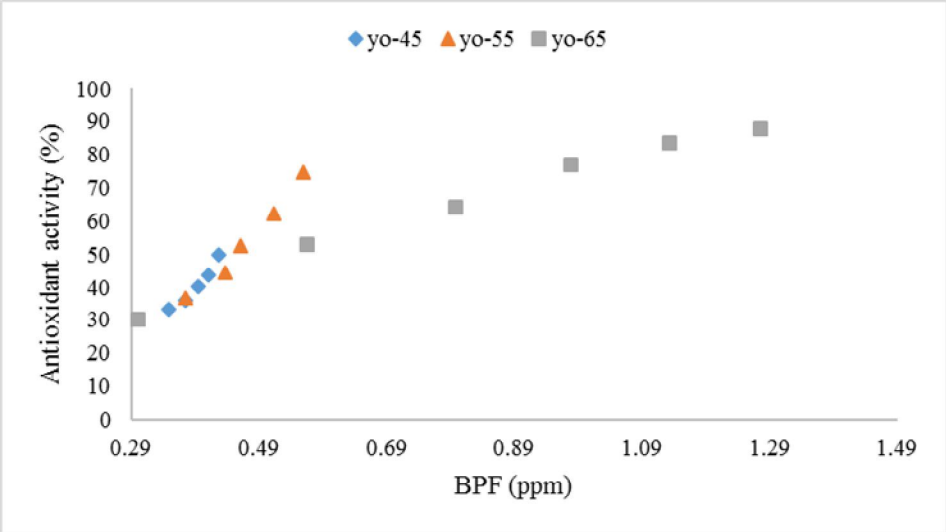


**Fig 4** Antioxidant activity-BPF relation in heated honey samples at 45, 55, 65 °C.

در حالیکه فعالیت ضداکسایشی و BPF به صورت خطی با افزایش زمان حرارت دهی در ٤٥ و ٥٥ درجه سانتیگراد افزایش یافته، افزایش لگاریتمی در فعالیت آنتی اکسیدان در ٦٥ درجه سانتیگراد مشاهده می شود (شکل ١ و ٢). افزایش فعالیت ضداکسایشی و قهوه‌ای شدن در طی افزایش حرارت را می‌توان بدلیل ترکیبات حاصل از واکنش‌های قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی (میلارد) نسبت داد، زیر این ترکیبات شامل ترکیبات مختلفی هستند که به موقعیت و شرایط فرآیند وابسته می‌باشند [٦ و ١٨]. مورالس و جیمنز-پرز (٢٠٠١) گزارش کردند که اختلاف در توانایی خنثی سازی رادیکال بین مقادیر ملانوئیدین با وزن مولکولی مختلف مشاهده شد. همچنین ملانوئیدین های ایزوله شده از بعضی غذاها فعالیت آنتی اکسیدان مختلف نشان داده اند [٨]. مطالعه مشابه توسط یاناجیموتو و همکاران (٢٠٠٢) انجام شد که اثر گروه های عملکردی مختلف روی ترکیبات هتروسیکلیک پیدا شده در واکنش میلارد با توجه به فعالیت ضداکسایشی مختلف ر نشان می دهد. هیچ داده ای در این مورد روی فعالیت آنتی اکسیدان و تغییرات رنگ در طول حرارت دادن عسل پیدا نشده بود [٧].

## ٣-٣- ارتباط بین فعالیت ضداکسایشی با محتوی فنول کل

ضریب همبستگی بالای مشاهده شده بین داده ها (جدول ٢) برای آنتی اکسیدان در برابر محتوی فنول کل در دماهای مختلف نشان می دهد که ارتباط قوی بین محتوی هر دو وجود دارد در شکل ٥، افزایش در فعالیت ضد اکسایشی همراه افزایش در محتوی فنول کل نمونه ها دیده می‌شود.

