

مجله علوم و صنایع غذایی ایران

صاحب امتیاز	انجمن متخصصان علوم و صنایع غذایی ایران
ناشر	دانشگاه تربیت مدرس
مدیر مسئول	دکتر ایرج شریفی آل آقا
سر دبیر	دکتر محمدحسین عزیزی

هیات تحریریه (به ترتیب الفبا)

سید محمد حسینی (استادیار گروه مهندسی شیمی صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی امیر کبیر)
زهره حمیدی اصفهانی (دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس)
محمدعلی سحری (استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس)
محمد حسین عزیزی (استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس)
محمد امین محمدی فر استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه داممارک)
حسن احمدی گاولیقی (استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس)
سلیمان عباسی (دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس)
منوچهر وثوقی (استاد گروه مهندسی شیمی صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی شریف)
علی رشیدنژاد (پژوهشگر موسسه تحقیقاتی ریدت)

کارشناس اجرایی:	ندا عزیزی
ویراستار ادبی - فنی فارسی:	محمد علی سحری
ویراستار ادبی - فنی لاتین:	محمد حسین عزیزی
حروفچینی و صفحه آرایی:	ندا عزیزی
لیتوگرافی و چاپ:	مرکز نشر دانشگاهی

نشانی دفتر مجله:	تهران: گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی ۴۸۲۹۲۲۰۰-۴۸۲۹۲۳۰۰، دورنگار: ۴۴۱۸۰۵۳۹ - ۴۸۲۹۲۴۷۵، تلفن: ۳۳۶-۱۴۱۱۵
	پست الکترونیک: fsct@modares.ac.ir یا food86@gmail.com
	وب سایت: www.fsct.ir

* مقاله ها بیانگر آرا و نظریات نویسندگان بوده، صرفا سر مقاله مبین نظر هیات تحریریه است

به موجب قانون مطبوعات، وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی، پروانه انتشار این فصلنامه را به شماره ۱۲۴/۱۲۰۸۸ در تاریخ ۷۸/۹/۲ صادر کرده است.

دارای مجوز علمی - پژوهشی به شماره ۳/۲۹۱۰/۱۲۱۸ از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری می باشد.

از مولفان گرامی تقاضا می شود در ارسال مقالات به نکات زیر توجه فرمایند:

- ۱- زبان رسمی مجله فارسی است.
- ۲- مقالات باید پژوهشی و حاصل تحقیق نویسنده یا نویسندگان بوده و در مجله دیگر یا مجموعه مقالات سمینارها و مجامع علمی بصورت مقاله کامل به چاپ نرسیده یا همزمان برای سایر مجلات ارسال نشده باشد.
- ۳- مقالات قابل چاپ در مجله به دو دسته تقسیم می شوند:
(الف) مقالات کامل پژوهشی : با حداقل حجم ۳۵۰۰ کلمه و یا بیشتر از آن
(ب) یادداشتهای کوتاه پژوهشی : با حداکثر حجم ۳۵۰۰ کلمه و یا کمتر از آن
تبصره ۱: مقالات مروری از نویسندگان مجرب و صاحب مقالات پژوهشی در زمینه مورد بحث به شرطی پذیرفتنی است که منابع متناهی مستند تحقیق باشد.
تبصره ۲: مقالات ترجمه اصولاً پذیرفته نمی شود.
- ۴- مقالات ارسال شده باید دارای بخشهای زیر باشند:
(الف) صفحه اول : عنوان کامل مقاله به فارسی و انگلیسی، نام نویسنده یا نویسندگان فارسی و انگلیسی (نام نویسنده عهده دار مکاتبات با ستاره مشخص شود)، آخرین مدرک تحصیلی، رتبه علمی و نام موسسه متناظر هر یک از نویسندگان به فارسی و انگلیسی، نشانی کامل پستی، شماره تلفن، شماره دورنگار و نشانی پست الکترونیکی به فارسی و انگلیسی
(ب) صفحه دوم : عنوان کامل مقاله به فارسی، چکیده فارسی (حداکثر ۳۰۰ کلمه)، کلید واژگان فارسی (حداکثر پنج واژه)، عنوان کامل مقاله به زبان انگلیسی(حداکثر ۳۰۰ کلمه)، کلید واژگان (حداکثر پنج واژه)
(ج) صفحات بعدی : شامل مقدمه، بدنه مقاله (شامل شرح مساله، روش تحقیق، تفسیر، تحلیل، نتایج)، نتیجه گیری، سپاسگزاری، فهرست واژگان لاتین، فهرست مراجع، نسخه اصلی شکلها و جداول (در صفحات جداگانه)
تبصره ۱: اصطلاحات خارجی با معادلهای دقیق و رسا در زبان فارسی و نام کامل واژه و عبارات اختصاری بکار رفته در متن به صورت زیر نویس ارجاع شود.
تبصره ۲: محل ارجاع عکسها، جداول، شکلها و نمودارها به طور دقیق ضمن رعایت ترتیب آنها در متن معین شود. ارسال اصل تصاویر، جداول به صورت سیاه و سفید با چاپگر لیزری و با کیفیت مطلوب ضروری است.
تبصره ۳: شماره و جهت عکسها، جداول، شکلها و نمودارها با مداد نرم در پشت آنها ذکر شده و زیر نویس آنها در صفحه ای به صورت جداگانه آورده شود.
تبصره ۴: تعیین محل دقیق مراجع در متن و فهرست نمودن مراجع به ترتیب ظهور در متن مقاله ضروری است. از تکرار یک منبع در فهرست مراجع خودداری شود. (تذکر: در قسمت فهرست منابع، مراجع فارسی به زبان انگلیسی برگردان شوند.)
۵- شیوه نگارش مشخصات مراجع به شرح زیر است:
(الف) کتاب : نام خانوادگی، نام نویسنده(نویسندگان)، تاریخ انتشار، نام کتاب، نام مترجم، محل نشر، نام ناشر، شماره صفحات.
(ب) مقاله : نام خانوادگی، نام نویسنده (نویسندگان)، تاریخ انتشار، عنوان مقاله، نام نشریه، دوره (جلد)، شماره صفحات.
۶- مقالات باید در چهار نسخه (یک نسخه اصل همراه با سه نسخه تصویر) بر روی یک کاغذ A4 (۲۱×۲۹ cm) با حاشیه ۲/۵ سانتیمتر در هر طرف و رعایت دو فاصله میان سطور، ترجیحاً با قلم لوتوس نازک ۱۲ (در مقالات لاتین با تایمز ۱۰) باشد و با برنامه word 2003 حروفچینی و همراه با صرفا سی دی مقاله به دفتر مجله ارسال شود.
۷- حداکثر حجم مقاله شامل جدولها، منحنی ها و تصاویر ۲۰ صفحه است.
۸- مقالات برگرفته از رساله دانشجویان دکتری با نام استاد راهنما، مشاوران و دانشجو به صورت توأم منتشر می شود، لذا استاد راهنما و مشاوران باید مسوولیت آن را تقبل فرمایند.
۹- مسوولیت صحت و سقم مطالب بر عهده نویسنده مسئول است.
۱۰- فصلنامه حق رد یا قبول مقالات را برای خود محفوظ می دارد و از بازگرداندن مقالات دریافتی معذور است.
۱۱- پس از چاپ فصلنامه، سه نسخه از مقاله به هر یک از نویسندگان اهدا خواهد شد.
۱۲- اصل مقالات پذیرفته شده، یکماه پس از انتشار فصلنامه از مجموعه خارج خواهد شد.
۱۳- در صورتیکه مقاله ارائه شده چهارچوب مورد قبول بر اساس بندهای ۱ الی ۱۰ را بر طبق نظر هیات تحریریه داشته باشد پس از صدور گواهی رسید مقاله با توجه به مصوبه هیات تحریریه و در جهت تامین بخشی از هزینه های آماده سازی و چاپ مقاله، لازم است نویسندگان در ابتدا مبلغ ۵۰ هزار تومان برای جبران بخشی از هزینه های داوری، مکاتبات، پست و... و در صورتیکه مقاله برای چاپ پذیرفته شود به ازای هر صفحه چاپی مبلغ ۱۵ هزار تومان به حساب جاری شماره ۴۳۳۷۶۸۹۳۵ در بانک تجارت شعبه دانشگاه تربیت مدرس واریز نمایند.
این نشریه در پایگاه اطاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID) به آدرس www.sid.ir، پایگاه استنادی علوم جهان اسلام (ISC) به آدرس www.ricest.ac.ir، اسکوپوس و سایر نمایه های موجود در صفحه اصلی سایت نمایه می شود. وب سایت مجله www.fscf.ir
آدرس: تهران، پل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، صندوق پستی ۳۳۶-۱۴۱۱۵ تلفن: ۸۲۹۲۴۷۵-۰۲۱-۴۴۱۸۰۵۳۹، دورنگار: ۸۲۹۲۳۰۰-۰۲۱-۴۸۲۹۲۲۰۰ پست الکترونیک: fscf@modares.ac.ir یا food86@gmail.com

فهرست مقالات

- ۱- تعیین ضخامت بهینه و زمان بازگرمایش مواد ۱
- ۲- تبیین الگوی مصرف و ارزیابی رفتار خریداران ۱۵
- ۳- بهینه‌سازی ویژگی‌های عملکردی پایداری ۳۱
- ۴- مطالعه اثر حرارت‌دهی اهمیک و حمام آب ۵۰
- ۵- ارزیابی برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ۶۳
- ۶- بررسی اثر تیمار حرارتی فرادما (UHT) بر ۸۰
- ۷- امکان‌سنجی تولید نوشیدنی انرژی‌زا فراسودمند ۹۹
- ۸- فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی ۱۱۹
- ۹- اسانس دانه گشنیز (*Coriandrum sativum*): تعیین ترکیبات ۱۳۰
- ۱۰- ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی و اثر ضد قارچی ۱۴۴
- ۱۱- مطالعه تولید نانو الیاف کامپوزیت از ترکیبات ۱۵۵
- ۱۲- ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و پتانسیل ۱۷۲
- ۱۳- ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی مخمر ۱۸۵
- ۱۴- ارزیابی میزان آکریلامید در انواع روغن‌های ۲۰۱
- ۱۵- غربالگری فاکتورهای موثر در رشد باکتری ۲۱۳
- ۱۶- بهینه‌سازی فرایند ریزپوشانی کانتا گزانتین ۲۲۷
- ۱۷- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و حسی ماست ۲۳۸
- ۱۸- بررسی اثر آرد گندم سن‌زده و اسید آسکوربیک بر ویژگی ۲۵۴
- ۱۹- بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسید ۲۷۰
- ۲۰- تولید نوشیدنی لبنی فراسودمند سین بیوتیک بر پایه شیر، ۲۸۳



تعیین ضخامت بهینه و زمان بازگرمایش مواد غذایی پخته و خنک شده بر پایه گوشت سفید (سینه مرغ) در طول سفرهای هوایی

علیرضا اردکانی^۱، حمید توکلی پور^{۲*}، نفیسه جهان بخشیان^۳

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲-استاد تمام گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران

۳-دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۱۰	فرآیند بازگرمایش مواد غذایی برای مصرف در تهیه غذا مورد توجه ویژه ای قرار گرفته است، زیرا می تواند به طور قابل توجهی بر کیفیت و ساختار غذا تأثیر بگذارد. طبق گفته سازمان غذا و داروی ایالات متحده (۲۰۱۳)، دمای داخلی غذای بازگرمایش شده برای ایمنی باید به ۷۴ درجه سانتیگراد برسد. با توجه به زمان محدود موجود برای بازگرمایش مجدد غذا در طول پرواز توسط پرسنل خدمه پرواز، عدم رعایت این استاندارد نه تنها خطرات ایمنی را به همراه دارد بلکه کیفیت غذا و خواص حسی را نیز کاهش می دهد. این مطالعه اثرات pH، اسیدیته، میزان رطوبت، زمان و دمای بازگرمایش را بر ارزیابی حسی کباب مرغ، با تمرکز بر ضخامت های مختلف قطعه (۱.۵، ۲، و ۲.۵ سانتی متر) و دمای بازگرمایش (۱۵۰ و ۲۳۰ درجه سانتی گراد) بررسی می کند. نتایج نشان می دهد که افزایش ضخامت قطعات مرغ و دمای گرم کردن مجدد از ۱۵۰ به ۲۳۰ درجه سانتی گراد، زمان گرم کردن مجدد را افزایش داد که از حد استاندارد ۲ ساعت تجاوز نکرد. حداکثر زمان گرم کردن مجدد ثبت شده ۱۸.۵۸ دقیقه برای قطعات ۲.۵ سانتی متر ضخامت در ۱۵۰ درجه سانتی گراد بود. علاوه بر این، با افزایش ضخامت و دمای گرم کردن مجدد، رطوبت سطح کاهش می یابد که منجر به تخریب بیشتر ویژگی های طعم و مقبولیت کمتر می شود. بالاترین امتیاز ارزیابی حسی ۸.۳۸ با قطعات ۱.۵ سانتی متر ضخامت دوباره گرم شده در ۱۵۰ درجه سانتی گراد به دست آمد. قابل توجه، مقادیر pH با ضخامت افزایش یافت و در ۲.۵ سانتی متر و ۲۳۰ درجه سانتی گراد به اوج رسید، در حالی که اسیدیته کاهش یافت، که کمترین مقدار در ۲.۵ سانتی متر و ۲۳۰ درجه سانتی گراد (۱.۵۱ درصد) مشاهده شد. محتوای رطوبت متفاوت بود، با بالاترین مقدار ۳۸.۰۴٪ در ضخامت ۲.۵ سانتی متر و ۲۳۰ درجه سانتی گراد، در مقایسه با کمترین ۳۴.۳۶٪ در ۱۵۰ درجه سانتی گراد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که با افزایش ضخامت قطعات مرغ، اتلاف حرارت کاهش می یابد و بالاترین مقدار ۰.۹۶۸ در دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد ثبت شده است.
کلمات کلیدی: بازگرمایش، جوجه کباب، دما، محتوای رطوبت، در پرواز، کیفیت غذا.	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.1. * مسئول مکاتبات: h.tavakolipour@gmail.com	

۱-مقدمه

حمل و نقل هوایی یکی از صنایع روبه رشد دنیاست و بدون شک در عصر حاضر یکی از مهم ترین و محبوب ترین وسایل جابجایی بشر می باشد [۱] ولی با این وجود مجموعه ای از خطرات منحصر به فرد، ناشی از بیماری های مرتبط با مواد غذایی و مسمویت ارائه می دهند که ممکن است پیامدهای جدی بر سلامت مسافران و خدمه پرواز به همراه داشته باشد. بنابراین پذیرایی با کیفیت بالا و ایمن در پرواز بر رعایت استانداردهای صحیح تهیه، ذخیره و توزیع مواد غذایی متکی می باشد [۲].

فرایند بازگرمایش غذاها جهت مصرف، اخیراً کاربرد ویژه ای در وعده های غذایی عمومی به همراه داشته است. این فرایند می تواند کیفیت و ساختار مواد غذایی را تحت تاثیر قرار دهد [۳]. همچنین این فرایند می تواند سبب کاهش بار میکروبی مواد غذایی منجمد و یا غذاهایی که در دمای مناسب نگه داری و ذخیره سازی نگردیده اند، شود [۴]. برای جلوگیری از رشد میکرواورگانیزم های بیماری زا باید بازگرمایش مواد غذایی در دما و زمان مناسب انجام گیرد [۵].

طبق قوانین اداره غذا و داروی آمریکا (۲۰۱۳) از نظر ایمنی مواد غذایی دمای مرکز مواد غذایی در حین گرم کردن مجدد باید به ۷۴ درجه سانتی گراد برسد [۶]. باتوجه به زمان کم اکثر پروازها که باعث محدودیت در زمان بازگرمایش مواد غذایی در هواپیما توسط پرسنل خدمه پرواز می شود، عدم برآورده سازی الزام استاندارد در زمینه بازگرمایش علاوه بر مخاطرات ایمنی، افت ویژگی های کیفی و حسی مواد غذایی را نیز به همراه خواهد داشت. بنابراین جهت تعدیل این مشکل لازم است پارامترهایی را که در زمان بازگرمایش (ضخامت مواد غذایی) موثر می باشند بهینه سازی گردد تا الزام استاندارد برآورده شود. با توجه به اینکه نفوذ حرارتی در مواد غذایی با تغییر ضخامت به صورت لگاریتمی تغییر می یابد [۷]، بنابراین بررسی ضخامت های مختلف و

تعیین بهینه آن جهت دستیابی به حداقل زمان لازم بازگرمایش می تواند مهمترین و ارزنده ترین روش ایمن و مقرون به صرفه در برآورد این مهم در صنعت کیتینگ هوایی و استانداردهای مربوطه باشد. ارزش غذایی و طعم و مزه مطبوع گوشت طیور، سهولت در طبخ، تناسب اسیدهای آمینه موجود در آن، کلاسترول پایین، کمتر بودن بیماری های قابل انتقال از این گوشت به انسان در مقایسه با گوشت قرمز و غیره باعث شده است که گوشت طیور در سبد غذایی خانوار مورد توجه بیشتری قرار گیرد [۸]. گوشت های سفید مانند سینه از بافت نرم، رنگ روشن، چربی کم و پروتئین بالایی برخوردار هستند [۹]. مطالعات مربوط به ایمنی مواد غذایی در کیتینگ هوایی محدود است و در ادامه به موارد مرتبط اشاره می شود.

بوری پاکری^۱ و آدولیا^۲ (۲۰۱۵) اثرات نمک، پلی فسفات ها و بازگرمایش را بر کیفیت مرغ سرخ شده منجمد آماده مصرف را مورد بررسی قرار دادند. بعد از پخت، میزان روشنایی رنگ (L^*) در همه نمونه ها کاهش یافته بود درحالی که بازگرمایش اختلاف معنا داری در رنگ نشان نداد. افت پخت پس از بازگرمایش مرغ سرخ شده نشان داد نمونه های فرموله شده با ۱٪ نمک و ۰/۳ درصد پلی فسفات به ترتیب بهترین نتایج را در مقایسه با نمونه شاهد نشان دادند. پس از بازگرمایش، مرغ سرخ شده منجمد بدون تزریق نمک و پلی فسفات بیش ترین کاهش وزن را نسبت به نمونه های تزریقی نشان داد. ال شیمی^۳ (۱۹۹۲) خصوصیات حسی و ترکیب شیمیایی برش های گوشت گاو پخته و باز گرمایش آن را در مایکروویو و فر سنتی مورد بررسی قرار دادند. ارزیابی حسی نشان داد نمونه های پخته شده با مایکرو ویو دارای نمرات عطر و طعم بالاتر و رطوبت کمتری در مقایسه با نمونه های پخته شده با فر معمولی را داشتند. میزان رطوبت کل کمی بیشتر برای نمونه های پخته شده به روش سنتی و بازگرمایش شده در مقایسه با گوشت های پخته و

بازگرمایش شده با مایکروویو گزارش گردید [۱۰]. اندازه گیری مقادیر pH، اسیدیته، افت بازگرمایش و بررسی مدت زمان لازم جهت بازگرمایش سینه مرغ پخته و خنک شده در محدوده ضخامت های مورد بررسی و بررسی تعیین ضخامت بهینه سینه مرغ پخته و خنک شده جهت برآورده نمودن الزام ایمنی بازگرمایش مقرون به صرفه تولیدی و بررسی اثرات کیفی (درصد رطوبت، محتوای رطوبت، ارزیابی حسی) جهت سرو غذا در هواپیما از اهداف اصلی این تحقیق می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- آماده سازی نمونه ها

در این پژوهش از سینه مرغ تازه با برند اخوان، برنج ایرانی با برند هاشمی، گوجه فرنگی از تره بار منطقه غرب استان تهران، زعفران با برند نیک منش، کره نیوزلندی با برند NZMP، آلبیمو با برند مجید، ادویه جات شرکت گلها و نشاسته از شرکت فردانه استفاده گردید. میزان ۵ کیلوگرم سینه مرغ نمونه برداری شده از محموله^۴ ۴۰ کیلوگرمی با ضخامت های ۱/۵، ۲ و ۲/۵ سانتی متر با دمای کمتر از ۴ درجه سانتی گراد در دستگاه تامبلر^۵ ساخت شرکت روله^۶ آلمان جهت برش با ابعاد مورد نظر قرار گرفت. برنج به صورت جداگانه در دستگاه برنج پز لایوینگ^۷ ساخت کشور چین پخت گردید. ضخامت های مختلف گوجه کباب به صورت جداگانه داخل سینی های فر رشنال^۸ ساخت کشور آلمان کالبره شده که دمای مرکز آن به ۷۴ درجه سانتی گراد رسیده بود تهیه شد. گوجه فرنگی برش داده شده نیز در فر رشنال پخت گردید. برنج، سینه مرغ و گوجه فرنگی پخته شده به صورت جداگانه داخل سردخانه های دمشی (بلاست چیلرها)^۹ با دمای کمتر از ۵ درجه سانتی گراد خنک گردیده و سپس سهم (پرسیون) غذا با وزن ثابت برنج سفید ایرانی

۱۲۰ گرم، گوجه فرنگی برش داده شده ۳۰ گرم، ضخامت های متفاوت سینه مرغ با وزن ثابت ۱۰۰ گرم، سس کره و لیمو^{۱۱} ۳۰۱۱ گرم، برنج زعفرانی جهت تزئین ۱۰ گرم داخل ظروف مخصوص سرو صورت پذیرفت. جهت پخت نمونه های گوجه کباب از فرهای رشنال و جهت بازگرمایش نمونه ها از آون های مخصوص هواپیما استفاده گردید به نحوی که دمای مرکز گوجه کباب به دمای استاندارد ۷۴ درجه سانتی گراد رسانده شد. اندازه گیری دمای مواد غذایی با استفاده از دستگاه دیتالاگر^۷ اختصاصی سوزنی چهار کاناله آلمانی مدل ۱۷۶T۴ با برند تستو که کالبره می شود با پنج تکرار انجام شد. شایان ذکر است ترمومتر داخل گوجه کباب و ثبت اطلاعات در دستگاه دیتالاگر صورت پذیرفته شد.

آزمون های مربوط به تعیین pH، اسیدیته، محتوای رطوبت، زمان بازگرمایش و افت بازگرمایش و همچنین ارزیابی حسی هدونیک ۹ نقطه ای بر روی نمونه ها با پنج تکرار انجام شد. کلیه نمونه ها در طول مدت زمان پایش در داخل سردخانه با دمای کمتر از ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد.

۲-۲- اندازه گیری pH

برای اندازه گیری pH بافت سینه مرغ از دستگاه پی اچ متر پروبی شرکت آلمانی تستو با مدل Testo ۲۰۵ استفاده شد. برای این کار حسگر دستگاه از قسمت شانه ای سینه مرغ به داخل بافت فرو برده شده و تا وقتی که دستگاه با تثبیت عدد، مقدار نهایی را اعلام کند، داخل بافت نگه داشته شد [۱۱].

۲-۳- اندازه گیری اسیدیته

مقدار ۵ گرم نمونه درون ارلن مایر وزن شد. مقدار ۲۰-۳۰ میلی لیتر الکل خنثی به آن اضافه گردید. با افزودن چند قطره معرف فنل فتالین، آن را با سود ۰/۱ نرمال تیترو نموده تا رنگ صورتی کم رنگ حاصل، حداقل ۳۰ ثانیه پایدار شود. حجم مصرفی در فرمول زیر قرار می گیرد.

۲ ترکیبات سس کره و لیمو شامل کره ۰/۳۵٪، زعفران رقیق شده ۰/۱۰٪، آب ۰/۸۰٪، نمک یددار ۰/۰۰۴٪، ارد کره ۰/۰۸٪، نشاسته ۰/۰۱٪، فلفل قرمز ۰/۰۰۰۳٪ و آلبیمو ۰/۰۴٪ می باشد.

3-Datalogger

4-Batch
5-Tumblr
6- Ruhle
7- Laying
8 -Rational
9 -Blast Chiller

$$= \frac{282 * N * 100 * V}{1000 * W}$$

N=نرمال سود مصرفی

V=حجم سود مصرفی

W=وزن نمونه

محاسبه اندازه گیری اندیس اسیدی از فرمول زیر صورت می پذیرد.

$$\frac{56.1 * N * V}{W} = \text{اندیس اسیدی}$$

۲-۴- اندازه گیری محتوای رطوبت

مقدار ۵ گرم نمونه سینه مرغ پخته و بازگرمایش شده را به صورت جداگانه با ضخامت های مورد بررسی (۱/۵، ۲ و ۲/۵ سانتی متر) با ۳ تکرار به صورت یکنواخت داخل دستگاه رطوبت سنج دیجیتالی مادام قرار داده و رطوبت نمونه ها با دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری گردید.

۲-۵- اندازه گیری زمان بازگرمایش برای اندازه گیری

زمان بازگرمایش، از نمونه غذاها با وزن ۲۹۰ گرم و با ابعاد مختلف ضخامت مرغ (۱/۵، ۲ و ۲/۵ سانتی متر) داخل فر پخت استاندارد و کالبره شده مدل رشنال^{۱۲} ساخت کشور آلمان قرار داده شد و پروب مخصوص کنترل دمای فر توسط دیتالاگر با مدل T4۱۷۶ در داخل بافت مرغ فرو برده شد. دمای پخت در ۱۵۰ و ۲۳۰ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. مدت زمانی که طول کشید تا دمای داخل بافت از ۵ به ۷۴ درجه سانتی گراد برسد، به عنوان زمان بازگرمایش تعیین گردید.

۲-۶- اندازه گیری درصد افت بازگرمایش

درصد افت بازگرمایش نمونه سینه های مرغ با ضخامت های مختلف توسط محاسبه تفاوت وزن سینه مرغ پخته شده و بازگرمایش شده طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد افت} = \frac{\text{وزن سینه مرغ پخته شده} - \text{وزن سینه مرغ بازگرمایش شده}}{\text{وزن سینه مرغ بازگرمایش شده}}$$

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تحلیل آماری قرار گرفت و از طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی در پنج تکرار برای طراحی آزمون ها و از روش دانکن برای مقایسه میانگین ها استفاده شد. در این پژوهش سینه مرغ، متغیر مستقل با سه سطح (ضخامت ۱/۵، ۲، ۲/۵ سانتی متر) می باشد. دمای بازگرمایش متغیر مستقل با دو سطح (۱۵۰ و ۲۳۰ درجه سانتی گراد) می باشد. اسیدیته، pH، محتوای رطوبت، افت بازگرمایش، زمان بازگرمایش و ارزیابی حسی از متغیرهای وابسته این پژوهش به شمار می روند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آزمون های فیزیکی

۲-۷- ارزیابی حسی

۷ نفر ارزیاب متشکل از کارشناسان کیفیت و آشپزهای با تجربه و آموزش دیده در محدوده سنی ۳۵ تا ۵۵ سال و تعداد ۲ زن و ۵ مرد جهت ارزیابی نمونه ها بعد از پخت و پس از بازگرمایش انتخاب گردیدند. از روش مقیاس هدونیک نه نقطه ای (۱-فوق العاده بد، ۲-خیلی بد، ۳-در حد متوسط بد، ۴-کمی بد، ۵-بی تفاوت، ۶-کمی دوست داشتنی، ۷-در حد متعادل دوست داشتنی، ۸-خیلی زیاد دوست داشتنی، ۹-فوق العاده دوست داشتنی) جهت ارزیابی حسی استفاده گردید. در این بررسی، ارزیابان فاکتورهای طعم، رنگ، بافت، احساس دهانی و مقبولیت کلی را مورد ارزیابی قرار دادند. در نهایت مقایسه میانگین امتیازات مربوط به طعم و مزه در تست هدونیک نه نقطه ای به روش تجزیه و تحلیل واریانس انجام گردید.

۳-۱-۱- ارزیابی ضخامت قطعات مرغ با زمان بازگرمایش در دمای ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی گراد

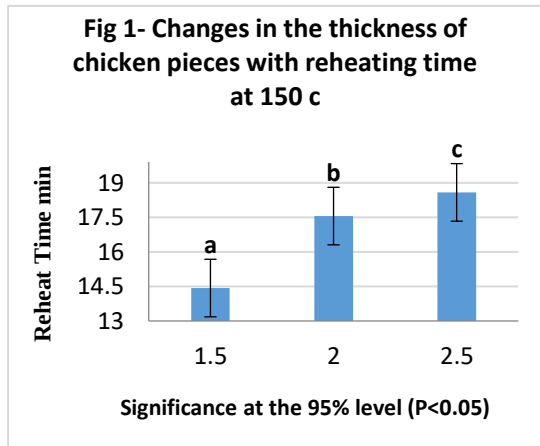


Fig 1- Changes in the thickness of chicken pieces with reheating time at 150 °C

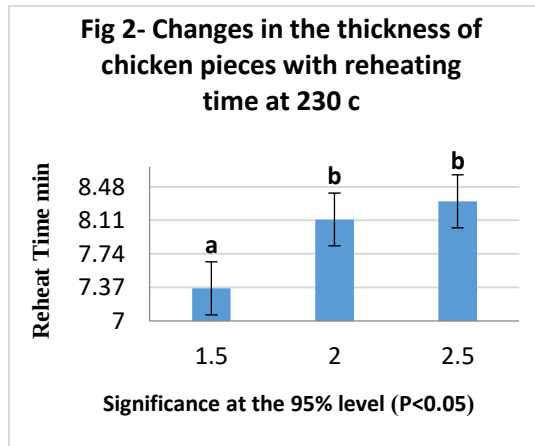


Fig 2- Changes in the thickness of chicken pieces with reheating time at 230 °C

ابوز^{۱۳} و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه خود بیان نمودند دمای پایین و طولانی زمان پخت، سبب بهبود تردی و کاهش افت پخت با توجه به تغییر در بافت اتصالی و پروتئین میوفیبریلی و حل شدن کلاژن در اثر گرما که سبب تردی می شود می گردد، همچنین دفع پروتئین های میوفیبریلی که سبب سفت شدن بافت می شود در این فرایند وجود دارد و ممکن است این موارد در زمان بازگرمایش ادامه یابد که نتایج حاصل از این مطالعه با تحقیق کنونی مطابقت دارد [۱۲].

۳-۱-۲- ارزیابی ضخامت قطعات مرغ با افت بازگرمایش در دمای ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی گراد

همان طوری که در شکل ۱ و ۲ مشخص شده است تغییرات شیب نمودار با افزایش ضخامت حاکی از آن است که در ضخامت های بالا، زمان بازگرمایش افزایش خواهد یافت. شایان ذکر است در مقایسه با دمای ۲۳۰ درجه سانتی گراد، شیب تغییرات در دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد کمتر می باشد که علت این امر را می توان به مدت زمان طولانی باقی ماندن نمونه ها در دمای بازگرمایش نسبت داد. زمان بازگرمایش تحت تأثیر دو عامل ضخامت ماده غذایی و درجه حرارت بازگرمایش قرار می گیرد.

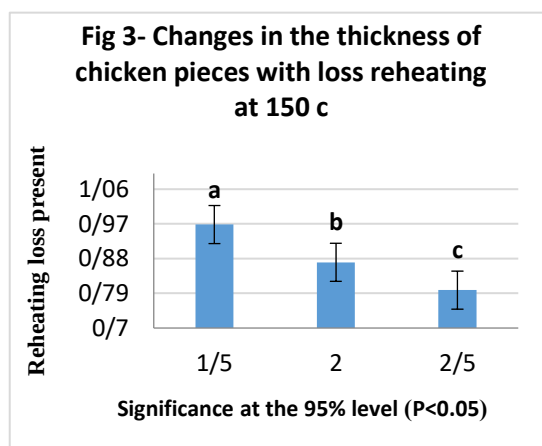


Fig 3- Changes in the thickness of chicken pieces with reheating loss at 150 °C

یکی از عواملی که در این مطالعه در افت بازگرمایش موثر می باشد شامل مساحتی از ضخامت قطعات مرغ است که در معرض هوای گرم قرار می گیرد. جریان هوای گرم باعث حذف رطوبت از سطح قطعات مرغ می گردد و محتوای رطوبت این قطعات کاهش می یابد و سطح آن خشک و سفت می گردد. با افزایش درجه حرارت تا ۲۳۰ درجه سانتی گراد با توجه به این که زمان کمتری جهت رسیدن به دمای استاندارد ۷۴ درجه سانتی گراد در مرکز قطعات مرغ صرف می شود و ذکر این نکته که رطوبت در عمق قطعات مرغ با روش هدایت صورت می پذیرد، حفظ رطوبت در مرکز مواد غذایی بهتر انجام می پذیرد و منجر به کاهش افت بازگرمایش مرغ می گردد.

۲-۳- آزمون های شیمیایی

۲-۳-۱ ارزیابی ضخامت قطعات مرغ با درصد محتوای رطوبت در دمای ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی گراد

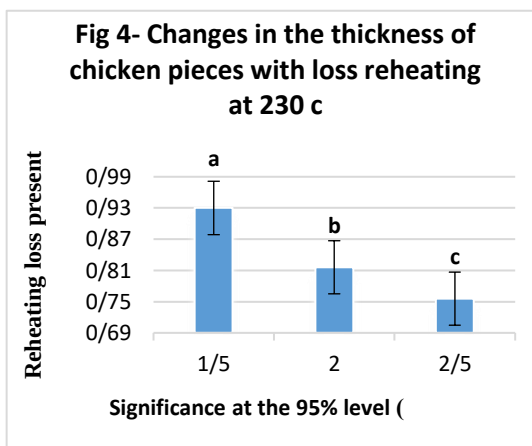


Fig 4- Changes in the thickness of chicken pieces with reheating loss at 230 °C

با توجه به شکل ۳ و ۴ این مطالعه نشان می دهد که در قطعات مرغ با افزایش ضخامت های مورد آزمون (۱/۵، ۲ و ۲/۵ سانتی متر)، درصد افت بازگرمایش افزایش می یابد و این رابطه از نظر اماری در سطح ۹۵ درصد اطمینان معنی دار می باشد ($p < 0/05$) Reheating Loss Present.

همان طوری که در شکل ۳ و ۴ مشاهده می گردد با افزایش ضخامت قطعات مرغ از ۱/۵ سانتی متر به ۲/۵ سانتی متر میزان افت بازگرمایش نمونه ها در هر دو دمای ۱۵۰ و ۲۳۰ درجه سانتی گراد کاهش می یابد ولی شیب نمودار در دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد در مقایسه با ۲۳۰ درجه سانتی گراد کمتر خواهد بود که علت آن احتمالاً این است که با افزایش ضخامت نسبت سطح به حجم کاهش خواهد یافت و بنابراین زمان مورد نیاز برای رسیدن دمای مرکز قطعه مرغ به دمای ۷۴ درجه سانتی گراد افزایش خواهد یافت.

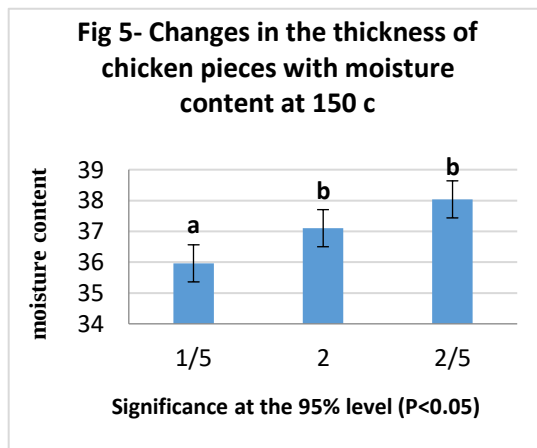


Fig 5- Changes in the thickness of chicken pieces with moisture content at 150 °C

ارزیابی حسی انجام پذیرفت. سه دمای سرخ کردن ۱۵۰، ۱۶۵، و ۱۸۰ درجه سانتی گراد استفاده گردید. نتایج نشان داد افزایش درجه حرارت بازگرمایش منجر به کاهش رطوبت سطح^{۱۵} و افزایش رطوبت داخل گردید اما اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در ارزیابی حسی تفاوت معنی داری در بین تمام صفات در همه نمونه ها به جز در رنگ پوشش و ویژگی های تردی وجود نداشت. الگوی یکسان نتایج برای ویژگی تردی در خمیر برنج یافت شد که بالاترین امتیاز در دمای ۱۶۵ درجه سانتی گراد دمای سرخ کردن بود. نتایج حاصل از مطالعه پیش رو با نتایج حاصل از تحقیق خالید و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی دارد.

۲-۲-۳-ارتباط ضخامت قطعات مرغ با میزان pH در دمای بازگرمایش ۱۵۰ و ۲۳۰ درجه سانتی گراد

با توجه به شکل ۷ و ۸ این مطالعه نشان می دهد که در قطعات مرغ با افزایش ضخامت های مورد آزمون (۱/۵، ۲ و ۲/۵ سانتی متر)، میزان pH افزایش می یابد و این رابطه از نظر اماری در سطح ۹۵ درصد اطمینان معنی دار می باشد ($p < 0/05$).

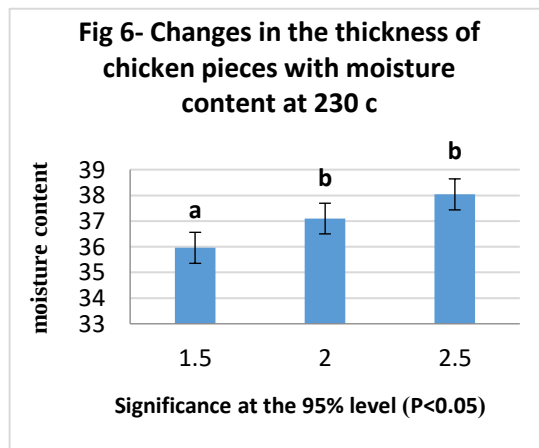


Fig 6- Changes in the thickness of chicken pieces with moisture content at 230 c

با توجه به شکل ۵ و ۶ این مطالعه نشان می دهد که در قطعات مرغ با افزایش ضخامت های مورد آزمون (۱/۵، ۲ و ۲/۵ سانتی متر)، درصد محتوای رطوبت افزایش می یابد و این رابطه از نظر اماری در سطح ۹۵ درصد اطمینان معنی دار می باشند ($p < 0/05$).

با مقایسه شکل ۵ و ۶، همان طور که مشخص است با افزایش ضخامت قطعات مرغ در دمای ۱۵۰ و ۲۳۰ درجه سانتی گراد بازگرمایش، درصد محتوای رطوبت افزایش می یابد اما شیب نمودار در دمای ۲۳۰ درجه سانتی گراد در مقایسه با ۱۵۰ درجه سانتی گراد ملایم تر و یکنواخت تر می باشد که علت این امر به نظر می رسد در خصوص حفظ رطوبت بیشتر در مرکز قطعات مرغ به دلیل افزایش درجه حرارت می باشد.

خالید^{۱۴} و همکاران (۲۰۱۱) به مطالعه فرایند بازگرمایش بر پوشش ناگت مرغ یخ زده با استفاده از خمیر حاوی آردها مانند گندم پرداختند و تعیین محتوای رطوبت، چربی و

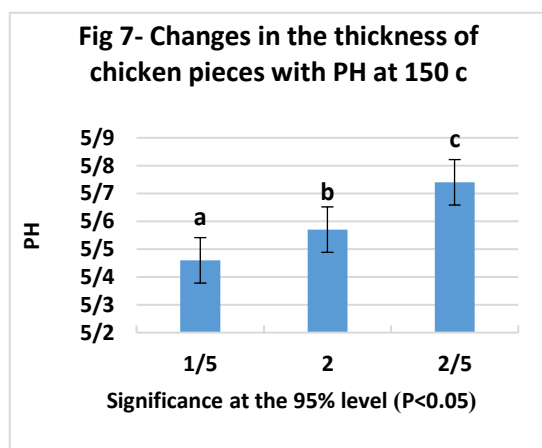


Fig 7- Changes in the thickness of chicken pieces with PH at 150 °C

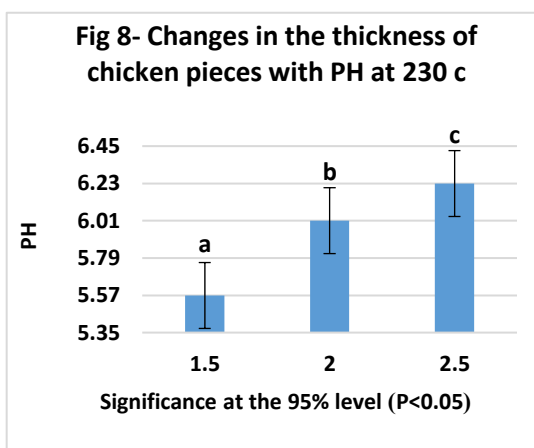


Fig 8- Changes in the thickness of chicken pieces with PH at 230 °C

علت این تفاوت، میزان و نوع روش پخت و پز می باشد. نتایج حاصل از روش پخت گوشت خوک توسط جوشاندن pH بالاتری نسبت به سایر روش های کبابی، سرخ کردن و فر به همراه داشت و با توجه به دمای پخت متفاوت مورد استفاده در پژوهش کنونی، نتایج حاصل با یکدیگر همخوانی دارند [۱۳].

۳-۲-۳- ارتباط ضخامت قطعات مرغ با اسیدیته در دمای بازگرمایش ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی گراد

همان طوری که در شکل های ۹ و ۱۰ دیده می شود در قطعات مرغ با افزایش ضخامت های مورد آزمون (۱/۵، ۲ و ۲/۵ سانتی متر)، درجه اسیدیته کاهش می یابد و این رابطه از نظر آماری در سطح ۹۵ درصد اطمینان معنی دار می باشد ($p < 0/05$). با افزایش ضخامت قطعات مرغ (۲/۵ سانتی متر)، اسیدیته کاهش می یابد. با افزایش درجه حرارت ۲۳۰ درجه سانتی گراد در مقایسه با ۱۵۰ درجه سانتی گراد میزان اسیدیته به مقدار بیشتری کاهش یافته است و اختلاف داده های مربوط به دمای ۱۵۰ درجه در این مطالعه معنی دار تر می باشد که علت را احتمالاً می توان به میزان نفوذ سس جوجه کباب به داخل آن ارتباط داد که با سهولت بیشتری انجام می گیرد.

تغییرات شیب در شکل ۶ و ۷ با افزایش ضخامت قطعات مرغ، حاکی از آن است که در ضخامت های بالاتر مورد بررسی (۲/۵ سانتی متر) و دمای بالاتر (۲۳۰ درجه سانتی گراد) میزان pH افزایش می یابد. شایان ذکر است در مقایسه با دمای پایین ۱۵۰ درجه سانتی گراد، شیب تغییرات به طور چشم گیری در دمای ۲۳۰ درجه سانتی گراد بیشتر می باشد که علت این امر را می توان به میزان نفوذ سس مخصوص جوجه کباب به بافت مرغ نسبت داد. در ضخامت های پایین مورد بررسی، نفوذ سس به بافت در مقایسه با ضخامت های بالاتر بیشتر خواهد بود و این موضوع با توجه به وجود آبلیمو در ترکیبات سس جوجه کباب (عامل اسیدی کننده) سبب تغییر pH می گردد. شایان ذکر است در دمای بالاتر بازگرمایش به دلیل سخت تر شدن سطح ماده غذایی در اثر انتقال حرارت، نفوذ سس به بافت کمتر می باشد و pH افزایش می یابد.

کیم و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهش خود با بررسی بر روش های پخت قبل از بازگرمایش و کیفیت گوشت خوک مرینیت شده بیان نمودند، روش های پخت و پز و دمای مورد استفاده، اثرات متفاوتی در pH محصولات گوشت دارد و

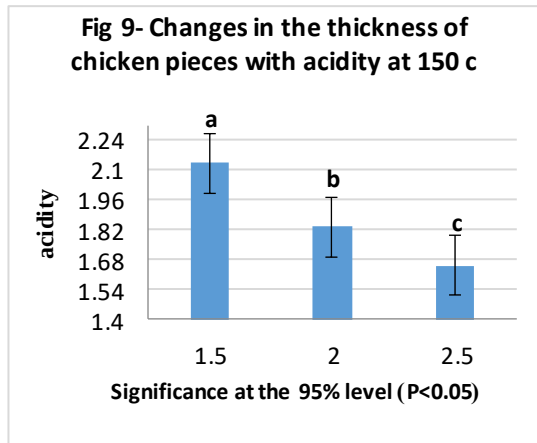


Fig 9- Changes in the thickness of chicken pieces with acidity at 150 °C

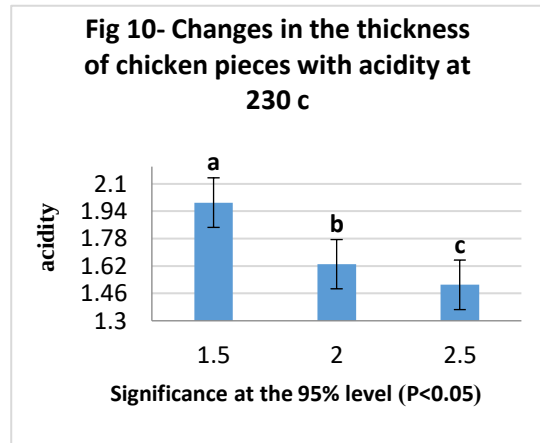


Fig 10- Changes in the thickness of chicken pieces with acidity at 230 °C

۳-۳-۳- ارزیابی حسی

۳-۳-۱- ارزیابی ضخامت قطعات مرغ با ارزیابی حسی (عطر و طعم) در دمای باز گرمایش ۱۵۰ و ۲۳۰ درجه سانتی گراد

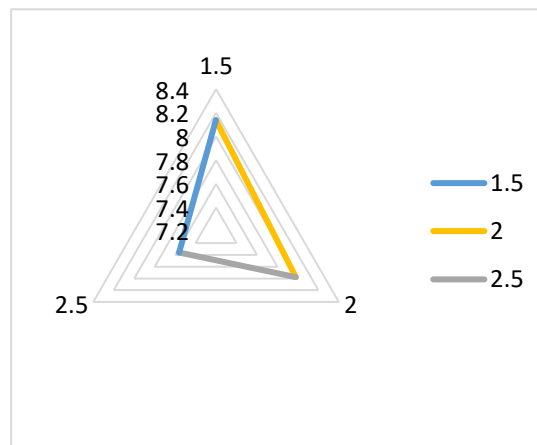


Fig 11- Changes in the thickness of chicken pieces by sensory evaluation (aroma and flavor) at 150 °C

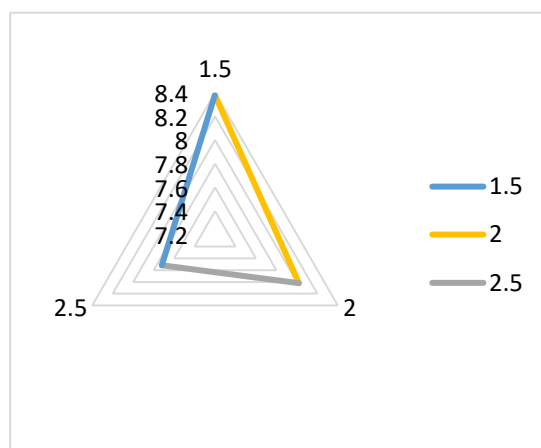


Fig 12- Changes in the thickness of chicken pieces by sensory evaluation (aroma and flavor) at 230 °C

با توجه به شکل های ۱۱ و ۱۲ مشاهده می شود با افزایش ضخامت قطعات مرغ، ارزیابی تست پنل و مقبولیت کاهش یافته است و این رابطه از نظر آماری در سطح ۹۵ درصد اطمینان معنی دار می باشد ($p < 0/05$).

با توجه به شکل های ۱۱ و ۱۲ مشاهده می شود با افزایش ضخامت قطعات مرغ، ارزیابی تست پنل و مقبولیت بافت کاهش یافته است و این رابطه از نظر آماری در سطح ۹۵ درصد اطمینان معنی دار می باشد ($p < 0/05$).

۳-۳-۲- ارزیابی ضخامت قطعات مرغ با ارزیابی حسی (بافت) در دمای باز گرمایش ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی گراد

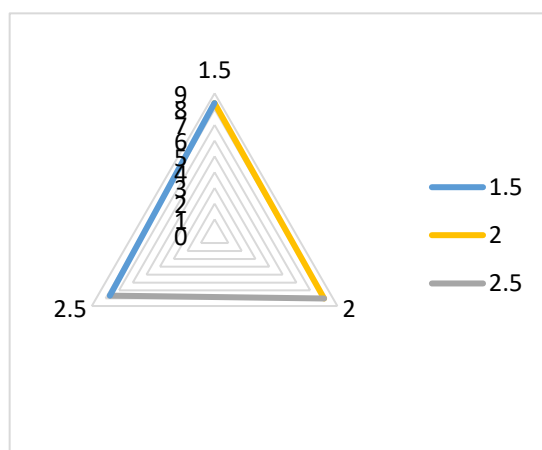


Fig 13- Changes in the thickness of chicken pieces by sensory evaluation (texture) at 150 °C

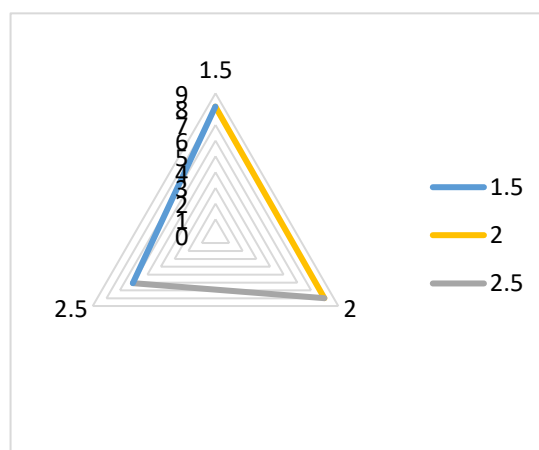


Fig 14- Changes in the thickness of chicken pieces by sensory evaluation (texture) at 230 °C

۳-۳-۳- ارزیابی ضخامت قطعات مرغ با ارزیابی حسی (رنگ) در دمای باز گرمایش ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی گراد

با توجه به شکل ۱۵ و ۱۶ این مطالعه نشان می دهد که با افزایش ضخامت قطعات مرغ، ارزیابی تست پنل و مقبولیت رنگ کاهش یافته است و این رابطه از نظر آماری در سطح ۹۵ درصد اطمینان معنی دار می باشد ($p < 0/05$).

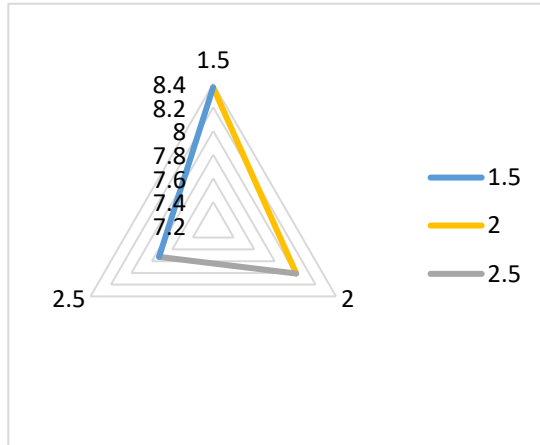


Fig 15- Changes in the thickness of chicken pieces by sensory evaluation (color) at 150 °C

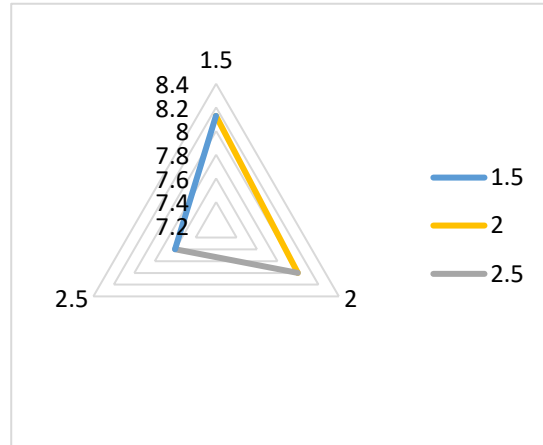


Fig 16- Changes in the thickness of chicken pieces by sensory evaluation (color) at 230 °C

مقبولیت کمتری دارند. بنابراین به نظر می رسد در ضخامت و دمای پایین تر بازگرمایش قطعات مرغ، نفوذ سس (مخصوص جوجه کباب) به بافت بیشتر می گردد و مطلوبیت حسی افزایش می یابد و بالعکس با افزایش ضخامت و دمای بالاتر بازگرمایش قطعات مرغ، نفوذ سس به بافت کمتر شده و مقبولیت طعم کاهش می یابد.

نتایج حاصل از تحقیق کنونی با نتایج مطالعه Klein و همکاران (۱۹۸۴) در خصوص افزایش درجه حرارت بازگرمایش که سبب کاهش قابل توجه کیفیت محصول به دلیل خشک شدن بیش از حد سطح، افت رطوبت و تغییر رنگ و بافت می شود، مطابقت دارد [۱۴].

۴- نتیجه گیری

به طور کلی نتایج بدست آمده نشان داد با افزایش ضخامت قطعات مرغ مورد مطالعه (۱/۵، ۲ و ۲/۵ سانتی متر) در دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد با افزایش ضخامت، مدت زمان

به طور کلی با افزایش ضخامت قطعات مرغ مورد آزمون (۱/۵، ۲ و ۲/۵ سانتی متر) ارزیابی حسی در نمونه های مورد بررسی (عطر و طعم، بافت، رنگ) کاهش و با افزایش دمای بازگرمایش از ۱۵۰ درجه سانتی گراد به ۲۳۰ درجه سانتی گراد ویژگی های ارگانولپتیک^{۱۶} و ارزیابی حسی در نمونه های مورد بررسی کاهش می یابد.

همان گونه که در شکل ۱۵ مشاهده می گردد با کاهش ضخامت قطعات مرغ (۱/۵ سانتی متر) در دمای پایین تر (۱۵۰ درجه سانتی گراد) ویژگی های عطر و طعم و مقبولیت طعم افزایش یافته است. لازم به ذکر است با توجه به شکل ۱۶ با افزایش ضخامت ماده غذایی و افزایش دمای بازگرمایش به ۲۳۰ درجه سانتی گراد با توجه به سخت شدن سطح و در نتیجه کاهش نفوذ سس (مخصوص جوجه کباب) به بافت مرغ، ویژگی عطر و طعم بیشتر آسیب می بیند و

بو، مزه، رنگ، ظاهر، لمس غذا که در واقع ارزیابی غذا از organoleptic^{۱۶} -
طریق حواس است :

می یابد. همچنین با افزایش ضخامت قطعات مرغ، زمان بازگرمایش بیشتر شده اما با افزایش درجه حرارت این عامل به طور معنی داری کاهش می یابد به طوری که در ضخامت ۲/۵ سانتی متر با درجه حرارت ۱۵۰ درجه سانتی گراد بیشترین مقدار زمان بازگرمایش (۱۸/۵۸ دقیقه) مشاهده گردید. لازم به ذکر است با افزایش ضخامت قطعات مرغ، درصد محتوای رطوبت در بافت مرغ افزایش می یابد و این عامل در دمای ۲۳۰ درجه به بالاترین مقدار می رسد. در خاتمه با افزایش ضخامت قطعات مرغ افت بازگرمایش کاهش می یابد و این مورد در دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد کمترین مقدار را دارا خواهد بود.

۵- سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری پرسنل کیتینگ آرمان و خدمه پرواز هواپیمایی ماهان که در انجام این پژوهش یاری نمودند تقدیر و تشکر می گردد.

۶-منابع

[1] McMullan, R. ., Edwards, P.J., Kelly, M.J., Millar, B.C., Rooney, P.J., Moore, J.E. (2007). Food-poisoning and commercial air travel. *Travel medicine and infectious Disease*. 5(5), pp. 276-286.

[2] Sheward, E., 2005. *Aviation food safety*. Blackwell Pub. ISBN: 978 (1), pp. 4551-4581

[3] Bureepakdee, W. and Adulyatham, P., 2015. Effects of Salt, Polyphosphates and Reheating on Quality of Ready-to-Eat Frozen Fried Chicken. *Food and Applied Bioscience Journal*, 3(1), pp. 50-58

[4] Khalid, K., Musa, M., Jusoff, K., Abdullah, R., Ghani, F.A. and Ramli, N., 2011. Effect of reheating process on the frozen coating system. *World Appl Sci J (Spec Issue Serv Sect Transforms Econ)*, 12, pp. 19-27.

[5] Bryan, F.L., Jermini, M., Schmitt, R., Chilufya, E.N., Michael, M., Matoba, A., Mfume, E. and Chibiya, H., 1997. Hazards associated with holding and reheating foods at

افزایش یافت. به عنوان مثال در ضخامت ۱/۵ سانتی متر حدود ۱۴/۴۳ دقیقه و در ضخامت ۲/۵ سانتی متر حدود ۱۸/۵۸ دقیقه زمان جهت بازگرمایش نیاز بود. شایان ذکر است در دمای ۲۳۰ درجه سانتی گراد با افزایش ضخامت، مدت زمان افزایش یافت اما این افزایش در ضخامت ۱/۵ سانتی متر به میزان ۷/۳۶ دقیقه و در ضخامت ۲/۵ سانتی متر به میزان ۸/۳۲ دقیقه با سرعت کمتری افزایش یافت. با توجه به دمای بالای مورد استفاده (۲۳۰ درجه سانتی گراد) و افزایش آسیب به ویژگی های حسی و کاهش مقبولیت طعم بین ارزیاب ها، نمونه غذاهای با ضخامت بالاتر قطعات مرغ و دمای ۲۳۰ درجه سانتی گراد بازگرمایش از کمترین امتیاز کیفیت برخوردار بودند و به این دلیل با وجود کاهش زمان بازگرمایش و افزایش ایمنی در مدت سرو غذا در هواپیما، در این مطالعه پیشنهاد نمی گردد. شایان ذکر است با افزایش ضخامت قطعات مرغ مورد بررسی و افزایش دمای بازگرمایش به ۲۳۰ درجه سانتی گراد میزان pH با توجه به نفوذ کمتر سس به بافت مرغ افزایش و میزان اسیدیته کاهش

vending sites in a small town in Zambia. *Journal of Food Protection*, 60(4), pp. 391-398

[6] Code, F., 2013. United States Public Health Service. Food and Drug Administration. College Park, MD: US Department of health and human services, p. 20740.

[7] Dincer, I. 1997. Heat transfer in food cooling applications. *CRC Press*

[8] Shahidi, F., Samaranayaka, A. G. P., and Pegg, R. B. (2014). Curing| Brine Curing of Meat. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 416-424

[9] Petracci, M., Bianchi, M., Mudalal, S. and Cavani, C., 2013. Functional ingredients for poultry meat products. *Trends in food science & technology*, 33(1), pp. 27-39

[10] El-Shimi, N.M., 1992. Influence of microwave and conventional cooking and reheating on sensory and chemical characteristics of roast beef. *Food chemistry*, 45(1), pp. 11-14

[11] Celen, M. F., Sogut, B., Zorba, Ö., Demirulus, H., and Tekeli, A. (2016). Comparison of normal and PSE turkey breast meat for chemical composition, pH, color,

myoglobin, and drip loss. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45(8), pp.441-444.

[12] Obuz, E., Dikeman, M.E. and Loughin, T.M., 2003. Effects of cooking method, reheating, holding time, and holding temperature on beef longissimus lumborum and biceps femoris tenderness. *Meat science*, 65(2), pp.841-851.

[13] Kim, T.K., Hwang, K.E., Kim, Y.B., Jeon, K.H., Leem, K.H. and Choi, Y.S., 2018. Effects of pre-cooking methods on quality characteristics of reheated marinated pork loin. *Korean journal for food science of animal resources*, 38(5), p.970.

[14] Klein, B., Matthews, M.E. and Setser, C.S., 1984. Foodservice systems: time and temperature effects on food quality. *Bulletin (University of Illinois at Urbana-Champaign. Agricultural Experiment Station)*; no. 779.



Scientific Research

Determination of Reheating Time and Thickness Effects on Sensory Quality of Chicken Kebabs During Flight

Ali-Reza Ardakani ¹, * Hamid Tavakolipour ², Nafiseh Jahan-Bakhshian ³

1-M.Sc. Graduate, Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2-Full Professor, Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

3-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2022/9/17 Accepted:2022/12/1 Keywords: Reheating, Chicken Kebabs, Temperature, Moisture Content, In-Flight, Food Quality. DOI: 10.22034/FSCT.22.158.1. *Corresponding Author E- h.tavakolipour@gmail.com	The process of reheating food for consumption has gained particular attention in meal preparation, as it significantly affects food quality and structure. According to the US Food and Drug Administration (2013), the internal temperature of reheated food should reach 74 degrees Celsius for safety. Due to the limited time available for reheating food during flights by flight crew personnel, failure to meet this standard pose safety hazards and diminishes food quality and sensory properties. This study examines the effects of pH, acidity, moisture content, reheating time, and reheating temperature on the sensory evaluation of chicken kebabs, focusing on different piece thicknesses (1.5, 2, and 2.5 cm) and reheating temperatures (150 and 230 °C). Results indicate that increasing the thickness of chicken pieces and reheating temperature from 150 to 230 °C extended the reheating time, which did not exceed the standard limit of 2 hours; the maximum reheating time recorded was 18.58 minutes for 2.5 cm thick pieces at 150 °C. Additionally, as thickness and reheating temperature increased, surface moisture decreased, leading to greater degradation of taste characteristics and lower acceptability. The highest sensory evaluation score of 8.38 was achieved with 1.5 cm thick pieces reheated at 150 °C. Notably, pH values increased with thickness, peaking at 2.5 cm and 230 °C, while acidity decreased, with the lowest value observed at 2.5 cm and 230 °C (1.51%). Moisture content varied, with the highest value of 38.04% at 2.5 cm thickness and 230 °C, compared to the lowest of 34.36% at 150 °C. Furthermore, results demonstrated that as the thickness of chicken pieces increased, heat loss decreased, with the highest value of 0.968 recorded at 150 °C



تبیین الگوی مصرف و ارزیابی رفتار خریداران و مصرف‌کنندگان کنسرو ماهی تن در استان مازندران با استفاده از نظریه رفتار برنامه‌ریزی شده

سهیل ریحانی پول^{۱*}، سکینه یگانه^۲، شبنم حقیقت خواجوی^۳، محمد خلیلی^۴

۱- دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۳- استادیار، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۴- دانش‌آموخته کارشناسی، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ‌های مقاله: تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۲۸	هدف تحقیق حاضر مطالعه الگوی خرید و مصرف کنسرو ماهی تن در استان مازندران با استفاده از نظریه رفتار برنامه‌ریزی شده بود. به همین منظور پس از تعیین فرضیات تحقیق، پرسشنامه‌ای متناسب طراحی و توسط جامعه آماری تکمیل شد. جامعه آماری پژوهش، کل استان مازندران بود که به صورت تصادفی ۱۰ شهر جهت مطالعه میدانی با حجم نمونه ۶۰۰ نفر انتخاب شدند. به منظور آزمون فرضیات و بررسی شدت رابطه بین گویه‌های آن‌ها، مدل مفهومی متناسب طراحی و با استفاده از نرم‌افزار لیزرل (روش مدل‌سازی معادلات ساختاری) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مطابق یافته‌ها، حدود ۶۰ درصد خانوارهای جامعه آماری سالیانه ۱۰ تا ۱۲ عدد قوطی کنسرو ماهی تن خریداری و مصرف می‌کردند. برند، سایز ۱۵۰ تا ۱۸۰ گرم و همچنین هابپرمارکت‌ها جزو اولویت‌های اول جامعه آماری پیرامون سه شاخص ویژگی‌های بسته‌بندی، سایز و اماکن خرید بودند. نتایج اجرای مدل مفهومی پژوهش در دو حالت استاندارد و معنی‌داری نشان داد که فقط فرضیه اثرگذاری معنی‌دار ریسک درک‌شده بر هنجارهای ذهنی رد و سایر فرضیات تأیید شدند. مطابق نتایج، از بین سه متغیر برند، کیفیت و مشخصات بسته‌بندی، برند کنسرو ماهی تن با ضریب تأثیر ۰/۵۲ بیشترین اثر را بر نگرش خریداران داشت. در ادامه مشخص شد اثرگذاری سودمندی درک‌شده بر هنجارهای ذهنی (۰/۵۶) بیشتر از درآمد (۰/۴۳) است. مطابق یافته‌ها، قیمت کنسرو ماهی تن با ضریب اثر ۰/۴۱، متغیر تبلیغات و آموزش با ضریب اثر ۰/۳۲ و متغیر اماکن خرید با ضریب اثر ۰/۲۴ به صورت معنی‌داری بر سازه کنترل رفتار درک‌شده موثر بودند. از بین سازه‌های نگرش، هنجارهای ذهنی و کنترل رفتار درک‌شده، موثرترین سازه بر تصمیم به خرید و مصرف کنسرو ماهی تن، نگرش بود (با ضریب اثر ۰/۴۷). خروجی چنین مطالعاتی به مسئولین مرتبط با اقتصاد شیلاتی و سلامت جامعه به ترتیب در تعیین راهبردهای مناسب جهت افزایش بهره‌وری و حفظ سلامت جمعیت کمک شایانی خواهد کرد.
کلمات کلیدی: فرآورده‌های دریایی، نظریه رفتار برنامه‌ریزی شده، بسته‌بندی، برند، مازندران	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.15. * مسئول مکاتبات: soheylreyhani@gmail.com	

۱- مقدمه

افزایش دغدغه‌های روزمره در زندگی و نبود وقت کافی جهت طبخ غذاهای خانگی موجب شده تا مردم بخشی از سفره خود را به غذاهای آماده اختصاص دهند. انواع فرآورده‌های گوشتی (سوسیس، کالباس، همبرگر، ژامبون و ...)، فرآورده‌های دریایی (کنسرو ماهی، فیله ماهی بسته‌بندی، شنپسل و ناگت ماهی و ...) و کنسروهای مختلف از دسته غذاهای حاضری هستند که امروزه به وفور در مراکز خرید یافت می‌شوند. با گذشت زمان و آگاهی مردم از مضرات برخی از فرآورده‌های گوشتی، توجه آن‌ها به سمت فرآورده‌های دریایی به عنوان جایگزینی مناسب جلب شده است که البته در راه استفاده از این فرآورده‌ها موانع مختلفی مانند قیمت بالا، بو، عدم تناسب با ذائقه خانوار و ... نیز وجود دارد [۱].

یکی از فرآورده‌های دریایی که آسان‌ترین نوع طبخ و مصرف را داراست و از دیرباز به سفره‌های مردم راه یافته، کنسرو ماهی تن است. صنعت کنسرو ماهی به دلیل اشتغال‌زایی قابل توجه و تولید محصولی سالم و با ماندگاری بالا و دسترسی آسان و نقش اساسی آن در تامین امنیت غذایی جامعه بویژه اقشار متوسط به پائین و نیز اهمیت استراتژیک آن به عنوان ذخایر مراکز نظامی و امدادی در مواقع بحران از جمله جنگ و بلایای طبیعی به صورت ویژه‌ای مورد توجه قرار دارد. این صنعت از یک سو موجبات توسعه و رونق حلقه پیشین یعنی صید و صیادی را فراهم می‌سازد و از طرف دیگر با تولید محصول سالم، مقوی و مغذی نقش مهمی در امنیت غذایی و تامین پروتئین ارزان برای اقشار متوسط به پائین جامعه به عنوان حلقه پسین ایفا می‌کند. بنابراین افزایش سرانه مصرف این محصول در داخل به اشتغال‌زایی و ثبات شغلی و همچنین صادرات آن به خارج به ارزآوری کمک ویژه‌ای خواهد کرد. ضمن اینکه کنسرو ماهی نسبت به سایر مواد غذایی آماده دیگر مغذی‌تر و بی‌خطرتر است و تمامی مزایای مصرف ماهی به عنوان غذای سلامتی را دارد.

کنسرو ماهی تن در حال حاضر یکی از سالم‌ترین مواد غذایی آماده در کشورهای جهان به شمار می‌رود. چرا که اولاً ماده اولیه این غذای آماده ماهی است که همواره از آن به عنوان

غذای سلامتی و مغذی یاد می‌شود؛ دوما در فرایند تولید کنسرو ماهی به دلیل وجود فرایندهای حرارتی (استریلیزاسیون) به هیچگونه ماده نگهدارنده‌ای نیاز نیست. در کشورهای توسعه یافته به منظور افزایش سرانه چنین مواد غذایی (که افزایش سرانه آن‌ها از همه جهت سودآور است)، با استفاده تکنیک‌های مرتبط با علم بازاریابی، رفتار خریداران و مصرف‌کنندگان را ارزیابی و مطالعه می‌کنند تا از این طریق بتوانند این مواد غذایی را مطابق با میل افراد جامعه تولید کنند که این فرایندها در نهایت منتج به افزایش سرانه مصرف می‌گردد [۲ و ۳]. رفتار مصرف‌کننده، رفتارهایی را در بر می‌گیرد که مصرف‌کننده قبل از خرید، حین خرید و پس از خرید محصول از خود بروز می‌دهد. به بیانی دیگر، رفتار مصرف‌کننده به مجموعه‌ای از رفتارها اطلاق می‌شود که فرد هنگام جستجو، خرید، استفاده، ارزیابی و کنارگذاری محصولات، خدمات و ایده‌هایی که نیازهایش را برطرف می‌سازد، از خود نشان می‌دهد [۴]. در مورد آبیان و فرآورده‌های دریایی نیز تحقیقات بسیار زیادی از این دست در کشورهای مختلف انجام شده است که نتایج در خور توجه و قابل قبولی به همراه داشته است [۴-۷].

هدف تحقیق حاضر ارزیابی و مطالعه رفتار خریداران و مصرف‌کنندگان کنسرو ماهی تن در استان مازندران بود. درک، شناسایی و ارزیابی رفتار مصرف‌کنندگان مزایای گوناگونی دارد. این شناسایی به همهی دست‌اندرکاران تولید، بازاریابان و مسئولین امر پیرامون تولید نوع محصول، میزان تولید، ایجاد تغییرات بهینه در محصول، تولید محصولی مطابق تمامی نیازهای جامعه مصرف و در یک جمله، به تدوین راهبردهای سازمانی و بازاریابی مبتنی بر درک و شناخت تفکرات، احساسات و رفتار مصرف‌کنندگان کمک شایانی می‌کند. از دیگر مزایای مطالعه رفتار مصرف‌کننده می‌توان به کمک به تصمیم‌گیری بهتر مدیران، در اختیار قراردادن پایگاه دانش از مصرف‌کنندگان برای پژوهشگران بازاریابی، کمک به قانون‌گذاران و سیاست‌گذاران عمومی برای وضع قوانین مربوط به خرید کالا و خدمت، کمک به

مصرف‌کنندگان برای اتخاذ تصمیم‌های بهتر و درک عوامل اجتماعی تأثیرگذار بر رفتار انسان اشاره کرد.

۲- مبانی نظری پژوهش

یکی از نظریه‌های مهم در زمینه ارزیابی رفتار مصرف‌کنندگان، تئوری رفتار برنامه‌ریزی‌شده است. این تئوری در برگرفته مطالعه نگرش‌ها (اساس علم روانشناسی) و مجموع گروه‌های تأثیرگذار بر رفتار مصرف‌کننده است. تئوری رفتار برنامه‌ریزی‌شده بر این اصل استوار است که مردم براساس اطلاعات قابل دسترس، تصمیم‌گیری منطقی و عقلانی می‌کنند [۸]. این تئوری از پنج سازه تشکیل شده که عبارتند از نگرش، هنجارهای ذهنی، کنترل رفتار درک‌شده، قصد رفتاری و رفتار مصرف‌کننده؛ که در واقع ستون‌های اصلی آن می‌باشند. نظریه رفتار برنامه‌ریزی‌شده، در سال ۱۹۸۵ توسط Ajzen ارائه گردید و الگویی شناختی از رفتار انسان است که تمرکز اصلی آن بر پیش‌بینی و ادراک رفتارهای کاملاً تعریف‌شده می‌باشد. این نظریه یک چارچوب سازمان‌یافته برای پیش‌بینی و تبیین رفتار انسانی ارائه می‌دهد و از نظریه اقدام مستدل منتج شده که عنوان می‌کند احتمال درگیر شدن یک فرد در رفتار خاص با نیت او برای انجام آن کار قابل پیش‌بینی می‌باشد [۹] و این مورد با شواهد تجربی بسیاری مورد تأیید قرار گرفته است [۱۰]. در واقع Ajzen نظریه عمل مستدل را با وارد کردن سازه کنترل رفتار درک‌شده به عنوان عامل تعیین‌کننده قصد رفتاری و رفتار هدف، گسترش داده و آن را به عنوان نظریه رفتار برنامه‌ریزی‌شده تبیین کرد. این نظریه با در نظر گرفتن ادراک‌های کنترل بر عملکرد به عنوان یک پیش‌بین اضافی، تلاش می‌کند رفتارهای غیرارادی را نیز پیش‌بینی کند. به بیانی دیگر می‌توان گفت نظریه رفتار برنامه‌ریزی‌شده بر تعیین‌کننده‌های ادراکی رفتار تمرکز دارد [۱۱].

هر نوع بیان نظر در مورد یک شی، فرد و یا یک رویداد که در آن قضاوت و ارزیابی نهفته باشد، نگرش نامیده می‌شود. در تعریفی دیگر، نگرش به احساس‌های مثبت یا منفی اطلاق می‌شود که یک فرد نسبت به انجام یک رفتار دارد. به صورت

جامع‌تر، نگرش یعنی احساسات نسبتاً پایدار، تمایلات یا مجموعه‌ای از باورهای هدایت‌شده به سمت یک ایده، شی، شخص و یا موقعیت. در مورد خرید و مصرف یک ماده غذایی، نگرش به احساسات مختلفی گفته می‌شود که افراد نسبت به خرید و مصرف آن ماده غذایی دارند [۱۲].

هنجارهای ذهنی به درک فرد از هنجارهای رفتاری اشاره دارد که افراد یا اشخاص نزدیک به او انتظار رعایت آن در محیط‌های خاص را از آن فرد دارند. اساساً، هنجارهای ذهنی به شکل فشار اجتماعی نمود پیدا کرده و شخص را به پیروی از رفتارهای خاصی وادار می‌کند که انتظار رعایت آن‌ها از وی می‌رود. به عبارت دیگر می‌توان گفت، هنجارهای ذهنی به تأثیرپذیری انسان از رفتار و توصیه‌های افراد مهم در زندگی و به طور کلی، اطرافیان اشاره دارند [۱۳].

کنترل رفتار درک‌شده به درک فرد از سختی یا آسانی انجام یک رفتار و همچنین به ادراک او از مهارت‌ها، فرصت‌ها و منابع در جهت انجام یک رفتار خاص مربوط می‌شود. این سازه از دو جزء تشکیل شده است. جزء اول خودکارآمدی است که بیانگر قضاوت فرد درباره توانایی‌هایش برای انجام یک رفتار می‌باشد. جزء دوم شرایط تسهیل‌کننده است که دسترس‌پذیری منابع مورد نیاز برای انجام رفتاری معین را تبیین می‌کند [۱۴].

۳- مواد و روش

۳-۱- طراحی پرسش‌نامه

به منظور مطالعه و بررسی رفتار خریداران و مصرف‌کنندگان کنسرو ماهی تن در استان مازندران، پرسش‌نامه‌ای متناسب با فرضیات تحقیق طراحی شد که دارای ۵۰ پرسش در دو بخش سوال‌های جمعیت‌شناختی (جنس، سن، میزان تحصیلات، شرایط تاهل و...) و سوال‌های اصلی بود. پرسش‌های اصلی (جدول ۱) بر اساس طیف پنج گزینه‌ای لیکرت (خیلی کم با کد ۱، کم با کد ۲، متوسط با کد ۳، زیاد با کد ۴ و خیلی زیاد با کد ۵) مورد سوال قرار گرفتند. در ابتدای پرسشنامه قید شده بود که فقط خریداران و مصرف‌

تحقیق حاضر، ۰/۹۱ محاسبه گردید که نشان‌دهنده سطح قابل قبولی از پایایی برای سوالات مورد پرسش از افراد است.

۳-۳- تعیین اعتبار (روایی)^۲ پرسش‌نامه

به منظور تعیین روایی سوالات، از تحلیل عاملی تأییدی (نرم‌افزار لیزرل) استفاده شد و با توجه به اینکه مقادیر بارهای عاملی (که برای همه سوالات بیشتر از ۰/۳ (۰/۲۸) بود) و T-value (که برای تمام سوالات خارج از بازه ۱/۹۶- تا ۱/۹۶ مثبت شد) برای همه سوالات در بازه مطلوب بدست آمدند، اطمینان حاصل شد که سوالات طراحی‌شده دارای سطح قابل قبولی از روایی هستند (جدول ۱).

کنندگان کنسرو ماهی تن می‌توانند در این پروژه شرکت کنند. جهت طراحی سوال‌های پرسش‌نامه از مطالعات مشابه داخلی و خارجی که رفتار مصرف‌کنندگان آبزیان (فراورده‌های دریایی) و اولویت‌های آن‌ها برای مصرف را ارزیابی کردند، نقطه نظرات اساتید دانشگاهی، پرسش‌نامه‌های مختلف و مطالعات کتابخانه‌ای استفاده گردید.

۳-۲- تعیین پایایی (قابلیت اعتماد)^۱ پرسش‌نامه

به منظور تعیین پایایی آزمون از روش آلفای کرونباخ استفاده گردید. بدین منظور یک نمونه اولیه شامل ۳۰ پرسش‌نامه پیش آزمون گردید و سپس با استفاده از داده‌های به دست‌آمده از این پرسش‌نامه‌ها و به کمک نرم‌افزار آماری SPSS²² میزان ضریب اعتماد با روش مذکور محاسبه شد. این ضریب برای پرسش‌نامه

Table 1. Factor loadings and T-value for questions (confirmatory factor analysis)

Questions	Factor loading	T-value	Questions	Factor loading	T-value
1. Attitude			8. Perceived risk		
Pleasure feeling	0.31	6.23	Harmful to health	0.35	6.76
Good feeling	0.45	7.96	It cannot guarantee health	0.49	8.34
bad feeling	0.29	5.82	Its ability to maintain health is less than expected	0.34	6.55
2. Packaging			9. Perceived behavior control		
Enter the expiration date	0.74	14.53	I will definitely buy	0.67	11.38
Design and color	0.29	5.79	I will probably buy	0.71	14.23
Size and weight	0.65	10.87	I have to buy	0.42	7.66
Brand	0.58	10.12	10. Place		
3. Brand			Fish market	0.55	9.82
Famous brand	0.71	14.18	Protein food supply stores	0.48	8.31
New brand	0.83	16.29	Online shop	0.69	11.49
Not important	0.43	7.88	Hypermarket	0.91	21.16
4. Quality			10. Price		
Texture Color	0.56	9.98	Expensive	0.29	5.69
Smell	0.85	17.73	Cheap	0.38	7.65
Taste	0.28	5.26	Average	0.36	7.54
Texture	0.29	5.81	11. Advertising & Education		
Type of processing	0.47	8.11	It is effective through the media	0.43	7.91
5. Subjective norms			It is effective in school and university.	0.57	9.99
People's opinion	0.34	6.49	Not important	0.39	7.12
Family's opinion	0.63	10.35	11. Intention		
Expert's opinion	0.94	23.46	I want to eat	0.45	7.94
Seller's opinion	0.37	6.84	I have a plan to eat	0.45	7.96
6. Perceived usefulness			Try to eat	0.73	14.33
More nutritional value than other foods	0.81	16.99	12. Final behavior		
More affordable than other food	0.75	15.43	One to three cans per year	0.31	6.24
Preventing diseases and maintaining health	0.33	6.41	Four to six cans per year	0.68	11.25

7. Income			Seven to nine cans per year	0.35	7.41
More than the purchase limit	0.27	4.89	Ten to twelve cans per year	0.75	15.61
Less than purchase limit	0.29	5.86	More than twelve cans per year	0.84	17.42
proportional to the purchase limit	0.61	9.97			

تبلیغات و آموزش و نهایتاً اماکن خرید از دسته متغیرهای مکنون مستقل (بروزنزا) هستند. متغیرهای نگرش، هنجارهای ذهنی، کنترل رفتار درک شده و تصمیم به خرید متغیرهای میانجی مدل را تشکیل می‌دهند و نهایتاً، افزایش سرانه مصرف (رفتار نهایی یا خرید و مصرف کنسرو ماهی تن) جز متغیرهای مکنون وابسته (درونزا) می‌باشد.

۴-۳- فرضیات پژوهش و ساخت مدل مفهومی بر پایه آن‌ها

جدول ۲ فرضیات پژوهش را نشان می‌دهد. بر پایه همین فرضیات که برگرفته از نظریه رفتار برنامه‌ریزی شده هستند، مدل مفهومی متناسب طراحی گردید که دیاگرام آن در شکل ۱ نشان داده است. در این مدل متغیرهای برند، کیفیت، مشخصات بسته‌بندی، سودمندی درک شده، درآمد، ریسک درک شده، قیمت،

Table 2. Hypothesis of research

Number	Hypothesis
1	The brand of canned tuna has a significant effect on citizens' attitudes toward buy and consumption.
2	The quality of canned tuna has a significant effect on citizens' attitudes toward buy and consumption.
3	The packaging specification of canned tuna has a significant effect on citizens' attitudes toward buy and consumption.
4	Perceived usefulness has a significant effect on citizens' mental norms.
5	Income of citizens has a significant effect on citizens' mental norms.
6	Perceived risk has a significant effect on citizens' mental norms.
7	Price has a significant effect on citizens' perceived behavior control.
8	Advertising and education has a significant effect on citizens' perceived behavior control.
9	Shopping place has a significant effect on citizens' perceived behavior control.
10	Attitude of citizens towards canned tuna has a significant effect on intention to buy and consumption.
11	Mental norms has a significant effect on intention to buy and consumption of canned tuna.
12	Perceived behavior control has a significant effect on intention to buy and consumption of canned tuna.
13	The intention to buy and consumption of canned tuna has a significant effect on citizens' final behavior (buy and consumption of canned tuna).
14	Perceived behavior control has a significant effect on citizens' final behavior (buy and consumption of canned tuna).

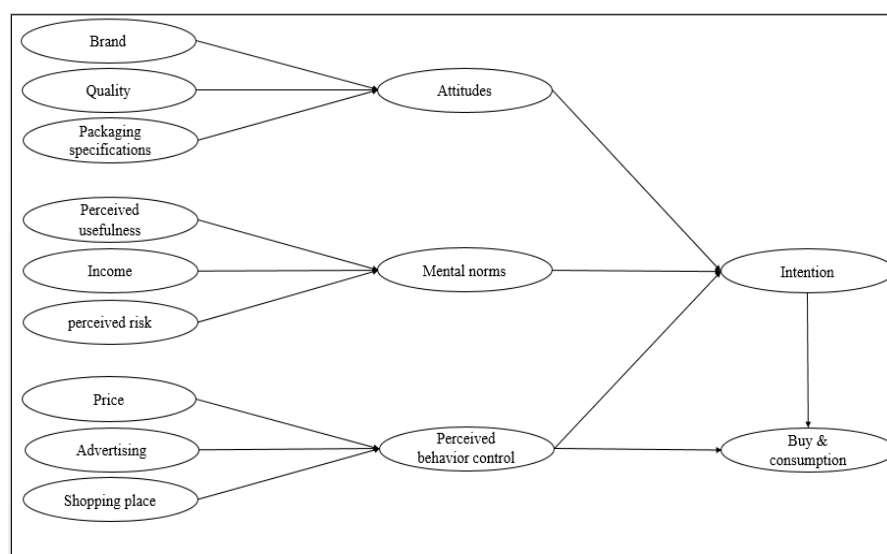


Fig 1. Diagram of conceptual model of research

۳-۵- جامعه آماری پژوهش

نمونه از طریق فرمول کوکران^۳ ۳۸۴ نفر محاسبه شد اما به منظور کسب نتایج قابل اطمینان‌تر از تعداد ۶۰۰ پرسش‌نامه استفاده گردید. تعداد نمونه در هر شهر بر حسب جمعیت آن شهر نسبت به جمعیت کل محاسبه گردید. در جدول ۴ ویژگی‌های جمعیت‌شناختی جامعه آماری نیز ارائه شده است.

جامعه آماری تحقیق حاضر استان مازندران است که به صورت تصادفی ۱۰ شهر (بهشهر، ساری، قائمشهر، آمل، بابلسر، نور، نوشهر، چالوس، تنکابن و رامسر) برای انجام مراحل میدانی پژوهش انتخاب شدند (جدول ۳). حجم

Table 3. Statistical society of research

City	Population size	Percentage of the total population	Sample size
Behshar	94702	8.05	48
Sari	347402	29.5	177
Qaemshahr	204953	17.4	104
Amol	237528	20.17	121
Babolsar	59966	5.1	31
Noor	26947	2.28	14
Nowshahr	49403	4.19	25
Chalus	65196	5.53	33
Tonekabon	55434	4.7	28
Ramsar	35997	3.05	19
Total	1177528	100	600

Table 4. Socio-demographic characteristics of the sample (% respondents, n=600)

Characteristics	Abundance	Characteristics	Abundance
Gender		Place of birth	
Male	59.6	Coastal city	92.4
Female	40.4	Non-coastal city	7.6
Age		Household size	
<20 years	6.5	Two	9.3
20-35 years	29.1	Three	23.7
35-50 years	52.8	Four	51.9
50-65 years	9.7	Five and more	15.1
65-80 years	1.9	Income (Rials)	
Education		100-150 millions	19.2
College education	80.9	150-200 millions	56.8
Diploma & less	19.1	200-250 millions	17.6
Marital Status		250 millions $\geq$	6.4
Married	74.6		
Single	25.4		
Job			
Free	52.5		
Employee	21.6		
Student	9.1		
Unemployed	6.2		
Retired	10.6		

۳-۶- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور انجام تحلیل عاملی تأییدی، بررسی قبول یا رد فرضیه‌ها (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) و همچنین شدت رابطه بین سازه‌های مدل از روش مدل‌سازی معادلات ساختاری و نرم‌افزار لیزرل (نسخه ۸/۸۰) استفاده گردید. در این روش، مدل تحقیق در دو حالت استاندارد (به منظور بررسی ضرایب اثر بین سازه‌های مدل) و معنی‌داری (جهت ارزیابی وضعیت فرضیات و مقادیر T) اجرا شد. فرضیاتی که مقادیر شاخص T-value برای آن‌ها خارج از بازه $-1/96$ تا $1/96$ قرار گیرد، مورد پذیرش قرار می‌گیرند و در غیر این صورت رد خواهند شد. در ادامه، جهت ارزیابی و رتبه‌بندی اولویت‌های جامعه آماری پیرامون برخی از خصوصیات

کنسرو ماهی تن از آزمون فریدمن (نرم‌افزار SPSS22) استفاده گردید.

۴- نتایج

۴-۱- میزان خرید و مصرف کنسرو ماهی تن (قوطی) در جامعه آماری

جدول ۵ میزان خرید کنسرو ماهی تن (قوطی) را در خانوارهای جامعه آماری نشان می‌دهد. مطابق این جدول، بیشتر خانوارها (۵۹/۶ درصد) سالیانه ۱۰ تا ۱۲ عدد قوطی کنسرو خریداری و مصرف می‌کنند. همچنین درصد خانوارهایی که بیش از ۱۲ عدد قوطی در سال خریداری و مصرف می‌کردند، ۷/۱ درصد گزارش شد.

Table 5. Level of consumption of canned tuna in the statistical population

Amount of household purchases	Abundance (%)
One to three cans per year	2.4
Four to six cans per year	12.6
Seven to nine cans per year	18.2
Ten to twelve cans per year	59.6
More than twelve cans per year	7.1

درصد افراد این سائز را در اولویت‌های اول و دوم انتخاب کردند. سائزهای ۱۲۰ تا ۱۵۰ گرم، ۱۰۰ تا ۱۲۰ گرم و بیشتر از ۱۸۰ گرم به ترتیب در اولویت‌های دوم تا چهارم قرار گرفتند (جدول ۶).

همانطور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود، اکثر شهروندان مورد مطالعه از بین اماکن مختلف خرید کنسرو ماهی تن، هایپرمارکت‌ها را ترجیح دادند (رتبه اول و میانگین رتبه ۱/۴۴). به این صورت که این مکان در اولویت‌های اول و دوم ۸۳/۱ درصد افراد جامعه آماری قرار داشت. پس از هایپرمارکت‌ها، آنلاین مارکت‌ها از جمله اماکن مورد توجه و مراجعه شهروندان به منظور تامین کنسرو ماهی تن بودند. به گونه‌ای که حدود ۶۳ درصد از پاسخ‌دهندگان این اماکن را در اولویت‌های اول و دوم انتخاب کردند.

۴-۲- اولویت‌های جامعه آماری پیرامون مشخصات بسته-

بندی، سائز بسته و محل خرید کنسرو ماهی تن

در جدول ۶ اولویت‌های جامعه آماری پیرامون مشخصات بسته‌بندی، سائز بسته و محل خرید کنسرو ماهی تن ارائه شده است (رتبه‌بندی). مطابق این جدول، مهم‌ترین فاکتوری که در مورد قوطی کنسرو (بسته‌بندی) مورد توجه خریداران و مصرف‌کنندگان قرار داشت، برند یا نام تجاری محصول بود (رتبه یک و میانگین رتبه ۱/۲۴). پس از برند، طرح و رنگ قوطی، فاکتوری بود که از نظر شهروندان مازندران حائز اهمیت بود (رتبه ۲ و میانگین رتبه ۲/۳۶). سائز قوطی و تاریخ انقضا محصول دو مشخصه دیگر مورد بررسی بودند که به ترتیب در درجه سوم و چهارم اهمیت جای گرفتند. در مورد سائز بسته‌بندی، وزن ۱۵۰ تا ۱۸۰ گرم در رتبه نخست قرار داشت (رتبه اول و میانگین رتبه ۱/۴۲) و ۸۳

Table 6. Consumer's preferences regarding packaging specifications, weight of packaging and place of purchase of canned tuna

Options	Consumer preferences				Average score	rank	Friedman	Significance level
	1	2	3	4				
1. Packaging specifications								
Expiration date	6.6	9.7	30.4	53.3	3.85	4	349.18	0.001
Design and color	32.1	31.7	20.9	15.3	2.36	2		
Size (weight)	19.8	24.1	33.6	22.1	3.12	3		
Brand	41.3	34.5	14.9	8.9	1.24	1		
2. Weight of packaging								
100-120g	11.1	26.3	41.5	20.4	2.96	3	354.87	0.001
120-150g	29.2	32.9	23.1	14.8	2.11	2		
150-180g	53.7	29.3	16.2	0.8	1.42	1		
More than 180g	6	11.2	19.1	63.5	3.75	4		
3. Place of purchase								
Protein food supply stores	10.7	24.8	42.9	20.8	3.11	3	361.57	0.001
Hypermarkets	49.9	33.2	15.6	1.1	1.44	1		
Online shop	32.8	29.6	23.1	14.3	2.39	2		
Fish market	6.3	12.4	17.8	63.4	3.85	4		

هستند (به ترتیب با ضرایب اثر ۰/۵۲، ۰/۵۶ و ۰/۴۱). در ادامه مشخص شد از بین سه سازه اصلی مدل یعنی نگرش، هنجار ذهنی و کنترل رفتار درک شده، نگرش شهروندان نسبت به خرید و مصرف کنسرو ماهی تن دارای بیشترین اثر بر تصمیم به خرید و مصرف این محصول می باشد (با ضریب اثر ۰/۴۷). همچنین در مدل اجرا شده در حالت استاندارد، بالاترین ضریب اثر مربوط به اثرگذاری معنی دار سازه تصمیم به خرید و مصرف بر سازه رفتار نهایی بود (با ضریب اثر ۰/۷۶). نهایتاً سازه کنترل رفتار درک شده نیز به صورت معنی داری با ضریب اثر ۰/۲۵ بر سازه خرید و مصرف (رفتار نهایی) موثر بود.

۳-۴- اجرای مدل تحقیق در حالت استاندارد و معنی داری

شکل ۲، اجرای مدل مفهومی تحقیق را در دو حالت استاندارد و معنی دار نشان می دهد (با استفاده از نرم افزار لیزرل و روش مدل سازی معادلات ساختاری). مطابق این شکل فقط فرضیه اثرگذاری معنی دار متغیر ریسک درک شده بر هنجار ذهنی جامعه آماری (فرضیه شماره ۶) رد و سایر فرضیات پژوهش تأیید شدند (قرارگیری T-value در خارج از بازه ۱/۹۶- تا ۱/۹۶). نتایج ضرایب تأثیر بین متغیرهای تحقیق و سازه های مدل نشان داد که متغیرهای برند، سودمندی درک شده و قیمت به ترتیب موثرترین عوامل بر سازه های نگرش، هنجارهای ذهنی و کنترل رفتار درک شده

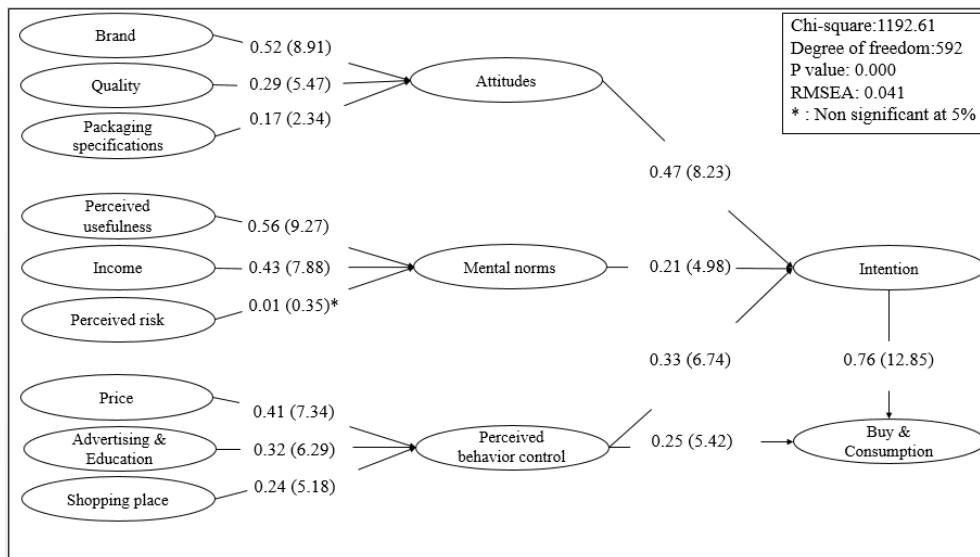


Figure 2. Running of the research model in two standard and significant modes

۴-۴- شاخص‌های برازش مدل مفهومی پژوهش

قرار دارند، می‌توان ادعا کرد که مدل از برازش مناسبی برخوردار می‌باشد. به این معنی که مدل اعتبار بسیار بالایی برای سنجش و ارزیابی روابط بین متغیرهای مورد بررسی دارد.

جدول ۷ شاخص‌های برازش مدل مفهومی تحقیق را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه این شاخص‌ها در بازه‌های استاندارد

Table 7. The measurement of model goodness of fit index (GOFI)

Fit Index	Result	The Fit Criteria	Model Evaluation
Chi-Square/Df	2.01	Chi-Square/Df ≤ 5	Good Fit
RMSEA	0.041	RMSEA ≤ 0.08	Good Fit
CFI	0.97	CFI ≥ 0.90	Good Fit
GFI	0.94	GFI ≥ 0.90	Good Fit
AGFI	0.94	AGFI ≥ 0.90	Good Fit
IFI	0.98	IFI ≥ 0.90	Good Fit
NFI	0.92	NFI ≥ 0.90	Good Fit
NNFI	0.91	NNFI ≥ 0.90	Good Fit

۵- بحث

دارد. به همین جهت مطالعه حاضر به ارزیابی رفتار خرید و مصرف این فرآورده پرداخته است.

نتایج این پژوهش نشان داد که حدود ۶۰ درصد خانوارهای جامعه آماری مورد مطالعه سالیانه ۱۰ تا ۱۲ عدد قوطی کنسرو خریداری و مصرف می‌کنند که با توجه به سرانه کم مصرف آبریان و فرآورده‌های شیلاتی در کشور، این میزان به طور نسبی قابل قبول است. البته حدود ۷ درصد از این خانوارها مقادیر بیشتر از ۱۲ عدد قوطی خرید در سال را هم تجربه می‌کردند. بر اساس گزارش تحلیلی سندیکای صنایع کنسرو ایران میزان سرانه مصرف کنسرو ماهی در کشور حدود یک

در بازار، انواع فرآورده‌های شیلاتی شامل کنسرو ماهی، فیله ماهی، شنپسل ماهی، ماهی کامل با سر و شکم‌خالی، ناگت ماهی، انواع مختلف میگوی فرآوری شده و ... یافت می‌شود که افراد بر حسب ذائقه خانوار هر کدام از این محصولات را خریداری می‌کنند. از بین این فرآورده‌ها، کنسرو ماهی تن به دلیل دسترسی آسان، ماندگاری بالا، مغذی بودن، مصرف راحت و ... از فروش و اهمیت بیشتری برخوردار بوده و سابقه مصرف طولانی‌تری نسبت به سایر فرآورده‌های مذکور

عنوان دومین متغیر موثر بر نگرش جامعه ثبت شد (با ضریب اثر ۰/۲۹). تصویر برند و یا نام برند نقش مهمی در افزایش عملکرد و رونق محصولات یک شرکت دارد. این فاکتور ابزار مهمی در تغییر رفتار خرید مردم است [۱۷].

همانطور که در بالا ذکر شد، متغیر کیفیت کنسرو تن ماهی پس از برند، دومین متغیری بود که بر سازه نگرش به صورت معنی داری موثر بود. این شاخص در کنسرو از طریق مواردی همچون رنگ بافت، نوع بافت (له شده، تکه تکه شده، پیوسته و ...)، طعم، مزه، بو و ... شناخته می شود. تحقیقات متعددی اثرگذاری معنی دار متغیر کیفیت آبیان، فرآورده های دریایی و سایر مواد غذایی را بر سازه نگرش تأیید کردند [۱، ۵ و ۱۸].

کنسروهای ماهی تن موجود در بازار دارای بسته بندی های متفاوتی از نظر طرح و رنگ (لیبل یا برچسب قوطی)، ساین و وزن هستند. در این پژوهش مشخصات بسته بندی بر نگرش شهروندان نسبت به خرید و مصرف کنسرو ماهی تن اثر معنی داری داشتند (با ضریب اثر ۰/۱۷). در تحقیقی که رفتار خریداران ماهی در غرب استان مازندران مورد بررسی قرار گرفت نیز مشخص شد ویژگی های بسته بندی می توانند بر نگرش جامعه آماری نسبت به خرید و مصرف ماهی (بسته بندی) به صورت معنی داری اثرگذار باشند [۱۸]. همچنین در پژوهشی که پیرامون نقش بسته بندی بر میزان فروش مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت، مشخص شد که فاکتورهایی مانند فرم، طرح، رنگ و جنس بسته بندی به صورت معنی داری بر افزایش فروش موثر هستند [۱۹]. رنگ (برچسب یا لیبل) قوطی کنسرو ماهی تن، یکی از ابعاد مهم بسته بندی محسوب می شود و جز اولین نمادی است که موجب جلب توجه مصرف کننده می گردد. تاثیرپذیری انسان از رنگ ها ماهیتی کاملاً روانی داشته و بطور غیرمستقیم در واکنش ها و رفتارهای فرد موثر واقع می شوند. رنگ ها یکی از علائم کلامی هستند که به عنوان یک عنصر مهم در بازاریابی محصولات شناخته شده اند. در صنعت غذا، اهمیت رنگ ها به ویژه زمانی که در ارتباط با تبلیغات و یا بسته بندی باشند، به دلیل نقشی که در جلب توجه مشتری دارند، بیشتر

کیلوگرم است (شش یا هفت قوطی) که این میزان در مقایسه با کانادا (۱/۵ کیلوگرم) و ایالات متحده (۱/۸ کیلوگرم) و اتحادیه اروپا (۲/۷ کیلوگرم) تقریباً قابل توجه بوده و ایران را در رتبه چهارم سرانه مصرف این محصول در جهان قرار داده است.

نتایج اجرای مدل مفهومی پژوهش در حالت استاندارد و معنی داری نشان داد که متغیر برند یا نام تجاری، موثرترین متغیر بر سازه نگرش بود (تأیید فرضیه مربوطه). در پژوهشی که رفتار خریداران و مصرف کنندگان میگوی بسته بندی در کشور مورد ارزیابی قرار گرفت، نام تجاری اولین و مهم ترین ویژگی بسته بندی بود که جامعه آماری به آن توجه می کردند [۱]. نتایج تحقیق Reyhani poul (۲۰۲۱) پیرامون عوامل موثر بر نگرش شهروندان تهرانی به خرید و مصرف آبیان و فرآورده های شیلاتی نیز این یافته را تأیید کرد [۱۵]. در ادامه، رتبه بندی ویژگی های قوطی نشان داد که از دیدگاه مشتریان، برند یا نام تجاری از اهمیت بسیار ویژه ای برخوردار است و این مشخصه در رتبه نخست جای گرفت؛ به گونه ای که بیش از ۴۱ درصد از شهروندان مازندرانی از میان چهار ویژگی قوطی، برند را در اولویت اول جای دادند. در واقع هم اجرای مدل و هم اولویت بندی مشخصات قوطی، اهمیت برند یا نام تجاری را در فروش محصول ثابت کردند. از رقابت های رو به رشد در بازارهای جهانی، شرکت ها را مجبور ساخته تا خودشان را در استفاده از فرصت ها و مزایا نسبت به رقبای متمایز سازند؛ به همین دلیل در سال های اخیر، مطالعه درباره توسعه برند، بسیار در مرکز توجه بوده است. در واقع یکی از اهرم هایی که منجر به فروش بیشتر (جلب توجه مشتری) و پیروزی در بازار مصرف می شود، توسعه نام تجاری (برند) محصول است [۱۶]. وقتی یک برند توسعه پیدا کرد و فراگیر شد، مشتریان تا سالیان متمادی در مراکز خرید صرفاً به دنبال همان برند هستند. شاید بتوان گفت که نام تجاری (برند) معروف در فروش یک محصول و جلب توجه مشتریان آنقدر مهم است که گاهی کیفیت مواد غذایی در پس نام تجاری پنهان می شود. این امر در تحقیق حاضر نیز مشهود بود و متغیر کیفیت به

می‌شوند [۲۰]. بعد دیگر بسته‌بندی (قوطی)، طرح آن است. این بعد به جذابیت بسته‌بندی اشاره دارد و مربوط به وجود طرح‌ها، تصاویر، ترکیب‌های رنگی، علائم، نشانه‌ها و نگاره‌های گرافیکی روی قوطی می‌شود. طبق مطالعات، گرایش و توجه مصرف‌کننده بیشتر به سمت محصولاتی با بسته‌بندی جذاب‌تر معطوف می‌شود [۲۱]. طرحی برای قوطی کنسرو مناسب و کارا است که بتواند در تمامی فرایندهای بازاریابی تولیدکننده را بر رقبای پیروز کند. به این صورت که این طرح باید سریعاً جلب توجه کند، موجب تشدید علاقه و تمایل به خرید در مصرف‌کننده شود، افراد را وادار به خرید کند و در انتها رضایت مشتری را به دنبال داشته باشد تا بتواند موجب فروش مستمر محصول گردد. بنابراین بسته‌بندی محصول مساله‌ای است که شرکت‌ها و تولیدکنندگان به لحاظ تغییرات و رقابت زیاد مجبورند که دائماً آن را کنترل نموده و در صورت لزوم تغییراتی در آن بوجود آورده و با فن‌آوری جدید (که در واقع پاسخی به نیاز ایجادشده در مصرف‌کنندگان در طول زمان است) هماهنگ کنند. تولیدکنندگان محصولات غذایی برای رسیدن به اهداف ارتباطی به طور موثر و بهینه‌کردن پتانسیل بسته‌بندی باید از پاسخ و واکنش مصرف‌کننده به بسته‌هایشان آگاه باشند و فرایندهای ادراکی مصرف‌کننده را با طراحی ادغام و در ابعاد مختلف بسته‌بندی لحاظ کنند. در فرآیند طراحی، بازاریابان و طراحان بسته‌بندی باید تجربیات گذشته مصرف‌کننده، نیازها و خواسته‌های وی را مد نظر داشته باشند؛ درک کنند که چگونه عناصر طراحی بسته‌بندی توجه مصرف‌کننده را به بسته و پیام‌های روی بسته جلب می‌کنند؛ و به طور گسترده، طراحی بسته‌بندی را برای اثر بخشی بسته‌ها در امور و اهداف ارتباطی مورد ارزیابی قرار دهند [۲۲]. در پژوهش پیش رو نتایج رتبه‌بندی مشخصات بسته‌بندی و یا ویژگی‌های قوطی نشان داد که طرح و رنگ در بین ویژگی‌های قوطی در رتبه دوم قرار داشت و حدود ۶۴ درصد شهروندان مازندرانی طرح و رنگ قوطی را در اولویت‌های اول و دوم خرید مورد توجه قرار دادند. این یافته‌ها در کنار مطالب ذکرشده در بالا مؤند اهمیت بسیار زیاد طرح و رنگ قوطی در انتخاب انواع کنسروهای

ماهی تن در فروشگاه‌ها هستند. یافته‌های مربوط به اولویت‌بندی اوزان مختلف قوطی مویید آن بود که سایز ۱۵۰ تا ۱۸۰ گرم در اولویت نخست شهروندان قرار دارد (رتبه اول). یکی از عواملی که در تعیین اولویت‌های مربوط به سایز و وزن دخالت دارد، قیمت و میزان تناسب قیمت و سایز است. غالباً کنسروهای ماهی تن با وزن ۱۸۰ گرم عرضه می‌شوند اما به ندرت اوزان دیگری هم تولید و به فروش می‌رسند. شاید یکی از دلایلی که اولویت نخست جامعه آماری اوزان ۱۵۰ تا ۱۸۰ گرم است، این باشد که در برخی از فروشگاه‌ها گزینه دیگری جهت خرید ندارند.

مطابق یافته‌ها، متغیر سودمندی درک‌شده موثرترین متغیر بر هنجارهای ذهنی شهروندان مازندرانی بود. این بدان معناست که افراد جامعه آماری هنگام پذیرش توصیه اطرافیان و متخصصان به مصرف کنسرو ماهی تن بر ارزش غذایی و فوائد مصرف آن آگاه هستند. همچنین عدم تأثیرگذاری متغیر ریسک درک‌شده بر سازه هنجارهای ذهنی نشان از آن دارد که افراد جامعه آماری مورد پرسش ریسک و خطر ناچیز مصرف کنسرو ماهی تن را که در برخی از رسانه‌ها مطرح می‌شود جدی نمی‌گیرند.

درآمد یکی دیگر از متغیرهای موثر بر هنجار ذهنی خریداران و مصرف‌کنندگان کنسرو ماهیان تن بود که کاملاً قابل توجهی و یافته‌ای است که با منطق سازگار است. اکثر تحقیقاتی که پیرامون بازاریابی آبریان و فرآورده‌های دریایی انجام شده‌اند به این مهم اشاره کردند [۲۳-۲۷]. اینکه اثرگذاری درآمد بر هنجار ذهنی شهروندان (۰/۴۳) کمتر از سودمندی درک‌شده است، حاکی از اهمیت‌دادن خاص جامعه به وجود آبریان و فرآورده‌های شیلاتی در سبد غذایی خانوار می‌باشد؛ چرا که آن‌ها این محصول را مغذی دانسته و به فوائد آن آگاه هستند و سعی دارند با هر سطح درآمدی، از این محصول استفاده نمایند.

به طور کلی یکی از مهم‌ترین مواردی که مردم برای مصرف مواد غذایی مختلف به آن توجه می‌کنند، قیمت محصول است. Magnusson و همکاران (۲۰۰۱) معتقدند که بسیاری از مصرف‌کنندگان قیمت را عامل مهم تعیین‌کننده خرید در

کلی در مورد این فرآورده‌ها، جامعه شاهد تبلیغات (در رسانه‌های مختلف) و آموزش (در مدرسه و دانشگاه) موثری نیست و همین عامل می‌تواند یکی از چند ده دلیلی باشد که سرانه مصرف آبزیان و فرآورده‌های دریایی در کشور کمتر از حد استاندارد است.

با توسعه محل‌های عرضه آبزیان و فرآورده‌های آن‌ها نظیر کنسرو تن ماهی، بسته به ویژگی محل از جمله دکور و طرز چیدمان، بهداشت و نظافت محیط، شلوغی و یا خلوتی مرکز، بو و تهویه محل عرضه، پوشش و نظافت فروشنده، برخورد مناسب فروشنده با مشتری، مدیریت مرکز، شیک و به روز بودن محل فروش، دسترسی آسان و ... افراد یک مرکز و یا محل خرید را ترجیح می‌دهند [۳۲]. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که مکان خرید کنسرو ماهی تن به صورت قابل ملاحظه‌ای بر سازه کنترل رفتار درک‌شده موثر است که این نتیجه با پژوهش ریحانی‌پول و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد [۱]. امروزه فرآورده‌های دریایی از جمله کنسرو ماهی تن در اماکن مختلفی از جمله بازارهای ماهی، فروشگاه‌های عرضه محصولات پروتئینی، آنلاین مارکت‌ها، هایپرمارکت‌ها و ... به فروش می‌رسند. نتایج پژوهش حاضر موید آن بود که از بین مراکز مذکور، رتبه اول مربوط به هایپرمارکت‌ها است. با توجه به قدیمی‌بودن کنسرو ماهی تن (وجود این محصول در همه هایپرمارکت‌ها و یا سوپرمارکت‌ها) و به روز بودن و در دسترس بودن هایپرمارکت‌ها، حدود ۵۰ درصد شهروندان مازندرانی در اولویت اول از این اماکن محصول مورد بررسی را خریداری می‌کردند (جدول ۶). در ادامه مشخص شد که رتبه دوم اماکن خرید مربوط به فروشگاه‌های اینترنتی است که در جای خود درخور توجه است. در این فروشگاه‌ها انواع آبزیان بسته‌بندی و کنسروهای ماهی تن (با تنوع بسیار بیشتری نسبت به سایر مراکز) عرضه می‌شوند و خریدار تنها در عرض چند دقیقه خرید خود را انجام می‌دهد و طی زمان کوتاهی سفارش خود را درب منزل دریافت می‌کند. همین آسانی خرید و دریافت محصول از جمله دلایل اصلی رجوع شهروندان به این مراکز آنلاین است. برحسب یافته‌ها، رتبه سوم اماکن خرید مربوط به فروشگاه‌های عرضه

نظر می‌گیرند [۲۸]. قیمت را می‌توان میزان فایده‌ای دانست که مصرف‌کنندگان برای مزایای حاصل از داشتن یا استفاده از کالا یا خدمت پرداخت می‌کنند [۲۹]. قیمت آبزیان جزء عوامل آمیخته بازاریابی است که تصور کم‌بودن (ارزان بودن) آن بر مصرف به صورت جدی تاثیرگذار است. این فاکتور از طریق مطلوبیت یا ویژگی‌های ایجادکننده رضایت، تثبیت می‌شود و با برداشت‌های مشتریان از خصوصیات و مزایایی که بهره می‌برند ارتباط دارد [۳۰]. بنابر مطالعه Hawkins و همکاران (۲۰۰۴)، فاکتور قیمت به عنوان یک عامل موثر بر برداشت مصرف‌کننده از کیفیت انواع کالاها مطرح است [۳۱]. نتایج تحقیق پیش‌رو مطابق پژوهش‌های مذکور بوده و قیمت کنسرو ماهی تن موثرترین متغیر بر سازه کنترل رفتار درک‌شده جامعه آماری بود. در حال حاضر در بازار قیمت کنسرو ماهی تن در مقایسه با سایر مواد غذایی یک قیمت نرمال و مقرون به صرفه به نظر می‌رسد. کنسروهای ماهی تن موجود در بازار بسته به وزن و سایز، نوع فرآوری و طعم‌های مختلف (روغن زیتون، شویدی، فلفلی، سیر و فلفل، لوبیا ماهی و ...) قیمت‌های مختلفی دارند.

در این پژوهش، متغیرهای تبلیغات و آموزش بر کنترل رفتار درک‌شده شهروندان جهت خرید و مصرف کنسرو ماهی تن اثر معنی‌داری داشتند (دومین متغیر موثر بر کنترل رفتار درک‌شده با ضریب اثر ۰/۳۲). تبلیغات آنقدر در تغییر گرایشات غذایی، تصمیم به خرید (مصرف) و همچنین رفتار مصرف‌کنندگان موثر است که شرکت‌های تولید مواد غذایی مختلف بخش زیادی از سود خود را به تبلیغات محصول اختصاص می‌دهند. تبلیغات در صورتی که به صورت مکرر و هدفمند باشد باعث ایجاد میل به خرید یا استفاده از یک محصول غذایی خاص می‌شود. آموزش نیز نقشی در آمیخته با تبلیغات دارد. در صورتی که به مردم اطلاعات و مطالبی پیرامون انواع فرآورده‌های دریایی، ارزش غذایی آن‌ها، صرفه اقتصادی آن‌ها و ... در قالب تبلیغات (رادیو، تلویزیون، بیلبردهای شهری و بین شهری) آموزش داده شود، همین امر می‌تواند در سوق دادن مردم به سمت استفاده از فرآورده‌های دریایی به عنوان غذای سلامتی بسیار موثر باشد. به طور

در برخی از جوامع آماری ممکن است تصمیم بر رفتار نهایی بی‌اثر باشد که این امر اشاره به این واقعیت دارد که گفتار و تصمیم آسان‌تر از عمل است.

۶- نتیجه‌گیری

میزان مصرف کنسرو ماهی تن در استان مازندران علیرغم نزدیکی به ساحل و وجود ماهیان تازه، قابل توجه و نسبت به سرانه مصرف آبزیان (که از میزان استاندارد کمتر می‌باشد) در حد نرمال و شاید خارج از انتظار است. شهروندان مازندرانی جهت خرید کنسرو ماهی تن در مراکز خرید، به دو فاکتور برند و طرح و رنگ قوطی توجه ویژه‌ای دارند و این دو فاکتور در انتخاب محصول در قفسه هایپرمارکت‌ها (به عنوان اولویت اول اماکن خرید) بسیار مهم هستند. لذا شرکت‌های تولیدی جهت افزایش بهره‌وری و سود پایدار باید به این عوامل اهتمام ویژه‌ای ورزند. در ادامه ثابت شد که برند محصول تا جایی برای جامعه آماری مهم است که میزان اثرگذاری آن بر نگرش شهروندان بیشتر از کیفیت محصول می‌باشد. شهروندان مازندرانی به مزایا و ارزش غذایی کنسرو ماهی تن آگاه هستند و خطر اندک مصرف این محصولات که گاها در رسانه‌ها از طرف متخصصین توصیه می‌شود، برایشان جدی نیست. قیمت کنسرو ماهی تن، اماکن خرید و تبلیغات و آموزش بر کنترل رفتار درک‌شده شهروندان و نهایتاً بر تصمیمشان بر خرید اثرگذار است. لذا تعدیل قیمت، تجهیز هایپرمارکت‌ها به به‌روزترین فرآورده‌های شیلاتی بخصوص انواع کنسروهای ماهی تن، آموزش افراد در مدرسه و دانشگاه و همچنین تبلیغات این محصول در رسانه‌های مختلف به دست‌اندرکاران امر تولید فرآورده‌های شیلاتی (جهت افزایش بهره‌وری) و مدیران سلامت جامعه توصیه می‌گردد.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جهت حمایت مالی تقدیر و تشکر به عمل آورند.

فرآورده‌های پروتئینی بود. در این فروشگاه‌ها در کنار آبزیان و فرآورده‌های دریایی، سایر محصولات پروتئینی از جمله مرغ، گوشت قرمز، سوسیس، کالباس و ... نیز عرضه می‌شود و معمولاً افرادی برای خرید کنسرو ماهی تن به این اماکن مراجعه می‌کنند که به غیر از این محصول، نیازمند خرید سایر فرآورده‌های پروتئینی نیز باشند. به همین دلیل فروشگاه‌های عرضه فرآورده‌های پروتئینی در رتبه‌های نخست جایی نداشتند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بازارهای عرضه آبزیان در رتبه چهارم قرار دارند و شهروندان مازندرانی جهت خرید کنسرو ماهی تن به این بازارها تمایل چندانی ندارند به گونه‌ای که فقط ۶۳ درصد پاسخ‌دهندگان این مکان را در اولویت نخست جای دادند. شلوغی و بوی نامطبوع محیط می‌تواند از جمله دلایل احتمالی این یافته باشند. دسترسی سخت نیز می‌تواند از دیگر عوامل احتمالی کاهش تمایل شهروندان به این بازارها باشد. چرا که بازارهای فروش آبزیان برخلاف هایپرمارکت‌ها (که در اکثر نقاط شهر وجود دارند)، اغلب در یک نقطه خاصی از شهر واقع شده‌اند و شهروندانی که نسبت به این نقطه دور هستند، گرایش چندانی به بازارهای مذکور ندارند. بنابر مشاهده میدانی تیم تحقیق، بازارهای محلی ماهی در استان مازندران بیشتر محل فروش ماهیان کامل و تازه است و توجه خاصی به فرآورده‌های دریایی در این اماکن نمی‌شود (برخلاف بازارهای محلی آبزیان در استان‌ها و شهرهای غیر ساحلی).

نتایج این پژوهش نشان داد که تصمیم به خرید و مصرف کنسرو ماهی تن، تحت تأثیر هر سه سازه مهم نظریه رفتار برنامه‌ریزی‌شده یعنی نگرش، هنجارهای ذهنی و کنترل رفتار درک‌شده قرار دارد که این یافته با نتایج سایر تحقیقات مشابه همخوانی دارد [۱، ۴، ۵ و ۷]. در تحقیق پیش‌رو، فرضیه مبنی بر اثر مثبت و معنی‌دار سازه تصمیم به خرید بر رفتار نهایی تأیید شد که این یافته با سایر تحقیقاتی که در این زمینه و زمینه‌های مشابه انجام شدند، مطابقت دارد [۳۳، ۳۴]. اثرگذاری معنی‌دار سازه تصمیم به خرید و مصرف بر رفتار نهایی (خرید و مصرف) نشان از آن دارد که جامعه آماری مورد مطالعه تصمیم و گفتار خود را به عمل تبدیل می‌کند.

