



بهینه سازی تأثیر اسانس های طبیعی حاصل از میخک، زیره و رازیانه در غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز سیب درختی (گلدن دلشز) با روش سطح پاسخ

امیر دارائی گرمه خانی^{۱*}، نرجس آقاجانی^۲

۱- استادیار، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده فنی و منابع طبیعی تویسرکان، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۲- استادیار، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۱۱

کلمات کلیدی:

سیب درختی،

اسانس های طبیعی،

آنزیم پراکسیداز،

روش سطح پاسخ.

DOI: 10.52547/fsct.18.02.07

*مسئول مکاتبات:

amirdaraey@basu.ac.ir

میوه ها و سبزیجات به علت دارا بودن آب زیاد و فعالیت آنزیمی بالا محصولاتی فساد پذیر هستند و سالانه مقدار زیادی از آن ها قبل از مصرف از بین می روند. برای کاهش ضایعات محصولات غذایی روش های مختلفی نظیر استفاده از حرارت یا نگهدارنده های شیمیایی مرسوم است اما افزایش تقاضای مصرف کنندگان به استفاده از مواد غذایی تازه و یا کمتر فرآوری شده باعث افزایش تحقیق در زمینه روش های نگهداری جایگزین شده است. در این مطالعه توانایی اسانس های میخک، زیره و رازیانه (غلظت های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm) در کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز (به عنوان یکی از عوامل مهم فساد بیوشیمیایی) در سیب درختی بررسی شد. اسانس میخک خالص و غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ ppm اسانس میخک باعث کاهش ۶۶/۶۷ درصدی و غلظت های ۵۰ و ۲۰۰ ppm اسانس میخک به ترتیب باعث کاهش ۴۸/۱۵ و ۶۲/۹۷ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه سیب درختی شده است. اسانس زیره در کلیه غلظت های مورد استفاده منجر به کاهش ۶۶/۶۷ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه سیب درختی شده است. همچنین استفاده از غلظت های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ ppm اسانس رازیانه باعث کاهش ۶۲/۹۷ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه سیب درختی شده است در حالیکه با افزایش غلظت رازیانه اثر ممانعت کنندگی از فعالیت آنزیم پراکسیداز آن کاهش می یابد به طوری که استفاده از اسانس خالص رازیانه و غلظت ۲۰۰ ppm آن به ترتیب باعث کاهش ۱۸/۵۲ و ۵۵/۵۶ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه سیب درختی شده است. نتایج بهینه سازی با روش سطح پاسخ نشان داد که کمترین فعالیت آنزیم پراکسیداز برای اسانس های میخک، زیره و رازیانه به ترتیب در غلظت اسانس و زمان فعالیت آنزیمی ۲۰۰ ppm و ۴۰ ثانیه برای اسانس میخک، ۱۴۶ ppm و ۱۱۲ ثانیه برای اسانس زیره و ۱۳۰ ppm و ۱۸۳ ثانیه حاصل می شود.

۱- مقدمه

میوه‌ها و سبزی‌ها به علت داشتن آب زیاد محصولاتی فسادپذیر هستند و معمولاً پس از برداشت بلافاصله باید مصرف یا به روش‌های خاصی نگهداری شوند. تأخیر در ایجاد شرایط مناسب برای نگهداری این فرآورده‌ها منجر به ضایعات فراوانی می‌شود. این ضایعات طبق برآورد مراجع گوناگون، ۲۵ تا ۸۰ درصد از میوه و سبزی‌های تازه را شامل می‌شود [۱] و هر ساله خسارت زیادی را متوجه کشور می‌نماید که منجر به از دست رفتن بخشی از محصولات کشاورزی شده و مصرف قارچ کش‌ها و آفت کش‌های شیمیایی جهت از بین بردن این گونه آفات باعث به خطر افتادن سلامت جامعه و ایجاد گونه‌های مقاوم به آفت کش‌ها نیز می‌گردد [۲-۳]. با توجه به محدودیت‌های روز افزون استفاده از مواد و آفت کش‌های شیمیایی نیاز به استفاده از مواد طبیعی و غیر مضر (نظیر اسانس‌ها و عصاره‌های طبیعی)، جهت جایگزینی و حذف سموم و قارچ کش‌های شیمیایی وارداتی بیش از پیش حس می‌شود. اسانس‌های فرار یکی از مواد موثری هستند که خواص ضد میکروبی آن‌ها در تحقیقات مختلف به خوبی اثبات شده است [۴]. علاوه بر این نگرش تولید کنندگان در اثر فشار روز افزون مصرف‌کننده (برای کاهش یا عدم استفاده از افزودنی‌های شیمیایی در میوه و سبزی‌ها)، به سمت استفاده از ترکیبات طبیعی برای جلوگیری از رشد میکروب‌ها و آفات سوق پیدا کرده است [۵]. میوه و سبزی‌ها موجودات زنده‌ای هستند که پس از برداشت نیز به تنفس ادامه می‌دهند. میکروارگانیسم‌ها و فعل و انفعالات بیوشیمیایی دو عامل اساسی در فساد مواد غذایی می‌باشند. فعل و انفعالات بیوشیمیایی اصلی آن‌ها توسط مجموعه‌ای از آنزیم‌ها تسریع شده و بنابراین به منظور حفظ خواص طبیعی مواد غذایی باید آنزیم‌ها با استفاده از حرارت یا روش‌های دیگر غیر فعال شوند [۶]. آنزیم شاخص مواد غذایی پراکسیداز می‌باشد که جزو مقاوم‌ترین آنزیم‌ها به حرارت است که غلظت آن در مواد غذایی مختلف متفاوت است. در صنایع غذایی هدف از آنزیم بری (بلاَنچینگ) معمولاً غیر فعال کردن این آنزیم می‌باشد که در صورت غیر فعال‌سازی این آنزیم، می‌توان اطمینان یافت که سایر آنزیم‌های مخرب میوه‌ها و سبزی‌ها (لیپواکسیداز، کلروفیل‌از و کاتالاز) نیز غیر فعال شده‌اند. باید در نظر داشت که پراکسیداز در واقع مخلوطی از چندین ترکیب است که هر یک مقاومت متفاوتی به حرارت دارند. اگر در حین فرآیند حرارتی، آنزیم‌ها به طور کامل غیر فعال نشوند، اغلب باعث کاهش عمر انبارداری محصول