**Table 2** Regression equations and correlation coefficients ($R^2$) of antioxidant activity as a dependent of TPC quantity for heated instances at different temperatures.

| Temperature (°C) | Regression equations | $R^2$ |
|---|---|---|
| 45 | y = 0.4066x + 21.567 | 0.9624 |
| 55 | y = 0.6455x + 14.309 | 0.9889 |
| 65 | y = 22.223ln(x) – 40.758 | 0.9621 |

y: antioxidant activity (%)
x: Total phenol (µg/g)

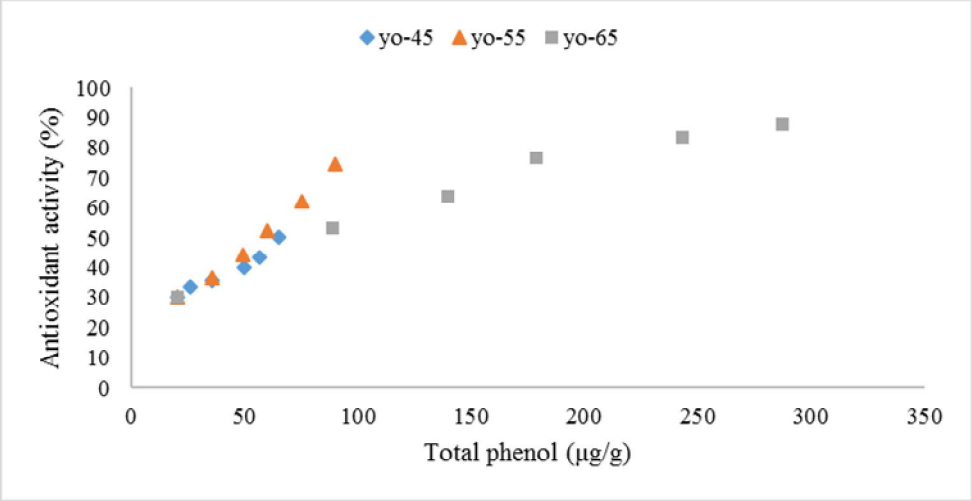


**Fig 5** Antioxidant activity- TPC relation in heated honey samples at 45, 55, 65 °C.

در حالی که فعالیت ضداکسایشی و فنول کل به صورت خطی با افزایش زمان حرارت دهی در ٤٥ و ٥٥ درجه سانتیگراد افزایش یافت، افزایش لگاریتمی در فعالیت آنتی اکسیدان در ٦٥ درجه سانتیگراد مشاهده شد (شکل ١ و ٣).

محتوی فنول کل عسل یونجه در دمای ٦٥ درجه از g/g۲۰/۷ در زمان ابتدایی (t=0) به g/g۲۸۷/۲۳ رسید، که حدود ١٤ برابر افزایش یافته است. نتایج مطابق تحقیقات انجام شده پیشین برای محتوی فنول کل بود. فریرز و همکاران (١٩٩٢)، گیل و همکاران (١٩٩٥) و مارتوس و همکاران (١٩٩٧) یافتند که محتوی فنولیک کل عسل به ترتیب بین ٢٠٠٠-٥٠٠، ٢٠٠٠-٧٠٠ و ٢٤٠٠-٢٠ g/100g بود [١٩، ٢٠ و ٢١].

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که ترکیبات فنولی می توانند مسئول فعالیت ضداکسایشی عسل یونجه باشند. در پژوهشی که با این تحقیق مطابقت دارد رابطه مستقیم بین خاصیت ضداکسایشی و میزان ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی در بلوبری (نوعی میوه که در نواحی اطراف دریای سیاه می روید) اثبات گردیده است [٢٢]. ترکیبات فنولی به دلیل خواص ضداکسایشی از جمله ترکیبات مهم گیاهی محسوب می شوند که نقش مهمی در غیر فعال کردن رادیکال های آزاد لیپیدی یا جلوگیری از تجزیه هیدروپراکسیدها به رادیکالهای آزاد را دارند [٢٣].

برخی از گزارشات بیانگر ارتباط مستقیم بین آزمایش فنول کل به روش معرف فولین-سیوکالته با آزمایشات فعالیت آنتی اکسیدان دی فنیل پیکریل هیدرازیل، فعالیت ضداکسایشی معادل ترولکس و پتانسیل ضداکسایشی احیاء آهن است [٢٤]. در مطالعات فراوانی نیز وجود ترکیبات فنولی عسل و ارتباط آن با فعالیت ضداکسایشی مورد بررسی قرار گرفته است.