۸-منابع

- [1] Reyhani Poul, S., Alishahi, A., Adeli, A., Nargesian, A., and Ojaq, M. Study and assessment of the behavior of shrimp consumers in Iran based on the theory of planned behavior. *Journal of Food Science and Technology*. 2019; 90(16): 65-77 [In Persian].
- [2] Najafabadi, F., and Alhosseini, M. Checking the intention to consume organic food products using the theory of planned behavior. *Journal of Business Strategies*. 2017; 24(10): 35-46 [In Persian].
- [3] Reyhani Poul, S., Alishahi, A., Adeli, A., Nargesian, A., and Ojaq, M. Study of behavior, priorities and barriers of shrimp consumers in Iran. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 2019; 28(6): 35-47 [In Persian].
- [4] Ghifarini, A. F., Sumarwan, U., and Najib, M. Application of theory of planned behavior in shrimp consumer behavior analysis. *Independent Journal of Management & Production*. 2018; 9(3): 984-1001.
- [5] Thong, N. T., and Olsen, S. O. Attitude toward and consumption of fish in Vietnam. *Journal of Food Products Marketing*. 2012; 18(2): 79-95.
- [6] Rortveit, A. W., and Olsen, S. O. Combining the role of convenience and consideration set size in explaining fish consumption in Norway. *Appetite*. 2009; 52(2): 313-317.
- [7] Verbeke, W., and Vackier, I. Individual determinants of fish consumption: application of the theory of planned behaviour. *Appetite*. 2005; 44(1): 67-82.
- [8] Ajzen, I., and Madden, T. J. Prediction of goal-directed behavior: Attitudes, intentions, and perceived behavioral control. *Journal of experimental social psychology*. 1986; 22(5): 453-474.
- [9] Bogers, R. P., Brug, J., van Assema, P., and Dagnelie, P. C. Explaining fruit and vegetable consumption: the theory of planned behaviour and misconception of personal intake levels. *Appetite*. 2004; 42(2): 157-166.
- [10] Ajzen, I. The theory of planned behavior. *Organizational Behavior and Human Decision Processes*. 1991; 50(2): 179-211.
- [11] Madden, T. J., Ellen, P. S., and Ajzen, I. A comparison of the theory of planned behavior and the theory of reasoned action. *Personality and social psychology Bulletin*. 1992; 18(1): 3-9.
- [12] Eagly, A. H., and Chaiken, S. Attitude structure and function. In D. T. Gilbert, S. T. Fiske and G. Lindzey (Eds), *The Handbook of Social Psychology* (4th edn. Vol. 1, pp. 269-322). New York: McGraw-Hill. 1998.
- [13] Voon, J. P., Ngui, K. S., and Agrawal, A. Determinants of willingness to purchase organic food: An exploratory study using structural equation modeling. 2011; 4(2): 103-120.
- [14] Taylor, S., and Todd, P. A. Understanding information technology usage: A test of competing models. *Information systems research*. 1995; 6(2): 144-176.
- [15] Reyhani Poul, S. Factors affecting consumers and buyers' attitude toward fish and fishery products packaging in Tehran city. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2021; 20(6): 1727-1739.
- [16] Adibpour, M., Ferdosi, Sh., and Moshabaki, A. Influencing factors in attitudes towards homogeneous brand Extension the Case of: Shirin Asal Company. *Modern marketing research*. 2017; 1(28): 21-34.
- [17] Shehzad, U., Ahmad, S., Iqbal, K., Nawaz, M., and Usman, S. Influence of brand name on consumer choice & decision. *IOSR Journal of Business and Management (IOSR-JBM)*. 2014; 16(6): 72-76.
- [18] Reyhani Poul, S. Analysis of conceptual model of fish buyer's behavior (Case study: west of Mazandaran Province). *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 2021; 30 (3): 149-163.
- [19] Khosro shahi, S., Jafar Nia, N., and Hesarinejad, M. The effect of packaging on the food packaged products marketing. *Journal of Food Science and Technology*. 2019; 91(16):213-218.
- [20] Hammond, D., Daniel, S., and White, C. M. The effect of cigarette branding and plain packaging on female youth in the United

- Kingdom. *Journal of Adolescent Health*. 2013; 52(2): 151-157.
- [21] Rundh, B. The multi-faceted dimension of packaging: marketing logistic or marketing tool?. *British food journal*. 2005; 107(9): 670-684.
- [22] Mehrani, K., Hasangholipour, T., Seyedjavadin, R. Investigating the effect of packaging of domestically produced food products on consumer behavior. Master's thesis, University of Tehran, Tehran. 2009.
- [23] Trondsen, T., Scholderer, J., Lund, E., and Eggen, A. E. Perceived barriers to consumption of fish among Norwegian women. *Appetite*. 2003; 41(3): 301-314.
- [24] Sayin, C., Emre, Y., Mencet, M. N., Karaman, S., and Tascioglu, Y. Analysis of factors affecting fish purchasing decisions of the household: Antalya district case. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2010; 9(12): 1689-1695.
- [25] Kessuvan, A., Parthanadee, P., and Buddhakulsomsiri, J. The study of consumption behaviors and factors affecting decision to purchase fishery products of consumers in the North and Northeast of Thailand. *International Food Research Journal*. 2015; 22(6): 206-217.
- [26] Ahmed, A. F., Mohamed, Z., and Ismail, M. M. Determinants of fresh fish purchasing behavior among Malaysian consumers. *Current Research Journal of Social Sciences*. 2011; 3(2): 126-131.
- [27] Petrenya, N., Dobrodeeva, L., Brustad, M., Bichkaeva, F., Menshikova, E., Lutfalieva, G., and Odland, J. Ø. Fish consumption and socio-economic factors among residents of Arkhangelsk city and the rural Nenets autonomous area. *International journal of circumpolar health*. 2011; 70(1): 46-58.
- [28] Magnusson, M. K., Arvola, A., Koivisto Hursti, U. K., Åberg, L., and Sjöden, P. O. Attitudes towards organic foods among Swedish consumers. *British food journal*. 2001; 103(3): 209-227.
- [29] Senobar, N., motefakker Azad, M., and Razi, N. Islamic values in marketing mix decisions. *Journal of Organizational Culture Management*. 2010; 8(21): 5-32.
- [30] Roosta, A., Venus, D., and Ebrahimi, A. Marketing Management. Organization of studying and compiling humanities books of universities. 420 p. 1996.
- [31] Hawkins, D.I., Best, R.J., and Coney, K.A. Consumer behavior: Building marketing strategy (9th ed.). New York: Irwin McGraw-Hill, 2004; 284p.
- [32] Adeli, A. A study of some situational factors on home consuming behavior fishes in Tehran. *Journal of Fisheries*. 2014; 67(2): 251-261.
- [33] Shen, Y. P. Consumption Intentions toward green restaurants: Application of theory of planned behavior and altruism. *International Journal of Management, Economics and Social Sciences (IJMESS)*. 2017; 6(3): 121-143.
- [34] Maichum, K., Parichatnon, S., and Peng, K. C. Factors affecting on purchase intention towards green products: A case study of young consumers in Thailand. *Young*, 2017; 16(5): 330-335.



Scientific Research

Explaining the pattern of consumption and evaluating behavior of canned tuna buyers and consumers in Mazandaran province using the theory of planned behavior

Soheyl Reyhani Poul^{1*}, Sakineh Yeganeh², Shabnam Haghighat khajavi³, Mohammad khalili⁴

1- PhD graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

3- Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

4- Bachelor graduate, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2024/6/30

Accepted: 2024/9/18

Keywords:

Marine products,

Theory of planned behavior,

Packaging,

Brand,

Mazandaran

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.15.

*Corresponding Author E-
soheylreyhani@gmail.com

The purpose of this research was to study the buying and consumption pattern of canned tuna in Mazandaran province using the theory of planned behavior. For this purpose, after determining the research hypotheses, a suitable questionnaire was designed and completed by the statistical community. The statistical population of the research was the entire Mazandaran province that 10 cities were randomly selected for field study with a sample size of 600 people. In order to test the hypotheses and examine the intensity of the relationship between their items, an appropriate conceptual model was designed and analyzed using Lisrel software (the structural equation modeling method). According to the findings, about 60% of the households of the statistical population bought and consumed 10 to 12 cans of canned tuna every year. Brand, size 150 to 180 grams, as well as hypermarkets were among the first priorities of the statistical community regarding the three indicators of packaging characteristics, size and shopping places. The results of running the research conceptual model in two modes, standard and significant, showed that only the hypothesis of a significant effect of perceived risk on subjective norms was rejected and other hypotheses were confirmed. According to the results, among the three variables of brand, quality and packaging specifications, canned tuna brand had the greatest effect on buyers' attitudes with an impact factor of 0.52. In the following, it was found that the effect of perceived usefulness on subjective norms (0.56) is more than income (0.43). According to the findings, the price of canned tuna with an effect coefficient of 0.41, advertising and education variable with an effect coefficient of 0.32, and shopping places variable with an effect coefficient of 0.24 were significantly effective on the perceived behavior control element. Among the attitude, subjective norms and perceived behavior control elements, the most effective element on the decision to buy and consume canned tuna was attitude (with an effect coefficient of 0.47). The output of such studies will be of great help to the officials related to fisheries economy and community health, respectively, in determining appropriate strategies to increase productivity and maintain population health.



بهینه سازی ویژگی های عملکردی پایداری کف پروتئین نخود کابلی رقم آنا

هانیه رضایی برزانی^۱، نفیسه زمین دار^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- نویسنده مسئول: دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۵	پروتئین نخود یک پروتئین طبیعی با کیفیت بالا در نظر گرفته می شود، که بعنوان یک ماده مغذی یا ماده اصلی غذاهای سودمند برای سلامتی استفاده می شود. در پژوهش حاضر تاثیر چهار متغیر مستقل زمان (۶۰-۲۰) دقیقه، دما (۳۵-۴) درجه سلسیوس، pH (۸/۵-۱۰) و نسبت جامد به حلال (آب دیونیزه) (۱:۱۵-۱:۱۰) بر بهینه سازی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین نخود کابلی رقم آنا، و خصوصیات عملکردی آن، شامل ظرفیت تشکیل و پایداری کف (۳۰ و ۱۸۰ دقیقه) در طی ۳۰ اجرای استاندارد با استفاده از روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی و ۶ تکرار در نقطه مرکزی، مورد ارزیابی قرار گرفت. حداکثر ظرفیت تشکیل کف و پایداری آن با شرایط بهینه ی دمای سانتریفوژ ۴/۰۵۵ درجه سلسیوس، زمان ۵۴/۲۷ دقیقه، مقدار pH ۸/۵۱۷ و نسبت جامد به حلال ۱:۱۰/۲۲۰ بدست آمد. بیشترین پایداری کف پس از گذشت ۴۰ دقیقه در pH برابر با ۸/۵ مشاهده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که پروتئین نخود کابلی رقم آنا قابلیت استفاده به عنوان جزئی از فرمولاسیون غذایی را داشته که ارزش غذایی و ویژگی های عملکردی محصول را افزایش می دهد.
کلمات کلیدی: بهینه سازی، پایداری کف، پروتئین نخود، ظرفیت تشکیل کف	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.31. * مسئول مکاتبات: n.zamindar@khuisf.ac.ir	

۱- مقدمه

آماده سازی بر خواص فیزیکی-شیمیایی و تشکیل ژل ایزوله پروتئین نخود توسط محققین مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که ایزوله پروتئین از آرد دانه های نخود چربی گرفته به دو روش استخراج قلیایی و سپس رسوب دهی در نقطه ایزوالکتریک و دیگری به وسیله استخراج پروتئین در محیط نیمه اسیدی و فرایند اولترافیلتراسیون تهیه شد. مشخص شد که رفتار ژل ایزوله پروتئین نخود به طور عمده به روش تهیه آن وابسته است [۹]. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، ویژگی‌های عملکردی و ترکیب آمینواسید ایزوله پروتئین ماش توسط محققان تعیین و برای کشف پتانسیل آن در صنایع غذایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت [۱۰]. منابع تجاری پروتئین نخود در صنایع غذایی محدود بوده در حالیکه تولید آن در کشور و جهان قابل توجه است. به همین منظور در این پژوهش، استخراج و بهینه سازی پروتئین نخود کابلی رقم آنا و ارزیابی خواص عملکردی آن از جمله ظرفیت تولید کف و پایداری کف، در تشکیل و تولید سیستم‌های مختلف غذایی و بررسی تاثیر برخی از عوامل مانند زمان، دما، pH و نسبت جامد به حلال به ماده اصلی استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ بر ویژگی‌های ایزوله پروتئین نخود رقم آنا برای معرفی و ارائه منبع جدیدی از پروتئین حبوبات بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده سازی نمونه

ماده اولیه مورد استفاده در این پژوهش دانه نخود کابلی رقم آنا بوده که از مرکز تحقیقات کشاورزی استان کرمانشاه تهیه شده‌است. دانه‌ها عاری از هرگونه خرابی و آفات بوده و از هرنوع ناخالصی و مواد خارجی پاک شده‌اند. سپس با استفاده از آسیاب برقی خانگی به صورت آرد (با مش ۶۰) درآمده و

پروتئین یکی از اصلی‌ترین مواد مغذی است که در آینده با کمبود آن مواجه خواهیم شد. در سال‌های اخیر تقاضای مصرف‌کنندگان برای پروتئین‌های گیاهی به دلیل افزایش دانش در مورد اثرات منفی زیست محیطی ناشی از تولید پروتئین حیوانی و رابطه بین پروتئین‌های گیاهی و سلامتی و هزینه بالای محصولات حیوانی، اهمیت زیادی نسبت به پروتئین‌های حیوانی پیدا کرده است [۱]. حبوبات بخش مهمی از رژیم غذایی انسان است. حبوبات غنی از پروتئین، کربوهیدرات‌ها و فیبرهای غذایی و سایر اجزای فعال زیستی بوده و چربی کمی دارند، که به حفظ وزن بدن کمک کرده و خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش می‌دهند و مصرف آنها در سراسر جهان گسترش می‌یابد. علاوه بر این، حبوبات همچنین سرشار از ویتامین‌های فولات، تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین و مواد معدنی (پتاسیم، کلسیم، منیزیم، فسفر و آهن) هستند [۲]. نخود (*Cicer arietinum* L.) (جزء منابع مهم پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود. صرفه نظر از خصوصیات تغذیه‌ای، پروتئین‌های دانه نخود به عنوان عملگر نقش مهمی را در فرمولاسیون و فراوری مواد غذایی دارا هستند [۳]. یکی از خصوصیات عمل‌کنندگی اساسی پروتئین‌های نخود توانایی آنها در تشکیل امولسیون‌های پایدار در سیستم‌های غذایی متنوع شامل خامه، سس، سوپهای خامه ای و محصولات گوشتی مثل سوسیس است [۴]. خصوصیات عملکردی مربوط به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ممکن است رفتار پروتئین‌ها را در سیستم‌های غذایی در هنگام فرایند، ذخیره سازی، تهیه و مصرف تعدیل کند. خواصی مانند حلالیت پروتئین، ظرفیت جذب آب و روغن، ظرفیت کف و پایداری کف، فعالیت امولسیون و تشکیل ژل، به تعامل پروتئین‌ها با سایر مولکول‌ها مانند کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها، نمک‌ها، مواد فرار و آب مربوط می‌شود [۵-۸]. برخی از محققین ویژگی‌های عملکردی و ترکیبات ایزوله های پروتئینی دانه های نخود در ارتباط با امکان استفاده ایزوله ها در صنعت غذا را بررسی کردند [۶]. اثر روشهای

تا زمان استفاده در دمای منفی ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند[۶].

۲-۲- تهیه پودر استون^۱

برای حذف ترکیبات فنلی و لیپیدها، از پودرهای استون بعنوان منابع عصاره پروتئین استفاده شد. برای تهیه پودرهای استون، ابتدا ۵۰ گرم نمونه نخود خشک آسیاب شده در مخلوط کن به مدت ۳ دقیقه با ۲۰۰ میلی لیتر استون همگن شد. سپس دوغاب بدست آمده به وسیله پمپ خلاء، کیف بوخنر و کاغذ صافی (بدون خاکستر) فیلتر شد. رسوب باقیمانده روی کاغذ صافی جمع آوری شد. در نهایت رسوب بدست آمده در دمای محیط خشک شد و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس ذخیره شد تا در استخراج مورد استفاده قرار گیرد[۱۱].

۱-۲-۲- استخراج پروتئین

برای به دست آوردن ایزوله پروتئین خام مطابق شکل ۱ و جدول ۲ عمل شد، پودر استون (گرم) تولید شده با میزان نسبت ارائه شده برای حلال در جدول RSM با آب دیونیزه (میلی لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه بر روی استیرر قرار گرفت. در این مرحله pH اولیه مخلوط با استفاده از سود (NaOH) یک مول بر لیتر مطابق جدول RSM تنظیم شد. سپس مخلوط مطابق جدول RSM در دما و زمان مشخص با ۹۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع آوری و با هیدروکلریک اسید یک مول بر لیتر pH بر روی ۴/۵ تنظیم شد. سپس مخلوط دوباره طبق جدول RSM با ۹۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب بدست آمده با میزان کمی آب دیونیزه معلق و سپس pH رسوب با سود یک مول بر لیتر روی ۷ تنظیم شد و درون پتری دیش ریخته و به مدت ۲۴ ساعت درون دستگاه خشک کن انجمادی در دمای ۵۰- درجه سلسیوس قرار گرفت و سرانجام در دمای ۱۸- درجه سلسیوس ذخیره سازی شد، تا اینکه برای ارزیابی خصوصیات عملکردی آنها استفاده شد[۱۲].

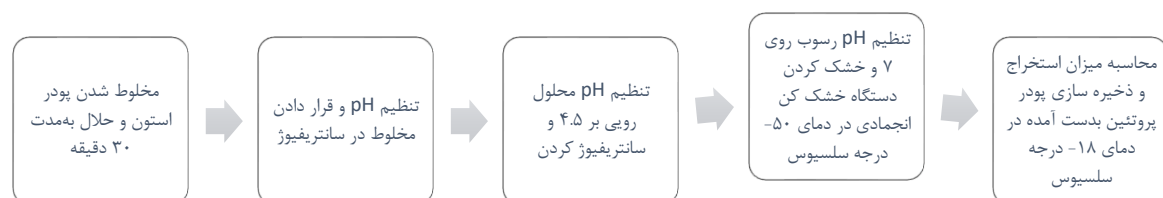


Fig 1- The procedure of chickpea protein isolate extraction

تا کف ایجاد شود[۱۲]. ظرفیت کف دهی با اندازه گیری حجم کف تشکیل شده در همان لحظه تشکیل کف (زمان صفر) بصورت میلی لیتر تعیین شد. پایداری کف با اندازه گیری حجم کف بر حسب میلی لیتر در دقیقه ۳۰ و ۱۸۰ دقیقه تعیین شد.

۴-۲- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش از روش سطح پاسخ (RSM)، طرح مرکب مرکزی (CCD) و نرم افزار Desing Expert، اثر

۳-۲- ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف

۲۵۰ میلی گرم پروتئین با ۲۵ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط شد و pH آن با سود یک مول بر لیتر (NaOH) روی هفت تنظیم شد. محلول های پروتئینی در دمای اتاق آماده شدند، محلول ها سپس در دستگاه هموژنایزر اولتراتوراکس با سرعت ۱۱۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱ دقیقه همگن شدند

^۱ -Aceton powders

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی آماری بهینه سازی شرایط فرایند

با روش سطح پاسخ

جدول (۱) مقادیر واقعی و کددار متغیرهای مستقل مورد استفاده برای طراحی تجربی استخراج نخود رقم آنا را نشان می‌دهد.

متغیرهای زمان (۶۰-۲۰ دقیقه)، دما (۳۵-۴) درجه سلسیوس)، pH (۸/۵-۱۰) و نسبت جامد (پودر استون نخود) به حلال (۱:۱۰-۱:۱۵ گرم بر میلی‌لیتر) بر پاسخ‌های ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف در ۳۰ و ۱۸۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. تعداد اجراها مطابق پیشنهاد طرح، طبق جدول ۲، ۳۰ اجرا با ۶ تکرار در نقطه مرکزی بود. طبق پیش‌بینی نرم افزار پس از تعیین بهترین شرایط، محصول با شرایط پیش‌بینی شده تولید شد و خواص فیزیکوشیمیایی بهینه تولید شده به وسیله ی آزمون T- Student در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مورد مقایسه قرار گرفت.

Table 1. The real and coded values of independent variables for experimental design

Factor	Name	Minimum	Maximum	Coded Low	Coded High	Mean	Std. Dev.
A	Time	20.00	60.00	-1 ↔ 20.00	+1 ↔ 60.00	40.00	15.76
B	Temperature	4.00	35.00	-1 ↔ 4.00	+1 ↔ 35.00	19.70	12.21
C	pH	8.50	10.00	-1 ↔ 8.50	+1 ↔ 10.00	9.25	0.5909
D	Water/meal ratio	10.00	15.00	-1 ↔ 10.00	+1 ↔ 15.00	12.50	1.97

جدول (۲) مقادیر متغیرهای مستقل مورد استفاده برای طراحی آزمایش و نتایج تجربی متغیرهای پاسخ را نشان می‌دهد.

Table 2. Experimental design of variables and the test results of responses

	Factor 1		Factor 2	Factor 3	Factor 4	Response 1	Response 2	Response 3
Std	Run	A:Time (min)	B:Temperature(°C)	C:pH	D:Water/meal ratio(ml/g)	Foaming capacity(ml)	Foam stability 1 (ml/30min)	Foam stability 2 (ml/180min)
10	1	60	4	8.5	15	90	60	55
16	2	60	35	10	15	75	50	40
3	3	20	35	8.5	10	80	55	45
12	4	60	35	8.5	15	85	55	50
15	5	20	35	10	15	40	40	35
28	6	40	20	9.25	12.5	60	45	35
26	7	40	20	9.25	12.5	70	48	40
2	8	60	4	8.5	10	90	60	55

17	9	20	20	9.25	12.5	42	40	35
20	10	40	35	9.25	12.5	80	55	45
14	11	60	4	10	15	85	55	50
5	12	20	4	10	10	38	38	35
19	13	40	4	9.25	12.5	70	48	38
13	14	20	4	10	15	38	38	35
8	15	60	35	10	10	75	50	40
9	16	20	4	8.5	15	80	55	40
29	17	40	20	9.25	12.5	60	45	35
7	18	20	35	10	10	38	38	35
21	19	40	20	8.5	12.5	85	55	50
22	20	40	20	10	12.5	50	40	35
6	21	60	4	10	10	85	55	50
4	22	60	35	8.5	10	85	55	50
1	23	20	4	8.5	10	80	55	50
24	24	40	20	9.25	15	60	45	35
25	25	40	20	9.25	12.5	60	45	35
23	26	40	20	9.25	10	60	45	35
30	27	40	20	9.25	12.5	60	45	35
11	28	20	35	8.5	15	80	55	45
18	29	60	20	9.25	12.5	60	45	35
27	30	40	20	9.25	12.5	60	45	35

۲-۳-ارزیابی پارامتر پاسخ ظرفیت کف-کنندگی

نتایج آنالیز واریانس برای ارزیابی پارامتر پاسخ ظرفیت کف-کنندگی در مورد مدل کامل درجه دوم با آثار متقابل نشان می‌دهد که F-Value مدل درجه دوم برابر با ۳۵/۰۹ است که بیانگر این است مدل معنادار است ($p < 0.0001$) (جدول ۳). مقدار F-value مربوط به Lack of Fit در این مدل برابر با ۰/۹۶۱۷ است. به عبارت دیگر مدل داده‌های تجربی را برازش می‌کند. مقدار R-Squared برابر با ۰/۹۷۰۴ نشان می‌دهد که این عدد به ۱ نزدیک بوده و بیانگر تطبیق زیاد نتایج مدل با نتایج تجربی است. Adeq Precision در این مدل عدد ۱۸/۵۷۷۷ بیانگر سیگنال کافی است. مقدار Pre R-Squared برابر با ۰/۸۹۸۸ و Adj R-Squared برابر با ۰/۹۴۲۷ است.

ظرفیت کف‌کنندگی براساس توانایی پروتئین در کاهش تنش سطحی، انعطاف‌پذیری مولکولی و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی (خواص آب‌دوستی، بار و توزیع آن و خواص هیدرودینامیکی) تعیین می‌شود. افزایش غلظت نمونه، واکنش‌های پروتئین-پروتئین را تشدید می‌کند که موجب افزایش ویسکوزیته شده و تشکیل یک فیلم پروتئینی چند لایه متصل به سطح آن را تسهیل می‌کند. همچنین افزایش در غلظت نمونه می‌تواند منجر به تولید فیلم‌های ضخیم‌تر شود [۱۳].

Table3. Variance analysis of the effect of independent variables on the foam formation capacity of chickpea protein at zero moment

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	7979/35	14	569/95	35/09	< significant 0.0001
A-Time	2547/27	1	2547/27	156/84	< 0.0001

B-Temperature	18/00	1	18/00	1/11	0/3091	
C-pH	2963/60	1	2963/60	182/47	<	
					0.0001	
D-Water/meal ra	0/2204	1	0/2204	0/0136	0/9088	
AB	64/74	1	64/74	3/99	0/0644	
AC	1156/00	1	1156/00	71/18	<	
					0.0001	
AD	0/2500	1	0/2500	0/0154	0/9029	
BC	4/31	1	4/31	0/2651	0/6141	
BD	0/2482	1	0/2482	0/0153	0/9033	
CD	0/2500	1	0/2500	0/0154	0/9029	
A²	250/08	1	250/08	15/40	0/0014	
B²	518/18	1	518/18	31/90	<	
					0.0001	
C²	115/45	1	115/45	7/11	0/0176	
D²	1/76	1	1/76	0/1085	0/7465	
Residual	243/62	15	16/24			
Lack of Fit	160/29	10	16/03	0/9617	0/5542	not significant
Pure Error	83/33	5	16/67			
Cor Total	8222/97	29				
Std. Dev.	4/03		R²		0/9704	
Mean	67/37		Adjusted R²		0/9427	
C.V. %	5/98		Predicted R²		0/8988	
			Adeq Precision		18/5777	

۱-۲-۳- نمودارهای سه بعدی سطح پاسخ

ظرفیت کف‌کنندگی

شکل (۲) نتایج مربوط به اندازه‌گیری ظرفیت کف‌دهی پروتئین نخود در لحظه صفر یا همان لحظه تشکیل کف را نشان می‌دهد. بر اساس آنالیز واریانس، متغیرهای pH و زمان تاثیر معنی‌داری بر روی ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین نخود داشتند ($p < 0.0001$) و دما و نسبت جامد به حلال معنی دار نبوده است ($p > 0.0001$). اثر متقابل متغیرهای زمان $\times$ pH معنی دار بود ($p < 0.0001$).

در شکل (2a)، اثر متغیرهای زمان و pH بر روی ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین نخود ارزیابی شده است. با توجه به شکل، مشخص است که با افزایش pH، ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین نخود کاهش پیدا کرده است. همچنین با افزایش زمان از ۲۰ دقیقه به ۶۰ دقیقه، ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین

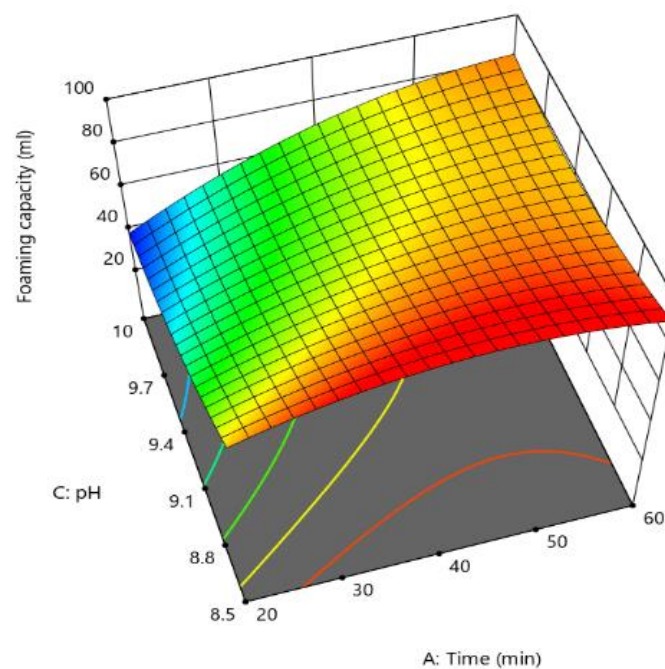
کمی افزایش پیدا کرده است. شکل (2b)، نیز تاثیر تغییرات دما و pH بر روی ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین نخود را نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که با افزایش دما، ظرفیت کف-کنندگی پروتئین نخود تغییر پیدا نکرده است. در حالی که افزایش pH منجر به کاهش ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین نخود شد ($p < 0.0001$). در پژوهشی مشابه، در ارزیابی ویژگی‌های عملکردی پروتئین باقلای هیدرولیز شده به روش هیدرولیز ترکیبی بیان کردند که ظرفیت کف‌کنندگی ایزوله پروتئین باقلا در pHهای مختلف با افزایش pH از ۴ به ۸ افزایش پیدا کرد. بیشترین کف‌کنندگی پروتئین باقلا در pH برابر ۸ مشاهده شد و در pH برابر با ۱۰ در تمامی نمونه‌ها کف‌کنندگی کاهش پیدا کرد [۱۴]. شکل (2c)، نیز تاثیر تغییرات دما و زمان بر روی ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین نخود را نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که با افزایش دما، ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین نخود تغییر پیدا نکرده است. در حالی که افزایش زمان کمی منجر به افزایش

تغییر پیدا نکرده است. با توجه به موارد عنوان شده، ظرفیت تشکیل کف مطابق رابطه (۱) بدست آمد:

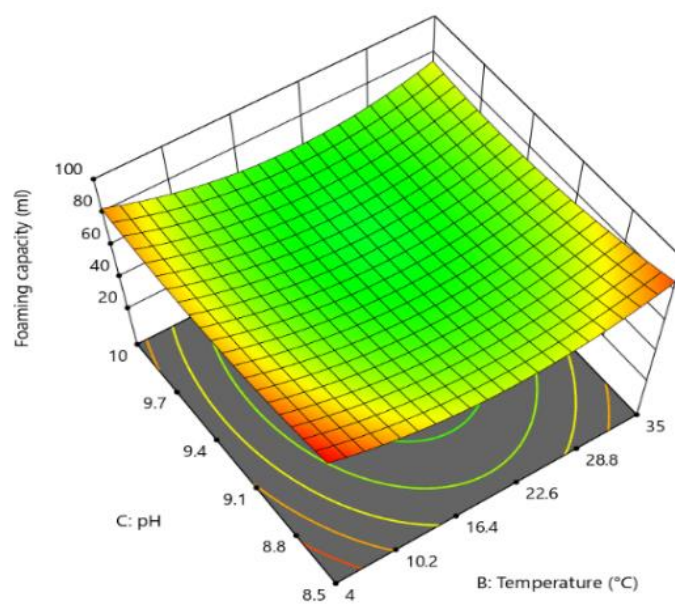
ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین نخود شد (بیشترین ظرفیت کف‌کنندگی در دقیقه ۴۰). نتایج بیانگر آن است که با افزایش نسبت جامد به حلال، ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین نخود

$$Y=1366.732-2.633A-2.323B-251.313C+0.567AC-0.025A^2+0.058B^2+11.43C^2$$

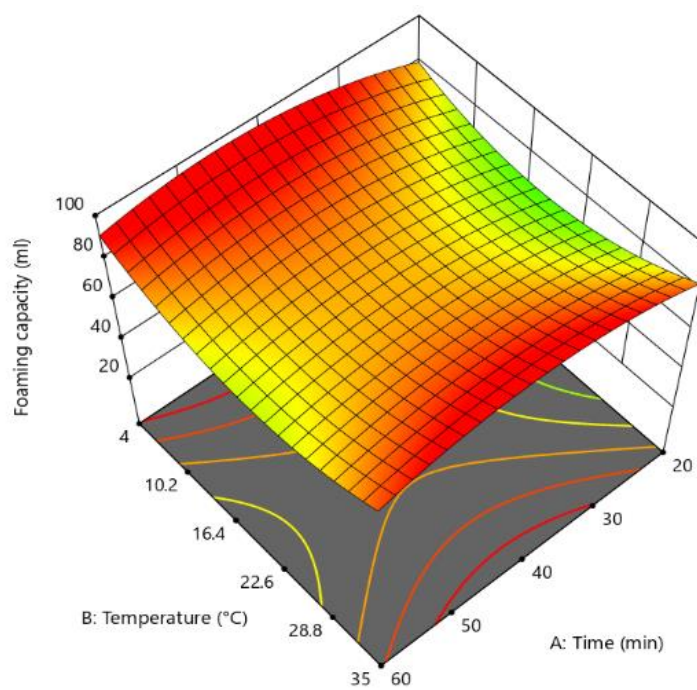
که در این رابطه Y ظرفیت تشکیل کف (میلی لیتر)، A زمان سانتریفوژ (دقیقه)، B دمای سانتریفوژ (درجه سلسیوس) و C نماد pH می‌باشد.



a



b



c

Fig. 2. The interaction of time and pH (a), temperature and pH (b), temperature and time (b) on the foam formation capacity of chickpea protein at zero moment

۳-۳- ارزیابی پارامتر پاسخ پایداری کف در ۳۰ دقیقه

پایداری کف مدت زمانی است که کف تولیدی بر اثر عواملی مانند نیروی جاذبه و تنش‌های مکانیکی به ۵۰ درصد حجم اولیه خود کاهش یابد [۱۵].

نتایج آنالیز واریانس را برای ارزیابی پارامتر پاسخ پایداری کف در مورد مدل کامل درجه دوم با آثار متقابل نشان می‌دهد

که F-Value مدل درجه دوم برابر با ۲۲/۹۹ بوده که بیانگر معنا دار بودن مدل است ($p < 0.0001$) (جدول ۴). مقدار F-value مربوط به Lack of Fit در این مدل برابر با ۳/۴۷ است. به عبارت دیگر مدل داده‌های تجربی را برازش می‌کند. مقدار R-Squared برابر با ۰/۹۵۵۵ نشان می‌دهد و بیانگر تطبیق زیاد نتایج مدل با نتایج تجربی است. Adeq Precision در این مدل عدد ۱۶/۰۵۷۵ بیانگر سیگنال کافی است. مقدار Pre R-Squared برابر با ۰/۸۲۱۷ و Adj R-Squared برابر با ۰/۹۱۳۹ است.

Table 4. Variance analysis of the effect of independent variables on the stability of chickpea protein foam 30 minutes after foam formation

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1277/15	14	91/22	22/99	< 0.0001	significant
A-Time	280/75	1	280/75	70/75	< 0.0001	
B-Temperature	6/72	1	6/72	1/69	0/2127	
C-pH	566/80	1	566/80	142/84	< 0.0001	
D-Water/meal ra	0/2204	1	0/2204	0/0556	0/8169	
AB	30/50	1	30/50	7/69	0/0142	
AC	132/25	1	132/25	33/33	< 0.0001	
AD	0/2500	1	0/2500	0/0630	0/8052	
BC	0/2204	1	0/2204	0/0556	0/8169	
BD	0/2482	1	0/2482	0/0625	0/8059	
CD	0/2500	1	0/2500	0/0630	0/8052	
A²	19/66	1	19/66	4/95	0/0418	
B²	100/41	1	100/41	25/31	0/0001	
C²	13/07	1	13/07	3/29	0/0896	
D²	0/1677	1	0/1677	0/0423	0/8399	
Residual	59/52	15	3/97			
Lack of Fit	52/02	10	5/20	3/47	0/0912	not significant
Pure Error	7/50	5	1/50			
Cor Total	1336/67	29				
Std. Dev.	1/99					
Mean	48/67					
C.V. %	4/09					
R²			0/9555			
Adjusted R²			0/9139			
Predicted R²			0/8217			
Adeq Precision			16/0575			

pH برابر با ۸.۵ مشاهده شد. همچنین با گذشت زمان، پایداری کف افزایش یافت. شکل (3b)، تاثیر دما و زمان بر روی پایداری کف پروتئین نخود پس از گذشت ۳۰ دقیقه از تشکیل کف را نشان می‌دهد. نتایج شکل حاکی از آن است که افزایش زمان پایداری کف افزایش یافت. با توجه به شکل (3c)، با افزایش pH، حجم کف و پایداری آن کاهش پیدا کرده است، اما در حد پایین یا حد بسیار بالا دمایی شاهد افزایش پایداری کف می‌باشیم. مشابه با نتایج پژوهش حاضر، سمائی و همکاران گزارش نمودند که بیشترین پایداری کف در pH برابر ۸ برای محلول مشاهده گردید و با افزایش pH تا مقدار ۱۰، پایداری کف کاهش پیدا کرد. این محققین بیان کردند که ایزوله‌ی پروتئین باقلا در pH برابر ۸، پس از زمان ۶۰ دقیقه فاقد کف بود [۱۴]. با توجه به موارد عنوان شده، پایداری کف پروتئین نخود پس از گذشت ۳۰ دقیقه مطابق رابطه (۲) بدست می‌آید:

$$y=178.608-1.105A-1.009B-15.149C-0.004AB+0.192AC-0.005A^2+0.029B^2$$

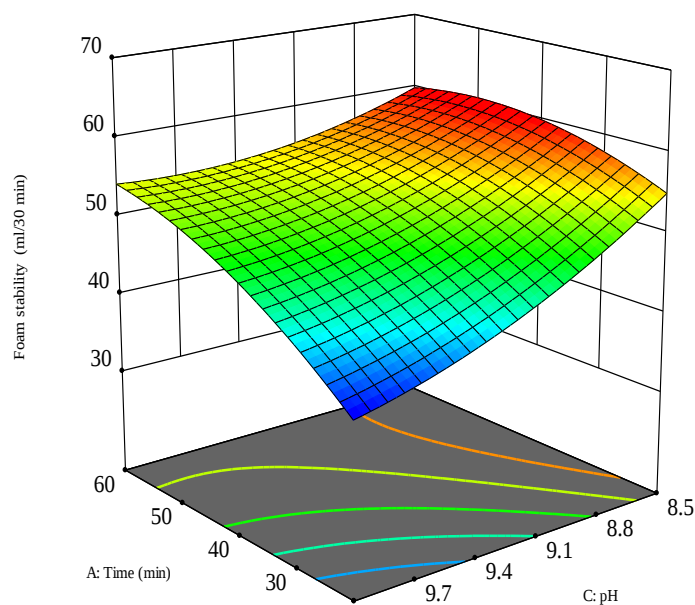
۱-۳-۳- نمودارهای سه بعدی پایداری کف

در ۳۰ دقیقه

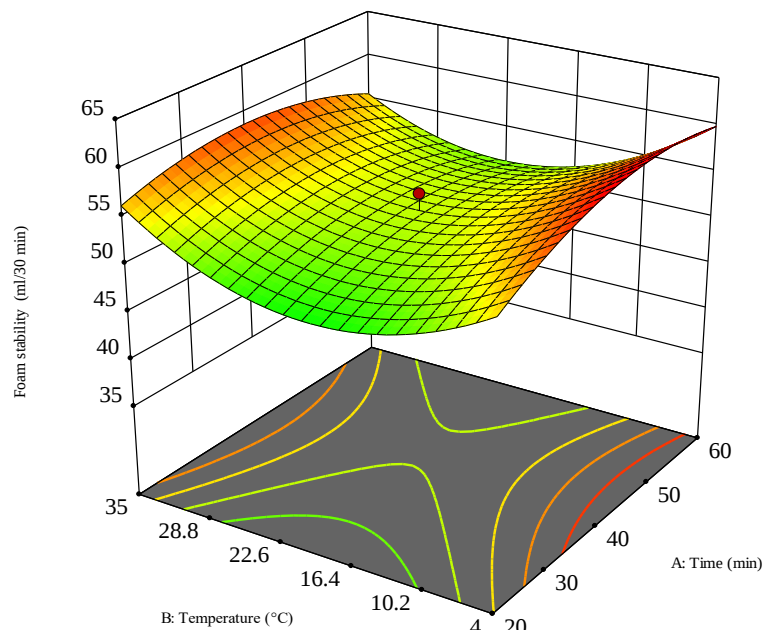
پایداری کف پروتئین نخود، با اندازه‌گیری حجم کف تولید شده پس از گذشت ۳۰ دقیقه از تشکیل کف ارزیابی شد که نتایج مربوط به آن در شکل (۳) ارائه شده است. بر اساس آنالیز واریانس، متغیرهای pH و زمان تاثیر معنی داری بر روی پایداری کف پروتئین نخود در ۳۰ دقیقه داشتند ($p<0.0001$) اما پارامتر دما و نسبت جامد به حلال تاثیر معناداری نداشتند. اثر متقابل متغیرهای زمان $\times$ pH و زمان $\times$ دما معنی دار بود ($p<0.05$).

با توجه به شکل (3a)، با افزایش pH، حجم کف و پایداری آن کاهش پیدا کرده است ($p<0.0001$). بطوریکه بیشترین پایداری کف پس از گذشت ۳۰ دقیقه از تشکیل کف، در

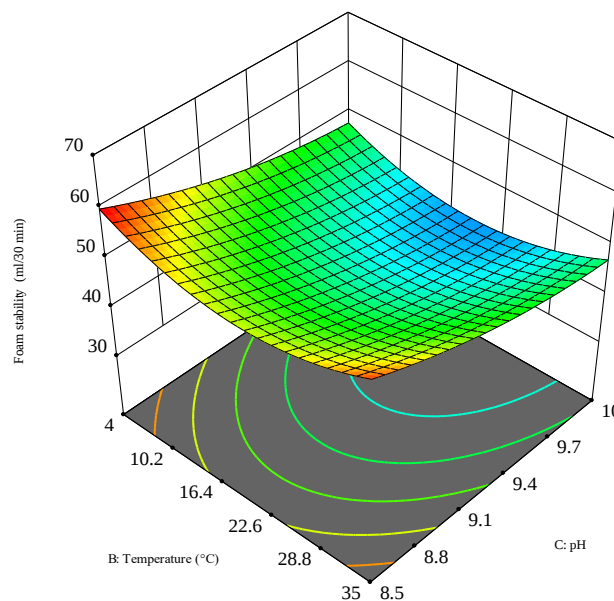
که در این رابطه Y پایداری کف (میلی لیتر) پروتئین نخود پس از گذشت ۳۰ دقیقه، A زمان سانتیفریوژ (دقیقه)، B دمای سانتیفریوژ (درجه سلسیوس) و C نماد pH می‌باشد.



a



b



c

Fig. 3. The interaction of time and pH (a), time and temperature (b), pH and temperature (c) on the stability of chickpea protein foam 30 minutes after foam formation

متقابل نشان می‌دهد که F-Value مدل درجه دوم برابر با ۸/۸۶ بوده که بیانگر معنا دار بودن مدل است ($p < 0.0001$) (جدول ۵). مقدار F-value مربوط به Lack of Fit در این مدل برابر با ۳/۲۳ است. عبارت دیگر مدل داده‌های تجربی را برازش می‌کند. مقدار R-Squared برابر با ۰/۸۹۲۲ نشان می‌دهد و بیانگر تطبیق زیاد نتایج مدل

۳-۴- ارزیابی پارامتر پاسخ پایداری کف در ۱۸۰ دقیقه

نتایج آنالیز واریانس را برای ارزیابی پارامتر پاسخ پایداری کف (در ۱۸۰ دقیقه) در مورد مدل کامل درجه دوم با آثار

با نتایج تجربی است. Adeq Precision در این مدل عدد Squared برابر با ۰/۴۸۸۰ و Adj R-Squared برابر با ۱۱/۰۸۸۸ بیانگر سیگنال کافی است. مقدار Pre R- Squared برابر با ۰/۷۹۱۵ است.

Table5. Variance analysis of the effect of independent variables on the stability of chickpea protein foam 180 minutes after foam formation

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	1287/11	14	91/94	8/86	< significant 0.0001
A-Time	273/17	1	273/17	26/34	0/0001
B-Temperature	29/39	1	29/39	2/83	0/1130
C-pH	401/00	1	401/00	38/66	< significant 0.0001
D-Water/meal ra	5/60	1	5/60	0/5399	0/4738
AB	57/19	1	57/19	5/51	0/0330
AC	6/25	1	6/25	0/6026	0/4497
AD	6/25	1	6/25	0/6026	0/4497
BC	6/48	1	6/48	0/6243	0/4418
BD	6/29	1	6/29	0/6068	0/4481
CD	6/25	1	6/25	0/6026	0/4497
A²	5/30	1	5/30	0/5107	0/4858
B²	65/52	1	65/52	6/32	0/0239
C²	95/47	1	95/47	9/20	0/0084
D²	5/30	1	5/30	0/5107	0/4858
Residual	155/59	15	10/37		
Lack of Fit	134/75	10	13/48	3/23	0/1036 not significant
Pure Error	20/83	5	4/17		
Cor Total	1442/70	29			
Std. Dev.	3/22	R²	0/8922		
Mean	41/10	Adjusted R²	0/7915		
C.V. %	7/84	Predicted R²	0/4880		
		Adeq Precision	11/0888		

با توجه به شکل (4a)، با افزایش pH، حجم کف و پایداری آن کاهش پیدا کرده است ($p < 0.0001$). بطوریکه بیشترین پایداری کف پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه از تشکیل کف، در pH برابر با ۸.۵ مشاهده شد. همچنین با گذشت زمان، پایداری کف افزایش یافت. شکل (4b)، تاثیر دما و زمان بر روی پایداری کف پروتئین نخود پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه از تشکیل کف را نشان می‌دهد. نتایج شکل حاکی از آن است که با افزایش زمان پایداری کف افزایش یافت. با توجه به شکل (4c)، با افزایش pH، حجم کف و پایداری آن کاهش پیدا کرده است، اما در حد پایین دمایی شاهد افزایش پایداری

۳-۴-۱ نمودارهای سه بعدی پایداری کف در

۱۸۰ دقیقه

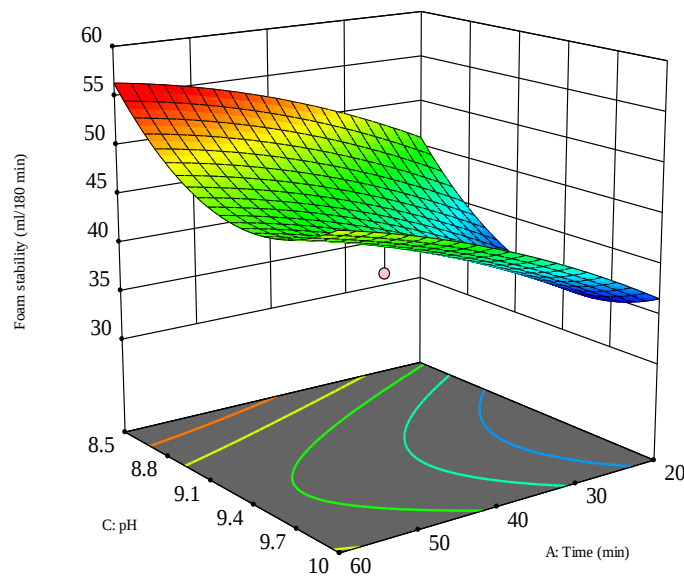
نتایج مربوط به پایداری کف در ۱۸۰ دقیقه در شکل (۴) ارائه شده است. بر اساس آنالیز واریانس، متغیرهای pH و زمان تاثیر معنی داری بر روی پایداری کف پروتئین نخود در ۱۸۰ دقیقه داشتند ($p < 0.05$)؛ اما پارامتر دما و نسبت جامد به حلال تاثیر معناداری نداشتند ($p > 0.05$). اثر متقابل متغیرهای زمان × دما معنی دار بود ($p < 0.05$).

کف می‌باشیم. با توجه به موارد عنوان شده، پایداری کف پروتئین نخود پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه مطابق رابطه (۳) بدست آمد:

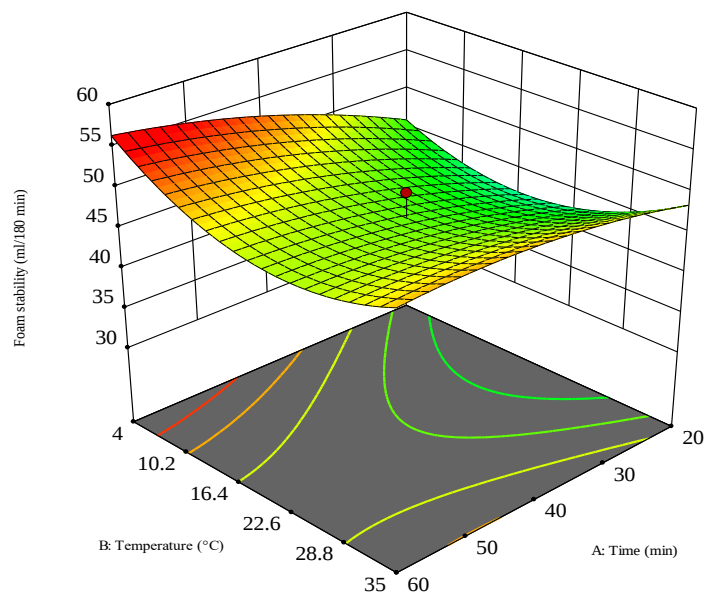
$$y=830.188+0.314A-0.461B-166.497C-0.006AB+0.016B^2+8.660C^2$$

دمای سانتریفوژ (درجه سلسیوس)، C نماد pH و D نسبت جامد به حلال (گرم به میلی لیتر) می‌باشد.

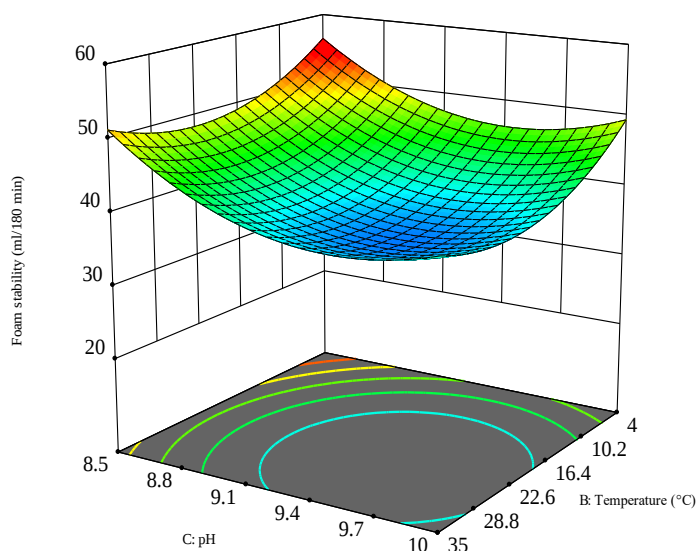
که در این رابطه Y پایداری کف (میلی لیتر) پروتئین نخود پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه، A زمان سانتریفوژ (دقیقه)، B



a



b



C

Fig. 4. The interaction of time and pH (a), time and temperature (b), the pH and temperature (c) on the stability of chickpea protein foam 180 minutes after foam formation

نرم‌افزار برای بهینه‌سازی شرایط فرایندی استخراج و نتایج آزمون انجام شده در سه تکرار را نشان می‌دهد. با توجه به جدول (۶) و نتیجه حاصل از آزمون T-student اختلاف معناداری بین آزمون انجام شده و شرایط پیشنهادی نرم افزار مشاهده نمی‌شود، که بیانگر دقت مناسب مدل می‌باشد.

۳-۵- بهینه‌سازی پارامترهای پاسخ

برای بهینه سازی کف و پایداری کف پروتئین نخود کابلی، متغیرهای مستقل در محدوده تعریف شده و متغیرهای وابسته در حالت حداکثر قرار گرفتند. جدول (۶) شرایط پیشنهادی

Table 6. Recommended conditions of the software for optimizing the process and the tests performed

	Time	Temperature	pH	Water/ meal ratio	Foaming capacity	Foam stability (30 min)	Foam stability (180 min)
Predicted conditions	54.27	4.055	8.517	10.22	93.22	60.31	55.22
Experiments performed	54.27	4.055	8.517	10.22	94±5.1 ^{ns}	60±1.4 ^{ns}	55±1.2 ^{ns}

ns: not significant

پارامترهای pH، زمان، دمای استخراج و نسبت جامد به حلال به عنوان متغیرهای مستقل انتخاب شد. نتایج نشان داد که مدل آماری درجه دوم با دقت بالایی به منظور پیش‌بینی پارامترهای پاسخ، قابل استفاده بود و همچنین نتایج بهینه سازی و پیش‌بینی مدل با نتایج تجربی همخوانی مناسبی

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، بهینه‌سازی شرایط فرایند استخراج برای ارزیابی خصوصیات عملکردی کف و پایداری آن در پروتئین نخود کابلی رقم آنا با استفاده از روش RSM انجام و

معنی‌داری نداشتند. مقایسه شرایط بهینه پیشنهادی نرم افزار با نتایج آزمون تفاوت معنی‌دار نداشتند. سایر ترکیبات موجود در نمونه مانند کربوهیدرات و چربی نیز بر کیفیت پروتئین در تعیین ویژگی‌های عملکردی موثر می‌باشند. نتایج این پژوهش می‌تواند چشم اندازی آتی بر استفاده از این ماده به عنوان منبعی فراوان و در دسترس از پروتئین و به عنوان جایگزین پروتئین‌های حیوانی در محصولات هم چون فرآورده‌های قهوه برای تولید کف مناسب و بهبود ویژگی‌های مواد غذایی باشد.

داشت. مهمترین نتایج این تحقیق بیانگر آن است که، میزان pH استخراج بر کف و پایداری کف در ۳۰ و ۱۸۰ دقیقه پروتئین نخود تاثیر معنی‌داری داشته و افزایش pH استخراج، منجر به کاهش ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف در ۳۰ و ۱۸۰ دقیقه شد. ارزیابی تاثیر متغیر مستقل زمان سانتریفوژ بر روی کف و پایداری آن نیز نشان داد که با افزایش زمان سانتریفوژ میزان ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف در ۳۰ و ۱۸۰ دقیقه پروتئین نخود افزایش پیدا کردند. متغیرهای مستقل دما و نسبت جامد به حلال، بر تمامی پاسخ‌ها اثر

۸-منابع

- [۱] Dehghani, M., & Zamindar, N. (2023). Optimization of Water and Oil Absorption Capacity of Bilesavar Lentil Protein by Response Surface Method. *Journal of food science and technology (Iran)*, 19(133), 69-78.
- [۲] Venkidasamy, B., Selvaraj, D., Nile, A. S., Ramalingam, S., Kai, G., & Nile, S. H. (2019). Indian pulses: A review on nutritional, functional and biochemical properties with future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 228-242.
- [۳] Bakhshi Moghadam, Farnaz, Milani, Elnaz, Mortazavi, Seyed Ali, and Meshkani, Seyed Mohammad. (2012). The effect of edge pool methods on the functional characteristics of chickpea protein isolate. *Iran Food Science and Industry*, 10(38), 11-20.
- [۴] Kaur, M., & Singh, N. (2007). Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food chemistry*, 102(1), 366-374.
- [۵] Barać, M. B., Pešić, M. B., Stanojević, S. P., Kostić, A. Ž., & Čabrilo, S. B. (2015). Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates: A review. *Acta periodica technologica*(46), 1-18.
- [۶] Boye, J., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537-546.
- [۷] Day, L. (2013). Proteins from land plants—potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32(1), 25-42.

- [۸] Shevkani, K., Kaur, A., Kumar, S., & Singh, N. (2015). Cowpea protein isolates: functional properties and application in gluten-free rice muffins. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 927-933.
- [۹] Papalamprou, E. M., Doxastakis, G. I., & Kiosseoglou, V. (2010). Chickpea protein isolates obtained by wet extraction as emulsifying agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 304-313.
- [۱۰] Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., et al. (2018). Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food hydrocolloids*, 76, 131-140.
- [۱۱] Arcan, I., & Yemenicioğlu, A. (2007). Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food chemistry*, 103(2), 301-312.
- [۱۲] Aydemir, L. Y., & Yemenicioğlu, A. (2013). Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 686-694.
- [۱۳] Adebawale, K., & Lawal, O. (2004). Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformis*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flours. *Food Research International*, 37(4), 355-365.
- [۱۴] Samaei, S. P., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A., & Alami, M. (2021). Investigation of functional and antioxidant properties of faba bean protein hydrolysates using combines hydrolysis. *Food Processing and Preservation Journal*, 12(2), 25-38.
- [۱۵] Cherry, J. P., & Leffler, H. R. (1984). Seed. *Cotton*, 24, 511-569.



Scientific Research

Optimizing the functional characteristics of the protein foam stability of Kabuli chickpeas of Anna variety

Haniyeh Rezaee Barzani¹, Nafiseh Zamindar^{*2}

1-Master Student, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received:2023/9/3

Accepted:2024/8/26

Keywords:

Optimization,

Foam stability,

Chickpea protein,

Foam capacity

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.31.

*Corresponding Author E-
n.zamindar@khuif.ac.ir

Chickpea protein is considered a high-quality natural protein and can be used as a nutrient or the main ingredient of foods, useful for human health. In this study, the effect of four independent variables including time (20-60) minutes , temperature (4-35) degrees of Celsius, pH (8.50-10) and solid to solvent ratio of (1:10 – 1:15) was investigated on the optimization of the physicochemical properties of Anna variety chickpea protein, and its functional properties, including foam formation capacity and stability (in 30 and 180 minutes). For this purpose, 30 standard runs were performed using the response surface method, central composite design including 6 repetitions at the central points. The maximum foam formation capacity and stability was obtained with optimal conditions of temperature of 4.055 °C, time of 54.27 min, pH value of 8.517 and solvent to solid ratio of 1:10.220. The highest foam stability was observed after 40 minutes, at pH equal to 8.5. The results of this research showed that the chickpea protein of Ana variety could be used as part of food formulation, which increases the nutritional value and functional characteristics of the product.



مطالعه اثر حرارت‌دهی اهمیک و حمام آب بر بقای اشرشیاکلی در آب هویج

سیدرامین رفیعیانی^۱، نفیسه زمین‌دار^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ‌های مقاله: تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۷	هویج پس از آب‌گیری دارای عمر نگهداری بسیار پایینی می‌باشد. پاستوریزاسیون راهی مناسب برای حفظ و تجاری‌سازی این محصول می‌باشد. در این مطالعه از دستگاه اهمیک به عنوان منبع گرمایش استفاده گردید و باکتری اشرشیاکلی به عنوان شاخص کفایت غیرفعال سازی فرم رویشی باکتری برای پاستوریزاسیون انتخاب گردید. آب‌هویج تازه تحت ۳ سطح دمای ۴۸، ۵۵ و ۶۲ درجه سانتی‌گراد و ۶ سطح زمان ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت تحت فرآیند حرارتی قرار گرفت و تعداد باکتری‌های بازمانده مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین پاستوریزاسیون به روش متعارف حمام آب داغ نیز انجام گرفت و با روش اهمیک مورد مقایسه قرار گرفت که نتیجه‌ی آن کارایی بیشتر روش اهمیک را نشان داد. پاستوریزاسیون به روش اهمیک علاوه بر جلوگیری از اتلاف وقت و انرژی با سرعت بالا باعث غیرفعال شدن فرم رویشی باکتری‌ها در مدت زمان بسیار کمی شده است. تغییرات بازمانده‌های باکتری‌ها با افزایش دما و زمان به وسیله‌ی طرح کاملاً تصادفی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. اثر روش و زمان و اثر متقابل روش و زمان بر کاهش تعداد باکتری‌های زنده‌مانده معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد بهترین نتیجه برای حرارت‌دهی اهمیک حاصل شد.
کلمات کلیدی: غیرفعال سازی، اشرشیاکلی، آب هویج، اهمیک	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.50. * مسئول مکاتبات: n.zamindar@khuif.ac.ir	

۱-مقدمه

آب میوه مانع مهمی در برابر رشد عوامل بیماری زای ناشی از غذا است. با این حال، تحقیقات بسیاری در مورد شیوع بیماری های ناشی از غذا شامل مصرف آب میوه منتشر شده است که توانایی آب میوه های اسیدی را برای حمل عوامل بیماری زای انسانی نشان می دهد. /شرشیا کلی O157: H7 می تواند در غذاها و نوشیدنی های اسیدی به خوبی زنده بماند زیرا برخی اسیدهای آلی را تحمل می کند و قابلیت سازگاری با اسید را دارد [۵]. /شرشیا کلی O157: H7، یک نوع پاتوژن گرم منفی، زیرمجموعه انتروهموراژیک است و توسط مرکز کنترل بیماری های ایالات متحده به عنوان یکی از پنج عامل بیماری زای برتر ذکر شده است که منجر به بستری شدن در بیمارستان می شود. بنابراین، غیرفعال سازی موثر /شرشیا کلی O157: H7 در غذا برای جلوگیری از شیوع بیماری و تضمین ایمنی مواد غذایی و سلامت انسان مهم است [۶].

فرایند های حرارتی از جمله پاستوریزاسیون به عنوان یک روش فرایند حرارتی برای غیرفعال سازی میکروارگانیسم های بیماری زا و فساد برای اطمینان از ایمنی و افزایش ماندگاری انواع مواد غذایی استفاده شده است. آب هویج به عنوان یک محصول تازه و پرآب، حساس به رشد میکروارگانیسم های بیماری زا می باشد که می توانند باعث عفونت های گوارشی و سمی بشود. برخی از این میکروارگانیسم ها شامل /شرشیا کلی، سالمونلا، لیستریا و کلستریدیوم بوتولینوم هستند. پاستوریزاسیون آب هویج می تواند این باکتری ها را کشته یا ضعیف کرده و از خطر بروز بیماری های غذایی جلوگیری کند. همچنین، پاستوریزاسیون می تواند عمر نگهداری آب هویج را افزوده و از نیاز به استفاده از مواد نگهدارنده و افزودنی ها بکاهد [۷]. با این حال، فناوری های حرارتی جدید در مقایسه با تیمار های حرارتی سنتی، حفظ مواد مغذی، بافت، رنگ و طعم دهنده های مواد غذایی را افزایش دهند. بنابراین، توسعه فناوری های جدید فرآیند حرارتی در دهه های گذشته توجه ویژه ای را به خود جلب کرده است. از

هویج یکی از سبزی های متعلق به گروه /آپاسه^۱ است که با نام /داکوس کاروت *al.* 'آرده بندی می شود. هویج سبزی ریشه دار یا غده ای خوراکی است که می توان آن را خام، خورد و یا رنده شده در سالاد مصرف نمود و بیشتر در پخت سوپ ها و خورش ها کاربرد دارد. استان های آذربایجان شرقی، خوزستان، اصفهان و زنجان بیشترین سهم را در تولید هویج کشور دارا می باشند. هویج دارای مقادیر بالای بتاکارتن به عنوان پیشساز ویتامین آ. است همچنین حاوی مواد معدنی مختلف نظیر آهن، مس، منیزیم، فسفر، و ویتامین هایی نظیر گروه B و C می باشد [۱]. به طور کلی با رشد محبوبیت غذاهای آماده در بسیاری از کشور های آسیایی، شاهد افزایش تقاضا برای سبزی ها و میوه های فراوری شده با کیفیت بالا بوده و پیش بینی می شود این روند در دهه آینده در همگی کشور های در حال توسعه جهان ادامه یابد [۲]. آب هویج یک نوشیدنی بسیار مغذی و غنی از بتاکاروتن و آنتی اکسیدان است. علاوه بر این، ریشه های هویج فیتوالکسین ۶-متوکسیملین تولید می کنند که از رشد چندین قارچ، مخمر و کپک جلوگیری می کند و اثر ضد لیستریا را نشان می دهد. با این حال، pH بالای آب هویج (۶/۴ تا ۶/۸) همچنان محصول را برای افزایش ماندگاری به چالش می کشد، زیرا میکروارگانیسم های نامطلوب در این مقادیر pH بسیار مقاوم هستند [۳].

در میان تمام علل احتمالی زوال مواد غذایی، انتشار میکروارگانیسم ها در مواد غذایی از اهمیت ویژه ای در صنایع غذایی برخوردار است. علاوه بر ضایعات غذایی ناشی از دور ریختن محصولات آلوده، برخی از میکروارگانیسم ها نیز می توانند مشکلات بهداشت عمومی را ایجاد کنند. این مشکلات مربوط به آسیب شناسی های ناشی از خود میکروارگانیسم یا سمومی است که توسط برخی از گونه ها ساخته می شود. بنابراین، غیرفعال سازی میکروارگانیسم ها تا تعداد قابل قبول یکی از مهم ترین نگرانی ها در زمینه فرایند مواد غذایی است [۴]. به طور سنتی تصور می شد که اسیدیته

نمونه‌ی هویج تازه را پس از پاک کردن و حذف بخش‌های زائد، پوست‌گیری کرده و به خوبی با آب مقطر شسته شده و سپس با دستگاه آب‌میوه‌گیری آبگیری شد [۱۲]. سپس pH آن تنظیم گردید و در شیشه‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری دربسته با مقاومت حرارتی بالا برای اطمینان از عاری بودن از هر میکروارگانیسم اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱.۲ bar به مدت ۲۰ دقیقه) کرده و در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) تا پیش از آزمون‌ها نگهداری گردید.

۲-۲-۲- محیط‌های کشت و سرم‌های رقت

سازی

در این پژوهش از سه محیط کشت، BHI، EMB و PCA و محلول رقیق‌کننده سرم فیزیولوژی در آزمایش اصلی یعنی شمارش تعداد کلنی‌های باقیمانده و از سه محیط کشت، SIM، MR-VP و سیمون سیترات برای تست تاییده ایموایک و از محیط کشت NB به همراه ۱٪ قند گلوکز، لاکتوز و ساکارز همراه با معرف فنل رد به منظور تست بررسی تخمیر قند استفاده شد، که آماده‌سازی هر کدام از آنها مطابق دستورالعمل ساخت محیط کشت شرکت سازنده انجام شد، توسط دستگاه اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱.۲ bar و به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید و در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) تا لحظه آزمایش داخل پک‌های استریل نگهداری شد.

برای ساخت سرم‌های فیزیولوژیک مورد استفاده در رقت‌سازی، مقدار ۸.۵ گرم سدیم کلرید را با ترازوی حساس با دقت ۰.۰۰۰۱ توزین کرده و در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس حجم آن به یک لیتر رسانیده شد. سپس با پیپت ۱۰ میلی‌لیتر مقدار ۹ میلی‌لیتر سرم را به داخل لوله‌های آزمایش ریخته در آن با پنبه محکم بسته و در ردیف‌های ۱۰ تایی دسته‌بندی گردید و سپس آنرا با اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱.۲ bar به مدت ۲۰ دقیقه استریل کرده و

گرمایش اهمیت می‌توان به عنوان یک فرایند حرارتی موثر برای گرم کردن مداوم محصولات غذایی با عبور جریان‌های الکتریکی از ماتریس‌های غذایی استفاده کرد. بنابراین، گرمایش اهمیت می‌تواند محدودیت‌های پاستوریزاسیون معمولی را با استفاده از برق دور بزند [۸]. فناوری گرمایش اهمیت مبتنی بر عبور جریان الکتریکی متناوب از طریق یک ماده غذایی با هدف اصلی گرم کردن آن می‌باشد [۹]. مهم‌ترین مزیت مرتبط با این فرایند، امکان گرم کردن مواد سریع و یکنواخت از جمله محصولات ذره‌ای بوده و به همین دلیل، محصولاتی که با گرمایش اهمیت تحت درمان قرار گیرند، کیفیت بالاتری نسبت به محصولات فرایند شده معمولی خواهند داشت [۱۰]. از مزایای آن در مقایسه با گرمایش معمولی می‌توان به حفظ رنگ و ارزش مواد غذایی، سرعت گرمایش بالا، ایجاد گرمایش حجمی، عدم ایجاد شیب دمایی، دوستدار محیط زیست و کارایی و بازدهی بسیار بالا نام برد [۱۱].

این مطالعه به بررسی استفاده از روش حرارت‌دهی اهمیت و اثرات این روش بر غیر فعال کردن باکتری/شرشیاکلی در آب هویج پرداخته است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

نمونه هویج، متعلق به خانواده آمبلیفریا^۳ و از جنس داکوس^۴ و کاروتاه بوده و از یک باغ در اصفهان خریداری شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. مواد شیمیایی با درجه خلوص بالا از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- آماده‌سازی نمونه

تا موقع مصرف در پک های استریل در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری گردید [۱۳].

۳-۲-۲- نمونه باکتری/اشرشیاکلی

سوش باکتری/اشرشیاکلی (PTCC ۱۳۹۹) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری شد، سپس برای فعال سازی کامل سوش ابتدا آن را در محیط کشت BHI قرار داده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور (پارس طب نوین، ایران) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و این کار به مدت سه مرحله ۴۸ ساعته با هر بار پاساژ جدید باکتری از کشت قبل انجام شد. پس از مشاهده کدورت کافی با استفاده از سوآپ استریل نمونه برداری کرده و با روش کشت خطی به محیط کشت EMB انتقال داده شد و پس از گرمخانه گذاری ۴۰ درجه سانتی گراد و تشکیل جلای سبز نمونه اشرشیا آماده شد و با نگه داری پلیت در یخچال می توان برای مدت حدود ۳ هفته از آن استفاده کرد و به منظور بررسی خلوص باکتری تست ایموایک و تست تخمیر قند انجام شده و از باکتری/اشرشیاکلی خالص جهت تهیه استاندارد نیم مک فارلند استفاده گردید [۱۴].

به منظور تهیه استاندارد نیم مک فارلند برای آماده سازی نمونه نهایی برای تلقیح با نمونه آب هویج از دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO S ۲۱۰۰، آمریکا) استفاده شد. ابتدا تعدادی از کلنی های تک بر روی محیط EMB جدا کرده و در لوله حاوی محیط BHI به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کرده و به اصطلاح کشت شبانه انجام گرفته و از کشت شبانه برای تهیه استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. برای ساخت استاندارد نیمه مک فارلند در محیط کاملاً استریل ابتدا جذب را بر روی ۶۲۵ nm تنظیم کرده و با سل حاوی محیط کشت BHI خالص را به عنوان شاخص، عدد دستگاه اسپکتروفتومتر را صفر یا به اصطلاح کالیبره گردید تا میزان جذب کدورت نمونه فقط میزان جذب باکتری موجود در آن باشد. با توجه به توضیحات مطابق استاندارد جذب نمونه تلقیحی روی عدد

۰.۰۹ تنظیم شد که این عدد جذب با روش شمارش معادل تعداد 1.5×10^6 محاسبه و گزارش گردید [۱۵].

۴-۲-۲- تست تاییدی ایمویک باکتری

اشرشیاکلی

تست ایندول و تست استفاده از سیترات، توانایی باکتری ها را برای تولید آنزیم های خاص بررسی می کنند. از سوی دیگر، تست متیل رد و تست ووگس پروسکوئر، محصولات متابولیک نهایی تولید شده توسط باکتری ها را شناسایی می کنند. به این ترتیب نوع و جنس باکتری بر اساس آنزیم ها، مواد مغذی مورد نیاز و محصولات متابولیکی که تولید کرده است، مشخص می گردد [۱۶].

۵-۲-۲- تست تاییدی تخمیر قند باکتری

اشرشیاکلی

شامل سه تست تخمیر قند گلوکز، لاکتوز و ساکارز می باشد که این سه تست در محیط مایع نوترینت براث با اضافه کردن ۱٪ از هر کدام از قندها انجام می گیرد که در نهایت با اضافه کردن معرف فنول رد وجود یا عدم وجود/اشرشیاکلی اثبات می شود. بدین صورت که با تغییر رنگ معرف فنول رد در هر سه نوع قند از قرمز به زرد اثبات وجود/اشرشیاکلی می باشد [۱۵].

۶-۲-۲- تنظیم pH

دامنه پاستوریزاسیون مربوط به مواد غذایی با pH کمتر از ۴.۶ می باشد و از آنجایی که آب هویج مورد استفاده در این پژوهش دارای pH اولیه ۶.۶ می باشد و در دامنه پاستوریزاسیون نمی باشد باید با استفاده از اسید های خوراکی و با توجه به حد مجاز استفاده آنها، نمونه وارد دامنه شود [۱۷]. به همین منظور نمونه آب هویج در یه ظرف ریخته شده و الکتروود pH متر در آن قرار می گیرد، سپس به آرامی مخلوط فسفریک اسید و گلیکودلتا لاکتون (نسبت ۱ به ۳) را به آرامی به نمونه اضافه نموده و هم زده شد. هدف ایجاد

و بلافاصله در مخلوط آب و یخ سرد و برای مرحله کشت آماده شد. در این روش نیز همان طور که در روش قبلی توضیح داده شد مدت زمان افزایش دما مهم بوده و اندازه گیری می‌شود [۲۰].

۹-۲-۲- شمارش تعداد کلنی های باقی مانده

با توجه به اینکه طبق مقررات FDA حداقل نیاز پاستوریزاسیون را به میزان $\log 5$ کاهش میکروارگانیسم های بیماری زا که قادر به رشد در محصول هستند الزامی می کند [۲۱]. به منظور اندازه‌گیری تعداد باکتری‌های /شرشیاکلی زنده مانده در نمونه آب‌هویج بعد از فرایندهای اعمال شده، یک میلی‌لیتر از نمونه با استفاده از نه سری ۹ میلی‌لیتری لوله‌های رقیق‌کننده که حاوی محلول رقیق‌کننده آب پیتونه یا سرم فیزیولوژی تهیه شده بود، به روش رقت سازی ترتیبی رقیق گردید. سپس از لوله‌های 10^{-1} تا 10^{-9} هر کدام با ۳ تکرار به روش کشت پورپلیت در محیط کشت پلیت کانت آگار کشت داده شد و بعد از کشت به دست آمده از بین رقت 10^{-1} تا 10^{-9} از کشت انجام شده، شمارش گردید [۱۶]، سپس کشت آمیخته یا پورپلیت برای شمارش میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه به کار رفت، سپس به مدت ۴۸ ساعت پلیت‌ها به صورت برعکس گرمخانه گذاری شدند تا کلنی‌ها رشد کنند. شمارش با استفاده از دستگاه کلنی کانتر، تعداد کلنی‌ها در هر رقت شمارش و سپس با استفاده از فرمول محاسبه با روش cfu/mL محاسبه و گزارش شد [۱۵].

$$\text{cfu/mL} = \text{عکس رقت} \times \text{تعداد کلنی شمارش شده} \quad (2)$$

عکس حجم نمونه

۱۰-۲-۲- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

pH ۴.۴ می‌باشد. چون تغییرات شدید می‌باشد از این مخلوط تا pH ۵ استفاده کرده و مابقی را با محلول ۳مولار فسفریک اسید تنظیم نموده، همچنین محاسبه میزان استفاده اسید با استفاده از رابطه هندرسون-هاسل باخ انجام می‌گیرد [۱۸].

(۱)

$$pH = pK_a + \log_{10} \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right)$$

که در رابطه بالا HA غلظت اسید، A^- غلظت پایه مزدوج و pK_a لگاریتم منفی ثابت تفکیک اسید می‌باشد [۱۹].

۷-۲-۲- پاستوریزاسیون به روش حمام آب داغ

ابتدا حمام آب را روشن کرده تا به دمای هدف (دماهای ۴۸، ۵۵، ۶۲ درجه سانتی‌گراد) برسد. پک استریل را با ۲۵۰ میلی لیتر نمونه تلقیح شده پرکرده، درون حمام قرار داده و با یک دماسنج، دمای نمونه مورد کنترل قرار می‌گیرد تا به عدد مورد نظر برسد (مدت زمانی که نمونه طی میکند تا از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دمای هدف برسد به اصلاح زمان افزایش دما^۶ نامیده می‌شود و از آن جایی که در محاسبات حرارتی حائز اهمیت است در این پژوهش اندازه‌گیری شده است). در این پژوهش شمارش باکتری های زنده مانده در نمونه در دماهای ۴۸، ۵۵، ۶۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ زمان ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ ثانیه مورد بررسی قرار گرفت.

۸-۲-۲- پاستوریزاسیون به روش اهمیتیک

در این روش نمونه‌ها را در سل مخصوص دستگاه که قبلاً توسط اتوکلاو استریل شده ریخته و در دماهای ۴۸، ۵۵، ۶۲ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و در زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ ثانیه پس از رسیدن به دمای هدف نمونه‌برداری گردید. برای این کار از سرنگ استریل ۱۰ میلی لیتر استفاده شد و نمونه گرفته شده را در فالكون های در بسته ای که قبلاً توسط اتوکلاو استریل شده بود ریخته شد

برای تجزیه و تحلیل آماری تعداد میکروب های/شرشیاکلی باقی مانده پس از هر تیمار اندازه گیری شد و لگاریتم این داده ها برای تحلیل آماری در نظر گرفته شد. تمام داده ها در سه تکرار بررسی شدند و اگر تفاوت شمارش یک تیمار بیش از ۱۵٪ بود، داده های آن تیمار تکرار گردید. اثر دو متغیر مستقل روش حرارت دهی (دو سطح اهمیک و حمام آب) و زمان حرارت دهی (۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ ثانیه) بر متغیر وابسته تعداد/شرشیاکلی باقی مانده به صورت جداگانه در دماهای ۴۸، ۵۵، ۶۲ درجه سانتی گراد در قالب آزمون فاکتوریل طرح کاملاً تصادفی و با نرم افزار SAS انجام شد، مقایسه میانگین ها با استفاده آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج ارزیابی پارامتر تعداد بازمانده های

شرشیاکلی پس از پاستوریزاسیون

نتایج پژوهش در دو روش حمام آب و اهمیک در ولتاژ ۱۰۰ ولت در سه دمای ۴۸، ۵۵ و ۶۲ درجه سانتی گراد و طی ۶ زمان ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه در جدول (۱) ارائه شده است. نتایج جدول تجزیه واریانس حاکی از این است که متغیرهای تعداد بازمانده های/شرشیاکلی در سطح احتمال ۵٪ معنی دار شدند.

Table (1) Analysis of variance of *Escherichia coli* survivors

Sources of changes	Degrees of freedom	average of squares		
		48°C	55°C	62°C
Time	5	0.374 **	0.83 **	25.32 **
Method	1	0.021 **	0.042 *	1.77 **
The interaction of time in the method	5	0.008 **	0.072 **	0.30 **
error	22	0.001	0.01	0.00

ns و * و **: به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار شدن در سطح آماری ۵ و ۱ درصد

زمان ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه که زمان ۰ تیمار شاهد می باشد، به روش اهمیک و حمام آب در جدول (۲) ارائه گردیده که نتایج نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵٪ می باشد. در دماهای بالاتر، تعداد باقی مانده ها در دماهای ۵۵ و ۶۲ درجه سانتی گراد در روش حمام بخار کمتر است.

۳-۲- نتایج ارزیابی پاستوریزاسیون به روش

اهمیک و حمام بخار

با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در این پژوهش در ولتاژ ۱۰۰ ولت و در سه دمای ۴۸، ۵۵ و ۶۲ درجه سانتی گراد و طی ۶

Table (2) Mean comparison of *Escherichia coli* survivors in conventional and ohmic methods

Temperature		48°C	55°C	62°C
Method				
Conventional (water bath)		4.80 ± 0.05 ^a	4.51 ± 0.06 ^a	2.58 ± 0.43 ^b
Ohmic		4.75 ± 0.06 ^b	4.58 ± 0.10 ^b	3.03 ± 0.49 ^a
LSD 5%		0.02	0.06	0.03

زمان افزایش دما و زمان حرارت دهی را باید مورد بررسی قرار داد. زمان افزایش دما یا زمانی که طول می کشد تا تیمار از دمای محیط یعنی ۲۵ درجه سانتی گراد به دمای هدف (در

با توجه به جدول (۲) به وضوح می توان دریافت که فقط مقایسه تعداد باکتری های بازمانده در دو روش گویای شدت میکروب کشی و پاستوریزاسیون نمی باشد بنابراین دو فاکتور

این آزمایش ۶۲، ۵۵، ۴۸ درجه سانتی‌گراد) برسد، از این نظر تر باشد شاهد از دست رفتن تعداد زیادی از میکروب‌ها مهم بوده زیرا در این بازه زمانی حرارت‌دهی صورت گرفته و میکروب‌کشی انجام می‌شود و هر چه این زمان طولانی‌تر باشد شاهد از دست رفتن تعداد زیادی از میکروب‌ها خواهیم بود [۲۲].

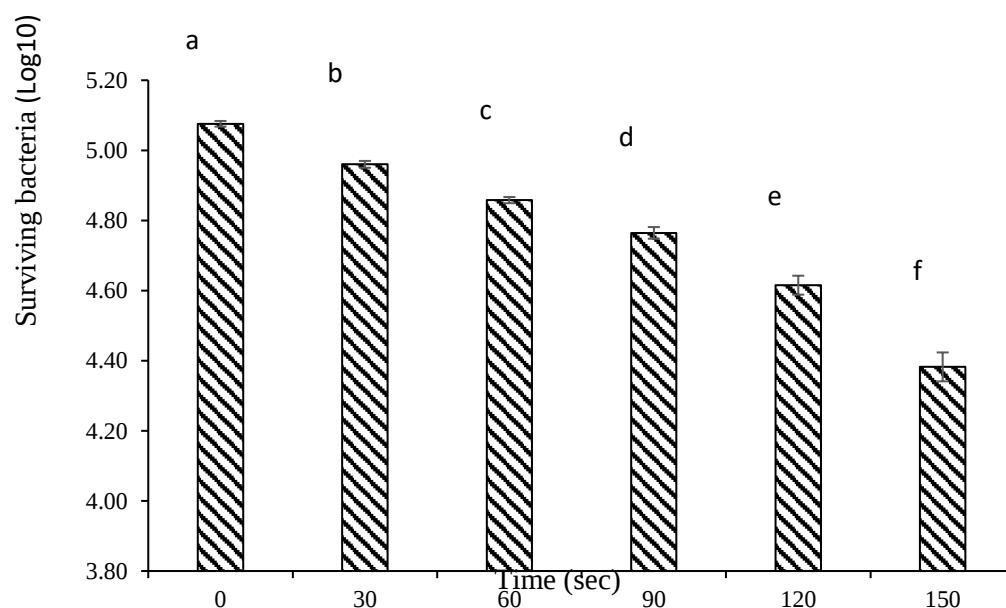
Table (3) Come up time for conventional and ohmic methods

Methods	48°C	55°C	62°C
Water bath	1':20"	1':46"	2':18"
Ohmic	0':34"	0':40"	0':52"
Time difference	0':46"	0':56"	1':26"

حرارت‌دهی در دماهای ۴۸، ۵۵ و ۶۲ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه است.

۳-۳- نمودار مقایسات میانگین تعداد بازمانده‌های/شرشیاکلی نسبت به زمان

شکل‌های (۱)، (۲) و (۳) که به ترتیب نشان دهنده نمودار میانگین لگاریتم (پایه ۱۰) تعداد بازمانده‌ها طی فرآیند

Figure (1) Mean comparison of *Escherichia coli* survivors at different times at 48 °C

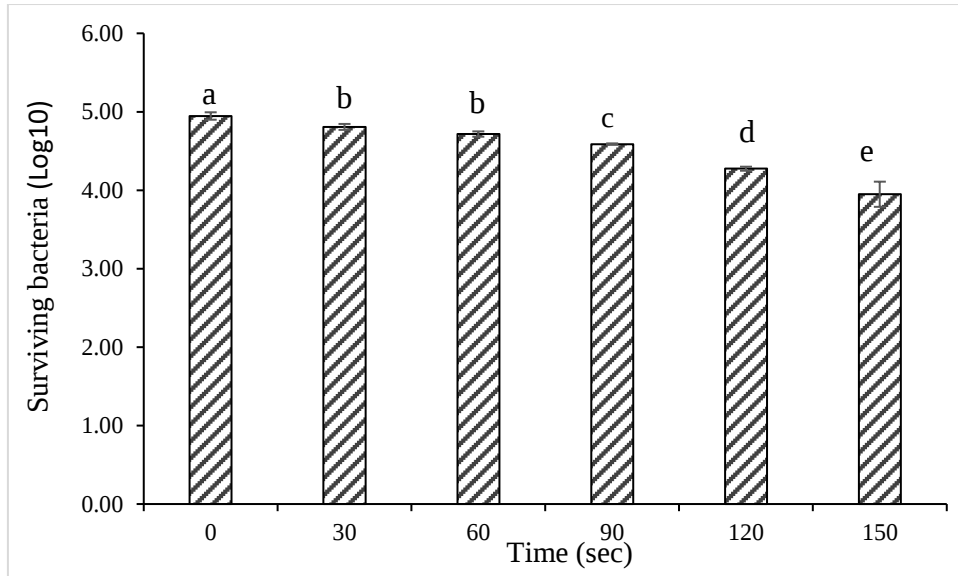


Figure (2) Mean comparison of *Escherichia coli* survivors at different times at 55 °C

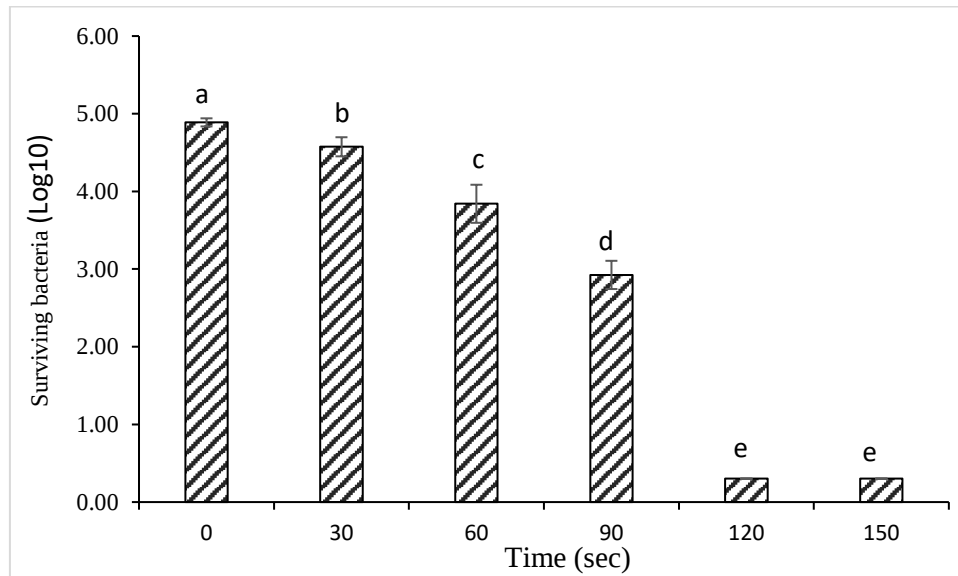


Figure (3) Mean comparison of *Escherichia coli* survivors at different times at 62 °C

۴-۳- نمودار مقایسات میانگین اثر متقابل

روش‌ها در زمان‌های مختلف با تاثیر زمان

افزایش دما

در نمودارهای (۴) الی (۶) نتایج مقایسات میانگین پاستوریزاسیون باکتری /شرشیاکلی به دو روش اهمیت و حمام آب آورده شده که در آن ستون اول هر نمودار نمونه

با توجه به نمودارهای ۱، ۲، ۳، تیمار اول اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با بقیه تیمارها دارد. با افزایش دما تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد تعداد بازمانده‌ها به گونه‌ای کاهش یافته که در تیمارهای ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد این مقدار به صفر رسیده است و کاهش باکتری ها نسبت به بقیه تیمارها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد. در کل بیش‌ترین میزان میکروب‌کشی در دمای ۶۲ درجه و زمان ۱۲۰ ثانیه رخ داده است و با افزایش دما و گذشت زمان میزان میکروب‌کشی افزایش یافته است.

شاهد و در لحظه ۰ ثانیه در هر دما می‌باشد و تیمارهای دیگر در سه دمای ۴۸، ۵۵ و ۶۲ درجه سانتی‌گراد و طی ۵ زمان ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه به هر دو روش حمام آب و اهمیک آورده شده است.

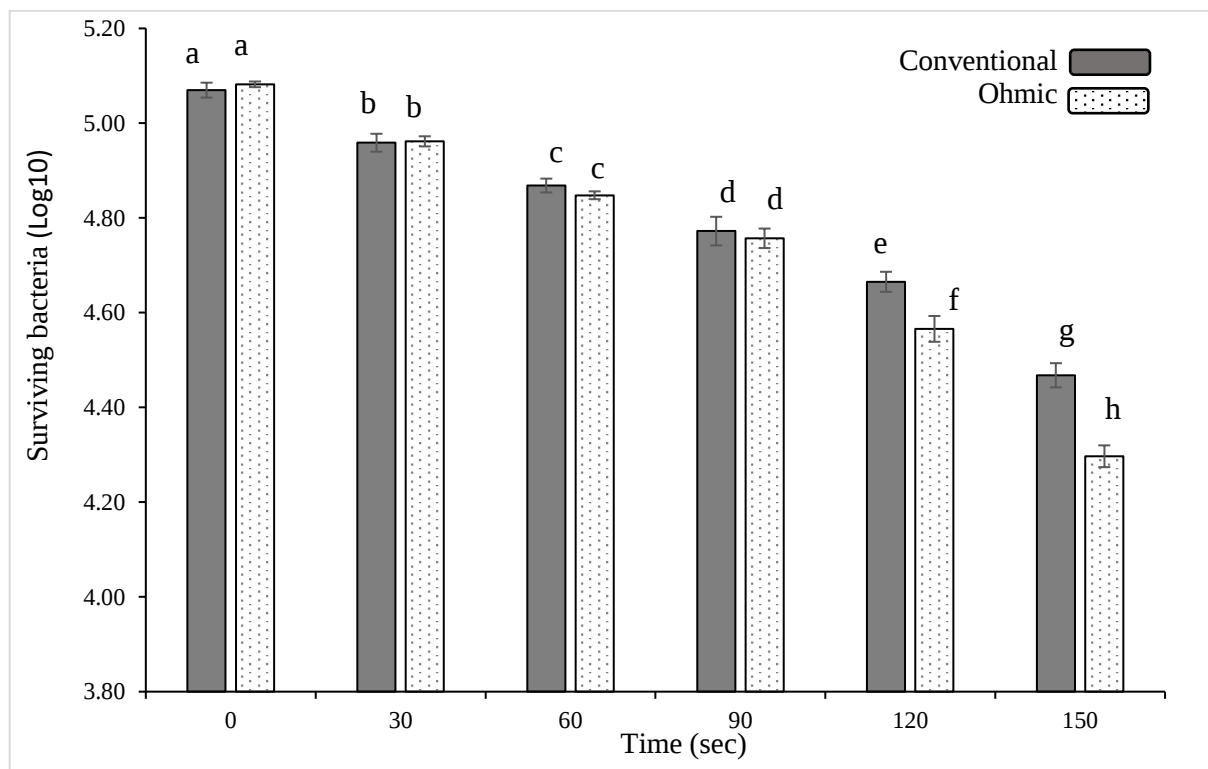


Figure (4) Mean comparison of *Escherichia coli* survivors affected by interaction of time and heating method at 48 °C

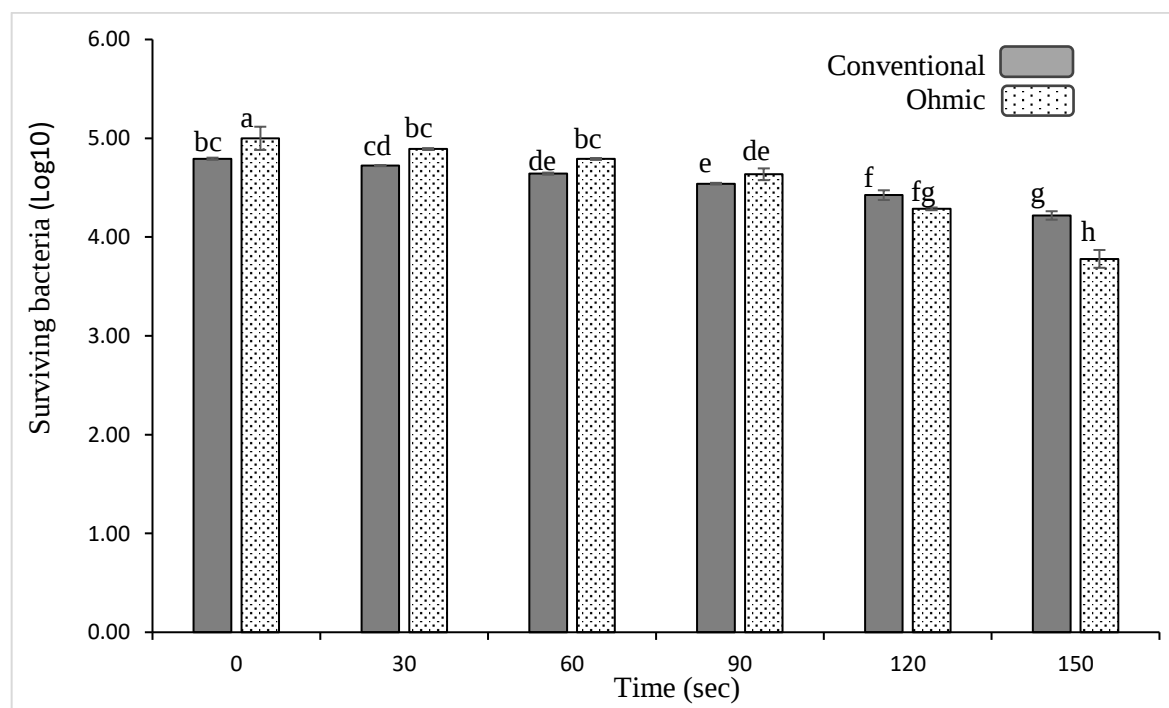


Figure (5) Mean comparison of *Escherichia coli* survivors affected by interaction of time and heating method at 55 °C

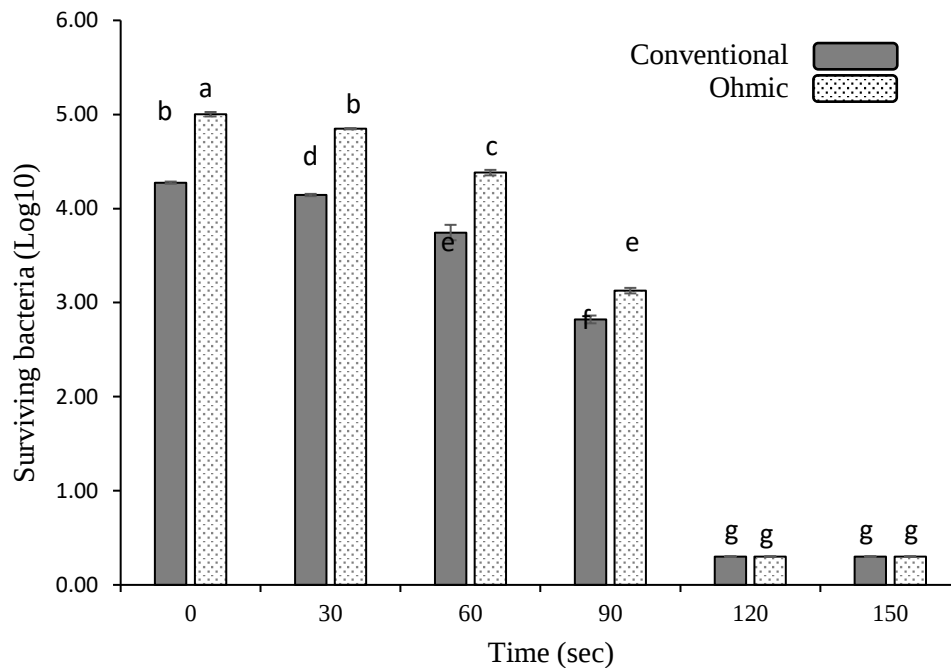


Figure (6) Mean comparison of *Escherichia coli* survivors affected by interaction of time and heating method at 62 °C

سه تیمار حمام آب ۶۰ ثانیه، حمام آب ۹۰ ثانیه و اهمیک ۹۰ ثانیه اختلاف آماری معنی داری وجود ندارد. اگرچه بین حمام آب و اهمیک ۹۰ ثانیه و همچنین حمام آب و اهمیک ۱۲۰ ثانیه اختلاف آماری خاصی دیده نمی شود ولی بین حمام آب و اهمیک ۱۵۰ ثانیه با یکدیگر و با تیمارهای زمان های دیگر اختلاف آماری معنی دار وجود دارد ($p > 0.05$).

در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد با پیشرفت زمان کاهش معنی دار در تعداد میکروب زنده مانده در هر دو روش اهمیک و سنتی مشاهده می شود. در مقایسه اثر متقابل مدت و زمان ملاحظه می شود در زمان های ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ثانیه بین دو تیمار حمام آب و اهمیک در هر بازه زمان اختلاف آماری معنی داری در سطح احتمال ۰.۵٪ وجود دارد و شمارش در روش سنتی پایین تر است. علت این امر طولانی تر بودن زمان افزایش دما در این روش است (جدول ۳) که خود این زمان اثر کشندگی دارد. در زمان های ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه، بین تیمار اهمیک و حمام آب اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۰.۵٪ وجود ندارد (نمودار ۶).

با توجه به نتایج مقایسات میانگین، دو تیمار اول هر نمودار نمونه ی شاهد در آن دما می باشد. با توجه به نمودارها وجود اختلاف آماری معنی داری بین نمونه های شاهد و بقیه تیمارها وجود دارد که نشان دهنده ی کاهش شدید تعداد باکتری های /شیرشیاکلی پس از تیمار حرارتی می باشد.

در دمای ۴۸ درجه سانتی گراد با پیشرفت زمان کاهش معنی دار در تعداد میکروب زنده مانده در هر دو روش اهمیک و سنتی مشاهده می شود. در مقایسه اثر متقابل مدت و زمان ملاحظه می شود در زمان های ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ثانیه بین دو تیمار حمام آب و اهمیک در هر بازه زمان اختلاف آماری معنی داری در سطح احتمال ۰.۵٪ وجود ندارد، برخلاف آن در زمان های ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه، بین تیمار اهمیک و حمام آب اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۰.۵٪ وجود دارد (نمودار ۴).

در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد (نمودار ۵) بین سه تیمار شاهد حمام آب، ۳۰ ثانیه اهمیک و ۶۰ ثانیه اهمیک و همچنین بین

log از میکروارگانیزم های بیماری زا که قادر به رشد در محصول هستند شرایط ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه برای برآوردن حداقل نیاز پاستوریزاسیون در هر دو روش اهمیک و حمام آب کافی است. مقایسه زمان افزایش دما پیش از پاستوریزاسیون هر دو روش اهمیک و حمام آب داغ این نکته حائز اهمیت است که در همه موارد زمان افزایش دمای روش حمام آب بیشتر از روش اهمیک بوده و در این حین حرارت دهی انجام شده است و اثر کشندگی وجود داشته است. اهمیک به دلیل صرف مدت زمان خیلی کوتاه‌تر برای رسیدن به دمای مورد نظر فرآیند و پاستوریزاسیون کامل علاوه‌بر صرفه در وقت که در صنعت نشان‌گر تولید بیشتر در یک بازه زمانی مشخص و کاهش هزینه ها می‌باشد، بیان‌گر صرفه‌جویی در انرژی نیز می‌باشد. در صنعت در اکثر مواقع برای تولید بخار آب و ایجاد حرارت در بویلر ها از سوخت‌های فسیلی استفاده می‌شود ولی برخلاف آن اهمیک دوستدار محیط زیست بوده و با مصرف کمتر انرژی و زمان کمتر باعث حفظ مواد مغذی و افزایش کیفیت محصول می‌شود.

بین تمام تیمارهای اهمیک و حمام آب شاهد و زمان های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ثانیه به طور جداگانه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال $p > 0.05$ وجود دارد بر خلاف آنها بین چهار تیمار آخر یعنی اهمیک و حمام آب ۱۲۰ ثانیه و ۱۵۰ ثانیه هیچ اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. در این دما با نگاه کلی اگرچه بین تیمار های شاهد حمام آب و اهمیک ۳۰ ثانیه و همچنین حمام آب ۶۰ ثانیه و اهمیک ۹۰ ثانیه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد اما بین دو تیمار اهمیک و حمام آب ۱۲۰ ثانیه با تمام نمونه های زمان های ماقبل آن اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال $p > 0.05$ وجود دارد. همچنین این نتایج با نتایج کشانی و همکاران (۲۰۲۰) در یک راستا می‌باشد [۲۳].

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش هدف غیر فعال‌سازی فرم رویشی باکتری *اشرشیاکلی* در آب‌هویج است. با توجه به لزوم کاهش ۵

۵- منابع

- [1] Karamian, A., hazbavi, i., & Shahbazi, F. (2019). Behavior of ohmic heating of carrot juice affected by electrode and voltage gradient. *Innovative Food Technologies*, 7(1), 31-40. <https://doi.org/10.22104/jift.2019.3199.1769>
- [2] Mahmoodi, M. J., & Azadbakht, M. (2019). Investigating the effects of blanching and ohmic heating at microwave drying on some quality characteristics of carrot slices. *Innovative Food Technologies*, 6(2), 247-256. <https://doi.org/10.22104/jift.2018.3130.1750>
- [3] Pokhrel, P. R., Toniazzo, T., Boulet, C., Oner, M. E., Sablani, S. S., Tang, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2019). Inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in carrot juice by combining high pressure processing, nisin, and mild thermal treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 54, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.007>
- [4] Müller, W. A., Ferreira Marczak, L. D., & Sarkis, J. R. (2020). Microbial inactivation by ohmic heating: Literature review and influence of different process variables. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 650-659. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.021>
- [5] Lee, J.-Y., Kim, S.-S., & Kang, D.-H. (2015). Effect of pH for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in orange juice by ohmic heating. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1, Part 1), 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.020>
- [6] Shao, L., Tian, X., Yu, Q., Xu, L., Li, X., & Dai, R. (2019). Inactivation and recovery kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 treated with ohmic heating in broth. *LWT*, 110, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.062>
- [7] Jabbar, S., Abid, M., Hu, B., Wu, T., Hashim, M. M., Lei, S., Zhu, X., & Zeng, X. (2014). Quality of carrot juice as influenced by blanching and sonication treatments. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.007>
- [8] Hashemi, S. M. B., Mahmoudi, M. R., Roohi, R., Torres, I., & Saraiva, J. A. (2019). Statistical modeling of the inactivation of spoilage microorganisms during ohmic heating of sour

- orange juice. *LWT*, 111, 821-828. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.077>
- [9] Gamboa-Santos, J., et al. (2012). "Effects of conventional and ultrasound blanching on enzyme inactivation and carbohydrate content of carrots." *European Food Research and Technology* 234(6): 1071-1079. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1726-7>
- [10] Brochier, B., et al. (2016). "Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating." *Lwt* 74: 396-403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.001>
- [11] Gomes, C. F., et al. (2018). "Ohmic blanching of Tetsukabuto pumpkin: Effects on peroxidase inactivation kinetics and color changes." *Journal of Food Engineering* 233: 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.001>
- [12] Zhang, Y., Wang, Y., Zhou, L., & Liao, X. (2010). A comparative study of inactivation of peach polyphenol oxidase and carrot polyphenol oxidase induced by high-pressure carbon dioxide. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(11), 2297-2305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02403.x>
- [13] Bikle, D. D., Siiteri, P. K., Ryzen, E., Haddad, J. G., & Gee, E. (1985). Serum Protein Binding of 1,25-Dihydroxyvitamin D: A Reevaluation by Direct Measurement of Free Metabolite Levels*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 61(5), 969-975. <https://doi.org/10.1210/jcem-61-5-969>
- [14] Dai, Y., Wen, Z., Ye, T., Deng, G., Zhang, M., Deng, Q., et al. (2018). Empirical treatment with non-anti-tuberculosis antibiotics decreased microbiological detection in cervical tuberculous lymphadenitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 92(3), 245-249. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.008>
- [15] Crone, P. B. (1948). The counting of surface colonies of bacteria. *Epidemiology and Infection*, 46(4), 426-430. <https://doi.org/10.1017/S0022172400036603>
- [16] Buttiaux, R., Samaille, J., & Pierens, Y. (1957). Identification of Coliform Bacteria Isolated from Water. Eijkman Test and Production of Indole at 44°C. IMViC Tests. [L'identification des Escherichae des eaux. Test d'Eijkman et production d'indole à 44°C. Tests I.M.V.I.C.]. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, 8, 137-149. <https://doi.org/10.5555/19572702971>
- [17] Abbasi, Z., Jafari, M., & Fazel, M. (2019). Potential of microencapsulation to protect ascorbic acid under different temperature and pH during heating process. *Brazilian Journal of Technology*, 2(2), 573-589. <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJT/article/view/2067>
- [18] Kedia, P., Badhe, Y., Gupta, R., Kausley, S., & Rai, B. (2023). Modeling the effect of pH on the permeability of dried chitosan film. *Journal of Food Engineering*, 358, 111682. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111682>
- [19] Knirsch, M. C., Alves dos Santos, C., Martins de Oliveira Soares Vicente, A. A., & Vessoni Penna, T. C. (2010). Ohmic heating – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(9), 436-441. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.06.003>
- [20] Mokhtari, M., Zamindar, N., Zia, M., Doudi, M., & Ghasemi Sepero, N. (2024). Inactivation of *Byssoschlamys fulva* during ohmic heating of tomato juice. *Food Science and Technology International*, 10820132231222509. <https://doi.org/10.1177/10820132231222509>
- [22] USDA. 2018. Small Entity Compliance Guide: Juice HACCP. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/small-entity-compliance-guide-juice-haccp> [Accessed 30 November 2018].
- [22] Keshani, M., Zamindar, N., & Hajian, R. (2021). Physicochemical properties of frozen tuna fish as affected by immersion ohmic thawing and conventional thawing. *Food Science and Technology International*, 28(8), 728-734. <https://doi.org/10.1177/10820132211056776>
- [23] Keshani, M., Zamindar, N., & Hajian, R. (2020). Effect of Immersion Ohmic Heating on Thawing Rate and Properties of Frozen Tuna Fish. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 16(5), 621-628. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v16i5.82797>



Scientific Research

Investigating the effect of ohmic and water bath heating on surviving of *Escherichia coli*

Syedramin Rafiaei¹, Nafiseh Zamindar^{2*},

1- Master Student, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2024/4/4 Accepted:2024/9/28 Keywords: Inactivation, <i>Escherichia coli</i>, carrot juice, Ohmic heating. DOI: 10.22034/FSC.T.22.158.50. *Corresponding Author E- n.zamindar@khuisf.ac.ir	Carrot juice has a very short shelf-life after production. Pasteurization is a suitable way to preserve and commercialize this product. In this study, an ohmic device was used as a heat source and <i>Escherichia coli</i> was chosen as an indicator of the effectiveness of bacterial inactivation for pasteurization. Fresh carrot juice was subjected to 3 temperature levels of 48, 55, and 62°C and 6 time levels of 0, 30, 60, 90, 120, and 150 seconds at a constant voltage of 100 volts under thermal processing and the number of surviving bacteria was investigated. . Conventional hot water bath pasteurization was also performed and compared with the ohmic method, which proved the greater efficiency of the ohmic method. Ohmic pasteurization not only prevents waste of time and energy but also leads to the inactivation of bacterial vegetative forms in a very short time at high speed. The changes in surviving bacteria with increasing temperature and time were significant at the 1% probability level using a completely randomized method. At 62°C, the best result for <i>Escherichia coli</i> was obtained.



ارزیابی برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی سوسیس گوشت گاو حاوی عصاره چای ترش (*Hibiscus sabdariffa* L.)

شریف قربانی^۱، سارا جعفریان^{۲*}، مهدی شریفی سلطانی^۳، لیلا روزبه نصیری^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران

۳- استادیار، گروه دامپزشکی، واحد چالوس، دانشگاه آزاد اسلامی، چالوس، ایران

۴- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۱۰

کلمات کلیدی:

عصاره چای ترش،

ریزپوشانی،

سوسیس گوشت گاو،

نگهدارنده طبیعی

گرچه مطالعات زیادی نشان داده‌اند استفاده از افزودنی‌های طبیعی گیاهی و ریزپوشانی عصاره‌های گیاهی در فرآورده‌های گوشتی برای کاهش اثرات مضر افزودنی‌های شیمیایی، اهمیت زیادی دارد، اما مطالعات در این حیطه بسیار محدود است. بر این اساس، مطالعه حاضر به بررسی اثرات عصاره چای ترش (*Hibiscus sabdariffa* L.) بر بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی سوسیس گوشت گاو پرداخته است. در این تحقیق، محتوای فنولی عصاره هیدروالکلی گیاه چای ترش با آزمون فولین-سیوکالتو و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون DPPH در غلظت‌های مختلف ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm عصاره مورد ارزیابی قرار گرفت. خصوصیات کپسول‌های حاوی این عصاره از جمله اندازه ذرات، پتانسیل زتا، کارایی، حلالیت، دانسیته توده و مورفولوژی آنها و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی فرآورده‌های گوشتی حاوی این کپسول‌ها مانند میزان تیوباربیتوریک اسید، رنگ و ویژگی‌های حسی ارزیابی شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز وریانس یکطرفه انجام گرفت. نتایج نشان داد میزان ترکیبات فنولی کل در عصاره چای ترش برابر ۱۷۴.۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره بوده و بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های بالای ۱۵۰۰ ppm عصاره مشاهده گردید. اندازه ذرات عصاره بین ۱۰۸.۵۱۷ تا ۶۴۶.۳۶۹ میکرومتر بود و پارامترهای فیزیکوشیمیایی مانند پتانسیل زتا، کارایی، حلالیت، دانسیته توده، و مورفولوژی کپسول در محدوده مناسب قرار داشتند. در طول نگهداری، میزان ترکیب تیوباربیتوریک اسید در نمونه شاهد افزایش یافت و این اختلاف با نمونه حاوی ۱۵۰۰ ppm عصاره چای ترش معنادار بود. همچنین با افزایش زمان نگهداری، میزان فاکتور رنگی L کاهش یافت، ولی ارزیابی حسی نشان داد تیمارها امتیاز قابل قبولی کسب کردند. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره چای ترش، چه به شکل آزاد و چه ریزپوشانی شده، می‌تواند به عنوان یک افزودنی طبیعی برای افزایش کیفیت و بهبود خواص حسی سوسیس گوشت گاو جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی مد نظر قرار گیرد.

DOI:10.22034/FSCT.22.158.63.

* مسئول مکاتبات:

drsjaafarian@yahoo.com

۱- مقدمه

اکسیداتیو و کاهش التهاب نقش مؤثری ایفا کنند [۷]. با توجه به خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی چای ترش، استفاده از آن در فرآورده‌های گوشتی برای جلوگیری از اکسیداسیون و فساد لیپیدها و افزایش ماندگاری و کیفیت محصولات بسیار رایج است [۸]. عصاره‌های گیاهی با سطوح بالای ترکیبات فنولی و دیگر مواد آنتی اکسیدانی می‌توانند در تأخیر واکنش‌های اکسیداتیو موثر باشند. بنابراین، استفاده از روش‌های حفظ بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها ضروری است. همچنین، برای بهبود پایداری شیمیایی و بیولوژیکی ترکیبات حساس عصاره‌های گیاهی، از فناوری میکروکپسولاسیون (ریزپوشانی) می‌توان استفاده کرد که می‌تواند آنها را در برابر واکنش‌های اجتناب‌ناپذیر در سیستم‌های غذایی محافظت کند.

ریزپوشانی مواد طبیعی نقش بسیار مهمی در افزایش پایداری، جذب، کارایی و کیفیت محصولات دارد و کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی پیدا کرده است. این فناوری امکان کنترل انتشار مواد فعال را فراهم می‌کند و موجب بهبود ویژگی‌های حسی و فیزیکی محصولات می‌شود. در صنایع غذایی، ریزپوشانی می‌تواند ماندگاری طعم، عطر و مواد مغذی را افزایش دهد و در عین حال از تخریب آنها در برابر عوامل محیطی مانند نور، حرارت و اکسیژن جلوگیری کند. به عنوان مثال، ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند به طور مؤثرتری در مواد غذایی حفظ شوند و باعث بهبود کیفیت تغذیه‌ای و جذابیت محصولات شوند [۹، ۱۰]. اخیراً کاربردهای روش ریزپوشانی در صنایع غذایی افزایش یافته است زیرا مواد محصور شده را می‌توان در برابر رطوبت، گرما یا سایر شرایط شدید محافظت شده و پایداری و ماندگاری آنها حفظ گردد [۱۱]. مطالعات متعددی در ارتباط با اثرات عصاره‌های گیاهی بر ماندگاری فرآورده‌های گوشتی خصوصاً سوسیس و کالباس انجام شده است. برای نمونه، مطالعه‌ای که خانلو و همکاران با هدف بررسی تأثیر عصاره اتانولی دانه ریحان و برگ‌های گزنه بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و حسی سوسیس در طول زمان نگهداری در یخچال انجام دادند،

سوسیس یکی از قدیمی‌ترین و محبوب‌ترین فرم‌های فرآوری شده گوشت است. گوشت و فرآورده‌های گوشتی به راحتی می‌توانند توسط میکروارگانیسم‌ها آلوده شوند و در صورت عدم شرایط نگهداری مناسب، باعث رشد باکتری‌های فسادزا و بیماری‌زا شوند [۱]. برای جلوگیری از فساد و کاهش خطرات بهداشتی، فرآورده‌های گوشتی مانند سوسیس و کالباس نیاز به استفاده از مواد نگهدارنده دارند. این مواد نگهدارنده می‌توانند شامل نمک‌های نیتريت و نیترات باشند که علاوه بر بهبود رنگ و ماندگاری محصولات، در کنترل رشد میکروبی نیز مؤثر هستند [۲]. اگرچه استفاده از افزودنی‌های شیمیایی می‌تواند در حفظ کیفیت فرآورده‌های گوشتی مفید باشد، اما استفاده بیش از حد از آنها می‌تواند برای سلامتی مضر بوده و خطر ابتلا به بیماری‌هایی مانند سرطان را افزایش دهد از این رو، استفاده از افزودنی‌های طبیعی به جای افزودنی‌های مصنوعی اهمیت زیادی دارد. عصاره‌های گیاهی، به دلیل خواص متنوعی که دارند، می‌توانند در حفظ کیفیت حسی و تغذیه‌ای فرآورده‌های گوشتی بسیار مؤثر باشند [۳]. یکی از این عصاره‌های گیاهی، عصاره چای ترش یا روزل (*Hibiscus Sabdariffa*) است. این گیاه که از خانواده مالواسه است، اصل و نشأت دقیقی ندارد و ممکن است از مناطقی مانند هند، آفریقای حاره‌ای یا عربستان سعودی منشأ گرفته باشد. اما در حال حاضر، کشت این گیاه به طور گسترده در مناطق آب و هوای گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا، آفریقا و آمریکای مرکزی و جنوبی صورت می‌گیرد [۴، ۵]. چای ترش به عنوان یک نوشیدنی گرم یا سرد در بسیاری از مناطق جهان مصرف می‌شود. این محصول دارای خواص درمانی متعددی است که در پزشکی عمومی کاربرد دارند، از جمله کاهش فشار خون و کلسترول، بهبود هضم غذا، خاصیت ضدالتهابی و تقویت سیستم ایمنی و علاوه بر این، چای ترش دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدسرطانی و ضد میکروبی بالقوه‌ای نیز است [۶]. این چای منبع غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی همچون کاتچین‌ها، تئین‌ها، پلی فنول‌ها و فلاونوئیدها است که می‌توانند در مبارزه با آسیب‌های

فیزیکوشیمیایی و حسی این محصول تأثیر نامطلوبی دارد [۱۹].

در مجموع، استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی در فرآورده‌های گوشتی می‌تواند عوارض جبران‌ناپذیری بر بدن داشته و در ایجاد بیماری‌هایی مانند سرطان نقش داشته باشد. در همین راستا، اثرات عصاره‌های گیاهی بر کیفیت و ماندگاری فرآورده‌های گوشتی، به ویژه سوسیس، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است و تحقیقات متعددی انجام شده است. با این حال، مطالعات درباره اثر عصاره آزاد و ریزپوشانی شده کاسبرگ چای ترش بر خواص فیزیکوشیمیایی سوسیس گوشت گاو بسیار محدود است و نتایج مطالعات قبلی در این زمینه تا حدی ضد و نقیض بوده است [13-16, 19]. بر این اساس، با توجه به عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی بر کیفیت و ماندگاری محصولات گوشتی به ویژه سوسیس‌های تولیدی از یک سو، و نیز خواص بسیار مفید چای ترش به ویژه از دیدگاه اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی از سوی دیگر، تحقیق حاضر با هدف استفاده از یک افزودنی طبیعی (عصاره چای ترش) در فرآورده‌های گوشتی و بررسی تأثیر آن بر خواص فیزیکوشیمیایی و حسی محصول نهایی به ارزیابی برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی سوسیس گوشت گاو حاوی عصاره چای ترش پرداخته است. نتایج این تحقیق می‌تواند در تولید فرآورده‌های گوشتی با کیفیت و ماندگاری بالا، به ویژه سوسیس، مورد توجه قرار گیرد و استفاده از عصاره‌های گیاهی به ویژه چای ترش می‌تواند به عنوان جایگزینی پایدار و سالم برای نگهدارنده‌های شیمیایی در صنعت فرآورده‌های گوشتی مورد نظر باشد. بنابراین با بررسی‌های فیتوشیمیایی و بهبود عصاره گیاه چای ترش و انجام تجربیات تکمیلی می‌توان از آن در مسیرهای صنعتی تولید سوسیس‌های با کیفیت بالا بهره برد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده

گوشت گاو مورد استفاده در این پژوهش از کارخانجات معتبر صنایع غذایی واقع در شهر تهران، ایران تأمین شده

نشان داد که سطوح ۰/۱ و ۰/۳ درصدی عصاره گزنه نتایج بهتری در مقایسه با عصاره دانه ریحان بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سوسیس داشته است [۱۲]. همچنین، نتایج پژوهشی دیگر حاکی از آن بود که نمونه سوسیس حاوی ۶۰٪ عصاره کرفس می‌تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای نیتریت عمل کرده و از نظر خواص آنتی‌اکسیدانی، نمونه سوسیس حاوی ۲۰٪ عصاره کرفس بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا می‌باشد [۱۳]. از سویی، تحقیقات نشان می‌دهند افزودن ترکیبات طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و فیزیکوشیمیایی به فرآورده‌های گوشتی می‌تواند کیفیت و ماندگاری این محصولات را بهبود بخشد. در این راستا نتایج پژوهشی نشان می‌دهند که افزودن عصاره آبی برگ گیاه (*Melastoma malabathricum* L.) به سوسیس گوشت گاو، باعث بهبود خواص فیزیکوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی این محصول شد [۱۴]. همچنین تجربیات تحقیقاتی بیانگر آنند که افزودن عصاره چای ترش تا میزان ۸ درصد به سوسیس مرغ، موجب افزایش میزان رطوبت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد [۱۵]. یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهند که عصاره روزل می‌تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای بهبود ایمنی و ترکیب غذایی در برخی سوسیس‌ها مورد استفاده قرار گیرد [۱۶]. علاوه بر این، ریزپوشانی روغن اسانس گیاه *Zanthoxylum bungeanum* به منظور افزایش پایداری طعم و مهار اکسیداسیون لیپیدی در سوسیس سبک چینی موثر بوده است [۱۷]. همچنین عصاره رزماری کپسوله شده نیز می‌تواند به عنوان نگهدارنده طبیعی در گوشت گاو و فرآورده‌های گوشتی به کار رود [۸]. در مطالعات اخیر، مشخص شده است که عصاره چای ترش نانوکپسوله شده با کربوکسی متیل سلولز (CMC) می‌تواند به عنوان نگهدارنده طبیعی در گوشت و فرآورده‌های گوشتی مانند ناگت مرغ استفاده شود [18]. در مقابل، نتایج مطالعه‌ای نشان داد که استفاده از عصاره کاسبرگ روزل در فرمولاسیون سوسیس نوع فرانکفورت مناسب نیست، زیرا بر خواص شیمیایی،

عصاره با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی گرم گالیک اسید/گرم عصاره اندازه گیری شد [۲۱].