می‌گردند. تجدید فعالیت و به تعبیری تجدید حیات آنزیم، معمولاً بعد از نگهداری محصول به صورت منجمد، دیده می‌شود [۷]. واکنش قهوه‌ای شدن آنزیمی در اثر آسیب یا بریدگی در سطح میوه و در معرض هوا قرار گرفتن آن توسط آنزیم پلی فنل اکسیداز اتفاق می‌افتد. این آنزیم در مجاورت هوا، ترکیبات فنلی را اکسید نموده و به پلیمرهای ایندول کینون تبدیل می‌نماید. این واکنش بسیار نامطلوب بوده و روش‌های متعددی جهت جلوگیری از انجام این نوع قهوه‌ای شدن، مورد استفاده قرار می‌گیرد که شامل استفاده از اسید سیتریک، اسید مالیک و یا اسید فسفریک و غوطه‌ور کردن محصول در آب نمک می‌باشد تا از این طریق از تماس اکسیژن با آن جلوگیری گردد [۶]. آنزیم پلی فنل اکسیداز برای انجام واکنش قهوه‌ای شدن به وجود اکسیژن نیاز دارد که این اکسیژن را آنزیم پراکسیداز با تجزیه آب اکسیژنه به آب و اکسیژن تأمین می‌کند. بنابراین غیر فعال‌سازی آنزیم پراکسیداز می‌تواند از فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و قهوه‌ای شدن آنزیمی جلوگیری نمود [۸]. علی‌رغم تمامی مزایای فرآیند حرارتی و رعایت شرایط بهینه برای کاهش آسیب حرارتی به ماده غذایی مصرف کنندگان دنبال محصولات غذایی فرآوری نشده یا حداقل فرآیند شده هستند که ضمن عاری بودن از عوامل فساد در فرآوری آن‌ها از مواد بی ضرر برای مصرف‌کننده نیز استفاده شده باشد. در زمینه استفاده از ترکیبات گیاهی به منظور غیر فعال‌سازی آنزیم پراکسیداز تحقیقات متعددی صورت گرفته است که در ادامه به آن‌ها پرداخته می‌شود. پونس و همکاران (۲۰۰۴) تأثیر اسانس‌های گیاهی بر غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز در سبزیجات برگی را گزارش نمودند [۹]. محسنی و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر اسانس آویشن بر غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز ترب سیاه و لوبیا سبز را بررسی نمودند و بیان کردند که مقاومت آنزیم پراکسیداز به اسانس آویشن بر اساس نوع منبع آنزیمی متفاوت بود. به طوری که اسانس آویشن موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ترب سیاه شده بود اما موجب تشدید فعالیت این آنزیم در لوبیا سبز شده بود [۱۰]. همچنین این محققین در تحقیقی دیگر (۲۰۱۵) کارایی اسانس میخک بر غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز در تربچه را گزارش نمودند [۱۱]. شهابی قهفرخی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که اسانس‌های میخک، رازیانه و زیره موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در کلم قرمز شده بودند. آن‌ها علت کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز را به ترکیب شدن اسانس‌های فوق با اکسیژن حاصل از فعالیت پراکسیداز نسبت دادند که این امر بیانگر خاصیت آنتی اکسیدانی

۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm تهیه و تأثیر آن‌ها بر روی آنزیم پراکسیداز سیب درختی آزمایش شدند.

۲-۲- روش‌ها

به منظور بررسی اثر اسانس‌های مورد استفاده، فعالیت آنزیم پراکسیداز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با اسپکتروفتومتر دو پرتویی ماوراء بنفش - مرئی (پی جی اینسترومنت، انگلستان)، در ۴۷۰ نانومتر با استفاده از گایاکول (مرک) به عنوان سوپسترا و پراکسید هیدروژن (مرک) به عنوان دهنده هیدروژن اندازه‌گیری شد [۱۴].

۲-۲-۱- تهیه عصاره آنزیمی

برای این منظور ۱۰ گرم از سیب درختی توزین و ضمن افزودن ۳۰ میلی لیتر آب مقطر (۴ درجه سانتی‌گراد) خرد گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (سیگما، آلمان) شد و فاز فوقانی به عنوان عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت [۹].

۲-۲-۲- مخلوط واکنش

مخلوط سوپسترا شامل مخلوط ۱۰ میلی لیتر گایاکول ۱٪، ۱۰ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۳٪ و ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات سدیم بود که pH مخلوط واکنش روی ۶/۵ تنظیم شد [۱۴].

۲-۲-۳- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی، ۲/۸۷ میلی لیتر مخلوط سوپسترا، ۰/۱ میلی لیتر عصاره خام سیب درختی و ۰/۳ میلی لیتر آب مقطر که جمعاً ۳ میلی لیتر بود به کاوت^۲ منتقل و جذب نمونه‌ها به صورت سینتیکی در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد [۱۴]. به منظور بررسی تأثیر اسانس‌های گیاهی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۰/۳ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی مورد استفاده، به جای ۰/۳ میلی لیتر آب مقطر به کاوت اضافه و فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. برای ارزیابی اثر اسانس‌ها در کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به نمونه شاهد از رابطه (۱) استفاده شد.

$$Ab = \frac{(Ab-As) \times 100}{As}$$

که Ab جذب نمونه شاهد (بدون اسانس) و As جذب نمونه‌های دارای اسانس می‌باشد.

اسانس‌های مورد مطالعه می‌باشد. در حقیقت اسانس‌ها با ترکیب شدن با اکسیژن مورد نیاز برای اکسیداسیون ترکیبات فنولی (گایاکول) را و حذف کرده و مانع ایجاد رنگ قهوه‌ای می‌شوند [۱۲]. همچنین تأثیر اسانس‌های گلپر، آویشن و میخک بر کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز کرفس توسط دارائی و همکاران (۲۰۱۷) گزارش شد. آن‌ها بیشترین اثر بازدارندگی آنزیم پراکسیداز را در غلظت‌های بالای اسانس گلپر گزارش نمودند [۱۳]. اسانس میخک دارای ترکیبات فراری نظیر اوژنول، کاربوفیلین، الکل بنزیلیک، بنزوات دو متیل، فورفول و اتیلن می‌باشد که اوژنول ماده اصلی میخک می‌باشد. ماده مؤثره زیره آلدئیدی بنام کومینول است که حدود ۳۰-۵۰ درصد ترکیبات فرار آن را تشکیل می‌دهد. اسانس دانه رازیانه دارای ترکیبات غالبی نظیر بتا- میرسن، آلفا، فلاندورن، لیمونن، آلفا- پینن از بین ۴۰ ترکیب شناسایی شده است. عمده خواص میکروبی و آنتی اکسیدانی اسانس‌ها را به ترکیبات غالب موجود در آن‌ها نسبت می‌دهند. با توجه به مطالب قید شده، این مطالعه به منظور بررسی کارایی اسانس‌های میخک، زیره و رازیانه به عنوان آنتی اکسیدان‌های طبیعی در کاهش فعالیت یا غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز که پیش ساز سنتز اتیلن و تأمین کننده اکسیژن مورد نیاز برای فعالیت آنزیم‌های مسئول قهوه‌ای شدن آنزیمی (پلی فنول اکسیدازها) است انجام شد. همچنین در این مطالعه شرایط غیر فعال سازی غیر حرارتی جهت دستیابی به غلظت مناسب اسانس و زمان فعالیت آنزیمی با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه سازی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده

۲-۱-۱- میوه

در این تحقیق سیب درختی رقم گلدن دلشیز^۱ که فعالیت آنزیمی بالایی دارد و به سرعت پس از برش قهوه‌ای می‌شود به عنوان منبع آنزیمی انتخاب و از بازار میوه و سبزی شهرستان تویسرکان (ایران) تهیه شد.