جهان و همکاران (٢٠١٥) بیان کردند که با افزایش محتوی فنول کل خاصیت ضداکسایشی عسل بنگلادش افزایش می یابد [٢٥]. خلیل و همکاران (٢٠١٢) گزارش کردند که ارتباط بالایی بین محتوی ترکیبات فنولی با فعالیت ضداکسایشی نمونه عسل الجزایری وجود دارد، که با افزایش محتوی فنولی در عسل ها فعالیت ضداکسایشی نمونه ها نیز افزایش پیدا می کند [٢٦]. الجدی و کاماریودین (٢٠٠٤) نشان دادند که در دو نمونه عسل ژلام و نارگیل مالزیایی ارتباط مستقیم بین محتوی فنول کل و فعالیت ضداکسایشی وجود دارد [١٢].

## ٣-٤- ارتباط بین BPF و محتوی فنول کل

ضریب همبستگی بالا داده ها برای BPF در برابر محتوی فنول کل در دماهای مختلف نشان می دهد که ارتباط قوی بین محتوی هر دو وجود دارد (جدول ٣). در شکل ٦، افزایش در BPF همراه افزایش در محتوی فنول کل نمونه ها دیده می شود.

**Table 3** Regression equations and correlation coefficients ($R^2$) of TPC as a dependent of BPF quantity for heated instances at different temperatures.

| Temperature (°C) | Regression equations | $R^2$ |
|---|---|---|
| 45 | $y = 1177.5x^{3.4595}$ | 0.9469 |
| 55 | $y = 365.58x^{2.3861}$ | 0.9981 |
| 65 | $y = 268.32x - 66.068$ | 0.9884 |

y: Total phenol (µg/g)
x: BPF (ppm)