۲-۴- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره چای ترش، بر مبنای تحقیقات پیشین [۲۲]، از روش مهار رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. در این روش، ابتدا 0/3 میلی لیتر از عصاره به 3/7 میلی لیتر محلول DPPH (6×10^5 mol/l) اضافه گردید و مخلوط حاصله به شدت هم زده شد. پس از 30 دقیقه تاریک گذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه ها در طول موج 517 nm در مقابل شاهد خوانده شد. تمامی این مراحل در مورد TBHQ به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد و شاهد (محلول DPPH متانولی تهیه شده به علاوه ی حلال های مربوطه) انجام شد. درصد مهار از طریق رابطه 1 زیر محاسبه گردید

$$100 \times \text{جذب شاهد} / \text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد} =$$

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH (1)

۲-۵- کپسولاسیون

با توجه به تجربیات آزمایشگاهی پیشین محققین و نیز تجربیات پژوهشی دیگر پژوهشگران [۱۸]، مالتودکسترین (DE=۱۶-۲۰) و پکتین (درجه متوکسیل بالا) به عنوان پوشش برای تهیه عصاره چای ترش کپسوله شده انتخاب شدند. در واقع این مواد خواص محافظتی و پایدارکنندگی مناسبی دارند. مالتودکسترین می تواند ترکیبات زیست فعال را در برابر شرایط نامطلوب محافظت کند، و پکتین با تشکیل ژل، پوشش مؤثری برای حفاظت عصاره فراهم می کند. مالتودکسترین و پکتین در محلول کلروفرم/متانول (۱:۳ وزن به وزن) حل شده و سپس در روتاری اوپراتور (Steroglass, Strik202, Italy) قرار داده شد تا حلال ها از بین بروند و یک لایه نازک بر روی دیواره تشکیل شود. همچنین، عصاره چای ترش نیز در محلول دی کلرومتان/متانول (۱:۲ وزن به وزن) حل شد و مخلوط حاصل با نسبت ۴:۱ مالتودکسترین و پکتین (مالتودکسترین-پکتین: عصاره) ترکیب شد و در نهایت حلال ها تحت بخار نیتروژن برداشته شدند. لایه نازک تولید شده در ۲ میلی لیتر بافر

است. علاوه بر آن، چای ترش مصرفی نیز از عطاری معتبر در تهران خریداری گردیده است. نکته قابل توجه اینکه کلیه مواد اولیه دیگر مورد استفاده در این مطالعه نیز از شرکت های داخلی معتبر و فعال در ایران تهیه شده اند. این موضوع حاکی از آن است که در این پژوهش تلاش شده است تا از مواد با کیفیت مناسب و منطبق بر استانداردهای ملی برای انجام آزمایشات استفاده شود.

۲-۲- تهیه عصاره

پودر چای ترش به نسبت ۱ به ۵ با حلال اتانول-آب (50%) (این به دلیل توانایی در استخراج موثر ترکیبات قطبی و غیرقطبی موجود در چای ترش، به عنوان حلال انتخابی در نظر گرفته شده است) (20 گرم نمونه با 100 میلی لیتر حلال) مخلوط و دور از نور به مدت 48 ساعت در شیکر (Iran Labtron, Ls-100) با سرعت 160 rpm قرار داده شد. سپس سه مرحله سانتریفوژ (Hermle, z200A, Germany) هر بار 10 دقیقه با سرعت 3000rpm انجام شد و در هر مرحله فاز آبی (فاز رویی) جمع آوری گردید، تا دیگر رسوبی در ته لوله دیده نشود. سپس فازهای آبی جمع آوری شده، با کاغذ واتمن شماره 1 صاف شدند. در ادامه توسط اوپراتور (حد اکثر دما 50 درجه سانتیگراد) (TAM 2times, Iran) حلال تبخیر و عصاره های حاصل تا زمان انجام آزمایش در دمای 18- درجه سانتیگراد نگهداری شدند [۲۰].

۲-۳- تعیین میزان فنول کل

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره بر اساس تجربیات پژوهشی پیشین [۲۱]، از طریق روش طیف سنجی با معرف فولین-سیوکالتیو اندازه گیری شد و نتایج بر اساس میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره بیان گردید. در این راستا، 0/5 میلی لیتر از عصاره 0/1% (محلول 0/1 گرم از عصاره با 100 میلی لیتر حلال) با 2/5 میلی لیتر از معرف سیو کالچو رقیق شده با آب با نسبت (10:1) ترکیب و 2 میلی لیتر از کربنات سدیم 7/5 درصد مخلوط گردید و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق قرار داده سپس جذب آنها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر PG (Instrument, T80, England) خوانده شد. مقادیر فنول کل

200 میلی گرم ریزپوشینه به 2 میلی لیتر محلول استخراجی شامل متانول- اسید استیک-آب به ترتیب به نسبت 8-42-50 (حجمی/حجمی/حجمی) اضافه شده و به مدت یک دقیقه همزده شد و در ادامه تحت اولتراسوند به مدت 20 دقیقه در دو مرحله با شدت 100% و فرکانس 20 کیلوهرتز قرار گرفت. بعد از این مرحله، سانتریفیوژ کردن (Hermle, z200A- Germany) در 5000 دور بر دقیقه به مدت 10 دقیقه انجام گرفت. کارایی کپسول مطابق رابطه ۲ محاسبه و به صورت درصد بیان گردید.

$$\text{مقدار ترکیبات فنولی ریزپوشانی شده} = \frac{\text{مقدار اولیه ترکیبات فنولی موجود}}{\text{کارایی ریز پوشانی (\%) (۲)}}$$

۲-۸- اندازه گیری حلالیت کپسول و تعیین دانسیته توده

کپسول

هدف از اندازه گیری حلالیت، ارزیابی قابلیت انحلال و آزادسازی مواد موثره در آب است که میزان و سرعت جذب آنها در بدن را نشان می دهد. در مقابل، اندازه گیری دانسیته توده ای کپسول به بررسی خصوصیات فیزیکی و یکنواختی پرکردن کپسول می پردازد که بر خواص جریان پذیری و نحوه پرکردن آنها تأثیرگذار است. روش های اندازه گیری ارائه شده برای این دو پارامتر، ساده، معتبر و رایج هستند. این اندازه گیری ها به درک بهتر خصوصیات فیزیکوشیمیایی کپسول کمک کرده و در ارزیابی و مقایسه مشخصات نهایی محصول مفید خواهند بود. در این تحقیق، با استفاده از روش کاری پژوهشهای پیشین [۲۵]، به منظور اندازه گیری حلالیت کپسول، ۱ گرم از پودر تولیدی در 100 میلی لیتر آب حل و محلول تولیدی به مدت 10 دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (Hermle, z200A- Germany) با سرعت 7500 دور بر دقیقه برای جدا کردن بخش های نامحلول قرار گرفت. سپس 25 میلی لیتر از بخش شفاف بالای لوله آزمایش برداشته و به مدت 5 ساعت در آون 105 درجه سانتی گراد قرار داده شد. مقدار حلالیت بر اساس رابطه ۳ زیر محاسبه و برحسب درصد بیان گردید.

فسفات (۱۰ میلی مول/لیتر، pH 7.4) حل شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد با فشار ۲۰۰ بار با هموژنایزر (300VT, BioLogics, USA) همگن شد. سوسپانسیون حاصل در تاریکی در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. سپس با سرعت ۶۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ (Hermle, z200A, Germany) شد. در نهایت، عصاره کپسوله شده چای ترش با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی-2 (Christ, Alpha LD Plus, Germany) از دستگاه خشک کن انجمادی برای حفظ کیفیت و ویژگی های زیست فعال عصاره چای ترش استفاده شد، زیرا این روش خشک کردن از تخریب ترکیبات مفید در دمای بالا جلوگیری می کند و باعث بهبود بازیابی و پایداری عصاره خشک شده می شود.

۲-۶- تعیین اندازه ذرات کپسول بهینه و پتانسیل زتا

بر مبنای مطالعات پیشین و به منظور سنجش اندازه و سطح مخصوص ذرات کپسوله شده، ابتدا دیسپرسیون آن ها در متانول تهیه شده و سپس به کمک دستگاه آنالیز، اندازه نانوذرات (Horiba, S2-100-SZ, Japan) مورد اندازه گیری قرار گرفت [۲۳]. پتانسیل زتا شاخص مهمی برای پایداری سیستم های کلوئیدی است. این پتانسیل الکتریکی در صفحه برشی بین لایه داخلی و بیرونی یونی اطراف ذرات کلوئیدی است. پتانسیل زتای بالا باعث دفعه الکتریکی قوی بین ذرات می شود و پایداری سیستم را افزایش می دهد. این مقدار را می توان با دستگاه پراش دینامیکی نور، اندازه گیری کرد و در مطالعه سیستم های کلوئیدی مانند عصاره چای ترش کاربرد دارد. در پژوهش حاضر، پتانسیل زتا بر اساس بار الکتریکی سطحی ذره در دمای اتاق با دستگاه پراش دینامیکی نور (Malvern, ZEN3600, England) اندازه گیری شد [۲۴].

۲-۷- کارایی کپسول

در تحقیق حاضر و بر مبنای پژوهشهای پیشین [۲۴]، برای تعیین مقدار عصاره ریزپوشانی شده از مقدار ترکیبات فنولی کل موجود در ریزپوشینه، کارایی کپسول مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا، استخراج عصاره از ریزپوشینه ها طبق روش روبرت و همکاران [۲۴] انجام شد. برای این منظور

درجه نشاسته خوراکی، گلوتن، مخلوط ادویه جات و روغن مایع خوراکی به همراه ۱/۳ مابقی یخ به کاتر اضافه گردید و در مجموع به مدت ۳ دقیقه کاتریزاسیون مخلوط شدند. سپس در بچ‌های جداگانه در کاتر نیتريت سدیم و عصاره آزاد و انکپسوله، چای ترش به نسبت های مختلف (۲۰:۸۰، ۴۰:۶۰، ۶۰:۴۰، ۸۰:۲۰، ۱۰۰:۰ و ۱۰۰:۰) که این نسبت ها بر اساس مطالعات تجربی محققین در آزمایشگاه و انجام آزمایشهای پایلوت و با هدف دستیابی به بهترین تأثیر بر خواص فیزیکوشیمیایی و حسی محصول انتخاب شدند و به گونه ای تنظیم شدند که بتوان بهینه ترین مقدار عصاره را برای بهبود خواص محصول تعیین کرد. نسبت های چای ترش به همراه نیمی از مخلوط آب و یخ به خمیر اضافه و با دستگاه پرکن (SMART, China) در پوشش های مخصوص پلی آمیدی پر و پیچیده شدند. در نهایت، سوسیس ها در اتاق پخت با بخار در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه که مرکز آن ها به دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برسد پخته شدند. پس از پخت، نمونه های سوسیس با آب ۱۲ درجه سانتی گراد دوش سرد شده و پس از رسیدن به دمای اتاق به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد انتقال داده و تا زمان انجام آزمایش در این شرایط دمایی (۱±۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. از نظر طول دوره آزمایش، دوره نگهداری ۳۰ روزه مد نظر محققین قرار گرفت. در واقع، در صنعت تولید فرآورده های گوشتی مانند سوسیس، نگهداری محصول تا ۳۰ روز یک رویکرد مرسوم و استاندارد است. این دوره زمانی کافی است تا تغییرات کیفی محصول در طول نگهداری به درستی بررسی و ارزیابی شود. در ادامه، در روزهای ۱۴، ۷، ۱ و ۳۰ سه سوسیس از هر بخش به طور تصادفی انتخاب شدند و برای انجام آزمایشات فیزیکوشیمیایی مورد آنالیز قرار گرفتند. همچنین تیمارهای مذکور در روز اول نگهداری مورد ارزیابی حسی نیز قرار گرفتند. این امر به این دلیل انجام گرفت که در روزهای پایانی دوره نگهداری، کیفیت محصول به حدی کاهش یافت که ارزیابی حسی اطلاعات مفیدی ارائه نمی دهد و آنالیزهای فیزیکوشیمیایی

$$(3) S = (m1 - m2) / 0.25 \times 100$$

در این معادله M1، M2 و S به ترتیب وزن ظرف پس از خارج کردن از آون، وزن ظرف خالی و حلالیت پس از مدت ۹ ساعت خواهد بود [۲۵].

جهت اندازه گیری دانسیته توده کپسول مقدار ۵ گرم از پودر تولیدی در یک استوانه مدرج ریخته سپس حجم آن اندازه گیری شد. اندازه گیری سه بار تکرار گردید و مقدار میانگین ثبت شد. دانسیته توده کپسول با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید [۲۵].

$$(4) Pb = m / vb$$

که در این رابطه Pb چگالی توده ای و m جرم نمونه و Vb حجم توده ای نمونه می باشد.

۹-۲- مورفولوژی کپسول

به منظور بررسی مورفولوژی کمپلکس تشکیل شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Hitachi, SU3500, Japan) استفاده شد و تصاویر با اسکن سطح میکروکپسول ها تهیه شد. نمونه ها با یک فیلم نازک از طلا روکش شده و در بزرگنمایی های مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند [۲۶].

۱۰-۲- تهیه سوسیس گوشت گاو

سوسیس گوشت گاو طبق فرمولاسیون کلی تولید شده بر اساس استاندارد ملی مربوط به فرآورده های گوشتی (2303) و مطابق با روش های معمول در صنعت تهیه گردید (گوشت گاو ۶۰٪، روغن مایع خوراکی ۵٪، مخلوط آب و یخ ۲۲٪، نشاسته خوراکی ۵/۸٪، گلوتن ۲٪، ایزوله سویا ۲٪، نمک و ادویه جات ۷۳/۲٪، اسید آسکوربیک ۰/۰۲٪، نیتريت سدیم ۰/۰۵٪، پلی فسفات سدیم ۰/۰۴٪). در این فرآیند، از کاتری ۵ لیتری (MADO, Germany) با دمای صفر درجه سانتی گراد استفاده شد. گوشت قرمز چرخ شده به همراه نمک و پلی فسفات سدیم با ۱/۳ از یخ فرمولاسیون در کاتر ریخته شد و به مدت ۱.۵ تا ۲ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه مخلوط شدند. سپس ۱/۳ مابقی یخ، ایزوله سویا، اسید آسکوربیک به کاتر افزوده و به مدت ۱.۵ تا ۲ دقیقه کاتریزاسیون ادامه یافت پس از کاهش دما به میزان دو

به عنوان شاخص اصلی ارزیابی کیفیت در نظر گرفته می‌شوند. تمامی آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند.

۲-۱۱-۲- ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی

۲-۱۱-۲-۱- اندازه گیری میزان تیوباریتوریک اسید

میزان اکسیداسیون چربی نمونه های سوسیس به روش تیوباریتوریک اسید، انجام گرفت. ۱۰ گرم نمونه وزن شده و ۳۵ میلی لیتر اسید پرکلریک ۰.۴٪ و نیز یک میلی لیتر محلول BHT ۰.۵٪ در اتانول هموژن شد. مخلوط با کاغذ واتمن صاف شده و ۵ میلی لیتر محلول صاف شده با ۵ میلی لیتر تیوباریتوریک اسید ۰.۰۲ مولار درون لوله آزمایش درب دار مخلوط گردیده و ۶۰ دقیقه در بن ماری آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن، جذب نور با اسپکتروفتومتر (Ningbo Mflab, GT211-NV203 Nv20, USA) در طول موج 532 نوارت شد و میزان تیوباریتوریک اسید در کیلوگرم نمونه بر اساس میلی گرم مالون الدئید (MDA) محاسبه شد [13].

۲-۱۱-۲-۲- آزمون رنگ سنجی

با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج (Hunterlab, Colorflex EZ, Japan) رنگ نمونه‌های سوسیس مورد ارزیابی قرار گرفت. دستگاه با دو کاشی سیاه و سفید رنگ، کالیبره شده و برش هایی از مقطع عرضی سوسیس ها با قطر مساوی تهیه گردید. برش های سوسیس در ظرف های مخصوص قرار داده شده و یک ظرف سیاه رنگ و مات نیز برای جلوگیری از تداخل نورهای خارجی بر روی ظرف مخصوص قرار داده شد، سپس فاکتور L^* نمونه ها که بیانگر روشنی نمونه ها هستند مورد ارزیابی قرار گرفت [27].

۲-۱۱-۲-۳- ارزیابی حسی

برای ارزیابی حسی نمونه های سوسیس تولید شده از تعداد 5 ارزیاب کار آزموده و مجرب (۳ مرد و ۲ زن در بازه سنی ۳۰-۴۰ سال) که نمونه ها را بر اساس پذیرش کلی مورد بررسی قرار دادند، استفاده شد. استفاده از ۵ ارزیاب آزموده و مجرب با تنوع جنسیتی و سنی مناسب، یک رویکرد مناسب و معمول برای ارزیابی حسی نمونه‌های سوسیس تولید شده به شمار می‌رود. این انتخاب از چند جنبه قابل توجیه است: تعداد مناسب ارزیابان برای کسب نظرات متنوع

و قابل اعتماد، بهره‌مندی از تخصص و تجربه ارزیابان، تنوع جنسیتی برای ارائه ادراکات متفاوت، و انتخاب گروه سنی مناسب با قدرت ادراک و تمرکز بالا. در مجموع، این ترکیب از عوامل مثبت، یک رویکرد استاندارد و مناسب برای ارزیابی حسی محصولات غذایی همچون سوسیس محسوب می‌شود و جهت ارزیابی، از سیستم نمره‌دهی هدونیک ۵ نقطه ای (نمره ۱ = بسیار بد، نمره ۲ = بد، نمره ۳ = متوسط، نمره ۴ = خوب، نمره ۵ = بسیار خوب) استفاده گردید [28].

۲-۱۲-۲- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده و آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد. از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ برای آنالیز داده ها و واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) و از Excel برای رسم شکلها استفاده گردید و جهت مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد و مقادیر ($p < 0/05$) به صورت معنی دار در نظر گرفته شد.

۳- یافته ها

۳-۱- اندازه گیری فنول کل

میزان کل ترکیبات فنولی با معرف فولین - سیوکالتیو براساس میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره بر اساس رابطه 5 محاسبه شد. مقدار فنول کل عصاره هیدروالکلی ۱۷۴/۶ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره می باشد.

$$Y = 0.0001X + 0.4425$$

$$R^2 = 0.8422$$

۲-۳- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی، میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت های مختلف ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm عصاره چای ترش مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این خصوص، غلظت ها بر اساس مطالعات تجربی محققین در آزمایشگاه و انجام آزمایشهای پایلوت انتخاب شدند. در واقع انتخاب غلظت های مورد نظر عصاره چای ترش بر اساس چند عامل انجام گرفت. غلظت های پایین تر (500 و ۱۰۰۰

سانتی متر مکعب بود. این مقدار دانسیته نشان‌دهنده تراکم نسبی کپسول‌ها و کیفیت فرآیند تولید است. دانسیته توده پایین به معنای وجود فضای بین ذرات کپسول و احتمالاً قابلیت فشرده‌سازی بهتر آن‌ها در کاربردهای مختلف است. به طور کلی، این نتایج نشان‌دهنده کیفیت بالای کپسول‌های تولید شده از نظر کارایی، حلالیت و تراکم توده است.

۳-۵- خواص مورفولوژیکی کپسول بهینه

شکل ۱ نشانگر مورفولوژی کپسول حاوی عصاره چای ترش با میکروسکوپ الکترونی روبشی است که نمایانگر ویژگی‌های برجسته‌ای است. کپسول‌ها دارای شکل هندسی منظم و دیواره‌های صاف و بدون نقص هستند که نشان از فرآیند تولید دقیق و کنترل‌شده دارد. اندازه یکنواخت و ساختار متراکم کپسول‌ها باعث رهايش کنترل‌شده و یکنواخت عصاره می‌شود و سطح بدون ترک و شکاف، پایداری فیزیکی کپسول‌ها را تضمین می‌کند. این ویژگی‌های مورفولوژیک، کپسول‌ها را برای کاربردهای مختلف، از جمله پوشش سوسیس، بسیار مناسب می‌سازد. گرچه این ویژگی‌های مورفولوژیکی تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب دیواره، روش خشک کردن و سرعت خشک شدن قرار می‌گیرد. از آنجا که این عوامل می‌توانند بر ویژگی‌های سطحی و ریزساختار مواد ریزپوشانی شده تأثیر گذاشته و تغییراتی در آنها ایجاد کنند، بنابراین، مورفولوژی و ساختار سطحی کپسول‌های مورد بررسی، بازتابی از اثر متقابل این عوامل در طول فرآیند ریزپوشانی بود.

ppm برای نمایش کاربرد عملی و واقعی این عصاره در محصولات و غلظت‌های بالاتر (1500 و 2000 ppm) با هدف ارزیابی حداکثر توان آنتی اکسیدانی عصاره چای ترش در شرایط آزمایشگاهی انتخاب شدند و انتخاب این محدوده غلظتی امکان مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با یک آنتی اکسیدان مرجع مانند TBHQ را فراهم آورد. نتایج نشان دادند که غلظت‌های بالای 1500 و 2000 ppm عصاره چای ترش و همچنین غلظت 1500 ppm TBHQ از بیشترین میزان بازدارندگی برخوردار بودند.

۳-۳- تعیین اندازه ذرات کپسول بهینه و پتانسیل زتا

با توجه به نتایج بدست آمده اندازه ذراتی که با پکتین و مالتودکسترین ریزپوشانی شدند بین 108/517 میکرومتر و 646/369 میکرومتر بودند. پتانسیل زتا عصاره ریزپوشانی شده با پکتین و مالتودکسترین برابر با 85/5- بود.

۳-۴- آزمون کارایی، حلالیت و دانسیته توده کپسول

کارایی کپسول‌های تولید شده برابر 81/7٪ بود که نشان‌دهنده موفقیت بالای فرآیند ریزپوشانی در حفظ و کارآمدی مواد فعال موجود در عصاره چای ترش است. نتایج آزمون حلالیت نیز حاکی از حلالیت 80٪ کپسول‌های تولید شده است. این میزان حلالیت نشان می‌دهد که کپسول‌ها توانایی خوبی در انحلال و آزادسازی مواد فعال در محیط‌های مختلف دارند که می‌تواند در بهبود جذب و اثربخشی محصول نهایی موثر باشد. همچنین، نتایج اندازه‌گیری دانسیته توده کپسول‌ها نشانگر میزان دانسیته برابر 0/15 گرم بر

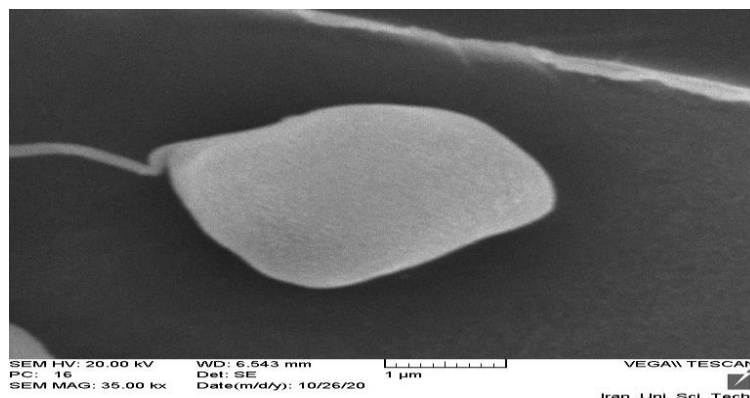


Figure 1. Capsule morphology

۳-۶- شاخص تیوباربتوریک اسید (TBA)

این اختلاف نیز معنی دار بود ($p < 0.05$). از طرفی، در تحقیقات پایلوت و تجربی، مشخص شد که عصاره ریزپوشانی شده تأثیر معناداری بر شاخص TBA که از مهم‌ترین معیارها برای اندازه‌گیری میزان اکسیداسیون چربی‌ها و کیفیت مواد غذایی است، نداشت. عدم تغییر معنادار در شاخص TBA نشان‌دهنده این بود که عصاره ریزپوشانی توانایی جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها را در شرایط آزمایشگاهی بهبود بخشید. به همین دلیل، داده‌های مربوط به شاخص TBA در نمودارها و نتایج مرتبط با این موضوع به نمایش در نیامده‌اند.

در طول دوره نگهداری، مقادیر شاخص تیوباربتوریک اسید در تیمار حاوی غلظت ۱۵۰۰ ppm عصاره چای ترش و تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۲). در روز صفر، مقدار این شاخص برابر با ۰/۳۱ میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم بافت بود، که در روز سی‌ام نگهداری به ترتیب به ۴/۶۴ و ۰/۹۱ میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم یافت در تیمار شاهد و تیمار حاوی عصاره چای ترش افزایش یافت. در طول دوره نگهداری، افزایش مقدار تیوباربتوریک اسید در تیمار شاهد نسبت به تیمار حاوی عصاره چای ترش بیشتر بود و

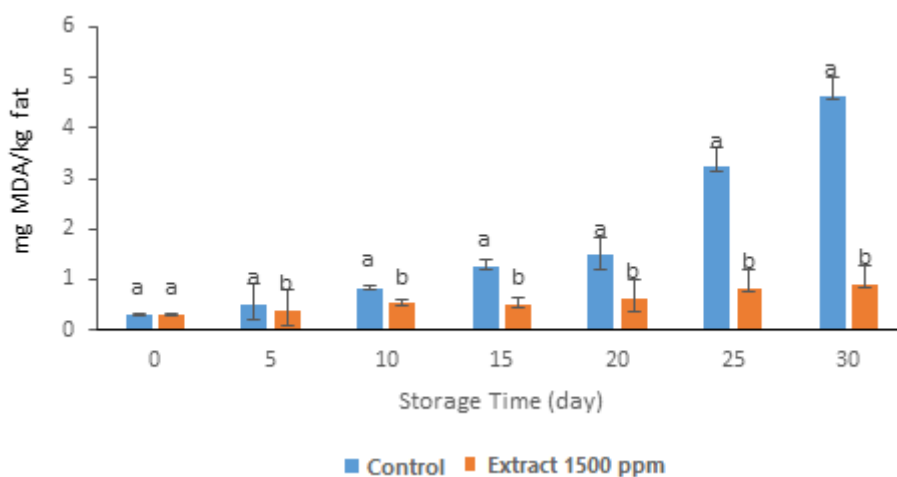


Figure ۲. The amount of thiobarbituric acid index during the storage period. Different Latin letters on the columns (a,b) indicate significant differences between the columns.

۳-۷- آزمون رنگ سنجی

و ۴۵ روز در دمای یخچال نمایش داده شده است. نتایج نشان دادند که در طول دوره نگهداری، فاکتور رنگ سنجی L^* در نمونه‌های مختلف تقریباً دارای روند کاهشی بوده است (شکل ۳). احتمالاً تغییرات شیمیایی و میکروبی طی نگهداری سوسیس در دمای یخچال، عامل اصلی تیره شدن نمونه‌ها (کاهش فاکتور L^*) بود که به عنوان شاخصی برای پایداری و کیفیت محصول در طول مدت نگهداری قابل ذکر است.

فاکتور L^* از فاکتورهای رنگ سنجی است که نشان‌دهنده میزان روشنایی و تیرگی نمونه‌ها است. مقادیر این فاکتور در بازه ۰ تا ۱۰۰ قرار دارد، به طوری که عدد صفر نشان‌دهنده سیاهی و عدد صد نشان‌دهنده سفیدی یا روشنایی نمونه است. در شکل ۳، تغییرات فاکتور رنگ سنجی L^* در نمونه‌های سوسیس در طول دوره‌های نگهداری ۰، ۱۵، ۳۰

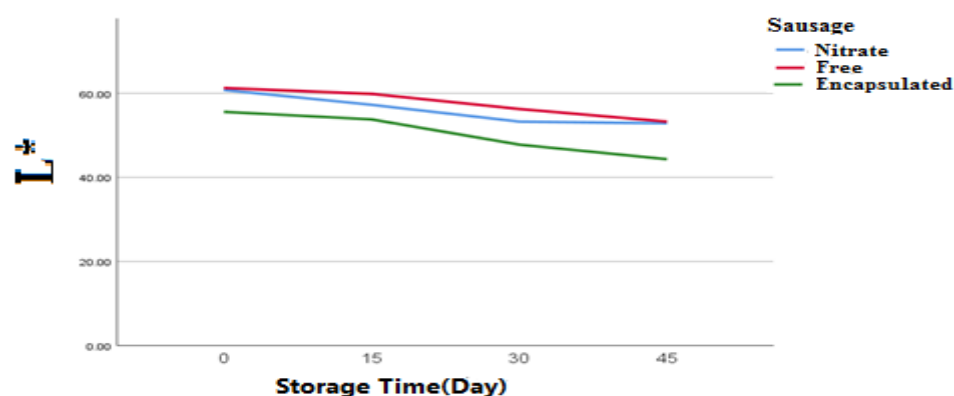


Figure 3. Changes in color index (L*) in different treatments (nitrite, free and encapsulated) during the storage process. The red, blue, and green linear graphs indicate the treatment with nitrite, free extract, and encapsulated extract, respectively.

مصرف بیش از حد نیترات در فرآورده‌های گوشتی، به ویژه سوسیس و کالباس، می‌تواند عوارض جدی برای سلامتی به همراه داشته باشد و به ایجاد مواد شیمیایی سرطان‌زا، آسیب سلولی و افزایش فشار خون منجر شود. برای کاهش این عوارض ناشی از افزودنی‌های شیمیایی، استفاده از افزودنی‌های طبیعی مانند عصاره‌های گیاهی و ریزپوشانی آن‌ها، و بهبود روش‌های فرآوری و بسته‌بندی می‌تواند راهگشا باشد. در این مطالعه، تاثیر عصاره آزاد و ریزپوشانی کاسبرگ چای ترش بر برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی سوسیس گوشت گاو مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان روش‌های جایگزین طبیعی و ایمن‌تری را برای بهبود کیفیت و ایمنی این محصولات غذایی معرفی کرد.

ترکیبات فنولی موجود در میوه‌ها و سبزیجات به دلیل پتانسیل بالای خود در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، توجه زیادی از سوی محققین به خود جلب کرده‌اند. این ترکیبات فنولی با اهدای یک اتم هیدروژن، از فعالیت رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند [۲۹]. نتایج این تحقیق نشان دادند که مقادیر ترکیبات فنولی در گیاه عصاره چای ترش برابر با ۶/۱۷۴ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره بود. همراستا با نتایج این مطالعه در پژوهشی که فریدونی و شورمستی انجام دادند، مقادیر کلی ترکیبات فنولی عصاره چای ترش را برابر با ۶۲۶/۵۷ میلی گرم گالیک اسید بر گرم گزارش نمودند [۱۸]. در مقابل در مطالعه ای دیگر محتوای فنولی پایین ۶۹/۰۴ میلی گرم اسید گالیک معادل در لیتر عصاره چای ترش

۳-۸- ارزیابی حسی

در فرم‌های ارزیابی، پنج ارزیاب ویژگی‌های مربوط به پذیرش کلی سوسیس‌های گوشت گاو حاوی نیتريت، عصاره آزاد و ریزپوشانی چای ترش را بررسی کرده و امتیازهایی از ۱ تا ۵ به آن‌ها اختصاص دادند. این ارزیاب‌ها بر اساس معیار پذیرش کلی محصول، نظرات خود را ارائه دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که تمامی ارزیاب‌ها به سوسیس‌های حاوی نیتريت امتیاز ۴ دادند، که نشان‌دهنده رضایت بالای ارزیابان از کیفیت این نوع سوسیس است. به‌طور مشابه، سوسیس‌های حاوی عصاره آزاد و ریزپوشانی چای ترش نیز امتیاز ۴ را دریافت کردند. این امتیازات بالا نشان می‌دهد که افزودن عصاره چای ترش، چه به صورت آزاد و چه به صورت ریزپوشانی شده، تاثیری منفی بر پذیرش کلی محصول نداشته است.

از طرفی، طعم چای ترش تأثیر منفی بر خواص ارگانولپتیکی محصول نداشت. ارزیاب‌ها گزارش دادند که طعم چای ترش در محصول نهایی به خوبی متعادل شده و منجر به کاهش کیفیت حسی سوسیس نشده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که عصاره چای ترش می‌تواند به عنوان یک افزودنی مفید در تولید سوسیس‌های گوشت گاو مورد استفاده قرار گیرد، بدون اینکه تأثیر منفی بر پذیرش مصرف‌کنندگان داشته باشد.

۴- بحث

گزارش شده است [۳۰]. این تفاوت‌ها ممکن است به دلیل تفاوت در روش‌های استخراج، شرایط کشت گیاه، و محیط‌های مختلف باشد که بر محتوای فنولی نهایی تأثیرگذارند. از این رو، انتخاب روش‌های استخراج مناسب و بهینه‌سازی شرایط می‌تواند نقش مهمی در تفسیر نتایج و تأثیر آنتی‌اکسیدانی عصاره چای ترش داشته باشد. از طرفی با توجه به محتوای بالای ترکیبات فنولی در عصاره چای ترش، این عصاره می‌تواند نقش مهمی در بهبود ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی سوسیس ایفا کند. در واقع، ترکیبات فنولی موجود در این عصاره با مکانیسم آنتی‌اکسیدانی خود، از اکسیداسیون چربی و پروتئین‌های موجود در سوسیس جلوگیری کرده و باعث افزایش پایداری و ماندگاری محصول می‌شوند [۲۹، ۳۰]. همچنین این ترکیبات می‌توانند بر بهبود ویژگی‌های بافتی و رنگی سوسیس تأثیرگذار باشند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت عصاره چای ترش، میزان مهار رادیکال آزاد DPPH نیز افزایش می‌یابد. موافق با یافته‌های تحقیق حاضر، نتایج مطالعه فریدونی و شورمستی (۲۰۱۸) که به بررسی تأثیر عصاره چای ترش نانوکپسوله شده با کربوکسی متیل سلولز بر کیفیت و ماندگاری ناگت مرغ پرداخته است، نشان داد که مهار رادیکال آزاد (DPPH) با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد [۱۸]. همچنین، در مطالعه ای که پرز-کوئینتانا و همکاران به منظور استفاده از عصاره چای ترش به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در سوسیس و کالباس انجام دادند، نشان دادند که افزودن عصاره با غلظت ۴٪ چای ترش، باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بهبود کیفیت حفاظتی در سوسیس می‌شود [۳۱]. همچنین، مطالعه مارکز رودریگز و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که عصاره چای ترش می‌تواند یک گزینه سالم برای مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها و یک جایگزین طبیعی برای افزایش ماندگاری گوشت در دمای سرد باشد [۳۲]. DPPH دارای جذب حداکثری در حدود ۵۱۵ نانومتر است و قابلیت غیرفعال‌سازی سریع توسط آنتی‌اکسیدان‌ها را دارد. این روش که به طور گسترده برای ارزیابی توانایی ترکیبات مختلف در مهار رادیکال‌های آزاد استفاده می‌شود،

نشان داد که چای ترش دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی است و افزودن عصاره چای ترش به سوسیس گوشت گاو، منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بهبود ماندگاری این محصولات می‌شود و این امر به نوبه خود نشان می‌دهد که چای ترش می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی و جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی عمل کند. در عمل، چای ترش حاوی ترکیبات فنولی مانند اسید فنولیک، فلاونوئیدها و کاتچین‌ها است که به خاصیت الکترون‌دهندگی خود، می‌توانند به راحتی رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و از این طریق اثرات آسیب‌زای آنها را کاهش دهند. همچنین، این ترکیبات می‌توانند با کلاته کردن یون‌های فلزی، از ایجاد واکنش‌های اکسیداسیون زنجیره‌ای جلوگیری کنند. بنابراین، افزودن عصاره چای ترش به مواد غذایی می‌تواند به عنوان یک روش موثر برای جلوگیری از فساد و کاهش کیفیت آنها عمل کند.

بررسی ویژگی‌های کپسول مانند اندازه ذرات و پتانسیل زتا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا این ویژگی‌ها به طور مستقیم بر خصوصیات و عملکرد کپسول‌ها تأثیر می‌گذارند. اندازه ذرات کپسول می‌تواند از جنبه‌های مختلف اهمیت داشته باشد؛ به عنوان مثال، اندازه ذرات می‌تواند تأثیر مستقیمی بر پایداری فیزیکی و شیمیایی کپسول داشته باشد، به طوری که انتخاب اندازه مناسب ذرات، می‌تواند باعث افزایش ماندگاری و تحریر و تخلیه کنترل شود. همچنین، پتانسیل زتا به عنوان شاخصی از پایداری دیسپرسی کپسول‌ها در محیط‌های مختلف، از جمله محیط‌های بیولوژیکی، حیاتی است. پتانسیل زتا نشان‌دهنده توانایی کپسول در مقابل تجزیه و تکوین اغلب در محیط‌های با pH متفاوت و وجود یون‌ها است که این ویژگی می‌تواند تأثیر زیادی بر استحکام و پایداری سیستم کپسول‌بندی داشته باشد [۲۴].

نتایج حاصل از اندازه‌گیری ذرات نشان داد که اندازه ذراتی که با مالتودکسترین و پکتین ریزپوشانی شدند بین ۱۰۸/۵۱۷ و ۶۴۶/۳۶۹ میکرومتر بود. با توجه به نتایج، اندازه عصاره ریزپوشانی شده کوچک بوده و اندازه کوچک ذرات می‌تواند باعث افزایش پایداری و مقاومت عصاره در محیط‌های

۸۰٪ نیز نشان می‌دهد که این کپسول‌ها قادر به آزادسازی موثر ماده مؤثره در محیط مناسب هستند، که این ویژگی می‌تواند به بهبود زیست‌فراهمی و در نتیجه اثربخشی بالینی این محصول کمک کند. دانسیته مناسب آن‌ها که برابر با ۰/۱۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب است، نشان‌دهنده پایداری و سازگاری فیزیکی این کپسول‌ها است، که می‌تواند بر ویژگی‌هایی مانند حمل و نقل و دوام آن‌ها تأثیر مثبت بگذارد. این نتایج نشان می‌دهند که استفاده از مالتودکسترین و پکتین به عنوان عوامل ریزپوشانی برای عصاره کاسبرگ چای ترش، می‌تواند منجر به تولید کپسول‌هایی با ویژگی‌های مطلوب و قابل قبول برای کاربردهای مختلف در صنعت غذایی شود.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی رویشی از کپسول‌های تهیه‌شده با استفاده از مالتودکسترین و پکتین، نشان دادند که کپسول‌ها دارای ساختار هندسی مشخص و دیواره‌های صاف هستند. این ویژگی‌ها نشان می‌دهد که فرآیند ریزپوشانی به خوبی انجام شده و منجر به تولید کپسول‌های یکنواخت و تعریف‌شده‌ای گردیده است. ترکیب دیواره، روش خشک کردن و سرعت خشک شدن، به ویژه در مراحل اولیه، می‌تواند بر ویژگی‌های سطحی و ریزساختار مواد ریزپوشانی شده تأثیر گذاشته و تغییراتی در آنها ایجاد کنند [۲۱]. سطح صاف و همگن کپسول‌ها بیانگر این است که شرایط خشک‌سازی و تعامل بین مواد ریزپوشانی و عصاره چای ترش بهینه‌سازی شده است. این ویژگی می‌تواند به پایداری فیزیکی، رهایش کنترل‌شده و توزیع کارآمد ترکیبات پوشاننده شده کمک کند. همچنین ممکن است به جذابیت ظاهری و سهولت کار با محصول ریزپوشانی‌شده نهایی کمک نماید.

در مواد غذایی، اکسیداسیون چربی‌های اشباع شده منجر به تولید ترکیبات آلدئیدی و کتونی ثانویه می‌شود که می‌توانند باعث ایجاد بوهای ناخوشایند در محصولات گوشتی گردند. برای ارزیابی درجه اکسیداسیون چربی در مواد غذایی، شاخص TBA به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش زمان نگهداری، میزان TBA افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده

مختلف شود. در مطالعه‌ای دیگر، اندازه ذرات عصاره چای ترش نانوکپسوله شده با مالتودکسترین-پروتئین کنسانتره آب پنیر برابر با $2/76 \pm 139/03$ نانومتر گزارش شده است [۱۸]. اندازه‌گیری پتانسیل زتا به ارزیابی بار سطحی و پایداری ذرات کمک می‌کند که در بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پایداری بیولوژیکی ذرات اهمیت زیادی دارد [۳۳]. نتایج پژوهش ما نشان می‌دهد که پتانسیل زتا برای عصاره ریزپوشانی شده با مالتودکسترین و پکتین دارای بار سطحی منفی قوی برابر با $-85/5$ است که می‌تواند در افزایش پایداری بیولوژیکی و کارایی عصاره نقش داشته باشد. نتایجی که در مطالعه ما به دست آمده است می‌تواند به توسعه روش‌های بهبود یافته برای ریزپوشانی و استفاده از عصاره در بسترهای زیستی کمک کنند. تجزیه و تحلیل بیشتر نشان می‌دهد که اندازه کوچک ذرات ریزپوشانی شده، به دلیل افزایش سطح تماس با محیط اطراف، می‌تواند باعث بهبود جذب و دسترسی زیستی عصاره در بدن شود. همچنین، بار سطحی منفی قوی ناشی از استفاده از مالتودکسترین و پکتین، می‌تواند از طریق دافعه الکترواستاتیک، مانع تجمع ذرات و افزایش پایداری کلوئیدی آن‌ها شود. این ویژگی‌ها در مجموع می‌تواند به بهبود اثربخشی و کارایی عصاره در کاربردهای زیستی منجر شوند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره‌های ریزپوشانی شده با استفاده از مالتودکسترین و پکتین، دارای کارایی برابر $81/7\%$ ، حلالیت 80% ، و دانسیته $0/15$ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مکعب هستند. این نتایج نشان می‌دهند که کپسول‌ها با بهترین عملکرد تولید شده‌اند. در واقع نتایج تحقیق ما نشان می‌دهد که استفاده از مالتودکسترین و پکتین به عنوان عوامل ریزپوشانی برای عصاره کاسبرگ چای ترش، توانایی خوبی در افزایش کارایی و حلالیت کپسول‌ها دارند. همچنین، دانسیته مناسب این کپسول‌ها نشان‌دهنده قدرت پایداری آن‌ها است. این کپسول‌ها با کارایی بالای $81/7\%$ نشان می‌دهند که احتمالاً به دلیل توانایی بالا در پوشش و محافظت از ترکیبات فعال موجود در عصاره، قادرند به طور مؤثر ماده مؤثره را حفظ و نگهداری کنند. از طرف دیگر، حلالیت بالای

تجمع محصولات اکسیداسیون ثانویه است. در این راستا نتایج مطالعه‌ای نشان داد که افزودن عصاره گل روزل به غلظت‌های بالا (۶ و ۸ درصد) می‌تواند باعث تسریع فرآیند اکسیداسیون لیپیدها شده و تأثیر منفی بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی مربوط به رنگ و بافت محصول داشته باشد [۱۶]. همچنین، افزودن عوامل آنتی‌اکسیدانی مانند عصاره برگ ملاستومالاباتریکام نیز نتوانسته از افزایش میزان مواد واکنش‌پذیر با اسید تیوباربتوریک در طول دوره نگهداری جلوگیری کند [۱۴]. در مجموع، این مطالعات نشان می‌دهند که اکسیداسیون چربی‌ها طی فرآیند نگهداری مواد غذایی، فرآیندی پیچیده است که می‌تواند به تشکیل ترکیبات آلدئیدی و کتونی منجر شود و بر خصوصیات حسی محصول، تأثیر منفی داشته باشد.

از دیگر عوامل قابل بررسی کیفیت سوسیس‌های تولیدی، فاکتور رنگ سنجی L^* یا همان نماد روشنایی (سیاه تا سفید) می‌باشد. در واقع، هر چه میزان L^* بیشتر باشد، نمای ظاهری سوسیس روشن‌تر خواهد بود. در این راستا، عواملی از قبیل اکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌ها، تغییرات میکروبی و شیمیایی در طی زمان نگهداری سوسیس می‌تواند منجر به کاهش روشنایی گردد. نتایج به دست آمده از مطالعه توصیفی مقایسه‌ای درون گروهی نشان داد که فاکتور رنگ سنجی L^* در طی دوره نگهداری در نمونه‌های مختلف تقریباً روند کاهشی داشت و در روزهای آخر نگهداری، کمترین تغییرات شاخص رنگی مشاهده گردید. طبیعی است که این امر به دلیل تغییرات شیمیایی و اکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌ها در طول دوره نگهداری قابل پیش‌بینی می‌باشد. با وجود محدودیت‌های امکانات پژوهشی، امکان مطالعه مقایسه‌ای میان گروهی فراهم نگردید تا بتوان تجزیه و تحلیل دقیق و قابل محاسبه‌ای از نظر مقایسه نماد L^* بین گروه‌ها ارایه نمود.

موافق با نتایج این مطالعه، پژوهش انجام یافته توسط حسین پور و همکاران بود که نشان داد در سیستم‌های نگهداری گوشت بدون نیتريت و با مقدار کم نیتريت در طول دوره نگهداری، فاکتور رنگ سنجی به تدریج کاهش یافته است [۳۴].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن عصاره‌های آزاد و ریزپوشانی شده چای ترش به سوسیس گوشت گاو در مقایسه با سوسیس حاوی نیتريت، ویژگی‌های حسی مورد تأیید ارزیابان را داشته و امتیازهای یکسانی را کسب کردند. این نتایج همسو با مطالعه سیاری و همکاران است که نشان دادند افزودن اسانس دانه زیره سیاه ریزپوشانی شده با صمغ ریحان به فیله ماهی قزل‌آلا رنگین تغییری در بو، بافت و پذیرش کلی ایجاد نکرده، اما در رابطه با رنگ با افزودن پوشش‌ها امتیاز حسی به‌طور معناداری کاهش یافت [۲۲]. همچنین، مطالعه گوتیرز-کورتز و ماهچا نشان داد که بین ویژگی‌های حسی سوسیس‌های حاوی عصاره بره‌موم و سوسیس‌های حاوی نیتريت تفاوتی وجود ندارد [۳۵]. این یافته‌ها حاکی از آن است که استفاده از جایگزین‌های طبیعی مانند عصاره‌های گیاهی می‌تواند ویژگی‌های حسی محصولات گوشتی را تا حد قابل‌قبولی بهبود بخشد. این موضوع بسیار مهم است، زیرا پذیرش و موفقیت یک محصول غذایی در بازار علاوه بر ملاک‌های علمی، به‌طور اساسی به نظرات و تجربیات مصرف‌کنندگان در مورد طعم، مزه و تجربه مصرف محصول مرتبط است.

مطالعه حاضر در محدوده ارزیابی برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی سوسیس گوشت گاو حاوی عصاره چای ترش انجام شده و از نظر مطالعات در حوزه‌های بیوشیمیایی و میکروبی و نیز اندازه‌گیری شاخص‌های دیگر به جز تیوباربتوریک اسید، به دلیل رعایت محدوده عملیاتی تعیین شده در پروپوزال تحقیقاتی و پشتیبانی مالی دارای محدودیت می‌باشد. محققین این طرح امیدوارند در ادامه امکان انجام مطالعات گسترده‌تر به ویژه در زمینه‌های میکروبی و فساد اکسیداسیونی مرتبط با این پژوهش فراهم گردد.

۵- نتیجه گیری

در مجموع نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهند عصاره چای ترش با محتوای ترکیبات فنولی به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی، در غلظت‌های بالا، می‌تواند به پایداری و مقاومت عصاره در شرایط مختلف کمک کند. همچنین، تیمارهای

یک افزودنی طبیعی می‌تواند بهبود قابل توجهی در خواص فیزیکوشیمیایی و حسی محصولات گوشتی داشته باشد، همچنین به افزایش جذابیت و سلامت این محصولات کمک نماید. بنابراین، این رویکرد نه تنها مزایای بالقوه برای صنعت فراورده‌های گوشتی دارد، بلکه یک عامل موثر برای حفظ سلامت مصرف‌کنندگان و حفاظت از محیط زیست نیز محسوب می‌شود.

۶- سپاسگزاری

این مقاله منتج از پایان نامه دکترای مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد نور می باشد و بدینوسیله از تمامی کسانی که در این مطالعه ما را یاری نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

حاوی عصاره چای ترش می‌تواند سبب بهبود ماندگاری، افزایش کیفیت فیزیکوشیمیایی و بهبود خواص حسی سوسیس گوشت گاو گردد. از سویی، افزودن عصاره چای ترش به صورت آزاد و ریزپوشانی به سوسیس گوشت گاو، به عنوان یک راه حل طبیعی و پایدار برای حفظ کیفیت فراورده گوشتی بسیار موثر و مفید بوده و در این راستا، بهترین تیمار شناسایی شده در این مطالعه شامل غلظت بهینه عصاره چای ترش بوده است که بهبودهای قابل توجهی را در ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی سوسیس گوشت گاو نشان داده است. بر اساس یافته‌های آزمایشی، فرمولاسیونی که عصاره چای ترش را در این سطح بهینه شامل می‌شود، به عنوان بهترین رویکرد معرفی می‌شود. با توجه به اهمیت موضوع و نتایج قابل توجه این پژوهش در راستای حل مشکل استفاده از افزودنی‌های مصنوعی در صنعت فراورده‌های گوشتی، استفاده از عصاره چای ترش به عنوان

۷- منابع

- [1] Mariana, E., Mustafid, D., & Bakar, A. (2023). Quality of beef sausage with kecombrang flower extract (*Etlingera elanor*) addition. Paper presented at the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 1183:012050
- [2] Esmaeilzadeh, P., Darvishi, S., Assadi, M. M., & Mirahmadi, F. (2012). Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* on nitrite concentration and bacterial load in fermented sausage during fermentation. *World Applied Sciences Journal*, 18(4), 493-501.
- [3] Bellucci, E. R. B., Bis-Souza, C. V., Domínguez, R., Bermúdez, R., & Barreto, A. C. d. S. (2022). Addition of natural extracts with antioxidant function to preserve the quality of meat products. *Biomolecules*, 12(10), 1506.
- [4] Guardiola, S., & Mach, N. (2014). Therapeutic potential of *Hibiscus sabdariffa*: A review of the scientific evidence. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 61(5), 274-295.
- [5] Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 575-586.
- [6] Islam, M. (2019). Food and medicinal values of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. Linne Malvaceae) plant parts: A review. *Open J Nutr Food Sci*, 1(1), 1003.
- [7] Hapsari, B. W., & Setyaningsih, W. (2021). Methodologies in the analysis of phenolic compounds in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.): Composition, biological activity, and beneficial effects on human health. *Horticulturae*, 7(2), 35.
- [8] Rashidaie Abandansarie, S. S., Ariaii, P., & Charmchian Langerodi, M. (2019). Effects of encapsulated rosemary extract on oxidative and microbiological stability of beef meat during refrigerated storage. *Food science & nutrition*, 7(12), 3969-3978.
- [9] Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia food science*, 1, 1806-1815.
- [10] Hojjati, M., Razavi, S. H., Rezaei, K., & Gilani, K. (2011). Spray drying microencapsulation of natural canthaxanthin using soluble soybean polysaccharide as a carrier. *Food Science and Biotechnology*, 20, 63-69.
- [11] Özvural, E. B., Huang, Q., & Chikindas, M. L. (2016). The comparison of quality and microbiological characteristic of hamburger patties enriched with green tea extract using three techniques: Direct addition, edible coating and encapsulation. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 385-390.
- [12] Khanloo, M., Chookar, N., & Aghajani, A. (2020). Determination of the effect of *Ocimum basilicum* and *Urtica dioica* extract on the physico-chemical and organoleptic properties of non-fermented sausage during cold storage. *Journal of Food Science and Technology*, 17, 79-90.
- [13]. Maleki, K. A., Bagheri, M., & Nateghi, L. (2016). Effect of Nitrite Substitution with celery

Extract on the antioxidant, anti-bacterial, color, and sensory properties of Chicken Cocktail Sausage. *Journal of Food Science & Technology*, 14, 269.

[14] Nuraini, H., Suryati, T., Arief, I. I., & Sajuthi, D. (2022). Antioxidant, Antimicrobial and Physicochemical Properties of Beef Sausages Enriched with an Aqueous Extract of Senduduk (*Melastoma malabathricum* L.) Leaf. *International Journal of Food Studies*, 11(2).

[15] Jamhari, J., Dewi, A. C., & Setiyono, S. (2019). Physicochemical properties and antioxidant activity of chicken sausage with addition of roselle extract (*Hibiscus sabdariffa*) and different filler ratio. *Buletin Peternakan*, 43(1), 46-51.

[16] Perez-Baez, A.J.; Camou, J.P.; Valenzuela-Melendres, M.; Lucas-Gonzalez, R.; Viuda-Martos, M. (20210). Assessment of Chemical, Physico-Chemical and Sensorial Properties of Frankfurter-Type Sausages Added with Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), Extracts. *Proceedings 2021*, 70, 73.

[17] Meng, F. B., Lei, Y. T., Zhang, Q., Li, Y. C., Chen, W. J., & Liu, D. Y. (2022). Encapsulation of Zanthoxylum bungeanum essential oil to enhance flavor stability and inhibit lipid oxidation of C hinese-style sausage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102, 4035-4045.

[18] Bahrami Feridoni, S., & Khademi Shurmasti, D. (2020). Effect of the nanoencapsulated sour tea (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract with carboxymethylcellulose on quality and shelf life of chicken nugget. *Food Science & Nutrition*, 8, 3704-3715.

[19] Perez-Baez, A. J., Camou, J. P., Gonzalez-Aguilar, G., Lucas-Gonzalez, R., Valenzuela-Melendres, M., & Viuda-Martos, M. (2021). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts added to Frankfurt-type sausages: Effects on chemical, physicochemical, and sensorial properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, e15782.

[20] Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., & Amiri, Z. R. (2014). Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. *Food science & nutrition*, 2, 426-435.

[21] Aala, J., Ahmadi, M., Golestan, L., & Shahidi, S.-A. (2022). The effect of free form and microcoating with nanoliposomes of *Laurus nobilis* and Rosemary leaves extracts on the behavior of some chemical indicators of spoilage in Silver carp fish kept at refrigerator temperature. *Journal of food science and technology (Iran)*, 19, 275-289.

[22] Sayyari, Z., Rabbani, M., Farahmandfar, R., Esmaeilzadeh Kenari, R., & Mousavi Nadoushan, R. (2021). Investigation of the effect of essential oil along with nanocoatings containing gums in the development of fish fillet storage time. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 3539-3552.

[23] Joye, I. J., Davidov-Pardo, G., & McClements, D. J. (2015). Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 2: Stability and functionality. *Food Hydrocolloids*, 49, 127-134.

[24] Sarabi, J. M., Kaveh, M., Modarres, M., & Bostan, A. (2020). Production of nanocapsules using *Salvia leriifolia* leaf extract and assessing effects of the extract and nanocapsules containing the extract on microbial properties in sausages during the shelf life. *Iranian J Nutr Sci Food Technol*, 15, 121-130

[25] Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2005). Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: I. The effect on product recovery. *Journal of Food Engineering*, 66(1), 25-34.

[26] Akbari, M., Sadeghi Mahoonak, A., Sarabandi, K., & Ghorbani, A. (2019). Physicochemical characterization and antioxidant activities of green tea extract microencapsulated by co-crystallization technique. *Journal of food science and technology (Iran)*, 15(85), 179-193.

[27] Choi, Y.-S., Choi, J.-H., Han, D.-J., Kim, H.-Y., Lee, M.-A., Kim, H.-W., . . . Kim, C.-J. (2009). Characteristics of low-fat meat emulsion systems with pork fat replaced by vegetable oils and rice bran fiber. *Meat science*, 82(2), 266-271.

[28] Pirouti, K., Javadi, A., & Nahidi, F. (2014). Effect of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on chemical, microbiological and sensory properties of sausage during storage. *Journal of Food Hygiene*, 4, 9-20.

[29] Hajimahmoodi, M., Aliabadipoor, M., Moghaddam, G., Sadeghi, N., Oveisi, M., & Jannat, B. (2012). Evaluation of in vitro antioxidant activities of lemon juice for safety assessment. *American Journal of Food Technology*, 7, 708-714.

[30] Karabacak, S., & Bozkurt, H. (2008). Effects of *Urtica dioica* and *Hibiscus sabdariffa* on the quality and safety of sucuk (Turkish dry-fermented sausage). *Meat science*, 78, 288-296.

[31] Pérez-Quintana, M., Silva-Chango, J., Caicedo, W., Bravo-Sánchez, L., & Arias-Gutiérrez, R. (2019). Use of *Hibiscus sandariffa* extract as a natural antioxidant in sausages. *Mol2net*, 5.

[32] Selene Marquez-Rodriguez, A., Nevarez-Baca, S., Cesar Lerma-Hernandez, J., Raul Hernandez-Ochoa, L., Virginia Nevarez-Moorillon, G., Gutierrez-Mendez, N., . . . Salas, E. (2020). In vitro antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. phenolic extract and its in situ application on shelf-life of beef meat. *Foods*, 9, 1080.

[33] Paim, M. P., Maciel, M. J., Weschenfelder, S., Bergmann, G. P., & Avancini, C. A. M. (2017). Anti-*Escherichia coli* effect of *Hibiscus sabdariffa* L. in a meat model. *Food Science and Technology*, 37, 647-650.

[34] Hoseinpoor, S., Eskandari, M. H., Mesbahi, G., Shekarforoush, S., & Farahnaky, A. (2013). Study on use of cochineal and paprika as natural colors for producing color of nitrite-free and low-nitrite

frankfurter. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 9, 243-52.

[35] Gutiérrez-Cortés, C., & Suárez, H. (2014). Antimicrobial activity of propolis and its effect on the

physicochemical and sensorial characteristics in sausages. Vitae, 21, 90-96.



Scientific Research

Evaluation of Some Physicochemical and Sensory Properties of Beef Sausage Containing Sour Tea (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Extract

Sharif Ghorbani¹, Sara Jafarian^{2*}, Mahdi Sharifi Soltani³, Leila Roozbeh nasiraie⁴

1- PhD student, Department of Food Science and Technology, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Iran

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Iran

3- Assistant Professor, Department of Veterinary, Chalous Branch, Islamic Azad University, Chalous, Iran

4- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2024/4/9

Accepted: 2024/7/31

Keywords:

Sour tea extract,

Encapsulation,

Beef sausage,

Natural preservative

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.63.

*Corresponding Author E-
drs.jafarian@yahoo.com

Although many studies have demonstrated the significance of using natural plant additives and encapsulating plant extracts in meat products to mitigate the adverse effects of chemical additives, research in this area remains limited. Hence, the current study investigated the effects of sour tea extract (*Hibiscus sabdariffa* L.) on enhancing the physicochemical and sensory characteristics of beef sausage. The study assessed the phenolic content of hydroalcoholic extract of sour tea using the Folin-Ciocalteu method, as well as its antioxidant activity via the DPPH assay at concentrations of 500, 1000, 1500, and 2000 ppm of the extract. The characteristics of the capsules containing this extract, including particle size, zeta potential, efficiency, solubility, mass density, morphology, and the physicochemical characteristics of the meat products containing these capsules including the amount of thiobarbituric acid, color, and sensory attributes were evaluated. Data analysis was conducted using one-way analysis of variance. The results indicated that the total phenolic content in sour tea extract was 174.6 mg of gallic acid per gram of extract, and the highest antioxidant activity was observed at concentrations above 1500 ppm of the extract. The particle size of the extract ranged from 108.517 to 646.369 micrometers, and physicochemical parameters such as zeta potential, efficiency, solubility, mass density, and capsule morphology were within appropriate ranges. During storage, the amount of thiobarbituric acid compound increased in the control sample, and this difference was significant compared to the sample containing 1500 ppm of sour tea extract. Additionally, with increasing storage time, the L color factor decreased, but sensory evaluation indicated that the treatments received acceptable scores. Overall, the results of this study demonstrate that sour tea extract, whether in free form or encapsulated, can serve as a natural additive to enhance the quality and improve the sensory properties of beef sausage, potentially replacing chemical preservatives.



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی اثر تیمار حرارتی فرادما (UHT) بر تغییرات رنگی، لیزین، فوروزین و ویتامین ث شیر مایع نوزاد

مسعود قربانی^۱، یحیی مقصودلو^{۲*}، مرتضی خمیری^۳، علی مویدی^۴، فرهاد گراوند^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۲- *پروفسور، هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۳- استاد، هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۴- دانشیار، هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۵- استادیار، هیئت علمی گروه تکنولوژی و شیمی مواد غذایی، مرکز تحقیقاتی صنایع غذایی تی گسک مورپارک، ایرلند

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	شیر مایع آماده برای تغذیه نوزادان (Ready-To-Feed Liquid Infant Formula) زمانی که شیر مادر در دسترس نباشد برای نوزادان نارس استفاده می شود. با این حال، استرلیزاسیون شیر مایع نوزاد با استفاده از تیمار فرادما (UHT) موجب تشکیل محصولات واکنش میلارد (MRPs) می شود که ممکن است بر عملکرد سیستم ایمنی و رشد کلیه ها اثر منفی بگذارد. در این تحقیق، شیر مایع نوزاد پس از آماده سازی در پایلوت شرکت پگاه تهران تحت تیمار حرارتی فرادما (۱۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳ ثانیه-UHT) قرار گرفت و شاخص های رنگی، تغذیه ای و ترکیبات اولیه واکنش میلارد قبل و پس از اعمال فرآیند UHT مورد بررسی قرار گرفت. یافته های این پژوهش نشان داد، مقدار عددی شاخص a^* ، b^* و L^* قبل و پس از فرایند حرارتی اختلاف معنی دار دارند ($p < 0.05$)، همچنین مقدار لیزین در دسترس، قبل و پس از اعمال تیمار حرارتی UHT به ترتیب $23 \pm 3/0$ و $0.05 \pm 1/99$ درصد در ماده خشک بود ($13/48$ ٪ کاهش یافت). مقدار فوروزین (شاخص ترکیبات اولیه واکنش میلارد) قبل و پس از اعمال تیمار حرارتی UHT به ترتیب $91 \pm 60/74$ و $51 \pm 1/57$ میلی گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین گزارش شد. میزان ویتامین ث به عنوان دیگر شاخص تغذیه ای، طی اعمال فرآیند UHT کاهش یافت (قبل و پس از اعمال تیمار حرارتی UHT به ترتیب $49 \pm 147/15$ و $65 \pm 128/29$ میلی گرم در کیلوگرم). بصورت کلی تیمار فرادما علی رغم وجود مزایایی از جنبه ایمنی مواد غذایی، بصورت قابل ملاحظه ای ارزش تغذیه ای شیر مایع نوزاد را از طریق واکنش میلارد کاهش داد.
کلمات کلیدی:	
استرلیزاسیون،	
شیر خشک نوزاد،	
شیر مایع نوزاد،	
میلارد،	
UHT	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.80.	
* مسئول مکاتبات:	
y.maghsoudlou@gu.ac.ir	

۱-مقدمه

شیر خشک نوزاد^۱ به منظور تأمین نیازهای غذایی نوزادان به ویژه در شش ماه اول زندگی استفاده می‌شود. این محصول عمدتاً بر پایه شیر گاو یا شیر سویا (به منظور تغذیه نوزادانی که به پروتئین‌های شیر گاو و یا گلوتن حساسیت دارند) است. در شیرخشک نوزاد سعی می‌شود از مواد مغذی موجود در شیر مادر تقلید و الگو برداری شود و در صورت عدم دسترسی به شیرمادر سالم و کافی، تنها غذایی است که از نظر تغذیه‌ای برای کودکان زیر ۱ سال مورد تایید جامعه پزشکی است [۱، ۲].

بر اساس تقسیم بندی حالت فیزیکی، سه نوع شیر به منظور تغذیه نوزادان در بازار موجود است که رایج‌ترین نوع آن به صورت پودر است و کم هزینه ترین فرم شیر خشک است که باید قبل از تغذیه با آب مخلوط شود. نوع دوم به صورت کنسانتره مایع^۲ است که با غلظت بالا تولید می‌شود و قبل از مصرف باید با آب سالم مخلوط شود تا غلظت مورد نیاز براساس استاندارد تعریف شده حاصل شود. نوع سوم در مقایسه با بقیه گران‌ترین است و نیازی به اختلاط یا آماده سازی ندارد و اصطلاحاً آماده تغذیه^۳ نامیده می‌شود، این محصول پس از فرآوری در شرایط اسپتیک بسته بندی شده و نیازی به آماده‌سازی جهت مصرف ندارد [۳].

از جمله محدودیت‌های مصرف شیرخشک نوزاد می‌توان به

خطا در حین آماده سازی و عدم رعایت تناسب تغذیه‌ای تعریف شده اشاره کرد، که ممکن است به سلامت نوزاد آسیب برساند. روش آماده‌سازی شیر نوزاد را به صورت چاپ شده روی قوطی محصول آموزش دهند ولی باز هم امکان رخ دادن این خطا وجود دارد. همچنین عدم دسترسی به منابع آب سالم جهت آماده‌سازی شیرخشک نوزاد نیز خطری بالقوه است، و در صورت عدم دسترسی به آب سالم یا ایجاد آلودگی ثانویه در آب در حین آماده‌سازی، ممکن است به سلامت نوزاد دچار آسیب‌های جدی و جبران ناپذیری شود.

روش‌های حرارتی رایج‌ترین روش‌های سالم‌سازی شیر است، که از این جمله می‌توان فرآیندهای حرارتی پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون فرادما یا UHT^۴ را نام برد [۴]. در فرایند حرارتی UHT، شیر تحت تیمار حرارتی با دمای ۱۵۰-۱۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰-۱ ثانیه قرار می‌گیرد و محصول استریل تجاری تولید می‌شود [۵]. فرآوری و عرضه شیر نوزاد به روش UHT (ترکیبات شیمیایی در جدول ۱ قابل مشاهده است)، گزینه‌ای مناسب و ایمن است، زیرا قبل از مصرف نیازی به آماده سازی ندارد و علاوه بر این، شیر مایع نوزاد آماده مصرف گزینه اصلی برای تغذیه نوزادان نارس، کم وزن یا دارای نقص ایمنی است [۶]. یکی

3 -Ready-to-feed
4 -Ultra Heat Treatment

1-Infant Formula
2- Liquid concentrate

از محدودیت‌های فرآوری شیر و به خصوص شیر نوزاد، واکنش قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی (میلارد) است که دلیل آن بالا بودن سطح لاکتوز و پروتئین این محصول است. قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی واکنشی پیچیده و نتیجه برهم‌کنش بین قندهای احیا کننده و گروه آمینی است. فوروزین یکی از شاخص‌های تشکیل ترکیبات اولیه میلارد است و ملاکی در تشخیص آسیب حرارتی به شیر است [۷].

Table 1-Liquid Infant Formula Ingredients

Composition	gr per 100gr
Carbohydrate	7.18
Fat	3.21
Protein	1.14
Ash	0.21

لیزین از جمله آمینواسیدهای ضروری است که طی واکنش میلارد با قندهای احیا کننده واکنش می‌دهد و از دسترس بدن خارج می‌شود. لیزین مسدود شده در شیر به صورت ترکیب آمادوری یافت می‌شود، که قابل جذب در بدن نیست و به دلیل اینکه نوزادان به مقدار بیشتری از لیزین نسبت به بزرگسالان نیاز دارند (۱۰۳ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز برای نوزادان؛ ۱۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز برای بزرگسالان) در اثر عدم دسترسی به آن متحمل آسیب‌های بیشتری می‌شوند. علاوه بر این، کمبود لیزین منجر به تهوع، از دست دادن اشتها، خستگی، رشد کند، سنگ کلیه، کم‌خونی و اختلالات فیزیولوژیک دیگر نیز می‌شود [۸].

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که واکنش میلارد یک مسیر مهم در توسعه عطر و طعم نامطلوب در حین فرآیند حرارتی است و نقطه کنترلی برای بهبود و توسعه استراتژی‌های مرتبط با عطر و طعم شیر UHT و نوشیدنی‌های بر پایه شیر است. اثر واکنش میلارد بر عطر و طعم، رنگ، سمیت و ارزش تغذیه‌ای محصولات طی پژوهش‌های اخیر، شناسایی شده است و علاوه بر این، اثرات منفی آن بر سیستم بیولوژیک، دیابت‌ها و بیماری‌های قلبی و مرتبط با افزایش سن ثابت شده است [۴، ۹].

ژانگ و همکاران در سال ۲۰۲۱ [۱۰] اثر فرآیندهای حرارتی مختلف بر تشکیل محصولات واکنش میلارد را بررسی کردند. یافته‌ها نشان داد کمترین مقدار فوروزین (۳.۹ میلی گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) در شیر خام بود و با افزایش دمای تیمار حرارتی به ۱۰۵ درجه سلسیوس مقدار فوروزین به ۲۰-۴۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین رسید. علاوه بر این

میزان فوروزین با افزایش دما رابطه مستقیم نشان داد و در دمای ۱۳۵ درجه سلسیوس بیشترین میزان فوروزین ($255/19 \pm 30/70$) میلی گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) تشکیل شد.

استفانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ [۱۱]، در بخشی از تحقیقات خود اثر حرارت دهی پیوسته با استفاده از تزریق مستقیم بخار، بر ویژگی های تغذیه ای شیر مایع نوزاد را بررسی کردند. یافته ها نشان داد، تیمار حرارتی UHT بصورت قابل ملاحظه ای موجب افزایش آسیب حرارتی به شیرمایع نوزاد شد. با افزایش دما میزان تغییرات شاخص های رنگی تشدید و نمونه تیره تر شد، همچنین میزان فوروزین به $14/2 \pm 1/0$ میلی گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین افزایش یافت.

گوا و همکاران در سال ۲۰۲۳ [۱۲]، میزان تغییرات در محصولات واکنش میلارد، مواد فرار و پروتئین های فعال شیر بز تحت تأثیر فرایندهای حرارتی مختلف را بررسی کردند.

نتایج نشان دادند، محتوای فوروزین و ۵-هیدروکسی متیل فورفورال با افزایش دما و زمان تیمار حرارتی، افزایش یافت. مقدار فوروزین و ۵-هیدروکسی متیل فورفورال در شیر بز استریل شده با تیمار حرارتی فرادما (UHT) به ترتیب $130/22 \pm 0/15$ میلی گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین و $1/31 \pm 0/03$ میلی گرم در لیتر و بود.

نتایج این مطالعه نشان داد بکارگیری تیمار UHT موجب افزایش شدت واکنش میلارد در شیر بز می شود.

ساندز و همکاران در سال ۲۰۱۸ [۵]، پیشرفت واکنش میلارد شیر UHT در حین نگهداری در سطوح دمایی مختلف را بررسی کردند. نتایج نشان داد غلظت فوروزین (از شاخص های محصولات اولیه واکنش میلارد) به صورت کاملاً مشخص در طی نگهداری شیر UHT در دمای ثابت ۲۰ درجه سلسیوس و بالاتر افزایش می یابد. قهوه ای شدن در شیر UHT نگهداری شده در دماهای ۱۰ و ۲۰ درجه سلسیوس به صورت مشخص افزایشی نداشت (در مدت ۲۴ هفته تغییر رنگ ۱/۲ واحد بود)، درحالی که شیر UHT نگهداری شده در دماهای ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس به ترتیب پس از ۲۴ هفته و ۶ هفته شاخص تغییر رنگ ۲/۳ و تغییر مشخصی را نشان دادند.

با توجه به صنعتی شدن جوامع، و محدود شدن دسترسی به منابع آب سالم، تکنولوژی فرآوری مواد غذایی به سمت تولید غذاهای آماده مصرف سوق پیدا می کند، و محصولات غذایی مورد نیاز نوزادان نیز از این قاعده مستثنی نیست. طبق گزارش سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد (FAO)، میزان تولید شیر مایع نوزاد در سال ۲۰۲۰ در کشور آمریکا ۳۵۰ تن بوده است [۱۳] و شرکت های تولید کننده شیر خشک نوزاد، با توجه به بازار رو به رشد این محصول، در حال اضافه کردن آن به سبد محصولات خود هستند. شیرمایع

نوزاد به دلیل وجود قندهای احیا کننده و اسید آمینه لیزین، به شدت مستعد واکنش میلارد است، و خواص تغذیه‌ای آن تحت تاثیر فرایند حرارتی UHT دچار تغییر می شود و ممکن است سلامت نوزاد را تحت تاثیر قرار دهد.

در این مطالعه اثر اعمال تیمار فرادما (۱۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳ ثانیه) بر میزان فوروزین، تغییرات شاخص های رنگی (L^* ، a^* و b^*)، میزان لیزین در دسترس و ویتامین ث با هدف بررسی میزان تغییرات رنگی و پیشرفت واکنش میلارد، و کاهش خواص تغذیه‌ای بر محصول شیر مایع نوزاد، در مورد بررسی قرار گرفت.

۲-مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و دستگاه‌های استفاده شده

مواد اولیه و ترکیبات شیمیایی مورد نیاز در این پژوهش از جمله میکس اولیه شیرخشک نوزاد (شرکت نستله ایران)، مواد شیمیایی استات سدیم (سیگما آلدریج)، انیدرید پروپیونیک (مرک)، اسید اورنج-۱۲ (مرک)، هیدروکلریک اسید ۳۷٪ (مرک)، استونیتریل (مرک) و فرمیک اسید (مرک) از شرکت‌ها و تامین کننده‌های معتبر خریداری شد.

آماده سازی نمونه

به منظور آماده سازی نمونه‌ها از روش ژو و همکاران در سال ۲۰۲۰ [۱۴] با برخی تغییرات استفاده شد. شیرخشک و

لاکتوز گرید یک (MR1)، ترکیبات معدنی، گالاکتوالیگوساکارید و فروکتوالیگوساکارید، پروتئین ایزوله آب پنیر (WPI)، ویتامین ث و ترکیبات ریز مغذی حاوی اسیدهای آمینه ضروری، مطابق با دستورالعمل آماده سازی میکس اولیه با هم ترکیب شده و با آب RO، در دمای ۵۵ درجه سلسیوس مخلوط شدند (ماده خشک نهایی ۱۰.۵۲ بود). محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه با همزن برقی همزده شد و به منظور هیدراته شدن، ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس به منظور تیمار UHT (۱۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳ ثانیه) به محفظه ورودی دستگاه استرلایزر اضافه شد و تحت تیمار استرلیزاسیون و هموژنیزاسیون (با فشار ۵۰-۱۵۰ بار) قرار گرفت، و پس از اتمام فرآیند طی شرایط بهداشتی با ظروف تتراپک یک لیتری استریل پر شد (شکل ۱) و تا زمان انجام آزمون‌ها در یخچال (۳ درجه سلسیوس) نگهداری شد.

آزمون رنگ سنجی جهت اندازه‌گیری محصولات نهایی

واکنش میلارد

تشکیل ملانوئیدین با استفاده از تغییر رنگ اندازه‌گیری و طبق روش السعدی و دیت در سال ۲۰۰۸ [۱۵] اندازه‌گیری شد. آزمون رنگ سنجی مستقیماً بر روی نمونه تازه با استفاده از سیستم هانتربل انجام شد و شاخص‌های رنگی L^* ، a^* و b^* اندازه‌گیری شد. اختلاف رنگی ΔE برای هر نمونه نسبت به نمونه شاهد از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2)}$$

اندازه‌گیری میزان لیزین در دسترس

میزان لیزین در دسترس با استفاده از روش اعلایی و همکاران در سال ۲۰۱۶ [۱۶] اندازه‌گیری شد. غلظت لیزین موجود با استفاده از یک منحنی استاندارد رنگ در بافر محاسبه شد و نتایج به عنوان درصد لیزین در دسترس موجود بر اساس ماده خشک بیان شد.

اندازه‌گیری فوروزین (متابولیت‌های اولیه واکنش میلارد)

به منظور اندازه‌گیری فوروزین، از روش کاریسو و همکاران [۱۷] استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر از نمونه با ۷ میلی‌لیتر HCL 08/0 مولار در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۳ ساعت هیدرولیز شد. نیتروژن با خلوص بالا به مدت ۲ دقیقه در محلول حباب ایجاد کرده و سپس نمونه هیدرولیز شده توسط کاغذ صافی فیلتر شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از بخش فیلتر شده به کارتریج Sep-Pak C18 با ۵ میلی‌لیتر متانول

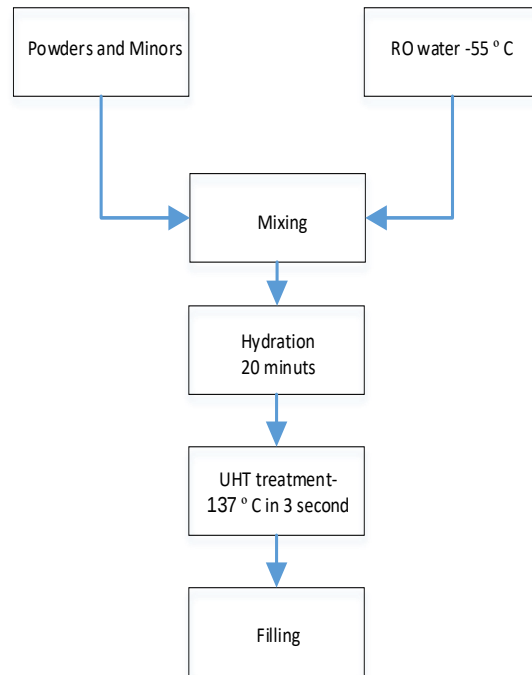


Figure 2-Flow diagram of sample preparations

آزمون‌های فیزیکوشیمیایی شیر:

اندازه‌گیری محتوای رطوبتی، ماده خشک بدون چربی، پروتئین، چربی، دانسیته، اسیدیته و pH:

به منظور اندازه‌گیری محتوای رطوبتی، ماده خشک بدون چربی، پروتئین، چربی، دانسیته، اسیدیته و pH، به ترتیب از روش‌های AACC (44-15A)، استاندارد ملی ایران شماره ۶۳۷، AOAC (991/20)، استاندارد ملی ایران شماره ۳۶۶، استاندارد ملی ایران شماره ۳۶۶، استاندارد ملی ایران شماره ۶۳۸ و استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲ استفاده شد.

مقایسه میانگین‌ها به روش Tukey در سطح اطمینان ۹۵٪، به منظور آنالیز داده‌ها انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

تأثیر تیمار UHT بر تغییرات شاخص‌های رنگ

ارزیابی رنگ نمونه‌ها با استفاده دستگاه رنگ سنج هانترلب انجام شد. اندیس L^* بیانگر روشنی (صفر = سیاه و ۱۰۰ = سفید)، اندیس a^* بیانگر قرمزی (مثبت) و سبزی (منفی)، و اندیس b^* نشان دهنده زردی (مثبت) و آبی (منفی) بود. رنگ یکی از مهم ترین پارامترهایی است که بر درک مشتری‌ها از مواد غذایی تأثیر می‌گذارد. به دلیل اینکه درک چشمی رنگ، ترکیبی از ابعاد مختلف فضای رنگ است، با بررسی پارامترهایی که ابعاد مختلف رنگ را نشان می‌دهد، تغییرات رنگی بهتر نشان داده می‌شود، که با تغییرات در مقادیر L^* (روشنی)، a^* (قرمزی) و b^* (سبزی) منعکس می‌شود. شاخص‌های رنگی نمونه‌های شیر مایع نوزاد، قبل و پس از تیمار حرارتی اندازه گیری شدند (جدول ۱)

و ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد و سپس با ۳ میلی‌لیتر HCL 3 مولار شسته شده و تحت خلا تبخیر شد. نمونه خشک شده در ۳ میلی‌لیتر مخلوط آب، استونیتریل و فرمیک اسید (به ترتیب به نسبت ۹۵، ۵ و ۰/۲) حل شده و ۵۰ میکرولیتر از محلول حاصل شده توسط HPLC آنالیز شد.

اندازه گیری ویتامین ث:

به منظور بررسی اثر تیمار حرارتی و همچنین به عنوان شاخصی جهت بررسی کیفیت تغذیه ای محصول اندازه گیری شد. بدین منظور از روش تیتراسیون دو مرحله ای و با استفاده از روش شرح داده شده در استاندارد ملی به شماره ۲۶۸۵ اندازه گیری شد.

تجزیه تحلیل آماری

در این پژوهش اثر فرآیند حرارتی فرادما (UHT) بر شیر مایع نوزاد بررسی شد. به منظور طراحی آزمایشات از طرح General Full Factorial با در نظر گرفتن ۲ تکرار استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab v.16 تجزیه و تحلیل شده و آنالیز واریانس به روش GLM^۶ و

Table ۱ - The effect of the UHT heat treatment process on changes in color indices

Sampling time	L^*	a^*	b^*	ΔE
Before UHT treatment	97.86±0.0123 ^a	-1.82±0.0003 ^a	7.95±0.0011 ^a	-

6-General linear model

After UHT treatment	80.23±0.0113 ^b	-1.2±0.0058 ^b	6.87±0.0014 ^b	6.99±0.0005
---------------------	---------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------

The data presented in the table are in the form of mean ± standard deviation of two replications. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) in the mean values.

پس از فرآیند حرارتی استرلیزاسیون حاکی از کاهش شاخص

L^* ، افزایش مقدار شاخص a^* و شاخص b^* بود.

یافته‌های مطالعات صورت گرفته [۱۹-۲۱] نشان داد، عوامل

مختلفی، از جمله، واکنش قهوه ای شدن غیر آنزیمی، دناتوره

شدن پروتئین‌ها (دناتوره شدن کازئین و پروتئین‌های آب پنیر

موجب تغییر در شاخص L^* می‌شوند. مهمترین دلایل آن

تغییر ساختار پروتئین‌ها و تغییر انعکاس و پراکنش پروتئین‌ها

است)، کاراملیزه شدن لاکتوز (به صورت موثری موجب

تغییر شاخص b^* می‌شود)، اکسیداسیون چربی‌ها (منجر به

افزایش شاخص b^* ، و تشدید رنگ زرد می‌شود) و تخریب

رنگدانه‌های موجود در شیر (تخریب رنگدانه‌هایی که به

صورت طبیعی در شیر وجود دارند، از جمله کلروفیل‌ها و

کارتونوئیدها موجب این تغییر رنگ می‌گردد) است.

اثر تیمار حرارتی UHT بر میزان لیزین در دسترس

فرآیند حرارتی از نقطه نظر افزایش ایمنی غذا، بهبود کیفیت

حسی و از بین بردن میکروارگانیسم‌ها و افزایش انبارمانی^۷

مواد غذایی اهمیت بسیاری دارد، ولی ممکن است اثرات

نامطلوبی بر کیفیت تغذیه‌ای مواد غذایی پروتئینی به دلیل

ایجاد تغییرات شیمیایی و تولید برخی ترکیبات نامطلوب

نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های رنگی نشان داد،

فرآیند حرارتی موجب تغییرات شاخص‌های رنگی در شیر

مایع نوزاد می‌گردد. همانطور که در جدول ۲ نمایش داده

شده است، شاخص L^* پس از فرآیند حرارتی کاهش یافت

و تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش توکی ($p < 0.05$) نشان داد،

نمونه‌ها قبل (86.97 ± 0.123) و پس از فرآیند حرارتی

UHT (80.23 ± 0.0113) اختلاف معنی دار دارند.

مقدار عددی شاخص a^* پس از فرآیند حرارتی افزایش

یافت، و تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش توکی ($p < 0.05$)

نشان داد، نمونه‌ها قبل (-1.2 ± 0.0058) و پس از فرآیند

حرارتی UHT (-1.2 ± 0.0058) اختلاف معنی دار دارند.

مقدار عددی شاخص b^* پس از فرآیند حرارتی افزایش

یافت، و تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش توکی ($p < 0.05$)

نشان داد، نمونه‌ها قبل (6.87 ± 0.0014) و پس از فرآیند

حرارتی UHT (6.99 ± 0.0005) اختلاف معنی دار دارند.

همچنین میزان تغییرات رنگی کل 6.99 ± 0.0005 بود که با

شاخص ΔE در جدول ۲ نمایش داده شده است.

نتایج بدست آمده با مطالعه شامبرگر و همکاران در سال

۲۰۰۷ [۱۸] مطابقت داشت. بررسی نمونه شیر خام، قبل و

اختلال در سنتز DNA و تقسیم میتوز شود. LAL به علت قدرت شلاته کردن می‌تواند آنزیم‌های حاوی یون‌های فلزی عمدتاً یون‌های مس دوظرفیتی و روی را که به متالوآنزیم‌ها (متالوپروتئین) معروفند، غیرفعال کند. از طرف دیگر، تشکیل ترکیب LAL موجب کاهش دسترسی به اسید آمینه ضروری لیزین و در نتیجه، کاهش کیفیت تغذیه‌ای منبع پروتئینی می‌شود. در واقع با اندازه‌گیری میزان لیزین در دسترس می‌توان اثر فرآیند حرارتی بر کیفیت تغذیه‌ای لیزین را مورد بررسی قرار داد و بصورت غیر مستقیم نقش آن در کاهش کیفیت تغذیه‌ای شیر مایع نوزاد را تفسیر و بررسی کرد. برای ارزیابی زمان شروع واکنش میلارد، لیزین در دسترس، ممکن است اطلاعات قابل اعتمادی را ارائه دهد. به صورت کلی، واکنش میلارد به ۳ مرحله تقسیم می‌شود، و تعامل لاکتوز با لیزین و تشکیل محصولات آمادوری به عنوان مرحله اولیه واکنش در نظر گرفته می‌شود [۲۲].

داشته باشد. لیزینوآلانین (۲-آمینو ۲-کربوکسی لیزین) یک ترکیب غیرطبیعی است که از تیمار حرارتی یا قلیایی مواد غذایی حاوی پروتئین تشکیل می‌شود. واکنش تشکیل، لیزینوآلانین (LAL) با حذف بتای گروه هیدروکسیل سرین، O-فسفوریل سرین، O-گلیکوزیل سرین یا گروه دی سولفید، سیستئین آغاز می‌شود. محصول نهایی حذف بتا، دهیدروآلانین (۲-آمینوآکرلیک اسید یا DHA) است. این ترکیب بسیار واکنش پذیر، محصول واسطه در تشکیل لیزینوآلانین و سایر اسیدهای آمینه زنبیوتیک است و می‌تواند با ترکیبات گوناگون آمین دار، مانند اسیدهای آمینه و آمین‌های بیوژن واکنش دهد. از واکنش DHA با اسید آمینه لیزین LAL تشکیل می‌شود. مطالعات نشان داده است که LAL اثرات نفروتوکسیک در برخی حیوانات داشته و می‌تواند موجب نفروسیتومگالی، جراحی میکروسکوپی سلول‌های کلیه، افزایش میزان نوکلئوپروتئین و در نتیجه

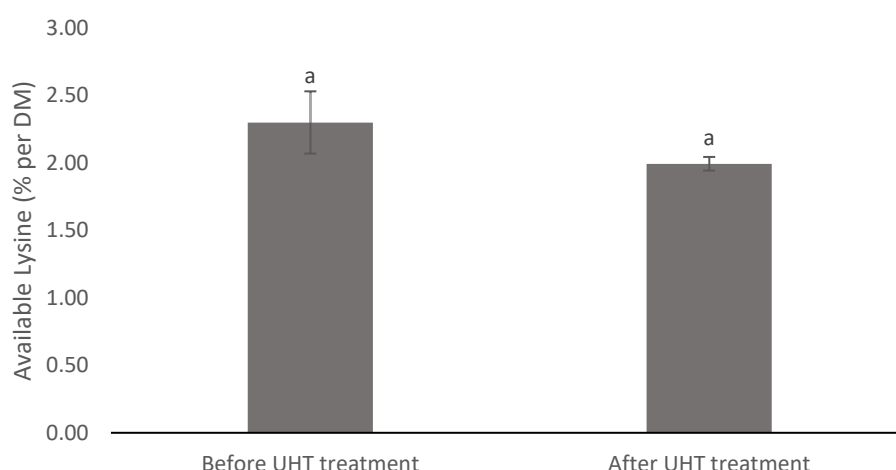


Figure ۱- Impact of the UHT thermal process on Available Lysine (% per DM); Means with different superscript indicate significant differences in column (P<0.05)

بررسی نمونه‌های شیر مایع نوزاد، قبل و پس از فرآیند حرارتی UHT نشان داد، اعمال تیمار حرارتی UHT موجب کاهش میزان لیزین در دسترس در شیر مایع نوزاد می‌شود. همانطور که در شکل ۲ نمایش داده شده است مقدار لیزین در دسترس قبل و پس از اعمال تیمار حرارتی UHT به ترتیب $2/30 \pm 0/23$ و $1/99 \pm 0/05$ درصد در ماده خشک است ($13/48\%$ کاهش)، و تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش توکی ($p < 0/05$) نشان داد، میزان لیزین در دسترس قبل و پس از فرآیند حرارتی UHT تفاوت معنی دار ندارند.

نتایج به دست آمده با مطالعه پرستل و همکاران در سال [۲۳] ۲۰۲۰ مطابقت داشت. آن‌ها گزارش کردند مقدار لیزین در شیر تیمار شده به روش UHT نسبت به نمونه تیمار شده کمتر است، زیرا به خوبی ثابت شده است، فرآیند حرارتی می‌تواند منجر به از بین رفتن لیزین، به دلیل مسدود شدن جایگاه‌های فعال اسید آمینه و همچنین حضور گلوکز قبل از فرایند حرارتی که می‌تواند واکنش میلارد را تسهیل کند.

همانطور که قبلاً اشاره شد، واکنش میلارد بین لاکتوز یا محصولات حاصل از هیدرولیز آن و لیزین رخ می‌دهد که

منجر به کاهش قابل توجهی در لیزین قابل دسترس از طریق تشکیل فوروزین می‌شود. نیاز تغذیه‌ای به اسید آمینه لیزین حدود ۱۰۷۰ میلی‌گرم در روز برای نوزادان ۱۰ کیلوگرمی اعلام شده است [۲۴]. مطالعه آکتاش و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داد، که 1516.8 میلی‌گرم/هر وعده^۸ (سروینگ) در روز از لیزین قابل دسترس در شیرهای نوزاد مورد تجزیه قرار گرفته است و همچنین همبستگی مثبت بین تشکیل فوروزین و از دست رفتن لیزین ممکن است منجر به بیماری‌های جدی از طریق تجمع محصولات آمادوری و از دست رفتن ریز مغذی‌ها در محصولات شیری شود [۸].

فوروزین (میلی گرم در صد گرم پروتئین)

فوروزین یکی از شاخص‌های تشکیل ترکیبات اولیه واکنش میلارد است و ملاکی در تشخیص آسیب حرارتی به شیر است، اندازه گیری فوروزین در نمونه شیر، بصورت مستقیم مقدار ترکیبات اولیه واکنش میلارد، ترکیبات آمادوری و لاکتولیزین را نشان می‌دهد.

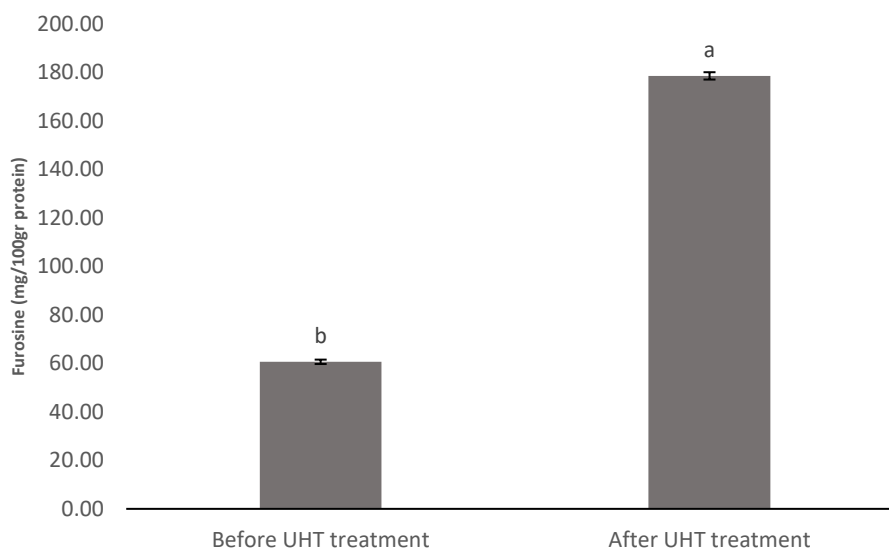


Figure ۲ -Content of Furosine (milligrams of Furosine per 100 grams of protein) ;Means with different superscript indicate significant differences in column (P<0.05)

مطالعات اخیر نشان دادند محتوای فوروزین در شیرهای

تیمار شده با فرآیندهای حرارتی مختلف، بصورت محسوسی

متفاوت است و با تشدید فرآیند حرارتی میزان محتوای

فوروزین به عنوان نشانگر ترکیبات اولیه واکنش میلارد

افزایش می یابد [۸، ۲۲].

اندازه گیری ویتامین ث (میلی گرم بر کیلوگرم)

شیر مادر سطح بالاتری از ویتامین ث (L-آسکوربیک اسید)

نسبت به شیرهای تجاری جایگزین شیر مادر دارد، اما

همانطور که در ابتدای این مقاله عنوان شد، در مواقعی استفاده

از شیرهای تجاری جایگزین شیر مادر انتخابی ناگزیر است.

ویتامین ث در برابر گرما، اکسیژن، نور، pH و محتوای

رطوبت بسیار ناپایدار است.

اندازه گیری میزان فوروزین نشان داد، اعمال تیمار حرارتی

UHT موجب افزایش فوروزین در شیر مایع نوزاد می شود.

همانطور که در شکل ۳ نمایش داده شده است مقدار

فوروزین قبل و پس از اعمال تیمار حرارتی UHT به ترتیب

۶۰/۰±۶۴/۹۱ و ۱۷۸/۱±۵۷/۵۱ میلی گرم در ۱۰۰ گرم

پروتئین است. تجزیه و تحلیل داده ها با روش توکی

(p<0/05) نشان داد، نمونه ها قبل و پس از فرآیند حرارتی

UHT تفاوت معنی دار دارند.

نتایج بدست آمده با مطالعه ژائو و همکاران در سال ۲۰۲۳

[۲۵] مطابقت داشت و گزارش کردند که تشکیل فوروزین

در شیر شتر به میزان دمای تیمار حرارتی و مدت زمان آن

رابطه مستقیم دارد و افزایش دما و زمان فرآیند، شدت واکنش

میلارد را تشدید می کند.

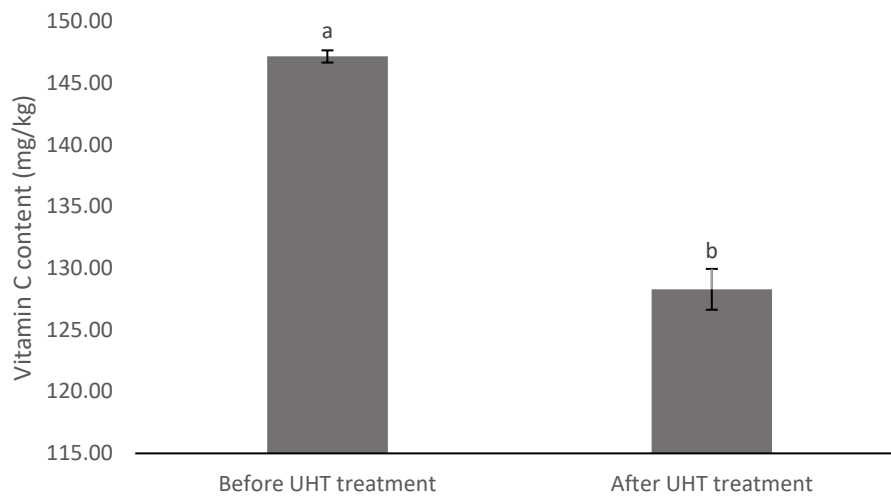


Figure ۳- Vitamin C content (mg/kg) ; Means with different superscript indicate significant differences in column ($P < 0.05$)

۴- نتیجه گیری

تیمار حرارتی UHT موجب کاهش میزان ویتامین ث در شیر مایع نوزاد شد. همانطور که در شکل ۴ نمایش داده شده است، مقدار ویتامین ث قبل و پس از اعمال تیمار حرارتی UHT به ترتیب $147/15 \pm 0/49$ و $128/29 \pm 1/65$ میلی گرم در کیلوگرم بود ($12/82$ درصد کاهش یافت). تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش توکی ($p < 0/05$) نشان داد، نمونه‌ها قبل و پس از فرآیند حرارتی UHT تفاوت معنی دار دارند. نتایج مطالعه حاضر با گزارشات سایر پژوهش‌ها مطابقت دارد و با توجه به اهمیت تغذیه‌ای ویتامین ث در رشد و تکامل نوزاد، کاهش سطح آن در طی فرآوری محصول، اهمیت غنی‌سازی با ویتامین ث را در محصولات غذایی نوزادان را تقویت می‌کند [۵، ۲۶، ۲۷].

یافته‌های مطالعه حاضر، اثرات نامطلوب فرآیند حرارتی فرادما (UHT) بر خواص تغذیه‌ای شیر مایع نوزاد را تایید می‌کند. استفاده از تیمار حرارتی UHT علی‌رغم وجود مزایایی از جنبه ایمنی مواد غذایی و صنعتی، به صورت موثری شاخص‌های تغذیه‌ای (آمینو اسید لیزین و ویتامین ث) این محصول را تحت تاثیر قرار داد. همچنین توسعه واکنش میلارد، با توجه به افزایش میزان فوروزین و تغییرات شاخص‌های رنگی (کاهش شفافیت و افزایش تیرگی که حاکی از تشکیل ملانوئیدین می‌تواند باشد)، مشهود است. افزایش میزان فوروزین، حاکی از پتانسیل بالای آسیب پذیری شیر مایع نوزاد برای توسعه واکنش میلارد در طی انبارمانی است و با توجه به اثبات اثرات نامطلوب ترکیبات حاصل از

واکنش میلارد بر سلامت مصرف کننده، و حساسیت گروه هدف تغذیه کننده از این محصول (نوزادان و بخصوص نوزادان نارس)، مطالعات بیشتری به ویژه در جهت بررسی

روش های کنترل و محدود کردن واکنش میلارد طی فرآوری و شیر مایع نوزاد فرادما مورد نیاز است.

ه-منابع

- [1] Cama-Moncunill, X., et al., *Direct analysis of calcium in liquid infant formula via laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS)*. Food Chemistry, 2020. **309**(125754).
- [2] Bakker-Zierikzee, A.M., et al., *Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable Bifidobacterium animalis on the intestinal microflora during the first 4 months of life*. The British Journal of Nutrition, 2005. **5**(94): p. 783–90.
- [3] Guo, M. and S. Ahmad, *Formulation guidelines for infant formula*, in *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. 2014, Woodhead Publishing: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. p. 141-171.
- [4] Kokkinidou, S. and D.G. Peterson, *Control of Maillard-Type Off-Flavor Development in Ultrahigh-Temperature-Processed Bovine Milk by Phenolic Chemistry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(32): p. 8023–8033.
- [5] Sunds, A.V., et al., *Maillard reaction progress in UHT milk during storage at different temperature levels and cycles*. International Dairy Journal, 2017. **34**.
- [6] Happe, R.P. and L. Gambelli, *Infant formula. Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition*, in *Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition*. 2015, Woodhead Publishing. p. 285–315.
- [7] Tamanna, N. and N. Mahmood, *Food Processing and Maillard Reaction Products: Effect on Human Health and Nutrition*. International Journal of Food Science, 2015. **6**.
- [8] Aktaş, I.G., A. Hamzahoğlu, and V. Gökmen, *Lactose hydrolysis and protein fortification pose an increased risk for the formation of Maillard reaction products in UHT treated milk products*. Journal of Food Composition and Analysis, 2019. **84**.
- [9] Roux, S., et al., *Kinetics of Maillard reactions in model infant formula during UHT treatment using a static batch ohmic heater*. Dairy Science & Technology, 2009. **89**: p. 349-362.
- [10] Zhang, Y., et al., *Effect of different heat treatments on the Maillard reaction products, volatile compounds and glycation level of milk*. International Dairy Journal, 2021. **Volume 123**(105182).
- [11] Roux, S., et al., *Comparative thermal impact of two UHT*

- technologies, continuous ohmic heating and direct steam injection, on the nutritional properties of liquid infant formula. *Journal of Food Engineering*, 2016. **179**: p. 36-43.
- [12] Guo, Y., et al., *Changes in Maillard reaction products, volatile substances and active proteins of goat milk under different heat treatments*. *International Dairy Journal*, 2024. **146**.
- [13] <https://www.statista.com/statistics/976542/sales-of-baby-milk-formula-by-type-us/>.
- [14] Zhu, H., et al., *Trapping of Carbonyl Compounds by Epicatechin: Reaction Kinetics and Identification of Epicatechin-adducts in Stored UHT Milk*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020. **68**(29): p. 7718–7726.
- [15] Al-Saadi, J.M.S.a.H.C.D., *Cross-linking of proteins and other changes in UHT milk during storage at different temperatures.* *Australian Journal of Dairy Technology*, 2008. **6**(63): p. 79-85.
- [16] Aalaei, K., et al., *Application of a dye-binding method for the determination of available lysine in skim milk powders*. *Food Chemistry*, 2016(196): p. 815-820.
- [17] Charissou, A., L. Ait-Ameur, and I. Birlouez-Aragon, *Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples*. *Journal of Chromatography A*, 2007. **1140**(1-2): p. 189-194.
- [18] Schamberger, G.P. and T.P. Labuza, *Effect of green tea flavonoids on Maillard browning in UHT milk*. *LWT - Food Science and Technology*, 2007. **40**(8): p. 1410-1417.
- [19] Lalwani, S., et al., *Changes in nutritional and technological properties of heat-treated milk and cream at dairy production scale during storage*. *International Dairy Journal*, 2024(154): p. 105927.
- [20] Milovanovic, B., et al., *Colour assessment of milk and milk products using computer vision system and colorimeter*. *International Dairy Journal*, 2021(120): p. 105084.
- [21] Karlsson, M.A., et al., *Changes in stability and shelf-life of ultra-high temperature treated milk during long term storage at different temperatures*. *Heliyon*, 2019(5): p. e02431.
- [22] Aalaei, K., et al., *Early and advanced stages of Maillard reaction in infant formulas: Analysis of available lysine and carboxymethyl-lysine*. *PLoS ONE*, 2019. **7**(14).
- [23] Prestela, S., et al., *Evaluation of the effect of berry extracts on carboxymethyllysine and lysine in ultra-high temperature treated milk*. *Food Research International*, 2020. **130**(108923).
- [24] Contreras-Calderón, J., et al., *Effect of Ingredients on Non-enzymatic Browning, Nutritional Value and Furanic Compounds in Spanish Infant*

- Formulas*. Journal of Food and Nutrition Research, 2017. 5(4): p. 243-252.
- [25] Zhao, X., et al., *Effects of different heat treatments on Maillard reaction products and volatile substances of camel milk*. Front in Nutrition, 2023. 10(1072261).
- [26] Laguerre, J.C., et al., *The impact of microwave heating of infant formula model on neo-formed contaminant formation, nutrient degradation and spore destruction*. Journal of Food Engineering,, 2011. 107(2): p. 208-213.
- [27] Yang, H., et al., *Degradation kinetics of vitamins in different enteral feeding formulas during storage at different temperatures*. Heliyon, 2024(10): p. e29653.



Scientific Research

Evaluation of the Effect of Ultra-High Temperature (UHT) Treatment on Color, Lysine, Furosine, and Vitamin C in Liquid Infant Formula

Masoud Ghorbani¹, Yahya Maghsoudlou^{2*}, Morteza Khomeiri³, Ali Moayed⁴, Farhad Garavand⁵

1 -PhD student of Food Technology, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*2-Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3-Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4 -Associated professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

5-Assistant professor, Department of Food Chemistry and Technology, Teagasc Moorepark Food Research Centre, Fermoy, Co. Cork, Ireland.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received: Accepted:	Ready-to-feed liquid infant formula (LIF) is used for preterm infants when human milk is unavailable. However, sterilization of liquid infant milk using ultra-high temperature (UHT) treatment leads to the formation of Maillard reaction products (MRPs), which may negatively impact the immune system and kidney development. In this study, infant liquid milk, after being prepared at the Pegah Tehran pilot plant, was subjected to UHT treatment (137°C for 3 seconds). The color indices, nutritional content, and initial Maillard reaction products were examined before and after the UHT process. The findings revealed that there were significant differences in the numerical values of L*, a*, and b* indices before and after thermal processing ($p < 0.05$). The available lysine content before and after UHT treatment was 2.30 ± 0.23 and 1.99 ± 0.05 % in dry matter, respectively (13.48% reduction). The amount of Furosine (early-stage indicator) before and after UHT treatment was reported as 60.64 ± 0.91 and 178.57 ± 1.51 mg per 100 grams of protein, respectively. Vitamin C levels, another nutritional index, decreased during the UHT process (before and after UHT treatment were 147.15 ± 0.49 and 128.29 ± 1.65 mg per kilogram, respectively). Overall, while UHT treatment has benefits for food safety, it significantly reduces the nutritional value of infant liquid milk through Maillard reaction products.
Keywords: UHT, Sterilization, Infant formula, Liquid Infant Formula, Maillard	
DOI: 10.22034/FSC.T.22.158.80. *Corresponding Author E- y.maghsoudlou@gau.ac.ir	



امکان‌سنجی تولید نوشیدنی انرژی‌زا فراسودمند حاوی کیتوزم تانن-اسیدلینولئیک کانژگه

مرتضی جمشید عینی^۱، حمید توکلی پور^{۲*}، رضوان موسوی نادوشن^۳، محسن مختاریان^۴

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

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

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۹

کلمات کلیدی:

اسید لینولئیک کنژوگه،

تانن،

کیتوزوم،

عصاره پوست انار،

نوشیدنی انرژی‌زا

امروزه با توجه به علاقه برای مصرف مواد غذایی فراسودمند و گسترش روزافزون بیماری‌های قلبی و عروقی، تمایل به مصرف محصولات فراسودمند افزایش یافته است. بنابراین محققان به دنبال بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های جدید محصولات با ویژگی‌های عملگرا هستند و در این راستا، مطالعه حاضر با هدف تولید نوشیدنی انرژی‌زا فراسودمند حاوی کیتوزم تانن-اسیدلینولئیک کانژگه انجام شد. پس از استخراج ترکیبات زیست فعال (بوژه تانن) از پوست انار همراه با اسید لینولئیک کنژوگه در ساختار کیتوزوم‌ها گنجانده شدند. پس از بررسی پایداری اکسایشی اسید لینولئیک، بررسی طیف‌سنجی FTIR و ریخت‌شناسی کیتوزوم‌ها، به میزان ۰/۷۵ گرم در فرمولاسیون نوشیدنی‌ها افزوده شدند. نتایج تأثیر معنادار غلظت‌های مختلف عصاره زیستی انار بر پایداری اکسیداتیو اسید لینولئیک را نشان داد. بررسی طیف‌سنجی FTIR بیانگر وجود ساختارهای زیست فعال انار و اسیدلینولئیک در کیتوزوم‌ها بود. ذرات تقریباً کروی کیتوزان با اندازه nm ۷۷/۶۶ و ۷۹/۹۰ با یکنواختی مشاهده شد. افزودن نانو کیتوزوم‌ها سبب افزایش معنادار pH (کاهش اسیدیته)، افزایش کدورت، ویسکوزیته، دوفاز شدن و محتوی فنلی را نشان داد. همچنین کاهش شاخص L* و افزایش a* و b* در نوشیدنی‌ها گزارش شد. نتایج حاضر نشان داد که پلیمرهای زیستی نقش کلیدی در پایداری ساختار غشای لیپوزومی و انتشار پایدار مولکول‌های به دام افتاده توسط یک مانع فضایی بر روی سطح دارند. این یک سکوی بالقوه را جهت طراحی مناسب حامل‌ها برای مواد مغذی یا نگهدارنده‌ها به منظور افزایش ماندگاری و ایمنی ماتریس‌های غذایی فراهم خواهد کرد.

DOI:10.22034/FSCT.22.158.99.

* مسئول مکاتبات:

tavakolipour@gmail.com

۱-مقدمه

امروزه محققان دریافته‌اند که غذاها علاوه بر تامین مواد مغذی ضروری، حاوی اجزایی هستند که ممکن است در حفظ سلامت و پیشگیری از بیماری‌های مزمن مفید باشند. اجزای موجود در محصولات حیوانی هر کدام با تأثیر خاصی بر سلامت انسان مرتبط هستند، به همین دلیل است که علاقه به اسیدهای مزدوج به طور قابل توجهی افزایش یافته است [۱]. اسید لینولیک مزدوج یک مکمل غذایی است که برای کاهش توده بدن، آسیب عضلانی و پاسخ‌های التهابی استفاده می‌شود. بنابراین، در چند دهه گذشته توجه علمی قلیل توجه‌ای را به خود جلب کرده است. اسید لینولیک خانواده‌ای از اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه است که به مخلوطی از ایزومرهای موضعی و هندسی اسید لینولیک با پیوندهای دوگانه مزدوج اطلاق می‌شود که می‌تواند در هر موقعیتی از زنجیره کربنی، معمولاً بین ۸ تا ۱۳، در یک پیکربندی سیس^۱ یا ترانس^۲ قرار گیرد [۲]. رایج‌ترین ایزومرها (c9,t11) cis-9, trans-11 و trans-10,c12 (t10,c12) هستند که به طور طبیعی در فرآورده‌های شیری (شیر، پنیر و ماست) و گوشت نشخوارکنندگان (گوشت گاو و بره) وجود دارند [۳]. مطالعات نشان داد که اسید لینولیک، علاوه بر استفاده برای درمان بیماری‌های قلبی عروقی، سندرم متابولیک و آسم می‌تواند اثرات سلامتی‌بخش مختلفی مانند خاصیت ضد سرطانی، مهار تصلب شرایین، افزایش عملکرد سیستم ایمنی، متابولیسم کبد و قند خون داشته باشد. اما معتبرترین یافته‌ها در مورد اثرات سلامتی‌بخش اسید لینولیک شامل ضد سرطان و کاهش اثرات چربی بدن است [۴]. مطالعات تحقیقاتی جدیدتر نشان می‌دهد که هر دو ایزومر اسید لینولیک دارای اثرات سلامتی بسیار متفاوتی هستند. CLA-t10,c12 یک عامل ضد سرطان، ضد چاقی و ضد دیابت است، درحالی‌که CLA-c9,t11 عمدتاً ضد التهاب است. همچنین این احتمال وجود دارد که برخی از اثرات ناشی از عمل هم افزایی این ایزومرها باشد [۱].

انار (*Punica granatum*) بومی کشور ایران تا کوه‌های هیمالیا در شمال هند است و که در آب و هوا و اقلیم نیمه خشک معتدل بیابانی، خشک، نیمه خشک، نیمه مرطوب و مرطوب سرد مناطق غربی و مرکزی کشور که دارای انواع خاک‌های متفاوت است به صورت درخت و درختچه در غالب ۳۰۰ گونه کشت می‌گردد. این گیاه هم چنین در مناطق بسیار گرم که بارندگی تنها در زمستان رخ می‌دهد و دارای تابستان‌های خشک است به طور طبیعی دیده می‌شود. امروزه پراکنش درخت انار در آسیای مرکزی، مناطق مدیترانه‌ای، آسیای جنوب شرقی و آمریکای شمالی گزارش شده است [۵]. در ایران ۶۷۰ هزار تن [۶] و در جهان تقریباً ۲۱۸۰۰۰ تن کشت می‌شود. پس از اثبات خواص ضد میکروبی و ضد ویروسی انار، بطورقابل توجهی کشت آن افزایش یافته است [۵]. پوست انار ۴۰ درصد از کل میوه آن را تشکیل می‌دهد. پوست انار سرشار از پلی فنول است و از آنجاییکه پلی‌فنل‌ها عوامل آنتی‌اکسیدانی هستند، می‌توانند توانایی دارویی انار را نشان دهند. بسیاری از محققین تأیید کرده‌اند که پوست انار یک منبع غنی از مخلوط‌های فعال زیستی از جمله الازیتانین‌ها، کاتچین‌ها، روتین و اپی‌کاتچین‌ها است [۷]. همچنین مطالعات نشان داده که پوست انار سرشار از تانن‌های قابل هیدرولیز در الازیتانین‌ها است. نشان داده شده است محتوی تانن در پوست انار از محتوی فلاونوئیدهای (عمدتاً آنتوسیانین‌ها) آن بیشتر است [۵]. تانن‌های موجود در انار عمدتاً تانن‌های متراکم و تانن‌های قابل هیدرولیز هستند. تانن‌های قابل هیدرولیز تقریباً ۸۵ درصد از تانن‌های موجود در پوست انار را تشکیل می‌دهند [۸]. بسیاری از فعالیت‌های زیستی مختلف تانن‌ها از جمله آنتی‌اکسیدان، ضد باکتری، ضد قارچ، ضد تومور و غیره نیز نشان داده شده است. گروه‌های ارتو دی هیدروکسیل موجود در تانن عامل شلات یون‌های فلزی هستند. درجه پلیمریزاسیون بالا و وزن مولکولی نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی تانن‌ها دارد. هنگامیکه تانن

به عنوان بخشی از رژیم غذایی انسان یا حیوان مصرف می‌شود، تانن‌ها ممکن است با تشکیل کمپلکس‌هایی با پروتئین و آهن بر استفاده از پروتئین تأثیر بگذارند. آنها می‌توانند با تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های فنلی و گروه‌های NH- پپتیدها که توسط آنزیم‌های گوارشی شکسته نمی‌شوند، پیوند قوی با پروتئین‌ها ایجاد کنند [۹].

لیپوزوم‌ها ذرات کروی (وزیکول) با یک یا چند غشای دو لایه، با ویژگی‌های آمفی پاتیک (دو دوستی) هستند که از تجمع مولکول‌های چربی یا فسفولیپید چربی (به ویژه فسفاتیدیل کولین) در محیط آبی تشکیل می‌شوند. علیرغم مزایای فراوان لیپوزوم‌ها (به ویژه امکان تولید از ترکیبات سالم و بی‌ضرر برای سلامتی انسان)، تنها تعداد کمی از لیپوزوم‌های اصلاح نشده پایدار هستند و اکثر آنها تمایل زیادی به تجمع دارند که به مرور زمان ممکن است منجر به به‌نشست محتوای به دام افتاده شود [۱۰]. برای غلبه بر این نقایص و برای پایداری بیشتر، اصلاح سطح حامل‌های لیپوزومی با استفاده از پلیمرهای زیستی مانند پکتین یا کیتوزان برای طراحی سیستم‌های تحویل موثرتر انجام شده است. زیرا کپسوله‌سازی با کاهش واکنش با محیط خارجی، پلی‌فنل‌ها را در برابر تخریب، اثرات نامطلوب نور، رطوبت و اکسیژن محافظت می‌کند و در نتیجه به افزایش عمر مفید آنها کمک می‌کند. علاوه بر این، کپسوله‌سازی منجر به کاهش تبخیر هسته، آزادسازی کنترل شده هسته، رقیق شدن هسته (در مواردی که فقط مقادیر کمی از ترکیبات فنلی مورد نیاز است) و افزایش نیمه عمر خواهد داشت [۱۰] و [۱۱]. Ramli و همکاران (۲۰۱۹)، افزایش راندمان کپسولاسیون عصاره بره موم با کیتوزم و پایداری کیتوزم‌ها پس از یک ماه ذخیره‌سازی را نشان دادند [۱۲]. Silva و همکاران [۱۳]. نیز نشان دادند بازده کل استخراج از ۳۵ به ۴۸/۱ درصد با افزایش غلظت کیتوزان (۰/۴ به ۱ درصد) افزایش یافت.

سازمان غذا و دارو نوشیدنی‌های انرژی‌زا را به‌عنوان دسته‌ای از نوشیدنی‌های غیر الکلی تعریف می‌کند که معمولاً حاوی

کافئین، با یا بدون سایر مواد افزودنی است. این نوشیدنی‌ها معمولاً حاوی مقادیر زیادی کافئین، قندهای افزوده شده، سایر افزودنی‌ها و محرک‌های قانونی مانند گوارانا^۲، تائورین^۳ و ال-کارنیتین^۴ هستند [۱۴]. علاوه بر این، نوشیدنی‌های کم‌الکل نیز مزایای بالقوه‌ای برای سلامتی دارند، مانند کاهش کلسترول و افزایش لیپوپروتئین با چگالی بالا، که به پیشگیری از بیماری قلبی و کاهش خطرات بیماری‌های مرتبط با الکل کمک می‌کند [۱۵].