۲-۱-۲- اسانس‌های مورد استفاده

اسانس‌های میخک، زیره و رازیانه به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی از شرکت باریج اسانس تهیه و با استفاده از توین ۸۰ در غلظت‌های

۳-۲- تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel (۲۰۰۷) استفاده شد. با توجه به اینکه فعالیت آنزیم ها (مصرف سوپسترا و تولید فرآورده) به صورت سینتیکی می باشد، برای بررسی تأثیر اسانس های مورد مطالعه در کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی، منحنی های فعالیت آنزیم پراکسیداز به صورت سینتیکی رسم و با نمونه شاهد (بدون اسانس) مقایسه شدند. برای بررسی تفاوت معنی داری بین تیمارها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۰.۰۵٪ استفاده شد ($p < 0.05$).

۴-۲- آزمایشات بهینه سازی

بهینه سازی فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تأثیر اسانس های گیاهی با استفاده از روش سطح پاسخ و با نرم افزار Design Expert 6.0.2 انجام گرفت. به این منظور طرح مرکب مرکزی (4^{CCD}) با ۳ سطح و ۵ تکرار در نقطه مرکزی برای بررسی اثر اسانس های مختلف بر غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت ($+1, 0, -1$) (جدول ۱).

Table 1 Independent variables and their applied levels for optimizing peroxidase enzyme activity in apple fruit under effect of different essential oils

Independent variables	Variables level		
	-1	0	+1
The time of enzyme activity (second)	40	220	400
Essential oil concentration (ppm)	0	100	200

محدوده ی متغیرهای مستقل زمان فعالیت آنزیمی (X_1)، غلظت اسانس های مورد استفاده (X_2) از آزمون های اولیه استنتاج گردید. تیمارهای آزمایشی به منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش بینی نشده در پاسخ های مشاهده شده به صورت تصادفی درآمدند. مدل های رگرسیونی چند جمله ای درجه ی اول و درجه دوم به منظور پیش بینی پاسخ، در نظر گرفته شد. مدل پیشنهادی برای پاسخ به صورت معادله (۲) است.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

3. Design Expert, 6.0.2 Trial, Stat-Ease Inc.
4. Central Composite Design

که در معادله (۲)، Y متغیر وابسته یا پاسخ (فعالیت آنزیم پراکسیداز) می باشد، β_0 ضریب ثابت مدل و β_i و β_{ii} و β_{ij} ضرایب ثابت برای متغیرهای مستقل X_1 ، X_2 (غلظت اسانس و زمان فعالیت آنزیمی) و اثرات متقابل آن ها ($X_1 X_2$) هستند که به ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه ی دوم و متقابل متغیرهای X_1 ، X_2 روی فعالیت آنزیم پراکسیداز (پاسخ) می باشند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تأثیر اسانس های میخک، رازیانه و زیره بر

غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز سیب درختی

فعالیت آنزیم پراکسیداز در سیب درختی تحت تأثیر غلظت های مختلف اسانس های میخک، زیره و رازیانه به ترتیب در شکل های ۱ (a)، ۱ (b) و ۱ (c) نشان داده شده است.

از آنجا که شیب منحنی جذب بیانگر فعالیت آنزیم می باشد و مقدار فعالیت از محاسبه شیب منحنی محاسبه می شود بنابراین به طوری که در شکل ۱ ملاحظه می شود تمام منحنی های فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تأثیر اسانس های مورد مطالعه با غلظت های مشخص شیب کمتری نسبت به منحنی های فعالیت آنزیم پراکسیداز اولیه سیب درختی داشته که بیانگر کاهش معنی دار فعالیت آنزیم پراکسیداز می باشد. همان طور که از شکل ۱ (a)، ملاحظه می شود به کار بردن اسانس میخک خالص و غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ ppm اسانس میخک باعث کاهش ۶۶/۶۷ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه سیب درختی شده است. همچنین استفاده از غلظت های ۵۰ و ۲۰۰ ppm اسانس میخک به ترتیب باعث کاهش ۴۸/۱۵ و ۶۲/۹۷ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه سیب درختی شده است. همان طور که در شکل ۱ (b) مشاهده می شود اسانس زیره در کلیه غلظت های مورد استفاده منجر به کاهش ۶۶/۶۷ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه سیب درختی شده است. همچنین استفاده از غلظت های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ ppm اسانس رازیانه باعث کاهش ۶۲/۹۷ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه سیب درختی شده است در حالیکه با افزایش غلظت رازیانه اثر ممانعت کنندگی از فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش می یابد به طوری که استفاده از اسانس خالص رازیانه و غلظت ۲۰۰ ppm آن به ترتیب باعث کاهش ۱۸/۵۲ و ۵۵/۵۶ درصدی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه سیب درختی شده است. تفاوت در میزان تأثیر اسانس های مختلف بر فعالیت آنزیم

مختلف متفاوت است. نتایج تحقیق محسنی و همکاران (۲۰۱۸) موید رفتار متفاوت این آنزیم به یک تیمار (اسانس آویشن) بر اساس نوع منبع آنزیمی بود. به طوری که اسانس آویشن موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ترب سیاه شده بود اما باعث تشدید فعالیت این آنزیم در لوبیا سبز شده بود [۱۰]. در حقیقت می‌توان بیان نمود که علاوه بر تفاوت نوع آنزیم در دو سبزی مورد مطالعه ممکن است عوامل ممانعت کننده دیگری در لوبیا سبز وجود داشته باشد که با اسانس آویشن واکنش داده و اثر آن را بر آنزیم پراکسیداز کاهش داده باشد یا حتی موجب تجزیه اسانس به ترکیبات فنولی فعال دیگر شده باشد که در واکنش با آب اکسیژنه شبیه نقش گایاکول را ایفا نموده و میزان فعالیت آنزیم را بیشتر نشان دهند [۱۶-۱۱].