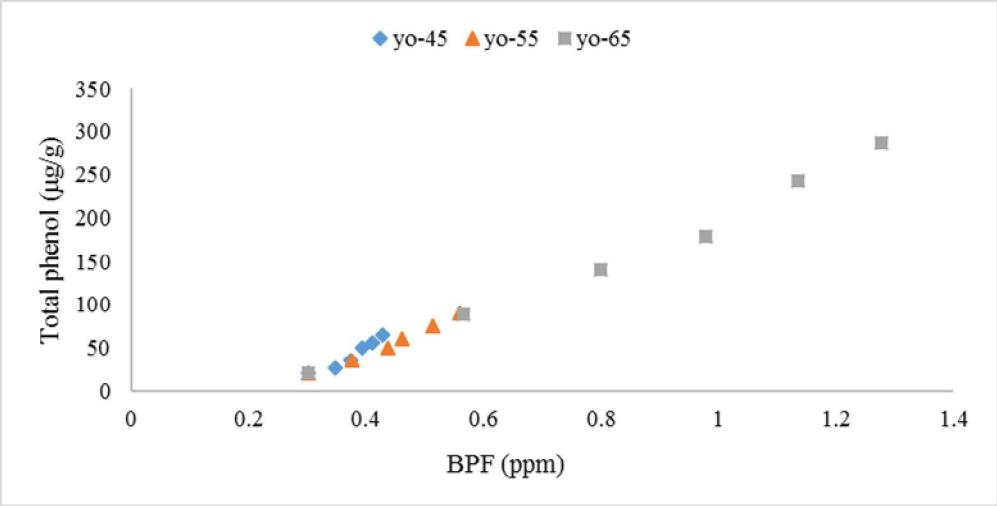


**Fig 6** TPC e BPF relation in heated honey samples at 45, 55, 65 °C.

هر دو پارامترهای BPF و فنول کل در عسل یونجه به صورت خطی با افزایش زمان حرارت دهی در ٤٥، ٥٥ و ٦٥ درجه سانتیگراد افزایش یافت (شکل ٢ و ٣). نتایج حاصل از BPF نشان می دهد که با افزایش دما و زمان حرارت دهی رنگ نمونه های عسل افزایش می یابد و این افزایش در دمای ٦٥ درجه به حداکثر خود می رسد و چون محتوی ترکیبات فنولیک معمولا در عسل های روشن در مقایسه با عسل های با رنگ تیره تر پایین تر است، سطوح بالا پلی فنول ها در عسل ممکن است همراه با عسل های با رنگ تیره تر باشد [٤]. مطالعات زیادی بر روی ارتباط رنگ عسل های مختلف با محتوی فنول کل آنها وجود دارد. سانتانا و همکاران (٢٠١٤) گزارش کردند که ارتباط مستقیم قوی بین افزایش تیره شدن عسل های برزیلی با محتوی فنولیک آنها وجود دارد [٢٧]. خلیل و همکاران ٢٠١٢ بیان کردند که بین افزایش محتوی فنولیک کل و ترکیبات فلاونوئیدی با افزایش رنگ عسل الجزایری ارتباط مستقیم وجود دارد [٢٦].

## ٣-٥- سینتیک های واکنش فعالیت آنتی اکسیدان، BPF و فنول کل

جهت دستیابی به مرتبه واکنش از مقایسه ضرایب رگرسیونی با همدیگر استفاده می شود و بالاترین ضریب رگرسیونی بدست آمده تعیین کننده مرتبه آن واکنش می باشد. بدین گونه که ضریب رگرسیونی مرتبه صفر نشان دهنده همان ضریب بدست آمده از نمودار غلظت در برابر زمان، ضریب رگرسیونی مرتبه اول نشان دهنده همان ضریب بدست آمده از نمودار لگاریتمی غلظت در برابر زمان و ضریب رگرسیونی مرتبه دوم نشان دهنده همان ضریب بدست آمده از نمودار معکوس غلظت در برابر زمان است [١٦].

در جهت تفسیر داده های قهوه ای شدن، فعالیت ضداکسایشی و فنول کل، از مدل های سینتیکی استفاده شد. مقادیر پارامترهای بدست آمده از این تناسب ها در جدول ٤ داده شده اند. مدل سنیتیک مرتبه صفر به خوبی BPF و فنول کل را در همه دماها توصیف می کند، که مطابق با مطالعات قبلی است. مدل های سنتیک مرتبه صفر و اول جهت ارزیابی ظاهر قهوه ای شدن غیر آنزیمی استفاده شده بودند [٢٨ و ٢٩]. مدل های مرتبه اول و دوم همچنین ارزیابی شد اما آنها ضریب همبستگی پایین تری را نشان دادند. با این حال، مدل های سینتیکی مرتبه اول برای BPF و فنول کل مناسب بود. از طرف دیگر، تغییرات در فعالیت

آنتی اکسیدان با زمان با مدل های سینتیکی مرتبه دوم، اول و صفرم به ترتیب در دماهای ٤٥، ٥٥ و ٦٥ درجه سانتیگراد قابل تفسیر بود. برای فعالیت آنتی اکسیدان مدل های سینتیکی متفاوتی در دماهای حرارت دهی مختلف به کار برده شده است. که این اثر فعالیت های متفاوت واکنش دهنده ها در واکنش میلارد را نشان می دهد که می تواند ناشی از اختلاف در حساسیت دمای مراحل مختلف واکنش میلارد باشد [۱۸]. یک پدیده مشابه برای تشکیل هیدروکسی متیل فورفورال (HMF) در عسل حرارت دیده در ٥٠ تا ١٠٠ درجه سانتیگراد گزارش شده بود. هیچ مطالعه ای برای تغییرات در فعالیت آنتی اکسیدان در طول فرآیند حرارتی از عسل یافت نشد. از طرف دیگر، سو و همکاران در سال (٢٠٠٤) گزارش کردند که انواع ظرفیت ضد رادیکالی از عصاره میوه توت با زمان تیمار در ٨٠ تا ١٠٠ درجه سانتیگراد در جهت هر دو مدل های مرتبه اول و صفرم فیت شد [۳۰]. اما این نویسندگان دومی را پیشنهاد کردند، که با نتایج بدست آمده برای ۷۰ درجه سانتیگراد از این مطالعه سازگار است. طبق جدول ٤، افزایش واضحی در ثابت های سینتیکی با دما مشاهده شد. این نشان می دهد که افزایش در دمای تیمار به هر سه فعالیت آنتی اکسیدان، BPF و فنول کل کمک کرده است.