بنابراین این مطالعه امکان تولید یک نوشیدنی انرژی‌زا سالم فراسودمند را توصیف می‌کند. کیتوزوم‌های اسیدلینولیک-تانن این پتانسیل را دارد که امکان بهبود کیفیت محصول از طریق افزایش غنی‌سازی ترکیبات فعال زیستی را فراهم کند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد: میوه انار تازه از باغی در استان ساوه (در شمال استان مرکزی بین عرض جغرافیایی (۳۴ درجه و ۴۵ دقیقه عرض) واریته *Wonderful*، روغن کانولا از شرکت لادن (ایران)، اسید لینولیک از شرکت HSF (چین) و مواد شیمیایی مورد نیاز تحقیق از شرکت Merck (آلمان) خریداری شدند.

۲-۲- استخراج ترکیبات زیست فعال (بویژه تانن) از پوست انار: ابتدا پوست چرمی بیرونی و سایر ضایعات زیستی آن (مزوکارپ و غشای تقسیم کننده) از دانه‌ها (آریل‌ها) حذف شد. سپس ضایعات زیستی انار تازه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد آبگیری شد و در خشک کن انجمادی (Operon- Korea) (۵۵ درجه سلسیوس، ۰/۱۵ میلی‌متر جیوه) به مدت ۴۸ ساعت خشک شد تا زمانیکه رطوبت اولیه آن از $0/5 \pm 69/93$ درصد در مبنای تر به میزان رطوبت ایمن تقریباً $4/76$ در مبنای تر کاهش یافت [۱۶]. پس از مرحله خشک کردن، محصول نهایی به کمک آسیاب آزمایشگاهی (LB20ES, Waring, USA) تا

دربندی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، تا شروع آزمایش‌های بعدی نگهداری شد [۱۹].

۲-۴- تولید ریز کپسول کیتوزوم حاوی هسته‌های زیست فعال (تانن - اسید لینوئیک کونژوگه): با هدف ممانعت از اکسیداسیون اسید لینوئیک، مقادیر مختلفی از عصاره زیستی خشک شده (۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۴۰۰، ۱۶۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۰۰۰ mg/ml) به اسید لینوئیک اضافه شد. ۱۰ درصد اسید لینوئیک به روغن کانولای بدون آنتی‌اکسیدان افزوده شد. نرخ اکسایش اسید لینوئیک (به روش آزمون ماندگاری تسریع شده یا (ALST)^۶ در مدت زمان ثابت (۶۰ دقیقه)) از طریق شاخص پراکسید پایش گردید تا مقدار بهینه (یعنی غلظتی که بیشترین میزان ممانعت از اکسایش لینوئیک اسید را داشته باشد) آنتی‌اکسیدان طبیعی عصاره زیستی خشک شده تعیین گردید [۱۹]. در نهایت، کیتوزوم‌ها با استفاده از روش حرارتی تولید شدند. برای این منظور، ابتدا لسیتین سوای پودر شده در حلال اتانول (۱۰ درصد وزنی / حجمی) حل شد. در مرحله‌ی بعد در تبخیرکننده‌ی چرخشی تحت خلأ، حلال حذف شد تا یک لایه نازک (تشکیل وزیکول چند لایه لپیدی لیپوزوم) در ته بالن ایجاد شد. سپس بالن در دسیکاتور قرار داده شد تا باقی‌مانده حلال نیز جدا گردید. در ادامه با استفاده از هیتر مغناطیسی (MS300H, Glassco, Netherlands) لایه لپیدی تشکیل شده در بافر فسفات حاوی ترکیبات فعال زیستی حل گردید. تیمار فراصوت در دامنه ۹۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد [۲۰].

۲-۵- تهیه نوشیدنی انرژی‌زای فراسودمند: ابتدا اجزا فرمولاسیون پایه تهیه شد. اجزاء مورد استفاده در تولید نوشیدنی شامل: سترات سدیم (۰/۰۴۵ درصد)، سوربات پتاسیم (۰/۰۰۳ درصد)، بنزوات سدیم (۰/۰۰۵ درصد)، طعم دهنده Tutti frutti (۰/۰۲ درصد)، رنگ طبیعی کارامل (۰/۰۲ درصد)، ویتامین B₁ (۰/۰۰۲ درصد)، ویتامین B₂ (۰/۰۱۴ درصد)، ویتامین B₅ (۰/۰۰۰۲ درصد)، ویتامین B₆

لندازه ذرات تا ۱ میلی‌متر پودر شد. پودر تولید شده از طریق الک مشبک فولادی زنگ نزن غربال شد. ذرات با حدود ۱ میلی‌متر انتخاب شد [۱۷]. جهت استخراج تانن از پوست انار از حلال آب و دستگاه اولتراسونیک (ZE 1031 DT, Heinrichstrabe, Germany) استفاده شد. نسبت نمونه به حلال روی ۱ به ۲۰ و دما برای روش فراصوت روی ۴۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. حدود ۳ گرم پودر پوست در بطری‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری معرف جداگانه و ۶۰ میلی‌لیتر حلال به آن اضافه شد. بطری‌های معرف به مدت ۱ ساعت در حمام سونیکاتور قرار گرفتند. فیلتراسیون نمونه‌ها با کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ انجام شد و سانتریفوژ (HB320, Brea, USA) به مدت حدود ۱۰-۱۲ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. حلال تحت خلأ ۱۴۰ میلی‌بار و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا زمان خشک شدن تبخیر شد. عصاره‌ها در بطری‌های شیشه‌ای کهربایی رنگ جمع‌آوری شدند و در دمای ۶-۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار گرفتند [۱۸].

۲-۳- خشک کردن ترکیبات زیست فعال استخراج شده: ترکیبات فعال زیستی پوست انار (به ویژه تانن) جدا شده، به روش غوطه‌وری در ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و به صورت دستی تکان داده شد. در مرحله‌ی بعد عصاره اتانولی از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ عبور داده شد. اتانول موجود در عصاره توسط تبخیرکننده‌ی چرخان (B-480, Flawil, Swiss) تحت خلأ در دمای ۳۵ درجه سلسیوس حذف گردید. برای فرایند خشک کردن تکمیلی عصاره تغلیظ شده، ابتدا عصاره تغلیظ شده با ۷۵ درصد مالتودکسترین مخلوط شده و توسط دستگاه خشک کن انجمادی (VACO5, ZIRBUS, Germany) به ترتیب در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و فشار ۰/۱ مگا پاسگال خشک شد. سپس عصاره خشک شده در یک ظرف شیشه‌ای تیره رنگ

موج ۴۰۰-۴۰۰۰ cm^{-1} با استفاده از دستگاه FTIR (IRSprit, Shimadzu, Japan) انجام گرفت. به منظور بررسی ایجاد برهمکنش‌های الکترواستاتیک بین کیتوزان و لیپوزوم و نیز ارزیابی درون پوشانی ترکیبات فعال زیستی از این دستگاه یعنی همان اسپکتروسکوپی انتقال فوری مادون قرمز FTIR استفاده شد [۲۰].

۲-۶-۳- ویژگی ریخت شناسی (مورفولوژی) کیتوزم تولید شده: ساختار میکروسکوپی ریزکپسول بهینه تولید شده، تک شکلی بودن یا چند شکلی بودن و اندازه ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی^۷ (EVO 15, ZEISS. Germany) در ۱۵ کیلووات مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور یک قطره از نمونه آماده شده بر روی لام آزمایشگاه ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط خشک شد و سپس نمونه با استفاده از دستگاه کندوپاش یونی با لایه طلا پوشانده شد تا در زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده شود. این مراحل برای تست AFM بدون پوشش انجام شد. برای تست TEM، یک قطره از نمونه رقیق شده (۵ برابر با بافر فسفات ۷/۴) که بر روی یک شبکه مسی که شامل یک فیلم نگهدارنده است، قرار داده شد. نمونه با اسید فسفوتنگستیک^۸ به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شد. سپس مایع اضافی با استفاده از کاغذ صافی خارج شده و پس از خشک شدن مش، نمونه توسط TEM مورد بررسی قرار گرفت [۲۰].

۲-۷- آزمون‌های نویشدنی انرژی‌زا

۲-۷-۱- آزمون pH و اسیدیته: آزمون pH نمونه‌ها به کمک pH متر در دمای محیط و اسیدیته به روش تیتراسیون با هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال تا ظهور رنگ صورتی کم‌رنگ پایدار انجام شد [۲۳].

۲-۷-۲- آزمون کدورت: برای ارزیابی کدورت، ابتدا به منظور یکسان نمودن غلظت عصاره، غلظت ماده خشک عصاره نهایی تا سطح (۴/۳ mg/l) رقیق گردید. میزان تغییر کدورت بعد از مدت ۲۴ ساعت به روش اسپکتروفتومتری (SpectroDirect, Lovibond, Germany) با اندازه‌گیری میزان

(۰/۰۰۰۴ درصد)، ساکارز (۸/۷ درصد)، اسید سیتریک (۰/۵۵ درصد)، مالتو دکسترین (۰/۰۶ درصد)، صمغ عربی (۰/۰۵ درصد)، تاورین (۰/۰۳۷ درصد)، گلوکونولاکتون (۰/۰۲۵ درصد)، کافئین (۰/۰۰۳ درصد) و مابقی فرمولاسیون را آب تشکیل می‌دهد. به منظور تولید نویشدنی حاوی ریزکپسول کیتوزوم، به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر فرمولاسیون پایه ۷۵/۵ گرم کیتوزوم افزوده شد [۲۱].

۲-۶- آزمون‌های کیتوزوم

۲-۶-۱- تعیین پراکسید اسید لینولئیک: مقدار ۵ گرم از هر نمونه اسید لینولئیک به همراه عصاره زیستی خشک شده بطور کامل در یک بشر ۵ میلی‌لیتری با ۰/۲ گرم هپتادکانوئیک اسید که به عنوان استاندارد داخلی اضافه شده بود، مخلوط شدند. ۲۰ میلی‌گرم از هر نمونه مخلوط حاصله در مجاورت هوا تحت هم زدن مداوم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب در ۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۸، ۳۵، ۴۴ و ۴۸ ساعت اکسید شدند. جهت تعیین پراکسید نمونه‌ها، مقدار ۵ گرم نمونه آماده شده در ارلن ملیر ۲۵۰ میلی‌لیتری وزن گردید و ۳۰ میلی‌لیتر حلال (مخلوط اسید استیک و کلروفرم) به آن اضافه شد. سپس حدود ۰/۵ میلی‌لیتر یدور پتاسیم به آن افزوده گردید و مخلوط به مدت یک دقیقه ساکن گذاشته و گاهی همزده شد، سپس حدود ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و مجدداً مخلوط به مدت یک دقیقه ساکن گذاشته شده و چند قطره چسب نشاسته به محلول اضافه و با محلول تیوسولفات ۰/۱ نرمال تیترو گردید. وقتی که رنگ نمونه به یک حالت شفاف و زلال رسید تیتراسیون متوقف گردیده و عدد پراکسید بر حسب میلی‌اکی والان بر کیلوگرم از طریق فرمول ۱ محاسبه شد [۲۲]:

$$\text{Proxied Value} = (1000 \times N \times V2) / (V1)$$

که در آن: N: نرمالیه تیوسولفات / V1: حجم تیتراسیون مصرفی / V2: حجم نمونه

۲-۶-۲- آزمون تحلیل گروه‌های عاملی (تشکیل پیوند) با FTIR: گروه‌های عاملی با اسپکتروسکوپی FTIR در طول

جذب نور در طول موج ۸۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید [۲۰]:

۲-۷-۳-آزمون رنگ: شاخص‌های رنگی نمونه‌های انرژی‌زا فراسودمند با استفاده از دستگاه رنگ سنج (Hunter Lab, Colorflex EZ, USA) و شاخص‌های L^* (شاخص شفافیت-تیرگی)، a^* (شاخص قرمزی-سبزی) و b^* (شاخص زرد-آبی) تعیین شدند [۲۲].

۲-۷-۴-آزمون ویسکوزیته: ویژگی‌های رئولوژیکی نوشیدنی انرژی‌زای فراسودمند با استفاده از دستگاه ویسکومتر جریان موئینه (YR-1, Brookfield, USA) دمای ۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. روش کار در ویسکومتر جریان موئینه بدین صورت است که زمان مورد نیاز برای عبور حجم استلنداردی از سیال از داخل لوله موئین‌های با طول معلوم اندازه‌گیری می‌گردد. ویسکوزیته نوشیدنی‌ها در دامنه دمایی ۳۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد با فواصل دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. سیال مرجع مورد استفاده در این پژوهش آب مقطر بود [۲۰]:

۲-۷-۵-آزمون دوفاز شدن: برای بررسی میزان دو فاز شدن، نمونه‌های نوشیدنی انرژی‌زا فراسودمند را در فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری در بسته ریخته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد طی مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. برای محاسبه میزان دو فاز شدن نمونه‌ها میزان فاز بالایی توسط خط کش، اندازه‌گیری و بر کل مقدار نوشیدنی انرژی‌زا فراسودمند محتوی لوله تقسیم و در عدد ۱۰۰ ضرب شد [۲۴].

۲-۷-۶-آزمون فنل کل: ابتدا محلول استاندارد عصاره زیستی خشک شده (با غلظت ۱۰ mg/g) در متانول (خلوص ۹۶ درصد) در دمای اتاق تهیه شد. سپس از یک لوله فالكون ۱۰ میلی‌لیتری برای مخلوط کردن ۰/۷۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره زیستی خشک شده با ۰/۷۵ میلی‌لیتر معرف Folin-Ciocalteu استفاده شد و مخلوط حاصل در حمام آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد (شامل یک تکان دهنده رفت و برگشتی با ۲۵۰ دور در دقیقه) به هم زده

شد. به مدت ۳۰ ثانیه پس از ۳ دقیقه استراحت، ۰/۷۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم (Na_2CO_3) با غلظت ۲۰ درصد به هر نمونه اضافه و حجم آن با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر تنظیم شد. در مرحله بعد، هر لوله از نمونه مجدداً در همان زمان هم زده شد و به مدت ۱ ساعت در انبار تاریک ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس جذب نمونه آزمایشی و سفید حاصل (حاوی ۰/۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۷۵ میلی‌لیتر معرف Folin-Ciocalteu و ۰/۷۵ میلی‌لیتر Na_2CO_3 ۲۰ درصد) توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (SpectroDirect, Lovibond, Germany) در ۷۲۵ nm اندازه‌گیری شد. فنل کل هر نمونه از منحنی استاندارد اسید گالیک (از ۲۵، ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر گرم ترسیم شده) به دست آمد و به صورت میلی‌گرم GAE (معادل اسید گالیک) گرم ماده خشک عصاره زیستی خشک شده بیان شد [۲۵].

۲-۸-تجزیه و تحلیل آماری: کلیه تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. همچنین، برای بررسی تفاوت بین نمونه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey) استفاده شد ($p < 0.05$).

۳-نتایج و بحث

۳-۱-پایداری اکسیداتیو اسید لینولئیک

نتایج پایداری اکسیداتیو اسید لینولئیک کنژوگه (CLA)^۹ حاوی غلظت‌های مختلف عصاره زیستی انار در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج تأثیر معنادار غلظت‌های مختلف عصاره بر پایداری اکسیداتیو نمونه را نشان داد ($p < 0.05$). مطابق انتظار بالاترین شاخص پراکسید (یعنی کمترین پایداری اکسیداتیو) در نمونه بدون عصاره زیستی انار مشاهده شد ($p < 0.05$). افزودن عصاره‌ها سبب کاهش شاخص پراکسید (یعنی افزایش پایداری اکسیداتیو) نمونه‌ها شد ($p < 0.05$). مطالعات نشان داده که CLA به طور کلی در هوا بسیار ناپایدار است. نتایج پایداری ایزومرهای CLA حداقل تا حدی توسط پیکربندی سیس یا ترانس آن، نه با موقعیت پیوندهای دوگانه آن‌ها، تعیین می‌شود. زیرا پیوند

فنلی، CLA می‌تواند به راحتی یک الکترون یا یک هیدروژن را به دلیل جابجایی رزونانس اهدا کند، اما، بر خلاف آنتی‌اکسیدان‌های فنولی، رادیکال آزاد حد واسط آن ممکن است پایدار نباشد و در معرض تخریب اکسیداتیو بیشتر قرار گیرد. در واقع نشان داده شده، CLA به سرعت برای تشکیل اسیدهای چرب فوران تجزیه می‌شود [۳۰]. Carvalho Filho (۲۰۱۴)، حضور اسید لینولئیک کنژوگه در عصاره انار را نیز به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی معرفی کردند [۳۱]. با این حال مطالعات نشان داده که مانند آنتی‌اکسیدان‌های فنلی، CLA می‌تواند به راحتی یک الکترون یا یک هیدروژن را به دلیل جابجایی رزونانس اهدا کند، اما، بر خلاف آنتی‌اکسیدان‌های فنولی، حد واسط رادیکال آزاد آن ممکن است پایدار نباشد و در معرض تخریب اکسیداتیو بیشتر قرار گیرد. در واقع نشان داده شده، CLA به سرعت برای تشکیل اسیدهای چرب فوران تجزیه می‌شود [۳۲]. Shayanmehr و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که شرایط بهینه برای تولید فرآیند ایزومرهای CLA با پلیداری بالا عبارتند از: غلظت حلال ۶/۷۴ میلیلیتر، دمای واکنش ۱۰۰ درجه سانتی گراد و زمان واکنش ۱۴۰ دقیقه. در شرایط بهینه میزان ایزومرهای cis-9 و trans-10 به ترتیب برابر با ۸/۴۴ و ۷/۶۲ درصد بود [۳۳].

دوگانه سیس از نظر شیمیایی ناپایدارتر از پیوند ترانس دوگانه است زیرا اولی سطح انرژی آزاد بالاتری دارد و در برابر حمله اکسیژن آسیب پذیرتر است [۲۶]. پوست انار به دلیل ترکیبات شیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی، یک ماده خام با ارزش است. حاوی ترکیبات فنلی مختلفی مانند آنتوسیانین‌ها، گالوتانین‌ها، اسیدهای هیدروکسی سینامیک، اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک، الازیتانین‌ها و استرهای گالاژیل است. این ترکیبات فنلی مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف پوست انار مانند آنتی‌جش‌زا، آنتی‌اکسیدان، ضد میکروبی و آپوپتوز هستند [۲۷]. افزودن عصاره زیستی انار منجمد سبب کاهش شاخص پراکسید (یعنی افزایش پایداری اکسیداتیو) نمونه‌ها شد. این روند کاهشی با افزایش غلظت عصاره زیستی انار معنادارتر بود. که می‌توان به حضور ترکیبات فنلی موجود در عصاره انار نسبت داده شود که با افزایش عصاره افزوده شده غلظت ترکیبات فنولی بیشتر می‌شود. یک همبستگی مثبت بین ترکیبات فنلی کل و فعالیت ضد رادیکالی وجود دارد [۲۸]. لازم به ذکر است از غلظت ۱۴۰۰ ppm به بالا در عصاره زیستی انار اختلاف آماری معناداری از نظر پایداری اکسایشی مشاهده نشد. علت این امر می‌تواند به دلیل پراکسیدانی عمل نمودن عصاره زیستی انار منجمد است [۲۹]. حضور اسید لینولئیک کنژوگه در عصاره انار را نیز به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی معرفی کردند. با این حال مطالعات نشان داده که مانند آنتی‌اکسیدان‌های

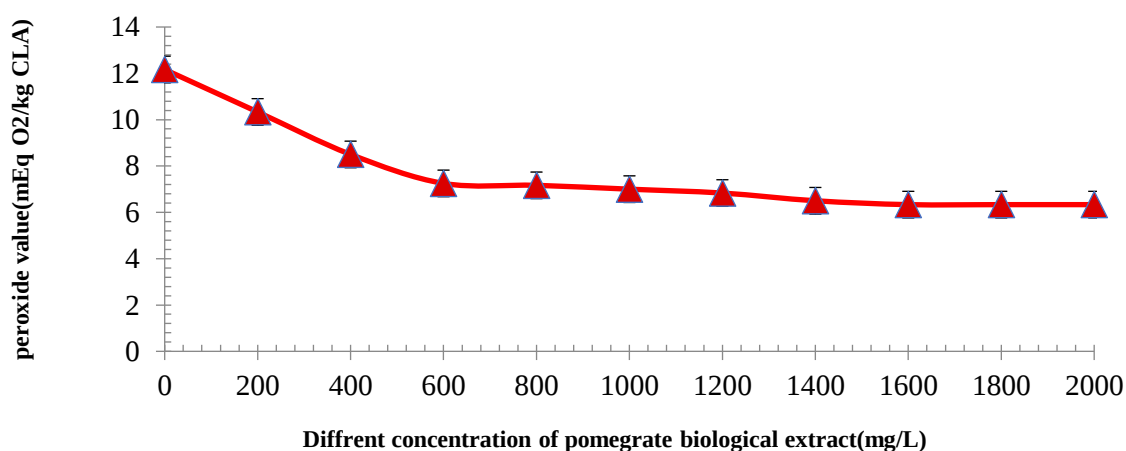


Fig 1. Results of linoleic acid peroxide index containing frozen pomegranate biological extract

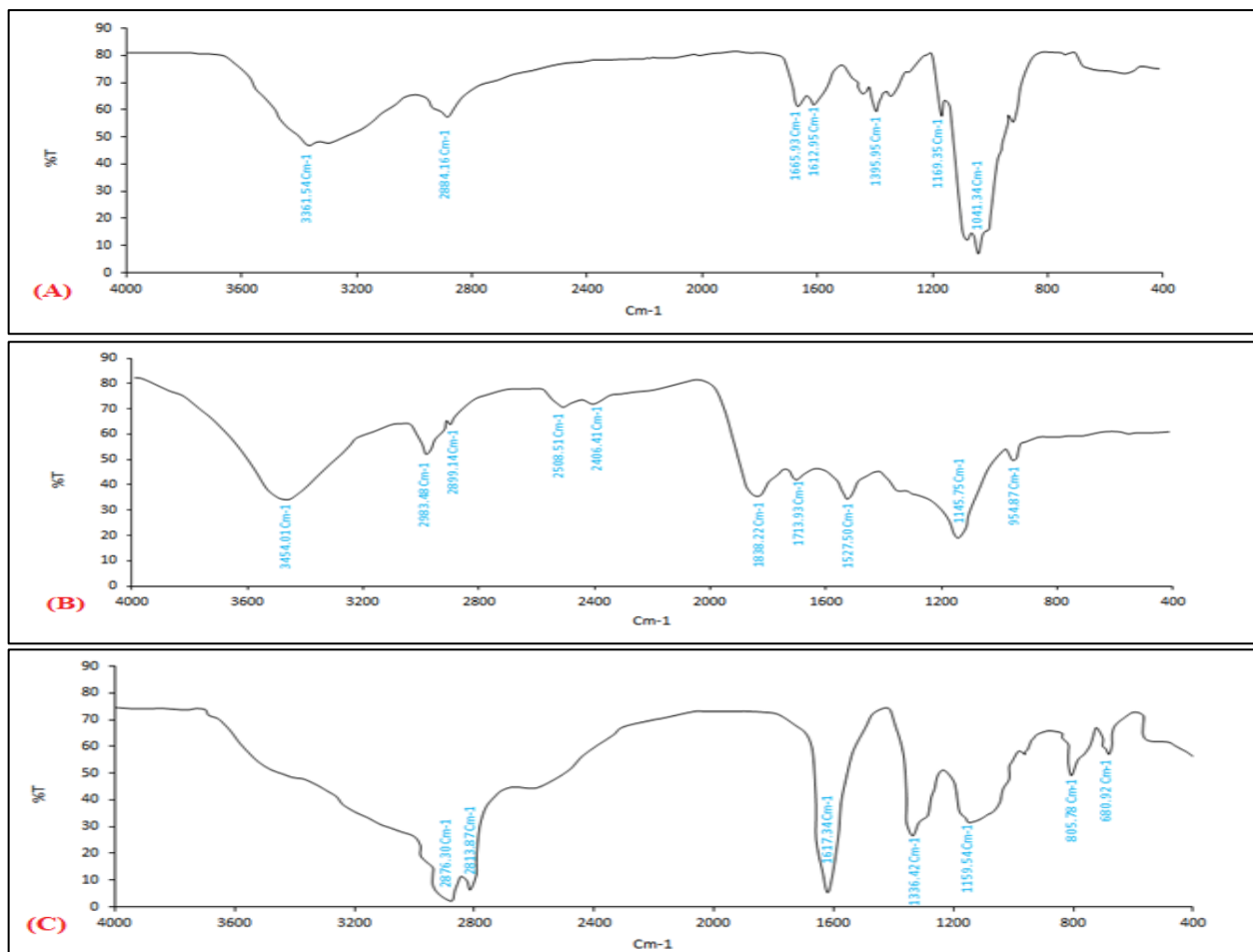
۳-۲- تحلیل گروه‌های عاملی (تشکیل پیوند) با FTIR

در طیف سنجی FTIR انرژی‌های پرتو مادون قرمز با انرژی‌های ارتعاشی مولکول‌ها منطبق می‌شوند و این انطباق باعث جذب انرژی اشعه الکترومغناطیس توسط نمونه می‌شوند. بنابراین با تغییر فرکانس اشعه در محدوده‌ای مشخص (مادون قرمز) طیفی بدست می‌آید که در برخی از طول موج‌ها مقدار عبور آن کاهش یافته و یا به عبارت بهتر توسط مولکول‌های ماده جذب شده است. بنابراین با بررسی فرکانس جذب هر طیف می‌توان به پیوندهای موجود در آن ماده پی‌برد. برای تحلیل گروه‌های عاملی این تحقیق از مطالعات Shahmoradi و همکاران (۲۰۲۳)، Nandiyanto و همکاران (۲۰۱۹)، Jung و همکاران (۲۰۱۸) و Gholizadeh و همکاران (۲۰۲۰)، استفاده شد [۳۴، ۳۵، ۳۶ و ۳۷] در طیف FTIR مربوط به نمونه کیتوزان (شکل ۲-a)، پیک ایجاد شده در عدد موج 3361 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای O-H و N-H در ساختارهای هیدروکسیلی و آمیدی می‌باشد. پیک قرار گرفته در عدد موج 1646 cm^{-1} و 1612 cm^{-1} نیز مربوط به ارتعاشات خمشی همین پیوندها است و پیک مربوط به ارتعاش کششی و خمشی C-H به ترتیب در عدد موج های 2884 cm^{-1} و 1395 cm^{-1} قرار گرفته است. همچنین پیک‌های ظاهر شده در عدد موج‌های 1163 cm^{-1} و 1041 cm^{-1} به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای C-N و C-O می‌باشد. شکل طیف FTIR مربوط به نمونه انار (شکل ۲-b)، نشان داد که در طیف FTIR مربوط به نمونه انار، پیک پدیدار شده در عدد موج 3454 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوند O-H و پیک‌های ظاهر شده در عدد موج‌های 2983 cm^{-1} و 2899 cm^{-1} به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن و متقارن پیوند C-H در ساختار آلifatیکی ماده است. پیک‌های مربوط به ارتعاشات گروه‌های آلکنی، کربونیلی و لاکتونی به ترتیب در عدد موج‌های 2508 cm^{-1} ، 2406 cm^{-1} و 1838 cm^{-1} قرار گرفته است.

همچنین پیک‌های ظاهر شده در عدد موج های 1713 cm^{-1} و 1527 cm^{-1} به ترتیب به ارتعاشات کششی پیوندهای C=O و C=C نسبت داده می‌شود. پیک‌های ظاهر شده در عدد موج‌های 1713 cm^{-1} و 1527 cm^{-1} به ترتیب به ارتعاشات کششی پیوندهای C=O و C=C نسبت داده می‌شود. پیک‌های پدیدار شده در عدد موج‌های 1145 cm^{-1} و 954 cm^{-1} نیز به ترتیب به ارتعاشات کششی پیوندهای C-OH و C-O-C نسبت داده می‌شود. شکل‌های به ترتیب طیف‌های FTIR مربوط به نمونه‌های CLA و ترکیبات زیست فعال انار به ترتیب شکل ۲-c و شکل ۲-d نشان داد که در طیف مربوط به CLA پیک‌های واقع شده در عدد موج‌های حدود 3500 cm^{-1} و 1617 cm^{-1} در طیف مربوط به نمونه ترکیبات زیست فعال انار پیک‌های واقع شده در عدد موج‌های 3498 cm^{-1} و 1692 cm^{-1} مجدداً به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی پیوند O-H موجود در ساختار هیدروکسیلی و ارتعاش کششی پیوند C=O در ساختار کربوکسیلی لینولیک اسید است. همچنین پیک‌های واقع شده در عدد موج‌های 2876 cm^{-1} و 2813 cm^{-1} در نمونه CLA و پیک واقع شده در 3018 cm^{-1} در نمونه زیست فعال انار به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن و متقارن پیوندهای C-H و ارتعاش خمشی پیوند C=C در ساختار آلifatیکی این اسید است. پیک‌های قرار گرفته در عدد موج‌های 1336 cm^{-1} و 1352 cm^{-1} به ترتیب در طیف‌های مربوط به نمونه CLA و زیست فعال انار مربوط به ارتعاش خمشی پیوند C-H است. پیک‌های قرار گرفته در عدد موج‌های 1107 cm^{-1} و 1159 cm^{-1} به ترتیب در طیف‌های مربوط به نمونه CLA و زیست فعال انار نیز مربوط به ارتعاش کششی پیوند C-OH است. پیک‌های واقع شده در عدد موج‌های 680 cm^{-1} و 61 cm^{-1} در نمونه CLA و همچنین 693 cm^{-1} و 794 cm^{-1} در نمونه زیست فعال انار نیز در هر دو نمونه مشترک بوده و مربوط به ارتعاشات رقاصکی 1 و گهواره‌ای 11 پیوندهای C-H در ساختار آلifatیکی این اسید چرب است. بنابراین

کربوکسیلی به ترتیب در عدد موج های 2505 cm^{-1} ، 2391 cm^{-1} و 1764 cm^{-1} قرار گرفته است که در طیف مربوط به انار نیز مشاهده شده بود. پیک های قرار گرفته در عدد موج های 1629 cm^{-1} و 1515 cm^{-1} نیز به ترتیب مربوط به ارتعاشات خمشی پیوندهای O-H و N-H موجود در ساختار کیتوزان است. همچنین پیک های قرار گرفته در عدد موج های 1071 cm^{-1} و 896 cm^{-1} نیز به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی پیوند C-O و ارتعاشات رقاصکی پیوند C-H است که در ساختارهای لینولینیک اسید و تانن موجود در زیست فعال انار موجود است. بنابراین وجود ساختارهای موجود در زیست فعال انار در کنار کیتوزان در این کامپوزیت قابل اثبات می باشد.

وجود این اشتراکات در هر دو طیف بیانگر برهمکنش موفقیت آمیز اسید لینولینیک با ترکیبات زیست فعال انار است. جهت بررسی صحت تشکیل کیتوزوم از آزمون FTIR استفاده شده و طیف حاصل مشاهده شد که در طیف FTIR مربوط به نمونه کیتوزوم (شکل ۲-e)، پیک ظاهر شده در عدد موج 3464 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای O-H و N-H است که در ساختار کیتوزان و ترکیبات زیست فعال موجود در انار موجود است. پیک های ظاهر شده در عدد موج های 2945 cm^{-1} و 2840 cm^{-1} به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن و متقارن پیوند C-H در ساختار آلیفاتیک لینولینیک اسید و دیگر ساختارهای موجود در زیست فعال انار و کیتوزان است. پیک های مربوط به ارتعاشات گروه های آلکنی، کربونیلی و



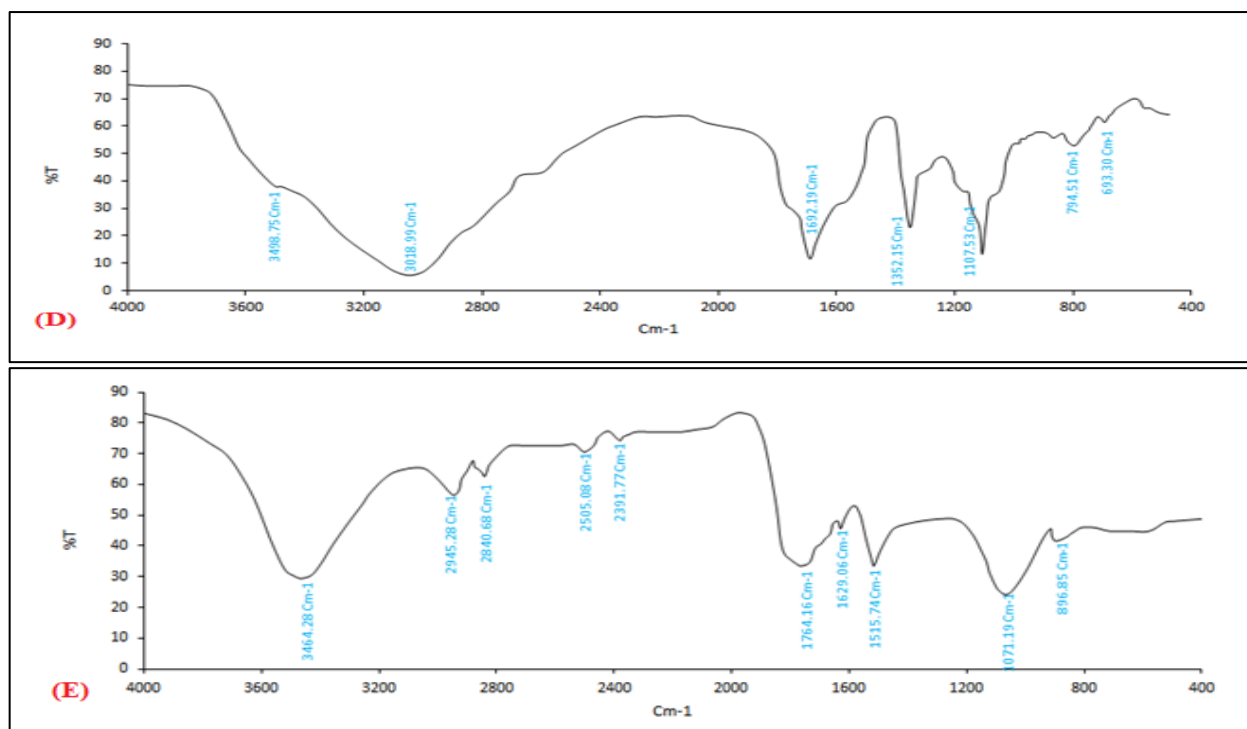


Fig 2. FTIR spectrum and approximate areas of different identified functional groups (A): Chitosan sample/ (B): Pomegranate sample/ (C): Linoleic acid/ (D): Pomegranate aqueous extract/ (E): Chitosome

نانوکتوزوم‌ها نامنظم بود که می‌تواند مربوط به حضور کیتوزان جذب شده روی سطح ترکیبات زیست فعال بستگی داشته باشد. علاوه بر این، کیتوزان آزاد ممکن است در طول فرآیند خشک کردن تجمعاتی تشکیل دهد. کیتوزان آزاد می‌تواند باعث ایجاد تعادل دینامیکی بین «شکل تجمعی» پلیمر زیستی و «شکل جذب‌شده» آن در اطراف ترکیبات زیست فعال شود. در واقع، کیتوزان خود به خود تجمع می‌یابد، بنابراین وقتی در محلول آبی رقیق می‌شود، نانو و ریزذرات می‌سازد، و فرآیند تجمع آن به شدت به وزن مولکولی کیتوزان و درجه استیل‌شدن بستگی دارد [۳۹]. نتایج بدست آمده با نتایج Nerli و همکاران (۲۰۲۳) مطابقت داشت. آن‌ها طی بررسی مورفولوژی کیتوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان شکل کروی کیتوزان‌ها و همگن و اندازه نانومتری آن‌ها را گزارش کردند [۴۰]. Hashemi و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند کیتوزوم‌های حاوی لینولئیک اسید حاوی لینولئیک اسید، اندازه کوچک ذرات کروی و همگن با سطح صاف را گزارش کردند [۴۱].

۳-۳- ویژگی ریخت‌شناسی^{۱۲}

ریخت‌شناسی عصاره خشک شده پوست انار به روش تصعیدی (شکل ۳)، نشان داد استفاده از امواج اولتراسونیک سبب تشکیل لندازه ذرات کوچک در حد نانومتر (بین محدوده ۴۸/۵۸۱ nm تا ۶۲/۲۱۴) شد. همچنین شکل شیشه مانند آمورف مشخصه ویژگی خشک کن انجمادی است در سطح عصاره‌ها مشاهده شد. عصاره ضایعات زیستی انار خشک شده منجمد فرم‌های پولکی با سطوح صاف را نشان دادند. نتایج Febriyenti و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند عصاره Haruan خشک شده با انجماد سطح صاف و مناطق آمورف پولکی داشتند [۳۸]. ورفولوژی کیتوزم نهایی تولید شده در شکل ۴ نشان داده شده است. وجود ذرات تقریباً کروی با اندازه نانومتری (۷۷/۶۶ nm و ۷۹/۹۰) را نشان داد. همچنین یکنواختی مشاهده شده در اندازه ذرات، توزیع مناسب اندازه ذرات را تأیید می‌کند. همچنین یکپارچگی در سیستم‌های نانوحامل، بدون وقوع جداسازی فاز، تجمع در نانوحامل‌ها مشاهده شد و نتایج نشان داد شکل

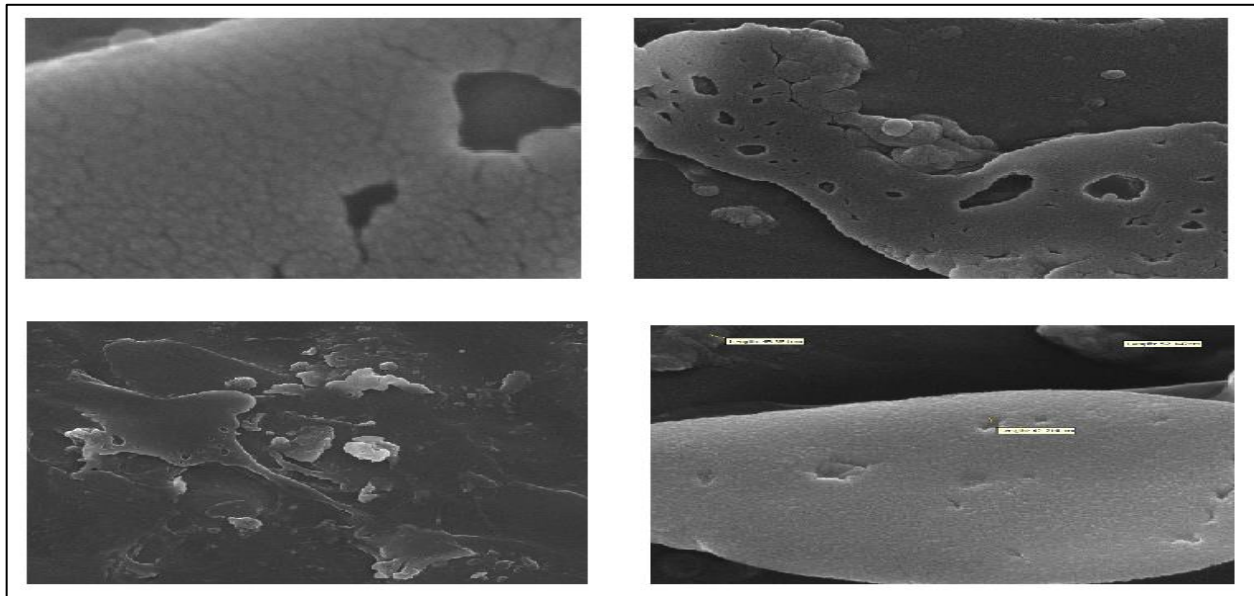


Fig 3. Morphology of dried pomegranate peel extract by sublimation method

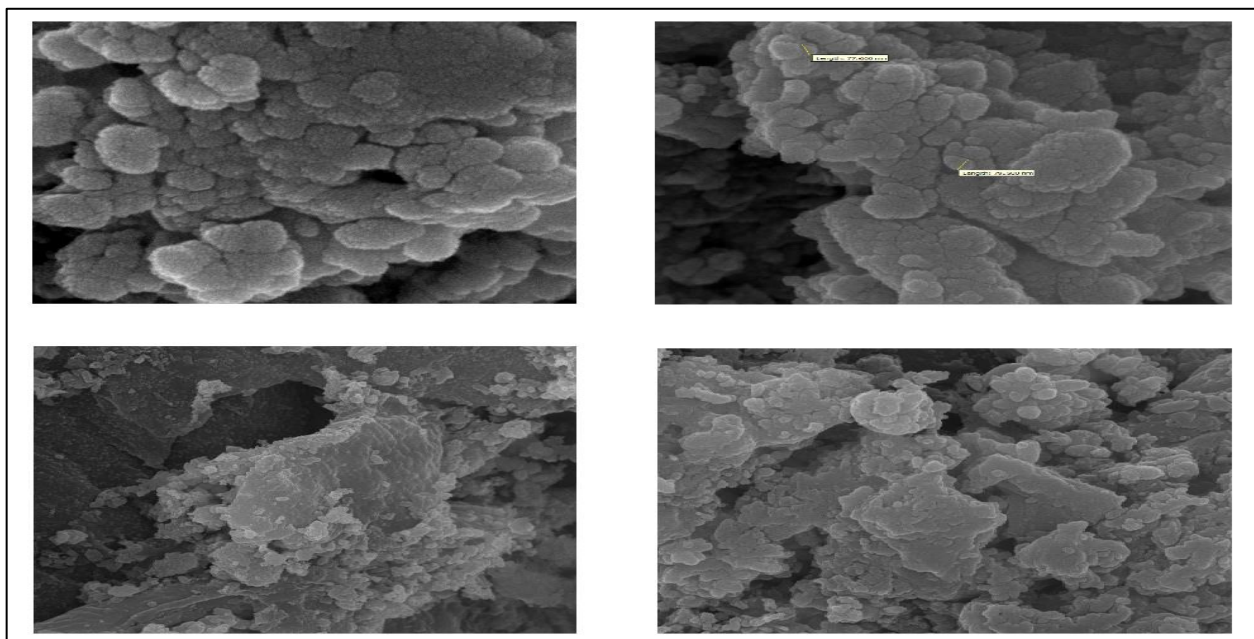


Figure 4- Morphology of produced chitosome

میکروارگانیزم‌ها و ماندگاری محصولات دارد زیرا می‌تواند مستقیماً بر ویژگی‌های حسی نوشیدنی‌ها تأثیر بگذارد [۴۲]. در جدول ۱ میزان pH و اسیدیته نوشیدنی‌های انرژی‌زا را نشان می‌دهند. مطابق با نتایج افزودن کیتوزم‌های تولید شده سبب افزایش معنادار pH (یا کاهش معنادار اسیدیته) نوشیدنی‌ها در مقایسه با نمونه شاهد شد. با این حال روند طی ۴۵ روز نگهداری کاهش معنادار pH (یا افزایش معنادار اسیدیته) در دو گروه مورد بررسی گزارش شد. مطالعات نشان داده که کاهش میزان pH در نمونه‌های نوشیدنی

۳-۵- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نوشیدنی انرژی‌زا فراسودمند

۳-۵-۱- pH و اسیدیته

نوشیدنی‌های انرژی‌زا، نوشیدنی‌هایی هستند که در محتوای خود به غیر از کالری، کافئین در ترکیب با سایر ترکیبات احتمالی افزایش دهنده انرژی مانند عصاره‌های گیاهی، ویتامین‌های گروه B نیز دارند. مطالعات نشان داده که pH نقش مهمی در تولید کارآمد، کنترل کیفیت، رشد

این مطالعه طی بررسی ویژگی‌های نوشیدنی انرژی‌زای خرما تحت تیمار با امواج فراصوت را نشان دادند [۴۲]. Selahvarzi و همکاران (۲۰۲۱) نیز نشان دادند عصاره دانه انار در نوشیدنی‌های کافئین‌دار سبب کاهش pH و افزایش اسیدیته نوشیدنی‌ها شد [۴۵].

انرژی‌زا می‌تواند به دلیل تشکیل محصولات اسیدی حاصل از واکنش میلارد و رشد میکروبی در حین انبارمانی باشد [۴۳]. کمتر بودن pH (بالاتر بودن اسیدیته) نمونه‌های غنی‌شده با کیتوزم‌ها را می‌توان به اسیدیته لینولئیک اسید و عصاره انار نسبت داد که می‌تواند به افزایش آزادسازی یون‌های هیدروژن در طی ذخیره‌سازی طولانی مدت نسبت داده شود [۴۴]. Fikry و همکاران (۲۰۲۳)، نیز روند ماشبه

Table 1- The results of the physicochemical characteristics of the functional energy drink during 45 days

parameter	Treatment	Shelf-life (Day)	
		1Day	45 Day
PH	Control	3.81 ± 0.00 ^{Aa}	3.45 ± 0.00 ^{Bb}
	Contain chitosome	3.30 ± 0.00 ^{Ab}	3.51 ± 0.03 ^{Ba}
Acidity	Control	0.55 ± 0.00 ^{Ba}	0.71 ± 0.00 ^{Aa}
	Contain chitosome	0.50 ± 0.00 ^{Bb}	0.69 ± 0.01 ^{Ab}

*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

*Different capital letters indicate significant differences between days ($p < 0.05$).

کدورت در این نمونه‌ها طی ۴۵ روز نگهداری مشاهده شد. این افزایش کدورت می‌تواند به دلیل رهائش ترکیبات از ساختار کیتوزم باشد. این بدان معنی است که کیتوزان یک عامل منعقد کننده / لخته‌ساز کارآمد برای شفاف کردن نوشیدنی‌ها است [۴۷]. در این راستا، مختاریان و همکاران [۱۹] نشان دادند که برهمکنش کافئین- پلی فنول یک عامل اصلی در تشکیل کرم چای سبز بوده که با افزایش ظاهر آبری در عصاره همراه است. کشک‌سرا و همکاران (۲۰۲۳) طی بررسی تولید نوشیدنی عملگرا برپایه ترکیبات زیست فعال چای سبز و قهوه سبز درهم تنیده در ساختار کیتوزوم نیز نتایج مشابه این تحقیق را نشان دادند [۲۵].

۳-۵-۲- کدورت

یکی از مهمترین فاکتورهای مؤثر در استفاده از نانوحامل‌های کلوییدی برای غنی‌سازی انواع غذای و بخصوص نوشیدنی‌های شفاف، بررسی میزان کدورت نانوحامل است. کدورت توسط مقادیر نور پخش‌شده توسط ذرات موجود در محیط سوسپانسیون تعیین می‌شود و به ماهیت، تعداد، اندازه کلوییدی ذرات موجود در فاز مایع و تفاوت در ضریب انعکاس ذرات و محیط سوسپانسیون و توزیع اندازه ذرات بستگی دارد [۴۶]. نتایج میزان کدورت نوشیدنی‌های انرژی‌زا نشان داد (شکل ۵) افزودن کیتوزوم در نوشیدنی‌ها سبب افزایش معنادار میزان کدورت در مقایسه با نمونه شاهد شد. همچنین روند افزایشی معنادار

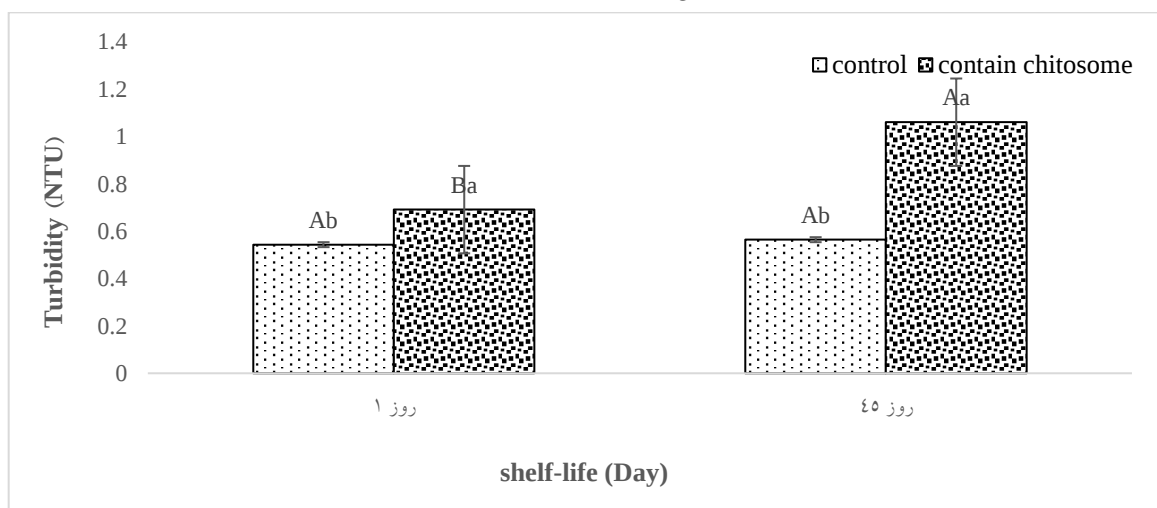
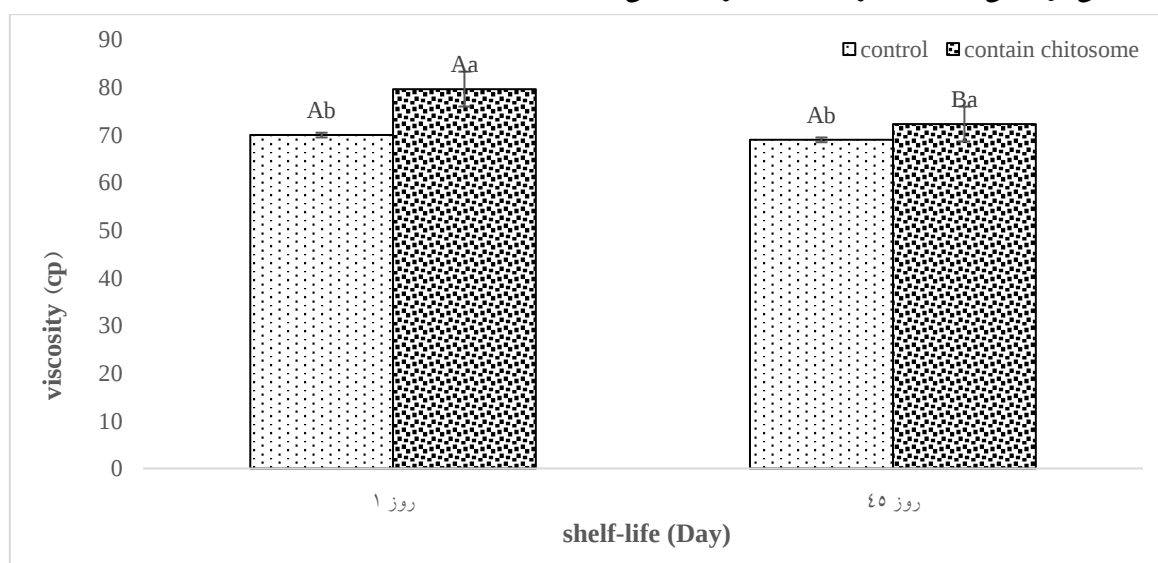


Fig 5. The results turbidity in the energy drink during 45 days*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).*Different capital letters indicate significant differences between days ($p < 0.05$).

بین زنجیره‌ها می‌شود که در افزایش ویسکوزیته نوشیدنی آشکار می‌شود [۴۲]. زنده‌بودی و همکاران (۲۰۱۹) نتایج مشابهی طی تولید نوشیدنی انرژی‌زا حاوی هیدروکلوئید زانتان و عصاره خرما نشان دادند [۴۹]. Elkot و همکاران (۲۰۲۴) نیز افزایش ویسکوزیته نوشیدنی انرژی‌زای ورزشی غنی شده با رز جلبک / اسپیرولینا پلاتنتیس^۳ نشان دادند [۵۰].

۳-۵-۳- ویسکوزیته

نتایج میزان ویسکوزیته نوشیدنی‌های انرژی‌زا (شکل ۶) نشان داد افزودن کیتوزوم‌ها افزایش معنادار میزان ویسکوزیته نوشیدنی‌ها در نمونه نوشیدنی انرژی‌زا طی زمان نگهداری مشاهده شد. این افزایش ویسکوزیته می‌تواند ناشی از نشت کیتوزوم‌های موجود در نوشیدنی‌ها در حین زمان انبارمانی باشد. این امر احتمالاً به دلیل وجود گروه‌های کربوکسیل بارهای منفی تولید می‌کنند که منجر به دافعه الکترواستاتیکی

**Fig 6. The results viscosity in the energy drink during 45 days***Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).*Different capital letters indicate significant differences between days ($p < 0.05$).

ادغام و زیکول‌های بی‌ثبات شده تکه تکه شدند [۵۱].

مطالعات نشان داده پوشش سطحی نانولیپوزوم‌ها یکی از راه‌حل‌های کارآمد برای بهبود پایداری نانولیپوزوم‌ها و افزایش زمان ماندن ترکیبات محصورشده در داخل نانو حامل هاست که برای افزایش کیفیت محصولات غذایی فرموله شده بسیار مورد توجه است Katouzian و همکاران (۲۰۲۱)، علت کاهش پایداری لیپوزوم‌ها را عصاره بارگذاری شده درون کیتوزوم‌ها گزارش کردند که ممکن است به فرآیند استولید کمک کند که در آن گروه‌های هیدروکسیل موجود در عصاره به گروه‌های حاوی O با بار منفی تغییر می‌یابند که به نوبه خود یونی / هیدروژن را

۳-۵-۳- دوفاز شدن

نتایج میزان دوفاز شدن نوشیدنی‌های انرژی‌زا (شکل ۷) نشان دادند افزودن کیتوزوم تولید شده سبب افزایش معنادار میزان دوفاز شدن نوشیدنی‌ها در مقایسه با نمونه شاهد شد. درحالی‌که هیچ دوفاز شدنی در نمونه‌های شاهد مشاهده نشد. نتایج نشان دهنده ناپایداری کیتوزوم‌ها در طول زمان است. این نتایج را می‌توان به عنوان پیامد شکستگی لیپوزوم‌های فراصوتی توضیح داد که در غیاب یک محافظ انجمادی خشک شده بودند، بنابراین، ساختارهای ضعیفی را ایجاد می‌کردند که در طول زمان و در نتیجه تجمع و

می‌توان به دافعه الکترواستاتیکی بین کیتوزوم‌های دارای بار مثبت و تمایل کم نانوذرات به رسوب به دلیل کاهش وزن مولکولی آن‌ها نسبت داد [۵۲]. Peng و همکاران (۲۰۱۸)، نیز نشان دادند هنگامیکه نانوحامل‌ها در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها استفاده می‌شوند، ممکن است واکنش‌های تداخلی را در بین اجزای غذا تحریک کنند. علاوه بر این، نشت مواد هسته و همچنین تجمع می‌تواند در طول زمان ذخیره‌سازی رخ دهد و باعث کاهش کیفیت ماتریس مواد غذایی شود [۵۳].

تشکیل می‌دهند. با گروه‌های دارای بار مثبت قسمت سر فسفولیپیدها متصل می‌شود که منجر به فرآیند رسیدن استوالد می‌شود. یک توضیح احتمالی برای تقویت پایداری ممکن است تشکیل یک سد با بار مثبت توسط کیتوزان بر روی نانولیپوزوم‌ها باشد که هم پایداری اکسیداتیو و هم پایداری فیزیکی شبکه را افزایش می‌دهد. این واقعیت تشکیل رادیکال‌های آزاد را محدود می‌کند و در نتیجه از تخریب فسفولیپیدها جلوگیری می‌کند. علت دیگر ناپایداری کیتوزوم‌ها را می‌توان به اندازه نانو ذرات حاصل شده نسبت داد در هنگام تشکیل نانوذرات با قطر کم به تشکیل یک شبکه نسبتاً همگن می‌گردد در نتیجه، افزایش پایداری را

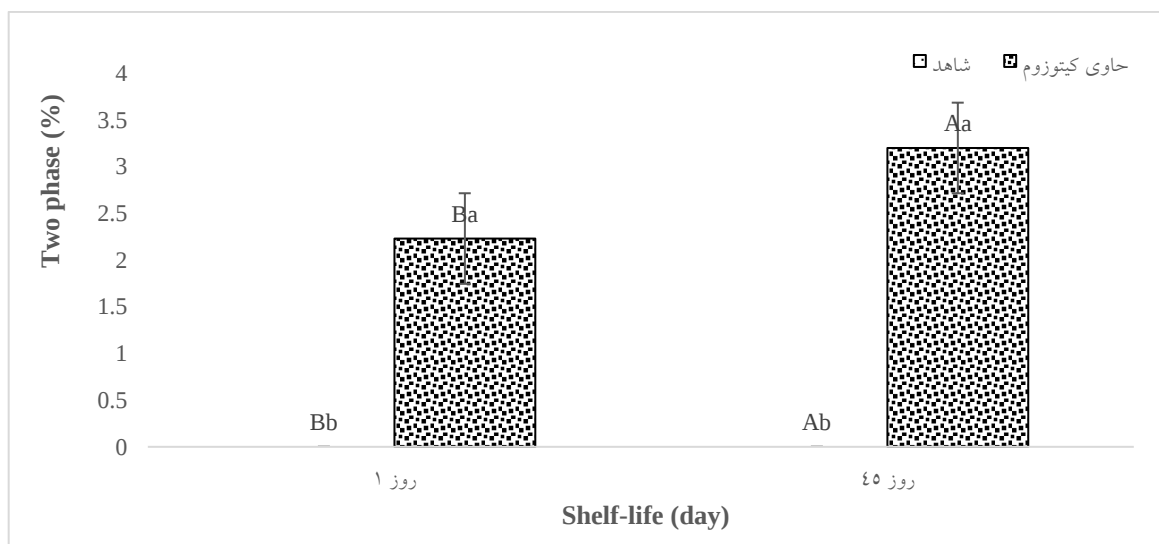


Fig 7. The results of two phase in the energy drink during 45 days

*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

*Different capital letters indicate significant differences between days ($p < 0.05$).

پوست لنار به عنوان ماده موثره بر رنگ نوشیدنی یعنی آنتوسیانین‌های عصاره باشد که این امر را می‌توان با اثر بازدارندگی آن‌ها بر روی آنزیم‌ها، به ویژه بر روی O-دیفنول اکسیداز توضیح داد [۵۴]. همچنین نتایج نشان داد طی ۴۵ روز نگهداری تغییرات رنگ در نمونه نوشیدنی انرژی‌زای حاوی کیتوزم بطور معناداری بالاتر بود. Sami و همکاران (۲۰۲۱) نیز نتایج مشابهی طی افزودن عصاره پوست انار بر رنگ شیر نشان دادند [۵۴]. افزایش زردی نوشیدنی‌های انرژی‌زا فراسودمند طی ۴۵ روز نگهداری نیز مشاهده شد

۳-۶- رنگ

شاخص رنگ یکی از مهمترین پارامترها در پذیرش محصول توسط مصرف کننده است. نتایج شاخص روشنایی نمونه‌های نوشیدنی انرژی‌زا (جدول ۲) نشان دهنده کاهش میزان روشنایی نمونه‌ها با افزودن کیتوزم بود که می‌تواند به دلیل رنگ زرد لستین سویای استفاده شده در این محصولات باشد. این کاهش شاخص روشنایی در طول زمان می‌تواند به دلیل دما و نور محیط باشد که اجزای مرتبط با رنگ نوشیدنی، معمولاً فلاونوئیدها را تخریب می‌کند. افزایش شاخص قرمزی می‌تواند به دلیل رنگ عصاره

Table 2- The results of the color value of the functional energy drink during 45 days

parameter	Treatment	Shelf-life (Day)	
		1 Day	45 Day
L*	Control	54.43 ± 0.25 ^{Aa}	53.89 ± 0.16 ^{Ba}
	Contain chitosome	52.54 ± 0.32 ^{Ab}	51.38 ± 0.05 ^{ABa}
a*	Control	14.88 ± 0.02 ^{Ba}	15.12 ± 0.09 ^{Aa}
	Contain chitosome	13.10 ± 0.07 ^{Bb}	15.469 ± 0.30 ^{Ab}
b*	Control	16.56 ± 0.04 ^{Ba}	17.04 ± 0.10 ^{Ab}
	Contain chitosome	15.77 ± 0.04 ^{Bb}	17.70 ± 0.23 ^{Aa}
ΔE	Control	0.00 ± 0.00 ^{Ba}	0.75 ± 0.27 ^{Ab}
	Contain chitosome	0.00 ± 0.00 ^{Bb}	3.26 ± 0.38 ^{Aa}

*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

*Different capital letters indicate significant differences between days ($p < 0.05$).

در نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد در تمام گروه‌های مورد بررسی، محتوی فنلی طی ۴۵ روز نگهداری کاهش یافت. احتمالاً این حلت به دلیل تخریب ترکیبات پلی‌فنولی رهائش یافته در محیط نوشیدنی و اثرات تخریبی شرایط نگهداری محیطی می‌باشد [۵۸]. همراستا با نتایج بدست آمده، Seyedabadi و همکاران (۲۰۲۱)، طی بررسی میزان رهائش کافئین در ۳۷ درجه سانتی‌گراد از کیتوزوم در محیط شبیه‌سازی شده آبمیوه نشان دادند که رهائش ناگهانی کافئین از ساختار کیتوزوم در محیط شبیه‌سازی شده آبمیوه، به دلیل متورم شدن ساختار ناشی از نفوذ محیط شبیه‌ساز و متعاقباً رهائش کافئین سطح نانو ذرات است [۲۰]. همچنین Liu و همکاران (۲۰۱۷) طی بررسی رهائش نانوذرات کیتوزان حاوی پلی‌فنول‌های چای مخلوط شده با فیلم ژلاتین در محیط‌های شبیه‌ساز چربی ۵۰ و ۹۵ درصد اتانول نشان دادند که رهائش ترکیبات پلی‌فنولی در محیط ۵۰ درصد نسبت به محیط ۹۵ درصد به دلیل افزایش دو برابری ضریب نفوذ، سریعتر بود [۵۹].

۳-۷- نتایج فنل کل

ترکیبات زیست‌فعال (شامل کاروتنوئیدها، اسانس‌های روغنی، آنتی‌اکسیدان‌ها یا طعم‌دهنده‌ها) گروهی از مواد شیمیایی با ویژگی‌های سلامتی‌بخش، دارویی و تغذیه‌ای بوده که به‌طور گسترده‌ای در فرآورده‌های غذایی به‌منظور ارتقاء ویژگی‌های حسی یا توسعه خصوصیات غذا دارویی آن‌ها به‌کار می‌رود [۵۵]. مطابق نتایج ارائه شده در شکل ۸ مدت زمان و درجه حرارت نگهداری تأثیر معناداری بر محتوی فنل نمونه‌ها نشان داد. بالاترین میزان ترکیبات فنولی کل (متناظر با بیشترین نرخ رهائش ترکیبات فنولی) موجود در محیط نوشیدنی، در نوشیدنی‌های نگهداری شده در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد طی ۴۵ روز نگهداری مشاهده شد. این امر احتمالاً این حلت به دلیل کاهش مقاومت دیواره کیتوزوم (متناظر با کاهش سیالیت غشاء) و در نتیجه رهائش ترکیبات فنولی می‌باشد [۲۰]. همچنین نتایج محتوی کل نمونه‌های نوشیدنی نگهداری شده در دماهای ۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد کمترین محتوی فنلی در نمونه نگهداری شده در دمای ۵ درجه و بعد از آن

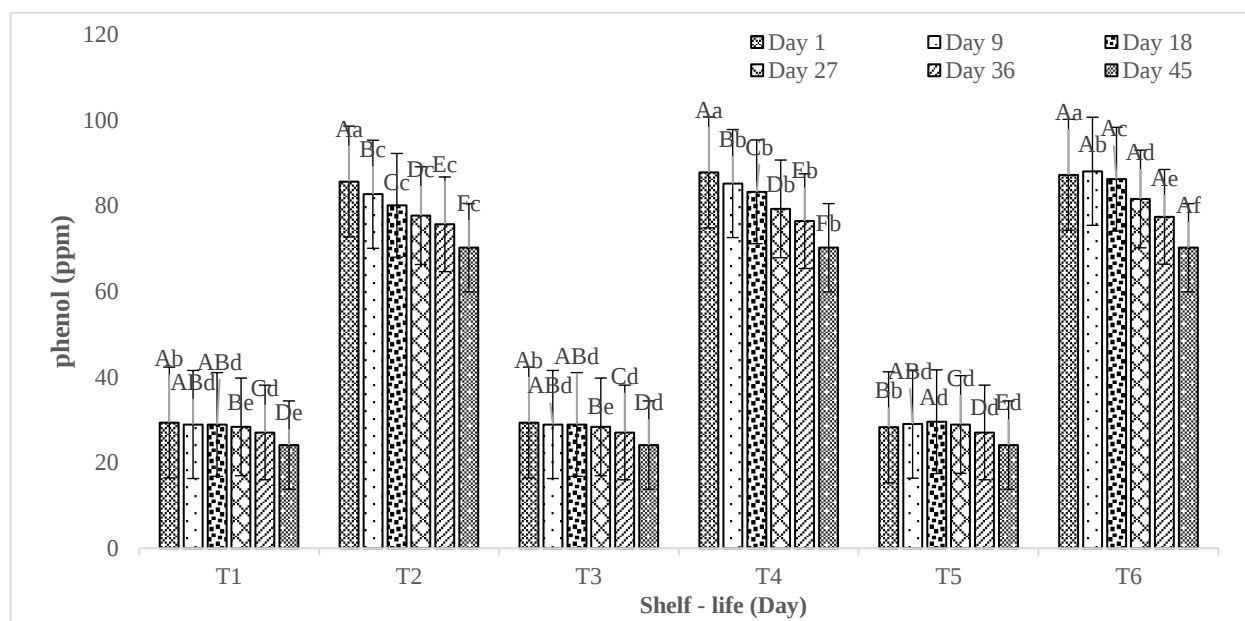


Fig 9. The results of phenol in the energy drink during 45 days

*T1: control sample kept at 5°C/ T1: sample containing chitosome kept at 5°C/ T3: control sample kept at 25°C/ T4: sample containing chitosome kept at a temperature of 25°C/ T5: control sample kept at a temperature of 45°C/ T6: a sample containing chitosome kept at a temperature of 45°C

*Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

*Different capital letters indicate significant differences between days ($p < 0.05$).

۷۹/۹۰) با یکنواختی مشاهده شده در اندازه ذرات، توزیع

مناسب اندازه ذرات را تأیید می‌کند. طی بررسی نتایج نوشیدنی‌های انرژی‌زا فراسودمند، افزایش معنادار pH (یا کاهش معنادار اسیدیته) با افزودن نانو کیتوزوم‌ها، افزایش معنادار ویسکوزیته و کدورت در نوشیدنی‌های انرژی‌زا فراسودمند مشاهده شد. همچنین ناپایداری کیتوزوم‌ها در طول دوره نگهداری، افزایش معنادار دوفاز شدن نوشیدنی‌ها را نشان داد. کاهش معنادار روشنایی، افزایش معنادار شاخص قرمزی و زردی نوشیدنی‌ها حاوی نانوکیتوزوم‌ها و نیز افزایش معنادار محتوی فنولی نوشیدنی‌های انرژی‌زا غنی شده مشاهده شد. بنابراین نانو کیتوزوم‌های حاوی تانن-اسید لینولئیک کنژوگه می‌تواند یک سیستم رهایش بالقوه برای مولکولی فعال زیستی به عنوان مکمل‌های غذایی و افزایش ایمنی مواد غذایی باشند.

۴- نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، نوشیدنی انرژی‌زا حاوی ریز ذرات کیتوزوم درهم تنیده شده با ترکیبات زیست فعال تانن-اسید لینولئیک کنژوگه پرداخته شد. پاداری اکسایشی اسید لینولئیک، گروه‌های عاملی با طیف‌سنجی FTIR، پراش اشعه ایکس کیتوزوم‌ها و ریخت‌شناسی آن‌ها بررسی شد و در نهایت ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (pH، اسیدیته، کدورت، دوفاز شدن و ویسکوزیته) و شاخص رنگ (L^* ، a^* و b^*) و محتوی فنل کل نوشیدنی‌ها در شرایط دمایی ۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی ۴۵ روز نگهداری پایش شد. ارزیابی کیفی ریز کپسول کیتوزوم بهینه وجود این اشتراکات در طیف‌های FTIR بیانگر پوشش‌دهی موفقیت آمیز زیست فعال تانن-اسید لینولئیک درون کیتوزان بود. بررسی مورفولوژی عصاره یخ زده‌ی ضایعات زیستی انار استخراج شده به کمک امواج اولتراسونیک تشکیل اندازه ذرات کوچک در حد نانومتر (بین محدوده ۴۸/۵۸ nm تا ۶۲/۲۱۴) به شکل شیشه مانند را نشان داد. همچنین وجود ذرات تقریباً کروی کیتوزان با اندازه نانومتری (۷۷/۶۶ nm و

ه-منابع

- [1] Arjeh, E., Khodaei, S. M., Barzegar, M., Pirsai, S., Karimi Sani, I., Rahati, S., & Mohammadi, F. (2022). Phenolic compounds of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Separation method, chemical characterization, and biological properties. *Food Science & Nutrition*, 10(12), 4238-4246.
- [2] Badawy, S., Liu, Y., Guo, M., Liu, Z., Xie, C., Marawan, M. A., ... & Martínez, M. A. (2023). Conjugated linoleic acid (CLA) as a functional food: Is it beneficial or not?. *Food Research International*, 113158.
- [3] Nasrollahzadeh, A., Tavani, S. M., Arjeh, E., & Jafari, S. M. (2023). Production of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria; important factors and optimum conditions. *Food Chemistry: X*, 100942.
- [4] Costantino, A., Maiese, A., Lazzari, J., Casula, C., Turillazzi, E., Frati, P., & Fineschi, V. (2023). The dark side of energy drinks: a comprehensive review of their impact on the human body. *Nutrients*, 15(18), 3922.
- [5] Ain, H. B. U., Tufail, T., Bashir, S., Ijaz, N., Hussain, M., Ikram, A., ... & Saewan, S. A. (2023). Nutritional importance and industrial uses of pomegranate peel: A critical review. *Food Science & Nutrition*, 11(6), 2589-2598.
- [6] Tehranifar. and weaponization, Y. (2006). Location of pomegranate in Iran. *The second desert ruby pomegranate festival*. [in Persian].
- [7] Ko, K., Dadmohammadi, Y., & Abbaspourrad, A. (2021). Nutritional and bioactive components of pomegranate waste used in food and cosmetic applications: A review. *Foods*, 10(3), 657.
- [8] Akuru, E. A., Chukwuma, C. I., Oyeagu, C. E., Mpendulo, T. C., & Lewu, F. B. (2023). Potential Relevance of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel in the Nutrition, Health, and Quality Products of Poultry. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 13(4), 627-646.
- [9] Gomes, P. W. P., Gomes, E. R. S., Carvalho, A. R., Mannocho-Russo, H., Leão, T. F., Reis, J. D. E., ... & da Silva, M. N. (2023). Characterization of a tetrameric proanthocyanidin in *Stryphnodendron pulcherrimum* and an overview on potential health benefits of condensed tannins via interaction with gut microbiota. *Journal of Functional Foods*, 109, 105801.
- [10] Tavakolipour, H., & Mokhtarian, M. (2023). Production of functional beverage based on cross-linked bioactive compounds of green tea and green coffee in chitosome structure. *Journal of food science and technology (Iran)*, 19(133), 79-89.
- [11] Shaddel, R., & Rajabi-Moghaddam, S. (2024). Encapsulation of caffeine in chitosan-coated nanoliposomes and its application in drink formulation. *Food Hydrocolloids*, 149, 109598.
- [12] Ramli, N. A., Ali, N., & Hamzah, S. (2019). Indo-Malayan Stingless Bees' Propolis Extract-Loaded Chitosomes: Characterization and Storage Stability Evaluation. *International Journal of Recent Technology and Engineering*, 7(6), 560-567.
- [13] da Silva, N. C., Assis, O. B. G., de Oliveira Sartori, A. G., de Alencar, S. M., & Martelli-Tosi, M. (2022). Chitosan suspension as extractor and encapsulating agent of phenolics from acerola by-product. *Food Research International*, 161, 111855.
- [14] Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. (2020). In situ production of conjugated linoleic acid by *Bifidobacterium lactis* BB12 and *Lactobacillus acidophilus* LA5 in milk model medium. *LWT*, 132, 109933.
- [15] Kodchasee, P., Pharin, N., Suwannarach, N., Unban, K., Saenjum, C., Kanpiengjai, A., ... & Khanongnuch, C. (2023). Assessment of Tannin Tolerant Non-Saccharomyces Yeasts Isolated from Miang for Production of Health-Targeted Beverage Using Miang Processing Byproducts. *Journal of Fungi*, 9(2), 165.
- [16] AOAC. (1998). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA.
- [17] Tavakolipour, H., Mokhtarian, M., & Kalbasi-Ashtari, A. (2017). Lipid oxidation kinetics of pistachio powder during different storage conditions. *Journal of food process engineering*, 40(3), e12423.
- [18] Rajha, H. N., Koubaa, M., Boussetta, N., Maroun, R. G., Louka, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2020). Selective ultrasound-assisted aqueous extraction of polyphenols from pomegranate peels and seeds. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(7), e14545.
- [19] Mokhtarian, M. O. H. S. E. N., Tavakolipour, H., Jafari Savareh, S., & Amiri, M. (2014). Determination of optimal parameters to extraction and formulation of functional drink from green tea and determining its physicochemical and rheological properties. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 3(1), 51-66. [in Persian].
- [20] Seyedabadi, M. M., Rostami, H., Jafari, S. M., & Fathi, M. (2021). Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine. *Food bioscience*, 40, 100857.
- [21] Meng, R., Wu, Z., Xie, Q. T., Cheng, J. S., & Zhang, B. (2021). Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: Physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties. *Food Chemistry*, 340, 127893.
- [22] Yang, L., Cao, Y., Chen, J. N., & Chen, Z. Y. (2009). Oxidative stability of conjugated linolenic

acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4212-4217.

[23] ISIRI. (2007). Fruit juices – Test methods. Institute of Standards and Industrial Research of Iran No2685. [In Persian]

[24] HOJJATI, M., Jafari, S., & Noshad, M. (2018). Effect of Xanthan Gum and Soluble Soybean Polysaccharide on Characteristics of Functional Flixweed (*Descurainia Sophi L.*) Syrup. *Food Processing and Preservation Journal*, 10(2), 63-80. [in Persian].

[25] Kashksara, K. M., Tavakolipour, H., & Mokhtarian, M. (2023). Effects of atmospheric-thermosonication process on phenolic compounds extraction, extraction productivity and antioxidant activity of freeze-dried green tea and green coffee aqueous extracts. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100582.

[26] Yang, L., Leung, L. K., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2000). Oxidative stability of conjugated linoleic acid isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3072-3076.

[27] Drinić, Z., Mudrić, J., Zdunić, G., Bigović, D., Menković, N., & Šavikin, K. (2020). Effect of pomegranate peel extract on the oxidative stability of pomegranate seed oil. *Food Chemistry*, 333, 127501.

[28] Burits, M., & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, 14(5), 323-328.

[29] Keshvari Fard, F., Mokhtarian, M., & Tavakolipour, H. (2020). Evaluation of the effects of peppermint essential oil (*Mentha piperita*) on oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 12(1), 81-94. [in Persian].

[30] Zhang, A., & Chen, Z. Y. (1997). Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1611-1613.

[31] Carvalho Filho, J. M. (2014). Pomegranate seed oil (*Punica granatum L.*): a source of punicic acid (conjugated α -linolenic acid). *J Human Nutri Food Sci*, 2(1), 1-11.

[32] Zhang, A., & Chen, Z. Y. (1997). Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1611-1613.

[33] Shayanmehr, M. R., Elhamirad, A. H., & Armin, M. (2021). Optimization of conjugated linoleic acid (Cla) synthesis conditions applying it in milk enrichment. *J Res Innov Food Sci Technol*, 9, 375-88.

[34] Shahmoradi, A. R., Bejandi, M. S., Rasanani, E. H., Javidparvar, A. A., & Ramezanzadeh, B. (2023). Graphene oxide nano-layers functionalized/reduced by L-Citrulline/Pectin bio-molecules for epoxy nanocomposite coating mechanical properties reinforcement. *Progress in Organic Coatings*, 178, 107493.

[35] Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1), 97-118.

[36] Jung, M. R., Horgen, F. D., Orski, S. V., Rodriguez, V., Beers, K. L., Balazs, G. H., ... & Lynch, J. M. (2018). Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. *Marine pollution bulletin*, 127, 704-716.

[37] Gholizadeh, E., Belibel, R., Bachelart, T., Bounadji, C., & Barbaud, C. (2020). Chemical grafting of cholesterol on monomer and PDMMLA polymers, a step towards the development of new polymers for biomedical applications. *RSC advances*, 10(54), 32602-32608.

[38] Febriyenti, M. N., Mohamed, N., Hamdan, M. R., Salleh, S. N. M., & Baie, S. B. B. (2014). Comparison of freeze drying and spray drying methods of haruan extract. *Int J Drug Deliv*, 6(3), 286-91.

[39] Scurti, E., Martins, J. P., Celia, C., Palumbo, P., Lombardi, F., Iannotta, D., ... & Viitala, T. (2023). In Vitro Characterization and Real-Time Label-Free Assessment of the Interaction of Chitosan-Coated Niosomes with Intestinal Cellular Monolayers. *Langmuir*, 39(23), 8255-8266.

[40] Nerli, G., Robla, S., Bartalesi, M., Luceri, C., D'Ambrosio, M., Csaba, N., & Maestrelli, F. (2023). Chitosan coated niosomes for nose-to-brain delivery of clonazepam: formulation, stability and permeability studies. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 6, 100332.

[41] Hashemi, F. S., Farzadnia, F., Aghajani, A., Ahmadzadeh NobariAzar, F., & Pezeshki, A. (2020). Conjugated linoleic acid loaded nanostructured lipid carrier as a potential antioxidant nanocarrier for food applications. *Food Science & Nutrition*, 8(8), 4185-4195.

[42] Fikry, M., Yusof, Y. A., Al-Awaadh, A. M., Baroyi, S. A. H. M., Ghazali, N. S. M., Kadota, K., ... & Al-Ghamdi, S. (2023). Assessment of Physical and Sensory Attributes of Date-Based Energy Drink Treated with Ultrasonication: Modelling Changes during Storage and Predicting Shelf Life. *Processes*, 11(5), 1399.

[43] Davídek, T., Robert, F., Devaud, S., Vera, F. A., & Blank, I. (2006). Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: Formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative α -dicarbonyl cleavage pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(18), 6677-6684.

[44] Akubor, P. I. (1996). The suitability of African bush mango juice for wine production. *Plant Foods for Human Nutrition*, 49, 213-219.

[45] Selahvarzi, A., Ramezan, Y., Sanjabi, M. R., Mirsaedghazi, H., Azarikia, F., & Abedinia, A. (2021). Investigation of antimicrobial activity of orange and pomegranate peels extracts and their use as a natural preservative in a functional

beverage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 5683-5694.

[46] Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 391, 95-102.

[47] Bindes, M. M. M., Reis, M. H. M., Cardoso, V. L., & Boffito, D. C. (2019). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from green tea leaves and clarification with natural coagulants (chitosan and Moringa oleifera seeds). *Ultrasonics sonochemistry*, 51, 111-119.

[48] Cardozo, C. J. M., Castañeda, C. A. J., & Ripoll, C. S. S. (2017). Development of mango (*Mangifera indica* L.) energy drinks. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 70(1), 8115-8121.

[49] Zendeboodi, F., & Ghollan, H. M. (2019). Optimization of formulation of energetic soft drink containing natural sweetener and whey protein using mixture design-extreme vertices. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(89), 113-123. [in Persian].

[50] Elkot, W. F., Elmahdy, A., Talaat, H., Alghamdia, O. A., Alhag, S. K., Al-Shahari, E. A., ... & Ismail, H. A. (2024). Development and characterization of a novel flavored functional fermented whey-based sports beverage fortified with *Spirulina platensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 258, 128999.

[51] Iida, A. S. L., Luz, K. N., Barros-Alexandrino, T. T., Fávaro-Trindade, C. S., Pinho, S. C. D., Assis, O. B. G., & Martelli-Tosi, M. (2020). Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. *Polímeros*, 29.

[52] Katouzian, I., & Taheri, R. A. (2021). Preparation, characterization and release behavior of

chitosan-coated nanoliposomes (chitosomes) containing olive leaf extract optimized by response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 3430-3443.

[53] Peng, S., Zou, L., Liu, W., Liu, C., & McClements, D. J. (2018). Fabrication and characterization of curcumin-loaded liposomes formed from sunflower lecithin: Impact of composition and environmental stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(46), 12421-12430.

[54] Sami, R., Khojah, E., Alharbi, M., AM Al-Mushhin, A., Saeed Alkaltham, M., Mohammad Salamatullah, A., ... & Helal, M. (2021). Functional effects of pomegranate peel extracts on milk: Antibacterial measurements, antioxidant activities, and photochemical characterizations. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 15(5), 571-579.

[55] Shabani, M., Mokhtarian, M., Kalbasi-Ashtari, A., & Kazempoor, R. (2021). Effects of extracted propolis (*Apis mellifera*) on physicochemical and microbial properties of rainbow-trout fish burger patties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(12), e16027.

[58] Tai, K., Rappolt, M., Mao, L., Gao, Y., Li, X., & Yuan, F. (2020). The stabilization and release performances of curcumin-loaded liposomes coated by high and low molecular weight chitosan. *Food Hydrocolloids*, 99, 105355.

[59] Liu, F., Avena-Bustillos, R. J., Chiou, B. S., Li, Y., Ma, Y., Williams, T. G., ... & Zhong, F. (2017). Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/nanoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants. *Food Hydrocolloids*, 62, 212-221.



Scientific Research

Feasibility of producing a functional energy drink containing tannin-linoleic acid conjugated chitosome

Morteza Jamshid Eini¹, Hamid Tavakolipour^{*2}, Rezvan Mosavi Nadoshan³, Mohsen Mokhtarian⁴

1-Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2 -Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3 -Department of Food Science and Technology, Faculty of Biological Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

4 -Department of Food Science and Technology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2024/5/25

Accepted: 2024/9/30

Keywords:

conjugated linoleic acid,
tannin,
chitosome,
pomegranate peel extract,
sports drink

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.99.

*Corresponding Author E-
tavakolipour@gmail.com

Nowadays, due to the interest in consuming extra-beneficial foods and the increasing spread of cardiovascular diseases, the desire to consume extra-beneficial products has increased. Therefore, researchers are looking for the optimization of new formulations of products with practical features in this direction. The study aimed to produce a functional energy drink containing tannin-linoleic acid-conjugated chitosome. After extracting bioactive compounds (especially tannin) from pomegranate peel, they were included in the structure of chitosomes along with conjugated linoleic acid. The results showed the significant effect of different concentrations of pomegranate biological extract on the oxidative stability of linoleic acid. The results showed the significant effect of different concentrations of pomegranate biological extract on the oxidative stability of linoleic acid. The examination of nano-chitosome groups showed the presence of structures in pomegranate bioactive along with linoleic acid in chitosomes. The uniformly chitosan spherical particles were observed with sizes of 77.66 and 79.90 nm. The addition of nano chitosomes showed a significant increase in pH (decrease in acidity), increase in turbidity, viscosity, two phases, and phenolic content. Also, a decrease in the L^* value and an increase in a^* and b^* values were reported. The present results showed that biopolymers play a key role in the stability of the liposome membrane structure. They have a stable release of molecules trapped by a spatial barrier on the surface. This nano chitosome will provide a potential platform for the carrier's design for nutrients or preservatives, to increase the shelf life and safety of food matrices.



فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی نانوامولسیون اسانس گشنیز در عصاره آلوئه‌ورا

نرگس شریفیات^۱، محمد امین مهرنیا^{۲*}، حسن برزگر^۲، بهروز عزیزاده بهبهانی^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع

طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

پژوهش حاضر در پاسخ به نیاز جدید مصرف‌کنندگان و صنعت غذا در تولید و معرفی افزودنی‌های جدید و طبیعی برای حفظ محصولات غذایی و افزایش کیفیت آن‌ها از لحاظ مختلف انجام گرفته است. نانوامولسیون تولیدشده به روش فراصوت، شامل قطرات پراکنده اسانس گشنیز با اندازه ذرات نانو در عصاره آبی آلوئه‌ورا بود. هر دو این ترکیبات به صورت مجزا مورد آزمون قرار گرفته و فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آن‌ها ثابت شده است. میزان فنل و فلاونوئید کل به ترتیب ۳۳/۵۳ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم و ۶۵۷/۳۳ میلی گرم کوئرستین در هر گرم بود. امولسیون تولید شده در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۷۳/۷۰ و ۷۱/۳۰ درصد اثر مهار بر رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS داشت. چهار آزمون میکروبی شامل دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی روی نانوامولسیون انجام شد. هاله‌های به دست آمده در آزمون دیسک دیفیوژن همگی قطر کم‌تر از ۱۰ میلی متر داشتند که مشابه با نتایج آزمون چاهک آگار بود. آزمون‌های حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی انجام گرفته نیز نشان داد که این محصول دارای اثر مهار روی تمامی باکتری‌های بیماری‌زا بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی نشان داد که برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* برابر با ۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود اما برای سایر باکتری‌های بیماری‌زا بزرگتر از ۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. تمامی ۴ آزمون نشان‌دهنده اثر قوی‌تر روی باکتری‌های گرم مثبت مورد استفاده نسبت به گرم منفی‌ها بود. در نهایت نانوامولسیون اسانس گشنیز در عصاره آبی آلوئه‌ورا می‌تواند توانایی عملکرد به عنوان یک نگهدارنده و ضد اکسایش مناسب و قوی را در صنعت غذا داشته باشد؛ با این حال لازم است آزمایش‌های بیشتری روی غلظت‌های مختلف این ماده افزودنی پیشنهاد می‌شود.

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۳۰

کلمات کلیدی:

نانوامولسیون،

فنل کل،

فلاونوئید کل،

افزودنی غذایی.

DOI:10.22034/FSCT.22.158.119.

* مسئول مکاتبات:

mehrnia@asnruk.ac.ir

۱-مقدمه

افزایش آگاهی مصرف کنندگان نسبت به ترکیبات سازنده مواد خوراکی و دیدگاه منفی آن‌ها نسبت به مواد افزودنی و نگهدارنده‌های شیمیایی، نیاز به بررسی و معرفی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی را به عنوان عوامل ضد فساد جدید در تولید محصولات غذایی به وجود آورده است. عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی با دارا بودن مقادیر قابل توجه مواد زیست فعال و با خواص زیادی از جمله ضد میکروبی و ضد اکسایشی می‌توانند افزودنی‌های طبیعی با فواید بسیار بر سلامت انسان و همچنین اثر مثبت بر عطر و طعم غذا باشند. هرچند ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این عصاره‌ها و اسانس‌های معطر امکان استفاده تنهایی و خام را به آن‌ها نمی‌دهد. فرار بودن اسانس‌ها و تأثیر زیاد و منفی بر خواص ارگانولپتیک می‌تواند از دلایل این امر باشد. راه حلی که در سال‌های اخیر توجه متخصصین غذایی را به خود جلب کرده، تولید نانوامولسیون از این ترکیبات است. امولسیون‌ها، سیستم‌های متشکل از دو فاز غیر قابل حل مانند آب و روغن با استفاده از یک عامل تثبیت کننده بوده که به دو صورت آب در روغن^۱ و روغن در آب^۲ تولید می‌شوند. اسانس‌ها به دلیل خاصیت آبگریزی معمولاً قادر به حل در مواد غذایی نشده و جذب آن‌ها به صورت کامل انجام نخواهد گرفت. در نتیجه با انجام امولسیفیکاسیون^۳، قطرات کروی اسانس روغنی با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر به صورت یکنواخت در فاز پیوسته آبی پراکنده شده و نانوامولسیونی با خواص ارگانولپتیک ملایم تر و حلالیت مناسب برای مصرف در محصولات مختلف حاصل خواهد شد. در این صورت ترکیبات فعال فرار موجود در اسانس و عصاره تثبیت می‌شوند [۱، ۲ و ۳].

گیاه سبز آلوئه‌ورا با برگ‌های تیغه‌دار و گوشتی که به طور عمده در خاورمیانه و مدیترانه می‌روید، از زمان‌های بسیار قدیم به عنوان معجزه‌ی درمانی مورد استفاده قرار می‌گرفت. فیله بی‌رنگی که درون برگ گیاه است حاوی حدود ۹۸ درصد آب و طیف بسیار گسترده‌ای از ترکیبات زیستی مانند آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها، مواد معدنی و

آنتراکینون‌ها است. خواص بسیاری از جمله فعالیت ضد میکروبی، ضد سرطانی، آنتی اکسیداسیونی و ضد دیابتی از این گیاه دیده شده که موجب استفاده از آن در صنایع مختلفی مانند بهداشتی، دارویی و غذایی شده است. فیبر بالای آلوئه‌ورا موجب کاهش وزن و تثبیت گلوکز خون شده و همچنین سطح انسولین بدن را پایدار می‌کند. ژلی که از فیله درون برگ به دست می‌آید علاوه بر خواص نگهدارندگی و سلامتی سرشار، می‌تواند نقش موثر دیگری نیز در صنعت غذا ایفا کند؛ پلی ساکاریدهای ساختاری آلوئه‌ورا (گلوکومانان یا آسه‌مانان) ژلی که از درون برگ گیاه استخراج می‌شود را تبدیل به موسیلاژی قابل استفاده در امولسیون سازی کرده است [۴ و ۵].

گیاه گشنیز با نام علمی *Coriander sativum*، با عطر و طعم خاص خود از گذشته‌ها به عنوان جزئی از افزودنی‌های غذایی با هدف حفظ غذا و سلامتی انسان مورد مصرف قرار می‌گرفت. کاربرد درمانی این گیاه علاوه بر تأثیر بر خواص حسی غذا از عوامل مهم محبوبیت آن است. اسانس به دست آمده از قسمت‌های مختلف گشنیز، به ویژه از دانه آن، می‌تواند به عنوان افزودنی سالم و بدون ایجاد اثرات نامطلوب در داروها و محصولات خوراکی به کار رود. اسانس روغنی بی‌رنگ گشنیز با عطر قوی و تیز خود می‌تواند اثرات مختلفی از جمله پیشگیری از سرطان روده، جلوگیری از دیابت، سوء هاضمه، نفخ معده، مقابله با میکروب‌های منتقل شده از راه دهان و همچنین ایجاد تعادل اکسیداتیو در بدن شود. زنجیره‌های کوتاه و فرار اسانس امکان استفاده از آن را در صنعت غذا محدود کرده است. عدم حلالیت اسانس روغنی و همچنین جذب پایین آن در روده موجب کارایی پایین و هدر رفت ترکیبات ضروری و زیست فعال آن خواهد شد. این اسانس هرچند توسط سازمان غذا و دارو آمریکا به طور کلی ایمن در نظر گرفته شده^۴ ولی مقادیر کم و معینی از آن می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد [۶ و ۷].

مخلوط کن خانگی همزده شد و ژلی یکدست و همگن حاصل گردید که با عبور این ژل از پارچه‌ای نخی (مانند موسلین) برای جداسازی ذرات و پلی‌ساکاریدهای معلق موجود، عصاره نهایی آماده شد [۸].

۲-۲- تهیه نانوامولسیون

برای آماده‌سازی نانوامولسیون از غلظت‌های معینی از اسانس و امولسیفایر (۱ درصد اسانس و ۱ درصد توئین ۸۰) استفاده شد. پس از افزودن مقادیر مشخص از عصاره (فاز آبی پیوسته)، اسانس (فاز روغنی پراکنده) و امولسیفایر، از دستگاه اولتراتراکس برای هموژن کردن مخلوط استفاده شد. امولسیون نهایی با استفاده از دستگاه اولتراسوند در مقیاس نانو تشکیل و برای بررسی ویژگی‌ها تحت آزمون قرار گرفت [۵].

۲-۳- تعیین محتوای کل فنلی^۷ در نانوامولسیون

برای این منظور، روش فولین-سیوکاتیو (رنگ‌سنجی) انجام شد و مقدار کل معادل با میلی گرم گالیک اسید در هر گرم از نانوامولسیون^۸ گزارش شد. ابتدا غلظت مشخصی از امولسیون تهیه و مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از آن به محلول فولین ۱۰٪ افزوده شد. محلول به‌دست آمده به‌خوبی هم‌زده و پس از گذشت ۶ دقیقه با ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. پس از سپری شدن ۳۰ دقیقه نگهداری محلول نهایی در دمای اتاق و مکان تاریک، جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر^۹ (WPA، ساخت کشور انگلیس) در طول موج ۷۶۵ نانومتر گرفته و در فرمول به‌دست آمده از منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد [۹].

۲-۴- تعیین محتوای کلی فلاونوئیدی^{۱۰} در نانوامولسیون

محتوای کل فلاونوئید موجود در نانوامولسیون نیز از طریق رنگ‌سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت. کوثرستین به‌عنوان محلول استاندارد تهیه و با استفاده از غلظت‌های مختلف آن، منحنی استاندارد رسم شد و با جایگذاری در فرمول، میزان فلاونوئید کل موجود در امولسیون معادل با میلی‌گرم کوثرستین در هر گرم

در پژوهش حاضر، نانوامولسیونی از اسانس حاصل‌شده از دانه گیاه گشنیز درون عصاره آبی برگ گیاه آلوئه‌ورا تولید و پتانسیل آن به‌عنوان نگهدارنده‌ای جدید برای معرفی بررسی شد. در این پژوهش میزان محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی موجود در امولسیون با روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری گردید. این دو ترکیب اثر زیادی بر خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی دارند. پتانسیل ضد اکسیداسیونی امولسیون تولیدی با دو روش ABTS^۵ و DPPH^۶ ارزیابی شد. و در نهایت اثری که ترکیب این دو عامل ضد میکروب می‌تواند بر چند گونه باکتری بیماری‌زای منتقل‌شونده از راه دهانی که موجب بیماری‌های چون اسهال، استفراغ و التهاب روده شوند با ۴ روش مورد آزمون قرار گرفت و نتایج به‌دست آمده تجزیه و تحلیل شد. این باکتری‌ها شامل: *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae* و *Escherichia coli* بودند.

۲- مواد و روش‌ها

برگ گیاه آلوئه‌ورا از تولیدکنندگان به‌صورت مستقیم از شهر ملائانی و اسانس گشنیز از شرکت گیاه‌کالا خریداری شده و مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش‌ها به طور کلی در آزمایشگاه‌های گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صورت گرفت.

۲-۱- عصاره‌گیری از برگ آلوئه‌ورا

برای تهیه عصاره ابتدا برگ‌های سبز گیاه شسته و با یک برس سطح آن به آرامی تمیز شد. سپس برای جداسازی مایع غلیظ زرد رنگ گیاه، سر و پایه بریده شده و برگ برای مدت ۶۰ دقیقه به‌صورت عمودی در آب مقطر قرار داده شد. پس از گذشت این زمان، تیغه‌ها و یک طرف از روکش سبز با چاقو جدا شده و فیله بی‌رنگ و چسبناک آلوئه‌ورا (موسیلاژ) استخراج شد. موسیلاژ به‌دست آمده به‌مدت ۳ دقیقه در

8 - mg GA/ mg nanoemulsion
9 - Spectrophotometer
10 - Total flavonoid content

5- 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
6- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
7- Total phenolic content

محلول کنترل، غلظت معینی از کاتیون ABTS با آب مقطر تهیه و با نسبت ۱:۲ با محلول ۲/۴۵ میلی مولاری از پرسولفات پتاسیم ترکیب شد. برای فعال سازی رادیکال های آزاد، ترکیب آماده شده به مدت ۱۶ تا ۲۴ ساعت در مکانی تاریک قرار گرفتند. سپس در روز بعدی، به قدری متانول به محلول اضافه شد که جذب آن به حدود ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر برسد. در نهایت رقت های مختلف از امولسیون با نسبت ۱:۱ با محلول کنترل مخلوط شده و پس از ۶ دقیقه جذب آن ها گرفته شد. درصد مهار غلظت های مختلف با استفاده از معادله ۱ تعیین و گزارش شد.

۷-۲- تعیین قدرت مهار نانوامولسیون در برابر پاتوژن ها
تعیین فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون تهیه شده در برابر شش باکتری بیماری زای که شامل *اشرشیا کلی* ATCC ۱۲۴۳۵، *شیگلا دیسانتری* ATCC ۱۳۳۱۳، *سالمونلا* تیفی ATCC ۶۵۱۵۴ (باکتری های گرم منفی)، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۱۴۱۵۴، *لیستریا مونوسیترنر* ATCC ۱۹۱۱۵ و *باسیلوس سرئوس* ATCC ۱۰۸۷۶ (باکتری های گرم مثبت) بود؛ انجام گرفت. برای این منظور از تکنیک های انتشار در آگار به روش دیسک دیفیوژن آگار^{۱۴}، انتشار در چاهک آگار^{۱۵}، حداقل غلظت مهارکنندگی^{۱۶} از رشد باکتری و حداقل غلظت کشندگی^{۱۷} استفاده شد.

۷-۲-۱- آماده سازی باکتری های بیماری زای غذازاد

برای انجام آزمون های میکروبی نیاز به کشت تازه از باکتری های بیماری زای بود. سوسپانسیون های استاندارد از باکتری های مدنظر، با کدورت نیم مک فارلند (1.5×10^8) CFU/mL تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. تهیه این کدورت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر و با جذبی بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ بود [۱۳].

۷-۲-۲- روش دیسک دیفیوژن آگار

برای اندازه گیری قطر هاله عدم رشد باکتری ها، ابتدا دیسک بلانک به مدت ۱۵ دقیقه درون نانوامولسیون قرار گرفت.

نانوامولسیون^{۱۱} گزارش شد. برای انجام این آزمون، ۷۵ میکرولیتر از محلول سدیم نیتريت ۵٪ با استفاده از سمپلر به نمونه امولسیون افزوده و پس از هم زدن، به مدت ۶ دقیقه استراحت داده شد. مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آلومینیوم ۱۰٪ با سمپلر به مخلوط اضاف و دوباره به مدت ۵ دقیقه استراحت داده شد. در نهایت با افزودن ۱ میلی لیتر NaOH ۱ مولار، بلافاصله جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر گرفته و میزان کل فلاونوئید با توجه به آن گزارش شد [۱۰].

۲-۵- مهار رادیکال آزاد ۲، ۲-دی فنیل-۱-پریکیل هیدرازیل^{۱۲}

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط غلظت های مختلف امولسیون، با کمی تغییر از روش حجتی و همکاران [۱۱] و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت. ابتدا غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از امولسیون تهیه شد. در مرحله بعد محلول متانولی پودر DPPH تهیه شد به طوری که جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر حدود ۰/۷ بود (کنترل). رقت های مختلف امولسیون در لوله های آزمایش با نسبت ۱:۱ با محلول متانولی ترکیب شده و پس از نگهداری ۳۰ دقیقه ای در محیط تاریک جذب آن ها خوانده شد. درصد مهار رادیکالی و در نتیجه خاصیت آنتی اکسیدانی نانوامولسیون تهیه شده با استفاده از معادله ۱ ارزیابی شد.

معادله ۱:

[جذب کنترل] / [جذب غلظت معین نمونه - جذب کنترل]

۲-۶- مهار رادیکال آزاد ۲، ۲-آزینو بیس-۳-اتیل بنزو تیازولین-۶-سولفونیک اسید^{۱۳}

در این آزمون درصد مهار این کاتیون با پیروی از روش کاپاراکو و همکاران [۱۲] با کمی تغییرات محاسبه و گزارش شد. ابتدا رقت های مختلف از امولسیون (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه شد. برای تهیه ی

15 -Well diffusion agar

16- Minimum inhibitory concentration (MIC)

17- Minimum bactericidal concentration (MBC)

11- mg QE/ mg nanoemulsion

12- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

13 -2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), (ABTS)

14 - Disc diffusion agar

تا معرف رنگی به خانه‌ها اضافه شود. معرف رنگی محلول ۵ درصدی از تری فنیل تترازولیم کلراید (TTC) به میزان ۲۰ میکرولیتر به خانه‌ها افزوده و دیواره و این‌بار برای مدت زمان ۳۰ دقیقه به انکوباتور منتقل شد. اولین خانه بدون تولید رنگ قرمز به‌عنوان حداقل غلظتی که از رشد باکتری جلوگیری کرده انتخاب شد [۱۶].

۲-۷-۵- حداقل غلظت کشندگی

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی از امولسیون که توانست خاصیت باکتری‌کشی را القا کند، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از خانه‌های بی‌رنگ (عدم رشد باکتری) برداشته و روی محیط، کشت داده شد. یک روز پس از انتقال به انکوباتور، پتری‌دیش‌ها خارج شده و غلظت‌هایی که فاقد رشد باکتری بودند، مشخص و گزارش شدند [۱۶].

۲-۸- تجزیه و تحلیل داده‌ها

میانگین داده‌های به‌دست آمده از آزمایش‌ها با ۳ تکرار، با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری ۵ درصد در آزمون دانکن تحلیل و گزارش شدند. برای این منظور از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون

ترکیبات فنلی ازجمله عوامل مهم زیست‌فعال گیاهی شامل طیف وسیعی از فیتوکمیکال‌هایی هستند که در دسته‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند. مقادیر بالای این مواد با اثر مهاری بر رادیکال‌های آزاد با مکانیسم‌های عمل مختلف، باعث افزایش ارزش آنتی‌اکسیدانی خواهند شد. عمل فراصوت در پژوهش‌های متعدد به‌عنوان روشی برای افزایش و بهبود محتوای ترکیبات فنلی اسانس و عصاره‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌است. در واقع پردازش فراصوت با ایجاد شوک و گسستن دیواره سلولی باعث رهاسازی بهتر ترکیبات زیستی از درون سلول شده و دسترسی و عملکرد آن‌ها را افزایش می‌دهد [۱۷، ۱۸ و ۱۹]. محتوای کل فنل یافت شده در نانوامولسیون برابر با $33/53 \pm 1/57$ میلی گرم اسیدگالیک

میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های استاندارد روی محیط‌های مولر هیتون آگار^{۱۸} کشت سطحی داده شدند. سپس روی هر محیط دیسک حاوی امولسیون، دیسک بلانک (کنترل منفی) و دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (کنترل مثبت) با فواصل مشخص از هم و دیواره پتری‌دیش قرار گرفتند. پس از انکوباتورگذاری یک‌روزه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اندازه‌گیری هاله‌ها انجام گرفت و براساس میلی‌متر گزارش شد [۱۴].

۲-۷-۳- روش چاهک در آگار

در این روش، پس از کشت سطحی سوسپانسیون‌ها بر محیط‌های کشت، چاهک‌هایی با فواصل مشخص از یک‌دیگر و دیواره پتری‌دیش با استفاده از ته‌پیت‌پاستورهای استریل شیشه‌ای بر آگار آماده و ته آن‌ها با آگار مذاب بسته شد. سپس میزان ۲۰ میکرولیتر از امولسیون تهیه شده با استفاده از سمپلر درون چاهک انتقال داده‌شد. در یک چاهک همین میزان آب مقطر استریل (کنترل) ریخته شد. پس از گذشت زمان انکوباتورگذاری، قطر هاله‌های دور چاهک اندازه‌گرفته شدند [۱۵].

۲-۷-۴- حداقل غلظت مهارکنندگی

از روش رقت‌سازی متوالی برای انجام این آزمون میکروبی استفاده شد. ابتدا غلظت اولیه از محیط کشت مایع مولر هیتون و امولسیون تهیه و با ۵ میلی‌لیتر از دی‌متیل سولفوکساید مخلوط شد. غلظت‌های متوالی پس از آن با افزودن ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع به‌دست آمدند. از هر کدام از غلظت‌ها میزان ۱۰۰ میکرولیتر با سمپلر برداشته و به درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه انتقال داده شد. سپس میزان ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های آماده‌شده به هر غلظت افزوده شد به‌طوری که هر ردیف حاوی غلظت‌های مختلف از اسانس حاوی یک سوسپانسیون باکتریایی بود. در هر ردیف یک کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد. کنترل منفی مخلوط بدون عامل ضدباکتری و کنترل مثبت مخلوط بدون باکتری بود. پلیت ۹۶ خانه پس از یک‌روز انکوباتورگذاری در دمای ۳۷ درجه، از انکوباتور خارج شد

به دست آمده توانایی بسیار بالایی در درصد مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH مشاهده شد و نتایج آن در جدول ۱ بیان گردید.

در هر گرم نمونه تعیین شد. بر اساس آزمایش انجام شده محتوای کل فلاونوئید محاسبه شده نیز برابر با $657/33 \pm 6/6$ میلی گرم کوئرستین در هر گرم بود. پتانسیل ضد اکسایشی نانوامولسیون تولید شده بررسی شد؛ براساس نتایج

Table 1. The antioxidant activity (DPPH & ABTS) of nanoemulsion

Concentration (mg/mL)	Radical scavenging effect (%)	
	DPPH	ABTS
50	57.33 ± 0.42^A	49.31 ± 0.29^A
100	60.16 ± 0.37^B	51.94 ± 0.11^B
150	66.18 ± 0.25^C	55.79 ± 0.15^C
200	68.40 ± 0.90^D	67.61 ± 0.27^D
250	72.53 ± 0.21^E	69.02 ± 0.15^E
300	73.70 ± 0.33^F	71.30 ± 0.07^F

Numbers in the table are the mean of 3 replicates $\pm$ standard deviation. Different letters in each column show a significant difference (5%) between the data in each column.

پردازش و اثر فراصوت بر سلول‌ها در فرکانس استفاده شده می‌تواند اثرات مختلفی را بر ویژگی‌های امولسیون ساخته شده اعمال کنند [۲۰]. عصاره آبی آلوئه‌ورا در مطالعات متعدد به عنوان قوی‌ترین عصاره در جلوگیری از اکسیداسیون و با بالاترین اثر بر رادیکال آزاد DPPH گزارش شده است که مشابه با پژوهش حاضر و باتوجه به نتایج گزارش شده در جدول ۱، میزان اثر نانوامولسیونی که از عصاره آلوئه‌ورا به عنوان فاز پیوسته با مقدار بیشتر به دست آمده نیز بر رادیکال آزاد DPPH بیشتر بود. در پژوهشی اثر فرآیند اولتراسوند بر عصاره‌های مختلفی که از برخی سبزیجات گرفته شده بود، بررسی و گزارش شد. براساس نتایجی که به دست آمد، فرآیند فراصوت باعث افزایش قابل توجه و معنی‌داری ($p < 0.05$) در خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های تیمار شده نسبت به عصاره خالص و فرآیند نشده (کنترل) بود. هرچند این نتایج در همه عصاره‌ها یکسان نبوده و در برخی موارد تغییری مشاهده نشد [۱۷ و ۲۱]. این نتیجه توسط یو و همکاران [۲۲] نیز تایید شد که این فرآیند موجب افزایش کارایی عصاره در مهار رادیکال آزاد DPPH خواهد بود. نیکروان و همکاران [۲۳] فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس و نانوامولسیون آن را به دو روش ABTS و DPPH بررسی و مقایسه کردند. براساس مشاهدات آن‌ها، نانوامولسیون اسانس، توانایی بالاتری در

نانوامولسیون تولید شده از عصاره آلوئه‌ورا (فاز پیوسته) و اسانس گشنیز (فاز پراکنده) از خود توانایی بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد نشان داد. امولسیون مورد نظر در کم‌ترین غلظت تهیه شده (۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) قدرت مهاري بالاتر از ۵۰ درصد در برابر رادیکال آزاد DPPH داشت که با افزایش رقت، به صورت معناداری تا ۷۳/۷۰ درصد در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بالا رفته است. رادیکال آزاد ABTS نیز در غلظت مشابه تا میزان ۷۱/۳۰ درصد مهار شده که این مقدار تقریباً نزدیک به درصد مهار DPPH بود. البته قدرت بازدارندگی در برابر ABTS در کم‌ترین غلظت از ۵۰ درصد کم تر بود ولی از غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوامولسیون شاهد افزایش ناگهانی قدرت ضد اکسایشی (بیش از ۱۰ درصد) بودیم. توان بالا و مشابه آنتی اکسیدانی نانوامولسیون در هر دو روش می‌تواند نتیجه پردازش فراصوت و عملکرد بهتر ترکیبات زیست فعال ترشحي از غشای سلول‌های تغییر یافته عصاره و همچنین حضور اسانس باشد. اسانس گشنیز با درصد پایین (۱ درصد وزنی/وزنی) و اثر افزایشی بر خصوصیات آنتی اکسیدانی، در عصاره آلوئه‌ورا حضور پیدا کرده و پس از فرآیند فراصوت، در سرتاسر فاز پیوسته (عصاره) پخش شد. پراکندگی قطرات روغن، میزان

مشخص شد که با تغییر اندازه ذرات درحد نانو، توانایی مهار و کشندگی عامل ضدمیکروب درحد قابل توجهی بالاتر خواهد رفت [۱۹].

در مطالعات گذشته نانوامولسیون اسانس ها در آب که یک ماده بی اثر و بدون ترکیبات اضافی است تولید می شدند، ولی نتایج گزارش شده در این مقاله، حاصل نانوامولسیون اسانس در یک عصاره با ترکیبات گوناگون است. عصاره آبی آلئوئورا متشکل از بیش از ۷۵ ترکیب مختلف است که طی عمل فراصوت دستخوش تغییر شده و همچنین برهمکنشی با قطرات اسانس پراکنده ایجاد خواهد شد [۵ و ۲۶]. عامل ضدمیکروب اصلی به کار رفته در نامولسیون، اسانس گشنیز، با مقدار ۱ درصد وزنی در ترکیب به کار گرفته و با انجام عمل فراصوت در مایع پیوسته (عصاره) به صورت قطرات روغنی پراکنده شد. نتایج آزمون دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار در جدول های ۲ و ۳ آورده شده است.

مهار رادیکال های آزاد داشته و در غلظت پایین تری قادر به اعمال اثر آنتی اکسیدانی تا حد ۵۰ درصد بود.

۲-۳- فعالیت ضدباکتریایی نانوامولسیون

نانوامولسیون های با فعالیت ضدمیکروبی در واقع سیستمی پایدار از دو مایع غیرقابل حل به صورت روغن در آب با حضور یک سورفاکتانت هستند که با مکانیسم های متفاوت بر روی غشای میکروارگانیسم اثر می گذارند. روغن استفاده شده با غلظت های خاص باید مورد استفاده قرار گیرد تا حداکثر قدرت روبرویی با عوامل بیماری زایی چون باکتری ها، قارچ ها و ویروس های تکامل یافته را دارا باشد. موضوع مهم دیگر که به شدت بر این مهم تأثیرگذار است؛ اندازه ذرات نانو است که با اثر روی غشای خارجی و ایجاد یک تعامل الکترواستاتیک بین بار کاتیونی نانوذرات و بار منفی میکروارگانیسم، موجب پارگی غشای سلولی می شود [۲۴ و ۲۵].

براساس نتایج مطالعاتی که بر مقایسه خاصیت ضدمیکروبی اسانس ها به دو صورت خالص و امولسیونی انجام شد،

Table 2. Antimicrobial effect of nanoemulsion against pathogenic bacteria (disc diffusion agar method)

Inhibition zone (mm)	Pathogenic bacteria					
	<i>E. coli</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>
Nanoemulsion	7.20 ± 0.50 ^A	6.10 ± 0.30 ^B	8.30 ± 0.40 ^C	9.40 ± 0.60 ^D	8.80 ± 0.50 ^C	9.00 ± 0.20 ^D
Gentamicin	24.00 ± 1.00 ^E	22.67 ± 1.53 ^E	23.33 ± 0.58 ^E	24.00 ± 1.73 ^E	25.00 ± 2.00 ^E	24.00 ± 1.41 ^E

Numbers in the table are the mean of 3 replicates ± standard deviation. Similar letters show a significant difference (5%) between the data.

Table 3. Antimicrobial effect of nanoemulsion against pathogenic bacteria (well diffusion agar method)

Inhibition zone (mm)	Pathogenic bacteria					
	<i>E. coli</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>
Nanoemulsion	7.50 ± 0.40 ^A	6.60 ± 0.50 ^B	8.90 ± 0.30 ^C	9.70 ± 0.50 ^C	9.60 ± 0.25 ^C	9.60 ± 0.50 ^C

Numbers in the table are the mean of 3 replicates ± standard deviation. Similar letters show a significant difference (5%) between the data

براساس قطر هاله های به دست آمده از هر دو روش می توان گفت نانوامولسیون تولید شده قدرت بالایی در برابر باکتری های بیماری زا مورد نظر ندارد. حساسیت باکتری ها نسبت به عامل ضدمیکروب تقریباً مشابه به هم بود. بیشترین

نانوامولسیون اثر قوی تری روی باکتری های بیماری زای گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی نشان داد که به دلیل عملکرد و محتوای متفاوت لایه غشایی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بود و حساسیت بالاتر گرم مثبت ها را توجیه می کند [۲۷ و ۲۸]. اثر مشابه با نتایج به دست آمده در پژوهش های دیگری نیز مشاهده شد که دلالت بر حساسیت بالاتر پاتوژن های گرم مثبت نسبت به گرم منفی دارد [۲۹ و ۳۰]. حداقل غلظت هایی از نانوامولسیون که دارای ویژگی بازدارندگی از رشد و کشندگی باکتری ها بود در جدول ۴ گزارش شده است.

حساسیت در برابر نانوامولسیون مربوط به باکتری های گرم مثبت بود. در میان باکتری های گرم منفی *سالمونلا تیفی* کمترین و *شیگلا دیسانتری* بیشترین مقاومت را در برابر عامل ضدباکتری از خود نشان دادند. تمامی هاله های اندازه گیری شده کوچک تر از ۱۰ میلی متر بودند. همچنین در آزمون دیسک دیفیوژن، تفاوت بسیار زیادی میان قطر هاله دور دیسک کنترل با دیسک حاوی نانوامولسیون مشاهده شد. میان هاله های اندازه گیری شده دور دیسک ها و چاهک های مربوط به باکتری ها در هر دو آزمون، اختلاف زیادی وجود نداشت هر چند در آزمون چاهک قطر هاله عدم رشد بیشتر بود.

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of nanoemulsion against pathogenic bacteria

Bacteria	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>E. coli</i>	256	>512
<i>S. dysenteriae</i>	256	>512
<i>S. typhi</i>	256	>512
<i>S. aureus</i>	128	512
<i>L. monocytogenes</i>	128	>512
<i>B. cereus</i>	128	512

رادیکال آزاد بود. از سوی دیگر نتایج آزمون های میکروبی نشان داد که نانوامولسیون فعالیت ضد میکروبی بالایی ندارد. در نهایت نانوامولسیون اسانس گشنیز در عصاره آبی آلوده را می تواند توانایی عملکرد به عنوان یک نگهدارنده و ضد اکسایش مناسب و قوی را در صنعت غذا داشته باشد؛ با این حال آزمایش های بیشتر بر غلظت های مختلف این ماده افزودنی پیشنهاد می شود.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

رشد هر سه باکتری گرم مثبت در غلظت ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوامولسیون متوقف شد. باکتری های گرم منفی نیز در غلظت ۲۵۶ رشد خود را متوقف کردند. با این وجود نانوامولسیون در بالاترین غلظت (۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر) تنها در برابر دو پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* خاصیت باکتری کشی از خود نشان داد.