اساس آزمون ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز به این صورت است که آب اکسیژنه در حضور آنزیم پراکسیداز به آب و اکسیژن تبدیل شده که این اکسیژن با ترکیبات فنولی (گایاکول) واکنش داده و موجب بروز رنگ قهوه‌ای می‌شود و هرچه فعالیت آنزیم بیشتر باشد میزان اکسیژن بیشتری به دنبال آن شدت رنگ بالاتری ایجاد می‌شود و این امر موجب افزایش عدد جذب اسپکتروفتومتری خواهد شد. ترکیبات فنولی موجود در بافت میوه‌ها و گیاهان و یا موجود در اسانس‌ها نیز می‌توانند در اثر واکنش با اکسیژن و تحت تأثیر آنزیم‌های فنولازی موجب ایجاد رنگ قهوه‌ای شوند. پیش فرض این تحقیق بر این اصل است که اسانس‌ها حاوی ترکیبات مختلفی هستند که می‌توانند با اکسیژن ایجاد شده توسط آنزیم پراکسیداز واکنش داده و با حذف اکسیژن مورد نیاز برای آنزیم‌های فنولازی مانع تشکیل کمپلکس‌های رنگی طی واکنش قهوه‌ای شدن آنزیمی شوند هرچند که با توجه به ماهیت متغیر آنزیم پراکسیداز (بیش از ۱۰۰۰ ایزو آنزیم) همیشه این فرض صادق نبوده و استفاده از برخی اسانس‌ها در سبزیجات و میوه‌های مختلف حتی موجب تشدید فعالیت آنزیم پراکسیداز و افزایش تشکیل کمپلکس رنگی نیز شده است که این امر به علت ترکیب شدن مواد فنولی اسانس با آب اکسیژنه و ایجاد رنگ قهوه‌ای باشد که باعث افزایش جذب شده است که در مطالعه محسنی و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده شد که اسانس آویشن نه تنها نتوانسته است فعالیت آنزیم پراکسیداز در

پراکسیداز در منابع گیاهی مختلف می‌تواند به دلیل متفاوت بودن ساختار آنزیم پراکسیداز در منابع گیاهی مختلف باشد.

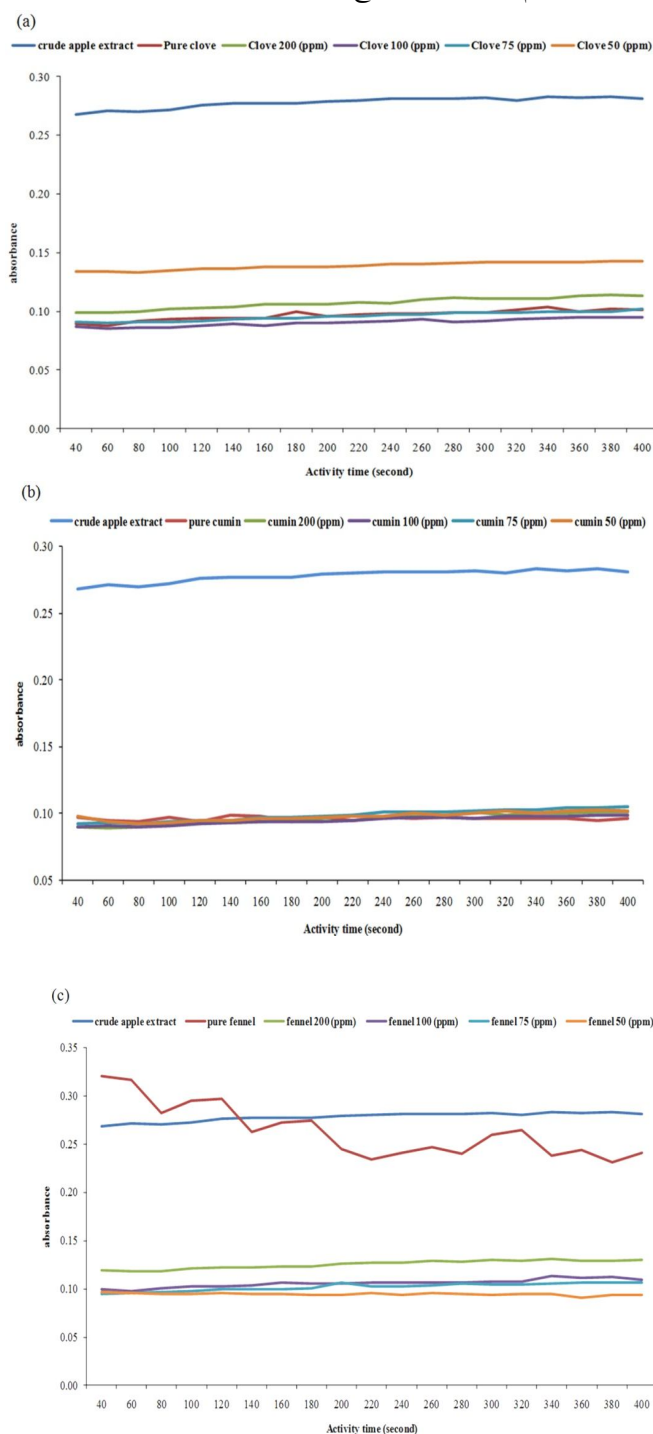


Fig 1 Effect of a) Clove b) Cumin and c) fennel essential oils on peroxidase enzyme activity in apple fruit

از آنجا که آنزیم پراکسیداز دارای ایزو آنزیم‌های مختلفی (بیش از ۱۰۰۰ ایزو آنزیم) است که با یکدیگر تفاوت‌های اساسی دارند؛ بر این اساس مقدار فعالیت و نیز حساسیت این آنزیم به عوامل

که در معادلات فوق X_1 و X_2 به ترتیب غلظت اسانس و زمان فعالیت آنزیمی می باشند.

معادله ۳ تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی تحت تأثیر اسانس میخک را نشان می دهد. همان طور که ملاحظه می شود این معادله به صورت درجه اول و خطی می باشد. در بررسی تأثیر اسانس زیره بر فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی، آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله ای درجه ی دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می باشد. ضریب همبستگی بالا ($R^2 = 0.9997$) موید این است که مدل رگرسیون، واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۹/۹۷ درصد از کل تغییرات در دامنه ی مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. مقادیر R^2 واقعی و R^2 تعدیل شده^۵ به ترتیب ۰/۹۹۹۷ و ۰/۹۹۹۶ به دست آمدند، نیز بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده ها هستند (معادله ۴). همچنین آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله ای درجه ی دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص به منظور پیش بینی تأثیر اسانس رازیانه بر فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی می باشد. ضریب همبستگی بالا ($R^2 = 0.9997$) موید برازش ۹۹/۹۷ درصدی از کل تغییرات در دامنه ی مقادیر مورد مطالعه توسط مدل رگرسیونی ایجاد شده می باشد. در معادله ۴، مقادیر R^2 واقعی و R^2 تعدیل شده^۶ به ترتیب ۰/۹۹۹۷ و ۰/۹۹۹۵ به دست آمدند که بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده ها می باشند. مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش^۷ مورد بررسی قرار گرفت که برای $P > 0.05$ معنی دار نبود. فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل (معادله ۵) معنی دار نبود ($P > 0.05$) و مدل بر اساس فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی (تحت تأثیر اسانس رازیانه) برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده توانسته است که تغییرات در داده ها را به اندازه کافی توضیح دهد [۱۲]، لذا این مدل جهت پیش بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود (معادله ۵).

لوبیا سبز را مهار کند بلکه خود به عنوان عامل تشدید کننده و ترکیب فنولی فعال با اکسیژن حاصل از تأثیر آنزیم بر آب اکسیژنه واکنش داده و شدت تشکیل رنگ را افزایش داده است [۱۰]. نتایج دارائی گرمه خانی و همکاران (۲۰۱۰ و ۲۰۱۷)، شهابی قهفرخی و همکاران (۲۰۱۳) و نیز محسنی و همکاران (۲۰۱۵) نیز موید تفاوت تأثیر اسانس های مختلف روی منابع آنزیمی مختلف بود [۱۵-۱۲].