ارتباط بین BPF و فنول کل نشان دهنده پیروی هر دو این پارامترها از واکنش درجه صفر است که این نتیجه را می توان دریافت که عامل قهوه ای شدن در یونجه احتمالا به یک ترکیب فنولی مربوط باشد، همانطور که مانتل و همکاران (۲۰۰۲) [۳۱]، پاتیل و همکاران (۲۰۰۹) [۳۲] و جیسوال و همکاران (۲۰۱۰) [۳۳] گزارش کردند که آنتوسیانین‌ها گروهی از ترکیبات فنولیک مربوط به خانواده فلاونوئیدها می باشند که مسئول رنگ های نارنجی، قرمز، بنفش و آبی در گروه بزرگی از گیاهان هستند. الیوت (۱۹۹۹) بیان کرد که الاژیک اسید که یک ترکیب فنولی و مهمترین ترکیب شیمیایی موجود در پوست انار دارای خاصیت ضداکسایشی است [٣٤].

تیمار حرارتی اثرات مثبت بر روی محتوی فنولیک دارد به طوریکه با افزایش حرارت محتوی آن ها افزایش پیدا می کند (شکل ۳). این مطالعه از نظر فعالیت آنتی اکسیدان مشابه مورد گزارش شده برای تورکمن و همکاران (٢٠٠٦) بود که بیان کردند فعالیت ضداکسایشی بصورت خطی همراه با افزایش دما (٥٠، ٦٠ و ٧٠ درجه سانتیگراد) طولانی مدت (در ۱۲ روز) افزایش می یابد [١٤]. با این تفاوت که در این مورد محتوی فنول کل نمونه ها و ارتباط آنها با فعالیت ضداکسایشی و قهوه ای شدن مورد بررسی قرار نگرفته بود. همچنین یافته های ما از نظر محتوی فنول کل مشابه با مورد گزارش شده برای عسل مانوکا از نیوزیلند بود به نحوی که گزارش شده که محتوی فنولیک به ترتیب ۲۰/۱ درصد و ١٦/٣ درصد تحت تیمارهای حرارتی در ٥٠ و ٧٠ درجه سانتی گراد افزایش می یابد [۳۵]. در این مطالعه مقدار فنولیک ممکن است با توجه به دناتوراسیون و باز شدن جایگاه های فعال پروتئین، تنزل آنتی اکسیدان های درونی و تولید بعضی آنتی اکسیدان های غیر مغذی مانند محصولات واکنش میلارد است که توسط کاسزنی ریویکز و همکاران (۲۰۰۸) [٣٦] و سرپن (۲۰۱۲) [۳۷] نیز گزارش شده است.

**Table 4** Kinetic parameters for BPF, antioxidant activity and TPC in honey at different temperatures.

| Parameter | Temperature (°C) | Zero-order | | First-order | | Second-order | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $k\ (day^{-1})$ | $R^2$ | $k\ (day^{-1})$ | $R^2$ | $k\ (day^{-1})$ | $R^2$ |
| Brown color formation | 45 | 0.012 | 0.952 | 0.032 | 0.923 | -0.090 | 0.895 |
| | 55 | 0.024 | 0.982 | 0.058 | 0.953 | -0.142 | 0.908 |
| | 65 | 0.096 | 0.984 | 0.135 | 0.897 | -0.222 | 0.758 |
| Antioxidant activity | 45 | 1.924 | 0.976 | 0.049 | 0.991 | -0.0012 | 0.997 |
| | 55 | 4.387 | 0.987 | 0.090 | 0.999 | -0.0019 | 0.973 |
| | 65 | 5.625 | 0.933 | 0.098 | 0.845 | -0.0018 | 0.714 |
| Total phenolic content | 45 | 4.665 | 0.986 | 0.119 | 0.973 | -0.0033 | 0.932 |
| | 55 | 6.793 | 0.997 | 0.139 | 0.949 | -0.0033 | 0.809 |
| | 65 | 26.20 | 0.994 | 0.234 | 0.834 | -0.0035 | 0.892 |