۴- نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی نانوامولسیون مورد بررسی قرار گرفت. این ماده خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی با دو روش DPPH و ABTS نشان داد که اثر افزایشی و موفقیت آمیز ترکیبات سازنده آن را ثابت می کند. امولسیون مورد نظر در غلظت حدود ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر دارای ۵۰ درصد قدرت بازدارندگی در برابر دو

خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

ه-منابع

- [1] Donsì, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233, 106-120.
- [2] Borthakur, P., Boruah, P. K., Sharma, B., & Das, M. R. (2016). 5 - Nanoemulsion: preparation and its application in food industry. In A. M. Grumezescu (Ed.), *Emulsions* (pp. 153-191): Academic Press.
- [3] Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Hemmati Kaykha, M. E., Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). Utilization of plantago major seed mucilage containing citrus limon essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition*. 9(3):1625-1639.
- [4] Nicolau-Lapeña, I., Colàs-Medà, P., Alegre, I., Aguiló-Aguayo, I., Muranyi, P., & Viñas, I. (2021). Aloe vera gel: An update on its use as a functional edible coating to preserve fruits and vegetables. *Progress in Organic Coatings*, 151, 106007.
- [5] Geetanjali, R., Sreejit, V., Sandip, P., & Preetha, R. (2021). Preparation of aloe vera mucilage-ethyl vanillin Nano-emulsion and its characterization. *Materials Today: Proceedings*, 43, 3766-3773.
- [6] Mahleyuddin, N. N., S. Moshawih, L. C. Ming, H. H. Zulkifly, N. Kifli, M. J. Loy, M. M. Sarker, Y. M. Al-Worafi, B. H. Goh, S. Thuraisingam & H. P. Goh. (2022). *Coriandrum sativum* L.: A Review on Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Cardiovascular Benefits. *Molecules*, 27(1), 209.
- [7] Tanavar, H., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., Mehrnia, M. A. (2021). Investigation of the chemical properties of *Mentha pulegium* essential oil and its application in *Ocimum basilicum* seed mucilage edible coating for extending the quality and shelf life of veal stored in refrigerator (4°C). *Food Science & Nutrition*, 9(10), 5600-5615.
- [8] Maan, A. A., Reiad Ahmed, Z. F., Iqbal Khan, M. K., Riaz, A., & Nazir, A. (2021). Aloe vera gel, an excellent base material for edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 329-341.
- [9] Ghazanfari, N., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Mohammadi, M. (2020). Microwave-assisted hydrodistillation extraction of essential oil from coriander seeds and evaluation of their composition, antioxidant and antimicrobial activity. *Heliyon*, 6(9), 2405-8440.
- [10] Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2022). Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18(4), 467-482.
- [11] Kiarsi, Z., Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). In vitro antimicrobial effects of *Myristica fragrans* essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 40(3), e12782.
- [12] Kaparakou, E. H., Kanakis, C. D., Gerogianni, M., Maniati, M., Vekrellis, K., Skotti, E., & Tarantilis, P. A. (2021). Quantitative determination of aloin, antioxidant activity, and toxicity of Aloe vera leaf gel products from Greece. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 101(2). 414-423.
- [13] Sureshjani, M. H., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Behbahani, B. A., & Shahidi, F. (2014). Antimicrobial effects of *Kelussia odoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. *Journal of Paramedical Sciences*, 5(2), 115-120.
- [14] Bendjedid, S., Lekmine, S., Tadjine, A., Djelloul, R., & Bensouici, C. (2021). Analysis of phytochemical constituents, antibacterial, antioxidant, photoprotective activities and cytotoxic effect of leaves extracts and fractions of *Aloe vera*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101991.
- [15] Hojjati, M., Omidi-Mirzaei, M., & Kiarsi, Z. (2020). Evaluation of chemical constituents and antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of two citrus species. *FSCT*. 17(100), 127-138.
- [16] Omidi Mirzaei, M., Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). Determination of chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of coriander seed essential oil on a number of pathogenic microorganisms. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 16(2), 221-233.
- [17] Lafarga, T., Rodríguez-Roque, M. J., Bobo, G., Villaró, S., & Aguiló-Aguayo, I. (2019). Effect of ultrasound processing on the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of selected vegetables. *Food Science and Biotechnology*, 28(6), 1713-1721.
- [18] Gansukh, E., Gopal, J., Paul, D., Muthu, M., Kim, D. H., Oh, J. W., & Chun, S. Ultrasound mediated accelerated Anti-influenza activity of Aloe vera. *Scientific Reports*. 12;8(1):17782.
- [19] Heydari, S., Jooyandeh, H., Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). The impact of Qodume Shirazi seed mucilage-based edible coating containing lavender essential oil on the quality enhancement and

shelf life improvement of fresh ostrich meat: An experimental and modeling study. *Food Science & Nutrition*, 8(12), 6497-6512.

[20] Yeganegi, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Asili, J., Behbahani, B.A. and Beigbabaei, A. (2018). *Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial pathogenesis*, 116, pp.62-67.

[21] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaee Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food Science & Nutrition*, 9(5), 2458-2467.

[22] Yu, J., Engeseth, N. J., & Feng, H. (2016). High Intensity Ultrasound as an Abiotic Elicitor—Effects on Antioxidant Capacity and Overall Quality of Romaine Lettuce. *Food and Bioprocess Technology*, 9(2), 262-273.

[23] Nikravan, L., Maktabi, S., Ghaderi Ghahfarrokhi, M., & Mahmoodi Sourestani, M. (2021). The comparison of antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Oliveria decumbens* and its nanoemulsion preparation to apply in food industry. *Iranian Veterinary Journal*. 17(3), 78-87.

[24] Worku, L. A., Bachheti, A., Chaubey, K. K., Bachheti, R. K., & Husen, A. (2023). Antimicrobial Activities of Nanoemulsion. In A. Husen, R. K. Bachheti, & A. Bachheti (Eds.), *Current Trends in Green Nano-emulsions: Food, Agriculture and Biomedical Sectors* (pp. 143-156). Singapore: Springer Nature Singapore.

[25] anganeh, H., Mortazavi, S., Shahidi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Evaluation of the

chemical and antibacterial properties of Citrus paradise essential oil and its application in Lallemandia iberica seed mucilage edible coating to improve the physicochemical, microbiological and sensory properties of lamb during refrigerated storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 1-16.

[26] Valizadeh, A., Darvishi, M. H., Amani, A., & Karimi Zarchi, A. A. (2022). Design and development of novel formulation of Aloe Vera nanoemulsion gel contained erythromycin for topical antibacterial therapy: In vitro and in vivo assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, 103519.

[27] Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 980-987.

[28] Alghooneh, A., Alizadeh Behbahani, B., Noorbakhsh, H., Yazdi, F. T. (2015). Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Frankfurter sausage containing Satureja extract. *Microbial Pathogenesis*. 85, 58-65

[29] Tabatabaei Yazdi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4). 55-61.

[30] Behbahani, B. A., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M. (2013). Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus" in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(7), 1652-1658.



Scientific Research

Antioxidant and antibacterial activity of coriander essential oil nanoemulsion in *Aloe vera* extract

Narges Sharifat¹, Mohammad Amin Mehrnia^{*2}, Hassan Barzegar², Behrooz Alizadeh Behbahani²

1-M. Sc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received:2024/5/27

Accepted:2024/7/20

Keywords:

Nanoemulsion,
Total flavonoid content,
Total phenolic content,
Food additive.

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.119.

*Corresponding Author E-
mehrnia@asnrukh.ac.ir

This study was done as a response to recent demands for developing and introducing new natural preservatives and quality enhancers for application in food industry. The emulsion produced by ultrasonic method, was consisted of coriander essential oil nano-droplets dispersed in *Aloe vera* extract. The two ingredients were tested individually and proved to have antioxidant and antibacterial activities. Total phenolic and flavonoid content of nanoemulsion estimated 33.53 mg GAE/g and 657.33 mg QE/g nanoemulsion respectively. DPPH and ABTS radical scavenging evaluated about 73.70 and 71.30 percent at 300 mg/mL concentration of nanoemulsion. Four methods (disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)) were used to evaluating antimicrobial effect of prepared nanoemulsion. Similar to disk diffusion agar method, the results of well diffusion agar method showed the inhibition zones with diameters less than 10 mm. Based on MIC and MBC results, the nanoemulsion had an inhibitory effect on all subjected pathogens with MBC of 512 mg/ml against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* while higher concentrations than 512 mg/mL were required for other pathogens. Overall results of four antibacterial tests indicated a stronger effect of nanoemulsion on the Gram-positive pathogens than the Gram-negative bacteria used in this study. Prepared coriander essential oil nanoemulsion in *Aloe vera* extract can be used as an antioxidant preservative with high performance in the food industry yet it is required to do more tests on this nanoemulsion to reach the valid effective concentrations.



اسانس دانه گشنیز (*Coriandrum sativum*): تعیین ترکیبات شیمیایی، قدرت آنتی اکسیدانی و فعالیت

ضدمیکروبی

نرگس شریفیات^۱، محمد امین مهرنیا^{۲*}، حسن برزگر^۲، بهروز عزیزاده بهبهانی^۲

^۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع

طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

^۲ - دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۷	افزودنی ها و بهبود دهنده های کیفیت مواد خوراکی نقش فراوانی در صنایع غذایی دارند. امروزه با توجه به مسائل ایمنی و سلامت غذایی و نیاز بازار به ورود محصولات خوراکی جدید متناسب با سلیقه متنوع مصرف کنندگان؛ بررسی خواص و معرفی گیاهان و عصاره های آبی و روغنی آن ها به روندی جدید برای پاسخ به این پیش آمد تبدیل شده است. در مطالعه حاضر، پس از تعیین ترکیبات عمده تشکیل دهنده، ویژگی های اسانس دانه گشنیز از نظر میکروبی و اکسیدانی تعیین شد. براساس طیف سنجی با دستگاه گاز-کروماتوگراف، لینالول با مقدار ۵۲/۴۰٪ به عنوان ترکیب اصلی سازنده اسانس مشخص شد. همچنین مقدار فنل و فلاونوئید به ترتیب ۷۵/۶۰ میلی گرم گالیک اسید و ۷۱۵/۳۳ میلی گرم کوئرستین در هر گرم اسانس محاسبه شد. دو روش بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH و ABTS، انجام گرفت و مشخص شد در غلظت یکسان (۱۰۰۰ ppm) مهار رادیکال آزاد DPPH برخلاف ABTS به حد بالاتری از ۵۰ درصد می رسد (۵۱/۹۵٪). کم ترین و بیشترین قطر هاله عدم رشد در روش دیسک دیفیوژن به ترتیب مربوط به باکتری شیگلا دیسانتری (۱۴/۱۰ میلی متر) و باسیلوس سرئوس (۲۴ میلی متر) بود. حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری های اشرشیاکلی، شیگلا دیسانتری، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز و باسیلوس سرئوس به ترتیب ۴، ۸، ۲، ۲ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی اسانس گشنیز برای باکتری های مذکور به ترتیب ۲۵۶، ۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸ و ۱۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود. براساس نتایج به دست آمده می توان ادعا داشت که این اسانس در غلظت و دوز مشخص می تواند پتانسیل بالایی در صنعت غذا به عنوان یک ماده افزودنی ایمن و نگهدارنده قوی داشته باشد.
DOI:10.22034/FSCT.22.158.130. * مسئول مکاتبات: mehrnia@asnruk.ac.ir	

۱- مقدمه

بهبود کیفیت مواد غذایی از لحاظ متفاوت چون ویژگی‌های حسی و سلامتی، در هر دوره زمانی از دغدغه‌های انسان بوده است. طی سال‌ها، مواد و ترکیبات افزودنی زیادی به مردم معرفی و به دلایل مختلف ایجاد مشکل کرده و دچار محدودیت و یا حتی حذف از صنعت غذا شده‌اند. امروزه مهندسين و پژوهشگران باتوجه به تقاضای مردم در مصرف محصولات خوراکی با ترکیبات مفید طبیعی، سعی در یافتن و تولید افزودنی‌های سالم و بدون ایجاد حساسیت و آلرژی با خواص بهبود دهنده و نگهدارندگی مناسب دارند. از زمان‌های قدیم گیاهان علفی به صورت تازه و یا خشک شده به عنوان ادویه جات برای بهبود طعم، عطر و افزایش ماندگاری به غذاها و نوشیدنی‌ها افزوده می‌شدند؛ همچنین گیاهان با داشتن ترکیبات متعدد زیستی و بیولوژیکی، می‌توانند کاربردهای فراوانی در زمینه‌های مختلف صنایع غذایی داشته باشند. اسانس‌ها یکی از این افزودنی‌های بهبود دهنده در صنایع مختلف می‌باشند [۱ و ۲].

اسانس‌ها که به "روغن‌های اتری" نیز معروف‌اند؛ مایعاتی با زنجیره‌های کربنی کوتاه و فرار می‌باشند. این روغن‌های معطر از روش‌های مختلفی مانند تقطیر و استخراج با حلال از قسمت‌های مختلف گیاهان که منبع غنی از ترکیبات زیستی هستند، به دست آمده و معمولاً به عنوان افزودنی برای بهبود عطر محصولات در صنایع شیمیایی، بهداشتی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. البته امروزه استفاده از اسانس‌های گیاهی در داروها به عنوان ترکیب ضدبیماری اصلی نیز بسیار پرطرفدار و یک روش جدید برای برخورد با مسائل مختلف درمانی در جامعه امروز شده است. اسانس‌ها همچنین به عنوان عوامل ضد میکروب، ویروس و به عنوان حشره کش نیز شناخته می‌شوند. اسانس‌ها مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات آلی فرار با وزن مولکولی پایین هستند. ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها با توجه به اسکلت هیدروکربنی، بیشتر از ترپنوئیدها که از ترکیبات فنلی هستند تشکیل

شده‌اند و خواص مختلف ضد میکروبی آن‌ها را سبب می‌شوند [۳ و ۴].

گیاه علفی، *Coriandrum sativum* L. از خانواده Umbelliferae یا همان گشنیز که با نام جفیری چینی^۱ نیز شناخته می‌شود گیاهی عطر است که به طور سالانه می‌روید. گمان براین است که ریشه این گیاه مدیترانه و خاورمیانه باشد ولی با این وجود هنوز منشأ اصلی آن مشخص نیست و برخی آن را علفی هرز در میان گیاهان می‌دانند. این گیاه از اولین ادویه جات مصرفی انسان است و امروزه در غذاها به عنوان یک چاشنی استفاده می‌شود. هرکدام از قسمت‌های این گیاه ترکیبات شیمیایی و خواص و ارزش مربوط به خود را دارند. درواقع این گیاه از گذشته تا کنون کاربردهای بسیاری در طب سنتی و غذا داشته است. خواص بسیار زیادی درمورد مصرف این گیاه در کشورهای مختلف ذکر و بررسی شده که از میان آن‌ها می‌توان به صورت کلی به چند مورد اشاره کرد: خواص تسکین دهنده زخم و التهاب دهانی، جلوگیری و درمان ناراحتی‌های گوارشی چون نفخ معده، سوء هاضمه و تهوع با تحریک کبد و ترشح آنزیم‌های گوارشی، ادرار آوری و همچنین درمان دیابت و کاهش سطح گلوکز خون از خواص گشنیز می‌باشند. علاوه بر موارد گفته شده، فعالیت ضد میکروبی این گیاه تحت تأثیر تمامی اجزاء زیست فعال تشکیل دهنده آن است که موجب مقابله در برابر باکتری‌های منتقله از طریق غذا چون *Salmonella typhi*^۲ شده و از درمان‌های اسهال خونی محسوب می‌شود [۵ و ۶]. گیاه گشنیز با توانایی تولید اسانس از قسمت‌های مختلف مانند برگ‌ها و بذر خود می‌تواند به صوت روغنی نیز مورد استفاده قرار گیرد. اسانس روغنی گشنیز با داشتن اسیدچرب تک غیراشباع (اسید پتروسلینیک) عمدتاً از دانه گیاه استخراج شده و بیشتر در درمانی بیماری‌های گوارشی دخالت می‌کند. این اسانس با دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی به عنوان نگهدارنده به مواد غذایی مختلف می‌تواند به کار رود؛ درواقع این اسانس با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی به عنوان

برنامه دمایی ستون HP-5MS از این قرار بود: ابتدا دما با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه از ۴۰ تا ۲۰۰ درجه رسید. پس از گذشت ۱ دقیقه، دما با سرعت ۱۰ درجه در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بالا رفت. ۵ دقیقه دیگر در این دما ماند سپس با سرعت ۲۵ درجه در دقیقه به ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد رسید. نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده به کمک طیف نرمال آلکان‌ها و درصد ترکیبات با محاسبه سطح زیر پیک‌ها گزارش شد [۱۰].

۲-۲- محاسبه فنل کل اسانس گشنیز

از روش رنگ‌سنجی با استفاده از فولین-سیوکالتیو برای اندازه‌گیری فنل کل استفاده شد. از غلظت ۱۰۰۰ ppm اسانس در متانول برای این آزمون استفاده شد. پس از رسم منحنی استاندارد گالیک اسید و به دست آوردن فرمول، از غلظت معین اسانس به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته و با محلول ۱۰٪ فولین (۲/۵ میلی‌لیتر) مخلوط شد. پس از مدت زمان ۶ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر کرینات سدیم (۷/۵ درصدی) به محلول اضافه و پس از اینکه کاملاً مخلوط شد، به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و مکانی تاریک نگهداری شد. در نهایت جذب ترکیب به دست آمده در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر^۹ (WPA، انگلیس) گرفته و در فرمول جای‌گذاری شد [۱۱].

۲-۳- محاسبه فلاونوئید کل اسانس گشنیز

میزان فلاونوئید کل اسانس، با استفاد از کلرید آلومینیوم محاسبه شد. در این آزمون، کوئرستین به عنوان محلول استاندارد تهیه و منحنی استاندارد آن رسم شد. پس از به دست آمدن فرمول استاندارد، نیتريت سدیم با غلظت ۵٪ آماده و به نمونه اسانس به میزان ۷۵ میکرولیتر افزوده شد. ۶ دقیقه بعد، آلومینیوم کلراید ۱۰٪ که از قبل آماده شده بود به محلول افزوده و به خوبی هم‌زده شد. پس از گذشت ۵ دقیقه ۱ میلی‌لیتر سود^{۱۰} یک مولار اضافه شده و بلافاصله جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت شد. [۱۲].

نگهدارنده در محصولات گوشتی عمل می‌کند. این اسانس با ظاهر تقریباً بی‌رنگ و بوی کاملاً متمایز و مطلوب در آروما درمانی نیز استفاده و موجب جلوگیری از بی‌خوابی، اضطراب، تشنج و افزایش قوای جنسی می‌شود. دلیل اصلی عطر و طعم خاص این گیاه علفی وجود یک جزء معطر و طعم‌دهنده فرار به نام لینالول است که موجب تسکین ذهن مصرف‌کننده می‌شود. [۷].

هدف از انجام این پژوهش، شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گشنیز، تعیین میزان فنل و فلاونوئید کل^۳ و درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط این اسانس در محیط آزمایشگاهی بود. همچنین پتانسیل این اسانس برای مقابله در برابر باکتری‌های بیماری‌زایی چون لیستریا مونوسیتوزن^۴، استافیلوکوکوس اورئوس^۵، باسیلوس سرئوس^۶، شیگلا دیسانتری^۷، اشرشیا کلی^۸ و سالمونلا تیفی^۹ که همه از باکتری‌های منتقله توسط مواد غذایی هستند و به ترتیب موجب التهاب معده و روده‌ای و عفونت، مسمومیت غذایی، اسهال و تهوع، اسهال آبکی و خونی، اسهال و استفراغ و التهاب روده و معده می‌شوند [۸ و ۹]؛ با روش‌های متنوع کیفی و کمی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

اسانس دانه گیاه گشنیز از شرکت گیاه کالا خریداری شد. آزمون‌های مربوط به اسانس در آزمایشگاه‌های گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام گرفت.

۲-۱- طیف‌سنجی و تعیین ترکیبات شیمیایی عمده اسانس

ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده این اسانس (رقیق‌شده با سیکلوهگزان، مقدار نمونه ۰/۵ میکرولیتر) از روش طیف‌سنجی و با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی تعیین شد. گاز هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل به کار رفت.

7 - *Shigella dysenteriae*
8 - *Escherichia coli*
9 - Spectrophotometer
10 - NaOH

3 - Total phenol and flavonoid content
4 - *Listeria monocytogenes*
5 - *Staphylococcus aureus*
6 - *Bacillus cereus*

۲-۴- مهار رادیکال آزاد رادیکال آزاد ۲، ۲- دی فنیل -

۱- پریکیل هیدرازیل^{۱۱}

ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد (DPPH) با کمی تغییر از روش حجتی و همکاران [۱۳] انجام شد. از اسانس ابتدا محلول مادر (غلظت ۱۰۰۰ ppm) با استفاده از متانول تهیه و غلظت‌های بعدی از آن به‌دست آمد. سپس محلول متانولی ۰/۱ میلی‌مولار از پودر DPPH تهیه شد (کنترل) و جذب آن گرفته شد. غلظت‌های مختلف اسانس با این محلول به نسبت ۱:۱ ترکیب و ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شده و جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر گرفته شد. درصد بازدارندگی از اکسیداسیون توسط اسانس در غلظت‌های مختلف توسط معادله (۱) محاسبه شد.

معادله ۱: $\times 100$

[جذب محلول کنترل / (جذب نمونه - جذب محلول کنترل)]

۲-۵- مهار رادیکال آزاد ۲، ۲- آزینو بیس - ۳- اتیل بنزو

تیازولین - ۶- سولفونیک اسید^{۱۲}

درصد مهار رادیکال آزاد (ABTS⁺) توسط اسانس گشنیز با تغییرات اندکی از روش کاپاراکو و همکاران (۲۰۲۱) آزمایش و تعیین شد. محلول این رادیکال با غلظت مشخص با استفاده از آب مقطر به‌دست آمد. در ادامه پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار تهیه شد که این دو محلول با نسبت ۱:۲ باهم مخلوط و در مدت زمانی برابر با ۱۶ تا ۲۴ ساعت در جای تاریک نگهداری شدند. در روز بعد، محلول کاتیونی به‌دست آمده تا جایی با متانول رقیق شد که جذبی معادل ± 0.02 بدهد (محلول کنترل). سپس با نسبت ۱:۱ با رقت‌های مختلف عصاره که از قبل آماده شده بود ترکیب و پس از گذشت زمان ۶ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر گرفته شد. درصد مهار رادیکالی از طریق به‌دست آوردن اختلاف جذب نمونه‌ها از محلول کنترل و محاسبه نسبت آن با جذب محلول کاتیونی گزارش شد [۱۴].

۲-۶- بررسی قدرت ضد میکروبی اسانس

از ۶ باکتری بیماری‌زای غذازاد شامل *اشرشیا کلی* ATCC ۱۲۴۳۵، *شیگلا دیسانتری* ۱۳۳۱۳ ATCC، *سالمونلا تیفی* ATCC ۶۵۱۵۴، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۱۴۱۵۴، *لیستریا مونوسیژنر* ۱۹۱۱۵ ATCC و *باسیلوس سرئوس* ۱۰۸۷۶ ATCC برای تعیین قدرت ضد میکروبی اسانس به‌دست آمده از دانه گشنیز به ۴ روش انتشار در آگار به‌روش دیسک دیفیوژن^{۱۳} و چاهک^{۱۴}، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی استفاده شد.

۲-۶-۱- تهیه سوسپانسیون میکروبی

کشت تازه از پاتوژن‌ها، یک روز قبل از انجام آزمایشات با تلقیح باکتری‌ها بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار به‌دست آمد. سوسپانسیون استاندارد سوبه‌ها برای انجام آزمایشات مورد نیاز بود که با برداشتن مقداری از کلنی خالص پاتوژن‌ها و حل کردن آن در سرم فیزیولوژی تا رسیدن به کدورت نیم‌مک‌فارلند (1.5×10^8 CFU/mL) تهیه شد. کدورت موردنظر باید در طول موج ۶۲۵ نانومتر جذب معادل ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ داشته باشد [۱۵].

۲-۶-۲- فعالیت ضد میکروبی عصاره آلوئه‌ورا به روش

دیسک دیفیوژن

دیسک‌های خالی به‌مدت ۱۵ دقیقه در اسانس نگهداری شدند. پس از کشت سطحی از سوسپانسیون باکتری‌ها روی محیط مولر هیتون آگار، دیسک‌های حاوی اسانس، با فاصله از هم و دیوار پتری‌دیش روی سطح آگار قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت در انکوباتور^{۱۵} ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری، براساس میلی‌متر گزارش و نسبت به هم بررسی شدند [۱۶].

۲-۶-۳- فعالیت ضد میکروبی به روش چاهک در آگار

برای تعیین میزان مهارکنندگی از رشد توسط این اسانس بر پاتوژن‌های مورد استفاده از روش چاهک، ابتدا از

14 - Well diffusion agar
15- Incubator

11- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
12- 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), (ABTS)
13 -Disc diffusion agar

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای که تغییر رنگی نداشتند برداشته و بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت سطحی داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری، غلظت‌های اسانس در پلیت‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت دارای ویژگی باکتری‌کشی مشخص و گزارش شدند [۱۹].

۲-۷- آنالیز آماری داده‌ها

از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و آنالیز آماری یک‌طرفه داده‌ها (one way anova) استفاده شد. مقایسه بین میانگین داده‌ها از طریق آزمون دانکن با سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گشنیز

اصلی‌ترین ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده اسانس گشنیز به دست آمده با دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی، در جدول ۱ ذکر گردید و کروماتوگرام مربوط به آن در شکل ۱ نشان داده شد. مطابق با جدول ۱، این اسانس عمده‌تأ متشکل از مونوترپن‌ها و p-Cymene است. لینالول (L) با درصد ۵۲/۴، به عنوان ترکیب اصلی سازنده مشخص شد که این میزان با نتایج به دست آمده از پژوهشی که امیدی‌میرزایی و همکاران انجام دادند کم‌تر بود (۷۶/۷۵٪). تغییرات و تفاوت در میزان لینالول موجود در اسانس به دست آمده از دانه، بسته به مراحل مختلف بلوغ در آن است به این صورت که در شروع بلوغ دانه، درصد لینالول کم و در مراحل آخر به اوج خود می‌رسد [۲۰].

مونوترپن‌ها با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{16}$ بیشترین متابولیت ثانویه تولیدی توسط گیاهان هستند که به‌طور عمده می‌توان با استخراج اسانس گیاهان به آن‌ها دسترسی پیدا کرد. این هیدروکربن‌های فرار و مشتقات آن‌ها که مسئول عطر و طعم خاص گیاهان و میوه‌جات هستند؛ از گذشته با هدف

سوسپانسیون‌ها میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت سطحی داده سپس با استفاده از پلیت پاستور شیشه‌ای چاهک‌هایی روی آگار ایجاد شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از اسانس استریل‌شده به درون چاهک‌ها تزریق شد. یک چاهک به عنوان شاهد در نظر گرفته و با آب مقطر پر شد. پس از ۲۴ ساعت ماندن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، هاله عدم رشد بوجود آمده دور چاهک‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری و گزارش شد [۱۷].

۲-۶-۴- حداقل غلظت بازدارنده از رشد^{۱۶} توسط

اسانس دانه گشنیز

برای انجام این آزمون میکروبی، از روش میکرودیالوژن براث^{۱۷} استفاده شد. در این روش ابتدا غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس با استفاده از مولر هیتون براث^{۱۸} تهیه و با ۵ میلی‌لیتر از دی‌متیل سولفوکساید مخلوط شده رقت‌های بعدی نیز به دست آمدند. از هر کدام از رقت‌ها میزان ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سمپلر برداشته و در هر ستون از پلیت ۹۶ خانه ریخته شدند. در ادامه به هر خانه میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌ها اضافه شد (هر ردیف متعلق به یک باکتری بود). زمان انکوباتور گذاری ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود که پس از گذشت این زمان پلیت از انکوباتور خارج و معرف رنگی ۵ درصد TTC^{۱۹} به تمام خانه‌ها افزوده شد و دوباره به انکوباتور برای مدت ۳۰ دقیقه انتقال داده شد. این معرف در حضور رشد باکتری به رنگ قرمز در خواهد آمد که عدم تغییر رنگ به قرمز، حداقل غلظتی که مانع از رشد پاتوژن‌ها شده بود را مشخص کرد. در این آزمون ۲ شاهد نیز انتخاب شد. شاهد منفی خانه حاوی رقت‌های اسانس و محیط کشت بدون باکتری بود و شاهد مثبت درواقع سوسپانسیون باکتریایی درون محیط کشت براث بدون حضور اسانس در نظر گرفته شد [۱۸].

۲-۶-۵- حداقل غلظت باکتری‌کشی^{۲۰} توسط اسانس دانه

گشنیز

19 - 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
20- Minimum bactericidal concentration (MBC)

16 -Minimum inhibitory concentration (MIC)
17- Microdilution broth method
18- Müller-Hinton broth

ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌ها در گیاهان معطر شناخته می‌شوند. در پژوهش‌هایی که در سال‌های اخیر بر روی موش‌های آزمایشگاهی انجام شده، ویژگی‌های ضد درد، ضدمیکروب و ضد التهابی آن را نشان می‌دهد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ایجاد تعادل اکسیداتیو نیز از ویژگی‌های سیمن‌ها به‌شمار می‌آید. البته هنوز مقدار مشخص و ایمن قطعی برای مصرف آن مشخص نشده است. حلقه بنزنی موجود در آن ممکن است در مصارف بالاتر از حد مشخص برای مصرف‌کننده خطرآفرین باشد هرچند این ترکیب توسط سازمان غذا و داروی آمریکا^{۲۳} به‌طور کلی ایمن^{۲۴} شناخته می‌شود [۲۴]. مقدار این ترکیب در پژوهش امیدی‌میرزایی و همکاران کمتر تعیین شد (۱/۸۳٪) که تفاوت نتایج این دو مطالعه را توجیه می‌کند [۲۰]. در مطالعه دیگری میزان لینالول اسانس گشنیز ۶۶/۰۷٪ و میزان Cymene در آن ۶/۳۵٪ مشخص شد [۲۵].

نگهداری مواد غذایی و همچنین خاصیت درمانی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. از ویژگی‌های این ترکیبات می‌توان به خاصیت ضدمیکروبی، ضد التهابی و تعدیل میکروفلور روده اشاره کرد. همچنین در پژوهش‌های اخیر فعالیت ضد چاقی و ضد دیابت مونوترپن‌ها با ایجاد تعادل در متابولیسم در بدن بررسی و اثبات شده‌است. مونوترپن‌ها به صورت‌های گوناگونی یافت می‌شوند. لینالول^{۲۱} یک مونوترپن الکلی معطر و از عمده‌ترین و پرکاربردترین مونوترپن‌های یافت‌شده در گیاهان با فعالیت زیستی بالاست. این ترکیب از طریق اختلال در غشای سلول، اثر ضدمیکروب خود را القا می‌کند. عدم سمیت مونوترپن‌ها باعث افزایش پتانسیل آن‌ها در مواد خوراکی می‌باشد. باوجود تمام خواص ذکر شده از مونوترپن‌ها، هنوز میزان ایمن و دقیقی برای مصرف در غذاها تعیین نشده‌است [۲۱، ۲۲ و ۲۳]. مسئله مهمی که مطرح است درصد بالای Cymene^{۲۲}، هیدروکربنی فرار و معطر در اسانس می‌باشد. Cymenes به‌عنوان اجزاء اصلی با فعالیت

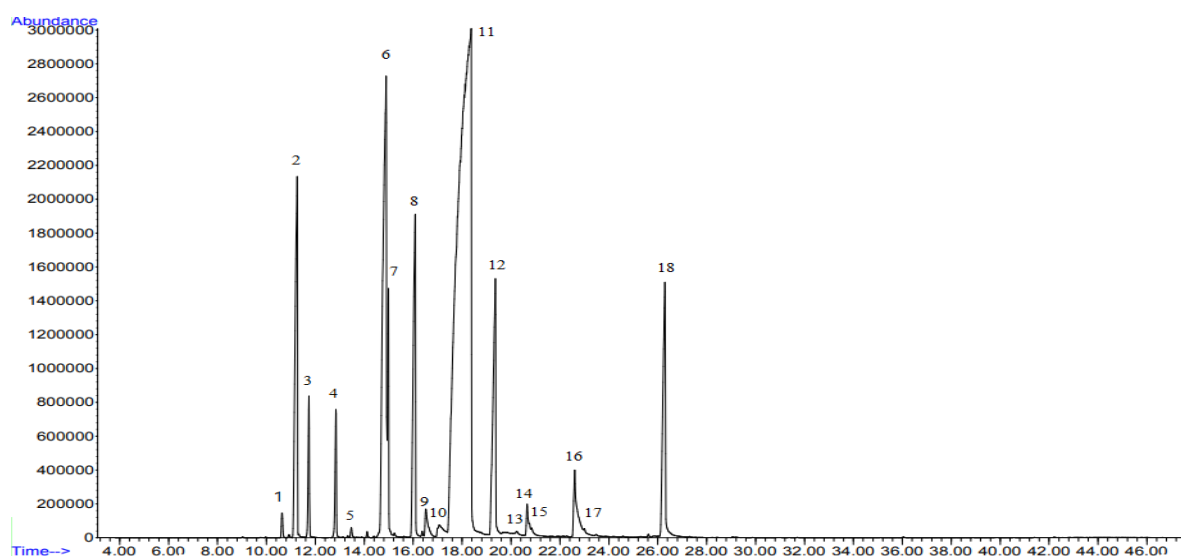


Figure 1. Chromatogram of coriander seed essential oil.

23 - U.S. Food and Drug Administration
24 - GRAS

21 - Linalool (2,6-dimethyl-2,7-octadien-6-ol)
22- 1-methyl-4-(1-methylethyl)-benzene

Table 1. Chemical composition of coriander seed essential oil

No	Compound	%	RT
1	Tricyclene	0.24	10.641
2	α -Pinene	6.30	11.253
3	Camphene	1.35	11.741
4	2- β - Pinene	1.36	12.852
5	β -Myrcene	0.12	13.474
6	Benzene	12.70	14.896
7	dl-Limonene	2.28	14.985
8	γ -Terpinene	5.55	16.074
9	cis-Linalool Oxide	0.73	16.519
11	Linalool	52.40	18.363
12	Camphor	5.72	19.363
13	dl-Limonene	0.21	20.229
14	α -Terpineol	0.62	20.662
15	Camphene	0.27	20.84
16	trans- Geraniol	1.85	22.607
17	Geraniol	0.30	22.995
18	2,6-Octadien-1-ol	5.29	26.295

تأثیر بالقوه‌ای بر مهار رادیکال‌های آزاد خواهد داشت. استفاده از رادیکال آزاد پایدار DPPH، برای بررسی ویژگی‌های آنتی اکسایشی مواد غذایی پیشنهاد شد و به همراه رادیکال کاتیونی ABTS ظرفیت کلی مهار رادیکال‌ها از طریق توانایی ماده در انتقال الکترون و یا هیدروژن تعیین و بررسی شد [۲۹ و ۳۰]. توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS توسط اسانس مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۲ گزارش شد. بالاترین قدرت مهار در غلظت ۲۵ ppm برابر با ۵۱/۹۵٪ برای رادیکال DPPH و ۴۴/۷۰٪ برای رادیکال آزاد ABTS بود. روند روبه‌بالا و تفاوت زیادی در درصد مهار رادیکال DPPH در پنج غلظت مورد بررسی مشاهده شد. مطابق با جدول ۲، به‌طور معناداری اثر مهاری از ۱۲/۸۹ در غلظت ۲۰۰ ppm به ۵۱/۹۵ درصد در غلظت ۱۰۰۰ رسید؛ برخلاف مهار ABTS که از ۳۳/۸۶ درصد در پایین‌ترین غلظت از اسانس، به ۴۴/۷۰ درصد در بالاترین غلظت اسانس رسید که اختلافی معادل با ۱۰/۸۴ درصد داشت. در پژوهشی که در مورد ویژگی‌های اسانس گشنیز و کاربرد آن در صنعت غذا بود؛ این ظرفیت مهاری معادل ۵۱/۰۵ درصد تعیین شد که تقریباً برابر با درصد

۳-۲- بررسی توانایی ضد اکسیداسیون اسانس گشنیز

پلی‌فنل‌ها از ترکیبات بسیار ارزشمند گیاهی هستند که علاوه بر ایجاد تغییراتی در رنگ و عطر و طعم مواد غذایی نقش دارند بلکه خصوصیات بیولوژیکی دیگری مانند خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی نیز بروز می‌دهند. درواقع رابطه معکوسی میان میزان پلی‌فنل موجود در خوراک مصرفی و اکسیداسیون برقرار است؛ به‌این‌صورت که گروه‌های پلی‌فنلی با پذیرش الکترون موب بروز اختلال در واکنش‌های اکسیداتیو درون سلول شده و باعث برقراری تعادل خواهند شد. [۲۶ و ۲۷]. محتوای کل فنلی و فلاونوئیدی اسانس حاصل شده از دانه گیاه گشنیز، به‌ترتیب معادل با 0.01 ± 0.07 میلی‌گرم گالیک‌اسید و 0.77 ± 0.77 میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم از اسانس محاسبه شد. مقادیر ذکر شده با مطالعات دیگری که در این زمینه انجام شد متفاوت و بالاتر از آن‌ها بود که این تفاوت می‌تواند به دلایل مختلفی چون فصل برداشت و دروه بلوغ دانه، روش آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی و منحنی استانداردهای متفاوت باشد [۲۸]. به‌هرحال، محتوای فنلی و فلاونوئیدی اسانس

درصد مهار رادیکال ABTS بیشتر از DPPH و معادل ۶۶٪/۶۰ بوده است. درصد مهار رادیکال DPPH نزدیک به نتیجه حاضر و برابر با ۵۳٪/۷۵ بود [۷]. نتایج قدرت ضد اکسیداسیون اسانس تقریباً در مطالعات انجام شده مشابه بود. اثر آنتی اکسیدانی اسانس می تواند از عوامل متعددی چون میزان مونوترپن ها و پلی فنل های موجود در آن باشد.

مشخص شده در پژوهش حاضر است [۲۵]. خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس گشنیز در مطالعه دیگری نیز محاسبه و غلظتی که در آن درصد مهاری DPPH به ۵۰ درصد رسید معادل ۹ تا ۱۸ گرم بر لیتر گزارش شد [۳۱]. ولی برخلاف نتایجی که در جدول ۲ ذکر شد؛ نتایجی که امیدی میرزایی و همکاران در مورد خاصیت ضد اکسایشی این اسانس به دست آوردند نشان داد که در غلظت های یکسان (۹۰۰ ppm)،

Table 2. Antioxidant activity of coriander essential oil (DPPH and ABTS)

Concentration (ppm)	Radical scavenging effect (%)	
	DPPH	ABTS
200	12.89 ± 0.24 ^A	33.86 ± 0.77 ^A
400	27.61 ± 0.72 ^B	37.75 ± 0.42 ^B
600	43.35 ± 0.87 ^C	39.44 ± 0.45 ^C
800	50.14 ± 0.29 ^D	41.49 ± 0.89 ^D
1000	51.95 ± 0.24 ^E	44.70 ± 0.70 ^E

The data shown in the table are "mean ± standard deviation" in 3 replicates. The capital letters in each column indicate a significant difference at $P < 0.05$ between radical scavenging effect of different essential oil concentrations.

همچنین حساسیت زایی این نگهدارنده ها، بررسی و معرفی نگهدارنده های طبیعی و با قدرت بالای ضد میکروبی به یکی از نیازهای اساسی در صنایع غذایی تبدیل شده است. از پاتوژن های اصلی که می توان به عنوان مسئول عفونت های ناشی از ماده خوراکی آلوده معرفی کرد، دو باکتری / شرشیا کلی و سالمونلا هستند [۳۲ و ۳۳]. نتایج تعیین قدرت بازدارندگی اسانس دانه گشنیز در برابر شش باکتری پاتوژن (سه باکتری گرم مثبت و سه باکتری گرم منفی) با روش انتشار در آگار به کمک دیسک (دیسک دیفیوژن) در جدول ۳ گزارش شده است.

۳-۳- قدرت ضد میکروبی اسانس گشنیز

عصاره ها و اسانس ها سرشار از ترکیبات ضد میکروبی چون پلی فنل ها و ترپن ها هستند. Cymene مهم ترین ضد میکروب موجود در آویشن و پونه کوهی است. میزان این ماده در اسانس دانه گشنیز مورد آزمایش به حد قابل توجهی بالاست که فعالیت بالای ضد باکتری، ضد قارچی و ضد ویروسی را توجیه می کند. از دیگر استفاده های این ترکیب در پیشگیری و درمان سرفه و خلط است [۲۴]. عدم رعایت بهداشت و ایمنی در صنعت غذا و مصرف خوراک آلوده موجب ایجاد بیماری های ناشی از مواد غذایی در مردم سرتاسر جهان شده که خطری روبه رشد در برابر سلامت عمومی ایجاد کرده است. از راه های ریشه کن کردن این بیماری ها استفاده از نگهدارنده ها بود که با توجه به مقاومت این نوع پاتوژن ها و

Table 3. Antibacterial effect of coriander essential oil (disc diffusion agar method)

Inhibition zone (mm)	Pathogens					
	<i>E. coli</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>
Coriander essential oil	18.20 ± 0.40 ^A	14.10 ± 0.50 ^B	16.30 ± 0.20 ^C	19.60 ± 0.50 ^D	20.80 ± 0.35 ^E	24.00 ± 0.30 ^F

The data shown are "mean ± standard deviation", with 3 replicates. Different capital letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between the antimicrobial effect of essential oil on pathogens.

روش دیسک دیفیوژن آگار بود. در هر دو آزمون، توانایی بازدارندگی اسانس در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به گرم منفی‌ها بیشتر بود که نشان‌دهنده مقاومت بالاتر گرم منفی‌ها نسبت به این اسانس را نشان می‌دهد. قابل به ذکر است که در آزمون میکروبی چاهک برخلاف دیسک دیفیوژن، باکتری گرم منفی /شرشیا کلی حساسیت بیشتری به اسانس نشان داده و هاله برگتری اطراف آن نمایان شد. قطر این هاله نزدیک به قطر عدم رشد گرم‌مثبت‌ها بود.

مطابق با نتایج، کم‌ترین قطر هاله عدم رشد در روش دیسک آگار حاوی اسانس در محیط رشد باکتری شیگلا دیسانتری و برابر با ۱۴/۱۰ میلی‌متر مشاهده شد. بزرگ‌ترین هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس (۲۴ میلی‌متر) بود.

توانایی مهار رشد باکتری توسط اسانس گشنیز به روش انتشار در چاهک در جدول ۴ آورده شده است. نتایج تقریباً مشابه

Table 4. Antibacterial effect of coriander essential oil (well diffusion agar method)

Inhibition zone (mm)	Pathogens					
	<i>E. coli</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>
Coriander essential oil	20.10 ± 0.60 ^A	16.50 ± 0.25 ^B	16.50 ± 0.40 ^C	21.40 ± 0.30 ^C	22.20 ± 0.50 ^D	24.60 ± 0.20 ^E

The data shown are "mean ± standard deviation" with 3 replicates. Similar capital letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between the antimicrobial effect of essential oil on pathogens.

حساسیت کم‌تری از خود در برابر اسانس نشان داد. غصنفری و همکاران توانایی ضد میکروبی اسانس دانه گشنیز را در برابر یک باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) و یک باکتری گرم منفی بررسی کردند. غلظتی از اسانس که در روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک استفاده شد برابر با ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. قطر هاله به ترتیب ۱۰ و ۱۵ میلی‌متر گزارش شد. همچنین نتایج حاصل از آزمون MIC و MBC اسانس در برابر این باکتری به ترتیب برابر با غلظت ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ارزیابی شد که از غلظت‌های تعیین شده در مطالعه حاضر بیشتر است درحالی که اثر بیشتر اسانس آن‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت با نتایج ما مطابقت داشت [۱۱]. در مطالعه دیگری اثر این اسانس بر باکتری‌های مختلفی مانند /شرشیا کلی، لیستریا مونوسیژنر و /استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از مشخص کردن کم‌ترین غلظت مهار از رشد بررسی شد. نتایج مشابه با مطالعات قبلی و مبنی بر حساسیت بالاتر گرم مثبت‌ها در برابر اسانس بود. غلظت مشخص شده از اسانس در برابر /شرشیا کلی برابر با ۵۰، ۶/۲۵ در برابر پاتوژن لیستریا مونوسیژنر

برای تعیین قدرت بازدارندگی و کشندگی باکتری‌های بیماری‌زای منتخب، غلظت‌های مختلفی از اسانس تهیه شد و نتایج آزمون‌ها در جدول ۵ گزارش شد. مطابق با جدول ۵، اسانس گشنیز در پایین‌ترین غلظت‌ها توانایی جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا را داشت به طوری که در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قادر به بازداشتن رشد سه باکتری گرم‌مثبت مورد آزمایش بود. این اسانس حتی در غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر توانست باکتری‌های گرم منفی که مقاومت بالاتری داشتند را از رشد باز دارد. مطابق با نتایج، مقاوم‌ترین باکتری نسبت به اسانس، شیگلا دیسانتری بود که در غلظت ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عدم رشد خود را نشان داد. همچنین این اسانس خاصیت کشندگی در برابر تمام پاتوژن‌های مورد نظر نشان داد. کم‌ترین غلظتی از اسانس که توانست قابلیت کشندگی در برابر باکتری مقاوم شیگلا دیسانتری داشته باشد، غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس بود. همچنین باکتری گرم‌مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس در تست MBC نسبت به بقیه باکتری‌های گرم‌مثبت

و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شد [۳۴]. نتایجی که از بررسی اسانس در مطالعه دیگری به دست آمد متفاوت با نتایج ما بود. قطر هاله اطراف دیسک حاوی اسانس دانه گشنیز که در معرض باکتری *باسیلوس سرئوس* قرار داشت برابر با ۳۰/۳۰ میلی‌متر بود. این مقدار برای دو باکتری *شرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* به ترتیب برابر با ۲۹/۲۰ و ۲۳/۱۵ میلی‌متر گزارش شد. هرچند اسانس مورد مطالعه حاضر در غلظت پایین‌تری دارای قدرت بازدارندگی از رشد بود [۲۰]. باتوجه به درصد کمتر p-Mycene و پلی‌فنل‌های اندازه‌گیری شده در هر دو مطالعه می‌توان تا حدی دلیل این تفاوت‌ها را حدس زد. مهار پاتوژن توسط ضد میکروب‌ها با حمله عامل تهاجمی به قسمت‌های مختلفی از غشاء انجام می‌گیرد. تفاوت غشاء

دو نوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی می‌تواند دلیلی بر تفاوت عکس‌العمل آن‌ها در برابر اسانس باشد [۳۶ و ۳۷]. اثر ضد میکروبی این اسانس در مطالعات زیادی بر روی باکتری‌ها و قارچ‌ها انجام گرفت و نتایج حاکی از اثر مناسب و قوی گشنیز بر روی عامل میکروبی بود. این اسانس به تنهایی و یا با برهم‌کنش با آنتی‌بیوتیک‌های دیگر می‌تواند اثر قابل توجهی بر بیماری‌زها به‌ویژه باکتری‌های گرم مثبت داشته باشد. درواقع استفاده از این ماده به صورت ترکیبی با آنتی‌بیوتیک مناسب می‌تواند اثر سینرژیستی داشته، نقاط ضعف را بهبود بخشد و باعث توسعه ویژگی‌های اسانس شده و مقاومت پاتوژن‌ها را در برابر عوامل ضد میکروبی قدیمی شکست دهد. آنتی‌بیوتیک جنتامایسین می‌تواند یکی از کاندیدهای ترکیب با اسانس دانه گشنیز با خاصیت هم‌افزایی باشد [۳۶ و ۳۷].

Table 5. MIC and MBC of coriander seed essential oil

Bacteria	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>E. coli</i>	4	256
<i>S. dysenteriae</i>	8	512
<i>S. typhi</i>	4	256
<i>S. aureus</i>	2	256
<i>L. monocytogenes</i>	2	128
<i>B. cereus</i>	2	128

نیز برای توجیه ویژگی‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی محاسبه و گزارش شد. اصلی‌ترین ویژگی اسانس مورد آزمایش، ویژگی ضد میکروبی آن در برابر شش باکتری بیماری‌زا بود. اسانس دانه گشنیز فعالیت ضد باکتری بسیار بالایی از خود نشان داد. براساس نتایج به دست آمده می‌توان ادعا داشت که این اسانس در غلظت و دوز مشخص می‌تواند پتانسیل بالایی در صنعت غذا به عنوان یک ماده افزودنی ایمن و نگهدارنده قوی داشته باشد.

۴- نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، ابتدا ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گشنیز براساس طیف‌سنجی مشخص و مونوترپن لینالول و p-Cymene به عنوان ترکیب عمده تعیین شد. مونوترپن‌ها به عنوان اصلی‌ترین ترکیبات سازنده اسانس‌ها، نقش اساسی در ویژگی‌های ضد اکسایشی و ضد میکروبی داشته که براساس آزمایش‌های انجام شده بر اسانس در مطالعه حاضر، اثر مهاری بر رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS تعیین و به ترتیب ۵۱/۹۵ و ۴۴/۷۰ درصد در بالاترین غلظت آماده شده گزارش شد. میزان محتوای فنل و فلاونوئید کل اسانس

۵- تقدیر و تشکر

خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

۵- منابع

- [1] Novais, C., Molina, A. K., Abreu, R. M. V., Santo-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., Pereira, C., & Barros, L. (2022). Natural Food Colorants and Preservatives: A Review, a Demand, and a Challenge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(9), 2789-2805.
- [2] Benkhoud, H., M'Rabet, Y., Gara-ali, M., Mezni, M., & Hosni, K. (2021). Essential oils as flavoring and preservative agents: Impact on volatile profile, sensory attributes, and the oxidative stability of flavored extra virgin olive oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(5), e15379.
- [3] Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Hemmati Kaykha, M. E., Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). Utilization of plantago major seed mucilage containing citrus limon essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition*. 9(3):1625-1639.
- [4] Jugreet, B. S., Suroowan, S., Rengasamy, R. R. K., & Mahomoodally, M. F. (2020). Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 89-105.
- [5] Mahleyuddin, N. N., S. Moshawih, L. C. Ming, H. H. Zulkifly, N. Kifli, M. J. Loy, M. M. Sarker, Y. M. Al-Worafi, B. H. Goh, S. Thuraisingam & H. P. Goh. (2022). Coriandrum sativum L.: A Review on Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Cardiovascular Benefits. *Molecules*, 27(1), 209.
- [6] Tanavar, H., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., Mehrnia, M. A. (2021). Investigation of the chemical properties of Mentha pulegium essential oil and its application in Ocimum basilicum seed mucilage edible coating for extending the quality and shelf life of veal stored in refrigerator (4°C). *Food Science & Nutrition*, 9(10), 5600-5615.
- [7] Al-Khayri, J. M., Banadka, A., Nandhini, M., Nagella, P., Al-Mssallem, M. Q., & Alessa, F. M. (2023). Essential Oil from *Coriandrum sativum*: A review on Its Phytochemistry and Biological Activity. *Molecules*, 28(2), 696.
- [8] Behbahani, B. A., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M. (2013). Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus" in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(7), 1652-1658.
- [9] Ali, A. A., Altemimi, A. B., Alhelfi, N., & Ibrahim, S. A. (2020). Application of Biosensors for Detection of Pathogenic Food Bacteria: A Review. *Biosensors*, 10(6), 58.
- [10] Zanganeh, H., Mortazavi, S., Shahidi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Evaluation of the chemical and antibacterial properties of Citrus paradise essential oil and its application in Lallemandia iberica seed mucilage edible coating to improve the physicochemical, microbiological and sensory properties of lamb during refrigerated storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 1-16.
- [11] Ghazanfari, N., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Mohammadi, M. (2020). Microwave-assisted hydrodistillation extraction of essential oil from coriander seeds and evaluation of their composition, antioxidant and antimicrobial activity. *Heliyon*, 6(9), 2405-8440.
- [12] Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2022). Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18(4), 467-482.
- [13] Kiarsi, Z., Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). In vitro antimicrobial effects of *Myristica fragrans* essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 40(3), e12782.
- [14] Kaparakou, E. H., Kanakis, C. D., Gerogianni, M., Maniati, M., Vekrellis, K., Skotti, E., & Tarantilis, P. A. (2021). Quantitative determination of aloin, antioxidant activity, and toxicity of Aloe vera leaf gel products from Greece. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 101(2). 414-423.
- [15] Sureshjani, M. H., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Behbahani, B. A., & Shahidi, F. (2014). Antimicrobial effects of *Kelussia odoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. *Journal of Paramedical Sciences*, 5(2), 115-120.
- [16] Yousefipour, H., Mehrnia, M. A., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., & Hojjati, M. (2022). Investigation of the functional groups of bioactive compounds, radical scavenging potential, antimicrobial activity of *Trigonella foenum* aqueous

extract "in vitro". *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 18(4), 415- 426.

[17] Zamanpour Boroujeni, A., Alizadeh Behbahani, B., Mehrnia, M. A., Noshad, M., & Hojjati, M. (2024). Evaluation of antioxidant activity and antimicrobial effect of *Nigella sativa* oil on some pathogenic bacteria and its interaction with chloramphenicol antibiotic. *mdrsjrn*s, 20(145), 111-121.

[18] Tabatabaei Yazdi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4). 55-61.

[19] Noshad, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2024). Evaluation of chemical properties and antimicrobial effect of *Thymus trautvetteri* essential oil on a number of bacteria causing infection and food poisoning: a laboratory study. *mdrsjrn*s, 20(145), 99-110.

[20] Omidi Mirzaei, M., Hojjati, M. Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). Determination of chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of coriander seed essential oil on a number of pathogenic microorganisms. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 16(2), 221-233.

[21] de Alvarenga, J. F. R., Genaro, B., Costa, B. L., Purgatto, E., Manach, C., & Fiamoncini, J. (2023). Monoterpenes: current knowledge on food source, metabolism, and health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(10), 1352-1389.

[22] An, Q., J.-N. Ren, X. Li, G. Fan, S.-S. Qu, Y. Song, Y. Li & S.-Y. Pan (2021). Recent updates on bioactive properties of linalool. *Food & Function*, 12(21), 10370-10389.

[23] Yeganegi, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Asili, J., Behbahani, B.A. and Beigbabaie, A. (2018). *Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial pathogenesis*, 116, pp.62-67.

[24] Marchese, A., C. R. Arciola, R. Barbieri, A. S. Silva, S. F. Nabavi, A. J. Tsetegho Sokeng, M. Izadi, N. J. Jafari, I. Suntar, M. Daglia & S. M. Nabavi. (2017). Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents: A Particular Focus on p-Cymene. *Materials*, 10(8). 947.

[25] Kačaniová, M., L. Galovičová, E. Ivanišová, N. L. Vukovic, J. Štefániková, V. Valková, P. Borotová, J. Žiarovská, M. Terentjeva, S. Felšöciová & E. Tvrdá (2020) Antioxidant, Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Essential Oil for Its Application in Foods. *Foods*, 9(3). 282.

[26] Mutha, R.E., Tatiya, A.U., & Surana, S.J. (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds

and their role in therapeutics: an overview. *Futur J Pharm Sci*. 7(1):25.

[27] Heydari, S., Jooyandeh, H., Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). The impact of Qodume Shirazi seed mucilage-based edible coating containing lavender essential oil on the quality enhancement and shelf life improvement of fresh ostrich meat: An experimental and modeling study. *Food Science & Nutrition*, 8(12), 6497-6512.

[28] Bista, R., Ghimire, A., & Subedi, S. (2020). Phytochemicals and Antioxidant Activities of Aloe Vera (*Aloe Barbadensis*). *J Nut Sci Heal Diet*. 1(1): 25-36.

[29] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaei Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food Science & Nutrition*, 9(5), 2458-2467.

[30] Wołosiak, R., Drużyńska, B., Derewiaka, D., Piecyk, M., Majewska, E., Ciecierska, M., Worobiej, E., & Pakosz, P. (2022). Verification of the Conditions for Determination of Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays—A Practical Approach. *Molecules*, 27(1). 50.

[31] Raveau, R., Fontaine, J., Verdin, A., Mistrulli, L., Laruelle, F., Fourmentin, S., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2021). Chemical Composition, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Clary Sage and Coriander Essential Oils Produced on Polluted and Amended Soils-Phytomanagement Approach. *Molecules*, 26(17). 5321.

[32] Silva, F., & Domingues, F. C. (2017). Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1), 35-47.

[33] Duarte, A., Luís, Â., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2016). Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*, 61, 115-122.

[34] Özkinali, S., Şener, N., Gür, M., Güney, K., & Olgun, Ç. (2017). Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Coriander & Galangal Essential Oil. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 51(3). 221-224.

[35] Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 980-987.

[36] Aelenei, P., Rimbu, C. M., Guguianu, E., Dimitriu, G., Aprotosoai, A. C., Brebu, M., Horhoge, C.E., & Miron, A. (2019). Coriander essential oil and linalool – interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 68(2), 156-164.

[37] Alghooneh, A., Alizadeh Behbahani, B., Noorbakhsh, H., Yazdi, F. T. (2015). Application of

intelligent modeling to predict the population dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Frankfurter

sausage containing Satureja extract. *Microbial Pathogenesis*. 85, 58-65.



Scientific Research

Coriander seed (*Coriandrum sativum*) essential oil: determination of chemical composition, antioxidant capacity and antimicrobial activity

Narges Sharifat¹, Mohammad Amin Mehrnia^{*2}, Hassan Barzegar², Behrooz Alizadeh Behbahani²

¹M. Sc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

²Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2024/6/1 Accepted:2024/9/28 Keywords: Antimicrobial agent, Chemical composition, Coriander seed, Preservative. DOI: 10.22034/FSCT.22.158.130. *Corresponding Author E- mehrnia@asnrukh.ac.ir	Nowadays food industry, investigating bioactivity of different plant extracts and essential oils as natural additives and quality enhancers plays a great role for responding to food related health issues and the need of safe products with improved overall quality according to consumer's diverse taste. In present study, chemical composition along with the antioxidant and antimicrobial properties of the coriander essential oil were investigated. According to the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) outputs, Linalool identified as the major component (52.40%) in the essential oil. Total phenol and flavonoid estimated about 75.60 mg GAE/g and 715.33 mg QE/g essential oil while antioxidant capacity of the substance evaluated and showed that unlike ABTS assay, essential oil in DPPH assay reached a higher level of radical scavenging slightly more than %50 (%51.95) at same concentration of 1000 ppm. The smallest and largest diameters of inhibition zones at disk diffusion agar method belonged to <i>Shigella dysenteriae</i> (14.10 mm) and <i>Bacillus cereus</i> (24 mm). Minimum inhibitory concentrations (MIC) against <i>Escherichia coli</i>, <i>Shigella dysenteriae</i>, <i>Salmonella typhi</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Bacillus cereus</i> estimated 4, 8, 4, 2, 2 and 2 mg/mL while minimum bactericidal concentrations (MBC) 256, 512, 256, 256, 128, 128 mg/mL respectively. Based on the overall results, coriander seed essential oil at certain concentrations could have a high potential as a safe food additive and a strong preservative for application in the industry.



ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی و اثر ضد قارچی اسانس مورخوش (*Zhumeria majdae*) بر کپک‌های عامل پوسیدگی و فساد میوه پرتقال طی انبارمانی

مصطفی رحمتی جنیدآباد^{۱*}، محمدرضا زارع بوانی^۱، خلیل دلفان حسن زاده^۲

۱- دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.

۲- مربی، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۱۰	در این پژوهش، ویژگی‌های شیمیایی و اثر ضد قارچی اسانس مورخوش (<i>Zhumeria majdae</i>) بر کپک‌های عامل پوسیدگی و فساد میوه پرتقال طی انبارمانی بررسی گردید. روش تقطیر با آب برای استخراج اسانس مورخوش مورد استفاده قرار گرفت. مقدار فنول کل (مطابق روش فولین سیوکالتو)، میزان فلاونوئید کل (بر اساس روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم) و اثر آنتی‌اکسیدانی (بر پایه روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS) و فعالیت ضد قارچی (بر پایه روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی) اسانس در برابر پنی‌سیلیوم/یتالیکوم و پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم بررسی گردید. محتوای فنول کل و فلاونوئید کل اسانس به ترتیب برابر با ۵۱/۳۸ GAE/g و ۲۲/۱۸ mg QE/g به دست آمد. اسانس مورخوش قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بود (به ترتیب ۶۱/۵۰ و ۶۷/۸۵ درصد). نتایج اثر ضد قارچی اسانس مورخوش نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد برای سویه‌های قارچی پنی‌سیلیوم/یتالیکوم و پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم در روش دیسک دیفیوژن آگار به ترتیب برابر با ۱۱/۱۰ و ۱۳/۷۰ میلی‌متر و در روش چاهک آگار برابر با ۱۲/۲۰ و ۱۴/۹۰ میلی‌متر می‌باشد. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای این سویه‌ها معادل ۴ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی برابر با ۶۴ و ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. مطابق نتایج، اسانس مورخوش را می‌توان بصورت ماده ضد میکروب طبیعی به‌منظور جلوگیری از رشد سویه‌های قارچی عامل پوسیدگی و فساد میوه پرتقال طی انبارمانی استفاده نمود.
کلمات کلیدی: پرتقال، پوسیدگی پس از برداشت، اسانس مورخوش، اثر ضدقارچی، ترکیبات فنولی.	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.144. * مسئول مکاتبات: rahmati@asnruk.ac.ir	

۱- مقدمه

مدت طولانی به عنوان ابزار کنترل جایگزین پس از برداشت مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

مورخوش (*Zhumeria majdae*) درختچه‌ای معطر چند ساله از خانواده نعنائیان بومی نواحی جنوبی ایران است که در دامنه‌های صخره‌ای نسبتاً لخت می‌روید. اسانس آن بوی مطبوع قوی دارد و از این گیاه به عنوان داروی معده درد، نفخ، اسهال، سوء هاضمه، سرماخوردگی، سردرد، التیام زخم و ضد عفونی کننده و درمان قاعدگی استفاده می‌شده است. از نظر فیتوشیمیایی، وجود برخی ترکیبات مانند فلاونوئیدها، دی تربنوئیدها و تری تربنوئیدها در مورخوش شناسایی شده است. علاوه بر این، فعالیت سیتوتوکسیک، ضد التهابی، ضد درد، ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن در مطالعات مختلف گزارش شده است [۱۸، ۱۹]. مطالعات پیشین در مورد اسانس مورخوش، سطوح بالای لینالول (۳۵/۶ - ۵۳/۳ درصد) و کامفور (۲۳/۸ - ۴۳ درصد) را نشان داده است [۲۰، ۲۱]. بنابراین، هدف از این مطالعه، استخراج اسانس مورخوش، تعیین محتوای فنول و فلاونوئید کل، بررسی اثر آنتی اکسیدانی و اثر ضد قارچی آن در برابر سویه‌های قارچی پنی‌سیلیوم / ایتالیکوم و پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم جهت بررسی قابلیت اسانس بعنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- استخراج اسانس

خشک کردن برگ‌ها توسط هوای محیط و در سایه انجام شد و سپس نمونه‌های خشک شده به پودر تبدیل شدند. از برگ‌های پودر شده برای استخراج اسانس استفاده شد. برای هر نوبت تقطیر با آب ۱۰۰ گرم نمونه استفاده گردید. عمل اسانس گیری به مدت ۳ ساعت انجام شد و سپس اسانس توسط Na_2SO_4 انهیدروس خشک گردید. اسانس حاصل در ظروف تیره و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۲].

۲-۲- محتوای فنول کل

محتوای فنول کل با استفاده از روش وانگ و همکاران (۲۰۱۷) تعیین شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۵ میلی‌لیتر

مرکبات یکی از رایج‌ترین محصولات میوه‌ای است که در مناطق نیمه گرمسیری و گرمسیری در سراسر جهان کشت می‌شود. برزیل سال‌هاست که بازار جهانی مرکبات را رهبری کرده است و به سمت فراوری گرایش دارد و به دنبال آن ایالات متحده و چین قرار دارند. زیان‌های اقتصادی عظیم در باغداری در سرتاسر جهان عموماً بازتابی از بروز چندین بیماری در مراحل پس از برداشت است. بیماری‌هایی مانند پوسیدگی ساقه، آنتراکنوز، لکه سیاه و ملانوز ممکن است تحت شرایط خاصی مهم باشند اما کپک به عنوان مهم‌ترین بیماری پس از برداشت در تولید مرکبات در نظر گرفته می‌شود [۱]. بطوریکه گزارش شده است که کپک تا ۱۵ درصد از همه بیماری‌های پس از برداشت را شامل می‌شود [۲].

پاتوژن قارچی اصلی که باعث ایجاد کپک در مرکبات می‌گردد، پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم است که کپک سبز رنگ نامیده می‌شود [۱]. الشیخ و یحیی در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که ۳۹/۵ درصد کپک‌زدگی در مرکبات مربوط به پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم و پنی‌سیلیوم ایتالیکوم، ۲۵/۵ درصد مربوط به پنی‌سیلیوم سیتیرینوم و ۰/۹۱ درصد مربوط به فوزاریوم سولانی می‌باشد [۳].

کنترل پس از برداشت این پاتوژن‌ها توسط قارچ‌کش‌های شیمیایی مصنوعی بصورت کاملاً کارآمد انجام می‌شود. بااین حال، کاهش تعداد مواد فعال مجاز، افزایش مقاومت برخی از پاتوژن‌های قارچی پس از برداشت در برابر قارچ‌کش‌های مجاز و افزایش تقاضای مصرف‌کننده برای میوه‌ها و سبزیجات با کیفیت بالا و ایمن، تلاش‌ها را برای توسعه روش‌های کنترل جایگزین افزایش داده است. عصاره‌ها و اسانس‌های به دست آمده از بسیاری از گیاهان اخیراً به دلیل فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی خود محبوبیت و علاقه علمی به دست آورده‌اند. نتایج زیادی در مورد خواص ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی حاوی انواع مختلف ترکیبات فنولی گزارش شده است [۱۷-۴]. ترکیبات فنولی منبعی غنی از بیوسیدها و نگهدارنده‌ها هستند که برای

در این فرمول، AC جذب نمونه کنترل و AS جذب نمونه می‌باشند.

۲-۴-۲- مهار رادیکال ABTS

از روش امیدپناه و همکاران (۲۰۱۵) با تغییرات مورد نیاز جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بر پایه مهار رادیکال آزاد ABTS استفاده شد. ابتدا غلظت ۷ میلی‌مولار ABTS (2,20-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-) (sulphonic acid) در آب تهیه و سپس کاتیون رادیکال ABTS با واکنش محلول استوک ABTS با محلول ۲/۴۵ میلی‌مولار پر سولفات پتاسیم و اجازه دادن به مخلوط در تاریکی در دمای اتاق به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت قبل از استفاده تولید گردید. محلول رادیکال کاتیون ABTS با اتانول تا جذب ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر، ۵۰۰ میکرولیتر اتانول، ۱۵ میکرولیتر محلول رادیکال کاتیون ABTS و ۲۰ میکرولیتر اسانس به لوله آزمایش اضافه و جذب محلول در طول موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در نهایت از معادله زیر برای بررسی فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS استفاده شد:

$$\%inhibition = [(AC-AS)/AC] * 100$$

در این معادله، AC و AS به ترتیب جذب نمونه کنترل و جذب نمونه می‌باشند [۲۵].

۲-۵-۲- فعالیت ضد میکروبی

اثر ضد قارچی اسانس مورخوش در برابر در برابر سویه‌های پنی‌سیلیوم ایتالیکوم و پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم مطابق روش رحمتی جنیدآباد و همکاران (۱۴۰۱) بررسی گردید. برای این منظور از آزمون‌های ضد میکروبی دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی استفاده شد.

۲-۵-۱- دیسک دیفیوژن آگار

در این آزمون، ابتدا اسانس مورخوش با کمک فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی استریل گردید. در ادامه، دیسکهای بلانک در اسانس مورخوش به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس دیسکهای بلانک روی سطح محیط کشت

اسانس، ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو و ۱ میلی‌لیتر محلول Na_2CO_3 (۷/۵ درصد) بود. پس از ۲ ساعت گرمخانه گذاری در دمای محیط، مخلوط با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. مقادیر جذب مربوطه در ۷۶۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. محتوای فنول کل اسانس با توجه به معادله به دست آمده از نمودار استاندارد اسید گالیک محاسبه و نتایج بصورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در هر گرم اسانس (mg GAE/g) گزارش شد [۲۳].

۲-۳- محتوای فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل از روش کلرید آلومینیوم استفاده شد [۲۴]. به طور خلاصه، مخلوط واکنش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه و ۳۰۰ میکرولیتر محلول $NaNO_2$ (۱:۲۰ وزنی/حجمی) به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از آن، ۳۰۰ میکرولیتر $AlCl_3$ (۱:۱۰ وزنی/حجمی)، ۲ میلی‌لیتر محلول ۱ مولار هیدروکسید سدیم و ۱/۹ میلی‌لیتر آب مقطر به مخلوط واکنش اضافه و همزده گردید. جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۱۰ نانومتر تعیین شد. از کوئرتستین برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج محتوای فلاونوئید کل بر حسب میلی‌گرم معادل کوئرتستین در گرم اسانس (mg QE/g) بیان گردید.

۲-۴-۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۲-۴-۱- مهار رادیکال DPPH

فعالیت مهار رادیکال DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) اسانس مطابق روش سعیدی و همکاران (۲۰۱۹) با تغییرات مورد نیاز ارزیابی گردید [۱۹]. برای این منظور، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول اسانس به ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب محلول در طول موج ۵۱۸ نانومتر ثبت گردید. فعالیت مهار رادیکال اسانس از معادله زیر محاسبه شد:

$$\%inhibition = [(AC-AS)/AC] * 100$$

از اسانس که سبب جلوگیری از رشد سویه‌های قارچی شده بود، بعنوان حداقل غلظت کشندگی آن در نظر گرفته شد.

۲-۶- آنالیز آماری

تمامی داده‌های جمع آوری شده با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. میانگین تفاوت بین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارزیابی شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) تجزیه و تحلیل و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار MS Excel 2019 ترسیم شدند. تمام آزمون‌ها سه مرتبه تکرار شدند.

۳- نتایج و بحث

ترکیبات فنولی متابولیت‌های ثانویه هستند که در بافت‌های گیاهی مانند گل‌ها، دانه‌ها، ریشه‌ها و قسمت‌های خوراکی یافت می‌شوند. این ترکیبات به طور گسترده به دلیل فعالیت‌های مفیدشان، از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد توموری و ضد میکروبی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. بیش از ۸۰۰۰ ترکیب فنولی با ساختارهای متنوع شناسایی شده است. ترکیبات فنولی در ساختار شیمیایی خود دارای حداقل یک حلقه آروماتیک با یک یا چند گروه هیدروکسیل می‌باشند. با توجه به تعداد و آرایش اتم‌های کربن، ترکیبات فنولی به دو دسته فلاونوئیدها و غیرفلاونوئیدها (یعنی اسیدهای فنولیک، لیگنان‌ها، استیلبن‌ها و سایر ترکیبات با وزن مولکولی پایین‌تر) طبقه‌بندی می‌شوند [۲۶]. نتایج میزان فنول کل و فلاونوئید کل اسانس مورخوش در شکل ۱ نشان داده شده است. اسانس مورخوش حاوی 0.71 ± 0.38 mg GAE/g فنول کل و 0.27 ± 0.15 mg QE/g فنول کل بود. ایمانی و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که اسانس مورخوش دارای 42.74 ± 22.18 mg GAE/g فنول کل می‌باشد [۲۷]. همچنین، محتوای فنول و فلاونوئید کل عصاره متانولی مورخوش به ترتیب $50.1 \mu\text{g GAE/mg}$ و $48.4 \mu\text{g QE/mg}$ و این مقادیر در عصاره آبی به ترتیب $27.4 \mu\text{g GAE/mg}$ و $13.5 \mu\text{g QE/mg}$ گزارش شده است [۲۸]. تفاوت در میزان ترکیبات فنولی اندازه‌گیری شده در این مطالعه با یافته‌های سایر پژوهشگران می‌تواند ناشی

سابورود دکستروز آگار حاوی سویه‌های قارچی ثابت گردید. محیط کشت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شد و در نهایت قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری گردید.

۲-۵-۲- چاهک آگار

در این آزمون، ابتدا ۵ چاهک به کمک پیپت پاستور استریل روی سطح محیط کشت سابورود دکستروز آگار ایجاد شد. در ادامه، سوسپانسیون میکروبی (۱۰۰ میکرولیتر) روی سطح محیط کشت پخش شد. بعد از اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر اسانس در هر چاهک، محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردید. در نهایت، قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری و بعنوان فعالیت ضد قارچی اسانس گزارش شد.

۲-۵-۳- حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی

روش رقیق‌سازی در محیط کشت براث برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام این آزمون، ابتدا غلظت ۲۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس مورخوش تهیه و استریل گردید. سپس رقت‌های متوالی از محلول استوک اسانس تهیه شد (۱/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). در ادامه، غلظت‌های اسانس به لوله‌های آزمایش جداگانه منتقل شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به هر غلظت اضافه گردید. گرمخانه گذاری نمونه‌ها در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انجام شد و کدورت ایجاد شده در لوله‌های آزمایش بصورت بصری بررسی شد. در این راستا، اولین غلظتی از اسانس که سبب جلوگیری از رشد میکروبی شده بود (عدم وجود کدورت در محیط) بعنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد اسانس مورخوش گزارش شد.

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، از محتویات لوله‌های بدون کدورت روی محیط کشت سابورود دکستروز آگار کشت سطحی داده شد. بعد از گرمخانه گذاری محیط در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت، کمترین رقتی

جغرافیایی، روش‌های خشک کردن و روش‌های استخراج مورد استفاده برای جداسازی اسانس‌ها قرار دارد [۱۶، ۲۹].

از این حقیقت باشد که ترکیب و کیفیت اسانس‌های حاصل از منابع گیاهی به شدت تحت تأثیر سن و تنوع گیاه، شرایط

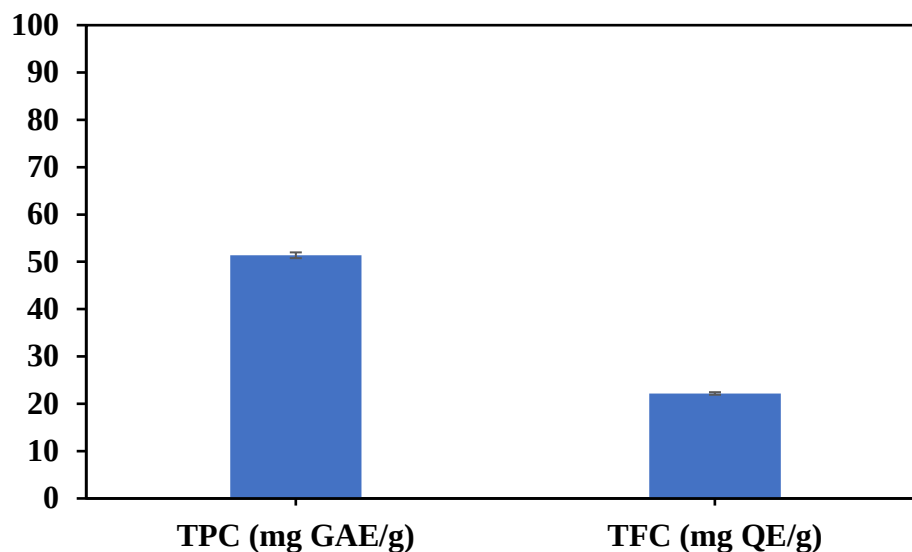


Figure 1. The total phenol content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of *Zhumeria majdae* essential oil.

B و ۱۲-دئوکسی-سالویپیسون کینون‌های دی‌ترین هستند که از ریشه‌های مورخوش جداسازی شده‌اند [۲۰]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان در عصاره‌های اندام هوایی نیز یافت که به محتوای فنولیک و فلاونوئید نسبت داده می‌شود. در یک مطالعه آزمایشگاهی، اسانس از اندام هوایی گیاه مورخوش در پنج منطقه ایران (سیرمند، قطب آباد، سرچهان، تنگزاو و گنو) استخراج شد. خواص آنتی‌اکسیدانی در مرحله گلدهی با استفاده از آزمون مهار رادیکال DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس بر حسب IC_{50} در محدوده ۸/۰۱ تا ۱۸/۴۷ میلی گرم در میلی لیتر متغیر بود [۱۹]. مشابه روش مورد استفاده در مطالعه فوق، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های مختلف گیاه مورخوش در برابر رادیکال آزاد DPPH آنالیز شده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس، عصاره پترولئوم اتر، کلروفرم، متانول و آبی گیاه مورخوش بر حسب IC_{50} به ترتیب برابر با ۲۰/۵، ۴۰/۱، ۴۵/۸، ۲۶/۱ و ۵۳/۶ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد [۲۸]. ترکیبات فنولی نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های گیاهی ایفا می‌کنند.

رادیکال‌های آزاد به دلیل ماهیت اکسیداتیو اثرات مضر بر بدن انسان دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که از این اثرات اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند و در درمان برخی از بیماری‌های مزمن مفید هستند. اگرچه می‌توان از اکسیداسیون لیپید در محصولات غذایی با آنتی‌اکسیدان‌ها جلوگیری کرد، آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به دلیل سمی بودن گزینه‌های مناسبی نمی‌باشند. محققان در تلاش‌اند تا منابع آنتی‌اکسیدانی طبیعی را برای نگهداری بهتر مواد غذایی و کاهش استرس اکسیداتیو در بافت‌های زنده را جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نمایند [۳۰-۳۲]. شکل ۲، نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس مورخوش را نشان می‌دهد. اسانس مورخوش بطور معنی‌داری سبب مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS گردید، بطوریکه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن در برابر رادیکال‌های DPPH و ABTS به ترتیب برابر با ۶۱/۵۰ و ۶۷/۸۵ درصد بود. گیاه مورخوش به دلیل وجود برخی دی‌ترین‌ها از جمله لابدن^۱ که در ریشه آن وجود دارد، خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد. ۱۲، ۱۶-دی‌داکسی ایجپیتینون

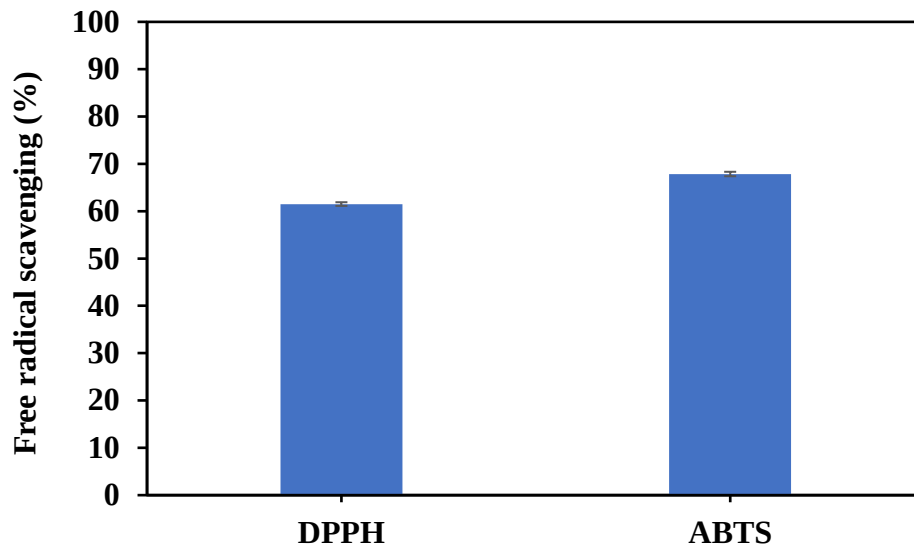


Figure 2. The antioxidant activity of *Zsummeria majdae* essential oil based on DPPH and ABTS radical scavenging methods.

میانگین قطر هاله عدم رشد برای پنی سیلیوم دیجیتاتوم بطور معنی داری بزرگتر از پنی سیلیوم /یتالیکوم بود (به ترتیب ۱۳/۷۰ و ۱۱/۱۰ میلی متر) ($p < 0.05$).

نتایج اثر ضد قارچی اسانس مورخوش در برابر سویه های قارچی بر پایه روش دیفیوژن آگار در شکل ۳ نشان داده شده است. فعالیت ضد قارچی در برابر سویه های پنی سیلیوم /یتالیکوم و پنی سیلیوم دیجیتاتوم معنی دار بود و

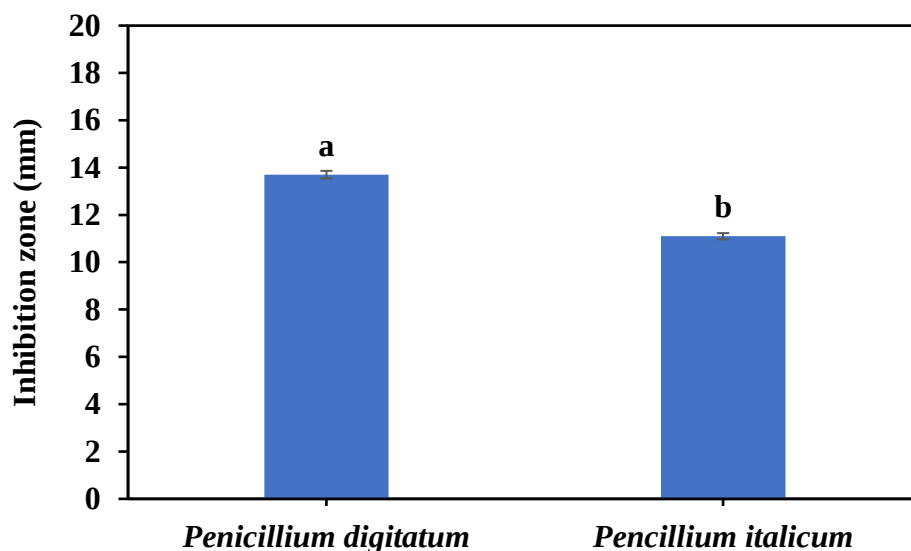


Figure 3. The antibacterial activity of *Zsummeria majdae* essential oil based on disc diffusion agar method.

میانگین قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار بزرگتر از روش دیسک دیفیوژن آگار بود. در واقع، گونه های قارچی در روش انتشار چاهک آگار در تماس مستقیم با اسانس هستند، اما سرعت انتشار عامل ضد میکروبی از سطوح

نتایج مشابهی در روش چاهک آگار مشاهده شد (شکل ۴) و سویه پنی سیلیوم دیجیتاتوم با قطر هاله عدم رشد ۱۴/۹۰ میلی متر در مقایسه با سویه پنی سیلیوم /یتالیکوم با قطر هاله عدم رشد ۱۲/۲۰ میلی متر، حساسیت بیشتری نسبت به اسانس مورخوش نشان داد ($p < 0.05$). علاوه بر این،

دیسک به محیط، اثر بازدارندگی آن را در آزمایش دیسک دیفیوژن آگار تعیین می‌کند [۹].

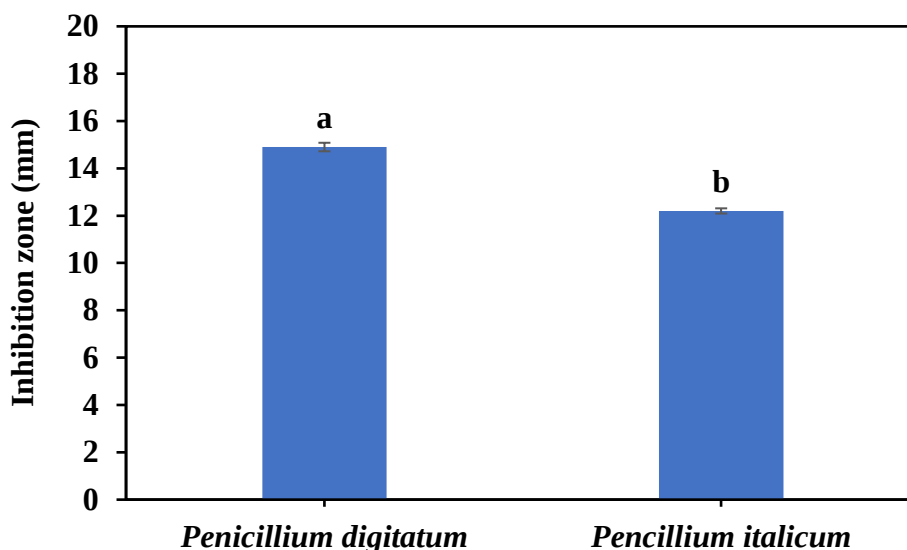


Figure 4. The antibacterial activity of *Zsummeria majdae* essential oil based on well diffusion agar method.

بود، بطوریکه سویه پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم قادر به رشد در حضور ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسانس نبود و بعنوان حساس‌ترین سویه نسبت به اسانس مورخوش شناخته شد. مطابق نتایج، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای سویه‌های های پنی‌سیلیوم/ایتالیکوم و پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم به ترتیب برابر با ۴ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده گردید.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد اسانس مورخوش در برابر سویه‌های قارچی در جدول ۱ ارائه شده است. مطابق نتایج، اثر ضد قارچی اسانس مورخوش به غلظت آن و نوع سویه قارچی مرتبط بود. غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسانس فاقد اثر ضد قارچی بر سویه‌های قارچی بودند. اثر ضد قارچی اسانس در غلظت‌های بالاتر معنی‌دار

Table 1. Minimum inhibitory concentration of *Zsummeria majdae* essential oil

Microorganism	Essential oil concentration (mg/mL)										Negative control	Positive control
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		
<i>Penicillium digitatum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Penicillium italicum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ grown; - not grown

حداقل غلظت کشندگی ۶۴ و ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بعنوان مقاوم‌ترین و حساس‌ترین سویه‌ها در برابر اسانس مورخوش شناسایی شدند.

نتایج حداقل غلظت کشندگی مشابه یافته‌های حداقل غلظت مهارکنندگی بود؛ با اینحال، غلظت‌های بالاتری از اسانس برای از بین بردن سویه‌های قارچی نیاز بود (جدول ۲). پنی‌سیلیوم/ایتالیکوم و پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم به ترتیب با

Table 2. Minimum fungicidal concentration of *Zsummeria majdae* essential oil

Microorganism	Essential oil concentration (mg/mL)										Negative control	Positive control
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		
<i>Penicillium digitatum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Penicillium italicum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+

+ grown; - not grown

ماهیت آبریز ترکیبات عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی آنها را قادر می‌سازد تا به راحتی جذب میسلیم قارچی شوند و از رشد آن جلوگیری نمایند [۳۷، ۵].

۴- نتیجه‌گیری نهایی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اسانس به دست آمده از گیاه مورخوش سرشار از ترکیبات فعال زیستی فنولی می‌باشد. اسانس فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS نشان داد که قابلیت آن بعنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را بازگو می‌کند. علاوه بر این، اثر ضد قارچی آن در برابر پنی‌سیلیوم/ایتالیکوم و پنی‌سیلیوم دیجیتالوم معنی‌دار بود و بیشترین تأثیر ضد قارچی در برابر پنی‌سیلیوم دیجیتالوم مشاهده شد. بنابراین، اسانس مورخوش را می‌توان یک ترکیب دارویی ارزشمند با کاربردهای بالقوه در زمینه‌های پزشکی، دارویی، مواد غذایی و کشاورزی در نظر گرفت. با اینحال، تحقیقات بیشتری برای بررسی مکانیسم دقیق اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس مورخوش مورد نیاز است.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۱۴۰۲/۳۵ می‌باشد، لذا از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

در راستای نتایج این پژوهش، فعالیت ضد قارچی اسانس مورخوش در برابر قارچ‌های بیماری‌زا مانند *کاندیدا آلبیکنس*، *تریکوفیتون متاگروفیت*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *تریکوفیتون روبروم*، *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم گیسیوم* و *اپیدرموفیتون فلوکوزوم* بررسی شده است. نتایج نشان داد که *کاندیدا آلبیکنس* (با قطر هاله عدم رشد ۲۹/۰۵ میلی‌متر و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ۰/۰۳۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر) و *آسپرژیلوس فلاووس* (با قطر هاله عدم رشد ۷/۸۴ میلی‌متر و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ۰/۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر) به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی در برابر اسانس بودند [۲۷]. علاوه بر این، فعالیت ضد قارچی اسانس مورخوش در برابر *کاندیدا آلبیکنس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *ساکارومایسس سرویزیه*، سویه‌های *فوزاریوم* و *بوتریتیس سینه‌را* در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است [۳۳-۳۶]. به طور کلی، ترپن‌ها و فلاونوئیدها اجزای اصلی در اسانس هستند که باعث خاصیت ضد قارچی آن می‌شوند. این خواص ممکن است به دلیل وجود لینالول و کامفور در اسانس نیز باشد [۲۷]. علاوه بر این، نشان داده شده است که فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنولی در عصاره و اسانس‌های گیاهی به دلیل وجود هسته آروماتیک و گروه OH فنولی در ساختار آنها می‌باشد که از طریق ایجاد پیوند هیدروژنی با گروه‌های سولفیدریل در مکانهای فعال آنزیم‌های هدف سبب غیرفعال سازی آنزیم‌های قارچی می‌شوند. همچنین،

۵- منابع

- [1] Coutinho, T. C., Ferreira, M. C., Rosa, L. H., de Oliveira, A. M., & de Oliveira Junior, E. N. (2020). *Penicillium citrinum* and *Penicillium mallochii*: New phytopathogens of orange fruit and their control using chitosan. *Carbohydrate polymers*, 234, 115918.
- [2] Fischer, I., Lourenço, S. A., & Amorim, L. (2008). Postharvest diseases in citrus and characterization of the fungal population in São Paulo's wholesale market. *Tropical Plant Pathology*, 33, 219-226.
- [3] Al-Sheikh, H., & Yehia, R. (2016). In vitro antifungal efficacy of *Aspergillus niger* ATCC 9642 chitosan-AgNPs composite against post-harvest disease of citrus fruits. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52(4), 413-420.
- [4] Behbahani, B. A., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M. (2013). Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus "in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(7), 1652-1658.
- [5] Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2021). Antifungal effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizopus stolonifer* causing strawberry's rot and mold. *Journal of*

- food science and technology (Iran)*, 18(115), 171-180.
- [6] Yazdi, F. T., & Behbahani, B. A. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4), 56-62.
- [7] Sureshjani, M. H., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Behbahani, B. A., & Shahidi, F. (2014). Antimicrobial effects of *Kelussia odoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. *Journal of Paramedical Sciences*, 5(2), 115-120.
- [8] Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M. (2017). Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 847-863.
- [9] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., & Tabatabaee Yazdi, F. (2020). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2020.
- [10] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaee Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food science & nutrition*, 9(5), 2458-2467.
- [11] Alizadeh Behbahani, B., & Imani Fooladi, A. A. (2018). Development of a novel edible coating made by Balangu seed mucilage and Feverfew essential oil and investigation of its effect on the shelf life of beef slices during refrigerated storage through intelligent modeling. *Journal of Food Safety*, 38(3), e12443.
- [12] Jalil Sarghaleh, S., Alizadeh Behbahani, B., Hojjati, M., Vasiee, A., & Noshad, M. (2023). Evaluation of the constituent compounds, antioxidant, anticancer, and antimicrobial potential of *Prangos ferulacea* plant extract and its effect on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- [13] Heydari, S., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). The impact of Qodume Shirazi seed mucilage-based edible coating containing lavender essential oil on the quality enhancement and shelf life improvement of fresh ostrich meat: An experimental and modeling study. *Food Science & Nutrition*, 8(12), 6497-6512.
- [14] Saffari Samani, E., Jooyandeh, H., & Alizadeh Behbahani, B. (2023). The impact of Zedo gum based edible coating containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the quality enhancement and shelf life improvement of fresh buffalo meat. *Journal of Food Measurement and Characterization*.
- [15] Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Jooyandeh, H. (2020). Improving oxidative and microbial stability of beef using Shahri Balangu seed mucilage loaded with Cumin essential oil as a bioactive edible coating. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101563.
- [16] Falah, F., Shirani, K., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Behbahani, B. A. (2021). In vitro screening of phytochemicals, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of *Echinops setifer* extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102102.
- [17] Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2020). Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. *Food Science and Biotechnology*, 29(5), 717-728.
- [18] Moein, S., & Moein, M. R. (2010). Relationship between antioxidant properties and phenolics in *Zhumeria majdae*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(7), 517-521.
- [19] Saeidi, M., Asili, J., Emami, S. A., Moshtaghi, N., & Malekzadeh-Shafaroudi, S. (2019). Comparative volatile composition, antioxidant and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Zhumeria majdae* from south of Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(1), 80-85.
- [20] Rustaiyan, A., Samadzadeh, M., Habibi, Z., & Jakupovic, J. (1995). Two diterpenes with rearranged abietane skeletons from *Zhumeria majdae*. *Phytochemistry*, 39(1), 163-165.
- [21] Ebadollahi, A., Khosravi, R., Sendi, J. J., Mahboubi, M., & Kosari, A. A. (2014). Chemical composition of essential oil from *Zhumeria majdae* Rech. F. & Wendelbo and its bioactivities against *Tribolium castaneum* Herbst (Tenebrionidae) larvae. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5), 824-831.
- [22] Sanei-Dehkordi, A., Soleimani-Ahmadi, M., Akbarzadeh, K., Salim Abadi, Y., Paksa, A., Gorouhi, M. A., & Mohammadi-Azni, S. (2016). Chemical composition and mosquito larvicidal properties of essential oil from leaves of an Iranian indigenous plant *Zhumeria majdae*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(6), 1454-1461.
- [23] Wang, H.-F., Yih, K.-H., Yang, C.-H., & Huang, K.-F. (2017). Anti-oxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(4), 881-889.
- [24] Saki, A., Mozafari, H., Asl, K. K., Sani, B., & Mirza, M. (2019). Plant yield, antioxidant capacity and essential oil quality of *Satureja*

- mutica supplied with cattle manure and wheat straw in different plant densities. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 50(21), 2683-2693.
- [25] Omidpanah, N., Valifard, M., Esmaeili, M., Yousefi, R., & Moghadam, A. (2015). Antioxidant and antibacterial properties of the essential oils of two Iranian Medicinal Plants: *Zhumeria majdae* and *Salvia mirzayanii*. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies*, 1(1), 51-60.
- [26] Rocchetti, G., Gregorio, R. P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Oliveira, P. G., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Mosele, J. I., Motilva, M. J., & Tomas, M. (2022). Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 811-842.
- [27] Imani, Z., Asgarpanah, J., Hashemi, F., & Hezaveh, J. H. (2015). Composition and antifungal activity of *Zhumeria majdae* essential oil. *Current Medical Mycology*, 1(4), 13-19.
- [28] Sharififar, F., Mozaffarian, V., Moshafi, M., Dehghan-Nudeh, G., Parandeh-Rezvani, J., & Mahdavi, Z. (2008). Chemical composition and biological activities of *Zhumeria majdae* Resh. F. & wendelbo. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 3(1), 8-18.
- [29] Nooshkam, M., Varidi, M., & Alkobeisi, F. (2022). Bioactive food foams stabilized by licorice extract/whey protein isolate/sodium alginate ternary complexes. *Food Hydrocolloids*, 126, 107488.
- [30] Nooshkam, M., Falah, F., Zareie, Z., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Mortazavi, S. A. (2019). Antioxidant potential and antimicrobial activity of chitosan–inulin conjugates obtained through the Maillard reaction. *Food Science and Biotechnology*, 28(6), 1861-1869.
- [31] Nooshkam, M., Varidi, M., & Bashash, M. (2019). The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chemistry*, 275, 644-660.
- [32] Garavand, F., Eghbal, N., Nooshkam, M., Miraballes, I., & Jafari, S. M. (2021). Salt, spices, and seasonings formulated with nano/microencapsulated ingredients. In *Application of Nano/Microencapsulated Ingredients in Food Products* (pp. 435-467). Elsevier.
- [33] Davari, M., & Ezazi, R. (2017). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Zhumeria majdae*, *Heracleum persicum* and *Eucalyptus* sp. against some important phytopathogenic fungi. *Journal de mycologie medicale*, 27(4), 463-468.
- [34] Arman, M., Yousefzadi, M., & Ebrahimi, S. N. (2009). Antimicrobial activity and composition of the essential oil from *Zhumeria majdae* Rech. f. & Wendelbo. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(5), 630-634.
- [35] Mahboubi, M., & Kazempour, N. (2009). In vitro antimicrobial activity of some essential oils from Labiatae family. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(4), 494-508.
- [36] Mahboubi, M., & Kazempour, N. (2009). Antimicrobial activity of *Zhumeria majdae* Rech. F. & Wendelbo essential oil against different microorganisms from Iran. *Pharmacognosy magazine*, 5(19), 105-108.
- [37] Alizadeh Behbahani, B., & Rahmati-Joneidabad, M. (2021). *Boswellia sacra* essential oil: Antioxidant activity and antifungal effect on some spoilage fungi causing strawberry rot. *Journal of food science and technology (Iran)*, 18(114), 25-34.



Scientific Research

Evaluation of the chemical characteristics and antifungal effect of *Zhumeria majdae* essential oil on molds causing orange fruit rot and spoilage during storage

Mostafa Rahmati -Joneidabad*¹, Mohammad Reza Zare-Bavani¹, Khalil Delfan Hasanzadeh²

1 - Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

3 - Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2024/6/4 Accepted:2024/7/31 Keywords: Orange, Post-harvest decay, <i>Zhumeria majdae</i> essential oil, Antifungal effect, Phenolic compounds. DOI: 10.22034/FSCT.22.158.144. *Corresponding Author E- rahmati@asnrukh.ac.ir	In this research, the chemical properties and antifungal effect of <i>Zhumeria majdae</i> essential oil on the molds that cause decay and spoilage of orange fruit during storage were investigated. The hydrodistillation method was used to extract <i>Z. majdae</i> essential oil. The amount of total phenol (according to Folin Ciocalteu method), the amount of total flavonoid (based on the colorimetric method of aluminum chloride), antioxidant effect (based on DPPH and ABTS free radical inhibition methods) and antifungal activity (based on disc diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum fungicidal concentration) of essential oil against <i>Penicillium italicum</i> and <i>Penicillium digitatum</i> were investigated. The content of total phenol and total flavonoid of the essential oil were equal to 51.38 mg GAE/g and 22.18 mg QE/g, respectively. <i>Z. majdae</i> essential oil was able to inhibit DPPH and ABTS free radicals (61.50% and 67.85%, respectively). The results of the antifungal effect of <i>Z. majdae</i> essential oil showed that the average diameter of the inhibition zone for the fungal strains of <i>P. italicum</i> and <i>P. digitatum</i> in the disc diffusion agar method was 11.10 and 13.70 mm, respectively, and in the well diffusion agar method it was 12.20 and 14.90 mm. The minimum inhibitory concentration for these strains was equal to 4 and 2 mg/ml and the minimum fungicidal concentration was equal to 64 and 16 mg/ml. According to the results, <i>Z. majdae</i> essential oil can be used as a natural antimicrobial agent in order to prevent the growth of fungal strains that cause rot and spoilage of orange fruit during storage.



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

مطالعه تولید نانو الیاف کامپوزیت از ترکیبات هیدروکلوئیدی دانه *Salvia macrosiphon L.* به روش الکتروریسی به منظور ریز پوشینه کردن ویتامین D₃

صدیقه یزدان پناه^{۱*}، مونا قربانی نژاد^۲

۱-دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

۲-دانشجوی دکتری گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۲۱	پیشرفت در فرآیندهای تولید نانو ساختارها با خصوصیات فرمولی مناسب، تولید نانو ذرات پایدار با قابلیت کاربرد در صنعت غذا را فراهم می‌سازد. می‌توان ترکیبات زیست فعال ریزپوشانی شده را در فیبرهای الکتروریسی ادغام کرد تا پایداری بیشتر نانو ذرات در برابر حرارت و نور که منجر به افزایش زمان نگهداری است، محقق شود. در مطالعه حاضر، لایه‌های نانوالیاف کامپوزیتی از موسیلاژ استخراجی از دانه <i>Salvia macrosiphon L.</i> با استفاده از الکتروریسی ساخته شدند. نانو کامپوزیت نانوالیاف از پلی وینیل الکل / ایزوله پروتئین سبوس برنج / موسیلاژ دانه <i>Salvia macrosiphon L.</i> در نسبت‌های مختلف آماده شد. سپس مورفولوژی و طیف سنجی FTIR مورد بررسی قرار گرفت. متوسط قطر نانوالیاف تولیدی حدود ۴۰ نانومتر و ضریب واریانس ۱۳٪ است، که نشان داد قطر الیاف نسبتاً یکنواخت است. افزایش غلظت محلول موسیلاژ و درصد ثابت پلی وینیل الکل باعث افزایش قطر نانوالیاف به طرز قابل توجهی شد. در مرحله بعد، ویتامین D ₃ درون نانوالیاف پلی وینیل الکل و کنسانتره پروتئین سبوس برنج کپسوله شد. نتایج FTIR وجود ویتامین D ₃ را در نانوالیاف تهیه شده تایید کرد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی، با افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل حلقه‌های آروماتیک در محیط واکنش، قدرت مهارکنندگی رایکال‌های آزاد موسیلاژ افزایش یافت. ترکیب نانوالیاف در نمودارهای طیف‌سنجی نشان داد که در نمونه‌های نانوکامپوزیت و ریزپوشانی شده، از ویتامین D ₃ ، دو پیک قوی در محدوده ۱۴۵۴ و ۱۷۴۳ بر سانتی‌متر وجود دارند که ارتعاشات کششی مربوط به گروه C=C در حلقه‌های آروماتیک ترکیبات فنولیک را نشان می‌دهند. بر اساس یافته‌ها، ترکیبات زیست‌فعال جهت افزایش دسترسی به ویتامین D ₃ را می‌توان در نانوالیاف الکتروریسی شده موسیلاژ <i>Salvia macrosiphon L.</i> / پلی وینیل الکل / کنسانتره پروتئین سبوس برنج محصور کرد.
کلمات کلیدی: الکتروریسی، نانوفیبر، <i>Salvia macrosiphon L.</i>	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.155. * مسئول مکاتبات: yazdanpanah2004@gmail.com	

۱-مقدمه

نانوفناوری در سال‌های اخیر به عنوان یکی از زمینه‌های پژوهشی و کاربردی پیشرفته در سطح جهان شناخته شده است [۱]. پیشرفت در فرآیندهای تولید نانو ساختارها و نانو مواد با خصوصیات فرمولی مناسب، تولید نانو ذرات پایدار با قابلیت کاربرد در صنعت غذا و صنایع وابسته را فراهم می‌سازد [۲ و ۳]. سازه‌های نانوالیافی جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند، زمانی که قطر الیاف پلیمری از میکرومتر به نانومتر کاهش پیدا می‌کند، خصوصیات جالب توجهی در آنها ظاهر می‌شود که می‌توان به بزرگ شدن نسبت سطح به حجم، افزایش قابلیت انعطاف پذیری در گروه‌های عاملی سطحی و عملکرد مکانیکی عالی مانند سختی و قدرت کششی اشاره نمود [۴ و ۵]. فرآیند الکتروریسی شامل اعمال ولتاژ بالا به پلیمرها در محلول یا مذاب است که منجر به ریسندگی الیافی به اندازه میکرون یا حتی نانومتر می‌شود و از مواد پلیمری زیست تخریب پذیر مانند پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها در ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال استفاده می‌شوند [۶ و ۷]. الکتروپینینگ یک تکنیک ساده و کاربردی است و می‌توان ترکیبات زیست فعال را در فیبرهای الکتروریسی ادغام کرد این نانوالیاف دارای ویژگی‌های سودمندی مانند تخلخل بالا و مساحت سطحی خاص هستند. از جمله ریزپوشانی با کارایی بالا، ثابت و پایدار بودن مواد ریزپوشانی شده، پایداری بیشتر در برابر حرارت و نور که منجر به افزایش زمان نگهداری و حفاظت مواد فعال زیستی از تخریب مواد شیمیایی می‌شود [۸ و ۹]. پایداری امولسیون‌ها بخش مهمی از الکتروریسی امولسیون است، امولسیون‌ها در طول زمان تمایل به شکستن دارند، بنابراین برای افزایش پایداری باید امولسیفایر اضافه شود. یکی از امولسیفایرهای رایج سورفکتانت‌ها هستند، که با افزایش نیروهای دافعه از تجمع قطرات جلوگیری می‌کنند. بنابراین الکتروریسی با میکروامولسیون‌ها می‌تواند یک مزیت قابل توجه برای توسعه محصول جدید با عملکردهای بهبود یافته باشد [۱۰ و ۱۱]. پلیمرهای طبیعی به دلیل زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری بهتر و غیر سمی بودن توجه زیادی را به نانوالیاف به دست آورده‌اند در تحقیقاتی که انجام شده به دلیل عملکرد مفید در چرخش،

گلوتن گندم برای اختلاط الکتروریسی و پردازش در لایه‌های نانوالیاف مرکب و بسته بندی آنتی باکتریایی فعال برای حامل‌های مواد غذایی و دارو استفاده شده است [۱۴ و ۱۳ و ۱۲]. پس از افزودن گلیسرول مونولورات به محلول الکتروریسی گلوتن گندم، الکتروریسی مخلوط را انجام دادند. فیلم‌های به دست آمده پایداری آب و فعالیت ضدباکتریایی خوبی داشتند و به عنوان مواد بسته بندی ضدباکتریایی مواد غذایی مناسب بودند. پلی وینیل الکل (PVA) به دلیل ماهیت غیرسمی، حلالیت عالی در آب و زیست تخریب پذیری کامل به عنوان یک ماده خام پلیمری بسیار مناسب برای الکتروریسی شناخته شده است. در نتیجه اغلب در محلول‌های الکتروریسی به عنوان یک اسپینینگ ادغام می‌شود تا خواص چرخشی محلول و ویژگی‌های مکانیکی لایه‌های نانوالیاف را افزایش دهد [۲]. عزیز و همکاران (۲۰۱۹) با موفقیت فیلم‌های نانوالیاف (پلی وینیل الکل/گلوتن گندم) PVA/WG را تهیه کرده‌اند که می‌توان از آنها برای بارگیری داروها استفاده کرد [۱۵]. برای غلبه بر این محدودیت‌ها، می‌توان از تکنیک‌های اتصال عرضی استفاده کرد. روش‌های پیوند متقابل شیمیایی و آنزیمی معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما پسماندهای سمی تولید می‌کنند و نسبتاً دست و پا گیر هستند، در نتیجه اجرای آنها را در حوزه بسته بندی فعال مواد غذایی محدود می‌کنند [۱۶]. از این رو اتخاذ یک روش اتصال عرضی غیرسمی و ساده در نظر گرفته شد، با افزودن یک قند کاهنده (به عنوان مثال، گلوکز) به محلول الکتروریسی، و سپس قرار دادن فیلم الکتروریسی شده حاصل در دمای بالا برای ایجاد اتصال عرضی مایلارد که این واکنش بین گروه کربونیل الکتروفیل قند احیاکننده و گروه آمین آدپروتونه در یک پروتئین رخ می‌دهد. این ترکیب و برهمکنش پروتئین را تغییر می‌دهد و منجر به پیوند متقابل مایلارد می‌شود [۱۷ و ۱۴]. در تحقیقی دیگر دنگ و همکاران (۲۰۱۹) گلوکز / ژلاتین / زئین را در دمای ۱۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت قرار دادند، و نشان داد که پایداری آب لایه‌های نانوالیاف ژلاتین اضافه- شده با گلوکز را می‌توان تا ۱۴ روز پس از اتصال عرضی مایلارد را افزایش داد [۴]. مواد هیدروکلوئیدی و عصارهای فنولی طبیعی

۱-۲- مواد اولیه

مواد اولیه اصلی مورد استفاده جهت تهیه نانوکامپوزیت الکتروریسی شده شامل دانه *Salvia macrosiphon L.* و سبوس برنج از بازار محلی (شهرکازرون، ایران)، پلی‌ونیل‌الکل با وزن مولکولی ۴۴/۰۵۳ گرم بر مول (مرک، آلمان) و جهت استخراج کنسانتره پروتئین سبوس گندم، مواد هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک (مرک، آلمان) تهیه و خریداری شد.

۲-۲- استخراج موسیلاژ دانه *Salvia macrosiphon L.*

جهت استخراج موسیلاژ دانه *Salvia macrosiphon L.* به نسبت ۲۰:۱ آب به دانه‌های *Salvia macrosiphon L.* اضافه شد. pH آب (۸/۵) با استفاده از سود ۰/۲ مولار تنظیم شد. سپس، به منظور جداسازی موسیلاژ از دانه‌های چیا، مخلوط به مدت ۱.۵ ساعت با استفاده از همزن هموژنایزر (HD3200, Berli، آلمان) با ۱۵۰۰ دور بر دقیقه به هم‌زده شد تا موسیلاژ جدا شود. با تشکیل دانه‌های متورم و ژل در اطراف آن‌ها، نمونه‌ها درون دستگاه سانتریفوژ (Hettich-320R Universal، آلمان) به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. موسیلاژ استخراج‌شده، و در آن به مدت ۲ ساعت و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک، سپس در کیسه‌های پلی‌اتیلنی قرار داده شد و تا زمان مصرف در جای خشک و خنک نگهداری شد [۲۴].

۳-۲- ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد

غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰) از ترکیبات موسیلاژ استخراجی از دانه *Salvia macrosiphon L.* به همراه ۱ میلی‌لیتر از (diphenyl-1-picrylhydrazyl free) DPPH (radical) ۰/۱ میلی‌مولار و ۱ میلی‌لیتر متانول تهیه شد. بعد از ۳۰ دقیقه قراردادن در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با DPPH در مقابل بلانک توسط دستگاه UV-Vis (Schimadzu UV/Vis-240 IPC، ژاپن) قرائت شد [۲۵].

درصد مهار رادیکال آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%RSD = (A_0 - A / A_0) \times 100$$

مواد ضد باکتری و آنتی‌اکسیدانی هستند که معمولاً در بسته‌بندی مواد غذایی برای بهبود ایمنی و کاهش فساد مواد غذایی استفاده می‌شوند [۱۹ و ۱۸]. تخم مرو *Salvia macrosiphon L.* یا مرمرشک که با نام محلی "برویز" نیز شناخته می‌شود، به تخم‌های درخت مرو اطلاق می‌شود. هیدروکلوئید تخم مرو به دلیل داشتن مواد مغذی مانند پروتئین، چربی‌های سالم، فیبر، ویتامین‌ها و مواد معدنی، و خواص آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی به عنوان یک منبع غذایی مفید شناخته می‌شود [۲۰]. برای تامین تقاضای پروتئین توسط جمعیت رو به رشد و همچنین به حداقل رساندن استفاده از پروتئین از منابع حیوانی، ابتکاراتی برای یافتن روش‌های جایگزین پروتئین با کیفیت بالا از گیاهان انجام شده است [۲۱]. در بین منابع گیاهی، پروتئین برنج از چهار ماده اصلی آلبومین‌ها، گلوبولین‌ها، گلوپتین‌ها و پرولامین‌ها تشکیل شده است. در میان آن‌ها، گلوپتین جزء اصلی پروتئین است که حدود ۸۰ درصد از کل پروتئین در آندوسپرم را تشکیل می‌دهد. در سبوس برنج پروتئین-های محلول در آب مانند آلبومین پروتئین اصلی است. سبوس برنج حاوی آمینواسیدهای مهم آرژنین، ترئونین، گلايسين، سيستين، والين، متيونين، لوسين، ايزولوسين، تيروزين، لایزین، هیستیدین و فنیل آلانین است [۲۲]. امروزه کمبود ریز مغذی‌ها در جامعه انسانی، توجه به غنی‌سازی مواد غذایی احساس می‌شود ویتامین D₃ یک ترکیب از خانواده ویتامین D است که به طور طبیعی ۷-دهیدروکلسترول در پوست، با قرار گرفتن در معرض نور خورشید به ویتامین D₃ تبدیل می‌شود. تحقیقات نشان دادند علت مشکلات معده‌ای-روده‌ای که دردهای شکمی، یبوست، اسهال و تورم به همراه دارد به دلیل کمبود ویتامین D هستند [۲۳]. در پژوهش پیش رو با توجه و تکنیک‌های پیشرفته در افزایش پلیمرهایی با خاصیت ارزش بالای بهداشتی به تولید نانوالیاف کامپوزیت از ترکیبات هیدروکلوئیدی دانه *Salvia macrosiphon*، پلی‌ونیل‌الکل و کنسانتره پروتئین سبوس برنج به روش الکتروریسی به منظور ریز پوشینه‌کردن ویتامین D₃ پرداخته شده و خصوصیات نانوالیاف تولیدی را مورد بررسی قرار داده است.

۲- مواد و روش‌ها

ترکیبات گیاهی آزمایش شده یا ترکیبات جدا شده از نظر میکروبیولوژیکی فعال باشند، پس از انکوباسیون، یک ناحیه بازدارنده در اطراف دیسک کاغذ صافی ایجاد می شود. قطر ناحیه مهار به درستی قدرت ضد میکروبی ترکیبات گیاهی یا ترکیبات فردی را توصیف می کند. لازم به ذکر است که روش انتشار دیسک روش مناسبی برای عصاره های چربی دوست نمی باشد زیرا انتشار نامحلول در آب و ترکیبات آن از دیسک کاغذ صافی به محیط آگار ناکافی است. بنابراین، چربی دوست ها نتایج منفی یا مناطق بازدارندگی کوچکتری با روش انتشار دیسک نسبت به سایر آزمایش ها، می دهند. برای تعیین فعالیت ضد میکروبی از روش انتشار آگار استفاده شد. نمونه ها با استفاده از یک قالب به دیسک هایی به قطر ۱۰ میلی متر تبدیل شد. قبل از قراردادن دیسک ها روی سطح محیط کشت، عمل کشت سطحی با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع محتوای تقریباً ۱۰^۸ CFU/ml از هر کدام از باکتری های (گرم منفی و گرم مثبت) آزمایش انجام گرفت. دیسک ها در شرایط کاملاً استریل بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. اختلاف قطر هاله های تشکیل شده از قطر دیسک ها به عنوان شاخص فعالیت ضد میکروبی در نظر گرفته شد. در مواردی که هاله های تشکیل نشده باشد، یعنی فعالیت ضد میکروبی وجود ندارد، اختلاف مساحت برابر صفر در نظر گرفته شد [۲۶].

۲-۶- استخراج کنسانتره پروتئینی سبوس برنج

برای استخراج کنسانتره پروتئینی سبوس برنج ابتدا ۱۰۰ گرم سبوس برنج به روش کلدال، روغن گیری شد. سپس سبوس برنج روغن گیری خشک شده را با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱ (وزنی/وزنی) مخلوط شد. با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم با غلظت ۱/۱ مولار، pH محلول را به ۱/۱ رسانده و به مدت یک ساعت در دمای محیط همزده شد. مخلوط را در سانتریفوژ در ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. pH سوپرناتانت (مایع بدست آمده بعد از سانتریفوژ) را با استفاده از اسید کلریدریک به ۱/۴ رسانده و به مدت نیم ساعت همزده شد. سپس به همراه پروتئین ها، سوپرناتانت را در دمای ۴ درجه سانتی -

RSD%: درصد مهار رادیکال آزاد (درصد بازدارندگی آنتی اکسیدان در برابر رادیکال های آزاد)

A₀: جذب شاهد (که حاوی یک میلی لیتر از متانول و یک میلی لیتر از محلول DPPH می باشد)

A: جذب نمونه (که حاوی حجم های مختلفی از موسیلاژ BHT و DPPH می باشد)

۲-۴- اندازه گیری محتوای تام فنلی

میزان ترکیبات فنولی کل بر اساس روش رنگ سنجی Folin-ciocaltue و بر حسب اسید گالیک اندازه گیری شد. محلول های استاندارد با غلظت های ۱۲.۵، ۲۵، ۵۰، ۶۲.۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ بی پی ام از اسید گالیک (مرک، آلمان) در محلول ۶۰٪ متانول تهیه شد، سپس از هر یک، ۰/۱ میلی لیتر به لوله آزمایش منتقل شد و به آن ها ۰/۵ میلی لیتر از محلول ۱۰٪ واکنش گر فولین - سیو کالتیو (مرک، آلمان) اضافه و پس از ۳ الی ۸ دقیقه به آن ۰/۴ میلی لیتر از محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد، آنگاه لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و پس از آن میزان جذب نوری به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر (Schimadzu UV/Vis-240 IPC، ژاپن) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه گیری شد. سپس ۱ گرم از موسیلاژ خشک شده را در متانول ۶۰٪ حل شد و به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده و بر اساس روش فولین - سیو کالتیو میزان فنول کل تعیین شد، با این تفاوت که به جای محلول استاندارد، ۰/۱ میلی لیتر از محلول موسیلاژ اضافه شد، سپس میزان جذب قرائت شده را در نمودار استاندارد قرار داده و به این ترتیب مقدار فنول کل ترکیبات هیدروکلوئیدی بر حسب معادل اسید گالیک (میلی گرم بر میلی - لیتر) به دست آمد [۲۵].

۲-۵- بررسی فعالیت ضد میکروبی

بررسی خاصیت ضد میکروبی به روش انتشار دیسک به عنوان یک روش انتشار آگار طبقه بندی می شود، چرا که ترکیبات گیاهی که باید آزمایش شود از مخزن خود از طریق محیط آگار بذر شده با میکروارگانیسم آزمایش پخش می شود. به طور کلی، مخزن یک دیسک کاغذ صافی است که در بالای سطح آگار قرار می گیرد. اگر

گرا برای یک شب نگهداری شد تا پروتئین‌ها رسوب کنند. لایه‌ی رسوبی را با دقت از بالای مخلوط جدا شد و پروتئین‌های رسوب یافته را با آب مقطر شسته و خنثی شد [۲۷].

۷-۲-الکترورسی محلول

در این آزمایش، الکترورسی محلول با نسبت‌های مختلف جدول ۱ در شرایط محیطی و شرایط مختلف دستگاهی شامل ولتاژ در محدوده ۱۲ تا ۲۰ کیلوولت، نرخ تغذیه محلول الکترورسی در محدوده ۰/۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌لیتر بر ساعت و فاصله سر سوزن تا سطح جمع‌کننده نانوالیاف در محدوده ۹ تا ۱۵ سانتی‌متر بررسی شد [۲۸]. برای انتخاب شرایط دستگاهی بهینه، محدوده ۹ سانتی‌متر تا در هر بار دو پارامتر ثابت در نظر گرفته شد و پارامتر سوم در محدوده ذکر شده تغییر داده شد. سپس تمام نمونه‌ها پس از الکترورسی، توسط میکروسکوپ نوری (HUTACT-40 X-

2000X، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب، شرایط مناسب برای دستیابی به الیاف با کمترین گره و بیشترین یکنواختی تعیین شد. در مرحله اول غلظت‌های متفاوت موسیلاژ با ۳ میلی‌متر آب مقطر حل شد. سپس ۰/۴ پلی وینیل الکل و ۰/۴ کنسانتره پروتئینی سبوس برنج در دمای محیط به مدت ۱۵ ساعت هم زده شد. تا یک محلول یک دست و یکنواخت بوجود آمد. سپس محلول آماده شده با اولتراسونیک فراصوت پروپ‌دار از جنس تیتانیوم (HD3200, Berlin، آلمان) به خوبی همگن شدند. و محلول تهیه‌شده درون سرنگ ۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و با استفاده از دستگاه الکترورسی (Full Option Lab 2ESII-II، ایران) با ولتاژ مثبت ۱۸ کیلو ولت الکترورسی شدند. فاصله تا نوک سوزن ۱۲ سانتی‌متر در نظر گرفته‌شد و سرعت درام جمع‌کننده ۵۰۰ دور بر دقیقه بود.

Table 1. Solution samples for electrospinning.