۳-۲- بهینه سازی تأثیر اسانس های میخک، رازیانه

و زیره بر غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز سیب

درختی

در جدول ۲ طرح آزمایشی با سطوح واقعی متغیرهای مستقل و نتایج فعالیت آنزیم پراکسیداز (جذب اسپکتروفتومتر) مربوط به تأثیر هر اسانس بر فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی به همراه نتایج پیش بینی شده توسط معادلات ارائه شده توسط روش سطح پاسخ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) داده های آزمایشی مربوط به فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تأثیر اسانس های میخک، زیره و رازیانه به منظور انطباق مدل ریاضی و تعیین ضرایب رگرسیونی و معنی داری ضرایب به ترتیب در جدول ۳ ارائه شده اند. ضرایب رگرسیون چندگانه از طریق روش حداقل مربعات به منظور پیش بینی مدل چند جمله ای درجه دوم برای متغیر پاسخ ایجاد شد و با توجه به معنی داری ضرایب (جدول ۳)، معادلات Y_3 ، Y_4 و Y_5 به ترتیب برای فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی تحت تأثیر اسانس های میخک، زیره و رازیانه ارائه گردید:

(۳)

$$Y_3 = +0.20 - (0.085) \times X_1 + (5.833 \times 10^{-3}) \times X_2$$

(۴)

$$Y_4 = +0.095 - (0.09) \times X_1 + (5.5 \times 10^{-3}) \times X_2 + (0.093) X_1^2 - (2.33 \times 10^{-3}) \times X_2^2 - (5 \times 10^{-4}) \times X_1 X_2$$

(۵)

$$Y_5 = +0.11 - (0.076) \times X_1 + (5.5 \times 10^{-3}) \times X_2 + (0.097) X_1^2 - (2.5 \times 10^{-3}) \times X_2^2 - (5 \times 10^{-4}) \times X_1 X_2$$

5. Adjusted R-Squared

6. Adjusted R-Squared

7.. Lack of fit

Table 2 Central composite design, Actual levels of independent variables and peroxidase activity of crude extracts of apple fruit under effect of different essential oils.

Independent variables			Actual dependent variable (Response)			Predicted dependent variable (Response)		
Treatment number	Essential oil Concentration (ppm) (X1)	The time of enzyme Activity (second) (X2)	Enzyme activity (Absorbance)			Enzyme activity (Absorbance)		
			Clove essential oil	Cumin essential oil	Fennel essential oil	Clove essential oil	Cumin essential oil	Fennel essential oil
1	100	220	0.268	0.268	0.268	0.278	0.270	0.270
2	100	40	0.099	0.090	0.119	0.108	0.091	0.120
3	100	220	0.281	0.281	0.281	0.290	0.282	0.282
4	100	220	0.113	0.101	0.130	0.120	0.101	0.130
5	0	40	0.280	0.280	0.280	0.284	0.278	0.278
6	100	220	0.108	0.099	0.127	0.114	0.098	0.127
7	200	220	0.087	0.090	0.100	0.193	0.088	0.098
8	200	40	0.095	0.099	0.109	0.205	0.099	0.109
9	200	400	0.093	0.095	0.104	0.199	0.095	0.106
10	0	400	0.092	0.096	0.105	0.199	0.095	0.106
11	100	220	0.091	0.095	0.106	0.199	0.095	0.106
12	0	220	0.890	0.094	0.107	0.199	0.095	0.106
13	100	400	0.089	0.094	0.106	0.199	0.095	0.106

Table 3 Analysis variance of regression coefficients of predicted quadratic polynomial models for predicting peroxidase enzyme activity in apple fruit under effect of different essential oils.

Essential oil	Source	DF	Sum of squares	Mean of squares	F-Value	p-Value	Coefficient
Clove	Model	2	0.043	0.022	0.40	0.6830	0.20 ^{ns}
	X1	1	0.043	0.043	0.79	0.3954	-0.085 ^{ns}
	X2	1	0.0002043	0.0002043	0.003728	0.9525	0.005833 ^{ns}
	Residual	10	0.55	0.55	-	-	-
	Lack of fit	6	0.037	0.006203	0.049	0.9988	^{ns}
	Pure error	4	0.51	0.13	-	-	-
	Total	12	0.59	-	-	-	-
Cumin	Model	5	0.076	0.015	5501.36	< 0.0001	0.095 ^{**}
	X1	1	0.048	0.048	17562.76	< 0.0001	-0.090 ^{**}
	X2	1	0.0001815	0.0001815	65.83	< 0.0001	0.0055 ^{**}
	X1 × X1	1	0.024	0.024	8603.52	< 0.0001	0.093 ^{**}
	X2 × X2	1	0.00001496	0.00001496	5.43	0.0526	-0.00233 ^{ns}
	X1 × X2	1	0.000001	0.000001	0.36	0.5660	-0.0005 ^{ns}
	Residual	7	0.0000193	0.000002757	-	-	-
	Lack of fit	3	0.0000165	0.0000054996	7.86	0.0375	*
	Pure error	4	0.0000028	0.0000007	-	-	-
	Total	12	0.076	-	-	-	-
Fennel	Model	5	0.0638961	0.012779215	5262.03	< 0.0001	0.11 ^{**}
	X1	1	0.0342015	0.0342015	14082.97	< 0.0001	-0.076 ^{**}
	X2	1	0.0001815	0.0001815	74.73529	< 0.0001	0.0055 ^{**}
	X1 × X1	1	0.0257195	0.025719548	10590.4	< 0.0001	0.097 ^{**}
	X2 × X2	1	0.00001726	0.0000172619	7.107843	0.0322	-0.0025 [*]
	X1 × X2	1	0.000001	0.000001	0.411765	0.5415	-0.0005 ^{ns}
	Residual	7	0.000017	0.00000242857	-	-	-
	Lack of fit	3	0.0000118	3.93333E-06	3.025641	0.1564	^{ns}
	Pure error	4	0.0000052	0.0000013	-	-	-
	Total	12	0.0639131	-	-	-	-