انرژی فعالسازی حساب شده با استفاده از معادله آرنیوس برای BPF و فنول کل به ترتیب ۸۶/۱ و ۷۱/۷ کیلو ژول بر مول در ٤٥ تا ٦٥ درجه سانتیگراد بود. که این مقادیر نسبت به مقدار ۱۳۲ کیلو ژول بر مول داده شده برای آب انگور جوشیده شده و همچنین پایین تر بود [۲۸]. هم چنین مقدار BPF نسبت به ۷۷/۱ کیلو ژول بر مول برای پوره سیب بالاتر و مقدار فنول کل پایین تر بود [۱۱]. این نشان می‌دهد که تشکیل ترکیبات فنولیک در عسل یونجه نسبت به آب انگور جوشیده شده و پوره سیب به دما حساس تر است اما واکنش قهوه ای شدن در عسل یونجه در مقایسه با آب انگور جوشیده شده به دما حساس تر ولی نسبت به پوره سیب به افزایش دما حساسیت کمتری دارد. اختلاف در سرعت قهوه ای شدن در عسل نسبت به آب انگور جوشیده شده و پوره سیب می تواند مرتبط با اختلافات در اسیدهای آمینه و محتوی قند احیا کننده آنها باشد. از دیگر فاکتورهای که احتمالا سبب تغییر سینتیک قهوه ای شدن میلارد می شوند، نوع و پایداری حرارتی آمینو اسیدها و قندهای احیا کننده در واکنش هستند.

**Table 5** RMSE and E parameters for BPF, antioxidant activity and TPC in honey at different temperatures.

| Parameter | Temperature (°C) | Zero-order | | First-order | | Second-order | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *RMSE* | *E* | *RMSE* | *E* | *RMSE* | *E* |
| Brown color formation | 45 | 0.082 | 0.0034 | 0.139 | 0.0065 | 0.142 | 0.0069 |
| | 55 | 0.041 | 0.0012 | 0.081 | 0.0033 | 0.133 | 0.0066 |
| | 65 | 0.038 | 0.0011 | 0.145 | 0.0069 | 0.328 | 0.0167 |
| Antioxidant activity | 45 | 0.055 | 0.0021 | 0.032 | 0.0002 | 0.018 | 0.0001 |
| | 55 | 0.036 | 0.0011 | 0.010 | 0.0001 | 0.058 | 0.0022 |
| | 65 | 0.109 | 0.0051 | 0.234 | 0.0091 | 0.387 | 0.0189 |
| Total phenolic content | 45 | 0.037 | 0.0012 | 0.058 | 0.0022 | 0.112 | 0.0061 |
| | 55 | 0.017 | 0.0001 | 0.095 | 0.0039 | 0.204 | 0.0098 |
| | 65 | 0.023 | 0.0001 | 0.245 | 0.0101 | 0.150 | 0.0069 |

## ٤- نتیجه گیری

در این بررسی، عسل یونجه ایرانی در سه دمای ٤٥، ٥٥ و ٦٥ درجه سانتیگراد برای ۱۰ روز حرارت داده شد و فعالیت ضداکسایشی، محتوی فنول کل و قهوه ای شدن نمونه های حرارت داده شده مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی افزایش در هر سه پارامتر در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد با شدت بیشتری انجام شد که وابستگی شدید هر سه پارامتر را به دما نشان می دهد. قهوه ای شدن و فنول کل در نمونه عسل یونجه تحت سینتیک مرتبه صفر با مقدار انرژی فعال سازی به ترتیب ۸٦/۱ و ۷۱/۷ کیلوژول بر مول در همه دماها افزایش یافت. با این حال، به دلیل تنوع فعالیت ضداکسایشی در دماهای مختلف، سینتیک مرتبه دوم، مرتبه اول و مرتبه صفر به ترتیب در دماهای ٤٥، ٥٥ و ٦٥ درجه سانتیگراد بدست آمد. افزایش منظم و طولانی حرارت می تواند سبب توسعه فعالیت ضداکسایشی عسل توسط افزایش تدریجی ترکیبات با خاصیت ضداکسایشی مانند ترکیبات فنولی و همچنین تشکیل محصولات واکنش میلارد شود. اما ایجاد رنگدانه قهوه ای توسط حرارت برای مشتری ها قابل قبول نیست. باید محدوده ای دمایی به گونه ای اعمال گردد که یک تعادل جهت بدست آوردن فعالیت ضداکسایشی بالا و قهوه ای شدن پایین ایجاد گردد.