Treatment	Mucilage (%)	Polyvinyl alcohol (%)	Protein Concentrate (%)
A	0.1	4	4
B	0.3	4	4
C	0.5	4	4
D	0.7	4	4

ساعت الکترورسی شد [۲۹]. ابتدا غلظت‌های مختلف موسیلاژ طبق جدول ۲ و ویتامین به نسبت ۱ به ۴ به ۱/۵ میلی لیتر آب اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه روی همزن قرار داده شد تا ویتامین در ساختار محلول پلیمر قرار بگیرد و در نهایت داخل سرنگ کشیده و آماده الکترورسی شد.

۸-۲-ریزپوشینه‌دار کردن

در این مرحله از نسبت‌های مختلف طبق جدول ۲ در شرایط محیطی استفاده و هم‌زده و بلافاصله محلول حاصل به مدت ۲

Table 2. Samples containing encapsulated composite compounds

Treatment	Encapsulated with nano composite
Control	Polyvinyl alcohol 4% + rice bran protein 4% + 1% vitamin D3
A	Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.1% <i>Salvia macrosiphon L.</i> seed mucilage

B	Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.3% <i>Salvia macrosiphon</i> L. seed mucilage
C	Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.5% <i>Salvia macrosiphon</i> L. seed mucilage
D	Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.7% <i>Salvia macrosiphon</i> L. seed mucilage

۱۰-۲-آزمون طیف سنجی FTIR

برای انجام آزمون FTIR از دستگاه (Spectrum Two, FTIR (Perkin Elemer, USA) استفاده شد. قرص‌های نازکی از نمونه‌های خشک‌شده با ضخامت کمتر از یک میلی‌متر و پوشش دادن با پتاسیم برمید در دستگاه تهیه قرص به دست آمد و طیف عبور نمونه‌ها در محدوده عدد موجی ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر و با قدرت تفکیک ۵ بر سانتی‌متر مورد آنالیز قرار گرفت [۳۱].

۱۱-۲-آنالیز آماری

در این پژوهش تحلیل داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و Excel استفاده شد. کلیه آزمایشات بر اساس طرح بلوک‌ها-ی کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و در سطح ۵٪ انجام شد. رسم منحنی‌ها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

۳-۳-بحث و نتایج

۱-۳-ارزیابی مهار رادیکال آزاد DPPH و فنل کل موسیلاژ *Salvia macrosiphon* L.

در جدول ۳ و ۴ به بررسی ارزیابی مهار رادیکال آزاد DPPH و فنل کل موسیلاژ *Salvia macrosiphon* L. پرداخته شده است. اثرات رادیکال آزاد DPPH در هیدروکلوئیدها به عنوان یک دسته گسترده از مواد پلیمری محلول در آب، مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته است. هیدروکلوئیدها شامل پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها می‌شوند که خواص زیستی و آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند. علاوه بر این، این پلی‌ساکاریدها می‌توانند محتوای سوپراکسید

۹-۲-مورفولوژی نانو الیاف با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی

از آنجا که نمونه‌های حاوی آب، سیستم‌های تحت خلاء مانند محفظه میکروسکوپ الکترونی روبشی را دچار مشکل خروج گاز می‌کنند، نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی باید خشک باشند. همچنین ممکن است دمای سطح نمونه در اثر برخورد الکترون‌های پراثرژی به آن، افزایش یافته و موجب پدیده تبخیر و گاززدایی و همچنین افزایش آلایندگی‌های موجود در محفظه، و در نتیجه کاهش کیفیت تصویر شود. علاوه بر آن، بالارفتن دمای سطح نمونه می‌تواند منجر به آسیب دیدن نمونه شود. افزون بر خشک بودن، نمونه میکروسکوپ الکترونی روبشی باید رسانا نیز باشد تا از تجمع بار الکتریکی بر روی سطح نمونه در اثر برخورد پرتو الکترونی جلوگیری شود. بدین منظور نمونه‌های نارسا با لایه‌ای نازک از ماده‌ای رسانا پوشش داده می‌شوند.

بوسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (TESCAN vega3, Czech Republic، چین) برای مطالعه سطح نمونه‌های نانوکامپوزیت حاوی ویتامین D3 با توان ۵ کیلو وات، قطعات کوچک از نمونه‌های نانوکامپوزیت به کمک چسب نقره به پایه نگهدارنده آلومینیومی چسبانده و پایه‌ها در یک دستگاه پوشش دهنده/پاشنده به مدت ۵ دقیقه با طلا (DSR1)، شرکت پوشش نانو ساختاری، ایران) پوشش داده و تصویر برداری در محدوده بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ انجام شد [۳۰].

IC₅₀ به آن غلظت از عصاره گفته می‌شود که در این غلظت نیمی از رادیکال‌های آزاد مهار شده است. این مقدار برای رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۲۵۰ پی‌پی‌ام (۷۳/۰۸ درصد) از موسیلاژ مشاهده شد. با توجه به تنوع ترکیبات موجود در گیاهان مختلف، معمولاً از روش‌های متعددی برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود. نتایج مطالعات مختلف نشان داده‌اند که هیدروکلوئیدهای پروتئینی و پلی‌ساکاریدی دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی و توانایی کاهش رادیکال‌های آزاد هستند [۳۵ و ۳۴].

دیسموتاز را افزایش دهند که از مکانیسم آنتی‌اکسیدانی پشتیبانی می‌کند [۳۲]. نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش مهار رادیکال آزاد DPPH در شش غلظت مختلف نشان داده شده است. ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد، DPPH نشان داد افزایش غلظت تاثیر معنی‌داری بر مهار رادیکال آزاد دارد یعنی فعالیت مهار رادیکال آزاد غلظت‌های مختلف موسیلاژ وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت موسیلاژ، میزان مهار رادیکال آزاد بیشتر شده است [۳۳]. برای مقایسه فعالیت مهار رادیکال آزاد موسیلاژ از فاکتوری به نام IC₅₀ استفاده شده است. طبق تعریف

Table 3. Evaluation evaluation of DPPH radical inhibition in the extracted mucilage of *Salvia macrosiphon L.* seed

Concentration (µg/ml)	Control absorption	<i>Salvia macrosiphon L.</i> mucilage	RSA %	IC ₅₀ (mg/ml)
50	0.52	0.312	40.00	2.34
100	0.52	0.291	44.04	7.73
150	0.52	0.228	56.15	13.12
200	0.52	0.180	65.38	18.51
250	0.52	0.140	73.03	23.90
300	0.52	0.075	85.58	29.29
350	0.52	0.035	93.27	34.68

شرایط آب و هوایی و عوامل دیگر متغیر است. توانایی و قدرت مهارکنندگی فنل‌ها به دلیل گروه‌های هیدروکسیل در ملکول‌های آن‌ها است [۳۷]. افزایش غلظت ترکیبات فنلی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌ها و هیدروکلوئیدهای مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل حلقه‌های آروماتیک ترکیبات فنلی در محیط واکنش، احتمال دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی موسیلاژ افزایش می‌یابد [۳۸]. پتریسون و همکاران (۲۰۱۵) اثر پوشش میوه کیتوزان در به تاخیر انداختن صفات کیفی و غذایی سه رقم توت‌فرنگی به نام‌های "کاندونگا"، "جونیکا" و "سابرینا" و همچنین اثر کیتوزان بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت. خواص فیزیکیوشیمیایی (کاهش وزن، محتوای جامد

موسیلاژ دانه *Salvia macrosiphon L.* حاوی ترکیبات فنلی است محتوای فنلی صمغ با دستگاه اسپکتروفتومتر مورد سنجش قرار گرفت. نتایج به دست آمده در جدول ۴ گزارش شده است. فنولیک اسیدها و مشتقات پلی‌فنلی از جمله ترکیباتی هستند که در این موسیلاژ موجود هستند. این ترکیبات به دلیل ساختار آب دوست که دارند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند. همچنین میزان ترکیبات فنلی در موسیلاژ دانه حدود ۱۰ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) معادل گالیک اسید به دست آمد. این مقدار نشان‌دهنده وجود سطح قابل توجهی از ترکیبات فنلی در موسیلاژ است که می‌تواند به عنوان یک منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها مورد استفاده قرار گیرد [۳۶]. مقدار فنولیک‌ها در مواد غذایی متفاوت است و بستگی به نوع ماده غذایی، روش کشت، فصل رشد،

در محتوای پلی فنل، آنتوسیانین و فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی اکسیدانی میوه‌های توت فرنگی پوشش داده شده با کیتوزان به تعویق افتاد. پوشش کیتوزان فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را افزایش داد و از قهوه‌ای شدن گوشت جلوگیری کرد [۳۹] که با نتایج تحقیق حاضر حداکثر محتوای فنلی کل تأیید شد، مطابقت داشت.

محلول و اسیدیته قابل تیتراسیون و مغذی (پلی فنل کل، آنتوسیانین، فلاونوئید، محتوای اسیداسکوربیک و ظرفیت آنتی اکسیدانی) همراه با فعالیت آنزیمی کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، گاپاکول پراکسیداز و لیپوکسیژناز مورد ارزیابی قرار گرفتند. تیمار کیتوزان به طور قابل توجهی از دست دادن آب را کاهش داد و تغییرات کیفی در رنگ، اسیدیته قابل تیتراسیون و محتوای اسیداسکوربیک به تاخیر انداخت. علاوه بر این، تغییرات

Table 4. Examination of the total phenol of extracted *Salvia macrosiphon* L. mucilage

Factor	The amount of	
Total phenol	10.24	µg/ml

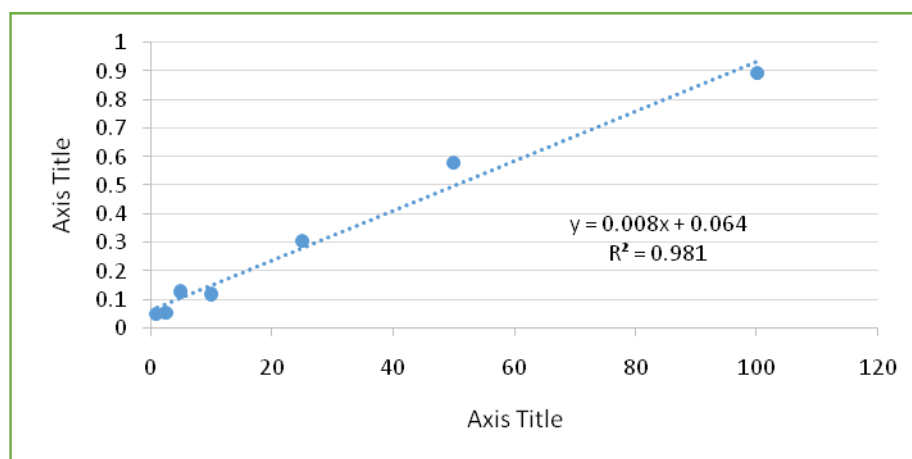


Figure 1. Absorption diagram of the calibration of mucilage extracted from *Salvia macrosiphon* L. seed based on gallic acid (µg/ml)

دارای اثرات ضد میکروبی مشخصی است و حساسیت بیشتری بر روی /ستافیلوکوکوس نشان داده است دلیل حساسیت بالای باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌تواند به علت عدم وجود دیواره سلولی لیپوپلی ساکاریدی در باکتری‌های گرم مثبت باشد [۴۰]. در باکتری‌های گرم منفی، دیواره سلولی از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری می‌کند به دلیل وجود غشاهای خارجی احاطه کننده، دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی، به نسبت باکتری‌های گرم مثبت کمتر حساسیت نشان می‌دهند. غشا خارجی باکتری‌های گرم منفی مانع از انتشار مواد چربی دوست از میان لایه پوشاننده لیپوپلی ساکاریدی می‌شود. در باکتری‌های گرم مثبت، تماس

۲-۳- خصوصیات ضد میکروبی موسیلاژ دانه *Salvia macrosiphon* L.

قطر هاله عدم رشد (هاله بازدارندگی) به روش انتشار با استفاده از دیسک برای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در جدول ۵ نشان داده شده است. در مقدار میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری گرم منفی و گرم مثبت در تیمارهای تفاوت معناداری مشاهده شد ($p \leq 0.05$). در بررسی باکتری گرم منفی قطر هاله عدم رشد برای نمونه کنترل و /ستافیلوکوکوس به ترتیب ۲۳ و ۸ میلی متر تعیین گردید. همچنین در بررسی باکتری گرم مثبت قطر هاله عدم رشد برای نمونه کنترل و /شرشیا کلاسی به ترتیب ۱۵ و ۳ میلی متر نشان داده است. نتایج این بررسی‌ها نشان می‌دهد که موسیلاژ دانه مرورو

مطالعه ساکتیول و همکاران (۲۰۱۲) و سفری و همکاران (۲۰۱۵)، نشان داده شده است که استخراج متابولیت‌های ثانویه میکروبی، باعث اثر ضد میکروبی در گیاهان است [۴۲ و ۴۱]. بنابراین پژوهش حاضر با پژوهش‌های پیشین مطابقت دارد.

مستقیم ترکیبات هیدروفوب با فسفولیپید دو لایه‌ای صورت می‌گیرد. این تماس محلی است که ترکیبات هیدروکلوئیدی اثر خود را برجای می‌گذارند. این اثر می‌تواند به صورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و ترکیبات حیاتی سلول یا نشت ترکیبات حیاتی سلول رخ دهد و یا سیستم آنزیمی باکتری را ناتوان کند [۴۱]. در

Table 5. Investigating the antimicrobial properties of the mucilage of *Salvia macrosiphon* L. seed using the average diameter of the halo of non-growth (disc diffusion).

Factor	Treatment	The diameter of the aura of lack of growth (mm)
Gram positive bacteria	Control	23.00±1.00 ^A
	<i>Staphylococcus</i>	8.00±0.2 ^B
Gram negative bacteria	Control	15.00±0.5 ^A
	<i>Staphylococcus</i>	3.00±0.2 ^B

The results are presented in the form of average standard deviation for each treatment, all experiments were done in three repetitions. Values with different capital letters are significantly different from each other at the 5% level.

موسیلاژ، قطر نانوالیاف به شکل قابل توجهی افزایش می‌یابد و این افزایش به دلیل افزایش گرانیروی محلول پلیمری رخ می‌دهد. سطح تماس موسیلاژ با نوک نازل و جمع‌کننده نیز می‌تواند تأثیرگذار باشد. سطح تماس بالا و یکنواخت میان موسیلاژ و سطح نوک نازل و جمع‌کننده می‌تواند به تشکیل نانوالیاف مسطح کمک کند. تنش سطحی موسیلاژ نیز می‌تواند در تشکیل نانوالیاف مسطح تأثیرگذار باشد. تنش سطحی بالا می‌تواند منجر به تسهیل تشکیل نانوالیاف مسطح شود. چن و همکاران (۲۰۱۰) به عنوان نتیجه تجربیات الکتروریسی کلاژن و کیتوزان در تری‌فلورواستیک اسید، گزارش کرده اند که قطر متوسط الیاف بین ۲۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر است [۴۴]. همچنین گزارش کرده‌اند که با افزایش میزان کیتوزان، قطر الیاف کاهش می‌یابد، اما به دلیل ایجاد ویسکوزیته بالا در غلظت‌های بیشتر کیتوزان، امکان الکتروریسی آن‌ها وجود نداشته است. در این تجربه، با افزایش غلظت موسیلاژ، احتمالاً ویسکوزیته محلول پلیمری افزایش یافته است. این ویسکوزیته بالا

۳-۳- خصوصیات تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانو الیاف قبل و بعد از ریزپوشانی

با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی در غلظت‌های مختلف وزنی، نانوالیاف موسیلاژ مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تصاویر نشان می‌دهند که الیاف تولید شده در غلظت‌های متفاوت دارای ساختار مسطح و یکنواخت هستند. متوسط قطر این نانوالیاف حدود ۴۰ نانومتر با ضریب واریانس ۱۳٪ است، که نشان می‌دهد قطر الیاف نسبتاً یکنواخت است. نانوالیاف مسطح به دلیل عدم تبخیر حلال در فاصله بین نوک نازل و جمع‌کننده تولید می‌شوند. بنابراین، افزایش غلظت محلول موسیلاژ و درصد ثابت پلی‌وینیل‌الکل باعث افزایش قطر نانوالیاف به طرز قابل توجهی می‌شود (نمونه کنترل حاوی کنسانتره پروتئینی سیوس برنج و پلی‌وینیل‌الکل). این افزایش قطر نانوالیاف به دلیل افزایش گرانیروی محلول پلیمری رخ می‌دهد [۴۳]. شکل ۱ نیز تأثیر غلظت موسیلاژ بر قطر نانوالیاف را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت محلول

یا زیاد باشد مانع از تشکیل ایاف بر روی سطح می شود و این امر بر روی خصوصیات سطح کششی و هدایت الکتریکی جریان می - گذارد. به همین دلیل، برای تشکیل نانوالیاف مسطح با خواص مطلوب، ممکن است نیاز به انتخاب نمونه هایی با قطر مناسب تری باشد.

می تواند باعث کاهش جریان الکتریکی و مشکل در الکتروریسی الیاف شود. به عبارت دیگر، در غلظت های بیشتر موسیلاژ، الیاف تشکیل شده به دلیل ویسکوزیته بالا و شرایط الکتریکی ناتوان در الکتروریسی هستند. که بهترین نمونه از لحاظ قطر کمتر نمونه B به دلیل اینکه اگر میزان موسیلاژ کمتر در محلول الکتروریسی کم

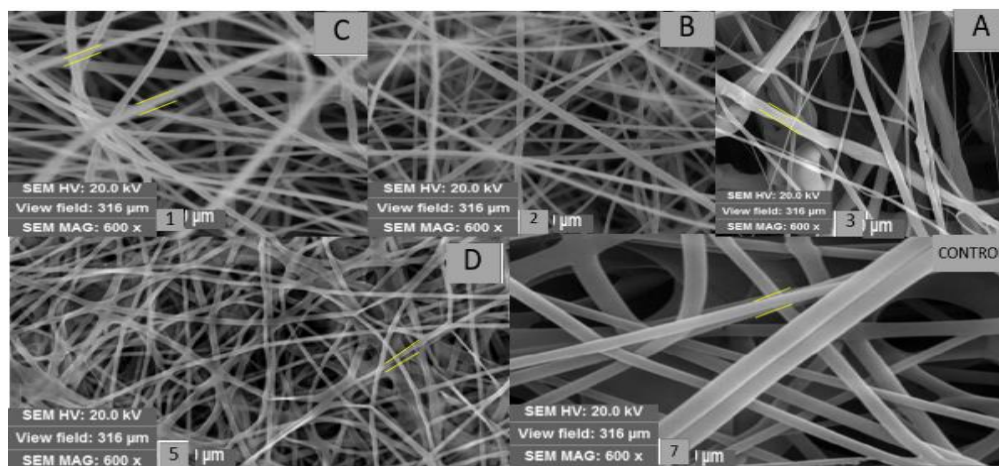


Figure 1. Morphology of nanofibers produced from extracted mucilage of *Salvia macrosiphon L.* seeds in samples containing composite nanofibers (Control: Polyvinyl alcohol 4% + rice bran protein 4% + 1% vitamin D3, A: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.1% *Salvia macrosiphon L.* seed mucilage, B: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.3% *Salvia macrosiphon L.* seed mucilage, C: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.5% *Salvia macrosiphon L.* seed mucilage, D: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.7% *Salvia macrosiphon L.* seed mucilage).

با نسبت وزن متفاوت نایلون-۶ به کیتوزان با استفاده از فرایند الکتروریسی ساختند. آن ها متوجه شدند که مورفولوژی و قطر نانوالیاف تحت تأثیر غلظت محلول و نسبت وزن مواد تشکیل دهنده آن ها قرار دارد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که با استفاده از مخلوط نایلون-۶/کیتوزان با نسبت های مختلف وزن، قطرهای مختلفی از فیبر تشکیل می شود. با توجه به نتایج، نانوالیاف دارای میانگین قطر ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر بودند. هنگامی که محتوای کیتوزان افزایش می یابد قطر فیبر به تدریج کاهش می یابد، به خصوص زمانی که محتوای کیتوزان بیش از ۳۱ درصد وزنی می شود. پژوهش حاضر با پژوهش های پیشین مطابقت دارد.

در شکل ۲ نانوالیاف الکتروریسی شده با غلظت های متفاوت موسیلاژ و درصد ثابت پلی وینیل الکل و ایزوله پروئینی و بستر ریزپوشانی شده ویتامین D₃ مشاهده شد در نمونه ای که حاوی غلظت ۰/۵ موسیلاژ است.

وان سالک و همکاران (۲۰۱۴) از کامپوزیت ایجاد شده از ژئین و کیتوزان برای ریز پوشانی کردن آلفاتوکوفرول استفاده کردند و میانگین قطر به دست آمده را بین ۵۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر گزارش کردند [۴۵]. یک غشای کامپوزیتی از نانوالیاف نایلون-۶/کیتوزان

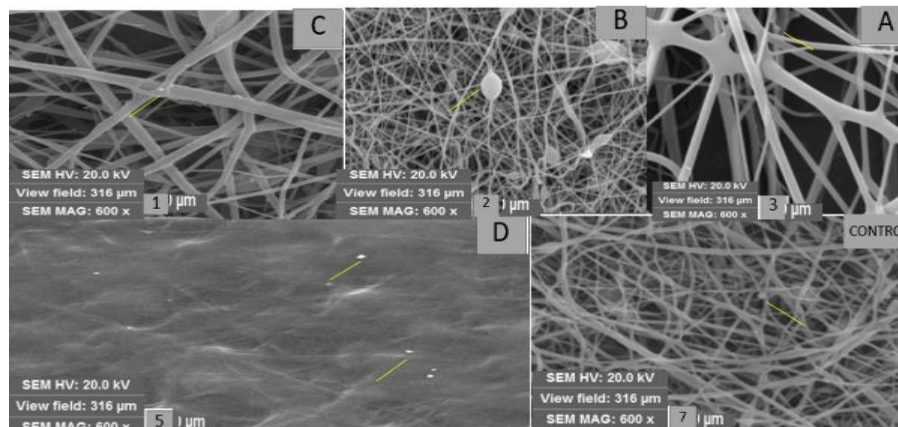


Figure 2. Morphology of nanofibers produced from extracted mucilage of *Salvia macrosiphon* L. seeds in samples containing encapsulated composite nanofibers (Control: Polyvinyl alcohol 4% + rice bran protein 4% + 1% vitamin D3, A: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.1% *Salvia macrosiphon* L. seed mucilage, B: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.3% *Salvia macrosiphon* L. seed mucilage, C: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.5% *Salvia macrosiphon* L. seed mucilage, D: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.7% *Salvia macrosiphon* L. seed mucilage).

بود (منسوب به ارتعاش C-O گلوکز). سپس، شدت مشخصه ها در ۱۰۸۰-۱۰۹۰ بر سانتی متر در ۱۰۸۰ و ۱۱۲ بر سانتی متر به اوج می رسد [۴۶]. گادهاو و همکاران (۲۰۱۹) نیز نتیجه مشابهی را گزارش کردند که نمایه FTIR فیلم کامپوزیت پلی ونیل-الکل/نشاسته به سمت اعداد موج پایین با افزایش غلظت تغییر مکان داد [۴۷]. بر اساس مطالعات قبلی، الکتروریسی محلول های کامپوزیتی ممکن است منجر به تغییراتی در ترکیب محلول بعد از ریزپوشانی از الکتروریسی نانوالیاف تولید شود به همین دلیل ترکیب نانوالیاف با نمودارهای طیف سنجی نشان می دهد که در نمونه های نانوکامپوزیت و ریزپوشانی شده، از ویتامین D₃، دو پیک قوی در محدوده ۱۴۵۴ و ۱۷۴۳ بر سانتی متر وجود دارند که ارتعاشات کششی مربوط به گروه C=C در حلقه های آروماتیک ترکیبات فنولیک را نشان می دهند. پیک های مشاهده شده در محدوده ۲۹۲۳ و ۲۸۵۴ بر سانتی متر نیز به ارتعاشات کششی گروه H-C گروه های متیلن موجود در حلقه های فنولیک اشاره دارند. نوار پهن در با مرکزیت در ۳۳۳۱ بر سانتی متر به دلیل وجود گروه های هیدروکسیل و ویتامین D₃، ایجاد (O=C) گروه کربوکسیل به همراه پیوندهای متیل را نشان می دهد. پیک های مشاهده شده در ۱۱۵۶ و ۱۰۸۷ بر سانتی متر به ارتعاشات کششی نامتقارن O-C و ارتعاشات کششی N-C مربوط هستند. همچنین،

۴-۳- خصوصیات گروه های عاملی نانو الیاف نانو الیاف قبل و بعد از ریزپوشانی

آنالیز طیف سنجی FTIR یکی از روش های مورد استفاده در بررسی گروه های آلی موجود در هیدروکلوئیدها است. در این روش، نور مادون قرمز از طریق نمونه عبور داده می شود و سپس با ماده جامدی تداخلی برخورد کرده و به شکل یک طیف جذب و شکست یافته نمایش داده می شود [۱۳]. طیف های حاصل از سامانه طیف سنجی FTIR مربوط به نمونه هیدروکلوئید نانوالکتروریسی از موسیلاژ در شرایط بهینه (توان برابر با ۶۰۰ وات، زمان برابر با ۴ دقیقه و pH برابر با ۰/۱) در شکل ۳ نشان داده شده است. ناحیه جذبی قوی بین ۳۵۰۰-۳۳۰۰ بر سانتی متر مربوط به گروه های عاملی OH موجود در قسمت های مختلف ساختار پلیمر موسیلاژ است. پیک ظاهر شده در نوار ۲۱۲۲ بر سانتی متر مربوط به ارتعاشات کششی آلیفاتیک H-C می باشد که شامل ارتعاشات خمشی و کششی گروه های CH₃، CH₂، CH است. به همین ترتیب، نوار ظاهر شده در ۱۷۴۳ مربوط به ارتعاشات CH-O₃ می باشد. سیمون و همکاران (۲۰۱۴) به این نتیجه رسیدند که بیشترین تغییرات جذب نسبی داربست های ژلاتینی پس از اتصال عرضی میلارد ۱۰۸۱ و ۱۰۳۵ بر سانتی متر

مربوط می‌شوند. با توجه به ترکیبات موجود، در محدوده ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ بر سانتی‌متر می‌توان پیک‌های مربوط به گروه‌های آمید، C-H آلیفاتیک و آروماتیک، و C=C آلکن‌ها را مشاهده کرد که به مرور کاهش یافته‌اند. یافته مشابهی توسط وانگ و همکاران (۲۰۱۵) گزارش شده است [۴۸].

پیک‌های مشاهده شده در ۷۲۲ و ۸۷۸ بر سانتی‌متر به خمش‌های خارج از صفحه‌ای پیوندهای H-C حلقه‌های فنولیک اشاره می‌کنند. در نمودارهای، طیف‌سنجی ریزپوشانی شده از ویتامین D3 نیز پیک‌هایی در محدوده‌های ۱۴۵۸، ۱۵۱۷، ۲۸۵۴ و ۳۳۲۹ بر سانتی‌متر نشان می‌دهد. این پیک‌ها به ترتیب ارتعاشات کششی H-O، ارتعاشات کششی H-C ناشی از گروه‌های CH₃، آمیدهای نوع اول، آمیدهای نوع دوم، خمش‌های H-C و آمیدهای نوع سوم

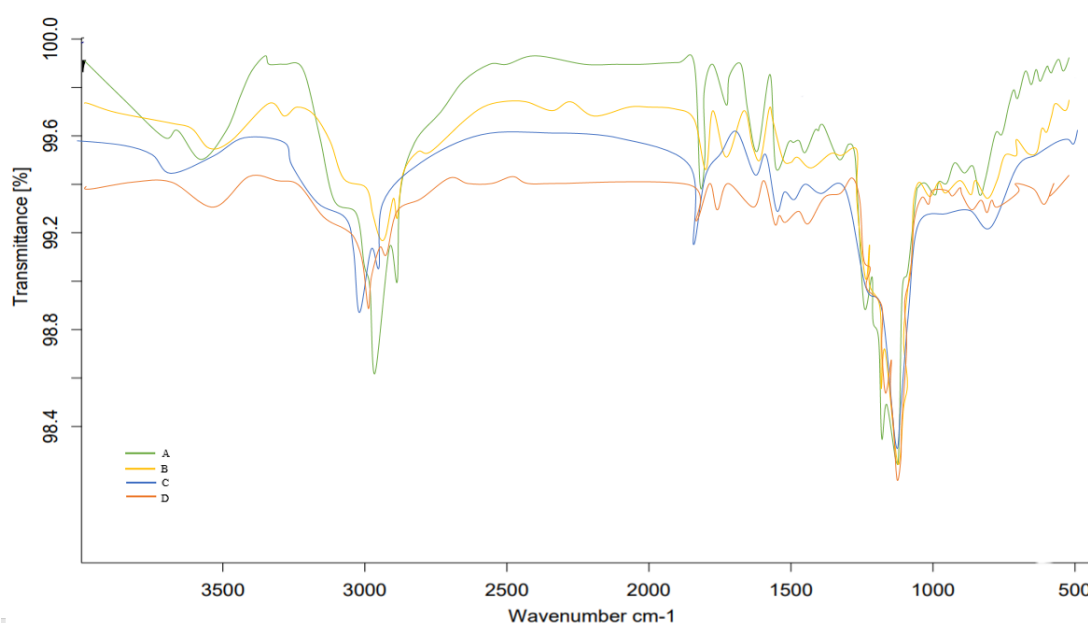


Figure 3. FTIR spectroscopy in the range of 400 to 4000 cm^{-1} in the samples containing micro-coated composite nanofiber compounds. (A: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.1% *Salvia macrosiphon* L. seed mucilage, B: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.3% *Salvia macrosiphon* L. seed mucilage, C: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.5% *Salvia macrosiphon* L. seed mucilage, D: Polyvinyl alcohol 4% + rice sauce protein 4% + 1% vitamin D3 + 0.7% *Salvia macrosiphon* L. seed mucilage).

۴-نتیجه گیری

در کپسول‌ها و الیاف با ظرفیت بالا کپسوله شد. ادغام موسیلاژ دانه *Salvia macrosiphon* L. / پلی‌ونیل‌الکل / کنسانتره پروتئین سبوس برنج باعث کاهش میانگین قطر الیاف و افزایش میانگین قطر کپسول‌ها شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کپسول‌ها و الیاف حاوی ویتامین مواد کاربردی برای استفاده در صنایع غذایی هستند، به‌ویژه آنهایی که اهمیت بالایی از لحاظ ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی دارند. زیرا تخریب ویتامین با ریزپوشانی کاهش می‌یابد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی از خود نشان می‌دهند. از

پیشرفت در فرآیندهای تولید نانوساختارها و نانومواد با خصوصیات فرمولی مناسب، تولید نانوذرات پایدار با قابلیت کاربرد در صنعت غذا و صنایع وابسته را فراهم می‌سازد در میان آنها، فیلم‌های نانوالیاف دارای توزیع قطر یکنواخت‌تر و جهت‌گیری بهتری هستند. موسیلاژ دانه *Salvia macrosiphon* L. پتانسیل زیادی به عنوان یک پلیمر برای تولید کپسول و الیاف با استفاده از تکنیک الکترورسی نشان داد. ویتامین D3 با موفقیت

ویتامین‌ها، اسیدهای چرب ضروری و املاح معدنی) به عنوان نانوحامل‌های قدرتمند در سیستم‌های غذایی به‌ویژه غذای کودکان جهت افزایش ریزمغذی‌ها بهره برد.

موسیلاژ دانه *Salvia macrosiphon* L. / پلی‌ونیل‌الکل / کنسانتره پروتئین سیوس برنج که یک ترکیب ارزان و قابل دسترس است با استفاده از روش الکتروریسی که دارای پتانسیل بالایی به دلیل برخورداری از ویژگی‌های منحصر به فرد مانند نسبت سطح به حجم بالا، تخلخل قابل کنترل و ظرفیت بالای بارگذاری (دارو،

ه-منابع

- [1] Zurutuza, A., & Marinelli, C. (2014). Challenges and opportunities in graphene commercialization. *Nature Nanotechnology*, 9(10), 730–734. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2014.225>
- [2] Yang, D. Z., Yu, K., Ai, Y. F., Zhen, H. P., Nie, J., & Kennedy, J. F. (2011). The mineralization of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membranes. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 990–996. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.057>
- [3] Zeng, Y., Zhu, Z., Du, D., & Lin, Y. (2016). Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 781, 147–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.10.030>
- [4] Deng, L. L., Li, Y., Feng, F. Q., & Zhang, H. (2019). Study on wettability, mechanical property and biocompatibility of electrospun gelatin/zein nanofibers cross-linked by glucose. *Food Hydrocolloids*, 87, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.042>
- [5] Yun, P., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2021). Microstructures of encapsulates and their relations with encapsulation efficiency and controlled release of bioactive constituents: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 1768–1799. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12701>
- [6] Wen, P., Zong, M. H., Linhardt, R. J., Feng, K., & Wu, H. (2017). Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 70, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.009>
- [7] Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Azeredo, H. M., Lorevice, M. V., Moura, M. R., Mattoso, L. H., et al. (2017). Recent advances on edible films based on fruits and vegetables—a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1151–1169
- [8] Xu, Cai, S. B., Sellers, A., & Yang, Y. Q. (2014). Electrospun ultrafine fibrous wheat glutenin scaffolds with three-dimensionally random organization and water stability for soft tissue engineering. *Journal of Biotechnology*, 184, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.011>
- [9] Santos, F. N., Souza, E. J. D., Souza, J. F., Pires, J. B., Siebeneichler, T. J., Kringel, D. H., ... Zavareze, E. D. R. (2022). Encapsulation of anthocyanic extract of jambolan (*Syzygium cumini* (L.)) in zein sub - micron fibers produced by electrospinning. *Food Biophysics*. <https://doi.org/10.1007/s11483-022-09758-3>
- [10] De Freitas Z^ompero, R. H., L'opez-Rubio, A., de Pinho, S. C., Lagaron, J. M., & de la Torre, L. G. (2015). Hybrid encapsulation structures based on β -carotene-loaded nanoliposomes within electrospun fibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 134, 475–482. [10.1016/j.colsurfb.2015.03.015](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.015)
- [11] Najafi Z., Cetinkaya, T., Bildik, F., Altay F., & Şahin-Yeşilçubuk, N., 2022. Nanoencapsulation of saffron (*Crocus sativus* L.) extract in zein nanofibers and their application for the preservation of sea bass fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 163 (2022) 113588. [10.1016/j.lwt.2022.113588](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113588)
- [12] Wang, Yi, S., Chu, C., Liu, H., & Jiang, S. (2015). Preparation, antimicrobial and release behaviors of nisin-poly (vinyl alcohol)/wheat gluten/ZrO₂ nanofibrous membranes. *Journal of Materials Science*, 50(14), 5068–5078. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9059-0>

- [13] Xu, Li, J. J., Yu, D. G., Williams, G. R., Yang, J. H., & Wang, X. (2017). Influence of the drug distribution in electrospun gliadin fibers on drug-release behavior. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106, 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.017>
- [14] Zhang, Deng, L., Zhong, H., Pan, J., & Zhang, H. (2020). Superior water stability and antimicrobial activity of electrospun gluten nanofibrous films incorporated with glycerol monolaurate. *Food Hydrocolloids*, 109, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106116>.
- [15] Aziz, S., Hosseinzadeh, L., Arkan, E., & Azandaryani, A. H. (2019). Preparation of electrospun nanofibers based on wheat gluten containing azathioprine for biomedical application. *International Journal of Polymeric Materials*, 68(11), 639–646. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1482464>
- [16] Elham, T.-K., Hossein Goli, S. A., & Milad, F. (2017). Fabrication and characterization of electrospun gelatin nanofibers crosslinked with oxidized phenolic compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1062–1068. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.152>
- [17]. Feng, L., Li, R., Song, R., & Wang, R. (2010). Formation process of a strong waterrepellent alumina surface by the sol–gel method. *Applied Surface Science*, 256(10), 3191–3196. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.12.004>
- [18] Mir, S. A., Dar, B. N., Wani, A. A., & Shah, M. A. (2018). Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.004>
- [19] Mayeli, M., Mehdizadeh, T., Tajik, H., Esmaeli, F., & Langroodi, A. M. (2019). Combined impacts of zein coating enriched with methanolic and ethanolic extracts of sour orange peel and vacuum packing on the shelf life of refrigerated rainbow trout. *Flavour and Fragrance Journal*, 34(6), 460–470.
- [20] Pham, T. T., Nguyen, L. L. P., Dam, M. S., & Baranyai, L. (2023). Application of edible coating in extension of fruit shelf life. *AgriEngineering*, 5, 520–536.
- [21] Singh, T. S., & Sogi, D. S. (2018). Comparative study of structural and functional characterization of bran protein concentrates from superfine, fine and coarse rice cultivars. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 281–288.
- [22] Amaglian, L., Jonathan, O'R., Kelly, Mahony, J. A. (2017). Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis* 59, 10.1016/j.jfca.2016.12.026
- [23] Mallard S.R., A.S. Howe, L.A. Houghton, Vitamin D status and weight loss: a systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized controlled weight-loss trials, *Am. J. Clin. Nutr.* 104 (4) (2016) 1151–1159, <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.13.6879>.
- [24] Tavares, L. S., Junqueira, L. A., Guimarães, I. C. O., & Resende, J. V. (2018). Coldextraction method of chia seed mucilage (*Salvia hispanica* L.): Effect on yield and rheological behavior. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 457–466. doi:10.1007/s13197-017-2954-4.
- [25] Singhal, S., Rasane, P., Kaur, S., Singh, J., & Gupta, N. (2020). Thermal degradation kinetics of bioactive compounds in button mushroom (*Agaricus bisporus*) during tray drying process. *Journal of Food Process Engineering*, 43, Article e13555.
- [26] Kang, S., Kong, F., Shi, X., Han, H., Li, M., Guan, B., et al. (2020). Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Pseudomonas fluorescens* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its application on whole milk. *Food Control*, 108, Article 106876. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106876>
- [27] Wani, I. A., Sogi, D. S., & Gill, B. S. (2015a). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolysed protein isolates from Indian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars. *LWT Food Science & Technology*, 60, 848–854.

- [28] Ahmad, N. A., Leo, C. P., Ahmad, A. L., & Ramli, W. K. W. (2015). Membranes with great hydrophobicity: A review on preparation and characterization. *Separation and Purification Reviews*, 44, 109–134. <https://doi.org/10.1080/15422119.2013.848816>.
- [29] Fonseca, L. M., Oliveira, J. P., Crizel, R. L., Silva, F. T., Zavareze, E. R., & Borges, C. D. (2020a). Electrospun starch fibers loaded with pinh~ ao (*Araucaria angustifolia*) coat extract rich in phenolic compounds. *Food Biophysics*, 15, 355–367. <https://doi.org/10.1007/s11483-020-09629-9>
- [30] Ebrahimi Behzad, Reza Mohammadi , Milad Rouhi , Amir Mohammad Mortazavian, , Saeedeh Shojaee-Aliabadi, , Mohammad Reza Koushki (2018). Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *J. LWT Volume 87*, January 2018, Pages 54-60 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.066>
- [31] Kiani, A., Fathi, M., & Ghasemi, S. M. (2017). Production of novel vitamin D3 loaded lipid nanocapsules for milk fortification. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2466- 2476. DOI: 10.1080/10942912.2016.1240690
- [32] Batista, J. D. F., Dantas, A. M., dos Santos Fonseca, J. V., Madruga, M. S., Fernandes, F. A. N., Rodrigues, S., & da Silva Campelo Borges, G. (2021). Effects of cold plasma on avocado pulp (*Persea americana* Mill.): Chemical characteristics and bioactive compounds. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, 15179. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15179>
- [33] Ali R, Khan S, Khan M, Adnan M, Ali I, Khan TA, et al. A systematic review of medicinal plants used against *Echinococcus granulosus*. *Plos One* 2020;15: e0240456.
- [34] Jing, Y., Huang, J., & Yu, X. (2019). Maintenance of the antioxidant capacity of fresh-cut pineapple by procyanidin-grafted chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 154, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.04.022>
- [35] Rodrigues, M. A. V., Bertolo, M. R. V., Marangon, C. A., Martins, V. C. A., & Plepis, A. M. G. (2020). Chitosan and gelatin materials incorporated with phenolic extracts of grape seed and jabuticaba peel: Rheological, physicochemical, antioxidant, antimicrobial and barrier properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 769–779. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.240>
- [36] Oliveira, J.G. de A.R.C. Braga, B.R. 2021. De Oliveira, F.P. Gomes, V.L. Moreira, V.A. C. Pereira, M.B. Egea, The potential of anthocyanins in smart, active, and bioactive eco-friendly polymer-based films; A review, *Food Res. Int.* 142, 110202.
- [37] Abo-Samaha, M. I., Alghamdi, Y. S., El-Shobokshy, S. A., Albogami, S., ElMaksoud, E. M. A., Farrag, F., & El-Hack, M. E. A. (2022). Licorice extract supplementation affects antioxidant activity, growth-related genes, lipid metabolism, and immune markers in broiler chickens. *Life (Chicago, Ill. : 1978)*, 12 (6), 914
- [38] Thakur, A. K., & Raj, P. (2017). Pharmacological perspective of *Glycyrrhiza glabra* Linn: A mini-review. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 5(5), 00156.
- [39] Petriccione, M., De Sanctis, F., Pasquariello, M. S., Mastrobuoni, F., Rega, P., Scortichini, M., & Mencarelli, F. (2015). The Effect of Chitosan Coating on the Quality and Nutraceutical Traits of Sweet Cherry During Postharvest Life. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 394–408. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1411-x>
- [40] Sakthiguru, N., & Sithique, M. A. (2020). Fabrication of bioinspired chitosan/gelatin/ allantoin biocomposite film for wound dressing application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 873–883. and diverse applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 70–82.
- [42] Shakeri MS, Shahidi F, Beiraghi-Toosi S, Bahrami A. Antimicrobial activity of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil incorporated with whey protein based films on pathogenic and probiotic bacteria. *Int J Food Sci Tech* 2011;46 (3):549-54. [in persian]

- [41] Safari, R., Adel, M., Monji, H., Riyahi Cholicheh, H., Nematollahi, A. 2015. Evaluation of antibacterial effect of some of the endemic herbal essential oils on *Streptococcus iniae* in invitro. *Journal of Aquatic Ecology*. 4(4): 40 -33 . (in Persian)
- [43] Li, J., Pan, K., Tian, H., & Yin, L. (2020). The potential of electrospinning/electrospraying technology in the rational design of hydrogel structures. *Macromolecular Materials and Engineering*, 305(8), 1438. <https://doi.org/10.1002/mame.202000285>
- [44] Chen, Z.G., Wang, P.W., Wei, B., Mo, X.M., Cui, F.Z. (2010). Electrospun collagen-chitosan nanofibr A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscell cell. *Acta Biomaterialia*, 6, 372-382.
- [45] Wengsasulak, S.W., Pathumban, S. (2014). Effect of entrapped alfa-tocopherol on mucoadhesivity and evaluation of the release degradation and swelling characteristics of zein-chitosan composite electrospun fibers. *J. Food Eng.*, 120, 110-117.
- [46] Siimon, K., Reemann, P., Poder, A., Pook, M., Kangur, T., Kingo, K., ... Jaervekuelg, M. (2014). Effect of glucose content on thermally cross-linked fibrous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 42(sep), 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.075>
- [47] Gadhave, R. V., Mahanwar, P. A., & Gadekar, P. T. (2019). Effect of glutaraldehyde on thermal and mechanical properties of starch and polyvinyl alcohol blends. *Designed Monomers and Polymers*, 22(1), 164–170.
- [48] Wang, Yi, S., Chu, C., Liu, H., & Jiang, S. (2015). Preparation, antimicrobial and release behaviors of nisin-poly (vinyl alcohol)/wheat gluten/ZrO₂ nanofibrous membranes. *Journal of Materials Science*, 50(14), 5068–5078. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9059-0>



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Studying the production of composite nanofibers from the hydrocolloid compounds of *Salvia macrosiphon L.* seeds by electrospinning method in order to cover vitamin D3

Sedigheh Yazdanpanah^{1*}, Mona Ghorbaninezhad²

1- Associate Professor, Department of Food Science and Industry, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

2- Ph.D. student, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2024/6/9 Accepted:2024/9/11 Keywords: Electrospinning method, Nanofiber, <i>Salvia macrosiphon L.</i> DOI: 10.22034/FSCT.22.158.155. *Corresponding Author E- yazdanpanah2004@gmail.com	Advancement in the production processes of nanostructures with appropriate formula characteristics provides the production of stable nanoparticles with the ability to be used in the food industry. Microencapsulated bioactive compounds can be integrated into electrospun fibers to achieve greater stability of nanoparticles against heat and light, which leads to increased storage time. In the present study, composite nanofiber layers were made from mucilage extracted from <i>Salvia macrosiphon L.</i> seeds using electrospinning. The nanocomposite of nanofibers was prepared from polyvinyl alcohol/rice bran protein isolate/ <i>Salvia macrosiphon L.</i> seed mucilage in different ratios. Then the morphology and FTIR spectroscopy were investigated. The average diameter of the produced nanofibers is about 40 nm and the coefficient of variance is 13%, which showed that the diameter of the fibers is relatively uniform. Increasing the concentration of the mucilage solution and the constant percentage of polyvinyl alcohol significantly increased the diameter of the nanofibers. In the next step, vitamin D3 was encapsulated in polyvinyl alcohol nanofibers and rice bran protein concentrate. FTIR results confirmed the presence of vitamin D3 in the prepared nanofibers. At higher concentrations of phenolic compounds, with the increase in the number of hydroxyl groups of aromatic rings in the reaction medium, the inhibitory power of mucilage free radicals increased. The composition of nanofibers in the spectroscopic graphs showed that there are two strong peaks in the range of 1454 and 1743 CM⁻¹ from vitamin D3 in the nanocomposite and microcoated samples which show the stretching vibrations related to the C=C group in the aromatic rings of phenolic compounds. Based on the findings, bioactive compounds to increase access to vitamin D3 can be enclosed in electrospun nanofibers of <i>Salvia macrosiphon L.</i> mucilage/polyvinyl alcohol/rice bran protein concentrate.



ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و پتانسیل ضد میکروبی عصاره آلوئه‌ورا بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی: یک مطالعه آزمایشگاهی

نرگس شریفیات^۱، محمد امین مهرنیا^{۲*}، حسن برزگر^۲، بهروز علیزاده بهبهانی^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

در جوامع امروزی مصرف مواد غذایی با ترکیبات و نگهدارنده‌های طبیعی به دلیل آگاهی مصرف‌کننده به تأثیر رژیم غذایی بر سلامت و پیشگیری از بیماری‌ها افزایش یافته است. به همین منظور در این پژوهش میزان فنل و فلاونوئید تام، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و اثر ضد میکروبی عصاره آبی به دست آمده از برگ گیاه آلوئه‌ورا مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان فنل و فلاونوئید کل به ترتیب $41/61$ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره و $783/33$ میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره اندازه‌گیری شد. بالاترین درصد مهارکنندگی برای رادیکال آزاد DPPH، $68/39\%$ و برای رادیکال آزاد ABTS، $50/07\%$ در بیشترین غلظت (600 میلی گرم بر میلی لیتر) مشخص شد. باتوجه به نتایج به دست آمده، بیشترین اثر ضد میکروبی عصاره در روش‌های دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار بر باکتری‌های گرم مثبت بود. کمترین غلظت بازدارنده از رشد برای پاتوژن‌های *اشرشیا کلی*، *شیگلا دیسانتری*، *سالمونلا تیفی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* به ترتیب برابر با 32 ، 64 ، 32 ، 16 و 32 میلی گرم بر میلی لیتر بود. درکل می‌توان گفت عصاره آبی آلوئه‌ورا یک ترکیب آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب مناسب است و می‌توان از آن به عنوان یک نگهدارنده طبیعی استفاده کرد.

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: $1403/4/13$

تاریخ پذیرش: $1403/6/5$

کلمات کلیدی:

ژل آلوئه‌ورا،

ضد باکتری،

ترکیبات زیست فعال،

نگهدارنده طبیعی.

DOI:10.22034/FSCT.22.158.172.

* مسئول مکاتبات:

mehrnia@asnrukh.ac.ir

۱- مقدمه

مواد غذایی باعث ایجاد یکسری تغییرات در محیط شده که باتوجه به خواست مهندسان صنایع غذایی می‌توانند نتایج مطلوبی را در محصول اعمال نمایند [۳، ۴ و ۵].

شرایط سخت و نامطلوب رشد گیاه و اجتماع رادیکال‌های آزاد موجب ایجاد سیستم‌های پیچیده آنزیمی و غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدانی در آن‌ها شده است. سیستم غیرآنزیمی با مکانیسم‌های مختلف باعث افزایش مقاومت سلول‌های گیاه در برابر استرس اکسیداتیو شده و در نتیجه با مصرف توسط انسان این ویژگی را در بدن نیز تقویت می‌کند. استرس اکسیداتیو مسئول برخی از اختلالات و بیماری‌ها مانند آلزایمر، سرطان، تصلب شرائین و اختلالات قلبی عروقی در انسان می‌شود. درواقع وجود ترکیبات پلی‌فنلی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیداسیونی و ایجاد تعادل در بدن می‌شوند. قابل ذکر است که این ترکیبات حتی در غلظت‌های پایین نیز اثر خود را اعمال خواهند کرد [۶].

امروزه مقاومت پاتوژن‌ها در برابر فعالیت مهاري یا تخریب توسط آنتی‌بیوتیک‌ها به‌خاطر استفاده بی‌رویه و نامنظم بالا رفته است. جداسازی ترکیبات زیست‌فعال مشتق شده از گیاهان دارویی با توجه به ماهیت درمانی و ترکیبات مفید زیاد، تنوع بالا و دسترسی ارزان و آسان رویکردی مناسب برای مقابله علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ارائه می‌دهند. سازمان بهداشت جهانی^۱ مقاومت میکروبی را فوری‌ترین مسئله‌ای اعلام کرده که پزشکی با آن مواجه شده است. برای رفع این مسئله نوظهور و باتوجه به این امر که درحال حاضر نیز درصدی از داروهای مورد استفاده منشأ گیاهی دارند؛ با شناسایی ترکیبات ضدمیکروب گیاهان مختلف و استفاده از آن‌ها می‌توان به کشف و تولید داروهای جدید با عملکرد مناسب در برابر پاتوژن‌های مقاوم شده به‌دست آورد. در نتیجه تعیین میزان فعالیت ضدمیکروبی گیاهان مختلف به هدفی برای محققین و پژوهشگران تبدیل شده است [۷ و ۸].

آلوئه‌ورا^۲ از خانواده *Liliaceae* گونه گیاهی سبز و چندساله است که بیشتر در مناطق خشک و گرم (خاورمیانه، شمال

تاکنون شواهد بسیاری در مورد اثر مستقیم مواد غذایی بر سلامت انسان به‌دست آمده که تمامی این شواهد میزان نیاز و درخواست مصرف‌کننده را برای در دسترس قرار گرفتن غذاهای سالم و مغذی بالا برده است. همچنین شیوع بیماری‌هایی چون سرطان، دیابت و مشکلات قلبی و عروقی ناشی از رژیم غذایی و نحوه زندگی نادرست در جوامع امروزی؛ باعث نگرانی مردم و تجدیدنظر در سبد مصرفی شده‌است. گیاهان برای قرن‌ها در زمینه‌های مختلفی چون مصارف غذایی و دارویی مورد استفاده انسان‌ها قرار می‌گرفتند. در واقع وجود ترکیبات مشتق شده از متابولیسم ثانویه گیاه چون ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، ترپنوئیدی و دیگر ترکیبات مفید زیستی و همچنین فیبر بالا باعث شده گیاهان نه تنها به‌عنوان منابع غذایی مصرف شوند بلکه از قدیمی‌ترین راه‌های پیشگیری یا درمان بیماری‌های مختلف باشند که تا امروز نیز این روند ادامه یافته است [۱ و ۲].

در صنعت غذا نیز می‌توان از گیاهان و ترکیبات درون آن‌ها به‌صورت مستقیم و یا غیرمستقیم بهره برد. یکی از راه‌های افزایش طول عمر و ماندگاری مواد غذایی استفاده از نگهدارنده‌های مصنوعی است. این نگهدارنده‌ها به‌دلیل نگرش منفی مردم به مصنوعی بودنشان که با افزایش آگاهی آن‌ها درمورد محصولات که روزانه مصرف می‌کنند ایجاد شده‌است؛ به‌مرور درحال جایگزینی با نگهدارنده‌های طبیعی یا همان عصاره‌ها یا اسانس‌های گیاهی‌اند. عصاره‌های گیاهی مایعات سبز نام دارند که با استفاده از حلال‌های مختلفی چون آب، اتانول، متانول و اتیل استات از قسمت‌های مختلف گیاه استخراج می‌شوند. خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی ازجمله ویژگی‌های ناشی از ترکیبات و ماهیت عصاره‌های گیاهی هستند. می‌توان اظهار داشت که خواص ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی بیشتر از عصاره آبی می‌باشد. قسمت‌های مختلف گیاهان دارای مقادیر متفاوت این ترکیبات از جمله پلی‌فنل‌ها هستند که تأثیر بسزایی در کاهش اکسیداسیون دارند. در واقع عصاره‌های گیاهی با حضور در

قندها، استرول‌ها، کرومون‌ها، آنتراکینون‌ها، آلونین، آلونئامودین، استرول‌ها، لیگنین، سالیسیک اسید، فلاونوئیدها، مواد معدنی و ترکیبات فنلی هستند. در مطالعه‌ای فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ این گیاه در برابر سویه‌های باکتریایی چون *اشرشیا کلی*^۳، *استافیلوکوکوس اورئوس*^۴ و *باسیلوس سرئوس*^۵ و برخی قارچ‌ها بررسی شد که نتایج خوبی را نشان داد [۱۲].

همچنین میزان مواد فلاونوئیدی و همچنین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی دو عصاره آبی و اتانولی آلونئورا بررسی شد و به اثبات رسید [۱۳]. هدف از این پژوهش، تعیین میزان فنل و فلاونوئید کل، ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی به دست آمده از برگ آلونئورا با روش‌های انتشار در آگار به کمک دیسک (دیسک دیفیوژن)، انتشار چاهک در آگار و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی^۶ و حداقل غلظت کشندگی^۷ بر پاتوژن‌های *اشرشیا کلی*، *شیگلا دیسانتری*^۸، *سالمونلا تیفی*^۹، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*^{۱۰} و *باسیلوس سرئوس* بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه عصاره آبی آلونئورا

برگ‌های تازه و سبز آلونئورا از بازار محلی شهر ملاثانی خریداری شد. آزمون‌های این مطالعه در آزمایشگاه‌های گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. برای جداسازی مایع غلیظ و تلخ زرد رنگ بین فیله و روکش‌های برگ^{۱۱}، پس از شست‌وشوی برگ‌ها به کمک یک برس و آبکشی نهایی توسط آب مقطر، سر و پایه برگ‌ها جدا شده و به مدت یک ساعت به صورت عمودی درون بشر حاوی آب مقطر قرار گرفتند. بعد از این مدت، با جداسازی تیغه‌های کناری و یک لایه از روکش سبز، فیله بی‌رنگ و آبدار درونی توسط یک قاشق استخراج شد. فیله استخراج شده به مدت ۳ دقیقه درون بلندر خانگی مخلوط و

آفریقا و مدیترانه جنوبی) می‌روید و از هزاران سال پیش به عنوان گیاهی دارویی برای درمان زخم، سوختگی و التهاب پوست مورد استفاده قرار می‌گرفته است. این گیاه دارای حدود ۹۸ درصد آب است و درون لاله‌های سبز رنگ آن فیله بی‌رنگ قرار گرفته است. امروزه از ژل به دست آمده از فیله درون برگ‌های گوشتی آن در صنایع دارویی، آرایشی و غذایی استفاده می‌شود. به ژل بی‌رنگی که از درون برگ‌ها به دست می‌آید، موسیلاژ آلونئورا می‌گویند. درون این ژل بیش از ۷۵ ترکیب مفید مانند ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، مواد معدنی، آنتراکینون‌ها، اسیدهای چرب و کربوهیدرات وجود دارد که هرکدام از این ترکیبات ویژگی‌ها و خواص درمانی مهمی چون خاصیت ضد دیابت، ضد سرطان و ضد چربی خون را باعث می‌شوند. پژوهش‌های مختلفی نشان داده است که وجود پلی‌ساکارید آسه‌مانان به عنوان پلی‌ساکارید عمده و حضور آنتراکینون‌های آلونئورا، عامل اصلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن است که موجب استفاده از این ژل و یا ترکیبات جدا شده از آن به عنوان نگهدارنده در زمینه‌ها و محصولات مختلف غذایی شده است. همچنین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی این گیاه تأثیر بسزایی در این امر دارند [۹ و ۱۰].

ژل آلونئورا به دلیل محتوای آب و فیبر بالای خود بین مردم به عنوان یک ماده خوراکی رژیمی برای کاهش وزن شناخته شده است. محصولات پودری، نوشیدنی و حتی ژل آن مورد مصرف بیماران دیابتی و یا افراد مبتلا به چاقی مزمن قرار می‌گیرد. از این ژل به واسطه دارا بودن خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی در فیلم و پوشش‌های خوراکی برای بسته‌بندی زیست فعال مواد غذایی استفاده می‌شود. افزودن این ژل به مواد خوراکی مخلفی چون سس‌ها، لبنیاتی چون پنیر و ماست و همچنین بستنی نیز گزارش شده است [۱۱]. ترکیبات فعال گزارش شده در برگ این گیاه که در خواص درمانی آن دخیل هستند شامل: ساپونین، آلونئوسین، آنزیم‌ها،

8- *Shigella dysenteriae*
9 - *Salmonella typhi*
10 - *Listeria monocytogenes*
11- Latex

3- *Escherichia coli*
4 - *Staphylococcus aureus*
5 - *Bacillus cereus*
6 - Minimum inhibitory concentration (MIC)
7- Minimum bactericidal concentration (MBC)

۲-۲-۳- مهار رادیکال آزاد ۲، ۲- دی فنیل-۱- پریکیل هیدرازیل^{۱۴}

تعیین کمی فعالیت مهار رادیکال آزاد (DPPH) با اندکی تغییر از طریق روش حجتی و همکاران [۱۷] انجام گرفت. غلظت‌های مختلف عصاره (۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه و در لوله‌های آزمایش ریخته و با نسبت ۱:۱ با محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH که با متانول آماده شده بود، در لوله‌ها مخلوط شدند. پس از گذشت زمان ۳۰ دقیقه نگهداری در تاریکی و دمای اتاق، جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی-فرابنفش گرفته شد. محلول کنترل، نمونه بدون عصاره بود و دستگاه با متانول صفر شد. درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط عصاره از طریق معادله ۱ تعیین شد که $A_{Control}$: جذب محلول متانولی DPPH بدون اسانس و A_{Sample} : جذب محلول متانولی DPPH در واکنش با غلظت خاصی از عصاره می‌باشد.

معادله ۱: تعیین درصد مهار رادیکال‌های آزاد

$$RSE^{15\%} = [(A_{Control} - A_{Sample}) / A_{Control}] \times 100$$

۲-۲-۴- مهار رادیکال آزاد ۲، ۲- آزینو بیس-۳- اتیل بنزو تیازولین-۶- سولفونیک اسید^{۱۵}

تعیین فعالیت مهارکنندگی در برابر رادیکال آزاد ($ABTS^{+}$) از روش کاپاراکو و همکاران [۱۸] با اندکی تغییر انجام شد. ابتدا محلول ۷ میلی مولار از رادیکال آزاد تهیه شد سپس با محلول ۲/۴۵ میلی مولار پتاسیم پرسولفات مخلوط و به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی انکوبه شد. پس از گذشت این مدت زمان، محلول به دست آمده تاجایی با متانول رقیق شد که به جذب 0.2 ± 0.7 در طول موج ۷۳۴ نانومتر برسد. محلول کاتیونی رقیق شده (محلول کنترل) سپس به نسبت ۱:۱ با غلظت‌های (۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) از عصاره مخلوط و پس از ۶ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد (دمای اتاق) قرائت شد.

موسیلاژی هموژن حاصل شد که با عبور و فیلتر این موسیلاژ از پارچه موسلین، عصاره تازه آلوئه‌ورا به دست آمد [۱۴].

۲-۲-۲- آزمون‌های شیمیایی

۲-۲-۲-۱- تعیین فنل کل^{۱۲} عصاره آبی آلوئه‌ورا

میزان فنل تام عصاره آلوئه‌ورا به روش رنگ سنجی فولین-سیوکالتیو و اندازه‌گیری برحسب گالیک اسید انجام شد. منحنی استاندارد گالیک اسید با استفاده از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گالیک اسید رسم شد. برای تعیین میزان فنل تام، مقدار ۰/۵ میلی لیتر از عصاره با غلظت معین با ۲/۵ میلی لیتر از فولین-سیوکالتیو ۱۰٪ مخلوط شد و پس از گذشت ۶ دقیقه، ۲ میلی لیتر سدیم کربنات ۷/۵٪ به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در یک مکان تاریک نگهداری شد. در نهایت جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر WPA (Biowave II)، ساخت کشور انگلیس) خوانده شد. جذب به دست آمده از محلول عصاره در رابطه‌ای که از نمودار استاندارد گالیک اسید به دست آمد، جایگذاری و میزان ترکیبات کل فنل موجود در عصاره محاسبه شد [۱۵].

۲-۲-۲-۲- تعیین فلاونوئید کل^{۱۳} عصاره آلوئه‌ورا

تعیین فلاونوئید کل عصاره آلوئه‌ورا به روش رنگ‌سنجی با آلومینیوم کلراید و برحسب کوئرستین به عنوان استاندارد انجام گرفت. ابتدا ۱ میلی لیتر از عصاره آلوئه‌ورا با غلظت معین به مقدار ۷۵ میکرولیتر از نیتريت سدیم ۵٪ اضافه و هم‌زده شد. پس از گذشت مدت زمان ۶ دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ به محلول اضافه و ۵ دقیقه دیگر در دمای اتاق نگهداری شد. در آخر ۱ میلی لیتر از سدیم هیدروکسید ۱ مولار افزوده و پس از گذشت یک دقیقه جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. میزان فلاونوئید تام عصاره به کمک رابطه منحنی استاندارد کوئرستین به دست آمد [۱۶].

15 - Radical Scavenging Effect

16- 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), (ABTS)

12 - Total phenolic content

13- Total flavonoid content

14 -2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. فعالیت ضدباکتریایی عصاره با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری دور دیسک بر حسب میلی‌متر، بررسی شد [۲۰].

۲-۳-۳- فعالیت ضد میکروبی به روش چاهک در آگار

در این روش، روی محیط کشت مولر هیتون آگار مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی آماده شده به روش کشت سطحی تلقیح شد. پس از آماده‌سازی چاهک‌ها و بستن ته چاهک به کمک محیط کشت مذاب، مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره خالص درون چاهک ریخته و یک چاهک حاوی آب مقطر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌های دارای چاهک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله بازدارنده از رشد باکتری با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و براساس میلی‌متر ثبت شدند [۲۱].

۲-۳-۴- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره

آلئوئورا

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آلئوئورا علیه باکتری‌های موردنظر، ابتدا غلظت ۵۱۲ از عصاره و محیط مولر هیتون براث^{۱۷} به همراه ۵ میلی‌لیتر DMSO (دی متیل سولفوکساید) تهیه شد سپس رقت‌های متوالی با افزودن ۵ میلی‌لیتر از رقت قبلی به ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هیتون براث آماده شدند. از رقت‌های آماده‌شده مقدار ۱۰۰ میکرولیتر با سمپلر برداشته و به درون خانه‌های پلیت ۹۶ خانه انتقال داده شد. سپس به هر خانه میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی اضافه شد. برای هر باکتری، کنترل مثبت (رقت تهیه شده از عصاره با محیط کشت) و کنترل منفی (محیط کشت به همراه سوسپانسیون باکتری) در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت ماندن در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۲۰ میکرولیتر معرف رنگی تری فیل ترازولیم کلراید^{۱۸} (۵ درصد) به خانه‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه و برای تعیین حداقل غلظت، دوباره به مدت ۳۰ دقیقه به انکوباتور منتقل شد. بر اساس اضافه شدن این معرف، مشاهده رنگ قرمز نشان‌دهنده رشد باکتری بود که اولین

درصد مهار این رادیکال توسط عصاره از معادله ۱ به دست آمد که در این معادله $A_{Control}$: جذب محلول متانولی ABTS بدون اسانس و A_{sample} : جذب محلول متانولی ABTS واکنش با غلظت خاصی از عصاره می‌باشد.

۲-۳-۲- فعالیت ضد میکروبی عصاره آلئوئورا

از روش‌های دیسک دیفیوژن، چاهک در آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی برای ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره آبی به دست آمده از برگ آلئوئورا در برابر ۶ باکتری پاتوژن، که شامل /شرشیا کلی ATCC ۱۲۴۳۵، شیکلا دیسانتری ATCC ۱۳۳۱۳، سالمونلا تیفی ATCC ۶۵۱۵۴ (باکتری‌های گرم منفی)، /استافیلوکوکوس /اورئوس ATCC ۱۴۱۵۴، لیستریا مونوسیتوژنز ATCC ۱۹۱۱۵ و باسیلوس سرئوس ATCC ۱۰۸۷۶ (باکتری‌های گرم مثبت) استفاده شد.

۲-۳-۱- تهیه سوسپانسیون میکروبی

کشت تازه از سویه‌های موردنظر ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایشات بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار به دست آمد. سوسپانسیون از کلنی خالص باکتری‌ها براساس کدورت نیم‌مک‌فارلند (1.5×10^8 CFU/mL) آماده شدند. برای تهیه سوسپانسیون با این کدورت پس از برداشتن مقداری از کلنی باکتری‌ها با استفاده از لوپ، آن به سرم فیزیولوژی درون لوله‌های آزمایش اضافه کرده و با شیکر هم زدیم. کدورت سوسپانسیون‌ها باید در طول موج ۶۲۵ نانومتر جذبی بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ نشان دهد [۱۹].

۲-۳-۲- فعالیت ضد میکروبی عصاره آلئوئورا به روش

دیسک دیفیوژن

عصاره آبی آلئوئورا ابتدا از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده و استریل شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره استریل به دیسک‌های بلانک انتقال داده شد. یک دیسک بلانک (به عنوان شاهد منفی) با فاصله مشخص از دیواره و همدیگر روی محیط کشت مولر هیتون آگار حاوی سوسپانسیون باکتری‌ها (استاندارد نیم مک‌فارلند) قرار گرفتند. محیط‌های کشت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای یخچال قرار گرفته و سپس

خانه‌ای که در آن رنگ قرمز پدیدار نشد، به‌عنوان کمترین غلظت بازدارنده از رشد باکتری‌ها ثبت شد [۲۲].

۲-۳-۵- تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره آلوئه‌ورا

برای تعیین حداقل غلظتی از عصاره که خاصیت کشندگی بر باکتری‌های مورد نظر را اعمال می‌کند؛ از هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای که تغییر رنگی دیده نشد میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بر محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد. پس از گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد، غلظتی از عصاره که کلنی‌های باکتری در آن مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی ثبت شد [۲۳].

۲-۴- آنالیز آماری داده‌ها

تمامی آزمون‌ها با سه تکرار انجام گرفت. برای مقایسه بین میانگین داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ارزیابی ترکیبات و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی آلوئه‌ورا

برگ گیاهان خوراکی حاوی مقادیر زیاد ترکیبات فعال زیستی مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی هستند که از آن‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی یاد می‌شود [۲۴ و ۲۵]. ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی (فیتوکمیکال‌ها) از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد با مکانیسم‌های مختلفی موجب مهار آن‌ها می‌شوند. در نتیجه با بالا بودن میزان این ترکیبات زیست‌فعال، می‌توان به قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دست یافت. در مطالعه حاضر، مقدار فنل تام 0.78 ± 41.61 میلی‌گرم گالیک‌اسید در هر گرم عصاره^{۱۹} و مقدار فلاونوئید تام 5.13 ± 783.33 میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره^{۲۰} آبی آلوئه‌ورا به‌دست آمد. کومار و همکاران به بررسی فیتوکمیکال‌ها و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی برگ‌های آلوئه‌ورا به‌دست آمده توسط پژوهشگران مختلف پرداختند. مقدار فنل تام گزارش شده از ۶۳/۲ تا ۳۲/۹

میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم عصاره متغیر بود. در همه مطالعات وجود ترکیبات فنلی عصاره در مقادیر قابل توجهی ثبت شد. همچنین در این مطالعه و مطالعات قبلی به‌این نتیجه رسیدند که میان محتوای فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی یک رابطه خطی معنادار وجود دارد [۲۶ و ۲۷]. شارما و همکاران محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل دو عصاره آبی و متانولی برگ آلوئه‌ورا را باهم مقایسه کردند که براساس نتایج گزارش‌شده از این پژوهش، مقدار این دو ترکیب در عصاره‌های مختلف تفاوت قابل توجهی نداشتند [۲۸]. بیستا و همکاران نیز مقدار فنل و فلاونوئید تام عصاره‌های متانولی و اتانولی برگ آلوئه‌ورا را باهم مقایسه کردند که نتایج نشان داد مقدار این ترکیبات در عصاره متانولی بالاتر و برابر با 30.53 میلی‌گرم گالیک‌اسید و 73.26 میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم وزن خشک عصاره بود. بر اساس مطالعات متعدد، میزان فلاونوئید در تمامی عصاره‌های برگ آلوئه‌ورا از میزان فنل کل بالاتر بود. تفاوت در مقادیر به‌دست آمده در مطالعات مختلف می‌تواند به دلایل مختلفی چون شرایط محیط رشد گیاه، زمان برداشت، مکان جغرافیایی، روش‌های مختلف و حلال‌های متفاوت در استخراج عصاره، غلظت مورد استفاده در آزمون و همچنین منحنی‌های استاندارد مختلف باشد. با همه این تفاوت‌ها، براساس چندین مطالعه، میزان ترکیبات شیمیایی زیست‌فعال معمولاً در عصاره آبی بیشتر از بقیه عصاره‌ها تعیین شد [۲۹ و ۳۰].

قدرت مهار رادیکال آزاد درواقع توانایی خشی سازی رادیکال آزاد از طریق دادن یک الکترون به آن و جلوگیری از واکنش و استرس اکسیداتیو است که باعث می‌شود با ترکیب الکترون و مهار رادیکال و رسیدن آن به حالت پایدارتر، رنگ محلول کمتر شده و جذب آن در طول موج مشخص ضعیف‌تر شود [۳۱ و ۳۲]. نتایج بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS در جدول ۱ آورده شده‌است. براساس نتایج مشاهده‌شده، میزان قدرت عصاره آبی آلوئه‌ورا در مهار رادیکال آزاد (DPPH) بیشتر از رادیکال آزاد (ABTS⁺) بود.

و همکاران نشان داد که درصد اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره آلوه‌ورا به‌روش DPPH برای عصاره متانولی برابر با ۸۱/۹۱ درصد بود که بالاتر از قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی در این پژوهش و خلاف مطالعات سابق در قوی‌تر بودن عصاره آبی است [۲۹]. اثر آنتی‌اکسیدانی آلوه‌ورا ناشی از ترکیبات زیست‌فعال (پلی‌فنل‌ها، آنزیم‌ها، پلی‌ساکاریدها و آنتراکینون‌ها) موجود در آن می‌باشد. آسمانان^{۲۱} پلی‌ساکارید ذخیره‌ای و ترکیب زیست‌فعال اولیه و مهم آلوه‌ورا است که نقش مهمی در مهار رادیکال آزاد ABTS ایفا می‌کند [۳۳]. کاپاراکو و همکاران [۱۸] فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژل آلوه‌ورا را بررسی و به‌صورت کمی گزارش کردند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH از ۱/۶۴ تا ۹/۲۱ میکرومول ترولوکس در هر میلی‌لیتر^{۲۲} از ژل و برای ABTS، معادل ۰/۷۳ تا ۵/۱۴ میکرومول ترولوکس در هر میلی‌لیتر از ژل برآورد شد. براساس نتایج میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش ABTS ضعیف‌تر از DPPH بود که مطابق با نتایج مطالعه حاضر است.

بیشترین درصد مهار DPPH، مربوط به غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معادل ۶۸/۳۹ درصد و کمترین قدرت مهار برای غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره برابر با ۳۶/۳۵ درصد مشخص شد. قدرت مهار همین غلظت‌ها برای رادیکال آزاد ABTS به‌ترتیب برابر با ۵۰/۰۷ درصد و ۴۱/۶۴ درصد بود. باتوجه به نتایج جدول ۱ با افزایش تدریجی غلظت عصاره از ۶۰ تا ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، افزایش قدرت مهار قابل‌توجهی (بیش از ۳۰ درصد) برای DPPH مشاهده شد ولی با افزایش غلظت به همین نسبت، میزان مهار رادیکال ABTS روند افزایشی کندتری (کمتر از ۱۰ درصد) را نشان داد. باین‌حال در هر دو روش، غلظت عصاره با درصد مهار رابطه مستقیم داشته و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها بود. مانیه و همکاران قدرت عصاره‌های آبی و متانولی آلوه‌ورا را در مهار رادیکال آزاد DPPH تعیین و مقایسه کردند. باتوجه به گزارش داده‌شده، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی به‌طور معنی‌داری بالاتر از عصاره متانولی بود. درصد مهار رادیکال DPPH برای عصاره آبی در محدوده ۳۴/۸-۶۵/۴ درصد و برای عصاره متانولی در محدوده ۱۵/۴-۴۸/۱ درصد گزارش شد [۱۳]. مطالعه بیستا

Table 1. DPPH and ABTS radical scavenging activity of *Aloe vera* extract

Concentration (mg/mL)	Scavenging effect (%)	
	DPPH	ABTS
60	36.35 ± 0.40 ^A	41.64 ± 0.13 ^A
80	45.01 ± 0.30 ^B	42.61 ± 0.36 ^B
100	61.18 ± 0.12 ^C	43.67 ± 0.15 ^C
200	63.67 ± 0.24 ^D	44.29 ± 0.21 ^D
400	64.77 ± 0.55 ^E	47.95 ± 0.59 ^E
600	68.39 ± 0.44 ^F	50.07 ± 0.18 ^F

The data written in table, indicate "mean ± standard deviation", n=3. The capital English letters in each column show a significant difference at $P < 0.05$ between antioxidant activity of different extract concentrations.

ویروس‌ها را دارد. پژوهش‌هایی در گذشته قدرت ضد میکروبی عصاره را بر بسیاری از قارچ‌ها ارزیابی کرده و به نتایج مطلوبی رسیده‌اند [۳۴ و ۳۵]. روش انتشار در آگار به‌کمک دیسک که به روش کربی-بائر نیز معروف است، یکی از انعطاف‌پذیرترین روش‌های تعیین حساسیت میکروب‌ها به عوامل بازدارنده است که قدرت ضد میکروبی

۳-۲- بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی آلوه‌ورا
فعالیت ضد میکروبی ژل آلوه‌ورا در مطالعات متعددی تاکنون بررسی شده‌است. این عصاره دارای خاصیت مهارکنندگی از رشد یا قابلیت کشندگی برخی باکتری‌ها، قارچ‌ها و

هاله مربوط به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر ۱۵/۴۰ میلی متر و کمترین قطر هاله مربوط به باکتری گرم منفی *شیگلا دیسانتری* با قطر ۹/۲۰ میلی متر می باشد. میان گرم مثبت ها، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور معناداری بالاترین قطر را داشتند و باکتری *لیستریا مونوسیٹوژنز* پس از آن ها کمترین مقاومت را نسبت به عصاره داشت. میان گرم منفی ها، *سالمونلا تیفی* به عنوان مقاوم ترین باکتری به عامل ضد میکروبی مشخص شد.

ماده براساس اندازه گیری هاله عدم رشد میکروب دور دیسک ها ارزیابی می شود [۳۶]. روش انتشار به کمک چاهک آگار بیشتر برای ارزیابی اثر ضد میکروب گیاهان و یا عصاره های میکروبی مورد استفاده قرار می گیرد. این روش مشابه دیسک دیفیوژن است با این تفاوت که به جای استفاده از دیسک، چاهک هایی در آگار آماده خواهد شد [۳۷]. براساس این دو روش،

نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره خالص در جدول ۲ و ۳ گزارش شد. جدول ۲، قطر هاله مهارکننده از رشد باکتری ها را دور دیسک حاوی عصاره نشان می دهد که بیشترین قطر

Table 2. Inhibition zone (mm) of *Aloe vera* extract on bacterial growth using disk diffusion agar method

Inhibition zone (mm)	Pathogenic bacteria					
	<i>E. coli</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>
Aloe vera	10.10 ± 0.30 ^A	9.20 ± 0.40 ^A	12.00 ± 0.50 ^B	15.40 ± 0.20 ^C	13.30 ± 0.80 ^B	15.00 ± 0.60 ^C

The data written are "mean ± standard deviation", n=3. Similar capital letters show a significant difference at P< 0.05 between antimicrobial activity on different pathogens.

باسیلوس سرئوس به طور معناداری نزدیک به هم و بیشتر از بقیه مشاهده شد. در هر دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک آگار، اثر ضد باکتریایی عصاره بر باکتری های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود ولی قطر هاله ها در روش چاهک آگار کمی بیشتر از روش دیسک دیفیوژن مشاهده شد.

جدول ۳، نتایج مربوط به خاصیت ضد میکروبی عصاره را بر باکتری های مورد استفاده براساس روش انتشار در چاهک نشان می دهد. در این روش بیشترین قطر هاله مربوط به باکتری *باسیلوس سرئوس* گرم مثبت (۱۶/۲۰ میلی متر) و کمترین قطر مشابه با روش دیسک دیفیوژن مربوط به باکتری *شیگلا دیسانتری* گرم منفی (۱۰/۰۰ میلی متر) بود. اثر بازدارندگی رشد بر دو پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس* و

Table 3. Inhibition zone (mm) of *Aloe vera* extract on bacterial growth using well diffusion agar method

Inhibition zone (mm)	Pathogenic bacteria					
	<i>E. coli</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>
Aloe vera	11.30 ± 0.60 ^A	10.00 ± 0.30 ^B	12.050 ± 0.40 ^C	16.10 ± 0.50 ^D	13.90 ± 0.50 ^E	16.20 ± 0.20 ^D

The data written are "mean ± standard deviation", n=3. Similar capital letters in the data row, show a significant difference at P< 0.05 between antimicrobial activity on different pathogens.

عصاره اتانولی برگ آلوئه ورا بود، این عصاره قطر هاله بازدارندگی معادل ۱۸ میلی متر در برابر باکتری گرم منفی *شرشیا کلی* در غلظت ۳۰ میکرولیتر نشان داد؛ همچنین هاله

دیش و همکاران نتایجی متفاوت با نتایج پژوهش حاضر را بیان کردند. بر اساس گزارش آن ها در مورد اثر ضد میکروبی

مورد استفاده در این پژوهش تنها در برابر باکتری/شرشیا کلی هاله عدم رشد (۱۰/۳۳ میلی‌متر) نشان داد [۲۰]. در مطالعه دیگری که بر روش اثر ضد میکروبی عصاره آبی آلوئه‌ورا بر باکتری‌های گرم منفی انجام شد، قطر هاله عدم رشد باکتری/شرشیا کلی برابر با ۱۸ میلی‌متر گزارش شد. در همین مطالعه، MIC و MBC این باکتری در برابر عصاره آبی آلوئه‌ورا بررسی و به ترتیب (۰/۶۲۵ و ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) گزارش شد. نتایج ضد میکروبی به شدت به غلظت به کار رفته بستگی دارد. در برخی موارد حتی غلظت‌های بالاتر از عصاره می‌تواند نتایج کم‌تری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر از خود نشان دهد [۳۸].

کم‌ترین غلظتی که باعث بازدارندگی از رشد باکتری‌ها می‌شود (MIC) و کم‌ترین غلظتی که موجب مرگ باکتری خواهد شد (MBC) ارزیابی و در جدول ۴ گزارش شد.

به دست آمده در برابر باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس و/استافیلوکوکوس/اورئوس که عصاره آبی بالاترین اثر را بر آن‌ها داشت مقادیری برابر با به ترتیب ۱۳ و ۱۴ میلی‌متر بود. این مقادیر با جدول ۳ و ۴ مغایرت داشت ولی در کل باتوجه به داده‌های گزارش شده در هر دو اثر می‌توان گفت اثر ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی برگ آلوئه‌ورا بر گرم مثبت‌ها بیشتر است. در واقع اثر ضد میکروبی عصاره آبی آلوئه‌ورا بر سه باکتری ذکر شده، کم‌تر از عصاره اتانولی برگ این گیاه است [۱۲]. بندجدید و همکاران اثر ضد باکتریایی عصاره آلوئه‌ورا را با ۵ حلال مختلف در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بررسی کرده و بیشترین اثر ضد میکروبی را مربوط به عصاره ان-بوتانول^{۲۳} و استونی آلوئه‌ورا (به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۲۵/۳۳ و ۲۲ میلی‌متر نسبت به باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس) گزارش کردند. عصاره آبی

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *Aloe vera* extract

Pathogenic bacteria	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>E. coli</i>	32	>512
<i>S. dysenteriae</i>	64	>512
<i>S. typhi</i>	32	512
<i>S. aureus</i>	16	256
<i>L. monocytogenes</i>	32	512
<i>B. cereus</i>	16	256

دیسانتیری بود. بیش‌ترین به کم‌ترین اثر ضد میکروبی عصاره بر باکتری‌ها به ترتیب حداقل غلظت بازدارندگی، باسیلوس سرئوس و/استافیلوکوکوس/اورئوس/کلیستریا مونوسیترنز، سالمونلا تیفی و/شرشیا کلی/شیگلا دیسانتری مشخص شد. کم‌ترین غلظت کشندگی عصاره بر باکتری‌ها در جدول ۴ آورده شده است. MBC دو باکتری گرم منفی/شرشیا کلی و شیگلا دیسانتری بزرگتر از ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود ولی باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی در غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره از بین رفت. دو باکتری گرم مثبت

برای تعیین این دو معیار، ابتدا غلظت‌های مختلف عصاره از روش رقت‌سازی متوالی انجام گرفت. رقت‌های متوالی (۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از عصاره تهیه شد. باتوجه به نتایج به دست آمده پایین‌ترین غلظتی از عصاره که توانست از رشد میکروارگانیسم جلوگیری کند، ۱۶ میلی‌لیتر بر میلی‌گرم در برابر باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس و/استافیلوکوکوس/اورئوس بود. بالاترین درصد از عصاره که توانایی مهار رشد را داشت، ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در برابر باکتری گرم منفی شیگلا

باکتری‌های نام‌برده بود. آلوئه‌ورا در این مطالعه در همان غلظت مهاری (۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) توانست اثر کشندگی بر روی باکتری گرم منفی /شرشیا کلی داشته باشد [۴۳].

۴- نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر، میزان فنل کل و فلاونوئید عصاره آبی برگ آلوئه‌ورا به‌دست آمد. براساس نتایج به‌دست آمده، این عصاره پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته و فعالیت ضد میکروبی مناسبی در برابر ۶ پاتوژن منتخب از خود نشان داد. درصد مهار کاتیون DPPH توسط این عصاره در غلظت‌های یکسان، بالاتر از ABTS مشاهده شد. همچنین اثر ضد میکروبی عصاره آبی آلوئه‌ورا بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی‌ها گزارش شد. درکل می‌توان از پتانسیل این عصاره به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا بهره برد.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

/استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس در غلظت پایین‌تری از عصاره MBC داشتند که نشان‌دهنده اثر ضد میکروبی بالاتر عصاره بر این دو باکتری است. و در نهایت باکتری گرم مثبت لیستریا مونوسیتوژنز دارای MBC در غلظت ۵۱۲ عصاره بود. به‌طور کلی می‌توان گفت که عصاره آبی آلوئه‌ورا اثر ضد میکروبی بالاتری بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها داشت. عوامل ضد میکروبی مختلف، با هدف قرار دادن قسمت‌های مختلف غشای باکتری‌ها موجب مهار و یا کشندگی می‌شوند. درواقع می‌توان با استناد بر تفاوت ساختار غشای باکتری‌های گرم مثبت و منفی، مقاومت بالاتر گرم منفی‌ها را در برابر این عصاره توجیح کرد [۳۹، ۴۰ و ۴۱]. ارباب و همکاران نیز به بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره ژل آلوئه‌ورا بر باکتری‌های دخیل در عفونت‌های پوستی (/شرشیا کلی، /استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا و سالمونلا) پرداختند که ژل فعالیت بالایی نشان داد به‌طوری که نتایج بر روی ۴ سویه بسیار نزدیک به هم بود. در این پژوهش نیز اثر عصاره اتانولی بر روی پاتوژن‌ها بیشتر مشخص شد [۴۲]. فعالیت ضد میکروبی ژل آلوئه‌ورا بر روی دو پاتوژن /استافیلوکوکوس اورئوس و /شرشیا کلی توسط محبی و همکاران مورد بررسی قرار گرفت؛ هرچند این ماده در غلظت‌های پایین‌تری (به‌ترتیب ۲ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) قادر به مهار رشد

۶- منابع

- [1] Veiga, M., Costa, E. M., Silva, S., & Pintado, M. (2020). Impact of plant extracts upon human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), 873-886.
- [2] Tanavar, H., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., Mehrnia, M. A. (2021). Investigation of the chemical properties of *Mentha pulegium* essential oil and its application in *Ocimum basilicum* seed mucilage edible coating for extending the quality and shelf life of veal stored in refrigerator (4°C). *Food Science & Nutrition*, 9(10), 5600-5615.
- [3] Olszewska, M. A., Gędas, A., & Simões, M. (2020). Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. *Food Research International*, 134, 109214.
- [4] Kolawole, F. O., Kolawole, S. K., Owa, F. A., Adebayo, A. O., Ajibola, O. O., & Hassan, S. B. (2023). Chapter 22 - Green nanomaterials and their

anticorrosive properties. pp. 453-477 In C. Verma, V. Srivastava, T. W. Quadri, C. Mustansar Hussain, & E. E. Ebenso Eds. *Smart Anticorrosive Materials*: Elsevier.

- [5] Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Hemmati Kaykha, M. E., Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). Utilization of plantago major seed mucilage containing citrus limon essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition*. 9(3):1625-1639.

- [6] Chaves, N., Santiago, A., & Alías, J. C. (2020). Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. *Antioxidants*, 9(1). 76.

- [7] Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*, 9(10). 2041.
- [8] Zanganeh, H., Mortazavi, S., Shahidi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Evaluation of the chemical and antibacterial properties of Citrus paradise essential oil and its application in *Lallemantia iberica* seed mucilage edible coating to improve the physicochemical, microbiological and sensory properties of lamb during refrigerated storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 1-16.
- [9] Sánchez, M., González-Burgos, E., Iglesias, I., & Gómez-Serranillos, M. P. (2020). Pharmacological Update Properties of Aloe Vera and its Major Active Constituents. *Molecules*, 25(6). 1324.
- [10] Nicolau-Lapeña, I., Colàs-Medà, P., Alegre, I., Aguiló-Aguayo, I., Muranyi, P., & Viñas, I. (2021). Aloe vera gel: An update on its use as a functional edible coating to preserve fruits and vegetables. *Progress in Organic Coatings*, 151, 106007.
- [11] Sonawane, S. K., Gokhale, J. S., Mulla, M. Z., Kandu, V. R., & Patil, S. (2021). A comprehensive overview of functional and rheological properties of aloe vera and its application in foods. *Journal of Food Science and Technology*, 58(4), 1217-1226.
- [12] Danish, P., Ali, Q., Hafeez, M., & Malik, A. (2020). ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ALOE VERA PLANT EXTRACT. *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2020(1).
- [13] Manye, S. J., Saleh, J. S., Ishaya, H. B., Chiroma, S. M., Attah, M. O. O., & Dibal, N. I. (2023). Phytochemical screening and in-vitro antioxidant activities of aqueous and methanol extracts of Aloe vera. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 8, 100291.
- [14] Maan, A. A., Reiad Ahmed, Z. F., Iqbal Khan, M. K., Riaz, A., & Nazir, A. (2021). Aloe vera gel, an excellent base material for edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 329-341.
- [15] Ghazanfari, N., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Mohammadi, M. (2020). Microwave-assisted hydrodistillation extraction of essential oil from coriander seeds and evaluation of their composition, antioxidant and antimicrobial activity. *Heliyon*, 6(9), 2405-8440.
- [16] Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2022). Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18(4), 467-482.
- [17] Kiarsi, Z., Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). In vitro antimicrobial effects of *Myristica fragrans* essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 40(3), e12782.
- [18] Kaparakou, E. H., Kanakis, C. D., Gerogianni, M., Maniati, M., Vekrellis, K., Skotti, E., & Tarantilis, P. A. (2021). Quantitative determination of aloin, antioxidant activity, and toxicity of Aloe vera leaf gel products from Greece. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 101(2). 414-423.
- [19] Sureshjani, M. H., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Behbahani, B. A., & Shahidi, F. (2014). Antimicrobial effects of *Kelussia odoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. *Journal of Paramedical Sciences*, 5(2), 115-120.
- [20] Bendjedid, S., Lekmine, S., Tadjine, A., Djelloul, R., & Bensouici, C. (2021). Analysis of phytochemical constituents, antibacterial, antioxidant, photoprotective activities and cytotoxic effect of leaves extracts and fractions of *Aloe vera*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101991.
- [21] Hojjati, M., Omidi-Mirzaei, M., & Kiarsi, Z. (2020). Evaluation of chemical constituents and antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of two citrus species. *FSCT*. 17(100), 127-138.
- [22] Omidi Mirzaei, M., Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). Determination of chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of coriander seed essential oil on a number of pathogenic microorganisms. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 16(2), 221-233.
- [23] Safari, E., Barzegar, H., Jooyandeh, H., & Alizadeh Behbahani, B. (2023). Identification of Functional Groups, Total Phenol and Flavonoids Contents, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Aqueous Extract and Its Interactions with Chloramphenicol and Amphotericin B. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 19(1), 79-93.
- [24] Wojdyło, A., & Oszmiański, J. (2020). Antioxidant Activity Modulated by Polyphenol Contents in Apple and Leaves during Fruit Development and Ripening. *Antioxidants*, 9(7), 567.
- [25] Zeb, A. (2021). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J Food Biochem*. 44(9), e13394.
- [26] Kumar, S., Yadav, A., Yadav, M., & Yadav, J. P. (2017). Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) *Burm.f*. *BMC Research Notes*, 10(1), 60.
- [27] Heydari, S., Jooyandeh, H., Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). The impact of Qodume Shirazi seed mucilage-based edible coating containing

lavender essential oil on the quality enhancement and shelf life improvement of fresh ostrich meat: An experimental and modeling study. *Food Science & Nutrition*, 8(12), 6497-6512.

[28] Sharma, S., Verma, O., Devi, L., & Kumar, R. (2021). ANTIOXIDANT ACTIVITY, TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENTS OF ALOE VERA LEAVES EXTRACT. *Journal of Phytological Research*. 34(1), 49.

[29] Bista, R., Ghimire, A., & Subedi, S. (2020). Phytochemicals and Antioxidant Activities of Aloe Vera (*Aloe Barbadensis*). *J Nut Sci Heal Diet* 1(1): 25-36.

[30] Yeganegi, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Asili, J., Behbahani, B.A. and Beigbabaei, A. (2018). *Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial pathogenesis*, 116, pp.62-67.

[31] Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R.P., & Chang, C.M. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*. 27(4):1326.

[32] Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaee Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food Science & Nutrition*, 9(5), 2458-2467.

[33] Comas-Serra, F., Estrada, P., Minjares-Fuentes, R., & Femenia, A. (2023). Evaluation of Acemannan in Different Commercial Beverages Containing Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) Gel. *Gels*, 9(7).

[34] Kahramanoğlu, İ., Chen, C., Chen, J., & Wan, C. (2019). Chemical Constituents, Antimicrobial Activity, and Food Preservative Characteristics of Aloe vera Gel. *Agronomy*, 9(12). 831.

[35] Behbahani, B. A., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Mohebbi, M. (2013). Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic

fungus" in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(7), 1652-1658.

[36] Tenover, F. C. (2019). Antimicrobial Susceptibility Testing. In T. M. Schmidt (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Fourth Edition) (pp. 166-175). Oxford: Academic Press.

[37] Balouri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 6(2):71-79.

[38] Arsene, M. M. J., P. I. Viktorovna, G. V. Sergei, F. Hajjar, Y. N. Vyacheslavovna, Z. A. Vladimirovna, V. E. Aleksandrovna, S. A. Nikolayevich & N. Sachivkina (2022). Phytochemical Analysis, Antibacterial and Antibiofilm Activities of Aloe vera Aqueous Extract against Selected Resistant Gram-Negative Bacteria Involved in Urinary Tract Infections. *Fermentation*, 8(11), 626.

[39] Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 980-987.

[40] Tabatabaei Yazdi, F., & Alizadeh Behbahani, B. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria "in vitro". *Archives of Advances in Biosciences*, 4(4). 55-61.

[41] Alghooneh, A., Alizadeh Behbahani, B., Noorbakhsh, H., Yazdi, F. T. (2015). Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Frankfurter sausage containing Satureja extract. *Microbial Pathogenesis*. 85, 58-65.

[42] Arbab, S., Ullah, H., Weiwei, W., Wei, X., Ahmad, SU., Wu, L., & Zhang, J. (2021). Comparative study of antimicrobial action of aloe vera and antibiotics against different bacterial isolates from skin infection. *Vet Med Sci*. 7(5), 2061-2067.

[43] Mohebbi, M., Alizadeh Behbahani, B., Ansarifard, E., & Noshad, M. (2015). Antimicrobial effect of Aloe vera and chitosan "in vitro". {اثر ضد میکروبی آلوئه ورا و کیتوزان در شرایط آزمایشگاهی}. *IRANA JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES AND TROPICAL MEDICINE*. 19(67), 21-29.



Scientific Research

Evaluation of antioxidant properties and antimicrobial potential of *Aloe vera* extract on a number of Gram-positive and Gram-negative bacteria: an *in vitro* studyNarges Sharifat¹, Mohammad Amin Mehrnia^{*2}, Hassan Barzegar², Behrooz Alizadeh Behbahani²

1-M. Sc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food

Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food

Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received:2024/7/3

Accepted:2024/8/26

Keywords:

Aloe vera gel,

Antibacterial,

Bioactive compounds,

Natural preservative.

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.172.*Corresponding Author E-
mehrnia@asnrukh.ac.ir

Nowadays food products who contain "natural" ingredients are trending among consumers as a result of raising knowledge and awareness about food ingredients and their influence on human's body health. The aim of this study was to investigate the biochemical (total phenol and flavonoid) of Aloe vera aqueous extract as a natural preservative and determination of antioxidant and antibacterial activity of the extract. Total phenol and total flavonoid content of the aqueous extract was measured as 41.61 ± 0.78 mg GAE/g extract and 783.33 ± 5.13 mg QE/g extract respectively. Free radical scavenging activity determined at different concentrations of Aloe extract; at highest concentration (600 mg/ml) %68.395 inhibitory effect was estimated through DPPH assay and %50.075 through ABTS assay. Aloe extract showed a greater effect on Gram-positive bacteria through disk diffusion agar and well diffusion agar methods. Minimum inhibitory concentrations (MIC) for *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* estimated 32, 64, 32, 16, 32 and 16 mg/mL respectively. Based on results in this study, Aloe vera aqueous extract can be a candidate to use as a preservative in food products.



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی مخمر غالب جدا شده از عسل

فاطمه طاهری^۱، علیرضا صادقی^{۱*}، سید مهدی جعفری^{۱،۲}، سارا شهریاری^۱، مریم زارعلی^۱

۱-گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲-مرکز تحقیقات حلال، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت و آموزش پزشکی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	همواره ارزیابی قابلیت‌های پروبیوتیکی میکروارگانیسم‌های جدا شده از بسترهای تحت تنش حائز اهمیت بوده است. از بین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، مخمرها نسبت به باکتری‌های اسید لاکتیک به واسطه اندازه بزرگ‌تر، قابلیت‌های اتصال مناسب‌تر و همچنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بدون امکان انتقال ژن‌های مقاومت متمایز می‌شوند. در پژوهش حاضر، ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی مخمر غالب جدا شده از عسل طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی <i>Saccharomyces cerevisiae</i> به عنوان مخمر غالب جدا شده از عسل گردید. همچنین جدایه مذکور، فاقد فعالیت همولیزی بود و از بین ترکیبات ضد قارچ مورد مطالعه، بیشترین حساسیت را نسبت به ناتامایسن نشان داد. علاوه بر این، اگر چه جدایه مخمری مذکور دارای زنده‌مانی مناسبی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش نبود اما از قابلیت‌های خود اتصالی (۹۳/۸۶٪) و آبگریزی سطحی (۷۶/۳۶٪) نسبتاً بالایی برخوردار بود. بیشترین قابلیت دگر اتصالی جدایه مذکور نیز با باکتری‌های گرم مثبت <i>Bacillus cereus</i> و <i>Staphylococcus aureus</i> مشاهده شد و بازدارندگی جدایه مذکور در برابر <i>B. cereus</i> به شکل معنی‌داری ($p < 0.05$) از سایر باکتری‌های غذازاد مورد مطالعه بیشتر بود. جدایه مذکور همچنین ۳۲/۱۸٪ اثر ضد قارچی بر علیه <i>Aspergillus flavus</i> از خود نشان داد. بر این اساس، مخمر غالب جدا شده از عسل، از قابلیت‌های مناسبی جهت استفاده به عنوان کشت محافظت کننده در صنایع تخمیری برخوردار است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۱۶	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۳۰	
کلمات کلیدی:	
عسل طبیعی،	
مخمر پروبیوتیک،	
قابلیت اتصال،	
اثر ضد باکتریایی،	
فعالیت ضد قارچی	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.185.	
* مسئول مکاتبات:	
sadeghi.gau@gmail.com	

۱-مقدمه

قابلیت‌های پروبیوتیکی فلور میکروبی جدا شده از بسترهای تحت تنش، بررسی شده و مورد تایید قرار گرفته است. بنابراین، بسترهای تحت تنش می‌تواند منبع مناسبی برای جداسازی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک باشد [۱ و ۲]. از مهم‌ترین ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌توان به اثرات ضد میکروبی، مزایای تغذیه‌ای و همچنین قابلیت حفظ تعادل فلور میکروبی بدن به منظور پیشگیری از مشکلات دستگاه گوارش و اختلالات سیستم ایمنی اشاره نمود [۳]. زنده‌مانی در شرایط نامتعارف دستگاه گوارش (حضور آنزیم‌ها، نمک‌های صفراوی، pH معده و روده)، ایمنی، قابلیت اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده^۱، مقاومت به عوامل بازدارنده مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین عدم انتقال ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک از سایر ویژگی‌های حائز اهمیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشند [۴ و ۵].

تاکنون اکثر مطالعات پروبیوتیکی بر روی باکتری‌های اسید لاکتیک انجام شده و به سایر میکروارگانیسم‌ها با ویژگی‌های کاربردی، مانند برخی از مخمرها کمتر توجه شده است [۶]. یکی از ویژگی‌های جالب توجه مخمرها اندازه بزرگ‌تر آن‌ها نسبت به باکتری‌ها است که می‌تواند سبب اتصال بهتر آنها به دستگاه گوارش و محدود کردن رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا گردد. از سایر ویژگی‌های مخمرها می‌توان به مقاومت ذاتی آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، قابلیت تحمل شرایط نامساعد دستگاه گوارش و اثرات مثبت سلامتی‌بخش آنها اشاره نمود [۷].

مطالعه میکروارگانیسم‌های جدا شده از بسترهای ویژه مانند عسل، احتمال مواجهه با نژادهای دارای قابلیت‌های جالب توجه را در پی دارد و تاکنون مطالعاتی در خصوص جداسازی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از عسل یا زیستگاه‌های مشابه آن انجام شده است.

به عنوان مثال، بر اساس پژوهش‌های انجام شده بر روی ۱۰۴ نژاد مخمری جدا شده از نمونه‌های مختلف عسل، مشخص شد که ۵۸ جدایه قابلیت رشد در pH اسیدی، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور نمک‌های صفراوی را داشتند. همچنین تمامی جدایه‌ها قابلیت خود اتصالی بالایی (۱۰۰-۷۰٪) از خود نشان دادند [۵ و ۸]. علاوه بر این، Tauber و همکاران (۲۰۱۹) مخمر *Wickerhamomyces anomalus* CBS 262 را از روده زنبور عسل، جداسازی کرده و مشاهده نمودند که این مخمر توانست با اسیدی کردن محیط، شرایط را به نفع باکتری‌های لاکتوباسیلوس تغییر دهد و موجب کاهش رشد قارچ *Nosema ceranae* گردد [۹]. طبق گزارش Khalafalla و همکاران (۲۰۱۹) مخمرهای *Zygosaccharomyces mellis* MK005880 و *Lachancea thermotolerans* W. MH997572 جدا شده از روده زنبور عسل، علاوه بر قابلیت تحمل pH اسیدی و غلظت ۳٪ نمک‌های صفراوی، فاقد فعالیت همولیتیک^۲ بوده و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی نیز از خود نشان دادند [۱۰]. بر اساس نتایج مطالعه Chelucci و همکاران در سال ۲۰۲۳، مخمرهای CBS 9710 *Candida* CBS 2677 *Starmerella bombicola* *Pichia guilliermondii* W1171 *magnolia* *Curvibasidium* *Rhodotorula* sp. *Aureobasidium* sp. sp. و *Metschnikowia* sp. جدا شده از گرده زنبور عسل^۳ فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی مناسبی از خود نشان دادند و از این جهت دارای قابلیت بالقوه برای استفاده به عنوان پروبیوتیک بودند [۱۱].

طبق بررسی‌های انجام شده، تاکنون مطالعات محدودی در خصوص ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از عسل طبیعی در کشور انجام شده است. بنابر این،

3- Bee pollen

1-Intestinal epithelial cells

2-Hemolytic activity

هدف از مطالعه حاضر، بررسی قابلیت‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از عسل طبیعی بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی مخمرهای عمده از عسل

ابتدا عسل طبیعی از جنگل‌های هیرکانی تهیه گردید و سپس با هدف غنی‌سازی اولیه، ۱۰ گرم از آن در ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت BHI broth^۴ (مرک، آلمان) حل و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. در مرحله بعد، از این سوسپانسیون، رقت‌های متوالی ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۶} در محلول رینگر (مرک، آلمان) استریل تهیه و سپس تمامی رقت‌ها بر روی محیط کشت YGC agar^۵ (مرک، آلمان) کشت سطحی داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در ادامه از پرگنه‌ها گسترش تهیه شد و پس از رنگ آمیزی و مشاهده توسط میکروسکوپ نوری (زنيس، آلمان)، جدایه‌های متفاوت برای ادامه پژوهش انتخاب شدند [۱۲].

۲-۲- شناسایی جدایه مخمری غالب

بدین منظور ابتدا DNA جدایه غالب (دارای بیشترین جمعیت از بین جدایه‌های مخمری) به کمک کیت (ژن آل، کره جنوبی) استخراج و سپس توسط PCR^۴ با پرایمرهای ITS1^۵ (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') در ترموسایکلر (کوربت، استرالیا) طی ۳۵ چرخه حرارتی و با دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد تکثیر انجام گردید. به منظور تایید اولیه تکثیر، محصولات PCR به ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی رنگ سایبر سیف^۶ (اینوایترژن، آمریکا) انتقال یافته و سپس الکتروفورز در بافر TBE^۷ با ولتاژ ۹۰ ولت و به مدت ۴۰ دقیقه انجام گردید. در نهایت با هدف شناسایی مخمر

منتخب، محصولات PCR پس از توالی‌یابی (پیشگام، ایران) با استفاده از رویه BLAST^۸ با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI^۹ مطابقت داده شد [۱۳].

۲-۳- بررسی زنده‌مانی جدایه منتخب در شرایط شبیه-

سازی شده دستگاه گوارش

ابتدا جمعیتی معادل ۱۰^۸ CFU/ml از جدایه منتخب در محیط کشت BHI broth تهیه شده و سپس pH آن به کمک محلول اسیدکلریدریک یک نرمال (مرک، آلمان) به حدود دو رسانده شد. در مرحله بعد، به این سوسپانسیون به میزان ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم پیپسین^۶ (سیگما، آمریکا) افزوده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در ادامه پس از افزودن سدیم هیدروکسید یک نرمال (مرک، آلمان) و رساندن pH به حدود ۷/۵، سوسپانسیون مذکور در مجاورت نمک صفراوی (سیگما، آمریکا) ۰/۳٪ وزنی/حجمی و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پانکراتین^۷ (سیگما، آمریکا) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت پس از رقت‌سازی و کشت سطحی بر روی محیط کشت YGC agar تعداد مخمرهای زنده در مقایسه با نمونه شاهد محاسبه گردید [۱۴].

۲-۴- بررسی قابلیت دگر اتصالی جدایه مخمری منتخب

بدین منظور ابتدا سوسپانسیون‌هایی با حجم و جمعیت یکسان از کشت فعال مخمر منتخب (جذب نوری حدود ۰/۶) و باکتری‌های غذازاد مورد مطالعه شامل *Bacillus* PTCC 1015، *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *Listeria monocytogenes* PTCC 1298، *Escherichia coli* PTCC 1709 و *Salmonella enterica* PTCC 1399 (جذب نوری حدود ۰/۰۵) تهیه شد. سپس جذب این سوسپانسیون‌ها پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری

7 -Tris-borate-EDTA

8 -Basic Local Alignment Search Tool

9 -National Center for Biotechnology Information

4 -Polymerase chain reaction

5 -Internal transcribed spacer

6 -SYBR safe

سپس از این سوسپانسیون، رقت‌های متوالی تهیه و پس از کشت بر روی محیط کشت کروموزینیک (کروم‌آگار، فرانسه)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در نهایت تعداد کلنی‌ها شمارش و با تعداد کلنی‌های نمونه شاهد (باکتری بدون افزودن مخمر) مقایسه گردید [۱۸].

۷-۲- بررسی مقاومت جدایه مخمری به ترکیبات ضدقارچ

برای این منظور، ابتدا کشت فعال ۲۴ ساعته از جدایه مخمری تهیه و روی محیط YGC agar کشت داده شد. سپس دیسک‌های استریل کاغذی آغشته به ترکیبات ضدقارچ شامل کتوکونازول، ایتراکونازول، فلوکونازول، پتاسیم سوربات، ناتامایسین و کلسیم پروپیونات بر روی آن قرار داده شد و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها به کمک نرم‌افزار Image J (نسخه 1.42e) اندازه‌گیری شد [۱۹ و ۲۰].

۸-۲- بررسی قابلیت همولیز خون توسط جدایه مخمری منتخب

جهت ارزیابی قابلیت همولیز خون، جدایه مخمری بر روی محیط کشت آگار خوندار (مرک، آلمان) حاوی ۵٪ خون تازه گوسفندی کشت داده شد و سپس نوع و رنگ هاله (هاله سبز: همولیز آلفا، هاله سفید یا شفاف: همولیز بتا، عدم تشکیل هاله: همولیز گاما) بررسی گردید [۲۱].

۹-۲- بررسی اثر ضد قارچی جدایه منتخب

بدین منظور از روش کشت دولایه در برابر قارچ‌های *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* PTCC 5006 و PTTC 5012 استفاده شد. بدین منظور ابتدا جدایه مخمری فعال بر روی محیط YGC به صورت خطوط موازی با فاصله متناظر از یکدیگر کشت داده شده و سپس سوسپانسیونی

در دمای ۳۷ سانتی‌گراد به صورت مجزا و مخلوط و در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (پی‌جی‌آی اینسترومنتز، انگلستان) خوانش گردید. درصد دگر اتصالی نیز طبق معادله زیر محاسبه شد [۱۵] که در آن A_{yeast} ، A_{bacteria} و A_{mix} به ترتیب، جذب نوری مخمر، باکتری غذازاد و مخلوط آنها می‌باشد.

$$[(A_{\text{yeast}} + A_{\text{bacteria}})/2 - (A_{\text{mix}})] / [(A_{\text{yeast}} + A_{\text{bacteria}})/2] \times 100$$

۵-۲- بررسی قابلیت خوداتصالی و آبگریزی جدایه مخمری منتخب

به منظور بررسی قابلیت خوداتصالی، جمعیت مخمر فعال در محیط کشت BHI به گونه‌ای تنظیم شد که جذب آن در طول موج

۶۰۰ نانومتر معادل ۰/۶ باشد (A_0). سپس سوسپانسیون مخمر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و

جذب آن مجدداً خوانش شد (A_1). در نهایت درصد خوداتصالی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید [۱۶].

$$[1 - (A_1/A_0)] \times 100$$

برای بررسی قابلیت آبگریزی جدایه مخمری نیز سوسپانسیونی از این مخمر با جذب معادل ۰/۶ (A_0) در محیط کشت BHI تهیه و سپس سه میلی‌لیتر از این سوسپانسیون با یک میلی‌لیتر زایلین (مرک، آلمان) مخلوط گردید. سپس این مخلوط در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت گرمخانه‌گذاری و در ادامه، جذب فاز تحتانی در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانش شد (A_F). میزان آبگریزی نیز از طریق رابطه زیر محاسبه گردید [۱۷].

$$[1 - (A_F/A_0)] \times 100$$

۶-۲- بررسی قابلیت ضدباکتریایی جدایه منتخب

ابتدا از مخمر منتخب و باکتری‌های غذازاد شامل *E. coli*، *B. cereus*، *S. enterica*، *S. aureus*، *L. monocytogenes* کشت فعال تهیه شد و سپس مخمر منتخب با جمعیت 10^8 CFU/ml و نسبت حجمی یکسان با هر یک از باکتری‌های مذکور به شکل جداگانه مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد.

چهار مخمر *Yarrowia*, *Pichia barkeri* VIT-SJSN01 و *W. anomalus* VIT-ASN01، *lipolytica* VIT-ASN04 و *Saccharomyces cerevisiae* VIT-ASN03 در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش نشان داد که این مخمرها زنده‌مانی حدود ۵۹-۴۸٪ داشتند [۲۴]. در پژوهش دیگری که توسط Hébrard و همکاران (۲۰۱۰) انجام گردید مخمر *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745® از نظر زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش و در طی زمان رسیدن به کلون مورد بررسی قرار گرفت و زنده‌مانی آن در حدود ۱۰٪ گزارش شد [۲۵]. طبق گزارشی از Alkalbani و همکاران (۲۰۲۲) نیز مشخص شد که نژادهای مخمری جدا شده از محصولات غذایی تحت شرایط نامساعد دستگاه گوارش، زنده‌مانی متفاوتی در محدوده ۷/۶ تا ۹۶/۴٪ از خود نشان دادند [۲۶]. همچنین در پژوهش Khalafalla و همکاران (۲۰۱۹) نیز مشخص شد که تمامی مخمرهای جدا شده از دستگاه گوارش زنبور عسل از قابلیت تحمل شرایط مشابه روده برخوردار بودند [۱۰]. زنده‌مانی در شرایط نامساعد دستگاه گوارش یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های یک میکروارگانیسم پروبیوتیک است چرا که به‌طور مستقیم با کارایی آن در ارتباط است. مخمرهای پروبیوتیک از مکانیسم‌های مختلفی نظیر خثی کردن pH، تغییر بیان ژن و تنظیم ترکیب لیپیدی غشا برای زنده ماندن در این شرایط استفاده می‌کنند. همچنین از دلایل مقاومت میکروارگانیسم‌ها به شرایط نامساعد روده می‌توان به هیدرولیز و مصرف صفرا اشاره کرد [۲۷ و ۲۸]. در شرایطی که میکروارگانیسم در قسمت فوقانی دستگاه گوارش زنده‌مانی مناسبی نداشته باشد اما از قابلیت‌های پروبیوتیکی مناسب دیگری برخوردار باشد استفاده از روش‌هایی نظیر ریزپوشانی به‌عنوان یک راهکار کارآمد برای بهبود زنده‌مانی آن در دستگاه گوارش پیشنهاد شده است [۲۴].

۳-۲- شناسایی جدایه مخمری منتخب

حاوی 10^5 spores/ml از هر قارچ در محیط کشت PDA¹⁰ agar (مرک، آلمان) تهیه و بر روی لایه اول ریخته شد. سپس پلیت‌ها تا پوشانده شدن تمام سطح پلیت شاهد (فاقد مخمر) با قارچ‌های مذکور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف مخمر به کمک نرم‌افزار Image J تعیین گردید [۲۲].

۱۰-۲- آنالیز آماری نتایج

تمامی آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شده و داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۷) و با روش آنالیز واریانس یک طرفه، تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین‌ها نیز از حداقل اختلاف معنی‌داری در سطح $p < 0/05$ استفاده شد. ترسیم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Microsoft office excel 2019 صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

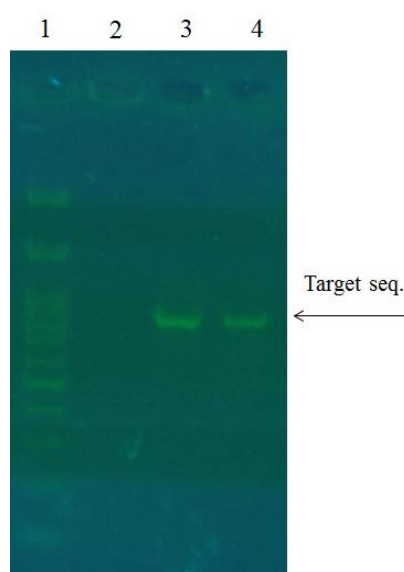
۳-۱- جداسازی مخمرهای عمده از عسل

پس از جداسازی مخمرهای غالب از عسل، سه جدایه با کدهای THY1، THY2 و THY3 که از لحاظ شکل کلنی و تصویر میکروسکوپی با هم متفاوت بودند پیش‌غربال و از نظر زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهدات انجام شده نشان داد که جدایه THY3 با زنده‌مانی $2/16 \pm 14/99\%$ به شکل معنی‌داری ($p < 0/05$) بیشترین زنده‌مانی را در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش داشت و دو جدایه دیگر فاقد زنده‌مانی در این شرایط بودند.

بر اساس پژوهش انجام شده توسط Binetti و همکاران (۲۰۱۳) بر روی مخمرهای جدا شده از مواد غذایی مشخص شد که قابلیت زنده‌مانی برخی از نژادهای مخمری در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش تا حدود دو سیکل لگاریتمی کاهش داشت و طبق گزارش این محققین، قابلیت مذکور کاملاً به نژاد مخمری وابسته بود [۲۳]. بررسی‌های انجام شده توسط Suvana و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی زنده‌مانی

مربوط به *Zygosaccharomyces* و *Starmerella* بود و همچنین برای نخستین بار وجود مخمر *Wickerhamomyces sydowiorum* در عسل گزارش شد [۳۱]. علاوه بر این، طی بررسی‌های انجام شده توسط Ziuzia و همکاران بر روی مخمرهای جدا شده از نمونه عسل لیمو در سال ۲۰۲۳ در لهستان، مشخص گردید که ۱۵ جدایه منتخب مربوط به گونه‌های *C. Y. lipolytica*، *Starmerella magnoliae* و *magnolia* بودند. طبق غربالگری‌های انجام شده بهترین تولیدکنندگان ترکیبات سودمند نژادهایی از مخمر *Y. lipolytica* معرفی شدند که توانایی تولید مقادیر فراوانی از اریتریتول و اسید سیتریک را داشتند [۳۲]. عسل به واسطه برخورداری از ویژگی‌های منحصر به فرد مانند فشار اسمزی بالا، محتوای آبی اندک، pH حدود ۴ و وجود برخی از ترکیبات بازدارنده، موجب مهار رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌شود [۳۳ و ۳۴]. از این رو، اغلب میکروارگانیسم‌های موجود در عسل، جزء فلور ذاتی و منشاء گرفته از روده زنبور عسل، گرده گل یا محیط اطراف می‌باشد و لذا احتمال مواجهه با میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت‌های پروبیوتیکی در بین آنها زیاد است [۸].

براساس نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR و همانطور که در شکل ۱ نیز مشخص است تکثیر توالی هدف در جدایه مخمري منتخب، مورد تایید قرار گرفت و نتایج توالی‌یابی منجر به شناسایی مخمر *S. cerevisiae* با ۹۶٪ شباهت شد. Saksinchai و همکاران در سال ۲۰۱۲ توانستند ۱۸۶ نژاد مخمري را از ۳۷ نمونه عسل مربوط به ۱۲ گونه مختلف زنبور جداسازی کنند که پس از مطالعات مورفولوژی و فیزیولوژی، موفق به شناسایی یک مخمر آسکومیست به نام *Zygosaccharomyces siamensis* شدند [۲۹]. همچنین طی بررسی‌هایی که توسط Silva و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی جدایه‌های میکروبی عسل طبیعی انجام شد، مشخص گردید که ۵۵ جدایه مربوط به مخمرهای *Papiliotrema Rhodotorula SM6-1*، *flavescentis DMKU-CE139*، *Starmerella CBS 9117*، *mucilaginosum* و *S. cerevisiae* sp. بودند و از میان این جدایه‌ها نژادهایی از *S. cerevisiae* توانایی تولید اتانول و گلیسرول را داشتند [۳۰]. بر اساس پژوهش دیگری که در سال ۲۰۲۱ توسط Echeverrigaray و همکاران بر روی عسل‌های ۱۷ گونه مختلف زنبور انجام شد مشخص گردید که جمعیت مخمري در نمونه‌های عسل با فعالیت آبی بالاتر از بیشترین تنوع برخوردار بود. جنس‌های غالب مخمري



شکل ۱. نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR به دست آمده از DNA استخراج شده از مخمر منتخب جدا شده از عسل طبیعی. لاین ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، لاین ۲: کنترل منفی، لاین ۳: کنترل مثبت (تکثیر DNA استخراج شده از مخمر نانوائی)، لاین ۴: تکثیر DNA استخراج شده از جدایه مخمری منتخب.