** significant at 1%, * significant at 5%, ^{ns} non significant

شکل ۲ منحنی های سه بعدی تأثیر هم زمان غلظت اسانس های مختلف و زمان فعالیت آنزیمی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی را نشان می دهد. همان طور که در بخش (a) شکل ۲ مشخص است با افزایش زمان فعالیت آنزیمی، فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ثابت از اسانس میخک، افزایش می یابد که نتایج مربوط به ارتباط افزایش فعالیت آنزیمی با افزایش زمان واکنش آنزیمی، بیانگر افزایش دسترسی آنزیم به سوبسترا بوده که در تحقیقات سایر محققین نیز ثابت شده است. به گونه ای که در بالاترین زمان فعالیت آنزیمی انتخاب شده بیشترین فعالیت آنزیمی (جذب) مشاهده می گردد. با افزایش زمان فعالیت آنزیمی از شدت و نرخ فعالیت آنزیمی (جذب) کاسته می شود که این کاهش می تواند به علت کم شدن سوبسترای در دسترس آنزیم و کم شدن فعالیت اکسیداتیو آنزیم باشد؛ از سوی دیگر تشکیل ترکیبات ممانعت کننده، از فعالیت آنزیمی نیز می تواند در این مورد اثرگذار باشد [۱۷-۱۸]. همان طور که مشاهده می شود افزایش غلظت اسانس میخک منجر به کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز می شود (شکل ۱) که با نتایج کاشانی نژاد و دارائی گرمه خانی (۲۰۱۳) مطابقت داشت. در زمان های فعالیت آنزیمی طولانی تر و غلظت های بالاتر اسانس، به دلیل ترکیب شدن اسانس با اکسیژن محیط از واکنش قهوه ای شدن آنزیمی ممانعت شده و در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز کنترل می شود [۱۶].

بخش های (b) و (c) شکل ۲ به ترتیب تأثیر اسانس زیره و رازیانه بر فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی نشان را نشان می دهند. همان طور که ملاحظه می شود با افزایش غلظت اسانس های زیره و رازیانه تا حدود ۱۰۰ ppm میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش شدیدی را نشان می دهد و سپس با افزایش غلظت این اسانس ها تا حدود ۲۰۰ ppm شیب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز ثابت می شود. همچنین با افزایش زمان فعالیت آنزیمی، فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ثابت از اسانس میخک، افزایش می یابد هر چند که در انتهای زمان فعالیت آنزیمی میزان فعالیت روند افزایشی آهسته و تقریباً ثابتی را نشان می دهد که می تواند به علت کم شدن سوبسترای در دسترس آنزیم و کم شدن فعالیت اکسیداتیو آنزیم باشد؛ از سوی دیگر تشکیل ترکیبات ممانعت کننده، از فعالیت آنزیمی نیز می تواند در این مورد اثرگذار باشد [۱۷-۱۸]. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش زمان فعالیت آنزیمی، در تحقیقات مختلفی نظیر دارائی گرمه خانی و همکاران (۲۰۱۰) و (۲۰۱۷)، شهابی قهفرخی و همکاران (۲۰۱۳) و محسنی و همکاران (۲۰۱۵ و ۲۰۱۸) نیز ثابت شده است [۱۴-۱۰]. کاشانی نژاد و

دارائی (۲۰۱۳) نیز در تحقیقی بیان داشتند که اسانس ها با ترکیب شدن با اکسیژن محیط مانع از قهوه ای شدن آنزیمی شده و در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز را تحت کنترل قرار می دهند که با بخشی از نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت [۱۶]. نتایج تحقیقات سایر محققین نیز ارتباط فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس های گیاهی و ممانعت کنندگی فعالیت آنزیم پراکسیداز در سبزیجات مختلف تحت تأثیر اسانس های گیاهی را نشان می دهد که موید نتایج تحقیق حاضر می باشند [۱۲ و ۱۵]. با افزایش مدت زمان فعالیت آنزیمی خصوصاً هر چه به انتهای واکنش نزدیک شویم، شدت و نرخ فعالیت آنزیمی (جذب) کاهش می یابد؛ که می تواند به علت کم شدن سوبسترای در دسترس آنزیم و کم شدن فعالیت اکسیداتیو آنزیم باشد؛ از سوی دیگر تشکیل ترکیبات ممانعت کننده از فعالیت آنزیمی نیز می تواند در این مورد موثر باشد [۱۲ و ۱۵]. اسانس ها با ترکیب شدن با اکسیژن محیط مانع واکنش قهوه ای شدن آنزیمی شده و در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز را کنترل می کنند که با مطالب این پژوهش منطبق می باشد [۱۶]. دارائی گرمه خانی و همکاران (۲۰۱۰) بیان داشتند که در اسانس رازیانه، افزایش زمان فعالیت و افزایش غلظت اسانس منجر به افزایش شدید فعالیت آنزیم پراکسیداز در کلم سفید و کلم قرمز شد در حالی که در اسانس میخک عکس این حالت مشاهده گردید و افزایش غلظت اسانس میخک اثر بازدارندگی بالاتری داشت. آن ها نتیجه گیری کردند که قدرت آنتی اکسیدانی و مهار کنندگی اکسیژن، اسانس میخک به مراتب بالاتر از اسانس رازیانه است [۱۵]. در این پژوهش نیز هر سه اسانس مورد استفاده به نحو عالی موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز شدند که بیانگر کاهش سوبسترای مصرفی و یا کاهش اکسیژن مورد نیاز آنزیم برای ایجاد رنگ قهوه ای می باشد که نشان دهنده توانایی این اسانس ها در واکنش با اکسیژن محیط و ممانعت از واکنش آنزیم پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز (قهوه ای شدن آنزیمی) می باشد. نتایج سایر محققین نیز بیانگر تأثیر مثبت اسانس میخک در ممانعت از فعالیت آنزیم پراکسیداز در سبزیجات مورد مطالعه (کلم سفید و کلم قرمز) بود و اثر ممانعت کنندگی اسانس با افزایش غلظت اسانس تشدید می شد [۱۵]. در لوبیا سبز با افزایش زمان فعالیت آنزیمی، شدت و نرخ فعالیت آنزیمی (جذب) افزایش می یابد که این افزایش می تواند به علت افزایش سوبسترای در دسترس آنزیم و کم شدن اثر بازدارندگی آنزیم در غلظت های متفاوت اسانس آویشن باشد [۱۲ و ۱۵].

شکل ۳ شرایط تعیین شده برای متغیرهای مستقل (جهت بهینه سازی تأثیر اسانس های مختلف بر فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی) و شرایط بهینه شده را نشان می دهد.

در فرآیند بهینه‌سازی به تمامی پارامترهای مستقل وزن و اهمیت یکسان داده شد. با توجه به شرایط مورد نظر راه حل‌های پیش‌بینی شده که بر اساس بالاترین مطلوبیت برای هر اسانس در شکل ۳ ارائه شده است و هرچه مطلوبیت به ۱ نزدیک‌تر باشد مناسب‌ترین و بهترین شرایط خواهد بود که راه حل اول به عنوان بهترین شرایط جهت دستیابی به شرایط بهینه در نظر گرفته شد و با اعمال شرایط فرآیند بدست آمده در بهینه‌سازی کم‌ترین مقدار فعالیت آنزیمی تحت تأثیر هر کدام از اسانس‌های مورد مطالعه بدست خواهد آمد.