## ٥- منابع


[1] Zumla, A. & Lulat, A. (1989). Honey--a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine,* 82**,** 384.

[2] Gorjanović, S .Ž., Alvarez-suarez, J. M., Novaković, M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M. & Sužnjević, D. Ž. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of food composition and analysis,* 30**,** 13-18.

[3] Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Gałkowska, D., Fortuna, T. & Witczak, T. (2011). Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. *International*

and Velioglu, Y.S., (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, *95*(4), pp.653-657.

[15] Labuza, T. P. (1984). Application of chemical kinetics to deterioration of foods. ACS Publications.

[16] Ritzoulis, C. (2013). *Introduction to the physical chemistry of foods*, CRC Press.

[17] Wagner, K., Derkits, S., Herr, M., Schuh, W. & Elmadfa, I. (2002). Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucose–glycine model. *Food Chemistry,* 78**,** 375-382.

[18] Van boekel, M. (2001). Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Molecular Nutrition & Food Research,* 45**,** 150-159.

[19] Ferreres, F., Ortiz, A., Silva, C., Garcia-Viguera, C ,.Tomás-Barberán, F. A. & Tomás Lorente, F. (1992). Flavonoids of "La Alcarria" honey A study of their botanical origin. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A,* 194**,** 139-143.

[20] Gil, M. I., Ferreres, F., Ortiz, A., Subra, E. & Tomas-Barberan, F. A. (1995). Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 43**,** 2833-2838.

[21] Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F. & Tomás-Barberán, F. A. (1997). Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 45**,** 2824-2829.

[22] Koca, I. & Karadeniz, B. (2009). Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae,* 121**,** 447-450.

[23] Jimoh, F., Adedapo, A., Aliero, A. & Afolayan, A. (2008). Polyphenolic Contents and Biological Activities of Rumex ecklonianus. *Pharmaceutical Biology,* 46**,** 333-340.

[24] Stratil, P., Klejdus, B. & Kubáň, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of agricultural and food chemistry,* 54**,** 607-616.

[25] Jahan, N., Islam, M. A., Alam, F., Gan, S. H. & Khalil, M. I. (2015). Prolonged *journal of food science & technology,* 46**,** 528-534.

[4] Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A ,.Dereń, M. & Kafarski, P. (2012). Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. *Food Chemistry,* 131**,** 1149-1156.

[5] Nicoli, M. C., Anese, M., Parpinel, M. T., Franceschi, S. & Lerici, C. R. (1997). Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer letters,* 114**,** 71-74.

[6] Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli ,M. C. & Lerici, C. R. (2000). Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in food science & technology,* 11**,** 340-346.

[7] Yanagimoto, K., Lee, K.-G., Ochi, H. & Shibamoto, T. (2002). Antioxidative activity of heterocyclic compounds formed in Maillard reaction products. International Congress Series, Elsevier, 335-340.

[8] Morales, F. J. & Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food chemistry,* 72**,** 119-125.

[9] Da Silva, P .M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O. & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. Food chemistry, 196, 309-323.

[10] Fallico, B., Zappala, M., Arena, E. & Verzera, A. (2004). Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. Food Chemistry, 85, 305-313.

[11] Ibarz, A., Pagan, J. & Garza, S. (2000). Kinetic models of non enzymatic browning in apple puree. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1162-1168.

[12] Aljadi, A. & Kamaruddin, M. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry,* 85**,** 513-518.