Fig. 1. Gel electrophoresis of the PCR products obtained from amplification of DNA extracted from selected yeast isolated from natural honey. Lane1: 100 bp DNA ladder, lane 2: negative control, lane 3: positive control (amplified DNA extracted from baker's yeast) and lane 4: amplified DNA extracted from selected yeast isolate.

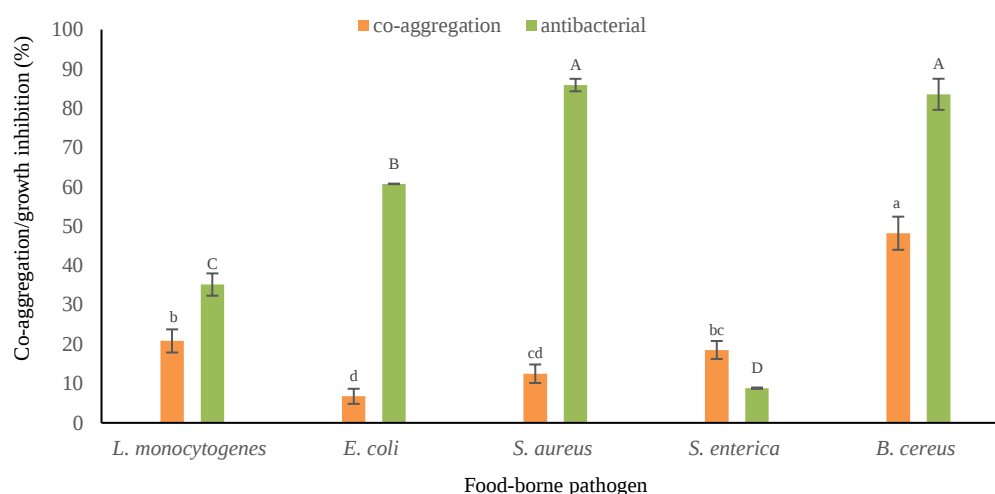
تواند به واسطه اتصال پیلی باکتری‌های گرم مثبت و مانان دیواره سلولی مخمر و همچنین اتصالات هیدروفوبیک و الکترواستاتیک غیراختصاصی رخ دهد [۳۶ و ۳۷]. در سال ۲۰۲۱ دو مخمر *Kluyveromyces lactis* B10 و *Torulaspora delbrueckii* B14 جدا شده از مواد غذایی که درصد بالایی از خوداتصال را در برابر باکتری *S. enterica* از خود نشان دادند پس از خوراندن شدن به موش‌های مبتلا به سالمونلوز موجب کاهش ۹۰٪ مرگ و میر این حیوانات شدند [۳۸]. Menezes و همکاران در سال ۲۰۲۰ نژادهایی از *S. cerevisiae* و *Pichia kluyveri* جدا شده از مواد غذایی را از نظر قابلیت‌های اتصالی و ضد میکروبی مورد بررسی قرار دادند. پژوهشگران مذکور مشاهده کردند که این دو مخمر از قابلیت دگر اتصالی مناسبی با باکتری‌های غذازاد *Salmonella enteritidis* و *L. monocytogenes*، *E. coli* برخوردار بودند. همچنین این مخمرها هیچگونه متابولیت ضد میکروبی تولید نکردند و لذا اثر ضد میکروبی آن‌ها در برابر باکتری‌های غذازاد ناشی از رقابت بر سر مواد غذایی و جایگاه‌های اتصال عنوان شد [۳۹]. در مطالعه دیگری بر روی مخمرهای *S. cerevisiae* UFMGCB 11120 و *R. mucilaginosa* UFMGCB 18377 مشاهده شد که هر دو مخمر، قابلیت دگر اتصالی بالایی با باکتری غذازاد *S. Typhimurium* داشتند. همچنین پس از خوراندن این دو مخمر به موش‌های آلوده شده به سالمونلا مشاهده شد مخمر *R. mucilaginosa* UFMGCB 18377 از موش‌ها در برابر آلودگی توسط سالمونلا محافظت کرد و از کاهش وزن آن‌ها نیز جلوگیری نمود [۴۰]. در پژوهش دیگری ۱۸ نژاد مخمری جدا شده از مواد غذایی از نظر قابلیت‌های پروبیوتیکی از جمله قابلیت دگر اتصالی و ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشخص گردید که مقادیر دگر

۳-۳- بررسی قابلیت دگر اتصالی و ضدباکتریایی جدایه مخمری منتخب

نتایج آزمون قابلیت دگر اتصالی و اثر ضد باکتریایی جدایه منتخب در شکل ۲ مشاهده می‌شود. نتایج نشان داد که جدایه مخمری *S. cerevisiae* به شکل معنی‌داری ($p < 0.05$) بیشترین دگر اتصالی را با باکتری‌های گرم مثبت *B. cereus* و *S. aureus* و کمترین دگر اتصالی را با باکتری گرم منفی *E. coli* داشت. علاوه بر این، بازدارندگی جدایه مذکور در برابر باکتری گرم مثبت *B. cereus* به شکل معنی‌داری بیشتر از سایر باکتری‌های مورد مطالعه بود و کمترین اثر ممانعت-کنندگی این مخمر نیز بر روی باکتری گرم منفی *S. enterica* مشاهده شد. همچنین بین قابلیت دگر اتصالی این جدایه و بازدارندگی رشد باکتری *B. cereus* رابطه مستقیمی وجود داشت.

طبق پژوهش Kanpiengjai و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی قابلیت دگر اتصالی مخمر *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 با باکتری‌های غذازاد مشخص شد که بیشترین درصد اتصال این مخمر با باکتری‌های *Salmonella*، *B. cereus*، *Thyphimurium*، *S. aureus* و *L. monocytogenes* با مقادیر دگر اتصالی ۴۵/۸٪، ۴۴٪، ۳۷/۸٪ و ۳۶/۲٪ مشاهده شد که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت [۳۵]. در بررسی انجام شده توسط Ragavan و همکاران (۲۰۱۹) بر روی مخمر پروبیوتیک *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 مشخص شد که برخلاف پژوهش حاضر، بیشترین درصد دگر اتصالی این مخمر با باکتری‌های گرم منفی مشاهده شد [۱۶]. اتصال میکروارگانیسم‌های متفاوت به یکدیگر دگر اتصالی نام دارد که در مخمرها دیواره سلولی نقش اساسی را در این اتصال ایفا می‌کند. دگر اتصالی می-

توسط نژادهای مختلف مخمری تولید می‌شوند شامل ترکیبات فنولی، اتانول، اسیدهای آلی، دی‌اکسید کربن، پراکسید هیدروژن و مایکوسین‌ها می‌باشند [۴۲ و ۴۳]. اتصال میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به عوامل بیماری‌زا نیز می‌تواند مانع دسترسی این میکروارگانیسم‌ها به مواد غذایی، جلوگیری از اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده و همچنین تسهیل خروج آنها از دستگاه گوارش توسط حرکات روده شود [۴۴].



شکل ۲. قابلیت دگر اتصالی مخمر غالب جدا شده از عسل طبیعی و اثر بازدارنده آن بر رشد باکتری‌های غذازاد مورد مطالعه. حروف کوچک متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) بین مقادیر دگر اتصالی و همچنین حروف بزرگ متفاوت نیز مبین تفاوت معنی‌دار بین مقادیر اثر ضد باکتریایی جدایه مخمری می‌باشد.

Fig. 2. Co-aggregation and antibacterial capabilities of predominant yeast isolated from natural honey against studied food-borne bacteria. The different lowercase and uppercase letters indicate significant differences among co-aggregation and antibacterial activities of the selected yeast isolate, respectively.

K. Clavispora lusitaniae, *S. cerevisiae*, *marxianus*

Galactomyces geotrichum و *lactis* انجام گردید مشخص شد که قابلیت خوداتصالی جدایه‌های مذکور در حدود ۷۰-۱۶٪ متغیر بود [۲۳]. همچنین بر اساس پژوهش دیگری که توسط Díaz-Vergara و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شد نژادهایی از مخمر *K. marxianus* از مواد غذایی جدا شدند. این مخمرها قابلیت خود اتصالی حدود ۳۳/۰۲ تا ۴۱/۶۵٪ از خود نشان دادند که از قابلیت خوداتصالی جدایه‌های پژوهش حاضر کمتر بود [۴۶]. خوداتصالی در مخمرها پدیده پیچیده ای است که در فاز نمایی یا سکون رخ می‌دهد و تحت تاثیر

اتصالی این جدایه‌ها در برابر باکتری غذازاد *S. enteritidis* بین ۱۹ تا ۲۵٪ بود. همچنین این جدایه‌ها اثر ضد میکروبی مناسبی بر روی این باکتری غذازاد داشته و اتصال آنرا به سلول‌های اپیتلیال روده محدود کردند [۴۱]. اتصال به عوامل بیماری‌زا، اصلاح ساختار و عملکرد سلول‌های اپیتلیال روده و همچنین تولید برخی از متابولیت‌های بازدارنده از مکانیسم‌های اصلی بروز اثرات ضد میکروبی در مخمرهای پروبیوتیک محسوب می‌شوند. برخی از این متابولیت‌ها که

۳-۴- بررسی قابلیت خوداتصالی و آبگریزی جدایه

مخمري منتخب

در پژوهش حاضر، مقادیر خوداتصالی و آبگریزی مخمر *S. cerevisiae* به ترتیب برابر با $0.06 \pm 0.93/86$ و $0.16 \pm$ بود. ۷۶٪/۳۶

قابلیت خوداتصالی، توانایی یک میکروارگانیسم برای اتصال به نژادهای همنوع تعریف می‌شود که یکی از قابلیت‌های حائز اهمیت در میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشد [۴۵]. طبق نتایج پژوهشی که توسط Binetti و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی نژادهایی از مخمرهای *Kluyveromyces*

تفاوت در ترکیب دیواره سلولی و پروتئین‌های سطحی سلول قرار می‌گیرد و می‌تواند موجب بهبود اتصال میکروارگانیسم به سلول‌های اپیتلیال روده و بهبود لانه‌گزینی، تشکیل بیوفیلم و محافظت از دستگاه گوارش و همچنین ممانعت از اتصال میکروارگانیسم‌های نامطلوب به دستگاه گوارش شود [۴۷ و ۴۵].

بر اساس بررسی‌های انجام شده توسط Suvarna و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی چهار نژاد مخمری، مشخص شد بیشترین مقادیر آبگریزی مربوط به مخمرهای *Y. lipolytica* VIT-ASN04 و *P. barkeri* VIT-SJSN01 در برابر دی اتیل اتر و با مقادیر ۹۶٪ و ۷۴٪ بود [۲۴]. بر اساس نتایج پژوهش دیگری که توسط Digutã و همکاران در سال ۲۰۲۲ انجام شد مشخص گردید نژادهای مخمری جدا شده از مواد غذایی، آبگریزی متفاوتی از خود در برابر هگزان و زایلن نشان دادند که این مقدار بین ۵/۹۳٪ تا ۵۵/۴۳٪ متغیر بود [۴۸]. قابلیت آبگریزی میکروارگانیسم‌ها با قابلیت اتصال به سلول‌های اپیتلیال و لانه‌گزینی آن‌ها در دستگاه گوارش مرتبط است و می‌تواند موجب بهبود اثرات سلامتی بخش آن‌ها، طولانی‌تر شدن زمان اثرگذاری بر ایمنی دستگاه

گوارش و همچنین ایجاد یک مانع در برابر لانه‌گزینی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا شود. همچنین قابلیت آبگریزی میکروارگانیسم‌ها ارتباط مستقیمی با سایر توانایی‌های اتصال آنها مانند قابلیت خوداتصال دارد و می‌تواند به عنوان مبنایی برای پی بردن به ظرفیت اتصال میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک استفاده شود [۴۹ و ۵۰].

۵-۳- بررسی مقاومت به ترکیبات ضدقارچ و قابلیت

همولیز خون

همانطور که در جدول ۱ نیز مشخص است مطالعه مقاومت آنتی‌مایکوتیکی نشان داد که مخمر *S. cerevisiae* به شکل معنی‌داری ($p < 0/05$) بیشترین حساسیت را نسبت به ناتامایسین از خود نشان داد. اگرچه این جدایه در برابر کتوکونازول نیز هاله عدم رشد تشکیل داد اما قطر هاله ایجاد شده کمتر از ۱۴ میلی‌متر بود و جدایه مذکور در برابر این ترکیب و سایر ترکیبات ضد قارچ مورد مطالعه شامل پروپونات کلسیم، سوربات پتاسیم، ایتروکونازول و فلوکونازول مقاوم تلقی شد. همچنین این جدایه هیچ گونه فعالیت همولیزی نداشت.

جدول ۱. مقاومت مخمر غالب جدا شده از عسل در برابر ترکیبات ضد قارچ. قطر هاله عدم رشد کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر: مقاوم، ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر: حساسیت نسبی و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر: حساس. حروف متفاوت، نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0/05$ می‌باشد.

Table 1. Antimycotic susceptibility of the predominant yeast isolated from natural honey. Diameter of inhibition zone equal to 14, 15-17 and higher than 20 mm, respectively show resistance, intermediate and sensitive. The different letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

Antifungal compounds (concentration)	Inhibition zone diameter (mm)	Sensitivity
Ketoconazole (200 mg)	9.95 ± 0.21 ^b	Resistant
Natamycin (50 mg)	20.10 ± 0.42 ^a	Sensitive
Calcium propionate (60 mg)	0.00 ^c	Resistant
Potassium sorbate (60 mg)	0.00 ^c	Resistant
Itraconazole (100 mg)	0.00 ^c	Resistant
Fluconazole (150 mg)	0.00 ^c	Resistant

قارچی حائز اهمیت است. Fernández-Pacheco و همکاران در سال ۲۰۲۱ مخمرهایی با قابلیت‌های پروبیوتیکی را از نظر حساسیت به عوامل ضد قارچ مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران مشاهده کردند که ترکیبات ضد قارچ

یکی از ویژگی‌های مهم مخمرهای پروبیوتیک، مقاومت آن‌ها به عوامل ضد قارچ است. این قابلیت به لحاظ کاربردی بودن مخمر پروبیوتیک در صنعت مواد غذایی همراه با نگهدارنده‌ها و همچنین در هنگام درمان با داروهای ضد

برابر قارچ *A. niger* را نداشت اما توانست مانع تغییر رنگ کامل قارچ مذکور به سیاه شود.

Ruggirello و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹ نژادهایی از مخمر *Saccharomyces* و *Candida* را از مواد غذایی جدا کرده و اثر ضد قارچی این مخمرها را بر قارچ‌های *Aspergillus* و *Penicillium* مورد بررسی قرار دادند. این محققین مشاهده کردند که مخمرهای مذکور، قابلیت ضد قارچی مناسبی از خود نشان داده و به طور میانگین موجب کاهش ۵۶/۱٪ رشد این قارچ‌ها شدند. همچنین این پژوهشگران، فعالیت ضد قارچی مخمرهای مذکور را به تولید متابولیت‌های پروتئینی مانند مایکوسین توسط آن‌ها مرتبط دانستند [۶۰].

و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ نژادهایی از مخمر *Candida stellimalicola* را به منظور مهار رشد قارچ *Penicillium italicum* در مرکبات مورد استفاده قرار دادند. محققین مذکور قابلیت ضد قارچی این مخمرها را به تولید آنزیم کیتیناز و همچنین ممانعت از جوانه‌زنی کنیدی‌های قارچ مرتبط دانستند [۶۱].

Kunyeit و همکاران (۲۰۱۹) قابلیت استفاده از دو مخمر پروبیوتیک *S. cerevisiae* و *Issatchenkia occidentalis* ApC را به عنوان راهکاری برای مقابله با عفونت‌های قارچی شایع تایید نمودند. بر اساس نتیجه مطالعه این پژوهشگران، هر دو نژاد مخمری مذکور توانایی مهار اتصال به سلول‌های اپیتلیال کلون، تولید بیوفیلم و تشکیل هیف چهار نژاد *Candida* شامل *Candida krusei*، *Candida tropicalis* MYA 3404 و *Candida glabrata* CDC317 و *Candida parapsilosis* را داشته و به این ترتیب موجب سرکوب بیماری‌زایی آن‌ها شدند [۶۲].

Dikmetas و همکاران در سال ۲۰۲۳ گونه‌هایی از مخمرهای *Moesziomyces*، *Meyerozyma* و *Metschnikowia* را به منظور بررسی اثر ضد قارچی آن‌ها بر روی قارچ *A. flavus* مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران گزارش کردند که ترکیبات آلی فرار تولیدی توسط برخی از این مخمرها توانست موجب کاهش رشد میسلیم و اسپورزایی قارچ مذکور تا حدود ۹۱٪ شود.

فلوکونازول و نیستاتین به ترتیب، کمترین و بیشترین تاثیر را بر مخمرهای مورد مطالعه داشتند [۵۱].

Qasim نیز در سال ۲۰۲۲ گونه‌هایی از مخمر *Rhodotorula* را از نظر حساسیت به ناتامایسین مورد بررسی قرار داد. نتایج این پژوهش نشان داد که هاله عدم رشد ایجاد شده توسط ناتامایسین در حدود ۳۰ میلی‌متر بوده و از اینرو مخمر *Rhodotorula* نسبت به این ترکیب کاملاً حساس بود [۵۲].

از مکانیسم‌های رایج مخمرها برای مقاومت در برابر عوامل ضدقارچی می‌توان به اصلاح و یا تغییر نفوذپذیری غشا، جلوگیری از سنتز DNA و RNA و همچنین تغییر در بیان ژن اشاره نمود [۵۳-۵۵].

Oliveira Coelho و همکاران در سال ۲۰۱۹ ضمن جداسازی مخمر *S. cerevisiae* LPBF3 از نوشیدنی کفیر بر پایه عسل مشاهده نمودند که این مخمر فاقد فعالیت همولیزی بود [۵۶].

همچنین در پژوهش دیگری که بر روی فعالیت همولیزی مخمرهای جدا شده از مواد غذایی انجام گرفت مشخص شد که از میان نژادهای مورد مطالعه تنها مخمر *Candida metapsilosis* قادر به همولیز سلول‌های خونی بود [۵۷].

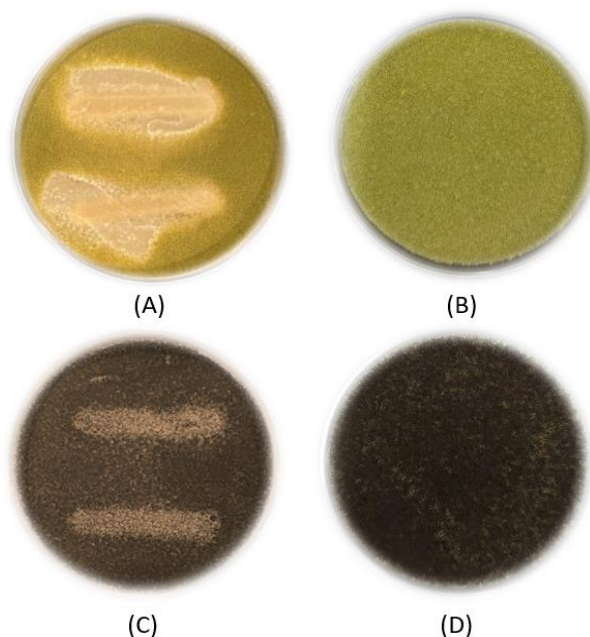
فعالیت همولیزی یکی از فاکتورهای مهم بیماری‌زایی در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بوده که می‌تواند سبب تسهیل دسترسی میکروارگانیسم به آهن و ایجاد کم‌خونی در میزبان شود. لذا بررسی این ویژگی در میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، ضروری و یکی از نخستین آزمون‌ها جهت تایید ایمنی آن‌ها می‌باشد [۵۸ و ۵۹].

۶-۳- بررسی اثر ضد قارچی جدایه منتخب

در شکل ۳ اثر بازدارندگی مخمر *S. cerevisiae* بر روی قارچ‌های *A. niger* و *A. flavus* در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده می‌شود. همانطور که در این شکل مشهود است جدایه مخمری با ایجاد هاله شفاف در کشت دو لایه از قابلیت بازدارندگی مناسبی در برابر رشد *A. flavus* برخوردار بود و توانست موجب بازدارندگی $1/32 \pm 32/18\%$ رشد این قارچ شود. اگرچه این جدایه قابلیت ایجاد هاله عدم رشد در

صنعتی، تمایل به کنترل زیستی قارچ‌ها افزایش پیدا کرده است. مخمرها به دلیل غیرسمی بودن و داشتن ویژگی‌های کاربردی به عنوان عوامل کنترل زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. این میکروارگانیسم‌ها با مکانیسم‌هایی همانند تولید متابولیت‌های ضدقارچی، آنزیم‌هایی مثل کیتیناز، مایکوسین-ها و همچنین رقابت بر سر مواد مغذی، قادر به کنترل زیستی قارچ‌ها می‌باشند [۶۶-۶۴].

همچنین ترکیبات فرار تولید شده توسط مخمر *Metschnikowia fructicola* 1-UDM نیز تا حد زیادی قابلیت کاهش آفاتوکسین تولیدی توسط قارچ مذکور را داشت [۶۳]. قارچ‌ها از تولید کنندگان اصلی سموم مهلک در مواد غذایی بوده که می‌توانند سبب ایجاد سرطان، نارسایی‌های کبدی و ناهنجاری‌های ژنتیکی برای انسان شوند و از اینرو کنترل آن‌ها در مواد غذایی از اهمیت بسزایی برخوردار است. امروزه با توجه به عوارض نامطلوب قارچ‌کش‌های



شکل ۳. اثر ضد قارچی مخمر جدا شده از عسل طبیعی به روش کشت دولایه در برابر (A) *A. flavus* و (C) *A. niger* در مقایسه با نمونه‌های کنترل (B and D).

Fig. 3. Antifungal effect of predominant yeast isolated from natural honey on *A. flavus* (A) and *A. niger* (C) compared to their corresponding controls (B and D) in overlay bioassay.

از نگهدارنده‌های سنتزی در صنعت غذا، معرفی جایگزین‌های زیستی مناسب نظیر مخمرهای پروبیوتیک نیز جالب توجه قرار گرفته است. در پژوهش حاضر، ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از عسل مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، قابلیت‌های خود اتصالی، آبگریزی سطحی، دگر اتصالی و ضد باکتریایی مناسب این مخمر تایید شد. علاوه بر این، جدایه مذکور از اثرات ضد قارچی مناسبی نیز برخوردار بود. البته هنگام استفاده از این جدایه پروبیوتیک در مواد غذایی تخمیری باید جنبه‌های ایمنی و اثر مقابل آن با فلور میکروبی موجود در

۴- جمع‌بندی

با توجه به اهمیت قابلیت‌های ضد میکروبی و پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از مواد غذایی، بررسی ویژگی‌های بالقوه این میکروارگانیسم‌ها برای استفاده در صنعت غذا اهمیت دو چندانی یافته است. از طرفی با در نظر گرفتن قابلیت‌های اتصال مناسب و مقاومت ذاتی مخمرهای پروبیوتیک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، این میکروارگانیسم‌های مفید نیز از جایگاه ویژه‌ای در زیست فناوری مواد غذایی برخوردار شده‌اند. با در نظر گرفتن مخاطرات و محدودیت‌های مرتبط با استفاده

آغازگر بوده و لذا می‌تواند قابلیت‌های متفاوتی به محصول تولیدی اعطا نماید) در صنایع تخمیری استفاده نمود.

اکوسیستم غذایی نیز مد نظر قرار گیرد. بر این اساس می‌توان از جدایه مخمیری مذکور به عنوان کشت محافظت کننده (کشت میکروبی با اثر بازدارنده بر عوامل مخاطره‌ساز میکروبی در ماده غذایی) و یا کشت همراه (کشت میکروبی غیر آغازگر که دارای قابلیت‌های متمایزی نسبت به کشت

ه-منابع

- [1] Zarali, M., Sadeghi, A., Jafari, S. M., & Sadeghi Mahoonak, A. (2022). Evaluation of antimicrobial and probiotic properties of the predominant LAB isolated from fermented germinated clover seed. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 19(123), 299-315.
- [2] Kiadaliri, F., Sadeghi, A., Khomeiri, M., Kashaninejad, M., & Aalami, M. (2018). Evaluating the antimicrobial properties of *Lactobacillus brevis* isolated from whole barley sourdough. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 15(2), 247-57.
- [3] Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Yeast as probiotics-*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & Therapeutics*, 26(6), 767-778.
- [4] Paşca, C., Mărghițaș, L. A., Matei, I. A., Bonta, V., Mărgăoan, R., Copaciu, F., Bobiș, O., Campos, M.G. & Dezmirean, D. S. (2021). Screening of some Romanian raw honeys and their probiotic potential evaluation. *Applied Sciences*, 11(13), 5816.
- [5] Zahoor, F., Sooklim, C., Songdech, P., Duangpakdee, O., & Soontorngun, N. (2021). Selection of potential yeast probiotics and a cell factory for xylitol or acid production from honeybee samples. *Metabolites*, 11(5), 312.
- [6] Sen, S., & Mansell, T. J. (2020). Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genetics and Biology*, 137, 103333.
- [7] Arévalo-Villena, M., Fernandez-Pacheco, P., Castillo, N., Bevilacqua, A., & Pérez, A. B. (2018). Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 657-665.
- [8] Begum, S. B., Roobia, R. R., Karthikeyan, M., & Murugappan, R. M. (2015). Validation of nutraceutical properties of honey and probiotic potential of its innate microflora. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 743-750.
- [9] Tauber, J. P., Nguyen, V., Lopez, D., & Evans, J. D. (2019). Effects of a resident yeast from the honeybee gut on immunity, microbiota, and Nosema disease. *Insects*, 10(9), 296.
- [10] Khalafalla, G. M., Sadik, M. W., Ali, M. A., & Mohamed, R. S. (2019). Novel potential probiotics from gut microbiota of honeybees (*Apis mellifera*) in clover feeding season in Egypt. *Plant Archives* (09725210), 19(2).
- [11] Chelucci, E., Chiellini, C., Cavallero, A., & Gabriele, M. (2023). Bio-functional activities of Tuscan bee pollen. *Antioxidants*, 12(1), 115.
- [12] Ebrahimi, M., A. Sadeghi, D. Rahimi, H. Purabdollah, and S. Shahryari (2021). Postbiotic and anti- aflatoxigenic capabilities of *Lactobacillus kunkei* as the potential probiotic LAB isolated from the natural honey. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(2): 343-355.
- [13] Srinivas, B., Rani, G. S., Kumar, B. K., Chandrasekhar, B., Krishna, K. V., Devi, T. A., & Bhima, B. (2017). Evaluating the probiotic and therapeutic potentials of *Saccharomyces cerevisiae* strain (OBS2) isolated from fermented nectar of toddy palm. *Applied Microbiology and Technology*, 7(1), 1-14.
- [14] Jooyandeh, H., & Namazi, P. (2024). Evaluation of probiotic, antibacterial and safety properties of *Lactocaseibacillus rhamnosus* JCM 1136. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 21(149), 223-240.
- [15] Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226, 1065-1073.
- [16] Ragavan, M. L., & Das, N. (2019). Optimization of exopolysaccharide production by probiotic yeast *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 using response surface methodology and its applications. *Annals of Microbiology*, 69(5), 515-530.
- [17] Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B., & Cosentino, S. (2017). *In vitro* screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 100-106.
- [18] Danielski, G. M., Imazaki, P. H., de Andrade Cavallari, C. M., Daube, G., Clinquart, A., & de Macedo, R. E. F. (2020). *Carnobacterium maltaromaticum* as bioprotective culture *in vitro* and in cooked ham. *Meat Science*, 162, 108035.
- [19] Bauer, A. W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single diffusion method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.

- [20] Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 234-240.
- [21] Romero-Luna, H. E., Hernández-Sánchez, H., Ribas-Aparicio, R. M., Cauich-Sánchez, P. I., & Dávila-Ortiz, G. (2019). Evaluation of the probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* Strain (C41) isolated from Tibicos by *in vitro* studies. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 794-800.
- [22] Tayel, A. A., El-Tras, W. F., Moussa, S. H., & El-Agamy, M. A. (2013). Antifungal action of *Pichia anomala* against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and its application as a feed supplement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3259-3263.
- [23] Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., & Suárez, V. (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 434-444.
- [24] Suvama, S., Dsouza, J., Ragavan, M. L., & Das, N. (2018). Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Food Science and Biotechnology*, 27, 745-753.
- [25] Hébrard, G., Hoffart, V., Beyssac, E., Cardot, J. M., Alric, M., & Subirade, M. (2010). Coated whey protein/alginate microparticles as oral controlled delivery systems for probiotic yeast. *Journal of Microencapsulation*, 27(4), 292-302.
- [26] Alkalbani, N. S., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Olaimat, A. N., Liu, S. Q., Shah, N. P., ... & Ayyash, M. M. (2022). Assessment of yeasts as potential probiotics: A review of gastrointestinal tract conditions and investigation methods. *Journal of Fungi*, 8(4), 365.
- [27] Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3, 421.
- [28] Shruthi, B., Deepa, N., Somashekaraiyah, R., Adithi, G., Divyashree, S., & Sreenivasa, M. Y. (2022). Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnology Reports*, 34, e00716.
- [29] Saksinchai, S., Suzuki, M., Chantawannakul, P., Ohkuma, M., & Lumyong, S. (2012). A novel ascosporeogenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand. *Fungal Diversity*, 52, 123-139.
- [30] Silva, M. S., Arruda, L. M., Xavier, P. L., Ramírez, M. X. D., da Silveira, F. A., Santana, W. C., ... & Eller, M. R. (2020). Selection of yeasts from bee products for alcoholic beverage production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 323-334.
- [31] Echeverrigaray, S., Scariot, F. J., Foresti, L., Schwarz, L. V., Rocha, R. K. M., da Silva, G. P., ... & Delamare, A. P. L. (2021). Yeast biodiversity in honey produced by stingless bees raised in the highlands of southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 347, 109200.
- [32] Ziuzia, P., Janiec, Z., Wróbel-Kwiatkowska, M., Lazar, Z., & Rakicka-Pustulka, M. (2023). Honey's yeast—new source of valuable species for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 7889.
- [33] Kahraman, T., Buyukunal, S. K., Vural, A., & Altunatmaz, S. S. (2010). Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. *Food Chemistry*, 123(1), 41-44.
- [34] Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I. & Bezirtzoglou, E. (2011). Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe*, 17(6), 375-379.
- [35] Kanpiengjai, A., Khanongnuch, C., Lumyong, S., Kummasook, A., & Kittibunchakul, S. (2020). Characterization of *Sporidiobolus ruineniae* A45. 2 cultivated in tannin substrate for use as a potential multifunctional probiotic yeast in aquaculture. *Journal of Fungi*, 6(4), 378.
- [36] Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58, 56-66.
- [37] Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., & Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 130-180.
- [38] Andrade, G. C., Andrade, R. P., Oliveira, D. R., Quintanilha, M. F., Martins, F. S., & Duarte, W. F. (2021). *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii*: Probiotic characterization, anti-*Salmonella* effect, and impact on cheese quality. *LWT-Food Science and Technology*, 151, 112240.
- [39] Menezes, A. G. T., de Sousa Melo, D., Ramos, C. L., Moreira, S. I., Alves, E., & Schwan, R. F. (2020). Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 140, 103969.
- [40] Coutinho, J. O., Peixoto, T. S., de Menezes, G. C., Carvalho, C. R., Ogaki, M. B., Gomes, E. C., Rosa, C.A., Rosa, L.H., Arantes, R.M., Nicoli, J.R., Tiago, F.C., & Martins, F. S. (2021). *In vitro* and *in vivo* evaluation of the probiotic potential of Antarctic yeasts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(5), 1338-1354.
- [41] Simões, L. A., Cristina de Souza, A., Ferreira, I., Melo, D. S., Lopes, L. A. A., Magnani, M., Schwan, R.F., & Dias, D. R. (2021). Probiotic properties of yeasts isolated from Brazilian fermented table olives. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1983-1997.

- [42] Nascimento, B. L., Delabeneta, M. F., Rosseto, L. R. B., Junges, D. S., Paris, A. P., Persel, C., & Gandra, R. F. (2020). Yeast mycocins: a great potential for application in health. *FEMS Yeast Research*, 20(3), foaa016.
- [43] Menezes, A. G. T., Ramos, C. L., Cenzi, G., Melo, D. S., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2020). Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 280-288.
- [44] Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226, 1065-1073.
- [45] Saito, K., Tomita, S., & Nakamura, T. (2019). Aggregation of *Lactobacillus brevis* associated with decrease in pH by glucose fermentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(8), 1523-1529.
- [46] Díaz-Vergara, L., Pereyra, C. M., Montenegro, M., Pena, G. A., Aminahuel, C. A., & Cavaglieri, L. R. (2017). Encapsulated whey-native yeast *Kluyveromyces marxianus* as a feed additive for animal production. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(5), 750-759.
- [47] Stewart, G. G. (2018). Yeast flocculation—sedimentation and flotation. *Fermentation*, 4(2), 28.
- [48] Diguță, C. F., Mihai, C., Toma, R. C., Cîmpeanu, C., & Matei, F. (2022). *In vitro* assessment of yeasts strains with probiotic attributes for aquaculture use. *Foods*, 12(1), 124.
- [49] Wang, X., Li, W., Mahsa, G. C., Zhang, C., Ma, K., Rui, X., & Li, W. (2023). Co-cultivation effects of *Lactobacillus helveticus* SNA12 and *Kluyveromyces marxianus* GY1 on the probiotic properties, flavor, and digestion in fermented milk. *Food Research International*, 169, 112843.
- [50] Falah, F., Vasiee, A., Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Moradi, S., Mortazavi, S. A., & Roshanak, S. (2019). Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. *Microbial Pathogenesis*, 131, 246-253.
- [51] Fernández-Pacheco, P., Ramos Monge, I. M., Fernández-González, M., Poveda Colado, J. M., & Arévalo-Villena, M. (2021). Safety evaluation of yeasts with probiotic potential. *Frontiers in Nutrition*, 8, 659328.
- [52] Qasim, Z. S. (2022). The Antimycotic activity of Rosuvastatin. *Iraqi Journal of Pharmacy*, 19(2), 84-92.
- [53] Kanafani, Z. A., & Perfect, J. R. 2008. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, 46(1), pp. 120-128
- [54] Goretti, M., Turchetti, B., Buratta, M., Branda, E., Corazzi, I., Vaughan-Martini, A., Buzzini, P. 2009. *In vitro* antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2-3), pp. 178-182.
- [55] Cernicka, J., Kozovska, Z., Hnatova, M., Valachovic, M., Hapala, I., Riedl, Z., Hajos, G., Subik, J. 2007. Chemosensitisation of drug-resistant and drug-sensitive yeast cells to antifungals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(2), pp. 170-178.
- [56] de Oliveira Coelho, B., Fiorda-Mello, F., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., de Carvalho, J. C., & Soccol, C. R. (2019). *In vitro* probiotic properties and DNA protection activity of yeast and lactic acid bacteria isolated from a honey-based kefir beverage. *Foods*, 8(10), 485.
- [57] Hsiung, R. T., Fang, W. T., LePage, B. A., Hsu, S. A., Hsu, C. H., & Chou, J. Y. (2021). *In vitro* properties of potential probiotic indigenous yeasts originating from fermented food and beverages in Taiwan. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13, 113-124.
- [58] Vesterlund, S., Vankerckhoven, V., Saxelin, M., Goossens, H., Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2007). Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 116(3), 325-331.
- [59] Kia, S., Sadeghi, A., Kashaninejad, M., Khomeiri, M., & Zarali, M. (2023). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus brevis* as the predominant LAB isolated from fermented amaranth. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 19(132), 65-76.
- [60] Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., Coccolin, L., & Dolci, P. (2019). Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*, 115, 519-525.
- [61] da Cunha, T., Ferraz, L. P., Wehr, P. P., & Kupper, K. C. (2018). Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 276, 20-27.
- [62] Kunyeyit, L., Kurrey, N. K., Anu-Appaiah, K. A., & Rao, R. P. (2019). Probiotic yeasts inhibit virulence of non-*albicans* *Candida* species. *Molecular Biology & Microbiology*, 10(5), e02307-19.
- [63] Dikmetas, D. N., Özer, H., & Karbancıoglu-Guler, F. (2023). Biocontrol potential of antagonistic yeasts on *In Vitro* and *In Vivo* *Aspergillus* Growth and Its AFB₁ Production. *Toxins*, 15(6), 402.
- [64] Gil-Rodríguez, A. M., & Garcia-Gutierrez, E. (2021). Antimicrobial mechanisms and applications of yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 114, 37-72.
- [65] Purabdollah, H., Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Kashaninejad, M., & Mohamadzadeh, J. (2022). Evaluation of probiotic and antifungal properties of

the predominant LAB isolated from fermented acorn (*Quercus persica*). *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 19(124), 171-183.

[66] Rahimi, D., Sadeghi, A., Kashaninejad, M., & Ebrahimi, M. (2024). Postbiotic characterization of a

potential probiotic yeast isolate, and its microencapsulation in alginate beads coated layer-by-layer with chitosan. *Heliyon*, 10(7).



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of probiotic and antifungal properties of predominant yeast isolated from honey

Fatemeh Taheri¹, Alireza Sadeghi^{1*}, Seid Mahdi Jafari^{1,2}, Sara Shahryari¹, Maryam Zarali¹

1-Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2-Halal Research Center of IRI, Iran Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2024/6/5 Accepted:2024/9/20 Keywords: Natural honey, probiotic yeast, adhesion capacity, antibacterial effect, antifungal activity. DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185. *Corresponding Author E- sadeghi.gau@gmail.com	Evaluation of probiotic properties of microorganisms isolated from stressful substrates has received considerable attention. Among probiotic microorganisms, yeasts are distinguished from lactic acid bacteria due to their bigger size, better adhesion ability, and resistance to antibiotics without the possibility of transferring resistance genes. In the present study, probiotic and antifungal properties of the predominant yeast isolated from natural honey were investigated. Sequencing results of the PCR products led to the identification of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> as the predominant yeast isolated from honey. Moreover, the isolate had no hemolytic activity and showed the highest sensitivity towards natamycin among the studied antimycotic agents. In addition, although the yeast isolate had no proper survival under simulated gastrointestinal conditions, it had relatively high auto-aggregation (93.86%) and cell-surface hydrophobicity (76.36%). The highest co-aggregation ability of the isolate was also observed with Gram-positive bacteria <i>Bacillus cereus</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>, and the inhibition activity of the isolate against <i>B. cereus</i> was significantly ($p<0.05$) higher than those of the other studied food-borne bacteria. The yeast isolate also showed 32.18% antifungal effect on <i>Aspergillus flavus</i>. Accordingly, the predominant yeast isolated from honey has suitable capabilities for application as a protective culture in fermentation industries.



مقاله علمی-پژوهشی

ارزیابی میزان آکریلامید در انواع روغن‌های خوراکی و فلافل‌های موجود در فست‌فودهای شهر تهران

فهیمة فرجی^۱، سیداحمد شهیدی^{۲*}، نبی شریعتی^۳، محمد احمدی^۱

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، مازندران، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۳- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۳۰

کلمات کلیدی:

آکریلامید،

ایمنی غذایی،

روغن‌های خوراکی،

فست‌فود،

فلافل.

DOI:10.22034/FSCT.22.158.201.

* مسئول مکاتبات:

sashahidy@yahoo.com

sa.shahidi@iaau.ac.ir

غذاهای سالم و عاری از آلودگی در حفظ سلامت بدن بسیار مؤثر هستند. ازجمله مواد غذایی که نیاز به نظارت دارد فلافل و روغن‌های خوراکی می‌باشد که می‌تواند آلوده به مواد خطرناکی مانند آکریلامید شوند. در این مطالعه از ۳ فست‌فود موجود در تهران نمونه‌های فلافل تهیه و نیز از فروشگاه‌های مواد غذایی ۳ نوع روغن خام رایج شامل روغن‌های آفتابگردان، سویا و کلزا در ۵ برند پرفروش انتخاب شدند که نمونه‌برداری به‌صورت رندوم انجام شد. که پس از آماده‌سازی توسط دستگاه GC-MS مورد ارزیابی این آلاینده‌ها قرار گرفتند. میانگین آکریلامید در نمونه‌های روغن برابر 0.02 ± 0.08 میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که پایین‌تر از استاندارد اتحادیه اروپا بود (برای سبب‌زمینی سرخ‌کرده ۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم و برای نان ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم بوده است). از میان سه روغن خام انتخاب‌شده روغن سویا کمترین میزان آکریلامید (0.01 ± 0.05 میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روغن آفتابگردان بالاترین میزان آکریلامید (0.03 ± 0.10 میلی‌گرم بر کیلوگرم) را دارا بودند؛ و نیز میانگین میزان آکریلامید در فلافل‌ها برابر 0.56 ± 1.80 میلی‌گرم بر کیلوگرم بوده است که بالاتر از استانداردهای ذکر شده است. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده و از آنجایی که میزان آلودگی به آکریلامید در فلافل‌های موجود در فست‌فودها کمی از استانداردها بالاتر است، ضروری است که نظارت‌های بیشتری در این زمینه صورت گیرد.

۱- مقدمه

روغن‌های خوراکی را معمولاً از چربی‌های نباتی یا حیوانی به دست می‌آورند. چربی‌های نباتی در دمای اتاق مایع‌اند. این نوع روغن‌ها را اغلب از گیاهان، مغز میوه، دانه گیاه و... تهیه می‌کنند. البته اغلب چربی‌های حیوانی در دمای اتاق به حالت جامدند و بنابراین نمی‌توان آن‌ها را جزو روغن به حساب آورد [۱]؛ اما برخی جانوران از جمله ماهی، وال و برخی از حیواناتی که در آب‌وهوای سرد زندگی می‌کنند، چربی بدنشان به حالت روغن مایع می‌باشد [۲]. روغن‌های خوراکی، به‌طور کامل مضر نیستند و مصرف مناسب آن‌ها می‌تواند به بهبود وضعیت سلامت کمک کند [۳]. مصرف روغن‌های خوراکی مناسب می‌تواند در رشد سلول‌ها، بهبود عملکرد قلب و عروق، جذب مواد مغذی مؤثر، تقویت سیستم ایمنی بدن و بهبود سلامت مغز و اعصاب کمک کند. در واقعیت، برای جذب مواد مغذی مبتنی بر چربی‌ها مانند ویتامین‌های A, D, E و K و بتاکاروتن‌ها، بدن انسان به مصرف روغن نیاز دارد؛ بنابراین، انتخاب بهترین روغن‌های خوراکی برای برآورده کردن نیازهای بدن، برای متخصصان تغذیه بسیار مهم است. معمولاً از روغن برای سرخ کردن و پختن غذا استفاده می‌شود. گاهی به‌منظور نگهداری از مواد غذایی هم به آن‌ها روغن می‌زنند [۴, ۵].

فلافل توپ‌های سرخ‌شده از نخود پخته و ادویه‌جات است. یک گلوله ۱۷ گرمی فلافل تقریباً ۴۸ درصد چربی، ۳۸ درصد کربوهیدرات، ۱۴ درصد پروتئین و همچنین حاوی عناصری مانند سدیم، کلسیم، آهن و پتاسیم است. فلافل یکی از غذاهای اصلی مردم فلسطین است و در خاورمیانه بسیار محبوب است. مصرف این غذا در جنوب ایران رایج است و امروزه به‌عنوان یک غذای آماده محبوب در دنیا مطرح است.

فلافل انواع مختلفی مانند فلافل نخود و لوبیا، فلافل نخود با گوشت و فلافل نخود با سیب‌زمینی در کشورهای مختلف وجود دارد، اما آنچه رایج است بر پایه نخود و سبزی‌ها است [۶-۹].

غذای سالم، متشکل از اجزاء مفید برای سلامت مصرف‌کنندگان و عاری از مواد زیان‌بخش و مضر است [۱۰, ۱۱]. حضور مواد زیان‌بخش و مضر در مواد غذایی موجب بروز اختلال در سلامتی مصرف‌کنندگان می‌شود [۱۲, ۱۳]. تشخیص این مواد یکی از جنبه‌های مهم در پژوهش در صنعت غذا است [۱۴, ۱۵]. یکی از آن مواد مضر، آکریلامید (۲-پروپن آمید) است. آکریلامید یک ترکیب آلی و بی‌بو با حلالیت بالا در آب، وزن مولکولی ۷۱/۰۸، نقطه ذوب $۸۴/۵ \pm ۰/۳$ درجه سانتی‌گراد و نقطه جوش ۱۳۶ درجه سانتی‌گراد در ۳/۳ کیلو پاسکال / ۲۵ میلی‌متر جیوه) است. آکریلامید بیشتر در غذاهای غنی از کربوهیدرات، طی فرآیندی به نام واکنش میلارد بین کاهش کربوهیدرات‌هایی مانند (گلوکز) و اسیدهای آمینه (به‌ویژه آسپاراژین) تولید می‌شود. این ترکیب شیمیایی کاربردهای صنعتی گسترده‌ای دارد. می‌توان از آن در تصفیه آب و فاضلاب، فرآوری مواد معدنی و فرآوری کاغذ و خمیر استفاده کرد. آکریلامید همچنین در لوازم آرایشی به‌عنوان افزودنی کاربرد دارد [۸, ۱۶, ۱۷].

پس از مصرف مواد حاوی آکریلامید توسط موش‌ها، آکریلامید می‌تواند به‌سرعت از دستگاه گوارش حیوان جذب‌شده و در بافت‌های مختلف حیوانی توزیع شود. عمده‌تأثیرهای دو بیوشیمیایی برای متابولیسم آکریلامید وجود دارد. اول، می‌تواند به N-استیل-S-(۳-آمینو-۳-

اکسوپروپیل) سیستین توسط گلوپتاتین-S-ترانسفراز (GST) متصل شود یا در مسیر دیگری توسط کمپلکس آنزیمی سیتوکروم P450 (CYP450) ممکن است به گلیسیدامید تغییر یابد [۷، ۱۸، ۱۹].

پلی آکریلامید یک پلیمر غیر سمی است که کاربردهای مختلفی در صنعت دارد، اما مونومر آن (آکریلامید) به دلیل خواص سمی‌اش که بر اندام‌های مختلف انسان تأثیر می‌گذارد، معروف است. آکریلامید یک ترکیب سمی بالقوه با طیف گسترده‌ای از عوارض جانبی است. سمیت عصبی یکی از عوارض جانبی اصلی مواجهه با آکریلامید است. اثر نوروپاتیک آن بر انسان و جوندگان به‌خوبی بررسی شده است. آکریلامید تمایز سلول‌های انسانی نوروبلاستوما و گلیوبلاستوم را مهار می‌کند. علائم نوروپاتیک آکریلامید در انسان شامل آتاکسی، ضعف عضلات اسکلتی و کاهش وزن و انحطاط آکسون است. آکریلامید همچنین به‌عنوان یک عامل ژنوتوکسیک و سرطان‌زا توصیف می‌شود. گلیسیدامید به‌عنوان متابولیت اصلی آکریلامید مسئول اثرات سمیت ژنتیکی است. نشان داده شده است که قرار گرفتن DNA در معرض دوزهای مختلف آکریلامید، سرعت بالایی از آسیب DNA را به همراه دارد. برخی از مطالعات همچنین ارتباط بین سرطان سینه و قرار گرفتن در معرض طولانی مدت آکریلامید را پیشنهاد کردند. همچنین مطالعات مختلفی در مورد تأثیر آکریلامید بر روی سیستم ایمنی بدن وجود دارد. آکریلامید تعداد لنفوسیت‌ها را کاهش می‌دهد و منجر به ناهنجاری در غدد لنفاوی، تیموس و طحال می‌شود [۲۰-۲۳]. سطح استاندارد اتحادیه اروپا برای سیب‌زمینی سرخ‌کرده (آماده برای خوردن) ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و برای محصولات مبتنی بر گندم و چاودار ۰/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم است [۲۴].

روش‌های شناسایی آکریلامید در مواد غذایی شامل HPLC-MS/MS (طیف‌سنجی جرمی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا)، LC-ESI-MS/MS (طیف‌سنجی جرمی یونیزاسیون پشت سر هم با کروماتوگرافی مایع) و GC-MS است که GC-MS به دلیل هزینه‌های کمتر، راحتی بیشتر و دقت بالاتر، جزو محبوب‌ترین‌ها بوده است [۸، ۱۸، ۲۰، ۲۳، ۲۵-۲۷].

از آنجایی که میزان مصرف پروتئین‌ها گیاهی ازجمله فلفل آماده‌شده در روغن‌های خوراکی در ایران رو به افزایش است و همچنین به دلیل خطرات احتمالی تشکیل آکریلامید در این ماده غذایی وجود دارد، از این رو انجام تحقیق حاضر ضروری به نظر رسید. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان آکریلامید در فلفل‌های آماده‌شده موجود در فست‌فودهای مختلف شهر تهران و نیز بررسی میزان این آلاینده در سه نوع روغن خام خوراکی پر مصرف با برندهای مختلف با استفاده از روش GC-MS است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌برداری

در این مطالعه از ۳ فست‌فود موجود در تهران نمونه‌های فلفل تهیه و نیز از فروشگاه‌های مواد غذایی ۳ نوع روغن خام رایج شامل روغن‌های آفتابگردان، سویا و کلزا در ۵ برند پرفروش (ایران) انتخاب شدند که نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی انجام شد.

۲-۲- معرف‌ها و ابزار دقیق

از شرکت مرک (آلمان)، معرف‌هایی شامل آکریلامید (خلوص ۹۹/۹٪)، اتانول (درجه آزمایشگاهی)، هیدروژن

استاندارد نیز آماده و به دستگاه GC-MS تزریق شدند. این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی بود و در محل انجام دانشگاه علوم پزشکی تهران و آزمایشگاه همکار سازمان غذا و دارو در تاریخ بهمن ۱۴۰۲ انجام شد.

۲-۴- آماده‌سازی نمونه

هر نمونه به درستی هموژن یا آسیاب شد. یک گرم از نمونه‌های فلافل و روغن وزن شده و ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم (KOH) در اتانول به نمونه‌ها اضافه و سپس به کمک دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالایی جدا شد. پس از آن یک میلی‌لیتر محلول Carrez I و Carrez II به رسوب کربوهیدرات و پروتئین اضافه شد. نمونه‌ها کاملاً مخلوط شدند و سپس مجدداً با کمک سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۶۰ میکرولیتر زانتیدرول و ۲۰۰ میکرولیتر استامید به محلول اضافه شد. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد و سپس ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک به نمونه‌ها اضافه شد که این فرآیند برای تکمیل قسمت مشتق‌سازی انجام شد. سپس ۱ میلی‌لیتر KOH (۲ مولار) و ۲ میلی‌لیتر K_2HPO_4 به محلول نمونه اضافه شد. پس از هم زدن محلول، pH در محدوده ۶/۸-۷/۲ تنظیم شد. محلول با دور ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس فاز بالایی جدا شد. در مرحله نهایی ۴۵۰ میکرولیتر اتانول و ۸۰ میکرولیتر C_2Cl_4 به نمونه محلول اضافه شد، سپس نمونه به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالایی برداشته شد و ۱ میکرولیتر از فاز رسوبی به GC-MS تزریق شد [۲۸].

۲-۵- شرایط CG-MS

فسفات دی پتاسیم، اسیدکلریدریک (HCl ۳۷ درصد)، هیدروکسید پتاسیم، تتراکلر (برای انجام تجزیه و تحلیل GC)، هگزا فروسیناید پتاسیم (carrez I) و استات روی (carrez II)، به دست آمد. از شرکت سیگما آلدریج (ایالات متحده آمریکا)، زانت هیدرول و استامید (خلوص $\leq 99\%$ درصد) خریداری شد. دستگاه GC-MS با کروماتوگرافی گازی Agilent 7890A همراه با آشکارساز انتخابی جرمی Agilent 5975c (MSD inert). ستون یک ستون مویرگی چابک HP-5ms (5% فنیل سیلوکسان / ۹۵% متیل پلی ارگانوسیلوکسان؛ طول: ۳۰ متر $\times$ ۰/۲۵ میلی‌متر؛ df: ۰/۲۵ میکرومتر) بود.

برای تهیه محلول Carrez I، ۱۰/۶ گرم هگزا فروسیناید پتاسیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. محلول Carrez II با مخلوط کردن ۳ میلی‌لیتر اسید استیک با ۲۱/۹ گرم استات روی تهیه شد، سپس حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر تنظیم شد. محلول استاندارد اولیه آکریلامید و استامید (۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در متانول تهیه شد. برای به دست آوردن محلول کاری، محلول استاندارد بالایی با متانول رقیق شد. محلول‌های استوک و کار تا زمان آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۲۸].

۲-۳- حجم نمونه، روش و شرایط بررسی

نمونه برداری به صورت تصادفی از سطح فست فودها (برای نمونه های فلافل) و سوپر مارکت های (برای نمونه های روغن خوراکی) شهر تهران تعیین شدند. ۳ نمونه فلافل فست فودی (به صورت دو بار تکرار) مجموعاً ۶ عدد و ۱۵ نمونه روغن (سه نوع روغن در ۵ برند) به صورت دو بار تکرار مجموعاً ۳۰ عدد انتخاب شدند. مجموع تعداد نمونه های ما ۳۶ عدد بوده است که ۱۲ عدد نمونه کنترل کیفیت و

فرمول $LOD=3.3\sigma/S$

۲:

انحراف استاندارد نسبی (RSD) از طریق تجزیه و تحلیل شش آنالیت آکریلامید تکراری تعیین شد و ۹/۷۲ بود.

۲-۷- تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری توسط بسته آماری SPSS نسخه ۱۸ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. معنی داری آماری با استفاده از آزمون t و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نمونه مستقل (ANOVA) ارزیابی شد.

۳- نتایج

۳-۱- منحنی کالیبراسیون و اعتبارسنجی روش

میران LOQ و LOD به ترتیب $66 \mu\text{g/kg}$ و $20 \mu\text{g/kg}$ بود. میزان بازیابی با اسپاک کردن سه نمونه واقعی آکرل آمید در محدوده $10 \mu\text{g/L}$ تا ۵۰ تعیین شد. میزان بازیابی روش ۹۳٪ بود. منحنی کالیبراسیون بین $20 \mu\text{g/g}$ تا ۲۰۰ با ضریب همبستگی خطی (R^2) ۰/۹۹۷۱ خطی تعیین شد.

هلیوم گاز حامل بود که با سرعت جریان 0.8 mL/min جریان داشت. دمای انژکتور 280°C درجه سانتی گراد، حالت تزریق بدون تقسیم و حجم تزریق $1 \mu\text{L}$ بود. در ادامه، دمای انژکتور روی 280°C درجه سانتی گراد حفظ شد. 100°C درجه سانتی گراد دمای اولیه آون بود که 1 min حفظ شد و سپس سرعت رمپ دما روی 20°C درجه سانتی گراد/دقیقه تا 300°C درجه سانتی گراد با نگهداشتن دما به مدت 20 min تنظیم شد. کل زمان اجرا 21 min بود. زمان ماند استاندارد داخلی و ترکیب هدف به ترتیب $9/9 \text{ min}$ و $10/2$ بود. اندازه گیری آکریلامید در نمونه های انتخاب شده بر اساس حالت نظارت بر یون انتخاب شده (SIM) انجام شد [۲۸].

۲-۶- عملکرد روش

منحنی کالیبراسیون از محلول استاندارد آکریلامید در محدوده ۲۰ تا 400 ng/g در متانول ساخته شد. در این مطالعه حد کمیت (LOQ) و حد تشخیص (LOD) با استفاده از انحراف استاندارد پاسخ (σ) و شیب منحنی کالیبراسیون (S) بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

فرمول ۱:

$$LOQ = 3 LOD$$

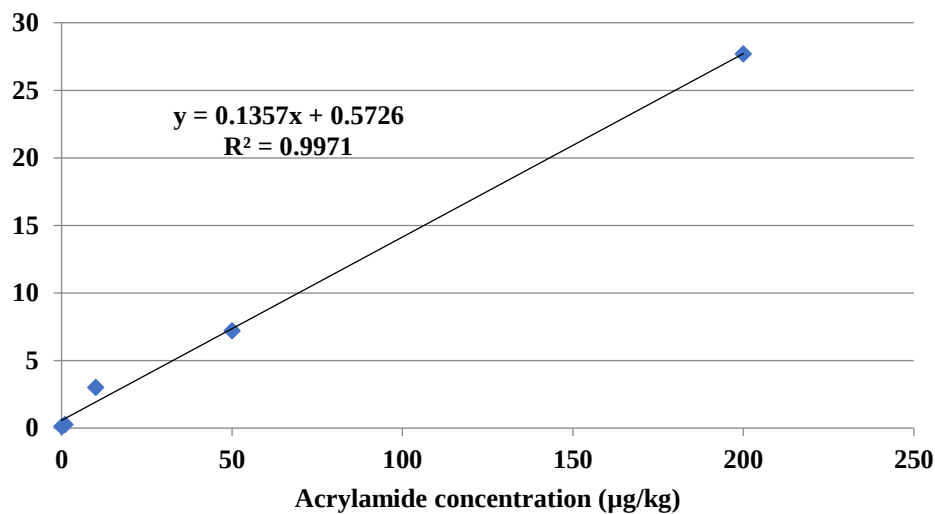


Fig 1- Standard curve for acrylamide concentration

(برای سیب‌زمینی سرخ‌کرده ۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم و برای نان ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم بوده است). از میان سه روغن خام انتخاب‌شده روغن سویا کمترین میزان آکریلامید (0.05 ± 0.01 میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روغن آفتابگردان بالاترین میزان آکریلامید (0.10 ± 0.03 میلی‌گرم بر کیلوگرم) را دارا بودند.

۳-۲- میزان آکریلامید در تمام نمونه‌های روغن خام جدول شماره ۱ میزان آکریلامید را در انواع روغن‌های خام خوراکی رایج نشان می‌دهد. مطابق این جدول میانگین آکریلامید در نمونه‌های روغن برابر 0.08 ± 0.02 میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که پایین‌تر از استاندارد اتحادیه اروپا بود

Table 1. The amount of acrylamide in all crude oil samples (mg/kg)

Crude oil		Mean				
Rapeseed oil		0.08 ± 0.02				
Sunflower oil		0.1 ± 0.03				
Soybean oil		0.05 ± 0.01				
Crude oil	Mean	Median	Minimum	Maximum	Std. Deviation	p value
Statistical analysis of all oil samples	0.08	0.08	0.05	0.10	0.02	0.00

جدول شماره ۲ میزان آکریلامید را در نمونه‌های فلفل آمده شده در ۳ مرکز فست‌فود را نشان می‌دهد. مطابق این جدول میانگین میزان آکریلامید برابر 0.06 ± 0.01 میلی‌گرم بر

۳-۳- میزان آکریلامید در تمام نمونه‌های فلفل فست‌فود

کیلوگرم بوده است که بالاتر از استانداردهای ذکر شده است. پایین ترین میزان (0.32 ± 0.07) میلی گرم بر کیلوگرم) آلودگی از میان نمونه های فست فود مرکز شماره ۱ بالاترین میزان به آکریلامید را دارا بودند. (3.81 ± 0.24) میلی گرم بر کیلوگرم) و مرکز شماره ۲

Table 1. The amount of acrylamide in all fastfood samples (mg/kg)

Fastfood				Mean		
Fastfood 1				3.81 ± 0.24		
Fastfood 2				0.32 ± 0.07		
Fastfood 3				1.26 ± 0.13		
Fastfood	Mean	Median	Minimum	Maximum	Std. Deviation	p value
Statistical analysis of all fastfood samples	1.80	1.26	3.81	0.32	0.56	0.00

۴- بحث

در ابتدای بحث لازم است مقایسه هایی با سایر مطالعات انجام شود:

سیلانی و همکاران [۲۹] میزان آکریلامید را در انواع ناگت مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که روش سرخ کردن سستی تأثیر معنی داری بر افزایش آکریلامید نسبت به روش سرخ کردن صنعتی دارد و همچنین مشخص شد که دما و زمان پخت متفاوت بر افزایش تشکیل آکریلامید تأثیر معنی داری دارد ($p < 0.05$)، اما نوع روغن های خوراکی تأثیر معنی داری نداشتند. بالاترین سطح آکریلامید در ناگت میگو (1.5 ± 0.27) نانوگرم در گرم) که با روغن کلزا و روش پخت سستی (۶ دقیقه در دمای ۲۲۰ درجه سانتی گراد) سرخ شده است، بود. درحالی که کمترین میزان آکریلامید در ناگت مرغ (0.1 ± 0.07) نانوگرم در گرم) است که با روغن ذرت و روش صنعتی سرخ شده است (۳ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد)، بود.

پدرسچی و همکاران میزان آکریلامید را در برش های سیب زمینی بررسی کردند و بیان کردند محدوده شرایط زمان-دمای سرخ کردن: ۷ دقیقه در دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد و ۳/۵ دقیقه در دمای ۱۹۰ درجه سانتی گراد، سطح آکریلامید برش های سیب زمینی از ۵۰۰ به ۴۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم افزایش یافت که یک تفاوت ۹ برابری بود [۳۰].

ماتائوس و همکاران میزان آکریلامید را در سیب زمینی سرخ شده ارزیابی کردند و اظهار داشتند محدوده زمان و دمای سرخ کردن: ۱۰ دقیقه به ترتیب در ۱۷۰ درجه سانتی گراد و ۱۹۰ درجه سانتی گراد، سطح آکریلامید در سیب زمینی سرخ کرده از ۸۰۰ به ۳۷۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم افزایش یافته است که یک تفاوت ۵ برابری بود [۳۱].

کنول و همکاران میزان آکریلامید را در چیپس سیب زمینی اندازه گیری نمودند و اظهار داشتند محدوده شرایط زمانی-دما: به ترتیب ۱/۵، ۴ و ۱۲ دقیقه در دمای ۱۶۰ درجه

سانتی‌گراد (ثابت دما پس از حدود ۱/۵-۲ دقیقه سرخ کردن در دمای اولیه روغن ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد)، سطح آکریلامید در چپس سیب‌زمینی از ۰/۲ به ۱۲ افزایش یافت و سپس کاهش یافت تا ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (پس از ۱۲ دقیقه) [۳۲].

ویلیامز میزان آکریلامید را در سیب‌زمینی سرخ شده بررسی نمودند و اظهار داشتند محدوده زمان و دمای سرخ کردن: ۳ دقیقه در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در دمای ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد، سطح آکریلامید در سیب‌زمینی سرخ‌کرده از سال ۱۹۹۵ به ۷۰۷۹ میکروگرم بر کیلوگرم افزایش یافت که یک تفاوت ۳/۵ برابری بود [۳۳].

رومانی و همکاران میزان آکریلامید را در سیب‌زمینی سرخ شده بررسی نمودند و اظهار داشتند محدوده زمان و دمای سرخ کردن: به ترتیب ۴، ۵، ۷ و ۹ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد، سطح آکریلامید در سیب‌زمینی سرخ‌کرده از ۵۰، ۶۸، ۲۰۸ و ۸۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم افزایش یافت [۳۴].

همچنین برخی از محققان میزان آکریلامید (میکروگرم بر کیلوگرم) را در نان‌های مصرفی مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که میزان آن بسیار متفاوت است به‌طور مثال بیدرمن و همکاران میزان آن را ۵-۱۶ [۳۵]، ال‌زینی و همکاران میزان آن را ۴۰-۹۰ [۳۶]، پوگاجوا و همکاران میزان آن را ۱۰۵-۱۵۲ [۳۷] و ماتهیس و همکاران میزان آن را ۲۷-۳۶ [۳۸] گزارش نمودند. از طرفی برخی از محققان میزان آلودگی آکریلامید در نان‌های تست شده را بالاتر گزارش نمودند مانند کونینگز و همکاران که میزان آن را ۱۴۳۰-۳۰ [۳۹] و نورماندین و همکاران که میزان آن را ۱۰۷-۱۰ [۴۰] گزارش نمودند.

اقوامی و همکاران میزان آکریلامید را در کیک‌های مصرفی با طعم‌های مختلف بررسی نمودند و نتایج آنها نشان داد که حداکثر و حداقل میانگین غلظت آکریلامید در بین نمونه‌ها به ترتیب مربوط به کیک دارچین (۲۱۲/۲۸ نانوگرم در گرم) و نمونه کیک کاکائویی (۱۰/۱۴ نانوگرم در گرم) بود. غلظت آکریلامید برای نمونه‌های بدون طعم، نمونه‌های کیک دارچینی و نمونه‌های کیک کاکائویی به ترتیب ۶۱/۸۶ نانوگرم در گرم، ۱۶۹/۳۸-۲۱۲/۲۸ نانوگرم در گرم و ۶۴/۱۴-۴۴/۱۰ نانوگرم در گرم بود [۲۸].

پایین‌تر بودن میزان آکریلامید در روغن‌های خام می‌تواند به دلایلی چون عدم حرارت بالا حین فرایند روغن‌کشی (آکریلامید معمولاً از راه غلات و طی حرارت بالا ایجاد می‌شود)، عدم وجود کربوهیدرات در روغن‌های خام و غیره بوده باشد؛ و بالاتر بودن میزان آکریلامید در فلافل‌های سرخ شده در فست‌فودها احتمالاً به دلیل استفاده از حرارت بالا، استفاده از روغن‌های مانده یا زیاد استفاده شده و استفاده از مواد اولیه نامرغوب (نخود، آرد و غیره) بوده است [۲۸، ۲۹، ۳۱، ۳۳، ۳۴، ۴۱، ۴۲].

۵- نتیجه‌گیری

هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان آکریلامید در نمونه‌های فلافل‌های موجود در فست‌فودها و نیز روغن‌های خام تولیدی ایران بوده است. میانگین آکریلامید در نمونه‌های روغن برابر 0.02 ± 0.08 میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. از میان سه روغن خام انتخاب‌شده روغن سویا کمترین میزان آکریلامید (0.01 ± 0.05 میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روغن آفتابگردان بالاترین میزان آکریلامید (0.03 ± 0.10 میلی‌گرم

۶- تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از رساله با عنوان «ارزیابی میران آکریلامید در فلافل آماده شده به روش های مختلف پخت (در دماها و روغن های مختلف خوراکی): ارزیابی ریسک سرطان زایی در کودکان و بزرگسالان» در مقطع دکترا در سال ۱۴۰۲ است که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی اجرا شده است.

ملاحظات اخلاقی: نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شامل رضایت آگاهانه، حسن رفتار، عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

بر کیلوگرم) را دارا بودند؛ و نیز میانگین میزان آکریلامید در فلافل ها برابر 0.56 ± 1.80 میلی گرم بر کیلوگرم بود. مطابق نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر میزان میانگین آکریلامید در نمونه های فلافل بالاتر و در نمونه های روغن خام میزان آن پایین تر از استانداردهای اتحادیه اروپا بوده است. مطابق این نتایج، مصرف فلافل می تواند خطراتی برای سلامتی انسان ها داشته باشد. از جمله محدودیت های مطالعه حاضر کمبود منابع مالی بوده است که پیشنهاد می شود در آینده تمامی محصولات آردی و با پایه غلات مورد ارزیابی و سنجش این آلاینده قرار گیرد و استاندارد هم برای آنها در ایران تدوین شود.

۷- منابع

- [1]. Sahebkar, A., Hosseini, M., & Sharifan, A. (2020). Plasma-assisted preservation of breast chicken fillets in essential oils-containing marinades. *Lwt*, 131, 109759.
- [2]. Mousavi, S. A., Nateghi, L., Javanmard Dakheli, M., Ramezan, Y., Piravi-Vanak, Z., Paidari, S., & Mohammadi Nafchi, A. (2022). Effects of incorporation of Chavir ultrasound and maceration extracts on the antioxidant activity and oxidative stability of ordinary virgin olive oil: identification of volatile organic compounds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(5), 4236-4250.
- [3]. Azarashkan, Z., Motamedzadegan, A., Ghorbani-HasanSarai, A., Biparva, P., & Rahaiee, S. (2022). Investigation of the physicochemical, antioxidant, rheological, and sensory properties of ricotta cheese enriched with free and nano-encapsulated broccoli sprout extract. *Food Science & Nutrition*, 10(11), 4059-4072.
- [4]. Gunstone, F. D. (2013). Composition and properties of edible oils. *Edible oil processing*, 1-39.
- [5]. Hamm, W., Hamilton, R. J., & Calliauw, G. (2013). *Edible oil processing*. Wiley Online Library.
- [6]. Al-Asmar, A., Giosafatto, C. V. L., Panzella, L., & Mariniello, L. (2019). The effect of transglutaminase to improve the quality of either traditional or pectin-coated falafel (Fried Middle Eastern Food). *Coatings*, 9(5), 331.
- [7]. Fikry, M., Khalifa, I., Sami, R., Khojah, E., Ismail, K. A., & Dabbour, M. (2021). Optimization of the frying temperature and time for preparation of healthy falafel using air frying technology. *Foods*, 10(11), 2567.
- [8]. Raviv, Y. (2015). *Falafel nation: Cuisine and the making of national identity in Israel*. U of Nebraska Press.
- [9]. Azarashkan, Z., Motamedzadegan, A., Ghorbani-HasanSarai, A., Rahaiee, S., & Biparva, P. (2022). Improvement of the stability and release of sulforaphane-enriched broccoli sprout extract nanoliposomes by co-encapsulation into basil seed gum. *Food and Bioprocess Technology*, 15(7), 1573-1587.
- [10]. Zabihpour, T., Shahidi, S., Karimi Maleh, H., & Ghorbani-HasanSarai, A. (2020).

- MnFe₂O₄/1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate modified carbon paste electrode: an amplified food sensor for determination of gallic acid in the presence of ferulic acid as two phenolic antioxidants. *Eurasian Chem. Commun*, 2(3), 362-373.
- [11]. Nezhad, H. M., Shahidi, S.-A., & Bijad, M. (2018). Fabrication of a nanostructure voltammetric sensor for carmoisine analysis as a food dye additive. *Anal Bioanal Electrochem*, 10, 220-229.
- [12]. Sharafi, S., & Nateghi, L. (2020). Optimization of gamma-aminobutyric acid production by probiotic bacteria through response surface methodology. *Iranian journal of microbiology*, 12(6), 584.
- [13]. Mohammadian, M., Moghaddam, A. D., Sharifan, A., Dabaghi, P & ,Hadi, S. (2021). Structural, physico-mechanical, and bio-functional properties of whey protein isolate-based edible films as affected by enriching with nettle (*Urtica dioica* L.) leaf extract. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(5), 4051-4060.
- [14]. Gharehyakheh, S., Elhami Rad, A. H., Nateghi, L., & Varmira, K. (2019). Production of GABA-enriched honey syrup using *Lactobacillus* bacteria isolated from honey bee stomach. *Journal of food processing and preservation*, 43(8), e14054.
- [15]. Najjar-Tabrizi, R., Javadi, A., Sharifan, A., Chew, K. W., Lay, C.-H., Show, P. L., Jafarizadeh-Malmiri, H., & Berenjian, A. (2020). Hydrothermally extraction of saponin from *Acanthophyllum glandulosum* root- Physico-chemical characteristics and antibacterial activity evaluation. *Biotechnology Reports*, 27, e00507.
- [16]. Bent, G.-A., Maragh, P., & Dasgupta, T. (2012). Acrylamide in Caribbean foods- residual levels and their relation to reducing sugar and asparagine content. *Food Chemistry*, 133(2), 451-457.
- [17]. Razia, S., Bertrand, M., Klaus, V., & Meinolf, G. (۲۰۱۶). Investigation of acrylamide levels in branded biscuits, cakes and potato chips commonly consumed in Pakistan. *International Food Research Journal*, 23(5).
- [18]. Cheng, K.-W., Zeng, X., Tang, Y. S., Wu, J.-J., Liu, Z., Sze, K.-H., Chu, I. K., Chen, F., & Wang, M. (2009). Inhibitory mechanism of naringenin against carcinogenic acrylamide formation and nonenzymatic browning in Maillard model reactions. *Chemical research in toxicology*, 22(8), 1483-1489.
- [19]. Granby, K., Nielsen, N. J., Hedegaard, R. V., Christensen, T., Kann, M., & Skibsted, L. H. (2008). Acrylamide-asparagine relationship in baked/toasted wheat and rye breads. *Food Additives and Contaminants*, 25(8), 921-929.
- [20]. Cheng, K.-W., Shi, J.-J., Ou, S.-Y., Wang, M., & Jiang, Y. (2010). Effects of fruit extracts on the formation of acrylamide in model reactions and fried potato crisps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 309-312.
- [21]. Hedegaard, R. V., Granby, K., Frandsen, H., Thygesen, J., & Skibsted, L. H. (2008). Acrylamide in bread. Effect of prooxidants and antioxidants. *European Food Research and Technology*, 227, 519-525.
- [22]. Rufian-Henares, J. A., Arribas-Lorenzo, G., & Morales, F. J. (2007). Acrylamide content of selected Spanish foods: survey of biscuits and bread derivatives. *Food Additives and Contaminants*, 24(4), 343-350.
- [23]. Svensson, K., Abramsson, L., Becker, W., Glynn, A., Hellenäs, K.-E., Lind, Y., & Rosen, J. (2003). Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food and Chemical Toxicology*, 41(11), 1581-158.
- [24]. EU, C. R. (2017). Establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food, 2017/2158 of 20 November 2017. *Official Journal of the European Union*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj>
- [25]. Murkovic, M. (2004). Acrylamide in Austrian foods. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61(1-2):161-67.
- [26]. Abdi ,R., Ghorbani-HasanSaraei, A., Karimi-Maleh, H., Raeisi, S. N., & Karimi, F. (2020). Determining caffeic acid in food samples using a voltammetric sensor amplified by Fe₃O₄ nanoparticles and room temperature ionic liquid. *International Journal of Electrochemical Science*, 15(3), 2539-2548.
- [27]. Behrouzifar, F., Shahidi, S.-A., Chekin, F., Hosseini, S., & Ghorbani-HasanSaraei, A. (2021). Colorimetric assay based on horseradish peroxidase/reduced graphene oxide hybrid for sensitive detection of hydrogen peroxide in beverages.

- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 257, 119761.
- [28]. Aghvami, M., Mohammadi, A., Khaniki, G. J., Ahmadi, M., Moazzen, M., Arabameri, M., & Shariatifar, N. (2023). Investigation of cocoa and cinnamon effect on acrylamide formation in cakes production using GC/MS method: A risk assessment study. *Food Chemistry: X*, 18, 100629.
- [29]. Seilani, F., Shariatifar, N., Nazmara, S., Khaniki, G. J., Sadighara, P., & Arabameri, M. (2021). The analysis and probabilistic health risk assessment of acrylamide level in commercial nuggets samples marketed in Iran: effect of two different cooking methods. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19, 465-473.
- [30]. Pedreschi, F., Kaack, K., & Granby, K. (2004). Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying. *LWT-Food Science and Technology*, 37(6), 679-685.
- [31]. Matthäus, B., Haase, N. U., & Vosmann, K. (2004). Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(11), 793-801.
- [32]. Knol, J. J., Viklund, G. Å., Linssen, J. P., Sjöholm, I. M., Skog, K. I., & van Boekel, M. A. (2009). Kinetic modelling: A tool to predict the formation of acrylamide in potato crisps. *Food Chemistry*, 113(1), 103-109.
- [33]. Williams, J. (2005). Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps. *Food Chemistry*, 90(4), 875-881.
- [34]. Romani, S., Bacchiocca, M., Rocculi, P., & Dalla Rosa, M. (2008). Effect of frying time on acrylamide content and quality aspects of French fries. *European Food Research and Technology*, 226, 555-560.
- [35]. Biedermann, M., Grundböck, F., Fiselier, K., Biedermann, S., Bürgi, C., & Grob, K. (2010). Acrylamide monitoring in Switzerland, 2007–2009: results and conclusions. *Food Additives and Contaminants*, 27(10), 1352-1362.
- [36]. El-Ziney, M., Al-Turki, A., & Tawfik, M. (2009). Acrylamide status in selected traditional Saudi foods and infant milk and foods with estimation of daily exposure. *American Journal of Food Technology*, 4(5):177-91.
- [37]. Pugajeva, I., Zumbure, L., Melngaile, A., & Bartkevics, V. (2014). Determination of acrylamide levels in selected foods in Latvia and assessment of the population intake. *Foodbalt*, 111-116.
- [38]. Matthys, C., Bilau, M., Govaert, Y., Moons, E., De Henauw, S., & Willems, J. (2005). Risk assessment of dietary acrylamide intake in Flemish adolescents. *Food and Chemical Toxicology*, 43(2), 271-278.
- [39]. Konings, E. J., Baars, A., van Klaveren, J. D., Spanjer, M., Rensen, P., Hiemstra, M., Van Kooij, J., & Peters, P. (2003). Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. *Food and Chemical Toxicology*, 41(11), 1569-1579.
- [40]. Normandin, L., Bouchard, M., Ayotte, P., Blanchet, C., Becalski, A., Bonvalot, Y., Phaneuf, D., Lapointe, C., Gagné, M., & Courteau, M. (2013). Dietary exposure to acrylamide in adolescents from a Canadian urban center. *Food and Chemical Toxicology*, 57:75-83.
- [41]. Boyaci Gunduz, C. P. (2023). Formulation and processing strategies to reduce acrylamide in thermally processed cereal-based foods. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(13), 6272.
- [42]. Shahbazi, R., Adergani, B. A., Shariatifar, N., Jafari, K., Taheri, E., Fathabad, A. E., Saatloo, N. V., Aghaee, E. M., Sadighara, P., & Khaneghah, A. M. (2022). Assessment of food additives impact on acrylamide formation in popcorn supplied in Tehran, Iran: a risk assessment study. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 14 (4)



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of the amount of acrylamide in various edible oils and falafels available in Tehran city fast foods

Fahimeh Faraji¹, Seyed-Ahmad Shahidi^{2*}, Nabi Shariatifar³, Mohammad Ahmadi¹

1- Department of Food Hygiene, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

2- Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

3-Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2024/7/21 Accepted:2024/9/20	Healthy and pollution-free foods are very effective in maintaining body health. Among the foods that need to be monitored are falafel and edible oils that can be contaminated with dangerous substances such as acrylamide. In this study, falafel samples were prepared from 3 fast food restaurants in Tehran, and 3 types of common crude oils including sunflower, soybean and canola oils were selected from 5 top-selling brands, and sampling was done randomly. After preparation, these pollutants were evaluated by GC-MS. The average acrylamide in oil samples was 0.08 ± 0.02 mg/kg, which was lower than the European Union standard ($500 \mu\text{g/kg}$ for fried potatoes and $100 \mu\text{g/kg}$ for bread). Among the three crude oils selected, soybean oil had the lowest amount of acrylamide (0.05 ± 0.01 mg/kg) and sunflower oil had the highest amount of acrylamide (0.10 ± 0.03 mg/kg). Also, the average amount of acrylamide in falafel samples was 1.80 ± 0.56 mg/kg, which is higher than the mentioned standards. According to the obtained results and since the amount of acrylamide contamination in the falafels available in fast food restaurants is slightly higher than the standards, it is necessary to carry out more monitoring in this field.
Keywords: Acrylamide, Edible oils, Falafel, Fast food, Food safety.	
DOI: 10.22034/FSCT.22.158.201. *Corresponding Author E- sashahidy@yahoo.com, sa.shahidi@iau.ac.ir	



غربالگری فاکتورهای موثر در رشد باکتری *Paenibacillus polymyxa* با استفاده از طرح آزمایشی پلاکت-

برمن

علیرضا وسیعی^۱، محبوبه سرابی جماب^{۲*}، فرشته فلاح^۳، سید علی مرتضوی^۳

۱-گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۲-گروه زیست فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۳-گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	باکتری <i>Paenibacillus polymyxa</i> از جمله میکروارگانیسم های است که توانایی تولید آگزوپلی ساکاریدهای خارج سلولی و نیز آنتی بیوتیک ها را دارا می باشد. عوامل متعددی از جمله محتوای محیط کشت، منبع کربن و نیتروژن، pH، دما، سرعت هوا و شرایط کشت بر رشد و تولید توده سلولی بالاتر و نیز تولید متابولیت های میکروبی تأثیر دارند. هدف از این مطالعه بررسی میزان رشد باکتری <i>P. polymyxa</i> در محیط کشت حاوی ملاس و همچنین غربالگری ۵ جزء محیط کشت و ۴ فاکتور شرایط تخمیر با استفاده از روش پلاکت-برمن جهت به حداکثر رساندن میزان تولید توده سلولی بود. نتایج نشان داد از بین متغیرهای مورد بررسی بریکس ملاس مورد استفاده، زمان، درصد تلقیح، میزان سولفات آمونیوم، سرعت هم زدن، میزان گلوکز و اوره به صورت معادله درجه اول اثر مثبت معنی داری بر رشد باکتری و تولید زیست توده دارد که از این میان اثر بریکس ملاس مورد استفاده بیش از سایر متغیرها است؛ این درحالی است که pH و میزان عناصر کم مصرف مورد استفاده اثر منفی بر رشد سلولی داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد محیط کشت برپایه ملاس می تواند به عنوان یک گزینه ارزان قیمت و مناسب برای رشد باکتری <i>P. polymyxa</i> مورد استفاده قرار گیرد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۱۴	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۲۱	
کلمات کلیدی:	
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	
رشد سلولی،	
پلاکت برمن	
DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213.	
* مسئول مکاتبات:	
m.sarabi@rifst.ac.ir	

۱-مقدمه

Paenibacillus polymyxa یک باکتری گرم مثبت متعلق به جنس *Paenibacillus* است. *Paenibacillus* ها باکتری های بی هوازی اختیاری و تشکیل دهنده آندوسپورانده که در ابتدا در جنس *Bacillus* قرار گرفته و سپس در سال ۱۹۹۳ به عنوان یک جنس جداگانه طبقه بندی شدند. *Paenibacillus polymyxa* که به طور طبیعی در خاک یافت می شود، به خاطر توانایی هایش در تولید مواد متابولیکی مفید مانند آنتی بیوتیک ها و پلی ساکاریدها شناخته شده است [۱]. همچنین، این ارگانیسم به عنوان یک عامل بیوکنترلی و کاهنده آفات در کشاورزی مورد توجه قرار گرفته است. *P. polymyxa* قادر است به تثبیت نیتروژن و بهبود کیفیت خاک کمک کند و به عنوان یک محرک رشد گیاهی عمل کند. این خاصیت ها باعث شده است که بررسی عوامل مؤثر بر رشد این باکتری از اهمیت بالایی برخوردار باشد [۲-۴].

عوامل مختلفی نظیر منابع کربن، نیتروژن، مواد معدنی و شرایط محیطی همچون دما و pH تأثیر بسزایی در رشد باکتری ها دارند. منابع کربن مختلف مانند ساکارز، گلوکز و نشاسته برای رشد میکروبی استفاده می شوند و نسبت کربن به نیتروژن (C:N) در محیط های کشت برای تولید مقدار بالای متابولیت ها اهمیت دارد [۵، ۶]. نیتروژن نیز به عنوان یکی از عناصر ضروری در رشد میکروارگانیسم ها شناخته می شود و تأثیر آن به ویژه در هنگام ایجاد گرسنگی و در افزایش راندمان تولید پس از مرحله رشد بیشتر مشخص می گردد. علاوه بر این، برخی از مواد معدنی مانند فسفر، گوگرد و آهن کوفاکتورهای مهمی برای آنزیم ها هستند و در متابولیسم ثانویه نقش اساسی ایفا می کنند. دما و pH نیز

از جمله عوامل محیطی مهمی هستند که تأثیر زیادی بر رشد میکروارگانیسم ها و تولید متابولیت ها دارند [۷، ۸].

با توجه به هزینه های بالای تولید متابولیت ها، استفاده از بسترهای ارزان قیمت و مواد جانبی صنایع غذایی و کشاورزی نظیر ملاس به عنوان منبع کربن مورد توجه قرار گرفته است. ملاس از محصولات جانبی کارخانه های تولید قند و شکر است و در پزشکی، صنعت، کشاورزی به عنوان ماده اولیه کاربرد دارد [۹، ۱۰]. ملاس چغندر قند محلولی از شکر، مواد آلی و معدنی در آب با ماده خشک ۷۷/۷۴ درصد (وزنی/وزنی) است. قند کل (عمدتاً ساکارز) تقریباً ۶۲/۴۸ درصد، خاکستر ۱۱/۹ درصد و کل ترکیبات حاوی نیتروژن (عمدتاً بتائین و اسید گلوتامیک) ۱۳/۱۲ درصد را تشکیل می دهند. استفاده از ملاس در کشت باکتری ها همچنین به دلیل هزینه پایین و دسترسی راحت به این ماده، به ویژه در کشورهای در حال توسعه، بسیار جذاب است. این ماده حاوی مقادیر قابل توجهی قند، پروتئین، و مواد معدنی است که می تواند به عنوان منبع انرژی و مواد مغذی برای باکتری ها عمل کند. وجود اسیدهای آمینه، ویتامین ها و عناصر کمیاب در ملاس، آن را به یک محیط کشت غنی تبدیل می کند که می تواند رشد باکتری ها را تسهیل کند [۱۱، ۱۲].

روش پلاکت-برمن یک تکنیک آزمایشی است که می تواند برای غربالگری و شناسایی فاکتورهای مؤثر در رشد میکروارگانیسم ها به کار می رود. استفاده از روش پلاکت-برمن به محققان کمک می کند تا به شکل نظام مند و برنامه ریزی شده، عوامل مؤثر در رشد میکروارگانیسم ها را بررسی کرده و به دلنش بیشتری در مورد بیولوژی

به منظور فعال‌سازی میکروارگانیسم، ابتدا باکتری *P. polymyxa* PTCC 1021 لیوفلیزه که از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران خریداری شده بود، در شرایط استریل به محیط کشت تریپتکاز سوی براث منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میکروارگانیسم فعال به سطح محیط کشت تریپتکاز سوی آگار منتقل و گرمخانه‌گذاری مشابه شرایط قبلی انجام گردید (شکل ۱). از کلنی‌های بدست آمده در محیط کشت مذکور به منظور انجام فرایند تخمیر استفاده شد [۱۵].

ارگانیسم‌ها دست یابند این داده‌ها می‌توانند به پژوهشگران کمک کنند تا مشخص کنند که کدام شرایط و فاکتورها تأثیر بیشتری بر رشد باکتری دارند و بهینه‌سازی شرایط کشت را ممکن سازند. [۱۳، ۱۴].

با توجه به توضیحات فوق‌الذکر، هدف اصلی این مطالعه، بررسی اثر فاکتورهای مختلف (ملاس، گلوکز، سولفات آمونیوم، اوره، ^1TES ، pH، زمان، هم‌زدن و میزان تلقیح) بر رشد باکتری *P. polymyxa* با استفاده از تکنیک پلاکت-برمن است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- فعال‌سازی میکروارگانیسم

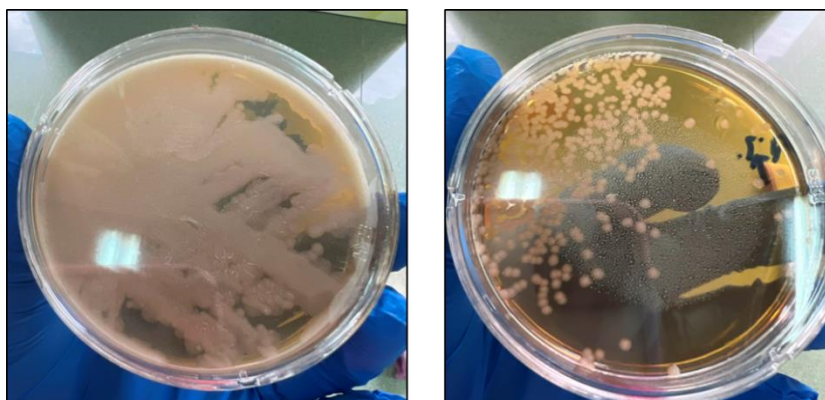


Fig. 1- *P. polymyxa* activated on the basic culture medium.

فواصل زمانی مختلف طی ۶ روز متوالی اندازه‌گیری و منحنی رشد باکتری رسم شد [۱۶].

محیط کشت پایه تخمیر^۲ شامل ۵۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲ گرم بر لیتر مونوپتاسیم فسفات، ۰/۵ گرم بر لیتر دی‌پتاسیم فسفات، ۱ گرم بر لیتر کلرید آهن ۶ آب، ۱ گرم بر لیتر کلرید منگنز ۴ آب، ۱ گرم بر لیتر

۲-۲- رسم منحنی رشد باکتری

پس از فعال‌سازی اولیه میکروارگانیسم در محیط تریپتکاز سوی براث، سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت پایه تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار گرمخانه‌گذاری گردید. تعداد کلنی باکتری در

2-Fermentation culture

1-Trace Element Solution

کلرید کلسیم ۲ آبه، ۰/۵ گرم بر لیتر سولفات منیزوم ۷ آبه و ۱ گرم بر لیتر کلرید سدیم بود [۱۶].

۲-۳- غربالگری فاکتورهای مؤثر در رشد با استفاده از طرح آزمایشی پلاکت-برمن

با توجه به اهمیت فاکتورهای مختلف رشد بر افزایش توده سلولی غربالگری فاکتورهای مؤثر در رشد توده سلولی، براساس ۵ جزء محیط کشت شامل ملاس (بریکس)، گلوکز (درصد)، سولفات آمونیوم (گرم در لیتر)، اوره (گرم در لیتر) و TES^۳ (حاوی روی (II) کلرید، منگنر (II) کلرید ۴ آبه، نیکل (II) کلرید ۶ آبه، مس (II) کلرید ۴ آبه، کبالت (II) کلرید ۶ آبه و سدیم مولیبدات ۲ آبه) (میکروگرم در لیتر) و ۴ پارامتر شرایط تخمیر شامل pH، زمان (ساعت)، هم‌زدن (دور در دقیقه) و میزان تلقیح (درصد) بر اساس طرح آزمایشی پلاکت-برمن با استفاده از نرم افزار آماری (Design-Expert 7.0.0 Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) انجام شد. این متغیرها بر اساس بررسی تحقیقات گذشته و پیش تیمارهای انجام شده انتخاب و در قالب یک ماتریس با ۱۲ آزمایش طراحی شدند [۱۷].

۲-۴- اندازه‌گیری توده سلولی

پس از پایان دوره تخمیر، محیط کشت میکروبی در ۸۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ محیط کشت تخمیر، توده سلولی به دست آمده با سود ۲ مولار به صورت سوسپانسیون در آمده و به مدت یک ساعت روی شیکر قرار گرفت و سپس، مجدد

سانتریفیوژ گردید. پلت به دست آمده در این مرحله به عنوان غلظت توده سلولی بر اساس وزن مرطوب و خشک (بر حسب گرم در لیتر) محاسبه شد [۱۸].

۲-۵- تجزیه تحلیل آماری

غربالگری اولیه جهت تولید بیومس سلولی براساس ۴ جزء محیط کشت و ۵ پارامتر شرایط تخمیر در شیکرفلاسک با استفاده از نرم‌افزار Design-Expert 7.0.0 Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA براساس آزمون پلاکت-برمن در قالب یک ماتریس با ۱۲ آزمایش انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آنالیز منحنی رشد باکتری *Paenibacillus polymyxa*

به‌دست آوردن منحنی رشد میکروبی، اطلاعات متعددی راجع به مراحل فازی رشد میکروارگانیسم مانند زمان ورود به فاز لگاریتمی، طول مدت این فاز، زمان ورود به فاز سکون، طول مدت فاز سکون و زمان شروع فاز مرگ را در اختیار قرار می‌دهد. لذا می‌توان برحسب براساس تجزیه و تحلیل منحنی رشد میکروبی، فرایند کشت را در زمان مناسب متوقف و محصول را برداشت نمود.

براین اساس رشد *P. polymyxa* در محیط کشت پایه مورد بررسی قرار گرفت و فازهای رشد با توجه به نتایج به‌دست آمده رسم گردید (شکل ۲).

همان‌طور که در منحنی رشد شکل ۲ مشاهده می‌شود، در طی ۱۲ و ۲۴ ساعت اول تعداد باکتری *P. polymyxa* به

ترتیب به حدود ۳ و ۷ سیکل لگاریتمی رسید. جوان بودن سوسپانسیون میکروبی تلقیحی و توانایی باکتری در متابولیزه نمودن مشتقات کربنی و نیتروژنی در سرعت خروج از فاز تأخیری^۴ بسیار حائز اهمیت می‌باشند. کوتاه بودن زمان رسیدن میکروارگانیسم به فاز لگاریتمی و افزایش حداکثری رشد از فاکتورهای بسیار مهم در بازده تولید زیستی در مقایسه صنعتی بوده، به‌طوری که تعداد دفعات فرایند تولید را افزایش داده و بهره‌وری تخمیر را در واحد حجم افزایش می‌دهد [۱۹]. فاز لگاریتمی تا روز سوم ادامه یافته و سپس فاز سکون^۵ آغاز گردید؛ به عبارتی دیگر ماکزیمم رشد در محیط پایه در زمان ۷۲ ساعت بدست آمده است. افزایش فعالیت باکتری *P. polymyxa* تا روز سوم محیط را با کاهش منابع غذایی و ریز مغذی روبرو می‌نماید؛ همچنین در روز سوم با ترشح و فعال شدن آنزیم‌های هیدرولیزکننده تخریب سلولی شروع می‌شود؛ لذا همراه با رشد سلولی، مرگ سلولی نیز رخ داده و به این ترتیب فاز سکون شروع می‌شود. هرچند اثر دما و فاکتورهای محیطی نظیر pH نیز می‌تواند بر آغاز فاز سکون تأثیر گذاشته و تولید توده سلولی را با کاهش روبرو سازد [۲۰]. براساس نتایج به‌دست آمده از منحنی رشد باکتری *P. polymyxa* در محیط کشت پایه، باکتری پس از ۱۲۰ ساعت (پس از روز پنجم) وارد فاز مرگ خود گردیده است.

Lee و همکاران (۲۰۲۲) منحنی رشد دو نوع واریته *P. polymyxa* E681 جداشده از ریشه جو زمستانه را که در

محیط کشت سوی تریپتیک براث^۶ تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته تحت شرایط تکان دادن در ۱۸۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شده بود ارزیابی کردند. شمارش تعداد میکروارگانیسم هر ۲۴ ساعت انجام شد. بیشترین میزان رشد در هر دو واریته پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری مشاهده شد که به بیش از ۸ سیکل لگاریتمی رسید. در خصوص واریته نوع B تا روز چهارم میزان میکروارگانیسم به حدود ۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافت ولی پس از آن مجدداً میکروارگانیسم رشد نمود و تا روز هفتم به حدود ۷ سیکل لگاریتمی رسید؛ درحالی که روند کاهش می‌زان رشد واریته F تا روز هفتم همچنان ادامه یافت؛ به‌طوری که در آخرین روز نگهداری به حدود ۴ سیکل لگاریتمی رسید [۲۱]. Zhao و همکاران (۲۰۲۴) *Paenibacillus polymyxa* B7 را از شلتوک برنج جداسازی نموده و با بررسی جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر، مراحل رشد میکروارگانیسم شناسایی شده را بررسی نمودند. فاز لگاریتمی سویه پس از ۴ ساعت آغاز شد و تا ۱۴ ساعت ادامه یافت [۲۲]. Grinev و همکاران (۲۰۲۰) به منظور تولید آگروپلی‌ساکارید از گونه *P. polymyxa* 92 از محیط کشت‌های حاوی ۳ درصد ساکارز، گلوکز یا فروکتوز استفاده نمودند. حداکثر غلظت سلولی (حدود 10^8 cfu/ml) پس از ۴۸ ساعت رشد و در محیط حاوی ۳ درصد ساکارز، مشاهده شد.

6 -Soy Tryptic Broth

4 -Lag phase

5 -Stationery Phase

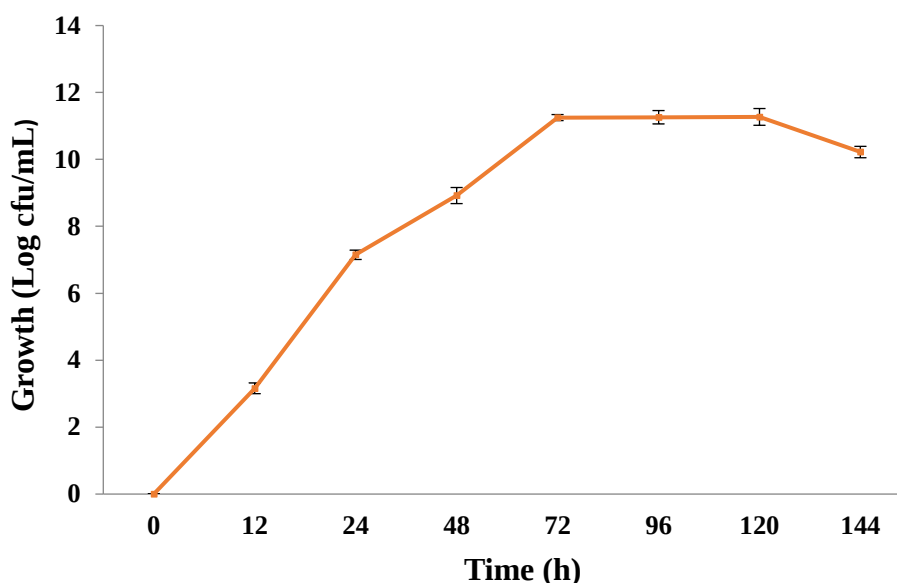


Fig. 2- Growth curve of *P. polymyxa* bacteria in basic culture medium.

متغیرها بر اساس تحقیقات گذشته و پیش تیمارهای انجام شده انتخاب و در قالب یک ماتریس با ۱۲ آزمایش طراحی شد. متغیرهای مستقل شامل pH، سرعت چرخش (دور در دقیقه)، زمان تخمیر (ساعت)، درصد تلقیح میکروارگانیسم، بریکس ملاس، میزان آمونیوم سولفات (گرم در لیتر)، میزان اوره (گرم در لیتر) میزان گلوکز مورد استفاده (درصد) و محلولی از عناصر کم‌مقدار (میکرولیتر در لیتر) بود. ماتریکس پلاکت-برمن به منظور ارزیابی تولید توده سلولی باکتری و نیز نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان بیومس تولیدی در جدول ۱ نشان داده شده است.

۳-۲ غربالگری عوامل مؤثر بر رشد باکتری *P. polymyxa*

در پژوهش حاضر طرح غربالگری براساس روش پلاکت-برمن، به منظور شناسایی متغیرهای مؤثر بر رشد در محیط ملاس انجام شد. این روش به‌ویژه زمانی مفید است که تعداد زیادی فاکتور (متغیر) بالقوه وجود دارد و تصمیم‌گیری و انتخاب آن‌ها برای طراحی آزمایش مشکل است. در این روش با کمترین تعداد آزمایش اطلاعات اولیه و مفیدی از سیستم به‌دست می‌آید که برای مراحل بعدی طراحی بسیار کارایی دارند [۲۳].

Table 1. Plackett-burman matrix to evaluate cell mass production

No.	TES (μL/L)	Time (h)	Glucose (%)	Inoculum (%)	Urea (g/L)	Ammonium sulfate (g/L)	Mollases (Bx)	Rotation (rpm)	pH	Wet Biomass (g/L)a	Dry Biomass (g/L)
	J	H	G	F	E	D	C	B	A		
1	1000	120	12	1	3	3	5	200	5	5.15	1.18
2	1000	120	2	10	1.5	1.5	5	200	5	6.13	1.19
3	100	72	2	1	1.5	1.5	5	100	5	5.56	1.42
4	1000	72	12	10	1.5	3	5	100	7	7.90	1.89
5	1000	120	2	10	3	1.5	25	100	7	17.78	4.35
6	100	72	12	10	3	1.5	25	200	5	14.03	3.68

7	1000	72	12	1	1.5	1.5	25	200	7	10.44	2.59
8	100	72	2	10	3	3	5	200	7	6.08	1.50
9	10000	72	2	1	3	3	25	100	5	12.08	3.08
10	100	120	12	1	3	1.5	5	100	7	7.12	1.73
11	100	120	2	1	1.5	3	25	200	7	11.45	2.75
12	100	120	12	10	1.5	3	25	100	5	12.46	3.19

باشد. مدت زمان ناکافی می‌تواند منجر به تولید نامناسب یا ضعیف و عدم تکمیل فرایند تخمیر شود. همچنین درصد میکروارگانسیم‌هایی که به فرایند تخمیر یا سوسپانسیون اضافه می‌شوند، تاثیر مستقیمی بر روی میزان زیست‌توده تولیدی خواهد داشت. درصد مناسب تلقیح می‌تواند باعث افزایش تولید شود. با توجه به نتایج بدست آمده اثر بریکس یا سنجش غلظت قندهای محلول مشخص می‌گردد و در اینجا مستقیماً به بررسی غلظت ملاس و تاثیر آن بر روی فرایند اشاره دارد. ملاس منبع قند برای میکروارگانسیم‌هاست و غلظت مناسب آن به همراه گلوکز به عنوان قند اصلی فرایند می‌تواند موجب افزایش تولید زیست‌توده گردد. در کنار این عوامل منابع نیتروژنی مانند اوره و سولفات آمونیوم نیز می‌توانند بر میزان توده زیستی اثرگذار باشند. به منظور مطالعه دقیق اثر هر فاکتور و کمی کردن آن و همچنین سنجیدن ارزش پاسخ‌ها، آنالیز و بررسی پاسخ‌ها، مطالعه جدول آنالیز واریانس آن‌ها ضروری است. معنی‌دار بودن معادله مدل چند جمله‌ای از نظر آماری با آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی شد. آنالیز واریانس و در اصل ضریب تغییرات اثرات متغیرها در تعیین پارامترهای مؤثر و غیر مؤثر را برای مدل‌های مربوط به پاسخ نشان می‌دهد.

جدول ۲ آنالیز واریانس فاکتورهای اولیه مورد استفاده در غربالگری را نشان می‌دهد. مدل بدست آمده بر اساس ارزیابی فاکتورهای مستقل بر میزان تولید زیست‌توده معنی‌دار بوده و با توجه به آن‌که ضریب تبیین در حدود ۰/۹ می‌باشد، مدل برازش‌شده مناسب ارزیابی می‌شود. جهت تعیین روند تغییرات تولید بیومس بررسی اثر هر یک از متغیرهای مستقل در ابتدا نیاز به تعیین مناسب‌ترین مدل جهت برازش داده‌های آزمون می‌باشد. از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون عدم برازش آن معنی‌دار نبوده و آزمون برازش معنی‌دار باشد. براساس ارزش p بدست آمده برای هر فاکتور در بررسی تاثیر عوامل مختلف بر میزان تولید زیست‌توده، مشخص می‌شود که در میان فاکتورهای مورد بررسی اثر دور همزن، زمان فرایند تخمیر و درصد تلقیح در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار است. پس از آن ترم‌های بریکس ملاس، درصد گلوکز مورد استفاده، میزان اوره و آمونیوم سولفات مورد استفاده حائز اهمیت می‌باشند. دور شیکر به تاثیر سرعت و نوع هم زدن در فرایند تخمیر اشاره دارد که می‌تواند به توزیع یکنواخت مواد مغذی و بهبود شرایط رشد سویه‌های میکروبی کمک کند. زمان لازم برای تخمیر نیز می‌تواند بر روی تولید زیست‌توده مؤثر

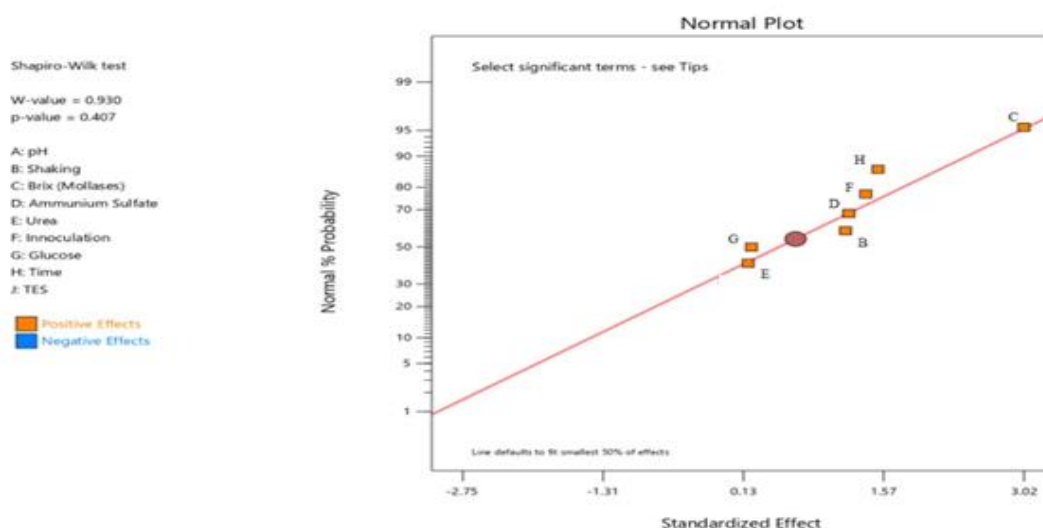
Table 2. Variance analysis of variables influencing the growth of *P. polymyxa* based on the plackett–burman designs

Source	Sum of Squares	Mean Square	Mean Square	F value	P value	
Model	84.19	9	8.42	0.716	0.0435	Significant

pH (A)	12.61	1	12.61	1.07	0.1488
Shaker (B)	0.0075	1	0.0075	0.0006	0.0098
Mollases Bx (C)	8.27	1	8.27	0.0703	0.0505
Ammonium sulfate (D)	0.5689	1	0.5689	0.0484	0.0682
Urea (E)	9.39	1	9.39	0.0798	0.0535
Inoculum (F)	2.88	1	2.88	0.0244	0.0307
Glucose (G)	9.68	1	9.68	0.0823	0.0530
Time (H)	6.21	1	6.24	0.0531	0.0409
TES (J)	2.72	1	2.72	0.0231	0.714
Residue	11.76	1	11.76		
Coefficient					0.887
Coefficient Variation					14.52

به صورت معادله درجه اول اثر مثبت معنی داری بر رشد باکتری و تولید زیست توده دارد که از این میان اثر بریکس ملاس مورد استفاده بیش از سایر متغیرها است؛ این درحالی است که pH و میزان عناصر کم مصرف مورد استفاده اثر منفی بر رشد سلولی داشته است.

در منحنی توزیع نرمال طرح پلاکت-برمن (شکل ۳)، علاوه بر درجه اهمیت هر یک از فاکتورهای مورد بررسی، مثبت یا منفی بودن اثر فاکتور نیز به ترتیب با رنگ های نارنجی و آبی قابل مشاهده است. از بین متغیرهای مورد بررسی بریکس ملاس مورد استفاده، زمان، درصد تلقیح، میزان سولفات آمونیوم، سرعت هم زدن، میزان گلوکز و اوره



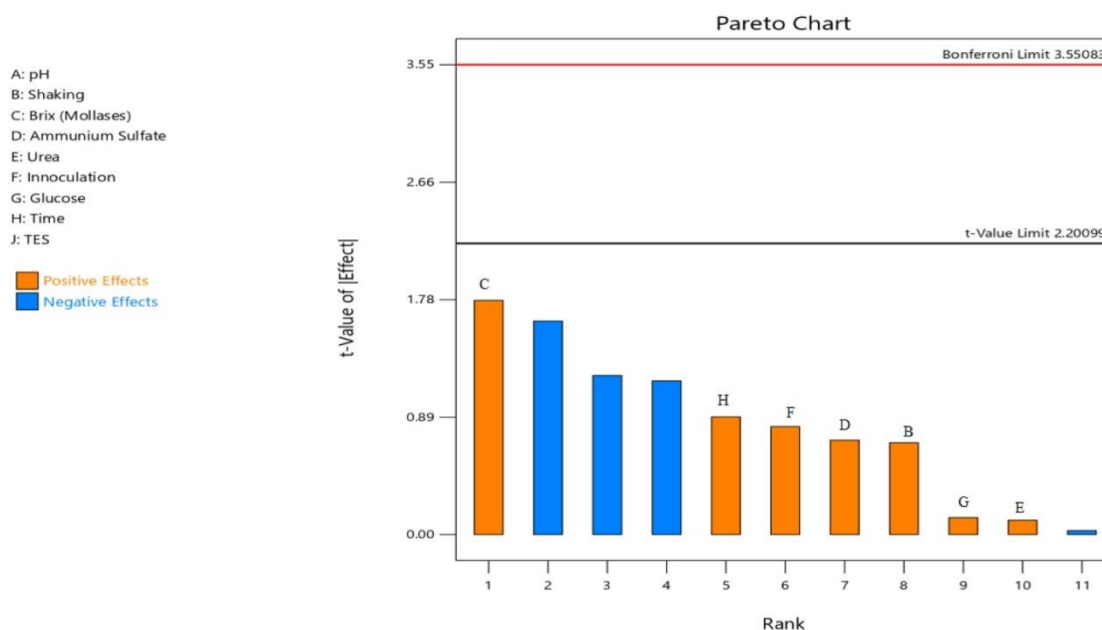


Fig. 3. The normal distribution curve of plackett burman's plot related to the screening of independent variables influencing *P. polymyxa* biomass (Normal plot and Pareto chart).

گرمخانه‌گذاری از ۷۲ تا ۹۶ ساعت، تولید توده زیستی افزایش و به یک نقطه حداکثر در ۹۶ ساعت رسید و زمان‌های طولانی‌تر تأثیر مثبتی بر تولید توده زیستی نداشتند [۱۶]. نتایج تحقیقات Lee و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد که تولید توده زیستی باکتری *Agrobacterium* (که مانند *P. polymyxa* تولنایی تولید آگروپلی ساکارید کردلان را دارا می‌باشد)، با افزایش سرعت هم‌زدن از ۱۲۰ به ۱۵۰ دور در دقیقه به طور قابل توجهی افزایش یافت. بالاترین تولید توده زیستی در سرعت هم‌زدن ۱۵۰ دور در دقیقه به دست آمد. تولید بیومس در ۱۲۰ دور در دقیقه کم گزارش شد که می‌توان آن را به محدودیت انتقال اکسیژن نسبت داد. با این حال، در ۱۸۰ دور در دقیقه، سطوح کمتری از توده زیستی

Rafigh و همکاران (۲۰۱۴) اثر پارامترهای مختلف روی تولید توده سلولی توسط سویه *P. polymyxa* را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که دما و غلظت گلوکز به عنوان عوامل مستقل، دارای ارزش ضریب بالایی بودند، که نشان دهنده تأثیر معنی‌دار خطی این دو عامل بر رشد باکتری است. اثر مستقیم شش متغیر (دما، pH، زمان تخمیر، گلوکز، عصاره مخمر و سرعت همزن) بر بازده متغیر پاسخ (تولید توده سلولی) در نتایج این مطالعه به وضوح مشهود است. از نظر pH، هنگامی که pH اولیه تخمیر از ۵/۵ تا ۷/۰ افزایش یافت، تولید توده سلولی نیز افزایش یافت. با این حال، مقادیر بالاتر (pH=۸/۵) موجب کاهش تولید گردید. علاوه بر این، مطالعه نشان داد که با افزایش زمان

مشاهده شد که می‌تواند به تجزیه باکتریایی ناشی از چندین مکانیسم برشی نسبت داده شود [۲۴].

در چندین پژوهش متفاوت، از طرح پلاکت-برمن به منظور بهینه‌سازی محیط کشت میکروارگانیسم‌های خانواده *Bacillus* که از نظر قرابت به *Paenibacillus* نزدیک می‌باشند، استفاده شده است. Shi و همکاران (۲۰۲۴) در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی محیط کشت تخمیر و شرایط رشد *Bacillus velezensis* BHZ-29 پرداخته و پیشرفت‌های قابل توجهی در افزایش تولید توده زیستی و قدرت ضدباکتری این سویه نشان دادند. آزمایش طرح پلاکت-برمن برای تعیین عوامل مهم مؤثر بر تعداد باکتری‌های زنده و قدرت ضدباکتریایی و آزمایش طرح Box-Behnken برای به دست آوردن شرایط رشد بهینه *B. velezensis* BHZ-29 استفاده شد. نتایج نشان داد ملاس، پپتون و سولفات منیزیم به عنوان عوامل کلیدی شناسایی شدند که تأثیر معناداری بر رشد باکتری و فعالیت ضدباکتریایی داشتند. نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد سلول‌های زنده از $10^9 \times 7/83$ CFU/mL به $10^{11} \times 2/17$ CFU/mL و تیتراژ ضدباکتری از $111/67$ به $153/13$ mm/mL افزایش یافت. همچنین بعد از بهینه‌سازی، شرایط تخمیر برای *B. velezensis* BHZ-29 به شرح زیر بود: دما $25/57$ درجه سانتی گراد، $pH=7/23$ ، زمان کشت ۹۵ ساعت، سرعت چرخش 160 دور بر دقیقه، مقدار تلقیح ۲ درصد و حجم تخمیر 100 میلی‌لیتر. پس از بهینه‌سازی شرایط تخمیر، تعداد باکتری‌های زنده به $3/9 \times 10^{11}$ CFU/mL و تیتراژ باکتریواستاتیک به $158/85$ mm/ml افزایش یافت [۲۵].

مطالعه‌ای که توسط Ghasemi و Ahmadzadeh (۲۰۱۳) انجام شده است، به بررسی روش‌های غربالگری و بهینه‌سازی تخمیر برای افزایش همزمان تولید توده زیستی

و کارایی یک متابولیت کنترل زیستی از *Bacillus subtilis* UTB96 می‌پردازد. با استفاده از طراحی پلاکت-برمن، محققان به طور مؤثری عوامل محیطی مختلفی را که بر تولید توده سلولی تأثیر می‌گذارند، بررسی نموده و بر pH ، دما و نسبت کربن به نیتروژن (C/N) به عنوان پارامترهای کلیدی تمرکز کردند. شرایط بهینه تعیین شده— pH برابر با ۷، دما 30 درجه سانتی گراد و نسبت C/N برابر با $23:1$ —با پروفایل‌های رشدی که معمولاً برای بسیاری از گونه‌های باکتری باسیلوس مشاهده می‌شود، همخوانی دارد. حفظ pH متعادل به ویژه برای متابولیسم میکروبی اهمیت زیادی دارد، زیرا فعالیت آنزیمی و جذب مواد مغذی را تسهیل می‌کند. نسبت C/N انتخاب شده احتمالاً محیطی متعادل فراهم می‌آورد که به سنتز مولکول‌های ضروری کمک می‌کند و در نتیجه به انباشت توده سلولی کمک می‌کند. یکی از یافته‌های برجسته این مطالعه، افزایش قابل توجه توده سلولی در باکتری‌هایی است که تحت شرایط بهینه کشت داده شده‌اند. محققان بیان نمودند کاربرد غربالگری فاکتورهای موثر در رشد توده سلولی و همچنین بهینه‌سازی شرایط کشت در بیوراکتور نیمه صنعتی و شرایط آزمایشگاهی تأثیر مثبتی در کاهش طول فاز تأخیر رشد باکتری داشت. این مشاهده نشان می‌دهد که استفاده از یک محیط بهینه می‌تواند سازگاری باکتری‌ها با شرایط محیطی جدید را تسریع کند که به طور کلی بهره‌وری را افزایش می‌دهد. کاهش فاز تأخیر به ویژه در کاربردهای بیوتکنولوژیکی سودمند است، زیرا کارایی زمان می‌تواند به طور قابل توجهی بر سودآوری اقتصادی تأثیر بگذارد [۲۶].

Praharyawan و همکاران (۲۰۱۴) از طراحی پلاکت-برمن برای غربالگری ترکیبات محیطی به منظور افزایش

کرده و فرآیند تنفس سلولی و رشد توده زیستی را تقویت می‌کند، در حالی که روغن زیتون اسیدهای چرب ضروری را فراهم می‌کند که برای تولید لیپاز حیاتی هستند. نقش پیتون به‌عنوان منبع نیتروژن نیز مهم است، زیرا اسیدهای آمینه لازم برای سنتز پروتئین‌ها، از جمله آنزیم لیپاز را تأمین می‌کند. دستیابی به حداکثر فعالیت لیپاز به میزان ۲۸۲ U/ml در فرآیند تخمیر نشان‌دهنده پتانسیل باکتری *Bacillus sphaericus* به‌عنوان یک تولیدکننده مؤثر لیپاز است [۲۸].

۴- نتیجه‌گیری

باکتری *P. polymyxa*، یک باکتری گرم مثبت طبیعی و مفید در خاک است که توانایی تولید انواع آنتی بیوتیک‌ها و پلی-ساکاریدهایی از قبیل کردلان را دارا می‌باشد. بنابراین ارائه راهکار برای رشد بیشتر این سویه در محیط کشت‌های ارزان قیمت می‌تواند منجر به تولید محصول نهایی با قیمت تمام شده پایین‌تر گردد. این پژوهش به بررسی اثرات انواع منابع کربن، نیتروژن و شرایط محیطی با تأکید بر استفاده از ملاس به‌عنوان یک منبع کربن ارزان‌قیمت و دسترس‌پذیر بر رشد این باکتری اختصاص دارد. نتایج آزمون غربالگری نشان داد اثر دور همزن، زمان فرایند و درصد تلقیح نسبت به سایر پارامترهای مورد بررسی، بر میزان تولید توده سلولی معنادارتر بود ($P < 0.95$). تحقیقات بیشتری در زمینه ارائه راهکار مناسب به منظور رشد بیشتر *P. polymyxa* در محیط کشت حاوی ملاس به منظور تولید توده سلولی بالاتر و در نتیجه تولید با راندمان بیشتر محصول متابولیکی مدنظر، لازم است.

۵- تقدیر و تشکر

تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری *Bacillus sp.* DSW17 استفاده نمودند. این رویکرد به‌طور مؤثر عوامل کلیدی تأثیرگذار بر بازده بیوسورفاکتانت را شناسایی و قدم مهمی در بهینه‌سازی فرآیندهای تخمیر برای تولید بیوسورفاکتانت محسوب می‌شود. از مجموع ۱۱ ترکیب بررسی شده، ۹ مورد آن به‌طور قابل‌توجهی بر تولید بیوسورفاکتانت تأثیر داشتند. به‌طور خاص، $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، NaNO_3 ، $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ و K_2HPO_4 و ساکارز رابطه مستقیمی با تولید بیوسورفاکتانت داشتند. منابع نیتروژن مانند NaNO_3 برای سنتز پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ضروری هستند، در حالی که منابع کربن مانند ساکارز انرژی لازم برای رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت را تأمین می‌کنند. درحالی‌که، مشاهده شد که $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، KH_2PO_4 و $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ رابطه معکوسی با تولید بیوسورفاکتانت دارند. این یافته‌ها دلالت بر این دارد که در محدوده تجربی مورد مطالعه، غلظت‌های بالای این ترکیبات ممکن است سنتز بیوسورفاکتانت را مهار کند [۲۷].