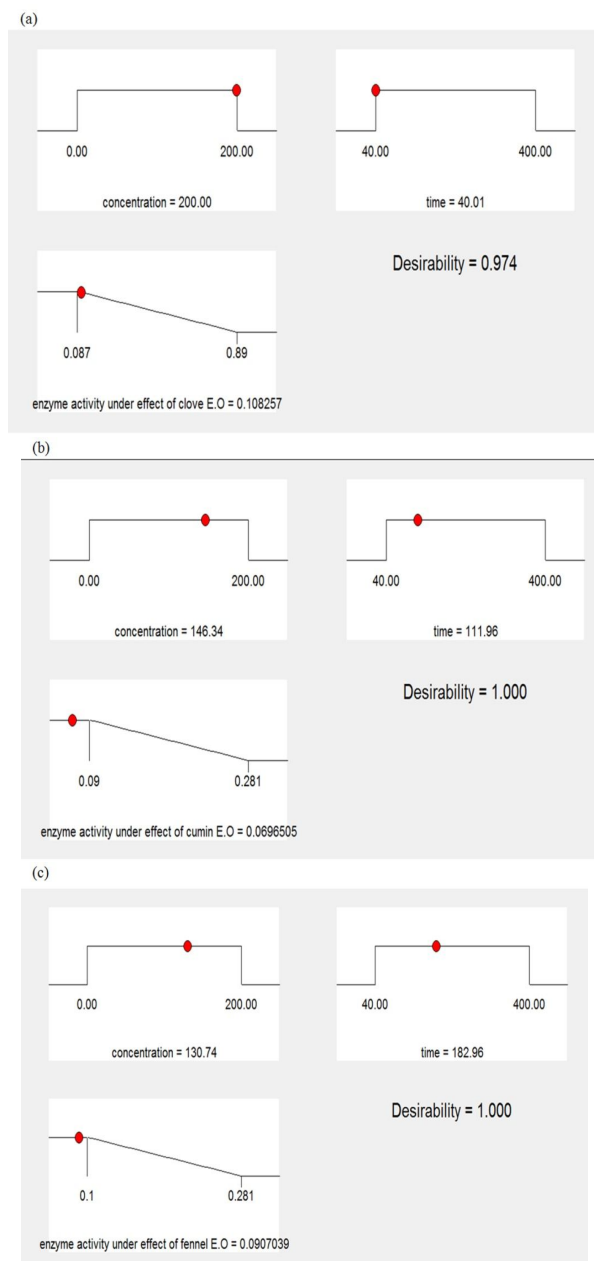


Fig 3 The optimum conditions for inactivation of peroxidase enzyme activity in apple fruit under simultaneous effect of different concentration of a) Clove b) Cumin and c) fennel essential oils and enzyme activity time

در این شکل‌ها متغیرهای مستقل (غلظت اسانس و زمان فعالیت آنزیمی) در محدوده آزمایشات انجام شده در نظر گرفته شده است در حالیکه فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان هدف فرآیند، حداقل در نظر گرفته شده است.

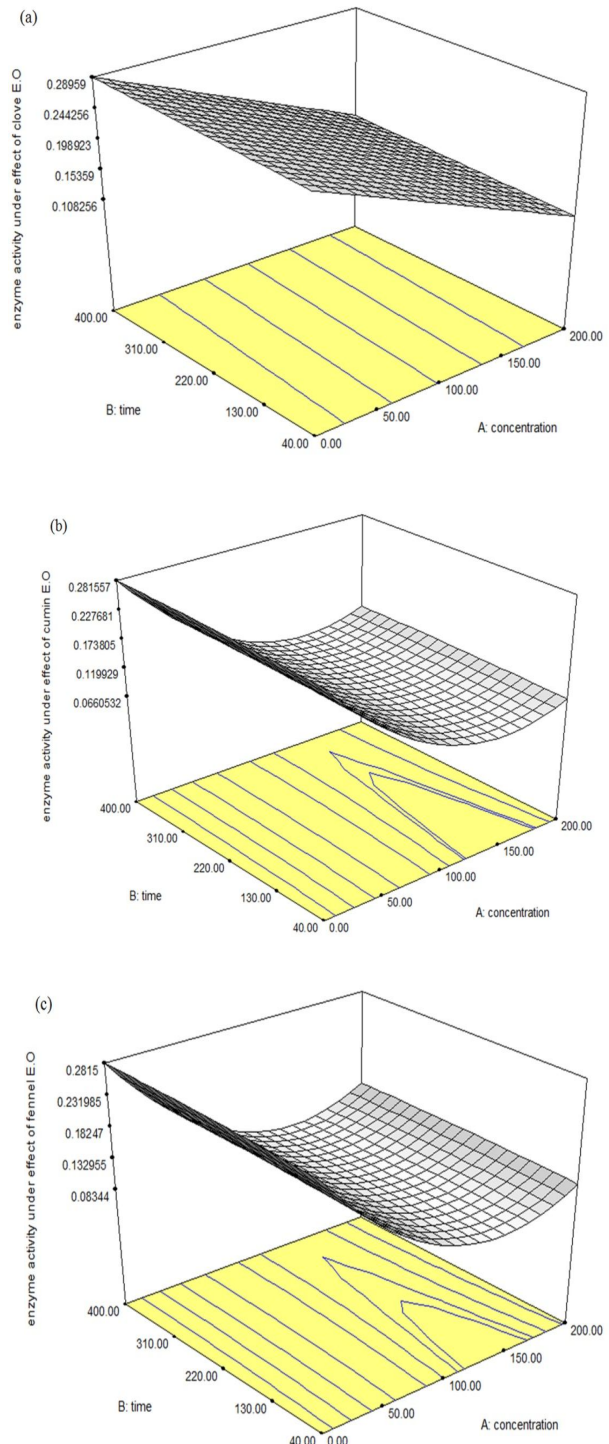


Fig 2 3D surface of the simultaneous effect of different concentration of a) Clove b) Cumin and c) fennel essential oils and enzyme activity time on peroxidase enzyme activity in apple fruit

- [2] Holley, R. A., and Patel, D. 2005. Improvement in shelf- life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22: 273-292.
- [3] Maskoki, A. M. 1998. The technology of essential oils and medicinal products production from medical herbs. Reported research at Iranian Research Organization for Science and Technology, Mashhad Unit (in Persian).
- [4] Boyraz, N, and Ozcan, M. 2005. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 1: 1-5.
- [5] Lanciotti, R, Gianotti, A, Patrignani, F, Belletti, N, Gverzoni, M E, and Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compound to improve shelf life and safety of minimally processed fruit. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 201-208.
- [6] Shahedi, M., and Kadivar, M. 1995. Principle of fruit and vegetables preservation. 1th ed, Shahr Kord University press, 318 pp.
- [7] Fatemi, H. 2014. Principle of fruit and vegetables preservation. 12th ed, Sahami enteshar press, 480 pp.
- [8] Sahari, M. A. 2002. Chemistry of bronian reaction in foods. 1th ed, Andishmand press, 128 pp.
- [9] Ponec, AG, Del Valle, CE, and Roura, SI. 2004. Natural essential oil as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetable. *LWT*, 37: 199-204.
- [10] Mohseni, M., Daraei Garmakhany, A., and Mohamadi Sani, A. 2018. Study of the effect of thyme essential oil on the reduction of peroxidase enzyme activity in black Spanish radish and green bean. *Food Science and Technology*, 15 (82): 63-71.
- [11] Mohseni, M, Mohamadi Sani, and A, Daraei Garmakhani, A. 2015. An investigation on the effects of clove essence on deactivation of horseradish peroxidase. *International journal of biology, pharmacy and allied science (IJBPAS)*, 4(7): 4891-4897.
- [12] Shahabi Ghahfarrokhi, I., Daraei Garmakhany, A, Kashaninejad, M, and Dehghani, A. A. 2013. Estimation of Peroxidase Activity in red cabbage by Artificial Neural Network (ANN). *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 5(2): 163-167.
- [13] Daraei Garmakhany A, Aghajani N, Gohari Ardabili A. Optimization of Non-thermal