[13] Molaveisi, M., Beigbabaei, A., Akbari, E., Noghabi, M.S. and Mohamadi, M., 2019. Kinetics of temperature effect on antioxidant activity, phenolic compounds and color of Iranian jujube honey. *Heliyon*, *5*(1), p.e01129.

[14] Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E.S.

heating of honey increases its antioxidant potential but decreases its antimicrobial activity. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines,* 12**,** 134-144.

[26] Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Islam, M. N., Sulaiman, S. A. & Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules,* 17**,** 11199-11215.

[27] Sant'ana ,L. D. O., Buarque ferreira, A. B., Lorenzon, M. C. A., Berbara, R. L. L. & Castro, R. N. (2014). Correlation of total phenolic and flavonoid contents of Brazilian honeys with colour and antioxidant capacity. *International journal of food properties,* 17**,** 65-76.

[28] Bozkurt, H., Göğüş, F. & Eren, S. (1999). Nonenzymic browning reactions in boiled grape juice and its models during storage. *Food Chemistry,* 64**,** 89-93.

[29] Yu, A.-N., Zhou, Y.-Y. & Yang, Y.-N. (2017). Kinetics of browning and correlations between browning degree and pyrazine compounds in l-ascorbic acid/acidic amino acid model systems. *Food chemistry,* 221**,** 1678-1684.

[30] Suh, H. J., Kim, J. M., Lee, H., Lee, S. W. & Choi, Y. M. (2004). Thermal kinetics on antiradical capacity of mulberry fruit extract. *European Food Research and Technology,* 219**,** 80-83.

[31] Mantell, C., Rodrıguez, M. & De La Ossa, E. M. (2002). Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modelling. *Chemical Engineering Science,* 57**,** 3831-3838.

[32] Patil, G., Madhusudhan, M., Babu, B. R. & Raghavarao, K. (2009). Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification,* 48**,** 364-369.

[33] Jaiswal, V., Dermarderosian, A. & Porter, J. R. (2010). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (Punica granatum L.). *Food Chemistry,* 118**,** 11-16.

[34] Elliott, J. G. (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages: Developing nutraceuticals for the new millenium. *Food Technology,* 53**,** 46-48.

[35] Akhmazillah, M., Farid, M. & Silva, F. (2013). High pressure processing (HPP) of honey for the improvement of nutritional value. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* 20**,** 59-63.

[36] Kusznierewicz, B., Śmiechowska, A., Bartoszek, A. & Namieśnik, J. (2008). The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *Food chemistry,* 108**,** 853-861.

[37] Serpen, A., Gökmen, V. & Fogliano, V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat science,* 90**,** 60-65.

# The effect of long-term temperature on antioxidant activity, phenolic compounds and honey color of Iranian alfalfa: Kinetic analysis

**Molaveisi, M. [1], Baikbabaei, A. [2*], Akbari, E. [1], Shahidi, M. [2]**

1. PhD Student, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.
3. PhD Student, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.
4. Associate Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.

**(Received: 2018/12/05 Accepted: 2019/05/22)**

In this study, the kinetics of total antioxidant activity changes by DPPH radical evaluation, brown pigment formation (BPF), and phenol total with folin–ciocalteu reagent intestinal tract in heated alfalfa honey at different temperatures (45, 55 and 65 °C) over a period of 10 days it placed. The results showed that the amount of antioxidant activity, BPF, and total phenol content increased with increasing temperature and time. Also, the kinetics of changes in BPF and total phenol showed that these parameters follow a zero-order kinetics and the activation energy was 86.1 and 71.7 kJ / mol, respectively, at 45-65 °C. However, due to the diversification of antioxidant activity at different temperatures, second order, first order, and zero order kinetics were obtained at 45, 55 and 65 ° C, respectively. Honey heating at 65 ° C was more effective than 45 ° C and 55 ° C for all three parameters. The results showed that antioxidant activity was associated with an increase in both browning factors and total phenol, and also with increasing brown pigment formation, the total phenol content increased so that the highest amount of phenol was related to the darkest honey sample.

**Keyword:** Kinetics, Honey alfalfa, Antioxidant, Total phenol

*Corresponding Author E-Mail Address: a.beigbabaei@rifst.ac.ir