شرایط بهینه برای غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز با استفاده از اسانس‌های میخک، زیره و رازیانه شامل استفاده از غلظت ppm ۲۰۰ اسانس میخک و زمان فعالیت آنزیمی ۴۰ ثانیه، غلظت ppm ۱۴۶ اسانس زیره و زمان فعالیت آنزیمی ۱۱۲ ثانیه و استفاده از غلظت ppm ۱۳۰ اسانس رازیانه و زمان فعالیت آنزیمی ۴۰ ثانیه بود که با اعمال این شرایط کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (جذب) برای اسانس‌های میخک، زیره و رازیانه به ترتیب ۰/۱۰۸، ۰/۰۷ و ۰/۰۹ می‌باشد (شکل ۳).

۴- نتیجه گیری کلی

فعالیت آنزیم‌ها می‌تواند باعث تغییرات رنگ، طعم، نرم شدن و از دست رفتن ارزش غذایی محصولات کشاورزی شود. قهوه‌ای شدن آنزیمی در میوه‌ها و سبزیجات اغلب در اثر فعالیت دو آنزیم پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز حاصل می‌شود که علاوه بر قهوه‌ای شدن و تغییر رنگ محصول، باعث کاهش طعم و خسارات تغذیه‌ای نیز می‌شوند. با توجه به نقش اکسیژن در فعالیت این دو آنزیم، استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان می‌تواند باعث مهار فعالیت این آنزیم‌ها شوند؛ بنابراین در این تحقیق از اسانس‌های گیاهی به عنوان آنتی اکسیدان‌های طبیعی برای غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز استفاده شد. نتایج این تحقیق بیانگر قابلیت بالای اسانس‌های میخک، زیره و رازیانه در غلظت‌های مورد مطالعه (۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ppm ۲۰۰ و خالص آن‌ها) در مهار و غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز سیب درختی بود به طوری که استفاده از این اسانس‌ها باعث کاهش ۶۶/۶۷ فعالیت آنزیم پراکسیداز سیب درختی شده بود. نتایج بهینه سازی نشان داد که شرایط بهینه برای غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز با استفاده از اسانس‌های میخک، زیره و رازیانه شامل استفاده از غلظت ppm ۲۰۰ اسانس میخک و زمان فعالیت ۴۰ ثانیه، غلظت ppm ۱۴۶ اسانس زیره و زمان فعالیت ۱۱۲ ثانیه و استفاده از غلظت ppm ۱۳۰ اسانس رازیانه و زمان فعالیت ۴۰ ثانیه بود که با اعمال این شرایط کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (جذب) برای اسانس‌های میخک، زیره و رازیانه به ترتیب ۰/۱۰۸، ۰/۰۷ و ۰/۰۹ می‌باشد.

۵- منابع

- [1] Rahemi, M. 2005. Post harvest physiology. an introduction to the physiology handling of fruit regetables arnamentals, 4th ed, Shiraz University press, 437 pp.

- [16] Kashaninejad, M, and Daraei Garmakhany, A. 2013. Application of essential oils as natural antioxidant in reduction of peroxidase enzyme activity. Reported research at Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, (in Persian).
- [17] Nikos Gand Tzortzakakis, A. 2007. Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 11-116.
- [18] Ercan, S. S, and Soysal, C. 2011. Effect of ultrasound and temperature on tomato peroxidase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 689-695.
- Inactivation of Celery's Peroxidase Enzyme by the Use of Response Surface Methodology. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2017; 12 (1) :99-108
- [14] Hemeda, HM, and Klein, BP. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Journal of Food Science*, 55: 184-186.
- [15] Daraei Garmakhany, A, Mirzai, HO, Aghajani, N, and kashiri, M. 2010. Investigation of natural essential oil antioxidant activity on peroxidase enzyme in selected vegetable. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 4 (3): 78-84.



Scientific Research

Response surface optimization of the effect of natural essential oils from clove, cumin and fennel in golden delicious apple fruit peroxidase inactivation

Daraei Garmakhany, A.^{1*}, Aghajani, N.²

1. Assistant Prof. Department of Food Science and Technology, Toyserkan Faculty of Engineering and natural resources, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran.

2. Assistant Prof. Department of Food Science and Technology, Bahar Faculty of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received 05 August 2020 Accepted 01 November 2020 Keywords: Apple fruit, Natural essential oils, Peroxidase enzyme, Response surface method. DOI: 10.52547/fsct.18.02.07 *Corresponding Author E-Mail: amirdaraey@basu.ac.ir	Fruits and vegetables are perishable products due to their high water content and high enzymatic activity, and large amounts of them are deteriorated each year before consumption. Different methods such as the use of heat or chemical preservatives are common to reduce food waste, but increasing consumer demand for fresh or minimal processed foods has led to increased research for finding alternative preservation methods. In this study, the ability of clove, cumin and fennel essential oils (concentrations of 50, 75, 100 and 200 ppm) in reducing peroxidase enzyme activity (as one of the main factors of biochemical deterioration) in apple fruit was investigated. Clove essential oil in pure state and in concentrations of 100 and 75 ppm reduced 66.67% of the peroxidase enzyme activity while concentrations of 200 and 50 ppm of clove essential oil reduced 62.97 and 48.15% of the peroxidase enzyme activity in apple fruit respectively. Cumin essential oil in all applied concentrations led to a 66.67% reduction in peroxidase enzyme activity in apple fruit samples. Also, the use of concentrations of 100, 75 and 50 ppm of fennel essential oil has reduced 62.97% of peroxidase enzyme activity in apple fruit samples, while increasing the fennel essential oil concentration reduces its inhibitory effect on peroxidase enzyme activity so that the application of pure state and concentration of 200 ppm of fennel essential oil reduced 18.52 and 55.56% of peroxidase enzyme activity in apple fruit, respectively. The results of response surface optimization method showed that the lowest peroxidase enzyme activity for clove, cumin and fennel essential oils were obtained in essential oil concentration and enzyme activity time of 200 ppm and 40 seconds for clove essential oil, 146 ppm and 112 seconds for cumin and 130 ppm and 183 seconds for fennel essential oil respectively.