مطالعه‌ای که توسط Rajendran و همکاران (۲۰۰۷) انجام شده است، بر کارایی استفاده از طراحی پلاکت-برمن در ارزیابی آماری اجزای محیط کشت برای افزایش تولید توده سلولی و لیپاز توسط باکتری *Bacillus sphaericus* تأکید می‌کند. با تجزیه و تحلیل دوازده مؤلفه محیطی در فرآیند تخمیر غوطه‌وری، این مطالعه به‌طور مؤثر عوامل کلیدی که به‌طور قابل‌توجهی بر تولید لیپاز تأثیر می‌گذارند، شناسایی کرده است. در میان اجزای ارزیابی‌شده، گلوکز، روغن زیتون، پیتون، NaCl و $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ به‌عنوان مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر فعالیت لیپاز شناسایی شدند. وجود گلوکز و روغن زیتون به‌عنوان منابع کربن به‌ویژه حائز اهمیت است. گلوکز به‌عنوان یک منبع انرژی اولیه عمل

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته شده از طرح شماره "۴۰۱۴۲۲۴" انجام شده است.

۶-منابع

- [1] Raza, W., et al., Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. *Bioresource technology*, 2011. **102**(10): p. 6095-6103.
- [2] El-Sayed, M.H., et al., Optimization, purification and physicochemical characterization of curdlan produced by *Paenibacillus* sp. strain NBR-10. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 2016. **13**(2): p. 901-909.
- [3] Zhang, F., et al., Biocontrol potential of *Paenibacillus polymyxa* against *Verticillium dahliae* infecting cotton plants. *Biological Control*, 2018. **127**: p. 70-77.
- [4] Huang, X.-Y., et al., Exopolysaccharides of *Paenibacillus polymyxa*: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024: p. 129663.
- [5] Falah, F., et al., Effect of immobilization, mutation, and microbial stresses on increasing production efficiency of "Cyclosporin A". *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2024. **14**(4): p. 4441-4456.
- [6] Topić Popović, N., et al., Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: A review. *Mass spectrometry reviews*, 2023. **42**(5): p. 1589-1603.
- [7] Brown, R.W., et al., Nutrient (C, N and P) enrichment induces significant changes in the soil metabolite profile and microbial carbon partitioning. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022. **172**: p. 108779.
- [8] Vasiee, A., et al., Optimization of the production conditions of the lipase produced by *Bacillus cereus* from rice flour through Plackett-Burman Design (PBD) and response surface methodology (RSM). *Microbial Pathogenesis*, 2016. **101**: p. 36-43.
- [9] Falah, F., et al., Optimization of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus* spp. from agro-food waste. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2024. **14**(3): p. 3425-3437.
- [10] Öz, Y.E. and M. Kalender, A novel static cultivation of bacterial cellulose production from sugar beet molasses: Series static culture (SSC) system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023. **225**: p. 1306-1314.
- [11] Saejung, C. and L. Puensungnern, Evaluation of molasses-based medium as a low cost medium for carotenoids and fatty acid production by photosynthetic bacteria. *Waste and Biomass Valorization*, 2020. **11**: p. 143-152.
- [12] Çakar, F., et al., Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydrate polymers*, 2014. **106**: p. 7-13.
- [13] Ejaz, U., A. Ahmed, and M. Sohail, Statistical optimization of immobilization of yeast cells on corncob for pectinase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018. **14**: p. 450-456.
- [14] Stone, M., et al., Standardized evaluation of Zika nucleic acid tests used in clinical settings and blood screening. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2023. **17**(3): p. e0011157.
- [15] Triveni, R., T. Shamala, and N. Rastogi, Optimised production and utilisation of

- exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. *Process Biochemistry*, 2001. **36**(8-9): p. 787-795.
- [16] Rafigh, S.M., et al., Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. *International journal of biological macromolecules*, 2014. **70**: p. 463-473.
- [17] Falah, F., et al., Production of cyclosporin A by *Tolypocladium inflatum* using dairy waste medium: optimization and investigation of the effect of ultrasound, high hydrostatic pressure, and pulsed electric field treatments on the morphology of fungus. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2023: p. 1-13.
- [18] Salah, R.B., et al., Fermentation of date palm juice by curdlan gum production from *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466TM: Purification, rheological and physico-chemical characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 2011. **44**(4): p. 1026-1034.
- [19] Maier, R.M. and I.L. Pepper, *Bacterial growth*, in *Environmental microbiology*. 2015, Elsevier. p. 37-56.
- [20] Peleg, M. and M.G. Corradini, *Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot*. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2011. **51**(10): p. 917-945.
- [21] Lee, Y., et al., Occurrence of phenotypic variation in *Paenibacillus polymyxa* E681 associated with sporulation and carbohydrate metabolism. *Biotechnology Reports*, 2022. **34**: p. e00719.
- [22] Zhao, T., et al., Isolation and Characterization of *Paenibacillus polymyxa* B7 and Inhibition of *Aspergillus tubingensis* A1 by Its Antifungal Substances. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024. **25**(4): p. 2195.
- [23] Kaczmarek, J.A. and K.L. Prather, Effective use of biosensors for high-throughput library screening for metabolite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2021. **48**(9-10): p. kuab049.
- [24] Lee, I.Y., et al., Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Bioprocess engineering*, 1999. **20**: p. 283-287.
- [25] Shi, Y., et al., Optimization of the fermentation media and growth conditions of *Bacillus velezensis* BHZ-29 using a Plackett–Burman design experiment combined with response surface methodology. *Frontiers in Microbiology*, 2024. **15**: p. 1355369.
- [26] Ghasemi, S. and M. Ahmadzadeh, Optimisation of a cost-effective culture medium for the large-scale production of *Bacillus subtilis* UTB96. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2013. **46**(13): p. 1552-1563.
- [27] Praharyawan, S., D. Susilaningsih, and K. Syamsu, Statistical screening of medium components by plackett–burman experimental design for biosurfactant production by indonesian indigenous *Bacillus* sp. DSW17. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci*, 2013. **15**(4): p. 805-13.
- [28] Rajendran, A., A. Sundaramurthy, and V. Thangavelu, Statistical evaluation of medium components using Plackett-Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Bacillus sphaericus*. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 2007. **21**(2): p. 181-188.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Screening of effective factors in the growth of *Paenibacillus polymyxa* using Plackett - Burman experimental design

Alireza Vasiee¹, Mahboobe Sarabi-Jamab^{2*}, Fereshteh Falah³, Seyed Ali Mortazavi³

1 -Department of Food Safety and Quality Control, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad,

Iran

2 -Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, RIFST, Mashhad, Iran

3 -Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2024/11/4 Accepted:2024/12/11	<i>Paenibacillus polymyxa</i> is one of the microorganisms that has the ability to produce extracellular exopolysaccharides and antibiotics. Several factors, including culture medium content, carbon and nitrogen sources, pH, temperature, air velocity, and culture conditions, have an effect on the growth and production of higher cell mass, as well as the production of microbial metabolites. The purpose of this study was to investigate the growth rate of <i>P. polymyxa</i> in a culture medium containing molasses and to screen five components of the culture medium along with four factors of the fermentation conditions using the Plackett -Burman method to maximize cell mass production. The results showed that among the investigated variables, molasses brix, time, percentage of inoculation, amount of ammonium sulfate, stirring speed, and the amount of glucose and urea, as a first-order equatino, had a significant positive effect on bacterial growth and biomass production. Molasses brix medium was found to be more effective than other variables; however, pH and the amount of low-use elements had a negative effect on cell growth. The findings of this study indicated that molasses-based culture medium can be used as a cost-effective and suitable option for the growth of <i>P. polymyxa</i>.
Keywords: <i>Paenibacillus polymyxa</i>, cell growth, Plackett -Burman	
DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213. *Corresponding Author E- m.sarabi@rifst.ac.ir	



بهینه سازی فرایند ریزپوشانی کانتا گزانتین به روش الکترواسپری

فاطمه کریمی^۱، محمدحسین عزیزی^{۲*}، سهراب معینی^۳، محمد کریمی^۴، رکسانا موگویی^۵

۱-دانش آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲-عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳-عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد تهران شمال، تهران، ایران

۴-عضو هیات علمی گروه نساجی دانشکده نساجی، دانشگاه امیرکبیر، تهران، ایران

۵-عضو هیات علمی گروه مدیریت، برنامه ریزی و آموزش محیط زیست، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال،

تهران، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۱	کانتاگزانتین مولکول کتوکاروتنوئید غیراشباع بوده که نسبت به عوامل محیطی حساس است. توسعه میکرو-نانو کپسولاسیون یکی از راهکارهایی است که ترکیبات زیست فعال را در برابر شرایط نامناسب محیطی محافظت می کند. در این مطالعه کانتاگزانتین با استفاده از پلیمر پروتئین آب پنیر با روش الکترواسپری ریزپوشانی شدند و با استفاده روش سطح پاسخ تاثیر چهار متغیر مستقل غلظت پروتئین آب پنیر، ولتاژ به کار رفته، نرخ ورودی و فاصله سر سرنگ و جمع کننده بر روی کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین ارزیابی شد. بر اساس نتایج به دست آمده توابع مطلوبیت بیشترین مطلوبیت با مقدار ۰/۹۳ در غلظت پروتئین آب پنیر ۳۹/۴٪، ولتاژ ۱۷/۵ kV، نرخ ورودی ۲/۲ mL/h، فاصله سر سرنگ و جمع کننده ۱۷/۱ cm تعیین شد.
کلمات کلیدی: ریزپوشانی، الکترواسپری، پروتئین آب پنیر، کانتاگزانتین	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.227. * مسئول مکاتبات: azizit_m@modares.ac.ir	

۱-مقدمه

کپسول را نداشت و PB4 هم از کارایی بسیار پائینی برخوردار بود در حالیکه ریزکپسول های تهیه شده با PCLC از حلالیت خوبی در آب برخوردار بودند و پایداری حرارتی مناسبی هم داشتند به طوریکه پس از دوساعت قرارگرفتن در دمای ۷۰ درجه سلسیوس هیچ کاهشی از آستانگزانین در ریزکپسولهای تهیه شده با این پوشش مشاهده نکردند [7]. ریزپوشانی با استفاده از الکترواسپری از جمله روش های نوین جهت ریزپوشانی ترکیبات غذایی می باشد. هدف از انجام این تحقیق ارائه مدلی برای کارایی الکترواسپری کانتاگزانین بر اساس متغیرهای موثر در کارایی ریزپوشانی کانتاگزانین با استفاده از روش سطح پاسخ و ارائه نقاط بهینه متغیرهای مستقل در ریزپوشانی کانتاگزانین به منظور بهینه سازی کارایی الکترواسپری کانتاگزانین بر اساس توابع مطلوبیت می باشد.

۲-مواد و روش ها

در این مطالعه از پروتئین آب پنیر از شرکت پنتیر لبن با ویژگیهای پروتئین ۸۰٪، لاکتوز ۹٪، لیپید ۸٪ و آب ۲۸٪ و کانتاگزانین از شرکت مرک استفاده شد.

دستگاه الکترواسپری مورد استفاده در این مطالعه ساخت دانشکده نساجی دانشگاه صنعتی امیرکبیر بوده است که جهت تولید نانوکپسولهای کانتاگزانین به روش الکترواسپری، امولسیون تهیه شده در سرنگ ۹ سی سی با سوزن ۶۹ گیج (قطر داخلی ۰/۹۰ میلیمتر) ریخته شد. سرنگ به صورت افقی روی پمپ تغذیه قرار گرفت و قطب مثبت دستگاه به سرنگ حاوی محلول و قطب منفی به صفحه جمع کننده که یک صفحه فویل آلومینیومی (با ابعاد ۹۰×۹۰ سانتیمتر) بود، متصل گردید. شمایی از دستگاه الکترواسپری در شکل ۱ نشان داده شده است.

نقش غذا در سبک زندگی مدرن از برآورده کردن مواد مغذی پایه و ضروری برای مصرفکننده فراتر رفته و در زمینه جلوگیری از بیماریهای مرتبط با غذا و همچنین بهبود سلامت جسمی و روحی فرد مصرفکننده نیز در حال پیشرفت گستردهای است [1] امروزه کاروتنوئیدها به عنوان رنگ دهنده مواد غذایی، مکمل های خوراکی، مواد آرایشی و به منظور سلامتی انسان تولید می شوند [2]. از جمله کاروتنوئیدها می توان بتاکاروتن، آلفا کاروتن، کانتاگزانین، آستاگزانین، لیکوپن و ... را نام برد [3]. کانتاگزانین امروزه در برخی کشورها به عنوان یک افزودنی مجاز در انواع سس، سوپ، شیرینی، نوشابه، بستنی، فرآورده های لبنی، فرآورده های گوشتی و فرآورده های دریایی مورد استفاده قرار می گیرد [4, 5] توسعه میکرو یا نانو کپسولاسیون یکی از راهکارهایی است که ترکیبات زیست فعال را در برابر شرایط نامناسب محیطی محافظت می کند [1] روش های متنوعی جهت ریزپوشانی ترکیبات وجود دارد که انتخاب آن به عوامل مختلفی بستگی دارد. در تحقیقی از پروتئین ذرت به عنوان ماده دیواره برای ریزپوشانی بتاکاروتن به روش الکترواسپری استفاده کردند. بدین طریق که پس از تهیه محلول حاوی بتاکاروتن و پروتئین ذرت (زئین)، از یک همزن مغناطیسی بسیار قوی در محیطی الکلی جهت تولید ریزکپسول استفاده شده است. بررسی های میکروسکوپی نشان از تولید ریزکپسول های حاوی بتاکاروتن به این روش داشته و نتایج آزمایشات نیز نشان دهنده پایداری این ریزکپسول ها در برابر نور بودند [6]. تاکاروتینون و همکاران (2009) از اتیل سلولز، PB4 (پلی متوکسی وینیل ۴-کینامات) و PCPLC (پلی متوکسی آمیل فتالیل کیتوزان) به عنوان مواد دیواره و روش خشک کن انجمادی استفاده نمودند. آنها مشاهده کردند که اتیل سلولز توان تشکیل

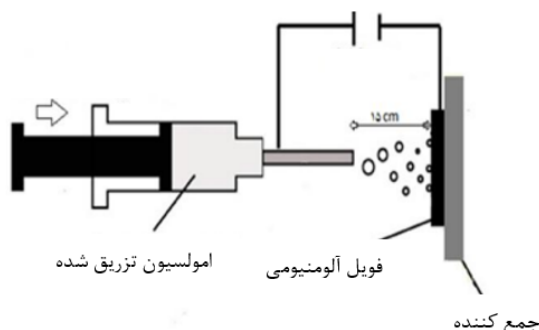


Fig 1. Electrospray machinery

۲-۱- تهیه امولسیون کانتاگزانتین

۲-۲- بازدهی ریزپوشانی (Microencapsulation)

(Efficiency):

با اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید کل (Total Carotenoid) و کاروتنوئید سطحی (Surface Carotenoid) و با استفاده از معادله زیر میزان کارایی (ME) ریزپوشانی محاسبه می‌شود:

$$ME\% = \frac{TC - SC}{TC} \times 100 \quad \text{معادله ۱}$$

ME: میزان کارایی ریزپوشانی

TC: میزان کاروتنوئید کل

SC: میزان کاروتنوئید سطحی

برای محاسبه میزان کاروتنوئید کل ۵۰ میلی گرم کانتاگزانتین ریزپوشانی شده با ۲۵ میلی لیتر آب مقطر حل کرده سپس ۲۵ میلی متر هگزان اضافه کرده و با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب آن را در طول موج ۴۷۶nm اندازه می‌گیریم [9,8]. برای محاسبه میزان کاروتنوئید سطحی ذرات نیز ۵۰ میلی گرم از پودر تهیه شده را با ۲۵ میلی لیتر هگزان حل کرده سپس جذب آن را در طول موج ۴۷۶nm می‌خوانیم [10,9].

امولسیون کانتاگزانتین و مواد پوششی محلول در آب نوعی امولسیون روغن در آب محسوب می‌شود که رنگدانه‌ی کانتاگزانتین فاز روغنی آن را تشکیل می‌دهد و پروتئینی که به عنوان دیواره جهت پوشش رنگدانه به کار می‌روند تشکیل دهنده فاز آبی آن می‌باشند. تهیه این امولسیون شامل سه مرحله جداگانه هر یک از فازها و مخلوط نمودن آنها با دستگاه اولتراسونیک می‌باشد. در ابتدا نمونه‌های پروتئین آب پنیر در غلظت‌های (۲۰٪، ۲۵٪، ۳۰٪، ۳۵٪ و ۴۰٪) در آب مقطر تهیه نموده سپس محلول کانتاگزانتین با حل کردن ۱.۲۵٪ w/v در روغن ذرت آماده شدند. برای تهیه امولسیون از محلول سورفاکتانت توئین-۲۰ استفاده شد و با هموژنایزر آزمایشگاهی فشار بالا شرکت Albertslund ساخت کشور دانمارک امولسیون کاملاً هموژن گردید.

تجزیه وتحلیل داده ها که با استفاده از برنامه نرم افزاری SAS9.1 و براساس طرح روش سطح پاسخ و توابع مطلوبیت انجام شد[11].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مدل سازی ریزپوشانی کانتاگزانتین

طرح مورد استفاده در این مطالعه طرح مرکب مرکزی می باشد. طرح مرکب مرکزی با استفاده از نقاط محوری و چند نقطه مرکزی از طرح فاکتوریل به دست می آید.

همانطور که در جدول ۱ قابل مشاهده است چهار متغیر مستقل این طرح شامل غلظت پروتئین آب پنیر (C)، ولتاژ کاربردی (V)، نرخ ورودی (F) و فاصله سر سرنگ و جمع کننده (D) می باشد. این جدول سطوح کد شده و مقادیر واقعی (کد نشده) نقاط مورد آزمایش برای این چهار متغیر مستقل را نشان می دهد. متغیرها در پنج رنج ۱، ۰، +۱، +۲، -۱ و -۲ کد شده اند. آزمایشات در ۳۰ نقطه انجام شده است. کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین در پروتئین آب پنیر به عنوان پاسخ در نظر گرفته شده است.

به منظور تحلیل آماری تاثیر متغیرهای آزمایش بر کانتاگزانتین ریزپوشانی شده به روش الکترواسپری، در این تحقیق از روش سطح پاسخ استفاده شد. با استفاده از روش سطح پاسخ همچنین می توان روابط بین متغیرهای آزمایش و پاسخ (متغیر وابسته) را مورد مطالعه قرار داد. متغیرهای مستقل در روش الکترواسپری عبارتست از غلظت بسپار، ولتاژ کاربردی، نرخ ورودی و فاصله کاری. پاسخ مورد نظر نیز کارایی الکترواسپری می باشد. بر اساس طرح مرکب مرکزی، سطوح متغیرهای مستقل بر اساس مقادیر کد شده ۰، ±۱، ±۲ انتخاب می شود. α برابر مجذور تعداد متغیرهای مستقل می باشد.

معادله مدلی که از طرح مورد اجرا به دست خواهد آمد برای پاسخ مورد نظر به صورت معادله ۲ می باشد:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^4 a_i x_i + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i}^4 a_{ij} x_i x_j \quad \text{معادله ۲}$$

که در آن y، پاسخ پیش بینی شده (کارایی الکترواسپری)، x_i و x_j متغیرهای مستقل کد شده و a_0 ، a_i و a_{ij} ضرایب مدل می باشند.

Table. 1 Experimental design of independent variables in the central composite design for canthaxanthine capsule

Independent variable Symbol		Range and level				
		-2	-1	0	+1	+2
Voltage	X1	9	12	15	18	21
Distance between needle tip and collector	X2	7	10	13	16	19
Feed rate	X3	0.5	1	1.5	2	2.5
Concentration of whey protein	X4	20	25	30	35	40

سامانه ناشناخته است؛ در نتیجه بایستی این موضوع ارزیابی شود که آیا مدل، داده های آزمایشی را به خوبی می پوشاند یا خیر. با توجه به اینکه نیاز است که داده ها و مدل به دست آمده تحلیل و از لحاظ آماری اعتبارسنجی شوند، تجزیه

پس از آن که ضرایب رگرسیونی به دست آمد و کارایی الکترواسپری بر اساس متغیرهای آزمایش مدل شد، پاسخ مورد مطالعه (کارایی الکترواسپری) با استفاده از معادله مدل برای نقاط آزمایش تخمین زده شد (جدول ۲)، معمولاً رفتار

واریانس عبارات مرتبه اول، دوم و اثرات متقابل مدل
 رگرسیون انجام شد. سپس تجزیه واریانس ضرایب عبارت-
 های مدل انجام شده و ضریب تبیین (R^2) مدل نیز بدست
 آمد. برای اطمینان حاصل کردن از برازش مناسب انحنای
 مدل آزمون عدم برازش در قالب جدول تجزیه واریانس با
 استفاده از نرم افزار SAS9.1 انجام شد.

Table. 2 Responses of dependent variables for efficiency encapsulation to changes in the independent variables. X1: concentration of whey protein (wt.%), X2: feed rate (mLh^{-1}), X3: voltage (kV), X4: distance between needle tip and collector (cm).

Exp. No	Variable levels				Efficiency	
	X1	X2	X3	X4	y	Efficiency
1	-1	-1	-1	-1	32	32
2	-1	-1	-1	+1	61	58
3	-1	-1	+1	-1	30	29
4	-1	-1	+1	+1	61	66
5	-1	+1	-1	-1	30	29
6	-1	+1	-1	+1	59	55
7	-1	+1	+1	-1	30	36
8	-1	+1	+1	+1	73	73
9	+1	-1	-1	-1	37	40
10	+1	-1	-1	+1	65	66
11	+1	-1	+1	-1	37	37
12	+1	-1	+1	+1	74	74
13	+1	+1	-1	-1	32	36
14	+1	+1	-1	+1	63	62
15	+1	+1	+1	-1	40	44
16	+1	+1	+1	+1	82	80
17	-2	0	0	0	45	44
18	+2	0	0	0	60	59
19	0	-2	0	0	55	57
20	0	+2	0	0	57	61
21	0	0	-2	0	41	42
22	0	0	+2	0	60	57
23	0	0	0	-2	20	13
24	0	0	0	+2	70	75
25	0	0	0	0	66	59
26	0	0	0	0	61	59
27	0	0	0	0	60	59
28	0	0	0	0	58	59
29	0	0	0	0	60	59
30	0	0	0	0	63	59

نتایج تجزیه واریانس مدل کارایی الکترواسپری کانتاگرانترین
 با بسپار پروتئین آب پنیر در جدول ۳ ارائه شده است. این

جدول مدل های کلی و پیش بینی را برای الکترواسپری با پروتئین آب پنیر را نشان می دهد.

Table. 3 Analysis of variance (ANOVA) for response of the dependent variable

Source	Predicted model			Total model		
	d.f	F	p-value	d.f	F	p-value
regression	8	43.37	0.0001	14	33.37	0.0001
Linear				4	104.22	0.0001
Squar				4	7.57	0.0027
interaction				6	3.34	0.0355
Residual error	18			12		
Lac-of-fit	16	2.13	0.36	10	1.63	0.4377
Pure error	2			2		
Total	26			26		

برآزش مناسب معادله است. به بیان دیگر معادله درجه دوم ارائه شده توسط روش سطح پاسخ به خوبی می تواند تاثیرات غیر از مرتبه اول بر کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین با بسپار پروتئین آب پنیر را نیز پیش بینی کند. مدل ها و عبارتهایی که مقدار P آنها از ۰/۰۵ کمتر باشد از لحاظ آماری می تواند داده ها را با خطای کمتر از ۵ درصد پیش بینی کند. در مطالعه ای بتا کاروتن توسط صمغ عربی ریزپوشانی شد و نتایج نشان داد که ضرایب خطی، درجه دوم و اثر متقابل در معادله معنی دار بوده و مدل ریاضی با ضرایب اطمینان قابل قبول به دست آمد. در این مطالعه جدول ANOVA نشان می دهد آزمون عدم برآزش $P \geq 0.05$ در سطح ۹۵٪ معنی دار نبود و خطای مورد انتظار مدل هم در سطح ۷.۲٪ پیش بینی شده است [12].

۳-۲- ارزیابی مدل کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین

روش سطح پاسخ بعد از اطمینان حاصل کردن از مدل ها، تجزیه واریانس همه عبارات مدل را بررسی می کند. نتایج تجزیه واریانس عبارات معادله مربوط به الکترواسپری کانتاگزانتین با استفاده از بسپار پروتئین آب پنیر در جدول ۴ ارائه شده است. در معادله مورد مطالعه p-value برای همه

مقادیر F در تجزیه واریانس مدل های کلی و پیش بینی شده به ترتیب ۳۳/۳۸ و ۴۳/۳۷ به دست آمد. مقادیر p-value برای مدل ها کمتر از ۰/۰۵ بود که نشان می دهد این مدل ها از لحاظ آماری قابلیت پیش بینی تاثیرات متغیرهای مستقل بر کارایی الکترواسپری را دارند. بعد از تأیید اعتبار مدل، نیاز است که هریک از عبارات معادله سنجیده شود. از آنجایی که p-value برای همه عبارات (مرتبه اول، مرتبه دوم و اثر متقابل) مربوط به معادله مورد مطالعه کمتر از ۰/۰۵ بود می توان نتیجه گرفت که همه سه نوع عبارات (مرتبه اول، مرتبه دوم و اثر متقابل) از لحاظ آماری اعتبار ورود در معادله را داشته است به گونه ای که این معادله توانایی پیش بینی تاثیرات مرتبه دوم و اثرات متقابل متغیرهای مستقل بر کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین را دارد. چون روش سطح پاسخ فقط قابلیت ارائه مدل های مرتبه اول و دوم را دارد و نمی تواند مدل های دیگری غیر از این دو مدل را برای پیش بینی متغیر وابسته ارائه دهد به آزمون عدم برآزش نیز برای اطمینان حاصل کردن مناسب بودن مدل در انحناها نیاز است. همان طور که در جدول ۴ مشخص است p-value برای آزمون عدم برآزش ۰/۳۶ تعیین شد که نشان دهنده رد فرض عدم

$$Ef = -1.98 + 3.75 \times V - 0.91 \times D - 3.83 \times F + 1.66 \times C - 1.95 V^2 + 2.5 D \times F - 2.45 \times F^2 - 3.83 \times C^2$$

معادله ۳

Ef کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین (%)، V ولتاژ به کار رفته (kV)، D فاصله سر سرنگ تا محل جمع کننده (cm)، F نرخ ورودی (mL/h) و C غلظت پروتئین آب پنیر (%) می باشد. علامت مثبت ضرایب نشان می دهد که عبارت مربوطه یک تاثیر هم جهت بر کارایی الکترواسپری داشته است و علامت منفی نشان دهنده یک تاثیر معکوس بر کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین را بازگو می کند.

جملات مرتبه اول و دوم به غیر از فاکتور مرتبه دوم ضخامت و همچنین عبارت $D \times F$ کمتر از ۰/۰۵ بدست آمد. به بیان دیگر می توان گفت که تاثیرات این عبارات بر کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین با بسیار پروتئین آب پنیر معنی دار بود. به هر حال تاثیرات بقیه عبارات مربوط به اثر متقابل بر کارایی الکترواسپری معنی دار نشد. عباراتی که تاثیر معنی داری روی کارایی نداشتند وارد مدل پیش بینی نشدند. مقادیر R^2 و R^2 تعدیل شده برای مدل پیش بینی به ترتیب ۹۵/۳۳ و ۹۲/۸۶ درصد بود. معادله زیر مدل پیش بینی کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین با بسیار پروتئین آب پنیر بر اساس اعداد واقعی (کد نشده) متغیرهای آزمایش را ارائه می دهد.

Table. 4 Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for the response of efficiency encapsulation based on t-statistic. X1: Concentration of whey protein (wt.%), X2: feed rate (mLh⁻¹), X3: voltage (kV), and X4: distance between needle tip and collector (cm).

parameter	Coefficient	SS	p-value	F
V	3.75	337.5	0.0005	21.31
D	0.916	20.16	0.0028	1.27
F	3.833	352.66	0.0004	22.27
C	1.666	5890.88	0.0001	372.04
V ²	-1.958	133.33	0.0132	8.42
D ²		56.33	0.0863	3.55
F ²	2.45	192	0.0045	12.12
C ²	3.833	408.33	0.0002	25.87
V×D		0.25	0.92	0.015
V×F		56.65	0.083	3.55
V×C		9	0.46	0.56
D×F	2.5	100	0.027	6.31
D×C		42.25	0.128	2.66
F×C		110.25	0.216	6.96

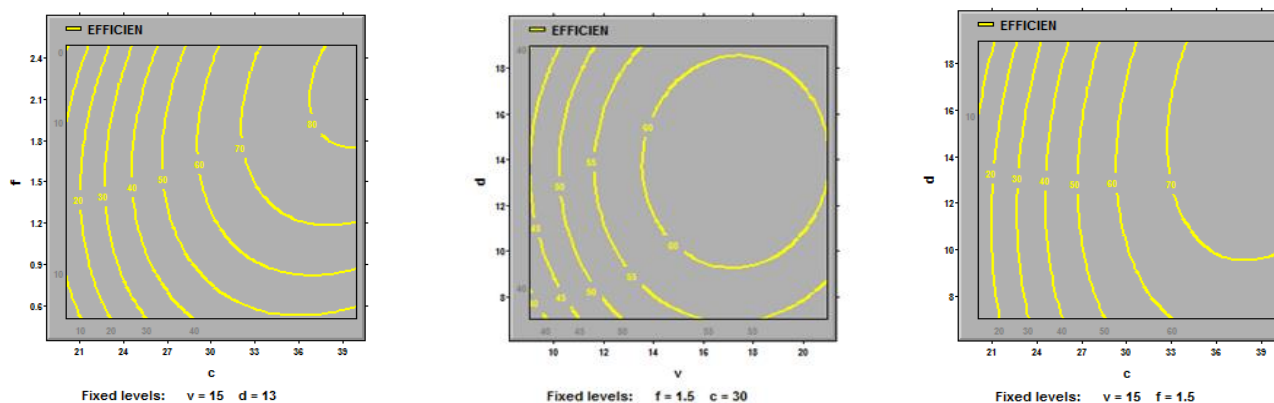
ای بتاکاروتن را توسط صمغ عربی ریزپوشانی کردند و مدل درجه دومی از متغیرهای مستقل به دست آوردند، که نشان داد زمانی که غلظت دیواره (صمغ عربی) افزایش می یابد و زمان کاهش می یابد، افزایشی در بازدهی ریزپوشانی کاروتنوئید دیده می شود [12]. همچنین بازدهی ریزپوشانی بتاکارتن ۳۲.۵٪ بوده است که این اختلاف می تواند به علت

مقدار بالای R^2 نشان می دهد که یک همبستگی بالایی بین مقادیر مشاهده شده و پیش بینی شده کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین با پروتئین آب پنیر برقرار است. همچنین نشان می دهد که مدل ارائه شده می تواند ۹۲/۸۶٪ کل تغییرات کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین با بسیار پروتئین آب پنیر را در شرایط مورد آزمایش تشریح و پیش بینی کند. در مطالعه

استفاده از خشک کردن پاششی توسط شیشیر و همکاران مورد مطالعه قرارگرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که راندمان ریزپوشانی کاروتنوئید از ۴۸.۷۳ تا ۸۳.۶۵٪ متغیر بوده است [14].

عملکرد بهتر الکترواسپری نسبت به خشک کردن پاششی، به علت نبود گرما و در نتیجه آسیب ندیدن کاروتنوئید باقیمانده باشد. در مطالعه ی دیگر به بازدهی ۲۵.۴٪ کاروتنوئید دست یافتند [13]. همچنین بهینه سازی ریزپوشانی آستاگزانتین با

Fig 2. a) the contour plots for the effect of whey protein concentration and the distance between needle tip and collector electrospray efficiency of canthaxanthin , b) the effect of voltage and the distance between needle tip and collector electrospray efficiency of canthaxanthin by whey protein macromolecule, and c) the effect of changing whey protein concentration and the feed rate on the electrospray efficiency of canthaxanthin by whey protein macromolecule



خیلی پایین اعمال ولتاژ به علت ناپایداری منجر به تشکیل دانه می شود. در واقع در غلظت های کم، گره خوردگی زنجیره های پلیمری کافی نیست. در واقع در غلظت های زیاد به علت ایجاد کشش کمتر محلول کارایی الکترواسپری افزایش می یابد [16]. همانطور که در شکل مشاهده می شود در شرایط غلظت پروتئین آب پنیر و نرخ ورودی ثابت در نقطه صفر کد شده با افزایش ولتاژ به کار رفته یک روند افزایشی در کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین رخ داده ولی در مقادیر بالاتر از مقدار بهینه ی ولتاژ کاربردی کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین کاهش یافت. در واقع برای اینکه کپسول تشکیل بشود نیاز به زمان داریم تا محلول از سر نازل جدا شود. در ولتاژهای زیاد این فرصت به محلول داده نمی شود که به صورت ذرات کوچکتر از سر نازل جدا شود لذا

پلات های هم تراز پاسخ یک تصویر گرافیکی دو بعدی می باشد که می تواند تاثیرات اختصاصی و تجمعی متغیر و همچنین اثر متقابل متغیرهای مستقل را بر متغیر وابسته به تصویر بکشد. پلات پاسخ با استفاده از خطوط هم تراز، خصوصیات هندسی سطح را نمایش می دهد. [15].

پلات های هم تراز برای مدل کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین با بسیار پروتئین آب پنیر در شکل ۱ نشان داده شده است. در شرایط ولتاژ و نرخ ورودی ثابت در کمترین غلظت پروتئین آب پنیر امکان ریزپوشانی رنگدانه کانتاگزانتین کاهش می یابد و هنگامی که فاصله سرسرنگ و جمع کننده افزایش می یابد تاثیر قدرت میدان الکتریکی کاهش یافته و امکان قابلیت اسپری شدن کاهش یافته لذا کارایی الکترواسپری کاهش می یابد. در واقع در غلظت های

بهینه‌سازی یکی از مهمترین مراحل در طراحی و تحلیل آزمایش است. در تحقیق حاضر، از توابع مطلوبیت برای بهینه‌سازی متغیرهای آزمایش (مستقل) به منظور دستیابی به نقطه بیشینه متغیر وابسته (کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین با بسپار پروتئین آب پنیر) استفاده شده است.

Table5. Prediction profile for the trends in efficiency encapsulation at the maximum desirability

Desirability	Feed rate	Voltage applied	Distance	Concentration
93%	12/2	17/5	17/1	39/4

سبب می شود ذرات درشت و به عبارتی ریزپوشاننده های بزرگتری را تشکیل دهد که سبب کاهش کارایی الکترواسپری در ولتاژهای بیشتر از حد بهینه می شود [17].

۳-۳ بهینه سازی فرایند ریزپوشانی

جهت ریزپوشانی ترکیبات غذایی می باشد. در این مطالعه مدلی برای کارایی الکترواسپری کانتاگزانتین بر اساس متغیرهای موثر (غلظت کانتاگزانتین، نرخ ورودی، ولتاژ کاربردی و فاصله سرسرنگ تا جمع کننده) در کارایی ریزپوشانی کانتاگزانتین با استفاده از روش سطح پاسخ ارایه شد. مقادیر p-value برای مدل‌ها کمتر از ۰/۰۵ بود که نشان می‌دهد این مدل‌ها از لحاظ آماری قابلیت پیش‌بینی تاثیرات متغیرهای مستقل بر کارایی الکترواسپری را دارند. مدل ارایه شده با ضریب تبیین ۹۵/۳۳٪ بازدهی ریزپوشانی را پیش بینی می کند. بیشترین مطلوبیت با مقدار ۰/۹۳ در غلظت پروتئین آب پنیر ۳۹/۴، ولتاژ ۱۷/۵، نرخ ورودی ۱۲/۲، فاصله سرسرنگ و جمع کننده ۱۷/۱ تعیین شد.

همانطور که در جدول ۵ مشاهده می شود بیشترین مطلوبیت با مقدار ۰/۹۳ در غلظت پروتئین آب پنیر ۳۹/۴، ولتاژ ۱۷/۵، نرخ ورودی ۱۲/۲، فاصله سرسرنگ و جمع کننده ۱۷/۱ تعیین شد. بر اساس نتایج توابع مطلوبیت، در این نقطه بهینه فرایند الکترواسپری کانتاگزانتین با پروتئین آب پنیر بیشترین کارایی اسپری شدن را تجربه می کند.

۴-نتیجه گیری کلی

امروزه کاروتنوئیدها به عنوان رنگ دهنده مواد غذایی، مکمل های خوراکی، مواد آرایشی و به منظور سلامتی انسان تولید می شوند. از آنجایی که کاروتنوئیدها ترکیبات غیراشباع و ناپایداری هستند، ریزپوشانی یکی از راهکارهایی است که ترکیبات زیست فعال را در برابر شرایط نامناسب محیطی محافظت می‌کند. الکترواسپری از جمله روش های نوین

۷-منابع

- [1] Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A. and Nedović, V. 2014. Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Journal of Food Engineering Reviews* 7: 452-490.
- [2] Fortes, C., 2006. Carotenoids in cancer prevention in Carcinogenic food component. (Baer-Dubowska et al, eds). CRC Press, Boca Raton, pp: 123-137.
- [3] DeMan, J.M. 1999. Principles of food Chemistry. Springer, New York, pp: 127-128.
- [4] Smith, J. and Hong- Shun, L., 2003. Food additive data book. Wiley-Blackwell, London, pp: 23-25.
- [5] Otles, S. and Cagindi, O. 2008. Carotenoids as colorants. In *Food colorants chemical and functional properties*. (Socaciu, C, ed). CRC Press, Boca Raton, pp: 34-41.
- [6] Fernandez, A., Torres-Giner, S. and Lagaron, J.M. 2009. Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. *Journal of Food Hydrocolloid* 23: 1427-32.
- [7] Tachaprutinun, A., Udomsup, T., Luadthong, C. and Wanichwecharungruang, S. 2009. Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. *Journal of Pharmaceutics* 374(1-2): 119-124.

- [8] Desobry, S.A., Netto, F.M., Labuza, T.B. 1997. Comparison of spray-drying, drum drying and freeze-drying for (1- 3, 1-4)- β -arotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science* 62: 1158-62.
- [9] Khodaiyan, F., Razavi, SH and Mousavi, SM . 2008. Optimization of canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 rom cheese whey using statistical experimental methods. *Biochem Eng J* 40:415-22.
- [10] Wagner, L. A., Warthesen, J.J. 1995. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *Journal of Food Science* 60(5): 1048-53.
- [11] Castillo, E.D. 2007. Process optimization a statistical approach. Springer, New York, pp: 232.
- [12] Luiz, C.C., Maria, L. and Margarida, M., Microencapsulation of β -Carotene by Spray Drying: Effect of Wall Material Concentration and Drying Inlet Temperature. *Journal of Food Science* 51: 228-334.
- [13] Rocha, G. A., F´avaro-Trindade, C.S. and Grosso, C.R.F. 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Journal of Food and Bioproducts Processing* 90(1): 37-42.
- [14] Islam Shishir, M.R., Taip, F.S., Aziz, N.A. 2016. Optimization of spray drying parameters for pink guava powder using RSM. *Journal of Food Science and Biotechnology* 25(2): 461-468.
- [15] Lundstedt, T., Seifert, E. and Abramo, L., et al. 1998. Experimental design and optimization. *Journal of Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42(1-2): 3-40.
- [16] Shenoy, S.L, Bates, W.D, Frisch, H.L, Wnek, G.E. 2005. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit. *Journal of Polymer*. 46(10): 3372-84.
- [17] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W-E., Lim, T-C., Ma, Z. 2005. An introduction to electrospinning and nanofibers. World Scientific, London, pp: 323-37.



Scientific Research

Microencapsulation of canthaxanthine with electrospray and optimizing processing parameters toward efficiency encapsulation

Fatemeh Karimi¹, Mohammad Hossein Azizi^{2*}, Sohrab Moeini³, Mohammad Karimi⁴ and Roxana Moogouei⁵

1.Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University North Tehran branch, Tehran, Iran

2.Department of food science and Technology, Tarbiat Modares university, Tehran, Iran

3.Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University North Tehran branch, Tehran, Iran

4.Department of Textile Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

5.Department of Environmental planning, Management and Education, Islamic Azad University North Tehran Branch, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2022/5/25

Accepted: 2023/1/1

Keywords:

*Canthaxanthin,
Encapsulation,
Electrospraying, Whey protein*

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.227.

*Corresponding Author E-
azizit_m@modares.ac.ir

This study showed the potential of the electrospinning (in this case electrospraying) technique to produce whey protein concentrate (WPC) micro and nanocapsules for applications in the encapsulation of canthaxanthin. The results showed that the solution concentration, feed solution flow rate and applied voltage had a direct effect on the encapsulation efficiency. by increasing of the solution concentration, feed solution flow rate and applied voltage, the encapsulation efficiency increased. The results showed that solution concentration was the most effective factor in electrospraying, because its scale estimate was highest. According to the results of analysis of variance (ANOVA) for this model, the regression model suggested a significant value for both linear and quadratic terms at $P < 0.05$. Also in order to obtain 0.93% encapsulation efficiency, optimum point was found at the emulsion concentration of 39.4%, feed solution flow rate of 12.2 ml/min, applied voltage of 17.5 kV, and 17.1cm distance between needle tip and collector.



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و حسی ماست همزده غنی شده با عصاره آبی-الکلی دانه گیاه شنبلیله

احمد پدرام نیا^۱، سحر ذکائیان^۲، مهدی جلالی^{۳*}

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

۲- مدیر کنترل کیفیت، شرکت زعفران مصطفوی مهر ایرانیان، مشهد، ایران

۳- گروه مهندسی شیمی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

۴- مدرس، دانشگاه جامع علمی- کاربردی، مرکز چشمه نوشان خراسان (عالیس)

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۲۱

کلمات کلیدی:

عصاره دانه شنبلیله،

غنی سازی ماست،

ویژگی های فیزیکوشیمیایی،

فعالیت آنتی اکسیدانی

یکی از متداول ترین انواع فرآورده های لبنی تخمیری به دلیل عطر و طعم مطلوب و بافت و قوام مناسبی، امکان اختلاط آن با سایر مواد مغذی به سهولت وجود دارد، ماست می باشد. شنبلیله با نام علمی (*Trigonella foenum-graceum*) گیاهی نهان دانه بوده و دانه شنبلیله که مهم ترین قسمت دارویی این گیاه است دارای فلاونوئیدها، سزکوئی ترپن ها و استرول ها و فیبرهای موسیلاژی می باشد. در مطالعه حاضر عصاره آبی-الکلی دانه شنبلیله در چهار سطح (صفر، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد) بر برخی ویژگی های فیزیکوشیمیایی (pH، اسیدیته، آب اندازی و ویسکوزیته)، مقدار ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی اکسیدانی و حسی (طعم، بافت، رنگ و پذیرش کلی) ماست همزده غنی شده در طی ۱۴ روز نگهداری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز داده ها نشان داد نمونه حاوی ۰/۶ درصد به ترتیب دارای کمترین و بیشترین میزان شاخص های pH و اسیدیته است. همچنین با افزایش مدت زمان نگهداری تا ۱۴ روز و نیز کاهش pH، میزان درصد آب اندازی تمام نمونه ها به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/05$). نتایج نشان داد که با کاهش معنی دار محتوای ترکیبات فنلی طی مدت نگهداری، اضافه کردن عصاره دانه شنبلیله به مقدار ۰/۶ درصد در مدت زمانی ۱ و بخصوص ۷ روز باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی شد و در ادامه تا زمان نگهداری ۱۴ روز فعالیت آنتی اکسیدانی در بعضی نمونه ها کم و در برخی با تغییر بسیار جزئی همراه بود ($P > 0/05$). همچنین بیشترین و کمترین مقدار ویسکوزیته ۳۵۰۰ سانتی پواز (نمونه شاهد در روز اول) و ۷۰۳ سانتی پواز (نمونه حاوی ۰/۶ درصد در روز چهاردهم) حاصل شد ($P < 0/05$). در نهایت با بررسی نتایج حاصله از خصوصیات حسی، نمونه حاوی عصاره دانه شنبلیله توانست در مقایسه با نمونه شاهد، امتیاز قابل قبولی را از جانب ارزیابان حسی کسب نماید. در بین انواع فرمولاسیون ماست غنی شده و شاهد، نمونه ی حاوی ۰/۶ درصد عصاره در زمان نگهداری ۱ روز از لحاظ ویژگی های حسی از بالاترین درجه مطلوبیت برخوردار بود.

DOI:10.22034/FSCT.22.158.238.

* مسئول مکاتبات:

mehdijalali62@yahoo.com

۱-مقدمه

ماست یک فرآورده لبنی تخمیری است و در هرم غذایی، در گروه شیر و لبنیات جای دارد و یک واحد مصرفی آن معادل یک لیوان است. از لحاظ تغذیه‌ای این محصول به سادگی هضم می‌شود، ارزش غذایی بالایی دارد و منبع غنی از کربوهیدرات، پروتئین، چربی، ویتامین‌ها، کلسیم و فسفر می‌باشد. به دلیل ترکیبات پروتئین، چربی و لاکتوز که به طور جزئی طی فرآیند تخمیر تجزیه می‌شوند، ماست یک فرآورده سهل الهضم‌تر از شیر می‌باشد، زیرا ماست قادر است تا فلور میکروبی دستگاه گوارش را حفظ نماید و حالت ضد تومور و ضد کلسترول را دارا می‌باشد [۱]. ماست همزده پس از مراحل تخمیر، مشابه ماست معمولی است، به‌طور مشابهی به ماست معمولی شبیه است، با این تفاوت که در ادامه فرآیند، با مخلوط کردن لخته‌های ماست، بافت صاف‌تر و یکنواخت‌تری به آن می‌بخشند. این عمل باعث جلوگیری از جدا شدن آب پنیر از لخته‌های ماست شده که در ادامه منجر به تولید محصولی، با بافت متمایز و باکیفیت‌تر می‌شود. همچنین ماست همزده به دلیل فرآیند هم‌زدن، اسید لاکتیک موجود در آن آزاد می‌شود که به نوبه خود باعث کاهش طعم ترش و افزایش شیرینی در محصول می‌گردد. متخصصان بر این نکته توافق نظر دارند که افراط و زیاده‌روی در دریافت انرژی از هر منبعی همراه با یک سبک زندگی ساکن و بی-تحرک منجر به بروز و افزایش وزن و چاقی، بیماری‌های قلبی - عروقی، سرطان، آب مروارید و بیماری‌های مزمن می‌شود. اثرات سلامتی بخش و مفید مصرف مواد غذایی گیاهی تا حدودی به حضور مواد فنلی نسبت داده می‌شود که با خطرات ناشی از بیماری‌های ذکر شده در تقابل هستند. این اثرات از طریق جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها، اتصالات عرضی پروتئین‌ها، جهش DNA و آسیب‌های بافتی، حاصل می‌شوند. اگر چه ترکیبات فنلی و برخی از

مشتقات آنها در جلوگیری از اتواکسیداسیون بسیار موثر هستند، فقط استفاده از برخی از آنها به عنوان آنتی‌اکسیدان در مواد غذایی مجاز می‌باشد و تولیدکنندگان مواد غذایی از آنتی‌اکسیدان‌های مجاز که عمدتاً ماهیت فنلی دارند، جهت جلوگیری از تخریب کیفیت محصولات و حفاظت ارزش تغذیه‌ای آنها استفاده می‌نمایند [۲]. اصطلاح آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به ترکیباتی اشاره دارد که به طور طبیعی در بافت‌های جانوری یا گیاهی وجود دارند. همچنین در حین پخت یا فرآوری مواد غذایی تشکیل می‌شوند و می‌توان آنها را استخراج کرد. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی تقریباً در همه گیاهان، میکروارگانیسم‌ها، قارچ‌ها و حتی بافت‌های حیوانی یافت می‌شوند. عمده‌ترین گروه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، ترکیبات فنلی هستند که توکوفرول‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی مهم‌ترین آنها را تشکیل می‌دهند. عمده‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در مواد غذایی، ترکیبات فنلی و پلی‌فنلی با منشأ گیاهی هستند که به عنوان ترکیبات روبشگر رادیکال‌های آزاد، طبقه‌بندی می‌شوند و در بسیاری از میوه‌ها و سبزی‌ها به فراوانی وجود دارند [۳].

شنبليله با نام علمی (*Trigonella foenum-graceum*) گیاهی نهان‌دانه، از دولپه‌ای‌های جدا گلبرگ است که جزء راسته گل سرخ، تیره نخود، تیره فرعی پروانه‌داران و جنس (*Trigonella L.*) از گروه (*Trifolia*) است [۴]. شنبليله دارای اثر تقویتی، ملین، اشتهاآور، خلط‌آور و ضد تب، محرک جریان شیر و کاهنده قند خون است. همچنین این گیاه حاوی مقادیر زیادی آهن، فسفر و ویتامین D است [۵ و ۶]. مواد تشکیل دهنده اصلی دانه شنبليله که مهم‌ترین قسمت دارویی این گیاه است شامل ساپونین‌ها، آلکالوئیدها و فیبرهای موسیلاژی (۵۰ درصد) می‌باشند. میزان پروتئین در این گیاه بالا بوده و همچنین فلاونوئیدها در این گیاه به صورت

روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، حسی، رئولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد اولیه مورد استفاده در این تحقیق شامل شیر خام، استارتر (LAT BY 1-63، شرکت لاکتینا، بلغارستان)، پودر شیر خشک بدون چربی کم حرارت دیده (شرکت فونترا، نیوزیلند) و همچنین دانه‌های گیاه شنبلیله که از فروشگاه-های سطح شهرستان سبزوار خریداری و تهیه شدند.

۲-۲- روش تهیه عصاره آبی-الکلی

برای تهیه عصاره آبی-الکلی از روش ماسراسیون (خیساندن)، دانه‌های گیاه شنبلیله در ابتدا شسته، خشک و سپس آسیاب شدند. بدین منظور ۵۰ گرم از دانه آسیاب شده، داخل ارلن ریخته شد و به آن به میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شد. درب ارلن با فویل آلومینیومی بسته و به مدت ۷۲ ساعت همزده شد. ترکیبات داخل ارلن را با کاغذ صافی واتمن صاف گردید و مایع صاف شده را با کمک روتاری اواپراتور در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد تا حجم ۵۰٪ تغلیظ شد. عصاره بدست آمده را به مدت ۷۲ ساعت در آن ۴۵ درجه سانتیگراد قرار داده تا غلیظ‌تر شود و با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی استریل و برای مصرف آماده گردید [۱۴].

۲-۳- تولید ماست

قبل از تهیه ماست، ابتدا استارتر خشک شده که حاوی ترکیبی از باکتری‌های آغازگر لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس می‌باشد به میزان ۲ درصد به ۵۰۰ میلی‌لیتر شیر پس چرخ استریل اضافه شده و جهت تهیه

گلیکوزید هستند و می‌توان با کروماتوگرافی کاغذی آنها را جداسازی کرد که عمده‌ترین آنها شامل فلاونوئید آرابینوزیدی (Orientin)، فلاونوئید C-گلیکوزیدی (Vitexin) و کوئرستین (Quercetin) می‌باشند [۷].

در مطالعه‌ای صورت گرفته از، پودر شنبلیله به میزان ۲۰، ۳۰ و ۶۰ درصد جیره غذایی و سه فراکسیون تهیه شده از شنبلیله (چربی‌زدایی شده، بودن ساپونین و ساپونین خام که همه به میزان معادل پودر شنبلیله ۳۰ درصد در جیره غذایی وارد شده بودند) به مدت ۲ هفته جایگزین مواد غذایی چرب دریافت شده گردیدند که نتایج نشان دهنده کاهش نسبت کلسترول کل خون به کلسترول HDL بود [۸]. همچنین فراکسیون غنی از فیبر عصاره شنبلیله (۷۹/۴ درصد فیبر)، تریگونلین خالص‌سازی شده از شنبلیله با دوز ۵۰ گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی و جوشانده تهیه شده از شنبلیله (۴۰ گرم در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب) در پژوهش‌های مختلف توانستند باعث کاهش قابل توجه قند خون شوند [۹، ۱۰ و ۱۱].

عرب صالحی و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی غنی‌سازی ماست همزده با روغن خرفه مشاهده کردند فعالیت آنتی-رادیکالی نمونه‌ها در طی ۲۱ روز نگهداری با فواصل ۷ روز، اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت [۱۲]. گاد و السلام (۲۰۱۰) نیز با افزودن عصاره رزماری و چای سبز به ماست معمولی متوجه شدند که خواص آنتی‌اکسیدانی در طی نگهداری ماست کاهش نیافت و می‌توان گفت این ترکیبات باعث افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی و سلامتی زایی ماست شدند [۱۳]. از این رو با توجه به اهمیت استفاده از محصولات فراسودمند در رژیم تغذیه‌ای، هدف از این مطالعه بررسی تولید ماست همزده حاوی عصاره گیاه شنبلیله بر

۵-۲- اندازه‌گیری اسیدیته

ابتدا به ۹ گرم از نمونه ماست مقداری آب مقطر افزوده و سپس با سود یک دهم نرمال در حضور معرف فنل فتالین، تا پیدایش رنگ صورتی تیترا گردید. اسیدیته برحسب درصد اسید لاکتیک گزارش شد [۱۶].

۶-۲- اندازه‌گیری درصد آب اندازی (سینرسیس)

در این آزمون نمونه‌های ماست به خوبی همزده و یکنواخت شد و ۲۵ گرم از نمونه‌های ماست توزین و روی کاغذ صافی واتمن که در یک قیف بالای ظرف شیشه‌ای قرار داشت، ریخته شد و به مدت ۱۲۰ دقیقه در یخچال ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و سپس وزن مایع جمع شده در ظرف شیشه‌ای از وزن ظرف شیشه‌ای خالی کسر گردید و نتایج با استفاده از رابطه زیر به صورت درصد بیان شد [۱۷].

۱۰۰

رابطه (۱)

$\times$ وزن اولیه نمونه ماست / وزن مایع آزاد شده = آب اندازی ماست

۷-۲- اندازه‌گیری ترکیبات فنولی

بررسی میزان کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالتو انجام گردید. جهت رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنولی موجود در محصول برحسب اسید گالیک و با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج برحسب میلی گرم اسید گالیک در هر گرم نمونه ماست تولیدی بیان شد [۱۸].

ماست به ازای هر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر شیر، دو میلی‌لیتر از این مخلوط آماده، تلقیح شد. به منظور تهیه ماست، ماده جامد شیر با چربی حدود ۱/۴ درصد به میزان ۱۲ درصد با استفاده از شیر خشک پس چرخ استاندارد گردید. سپس توسط هیترا در حالی که عملیات اختلاط با همزن هموژن کننده به طور مداوم انجام خواهد شد، دمای شیر به ۷۰ درجه سانتیگراد رسید. بعد از آن سطوح مختلف عصاره دانه شنبلیله به نمونه‌های شیر داخل بن ماری افزوده و تیمارها ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد توسط همزن هموژنایزر به طور کامل همزده و یکنواخت شدند. سپس شیرهای حاصل به دمای ۸۵ درجه سانتیگراد رسیده و به مدت ۳۰ دقیقه در این دما مورد تیمار حرارتی قرار گرفته و به سرعت تا دمای ۴۵ درجه سانتیگراد خنک شدند. هنگامی که دمای شیر به ۴۵ درجه سانتیگراد می‌رسد ۲ میلی‌لیتر استارتر تهیه شد به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر شیر تلقیح شده و در ظروف پلاستیکی ۱۰۰۰ گرمی ریخته می‌گردد. ظروف حاوی نمونه، تا رسیدن به اسیدیته معادل ۸۰ درجه دورنیک در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. سپس ظروف حاوی ماست تولیدی تا دمای ۵ درجه سانتیگراد خنک گردیده و در زمان‌های ۱، ۷ و ۱۴ روز بعد از تولید آزمون‌های مورد نظر بر روی آنها صورت گرفت [۱۵].

۴-۲- اندازه‌گیری pH

سنجش pH نمونه‌های ماست دستگاه pH متر (مدل HI99164، شرکت Hanna، آمریکا) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد صورت می‌گیرد [۱۶].

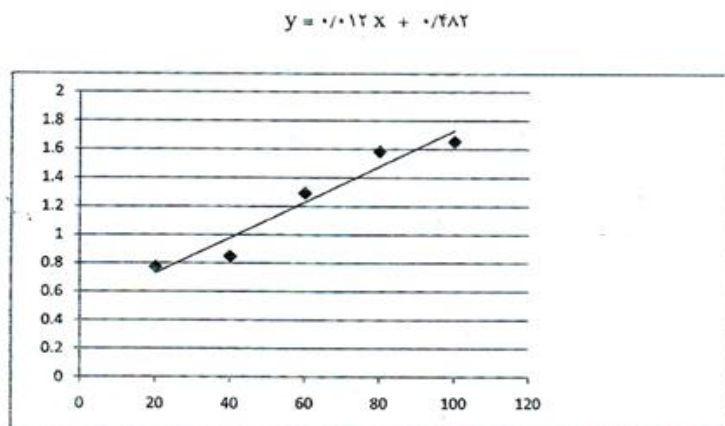


Fig 1 Gallic acid standard curve

جذب نوری غلظت‌های مختلف اسانس و عصاره را بیان می‌کند [۱۹].

۸-۲- اندازه‌گیری فعالیت‌های آنتی اکسیدانی

۹-۲- اندازه‌گیری ویسکوزیته

ویسکوزیته نمونه‌های تولیدی با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد (R-DVII) اندازه‌گیری شد. در این آزمایش پس از آزمون‌های اولیه اسپیندل شماره ۶ به عنوان اسپیندل مناسب جهت اندازه‌گیری ویسکوزیته انتخاب شد. کلیه آزمون‌ها در دمای ۵ درجه سانتیگراد و با شرایط یکسان انجام شد به طوری که ویسکوزیته نمونه‌ها در سرعت ۷۰ دور در دقیقه و پس از گذشت ۱۵ ثانیه از چرخش اسپیندل قرائت شد [۲۰].

۱۰-۲- ارزیابی خصوصیات حسی

به منظور ارزیابی کیفیت محصول تولیدی و رسیدن به بهترین فرمولاسیون نمونه‌های ماست حاوی عصاره در معرض قضاوت داوران مربوط گذاشته شد و پس از آموزش‌های مقدماتی تعداد ۱۰ نفر به عنوان ارزیاب انتخاب و با استفاده از روش هدونیک (۵ نقطه‌ای) نمونه‌های ماست تهیه شده را از نظر طعم، بافت، رنگ و پذیرش کلی محصول ارزیابی کردند. به این ترتیب که حداکثر نمره (۵) به منزله عالی بودن

اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از معرف دی- فنیل پیکریل هیدرازیل انجام شد که یک ترکیب رادیکالی پایدار با رنگ بنفش می‌باشد که با احیاء شدن توسط عناصر دهنده الکترون یا هیدروژن در ترکیبات آنتی اکسیدانی به دی- فنیل پیکریل هیدرازین زرد رنگ تبدیل می‌شود. در این روش ۱ سی سی از غلظت‌های مختلف عصاره ماست در ۳ تکرار به ۸۰٪ اتانول و ۳/۵ میلی متر محلول ۰/۰۱ گرم (DPPH) اضافه شد و پس از ۳۰ ثانیه تکان دادن توسط ورتکس و ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر بر بلانک قرائت شد و همچنین برای نمونه شاهد به جای عصاره از ۱ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ استفاده شد و درصد رادیکال‌های آزاد (DPPH) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\%I = (A_{\text{blank}} / A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times 100 \quad \text{رابطه (۲)}$$

در این فرمول (A_{blank}) جذب نوری کنترل منفی را که فاقد اسانس و عصاره می‌باشد نشان می‌دهد و (A_{sample}) میزان

نمونه و کمترین نمره (۱) که نشان دهنده خیلی ضعیف بودن نمونه است و بدین منظور جدولی جهت امتیازدهی افراد تهیه گردید [۲۱].

۱۱-۲- تجزیه و تحلیل آماری

تحلیل آماری داده‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SAS در سطح معنی‌داری ۵ درصد صورت گرفت و جهت رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۱-۳- بررسی تغییرات pH ماست

تاثیر متغیرهای عصاره دانه گیاه شنبلیله و مدت زمان نگهداری بر میزان pH ماست در شکل (۱) نشان داده شده است. تغییرات pH در نمونه‌های ماست حاوی عصاره در طی زمان نگهداری ۱۴ روز توانست اثر معنی‌داری را نشان دهد ($P < 0/05$). در واقع در روز اول با افزایش درصد عصاره دانه گیاه شنبلیله تا مقدار ۰/۶ درصد، شاخص pH کاهش یافت که به دلیل فعالیت باکتری‌های آغازگر در ماست و تولید اسید لاکتیک می‌باشد [۲۲].

نتایج آنالیز واریانس اثر متقابل عصاره دانه گیاه شنبلیله و زمان نگهداری که با افزایش میزان عصاره از ۰/۲ به ۰/۴ درصد و مدت زمان نگهداری از یک به ۱۰ روز مقدار عددی pH روندی نزولی از خود نشان داد. قابل ذکر است که کمترین مقدار pH در مقدار ۰/۶ درصد عصاره شنبلیله و مدت زمان ۱۴ روز حاصل گردید. یکی از خصوصیات دانه شنبلیله که مهمترین قسمت دارویی این گیاه است داشتن حداقل ۵۰ درصد فیبرهای موسیلاژی است که می‌توان پیش‌بینی نمود که با افزایش میزان عصاره دانه شنبلیله در

نمونه‌های تولیدی و به دنبال آن تشکیل حالت ژلی سبب تاخیر در غیرفعال شدن استارترها هنگام نگهداری حتی در دماهای پایین شده و تاثیر خود را بر میزان شاخص pH گذاشته و می‌تواند باعث کاهش آن شود [۲۳].

۲-۳- بررسی تغییرات اسیدیته ماست

تاثیر متغیرهای مستقل عصاره دانه گیاه شنبلیله و مدت زمان نگهداری بر میزان اسیدیته ماست در شکل (۱) نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس اثر خطی هر دو متغیر مستقل بر تغییرات اسیدیته ماست تولید شده معنی‌دار بود ($P < 0/05$). یکی از دلایلی که می‌توان در نظر گرفت این است که، با افزایش زمان نگهداری، عصاره دانه شنبلیله در افزایش پارامتر اسیدیته تاثیرگذار است به طوری که به افزایش سوبسترای و نهایتاً رشد میکروارگانیسم‌ها کمک کرده و در ادامه به مصرف قند شیر، کاهش pH و افزایش اسیدیته منجر می‌گردد [۲۴].

همچنین نتایج آنالیز واریانس برای اثر متقابل دو متغیر نشان داد که با افزایش میزان عصاره دانه گیاه شنبلیله و زمان نگهداری، تغییرات اسیدیته ماست افزایش می‌یابد. به ترتیب با افزایش غلظت عصاره دانه شنبلیله از ۰/۲ به ۰/۶ درصد و مدت زمان نگهداری تا حدود ۱۴ روز میزان اسیدیته ماست روندی صعودی را نشان داد که مقدار بهینه این شاخص برابر ۸۰/۳۹ درصد حاصل شد. با توجه به تغییرات شاخص‌های pH و اسیدیته ماست و به موازات هم تغییرات اسیدیته در نمونه‌های حاوی عصاره دانه شنبلیله کمتر بود و این کمتر بودن، متناسب با غلظت این متغیر مستقل در نمونه‌های تحت آزمایش می‌تواند با کنترل مقادیر اسیدیته و pH در ماست همراه بوده و در مرحله بعدی سبب پوشاندن طعم ترشی محصول در طول زمان نگهداری گردد که نتایج حاصله

با تحقیق لطفی‌زاده دهکردی و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد [۱۵].

۳-۳- بررسی تغییرات آب‌اندازی ماست

یکی از معایب عمده ماست آب‌اندازی است که مستقیماً می‌تواند به عواملی مانند میزان اختلال فیزیکی، کاهش ناگهانی pH، عدم کنترل درست درجه حرارت در مدت گرمخانه‌گذاری ارتباط داشته که در نهایت باعث به هم خوردن شبکه مسیل‌های پروتئینی می‌شود [۲۵].

نتایج آنالیز اثر متغیرهای عصاره دانه گیاه شنبلیله و زمان نگهداری، بر میزان آب‌اندازی ماست نشان داد که اثر خطی هر دو متغیر بدست آمده بر میزان آب‌اندازی معنی‌دار بود ($P < 0.05$). همان‌طور که در قبل ذکر شد تغییرات pH می‌تواند عاملی تأثیرگذار در آب‌اندازی در ماست و چروکیدگی ساختار سه بعدی شبکه پروتئینی باشد که منجر به کاهش قدرت اتصال پروتئین‌های آب‌پنیر و خروج آنها از ماست گردد. به همین دلیل با گذشت زمان میزان آب‌اندازی افزایش یافت. بنابراین می‌توان گفت که بین میزان آب‌اندازی نمونه‌ها و تغییرات pH رابطه‌ای مستقیم مشاهده می‌شود [۲۶].

برخلاف انتظار، در بررسی اثر متقابل عصاره دانه گیاه شنبلیله و زمان نگهداری مقایسه میانگین داده‌های حاصل از این دو

متغیر مشخص شد اختلاف معنی‌داری بین تمامی میانگین‌ها وجود دارد و در مقادیر ۰/۴ و ۰/۶ درصد عصاره و روز ۱۴ بیشترین درصد سینرسیس اتفاق افتاد ($P < 0.05$). این اتفاق را در پژوهش حاضر می‌توان این‌گونه توجیه نمود که با توجه به زنده‌مانی و فعالیت باکتری‌های آغازگر ماست در حین نگهداری به خصوص در دمای پایین و در نتیجه هیدرولیز و هضم پروتئین‌های محصول توسط آنها، با گذشت زمان، میزان سینرسیس نمونه‌ها افزایش می‌یابد چرا که پروتئین‌های عامل بافت مطلوب خاصیت خود را از دست داده و پیوند با آنها گسسته می‌شود [۲۴]. از سوی دیگر، با توجه به دارا بودن فیبرهای موسیلاژی دانه شنبلیله این انتظار وجود داشت که با افزودن عصاره این ماده به فرمولاسیون کاهش درصد سینرسیس اتفاق افتاد که در واقع صورت نگرفت و با تحقیقات بلکر و همکاران (۲۰۰۱) همخوانی دارد. همچنین گارسیا پرز و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند افزایش یک گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر فیبر پرتقال به ماست سینرسیس را کاهش داده و خواص کرمی را بهبود می‌بخشد و موجب افزایش سفتی ژل و چسبندگی محصول خواهد گردید [۲۷ و ۲۸].

Table 1 The effect of different levels of Fenugreek seed extract on the amount of changes in pH, acidity and syneresis of yogurt

Amount of extract (%)	Day	pH	Acidity	Syneresis
Sample	1	4.15±0.01 ^a	74.89±0.03 ^a	10.12±0.06 ^a
0.2	1	4.09±0.05 ^d	75.92±0.05 ^b	12.54±0.04 ^d
0.4	1	4.05±0.05 ^c	77.84±0.07 ^f	14.22±0.02 ^f
0.6	1	4.01±0.02 ^f	80.01±0.05 ^e	14.88±0.10 ^j
Sample	7	4.05±0.02 ^b	76.45±0.06 ^c	11.12±0.07 ^b
0.2	7	3.98±0.04 ^g	78.49±0.04 ^g	13.34±0.05 ^e
0.4	7	3.86±0.04 ⁱ	78.95±0.03 ⁱ	13.79±0.03 ^h
0.6	7	3.73±0.01 ^j	80.76±0.01 ^l	14.57±0.28 ^k
Sample	14	4.01±0.01 ^e	79.87±0.04 ^d	11.68±0.04 ^c

0.2	14	3.81 ± 0.03^h	81.02 ± 0.02^h	12.87 ± 0.17^g
0.4	14	3.69 ± 0.02^k	81.89 ± 0.01^j	14.11 ± 0.31^i
0.6	14	3.47 ± 0.01^l	83.77 ± 0.17^k	15.83 ± 0.02^l

±: Values indicate standard deviation

a-l: Averages with different superscripts in the same row have a significant difference (less than 0.05).

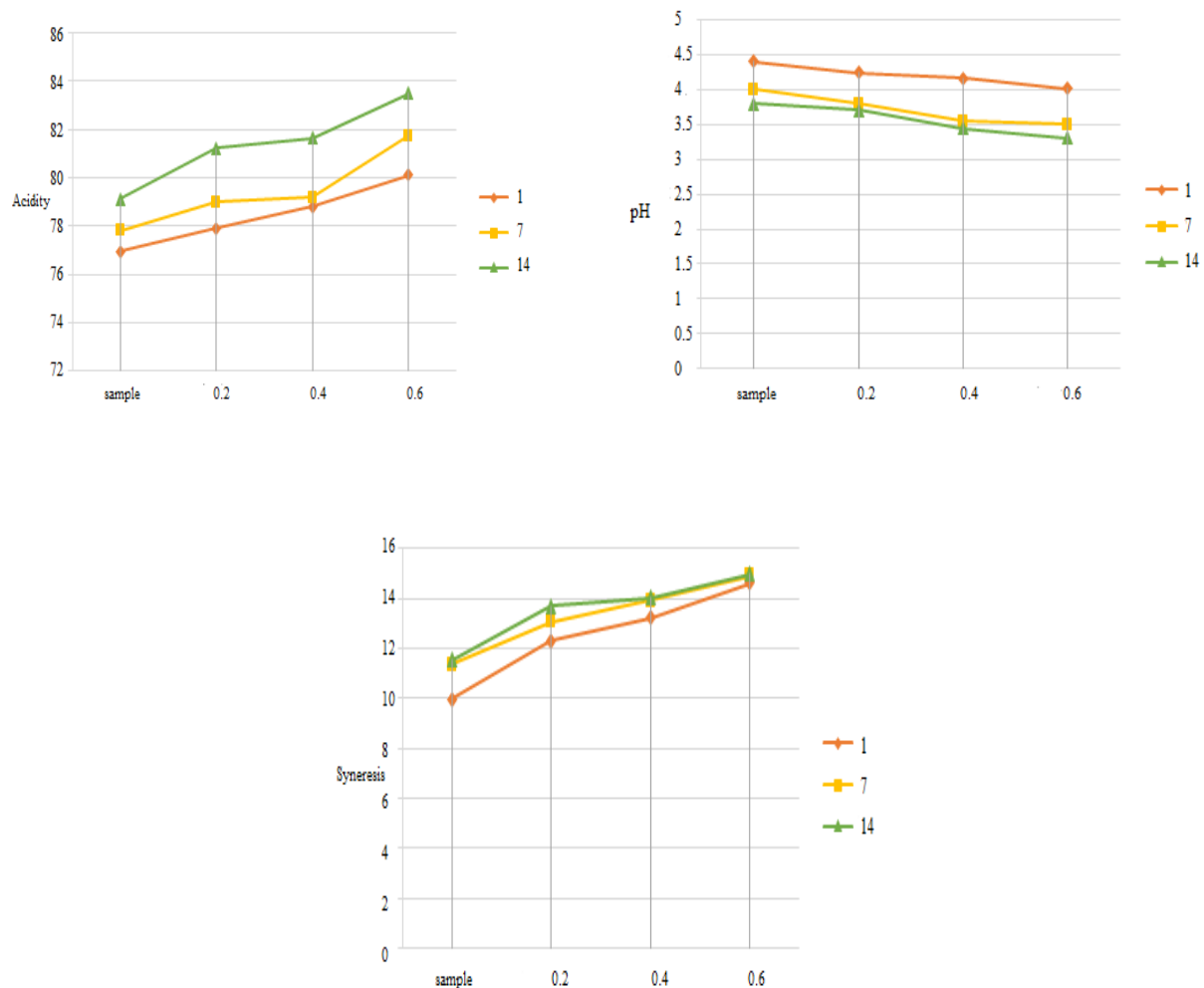


Fig 2 Changes related to pH, acidity and syneresis of yogurt containing Fenugreek seed extract

۳-۴- بررسی ترکیبات فنلی ماست

اسیدهای فنولی^۱ (مشتقات اسید بنزوئیک^۲ و اسید سینامیک^۳)، فلاونوئیدها^۴ و دی ترپن‌ها^۵ می‌باشند [۲۹].

در بین متغیرهای مورد بررسی بر میزان ترکیبات فنلی، اثر خطی ($P < 0.05$) عصاره دانه شنبلیله بر ترکیبات فنلی معنی-

گیاهان منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهی، به طور کلی ماهیت فنولی داشته، شامل ترکیباتی نظیر توکوفرول‌ها، کارتنوئیدها،

⁴- Flavonoids

⁵- Di Terpenes

1- Phenolic acids

²- Benzoic acid

³- Cinamic acid

دار بود که این نتایج با پژوهش‌های فرقانی و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت داشت [۳۰]. نتایج آنالیز واریانس برای اثر متقابل دو متغیر نشان داد که با افزایش میزان عصاره دانه گیاه شنبلیله و زمان نگهداری، میزان ترکیبات فنلی روندی صعودی را در محصول تولیدی ماست خواهند داشت. بیشترین مقدار ترکیبات فنلی مربوط به سطح عصاره ۰/۶ درصد در روز اول نگهداری و کمترین مقدار ترکیبات اندازه‌گیری شده در نمونه‌های شاهد در هر سه بازه زمانی مشاهده گردید.

مقادیر بالای ترکیبات فنلی موجود در شنبلیله منجر به غنی شدن ماست حاوی عصاره آبی-الکلی شنبلیله از نظر ترکیبات فنلی نسبت به ماست شاهد می‌گردد. فلاونوئیدها، سزکوئی-ترپن‌ها و استرول‌های از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فراوان موجود در شنبلیله بوده که در کنار کومارین، تانن و ترکیبات کاروتنوئیدی در شنبلیله مشاهده شده‌اند [۳۱]. دلیل دیگری که می‌توان به وجود ترکیبات فنلی در سطح بالای عصاره در روز اول اشاره نمود دارا بودن دانه شنبلیله از اسیدهای چرب غیراشباع و همچنین وجود چربی در شیر اولیه برای تولید محصول است. با افزایش غلظت عصاره شنبلیله میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش چشمگیری داشت اما با گذر زمان این فعالیت تا حدودی کاهش نشان داد که علت آن را در ابتدای فعالیت به حضور ترکیبات فنلی و در انتهای دوره نگهداری به دلیل حضور و افزایش فعالیت آنزیم لیپاز، تولید اسیدهای چرب روندی صعودی پیدا نمود و در عوض، تا حدودی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاسته شد که با مطالعات پدram نیا و همکاران (۲۰۲۲) مطابقت دارد [۳۲].

۳-۵- بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ماست

نتایج حاصل از خاصیت آنتی‌اکسیدانی در جدول (۲) آورده شده است. نتایج آنالیز اثر متغیرهای عصاره دانه شنبلیله و زمان نگهداری، بر میزان فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ماست نشان داد که اثر خطی هر دو متغیر بدست آمده بر میزان این شاخص معنی‌دار بود ($P < 0/05$). با افزایش میزان عصاره دانه شنبلیله (۰/۶ درصد) درصد مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش یافت که می‌توان به بالا بودن مقادیر فلاونوئیدها، ترکیبات کاروتنوئیدی و انواع ترپن‌ها در گیاه شنبلیله نسبت داد [۳۱]. قاسمی‌کیا و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که پروتئین استخراج شده از دانه شنبلیله به کمک امواج فراصوت، به عنوان یک محصول طبیعی دارای توانایی چشمگیری در مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH) می‌باشد. همچنین بیان کردند عملکرد احتمالی توانایی مهار رادیکال آزاد توسط نمونه‌های مورد مطالعه ممکن است با انتشار الکترون یا انتقال هیدروژن به رادیکال‌های آزاد از گروه‌های مختلف هیدروکسیل موجود در ساختار پروتئین مرتبط باشد و در نتیجه می‌تواند واکنش زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد را متوقف کند [۳۳].

نتایج آنالیز واریانس برای اثر متقابل دو متغیر نشان داد که با افزایش میزان عصاره دانه گیاه شنبلیله و زمان نگهداری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در محصول تولیدی ماست بیشتر خواهد شد. همچنین بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول ماست مربوط به سطح ۰/۶ درصد و در روز اول نگهداری مشاهده شد ($P < 0/05$). علاوه بر فعالیت آنزیم لیپاز که می‌تواند مربوط به وجود ترکیبات چرب موجود در عصاره شنبلیله و شیر باشند، حبیبی نجفی و همکاران (۲۰۱۸) نیز اذعان داشتند پپتیدهای حاصل از پروتئولیز نمونه‌های ماست می‌توانند درجه آنتی‌اکسیدانی متفاوتی از خود نشان دهند به طوری که با گذشت زمان و افزایش میزان

هیدرولیز تا روز بیستم از میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در بعضی نمونه‌ها کم شده و در بعضی نمونه‌ها یا با تغییر بسیار جزئی همراه بوده است یا بدون تغییر ثابت مانده است که نتایج با پژوهش حاضر نیز مطابقت دارد. دلیل این کاهش می‌تواند مرتبط با هیدرولیز بیشتر و شکست در مناطقی از پپتیدهای زیست فعال باشد که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند [۳۴].

۳-۶- بررسی ویسکوزیته ماست

تأثیر متغیرهای مستقل بر میزان ویسکوزیته ماست در جدول (۲) نشان داده شده است. با توجه به نتایج آنالیز واریانس داده‌ها مشاهده می‌شود که عصاره دانه شنبلیله تأثیر معنی‌داری بر تغییرات ویسکوزیته داشته، به طوری که اثر خطی ($P>0/05$)، روندی کاهشی را از خود نشان داده است. کاهش ویسکوزیته می‌تواند به دلیل تغییرات شاخص pH و به حداقل رسیدن حلالیت پروتئین می‌تواند منجر به حالت دانتوراسیون این ماکرومولکول شود. از سوی دیگر ویسکوزیته شاخص پایداری پروتئین است، بنابراین در pH های بالاتر از ۴/۶ دافعه یونی میان میسل‌های کازئینی، تجمع آنها را با مشکل همراه می‌کند [۳۵]. با داشتن فیبرهای موسیلاژی در دانه شنبلیله این انتظار وجود داشت که با افزایش غلظت عصاره دانه شنبلیله، مقدار ویسکوزیته نیز افزایش یابد که رخ نداد و با مطالعات زمردی (۲۰۱۲) با کاربرد فیبر گندم و شریعتمدار طهرانی و شریفی (۲۰۱۷) فیبر حاصل از ساقه شوید و ریحان در محصول ماست مغایرت داشت [۳۶ و ۳۷].

نتایج بررسی اثر متقابل عصاره دانه گیاه شنبلیله و زمان نگهداری نیز نشان داد که با افزایش عصاره شنبلیله از ۰/۲ به ۰/۴ درصد ابتدا میزان ویسکوزیته افزایش و سپس با افزایش

از غلظت ۰/۴ به ۰/۶ درصد میزان شاخص ویسکوزیته کاهش یافت، علاوه بر این که با افزایش زمان نگهداری تا ۱۴ روز پارامتر ویسکوزیته کاهش چشمگیری پیدا کرد. در نهایت به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار ویسکوزیته ۳۵۰۰ سانتی پواز (نمونه شاهد در روز اول) و ۷۰۳ سانتی پواز (نمونه حاوی ۰/۶ درصد در روز چهاردهم) حاصل شد. این تغییرات نسبی کم با نتایج لطفی‌زاده دهکردی و همکاران (۲۰۱۳) و حسینی و سیفی (۲۰۲۲) که به ترتیب از عصاره‌های گیاه شنگ و آویشن استفاده کردند، مطابقت دارد و در هر دو تحقیقات علت را عدم تشکیل مناسب ژل دانستند بدین صورت که در طی فرآیند اتصال آب آزاد با ماکرومولکول‌ها به خصوص پروتئین‌های موجود در شیر، سبب پایداری شبکه پروتئینی و محدودیت در حرکت آب شده و می‌تواند پیوندهای قوی‌تری بین آب و پروتئین ایجاد گردد، اما استفاده از عصاره‌های استخراج شده از گیاهان می‌تواند با توجه به ایجاد تغییرات در pH و رقابت با آب موجود در شیر فاصله‌ای در برقراری پیوند آب و پروتئین و افزایش ویسکوزیته اختلال نموده و خصوصیات بافتی ماست را تحت تأثیر خود قرار دهد [۱۵ و ۳۸]. در تولید ماست بررسی خواصی نظیر خواص رئولوژیکی که عمدتاً عبارت از ویسکوزیته، سفتی بافت و ظاهر آن و خاصیت سینرسیس که درواقع همان خاصیت آب انداختن ماست می‌باشد بسیار ضروری است. این خواص خود وابسته به چند عامل مهم از جمله میزان مواد جامد ماست، میزان چربی، میزان پروتئین‌های موجود، نوع و نسبت پروتئین‌ها، نوع و غلظت ثبات دهنده‌ها و یا قوام دهنده‌های مورد استفاده و شرایط فرآیندی نظیر عملیات حرارتی می‌باشد [۳۹].

Table 2 The effect of different levels of Fenugreek seed extract on the amount of phenolic compounds, antioxidant activity and viscosity of yogurt

Amount of extract (%)	Day	Phenolic compounds	Antioxidant activity	Viscosity
Sample	1	466±0.01 ^a	56.91±0.01 ^a	3567±0.04 ^c
0.2	1	490±0.05 ^c	69.70±0.03 ^b	1950±1.28 ^c
0.4	1	497±0.04 ^e	70.71±0.03 ^c	3200±1.20 ^c
0.6	1	499±0.01 ^g	70.98±0.03 ^d	3050±6.50 ^c
Sample	7	465±0.02 ^b	57.95±0.06 ^a	1782±0.40 ^b
0.2	7	491±0.04 ^d	75.66±0.04 ^b	1022±0.02 ^b
0.4	7	495±0.04 ^f	78.57±0.03 ^c	1167±0.66 ^b
0.6	7	495±0.01 ^h	79.87±0.01 ^d	1159±0.30 ^b
Sample	14	466±0.01 ^a	45.71±0.04 ^a	1280±0.90 ^a
0.2	14	491±0.03 ^d	65.51±0.02 ^b	759±1.50 ^a
0.4	14	495±0.02 ^f	67.24±0.01 ^c	711±3.88 ^a
0.6	14	493±0.01 ⁱ	68.27±0.11 ^d	703±3.96 ^a

±: Values indicate standard deviation

a-l: Averages with different superscripts in the same row have a significant difference (less than 0.05).

نتایج آنالیز واریانس اثر متقابل عصاره دانه گیاه شنبلیله و زمان نگهداری نیز مشخص نمود به مرور زمان افزودن عصاره تاثیر معنی‌داری داشته و منجر به کاهش پارامتر پذیرش کلی نمونه‌ها، از نظر ارزیاب‌ها شده است. نمونه شاهد در روز اول بالاترین و نمونه حاوی ۰/۲ درصد عصاره در روز ۱۴ پایین‌ترین امتیازات کیفی خواص حسی را کسب کردند ($P < 0.05$). در واقع افزودن عصاره دانه شنبلیله تاثیر نامطلوبی بر خصوصیات حسی ماست نداشت اما در طول نگهداری از میزان مطلوبیت ماست کاسته شد. نتایج تحقیق حاضر با مطالعه صوفی و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد چون آنها به منظور تولید ماست کم چرب پری‌بیوتیک حاوی اینولین از سه سطح استفاده و بیان کردند با افزایش غلظت اینولین، مقدار پذیرش کلی نمونه‌های ماست ابتدا افزایش و سپس کاهش یافته بود؛ که این امر به دلیل تاثیر اینولین در ایجاد بافت و مزه خامه‌ای و مشابه ماست‌های پرچرب می‌باشد [۴۱]. با توجه تحقیق کاکوئی و همکاران (۲۰۰۷)، کنسانتره پروتئینی آب پنیر به جای شیرخشک در تهیه ماست به دلیل خاصیت هیدروفیلی بیشتر پروتئین‌های سرمی نسبت

۳-۷- بررسی خصوصیات حسی ماست

در شکل (۲) تاثیر متغیرهای عصاره دانه شنبلیله و زمان نگهداری بر میزان خصوصیات حسی از جمله طعم، بافت، رنگ و پذیرش کلی ماست تولیدی ملاحظه می‌شود. در اکثر موارد نمونه‌های ماست شاهد امتیاز حسی بالاتری نسبت به نمونه‌های حاوی عصاره دانه شنبلیله کسب نمودند. بررسی داده‌ها و تجزیه و تحلیل آنها نشان داد که نمونه حاوی ۰/۶ درصد عصاره بیشترین تاثیر را بر شاخص‌های رنگ و بافت ماست تولیدی داشته در حالی که هر سه سطح عصاره مصرفی تاثیری بر پارامتر پذیرش کلی ($P > 0.05$)، نداشتند که این نتایج با تحقیقات امام اوغلو و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت داشت و در نتایج خود بیان کردند استفاده از سطوح بالاتر ترکیبی از اسانس‌های زعفران، آویشن و زیره سبز باعث کاهش میزان ویسکوزیته، در ادامه تغییر احساس دهانی و در نهایت کاهش پذیرش کلی محصول تولیدی گردید [۴۰].

به دلیل تولید بیشتر دی‌استیل و اسیدیته نسبت به نمونه شاهد و همچنین بهبود ساختمان ژل و قوام ماست خامه‌ای شده، پذیرش کلی محصول بهبود یافته و به نمونه شاهد نزدیکتر شد [۴۲].

به کازئین باعث خامه‌ای شدن بافت ماست در نمونه‌های تولیدی شد و این بافت از نظر اکثر مصرف‌کنندگان مطلوب بوده و احساس دهانی مطبوع ایجاد می‌کند. لذا در طول دوره نگهداری ماست غنی‌سازی شده با کنسانتره پروتئینی آب پنیر



Fig 3 The effect of Fenugreek seed extract and storage time on the sensory properties of yogurt

اثری زیاد در شاخص‌های pH، اسیدیته و درصد آب‌اندازی داشته باشد. با افزودن سطح عصاره تا ۰/۶ درصد به ترتیب میزان ترکیبات فنلی در روز اول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روز ۷ نگهداری بیشترین مقادیر را از خود نشان دادند. با ایجاد تغییرات در pH و اسیدیته با افزایش سطح مصرف عصاره دانه شنبلیله (نمونه حاوی ۰/۶ درصد در روز

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه به بررسی تاثیر افزودن عصاره آبی-الکلی دانه گیاه شنبلیله در ماست پرداخته شد. نتایج بررسی اثر متقابل عصاره دانه گیاه شنبلیله و زمان نگهداری نشان داد افزایش سطح عصاره تا ۰/۶ درصد و مدت زمان ۱۴ روز می‌تواند

روز اول بالاترین و نمونه حاوی ۰/۲ درصد عصاره در روز ۱۴ پایین‌ترین امتیازات کیفی خواص حسی را کسب کردند.

چهاردهم) مقدار شاخص ویسکوزیته به کمترین مقدار خود (۷۰۳ سانتی پواز) نزدیک شد. از نظر ارزیاب‌ها به منظور تعیین شاخص پذیرش کلی محصول ماست نمونه شاهد در

۵- منابع

- [1] Çon, A.H., Çakmakçi, S., Çağlar, A., and Gökalp, H.Y. 1996. Effects of different fruits and storage periods on microbiological qualities of fruit-flavored yogurt produced in turkey. *Journal of Food Protection*, 59(4): 402-406.
- [2] Mahiyan, R.A., Elhami Rad, A.H., and Jalali, M. 2015. Check active packaging has antioxidant properties in food products. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 9(7): 1163-1168.
- [3] Antolovich, M., Bedgood, D.J.R., Bishop, A., Jardine, D., Prenzler, P., and Robards, K. 2004. LC-MS investigation of oxidation products of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4): 962-971.
- [4] Dini, M. 2006. Scientific name of medicinal plants used in traditional medicine. Forest and Rangeland Research Institute Publication, ISBN: 964-473-224-3. [In Persian].
- [5] Ruby, B.C., Gaskill, S.E., Slivka, D., and Harger, S.G. 2005. The addition of fenugreek extract (*Trigonella foenum-graecum*) to glucose feeding increases muscle glycogen resynthesis after exercise. *Amino Acids*, 28: 71-76.
- [6] Morcos, S.R., Elhawary, Z., and Gabrial, G.N. 1981. Protein rich food mixtures for feeding the young in Egypt. 1. Formulation. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 20: 275-282.
- [7] Niknam, R., Kiani, H., Mousavi, Z.E., and Mousavi, M. 2021. Extraction, Detection, and Characterization of Various Chemical Components of *Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugreek) Known as a Valuable Seed in Agriculture. In: Naeem, M., Aftab, T., and Khan, M.M.A. (eds) Fenugreek. Springer, Singapore.
- [8] Al-Habori, M., Al-Aghbari, A.M., and Al-Mamary, M. 1998. Effects of fenugreek seeds and its extracts on plasma lipid profile. a study on rabbits. *Phytotherapy Research*, 12(8): 572-575.
- [9] Ribes, G., Sauvaire, Y., Baccou, J.C., Valette, G., Chenon, D., Trimble, E., and Loubatieres-Mariani, M.M. 1984. Effects of fenugreek seeds on endocrine pancreatic secretions in dogs. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 28(1): 37-43.
- [10] Zhou, J., Chan, L., and Zhou, S. 2012. Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. *Current Medicinal Chemistry*, 19(21): 3523-3531.
- [11] Alarcon-Aguilara, F.J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C., and Flores- Saenz, J.L. 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2): 101-110.
- [12] Arab Salehi Nasrabadi, M., Ghorbani, M., Sadeghi Mahunak, A., and Khomeiri, M. 2019. Yogurt enrichment with Common purslane oil (*Portulacaoleracea*) and its physicochemical, antioxidant and sensory properties. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 16(92): 23-36. [In Persian].
- [13] Gad, A.S., and El-Salam, M.H.A. 2010. The antioxidant properties of skim milk supplemented with rosemary and green tea extracts in response to pasteurisation, homogenisation and the addition of salts. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3): 349-355.
- [14] Abpeikar, Z., Lohrasbi, P., and Monsefi, M.Z. 2015. The comparison of dill seed and leaf aqueous extracts (*Anethum Graveolens* L.) on histomorphometrical changes of rat uterus and ovaries. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 28(2): 116-124. [In Persian].
- [15] Lotfizadeh Dehkordi, S., Shakerian, A., and Mohammadi, A., 2013. Effect of extract from *Tragopogon graminifolius* DC. on properties sensory, shelf life and the viscosity rate yogurt. *Journal of Medicinal Herbs*, 4(1): 49-57. [In Persian].
- [16] Iran National Standards Organization. 2022. Milk and milk products-Determination of titrable acidity and pH-Test method. 2nd Revision, No. 2852. [In Persian].
- [17] Tamime, A.Y., Barrantes, E., and Sword, A.M. 1996. The effects of starch based fat substitutes on the microstructure of set-style yogurt made from reconstituted skimmed milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, 4(1): 1-10.

- [18] Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., and Gargova, S. 2007. Antioxidant activity of ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*, 102(3): 764-770.
- [19] Burits, M., and Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14(5): 323-328.
- [20] Sah, B.N.P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., and Donkor, O.N. 2016. Physicochemical, textural and rheological properties of probiotic yogurt fortified with fibre-rich pineapple peel powder during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 65: 978-986.
- [21] Barrantes, E., Tamime, A.Y., and Sword, A.M. 1994. Production of lowcalorie yogurt using skim milk powder and fat-substitute. 3. Microbiological and organoleptic qualities. *Milchwissenschaft*, 49(4): 205-208.
- [22] Talei, G.R., Meshkatsadat, M.H., and Mosavi, S.Z. 2008. Antibacterial activity native medicinal plants extracts in Lorestan, Iran. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*, 10(1): 31-35. [In Persian].
- [23] Kosikowski, F.V. 1981. properties of commercial flavored frozen yogurt. *Journal of Food Protection*, 44(11): 853-856.
- [24] Tarakçi, Z., and Küçüköner, E. 2003. Physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of some fruit-flavored yoghurt. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14(2): 10-14.
- [25] Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., and Schrezenmeir, J. 2001. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2): 421-429.
- [26] Bröls, M., Foroutanparsa, S., Maljaars, C.E.P., Olsthoorn, M., Tas, R.P., and Voets, I.K. 2024. Investigating the impact of exopolysaccharides on yogurt network mechanics and syneresis through quantitative microstructural analysis. *Food Hydrocolloids*, 150: 109629.
- [27] Blecker, C., Chevalier, J.P., Herck, J.C., Fougnes, C., Deroane, C., and Paquot, M. 2001. Inulin: Its physio-chemical properties and technological functionality. *Recent Research Development in Agriculture and Food Chemistry*, 5: 125-131.
- [28] García-Pérez, F.J., Sendra, E., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., and Pérez-Alvarez, J.A. 2006. Rheology of orange fiber enriched yogurt. *Milchwissenschaft*, 61(1): 55-59.
- [29] Rashmi, H.B., and Negi, P.S. 2022. Chapter 3 - Chemistry of plant extracts. *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, ISBN: 978-0-12-822475-5, pp:39-73.
- [30] Forgani, S., Peighambaroust, S.H., and Olad Ghaffari, A. 2017. Investigating organoleptic and physicochemical properties of functional set yogurt incorporating oat milk. *Iranian Journal of Biosystem Engineering*, 48(3): 279-288. [In Persian].
- [31] Hasanzadeh, E., Rezazadeh, S., Shamsa, S., Dolatabadi, R., and Zarringhalam, J. 2010. Review on phytochemistry and Therapeutic properties of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*). *Journal of Medicinal Plants*, 9(34): 1-18. [In Persian].
- [32] Pedram Nia, A., Sabetghadam, M., and Jalali, M. 2022. Optimization of chestnut (*Aesculus hippocastanum*) fruit extract extraction process by response surface methodology and evaluation of its antioxidant effect on the stability of soybean oil during shelf life. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 18(120): 389-400. [In Persian].
- [33] Ghasemi Kia, A., Ganjloo, A., and Bimakr, M. 2022. Optimization of ultrasound-assisted extraction of Fenugreek Seed protein and evaluation of its structural, functional Properties and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 19(126): 39-55. [In Persian].
- [34] HabibiNajafi, M.B., Fatemizade, S., and Tavakoli, M. 2018. Release of proteolysis products with aceinhibitory and antioxidant activities in probiotic yogurt containing different levels of fat and prebiotics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19(4): 275-380.
- [35] Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S., and Corrieu, G. 2004. The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(2): 113-137.
- [36] Zomorodi, Sh. 2012. Physicochemical, rheological and sensory properties of stirred fruit yoghurt fortified by wheat fiber. *Journal of Food Research*, 22(4): 443-454. [In Persian].
- [37] Shariatmadar Tehrani, H., and Sharifi, A. 2017. Investigating the possibility of producing synthetic biotic yogurt containing *Lactobacillus kaisii* and fibrillum from basil and stem. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 9(1): 1-13. [In Persian].
- [38] Hosseini, M., and Saifi, T. 2022. The effect of aqueous-alcoholic extract of thyme and inulin on physicochemical properties of traditional Bokez Ilam

yogurt. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 19(126): 103-120. [In Persian].

[39] Abdi, S., Mir, N., and Dehghan Niri, M. 2013. Improvement of physical and sensory properties of dairy products using functional valuability of whey proteins. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 7(5): 897-908. [In Persian].

[40] Imamoglu, H., Coggins, P.C., and Rowe, D.E. 2017. Influence of storage time and starches on texture attributes of conventional milk yogurt using response surface methodology. *International Food Research Journal*, 24(4): 1721-1727.

[41] Soofi, M., Alizadeh, A., and Mousavi Kalajahi, S.E. 2019. Optimization of low fat prebiotic yogurt processing containing inulin at different temperatures and shear stresses. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 16(86): 109-118. [In Persian].

[42] Kakoei, H., Ehsani, M.R., and Mazlomi, M.T. 2007. Survey on diacetyl changes and sensory characteristics in yoghurt fortified with whey protein concentrate instead of milk powder. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 4(2): 31-37. [In Persian].



Scientific Research

Physicochemical, antioxidant and sensory properties of stirred yogurt enriched with aqueous-alcoholic extract of Fenugreek seed

Ahmad Pedram Nia¹, Sahar Zokaeiyan^{2&3}, Mahdi Jalali^{1&4*}

1- Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

2- Quality Control Manager, Mostafavi Saffron Company, Mashhad, Iran

3- Department of Chemical Engineering, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran

4- Lecturer, University of Applied Science and Technology, Center of Cheshme Noshan Khorasan (Alis)

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received:2024/3/25

Accepted:2024/12/11

Keywords:

Fenugreek seed extract,
yogurt enrichment,
physicochemical properties,
antioxidant activity

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.238.

*Corresponding Author E-
mehdijalali62@yahoo.com

Yogurt is one of the most common types of fermented dairy products due to its pleasant flavor and texture and consistency, and it can be easily mixed with other nutrients. Fenugreek with the scientific name (*Trigonella foenum-graceum*) is a hidden plant, and the fenugreek seed, which is the most important medicinal part of this plant, contains flavonoids, sesqui-terpenes, sterols, and mucilage fibers. In the present study, the aqueous-alcoholic extract of fenugreek seeds at four levels (zero, 0.2, 0.4 and 0.6%) on some physicochemical characteristics (pH, acidity, hydration and viscosity), the amount of phenolic compounds, The antioxidant activity and sensory properties (taste, texture, color and overall acceptance) of the enriched stirred yogurt were evaluated during 14 days of storage. The results of data analysis showed that the sample containing 0.6 percent has the lowest and highest pH and acidity indicators, respectively. Also, by increasing the storage time up to 14 days and decreasing the pH, the amount of water content of all the samples increased significantly ($P<0.05$). The results showed that with a significant decrease in the content of phenolic compounds during the storage period, adding fenugreek seed extract to the amount of 0.6% in a period of 1 and especially 7 days increased the antioxidant activity and then, up to the storage time of 14 days, the antioxidant activity was low in some samples and with a very slight change in some samples ($P<0.05$). Also, the highest and lowest values of viscosity were 3500 centipoise (the control sample on the first day) and 703 centipoise (the sample containing 0.6% on the fourteenth day) ($P<0.05$). Finally, by examining the results of sensory properties, the sample containing fenugreek seed extract was able to get an acceptable score from the sensory evaluators compared to the control sample. Among the types of enriched and control yogurt formulations, the sample containing 0.6% extract had the highest degree of desirability in terms of sensory properties when stored for 1 day.



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی اثر آرد گندم سن زده و اسید آسکوربیک بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی و حسی کلوچه سنتی زابلی

نرگس میر^۱، غلامحسین حقایق^{۲*}، محمد امین میری^۳، بهاره صحرانیان^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۳- گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۱۹	گندم سن زده یکی از ضایعات کشاورزی است که با ورود به چرخه انسانی کمک قابل توجهی به صنعت فراورده های پخت خواهد شد. از این رو در پژوهش حاضر، آرد گندم سن زده در سطوح ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد جایگزین آرد گندم سالم در فرمولاسیون کلوچه سنتی زابلی شد و برای جبران خسارات ناشی از سن زدگی از اسید آسکوربیک در سطوح ۳۰ و ۶۰ پی پی ام استفاده گردید. نتایج نشان داد میزان رطوبت، خاکستر، چربی، پروتئین، عدد فالینگ و عدد زلنی آرد گندم سالم و سن زده نتوانست شاخص مناسبی برای تشخیص سن زدگی باشد. این در حالی بود که میزان گلو تن مرطوب و اندیس گلو تن از پارامترهای تاثیرگذار برای تشخیص و تفکیک گندم سالم و سن زده بودند و میزان گلو تن و اندیس گلو تن در نمونه آرد حاصل از گندم سالم بیشتر بود. همچنین نتایج نشان داد با جایگزینی آرد گندم سالم با سن زده از میزان رطوبت کلوچه ها کاسته شد. اسید آسکوربیک در حفظ رطوبت کلوچه ها طی فرایند پخت و پس از آن موفق عمل نمود. علاوه بر این براساس نتایج حاکی از آن بود که نمونه حاوی ۱۰ درصد آرد گندم سن زده و ۳۰ پی پی ام اسید آسکوربیک دارای بیشترین حجم مخصوص و کمترین سفتی بافت طی یک ماه نگهداری بود. حضور آرد گندم سن زده و اسید آسکوربیک در فرمولاسیون به ترتیب منجر به تیره و روشن تر شدن رنگ نمونه ها شد. براساس امتیاز پذیرش کلی مشخص شد نمونه حاوی ۱۰ درصد آرد گندم سن زده و ۳۰ پی پی ام اسید آسکوربیک (اولویت اول)، نمونه شاهد (فاقد آرد گندم سن زده و اسید آسکوربیک) (اولویت دوم) و نمونه حاوی ۲۰ درصد آرد گندم سن زده و ۶۰ پی پی ام اسید آسکوربیک (اولویت سوم) سه نمونه برتر بودند. اما از آن جا که هدف کاربرد آرد گندم سن زده بود، نمونه های حاوی آرد گندم سن زده (اولویت اول و سوم) به عنوان بهترین نمونه ها به لحاظ ویژگی های تکنولوژیکی و حسی معرفی می شوند.
کلمات کلیدی: اسید آسکوربیک، زابل، کلوچه سنتی، گندم سن زده، ویژگی های تکنولوژیکی.	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.254. *مسئول مکاتبات: gh2002_haghayegh@yahoo.com Haghayegh@uoz.ac.ir	

۱-مقدمه

هر شهری سوغات خاصی دارد و نماینده و یادآور آن شهر تلقی می‌شوند [۱]. کلوچه نوعی شیرینی است که مواد اولیه اصلی آن آرد گندم، روغن، شکر و تخم مرغ می‌باشد. با توجه به نوع و فرمولاسیون این فراورده از مواد دیگری نظیر انواع طعم دهنده و رنگ‌دهنده و ترکیبات مغذی در تهیه آن استفاده می‌شود [۲]. کلوچه‌های سنتی زیادی در ایران از جمله کلوچه سیستان، گرگان، فومن، دزفول و خوزستان سوغات محسوب می‌شوند. در سیستان عموماً سه نوع کلوچه وجود دارد: کلوچه ساده یا روغنی، کلوچه خرمايي و کلوچه قندی. نکته قابل توجه این است آرد گندمی که در تولید انواع کلوچه استفاده می‌شود در مقایسه با آرد نان ضعیف‌تر بوده و میزان پروتئین آن پایین‌تر است [۳]. از این رو می‌توان از آرد سایر غلات و شبه غلات (جو، چاودار، یولاف، تربیتکاله، ارزن، سورگوم، برنج، ذرت، کینوا، گندم سیاه، آمارنت و غیره) [۴ و ۵] و آرد گندم سن‌زده که از میزان گلوتن کمی برخوردارست و آرد ضعیفی محسوب می‌شود، در سطوح مناسب در مخلوط با آرد گندم برای تولید کلوچه استفاده نمود [۶]. قدیمی‌ترین و مهم‌ترین آفتی که به گندم حمله می‌کند، حشره سن (*Eurygaster integriceps*) است. خسارات پروتئاز بزاق سن روی ویژگی‌های کیفی و ارزش نانوائی گندم به مراتب بیشتر از خسارات کمی ناشی از آن است. اثر تخریبی این آنزیم ناشی از تجزیه گلوتن است [۷]. Siviri و همکاران (۲۰۰۲) به این نتیجه دست یافتند که پروتئاز سن یا از طریق از هم پاشیدن پلیمرهای گلوتئین و یا با تحت تاثیر قرار دادن تجمع مولکول‌های گلوتن، باعث تضعیف خمیر حاصل از گندم سن‌زده می‌شود [۸]. با تجزیه شدن گلوتن در نتیجه آنزیم پروتئاز سن گندم، شبکه گلوتنی ضعیفی در خمیر فراورده‌های نانوائی ایجاد می‌شود که قادر به نگهداری گاز حاصل از فرایند تخمیر نیست و محصول تولیدی از ارتفاع، حجم و تخلخل کمی برخوردار خواهد بود و بافت و ساختار آن با نمونه حاصل از آرد گندم سالم قابل مقایسه نیست [۹]. Ozar و Dizlek (۲۰۱۷) کاهش کیفیت پخت از جمله افزایش افت وزن، کاهش تخلخل و حجم را در نتیجه کاربرد آرد سن‌زده در فرمولاسیون نان گزارش

کردند. در کل تهیه نان با آرد گندم آسیب‌دیده و سن‌زده با مشکلات تکنولوژیکی و حسی زیادی مواجه است. خمیر حاصل از این نوع گندم دارای زمان استراحت سریع و متعاقباً حجم محصول تولیدی کم و بافت آن ضعیف است [۱۰]. فعالیت مخرب آنزیم در آردهای سن‌زده با تضعیف شبکه گلوتنی موجب می‌شود خمیری ضعیف و چسبنده با قابلیت کم برای جابه‌جایی و شکل‌پذیری تولید شود. این خمیر به دلیل ضعف در نگهداری آب، قوام و ضریب تحمل اندکی دارد و بافت درونی آن بی کیفیت و خواص حسی آن نظیر بافت، قابلیت جویدن، نرم و شکل، رنگ، بو و مزه نامطلوب است [۱۱]. همین امر سبب شده است محققان صنعت غذا، این نوع آرد را برای تهیه کلوچه و بیسکوئیت که به آرد ضعیف نیاز دارند، پیشنهاد کنند. البته کاربرد انواع افزودنی و بهبوددهنده‌های صنعت پخت در تولید این دسته از فراورده‌ها برای رسیدن به نتیجه مطلوب و محصولی بازارپسند مورد توجه قرار گرفته است. اسید آسکوربیک که جزو دسته اکسیدکننده‌ها می‌باشد از جمله افزودنی‌هایی است که برای تقویت آرد گندم ضعیف و تا حدودی جبران خسارات ناشی از سن‌زدگی استفاده می‌شود [۱۲]. مکانسیم عمل اسید آسکوربیک به عنوان بهبوددهنده به این ترتیب است که نخست اسید آسکوربیک با حضور اکسیژن به دهیدروآسکوربیک اسید تبدیل می‌شود. هم‌زمان با این واکنش گلوتاتیون (GSH) که یک تری‌پپتید طبیعی در آرد است، توسط آنزیم گلوتاتیون دهیدروژناز به گلوتاتیون دی‌سولفید (GSSG) تبدیل می‌شود. در واقع دهیدروآسکوربیک اسید اکسید شدن گروه‌های تیول (-SH) را کاتالیز کرده و موجب ایجاد پیوندهای عرضی در ساختار پروتئین و تقویت شبکه گلوتنی خمیر می‌شود [۱۳ و ۱۴]. Maforimbo و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند مهم‌ترین تاثیر اسید آسکوربیک اکسید کردن گروه‌های سولفیدریل موجود در خمیر است که در نتیجه‌ی آن شبکه گلوتنی تقویت می‌شود [۱۵]. با بهبود این شبکه کشش‌پذیری خمیر حاصل از آرد گندم سن‌زده را افزایش، سفتی بافت فراورده نانوائی حاصل از آن کاهش و حجم افزایش می‌یابد [۱۱].

Kiyashko و Slideltsey (۲۰۲۲) با کاربرد اسید آسکوربیک به عنوان یک بهبوددهنده با عملکرد اکسیدکنندگی بر ویژگی های رئولوژیکی خمیر و تکنولوژیکی و حسی نان گزارش کرد افزودن اسید آسکوربیک به فرمولاسیون نان منجر به بهبود ویژگی های رئولوژیکی خمیر و افزایش حجم و تخلخل نمونه های تولیدی شد. سطح پوسته نمونه های حاوی اسید آسکوربیک در مقایسه با نان شاهد یکنواخت و مسطح تر و بدون شکستگی، برآمدگی و فرورفتگی بود. رنگ این نمونه ها روشن تر و شیشه ای و بدون سوختگی بود. فرایند خمیرگیری و پخت بهبود یافت. چسبندگی خمیر کاهش یافت. نان حاوی اسید آسکوربیک از عطر و مزه بهتری برخوردار بود [۱۶]. مطالعات نشان می دهد مقدار اسید آسکوربیک مورد نیاز برای آردهای ضعیف از جمله گندم سن زده حدود ۷۵-۵۰ پی پی ام است و اگر بیشتر از مقدار مورد نیاز استفاده شود نه تنها اثرات مثبت فیزیکی شیمیایی و تکنولوژیکی مشاهده نمی شود بلکه خمیر بیش از اندازه چسبندگی دارد که منجر به عدم پخش پذیری آن می شود. همچنین بافت محصول نهایی سفت و غیریکنواخت خواهد بود [۱۷]. بنابراین با توجه به اینکه سالانه میزان زیادی از گندم به دلیل آفت سن از چرخه انسانی خارج و صرف خوراک دام و طیور می شود، هدف از این پژوهش استفاده آرد گندم سن زده (در سطوح صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد) و اسید آسکوربیک (در سطوح صفر، ۳۰ و ۶۰ پی پی ام) در فرمولاسیون کلوچه سنتی زابل به منظور استفاده از محصولات جانبی کشاورزی و کاهش ضایعات در این حوزه بود.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-مواد

گندم سن زده (حدود ۱۰ درصد سن زدگی) از اداره کل غله و خدمات بازرگانی استان همدان و آرد گندم با درجه استخراج ۷۵ درصد از کارخانه آرد رضا (قوچان-ایران) تهیه گردید. گندم سن زده پس از بوجاری و تبدیل به آرد با آسیاب چکشی از الک با مش ۶۰ عبور داده شد. سپس دو نمونه آرد در انبار خنک در شرایط خشک تا انجام آزمایشات نگهداری

شدند. اسید آسکوربیک از شرکت توسعه صنایع غذایی دانشجویان نوین دلسا (مشهد-ایران) و شکر با برند شیرین کار (البرز-ایران)، نمک با برند سپید دانه (شیراز-ایران) و روغن جامد از یک فروشگاه عرضه کننده مواد قنادی در سطح شهر مشهد خریداری گردید. مخمر مورد استفاده ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) که به شکل پودر مخمر خشک فعال و به صورت بسته بندی و کیوم بود از شرکت خمیرمایه رضوی (مشهد، ایران) و مواد شیمیایی از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. لازم به ذکر است رطوبت آرد گندم سالم و سن زده به ترتیب ۱۲/۲۰ و ۱۱/۷۰ درصد، خاکستر ۰/۴۹ و ۰/۴۷ درصد، پروتئین ۱۱/۵۰ و ۱۰/۰۰ درصد، چربی ۰/۹۴ و ۰/۸۹ درصد، گلوتن مرطوب ۲۹/۰۰ و ۲۳/۵۰ درصد، اندیس گلوتن ۷۸/۶۰ و ۵۹/۴۰، عدد زلنی ۲۸/۰۰ و ۱۳/۰۰ و عدد فالینگ ۳۶۲/۰۰ و ۳۳۸/۰۰ ثانیه بود.

۲-۲-روش ها

۲-۲-۱-تهیه کلوچه

آماده سازی و پخت خمیر کلوچه سنتی زابلی (نوع ساده) (نمونه شاهد) با استفاده از مواد اولیه شامل ۱۰۰ درصد آرد گندم سالم، ۲۵ درصد روغن جامد، ۲ درصد پودر شکر، ۰/۵ درصد مخمر، ۰/۳ درصد نمک و ۲۰ درصد آب انجام شد. برای تهیه تیمارها آرد گندم سن زده در سطوح صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد جایگزین آرد گندم سالم شد. همچنین به دلیل حضور آرد گندم سن زده در میان ترکیبات، در فرمولاسیون کلوچه از سه سطح صفر، ۳۰ و ۶۰ پی پی ام اسید آسکوربیک استفاده گردید. برای تهیه خمیر کلوچه ابتدا پودر شکر، مخمر و آب ولرم (دمای ۳۵ درجه سانتی گراد) در یک بشر ۲۵۰ سی سی با یکدیگر مخلوط شدند و به مدت ۵ دقیقه (تا زمان مشاهده حالت کف مانند و به عبارتی عمل آمدن مخمر) در حالت ثابت قرار گرفتند. سپس آرد، نمک و روغن تا رسیدن به خمیری یکدست و یکنواخت در همزن آزمایشگاهی (مدل BJJ-BM5N، ساخت شرکت بیک صنعت، ایران) مخلوط شدند. در ادامه مخمر عمل آمده به آن ها اضافه و عمل ورز دادن به مدت ۵ دقیقه به صورت دستی انجام شد. سپس روی

برای اندازه‌گیری مولفه‌های رنگی سطح کلوچه‌ها در فاصله زمانی ۲ ساعت پس از پخت به این صورت عمل شد که الف) سیستم پردازش تصویر: برای تصویرگیری، از دوربین دیجیتال (Canon EOS 1000D, Taiwan) استفاده شد. در این روش تصویرگیری از یک اتاقکی چوبی با دیواره‌های سیاه رنگ که دارای ۴ لامپ فلورسنت (OpplE, modEl: MX396-Y82) ۸ وات به طول ۶۰ سانتی‌متر بود و بروی یک پایه تثبیت‌کننده دوربین تعبیه شده بود، استفاده شد. در نهایت تصاویر با فرمت JPEG ذخیره شدند. ب) پیش پردازش تصاویر: تقطیع تصاویر (جدا نمودن تصویر حقیقی از پس زمینه) با استفاده از نرم افزار فتوشاپ (Adobe, v.8.0) انجام گرفت و عکس‌ها به فرمت bmp ذخیره شدند. ج) تغییر فضای رنگی RGB به $L^*a^*b^*$: از آنجا که پارامترهای رنگی $L^*a^*b^*$ وابسته به ابزار اندازه‌گیری نبوده، بدون توجه به خروجی یا ورودی، رنگ یکنواختی را فراهم می‌کند، تصاویر به دست آمده به فضای رنگی $L^*a^*b^*$ تبدیل شدند. در این مطالعه، آنالیز تصویر با استفاده از نرم افزار ایمج جی (Image J) نسخه 1.43r انجام شد [۲۰].

۲-۲-۲-۶ ویژگی‌های حسی

بدین منظور ۱۰ داور انتخاب شدند. خصوصیات حسی کلوچه از نظر فرم و شکل، خصوصیات سطح بالایی، خصوصیات سطح پائینی، سفتی و نرمی بافت، قابلیت جویدن و بو و مزه ارزیابی شد. ضریب ارزیابی صفات براساس هدونیک پنج نقطه‌ای از بسیار بد (۱) تا بسیار خوب (۵) بود [۲۱ و ۲۲]. خصوصیات بررسی شده در ارزیابی حسی به یک اندازه مؤثر نیستند. بنابراین پس از بررسی منابع به ترتیب ضریب رتبه‌ای ۴، ۲، ۱، ۲، ۳ و ۳ داده شد. در انتها با داشتن این معلومات، امتیاز کلی (عدد کیفیت کلوچه) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

$$Q = \sum (P \cdot G) / \sum P \quad \text{رابطه ۱}$$

که در این رابطه Q پذیرش کلی (عدد کیفیت کلوچه)، P ضریب رتبه صفات و G ضریب ارزیابی صفات است.

۲-۲-۷ تجزیه و تحلیل آماری

خمیر با لفاف‌های پلی‌اتیلینی پوشانده شد و خمیر به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) مرحله استراحت خود را طی نمود. سپس خمیر آماده شده با استفاده از یک وردنه روی یک صفحه سیلکونی پهن و آماده قالب‌زنی با کاتر گرد به قطر ۲ و ارتفاع ۰/۵ سانتی‌متر شد. در انتها خمیرهای کلوچه روی سینی چیده شدند و در فر آزمایشگاهی (مدل XFT135، ساخت ایتالیا) با دمای ۱۸۰ درجه به مدت ۲۵ دقیقه قرار گرفتند. بعد از پخت، نمونه‌ها در بسته‌های پلی‌اتیلینی برای انجام آزمون‌های مربوطه در دمای محیط نگهداری شدند.

۲-۲-۲-۲-۲ رطوبت

برای انجام این آزمایش از استاندارد AACC (۲۰۰۰) به شماره ۱۶-۴۴ استفاده گردید [۱۸]. برای این منظور نمونه‌ها در فاصله زمانی ۲ ساعت (در روز اول پس از سرد شدن کامل نمونه‌ها)، ۲ هفته و یک ماه پس از پخت در آون (مارک Jeto Tech، مدل OF-O2G، ساخت کشور کره جنوبی) با حرارت ۱۰۵-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

۲-۲-۳-۲-۲ حجم مخصوص

برای این منظور از روش جایگزینی حجم با دانه کلزا مطابق با استاندارد AACC (۲۰۰۰) شماره ۱۰-۷۲ استفاده شد [۱۸]. بدین صورت که وزن و حجم یک عدد کلوچه تعیین گردید و از تقسیم حجم بر وزن نمونه، حجم مخصوص بر حسب میلی‌لیتر بر گرم محاسبه شد.

۲-۲-۴-۲-۲ بافت

به منظور اندازه‌گیری سفتی بافت نمونه‌های کلوچه در فاصله زمانی ۲ ساعت، ۲ هفته و یک ماه پس از پخت از دستگاه سنجش بافت (مدل TA plus، ساخت انگلیس) استفاده شد. برای این منظور از پروب استوانه‌ای به قطر ۵ میلی‌متر استفاده گردید. سرعت قبل از آزمون ۱ میلی‌متر در ثانیه، سرعت آزمون ۰/۵ میلی‌متر در ثانیه، عمق نفوذ ۲ میلی‌متر و میزان بارگذاری ۵۰ کیلوگرم بود و در نهایت میزان سفتی بافت کلوچه‌ها بر حسب نیوتن گزارش شد [۱۹].

۲-۲-۵-۲-۲ رنگ ($L^*a^*b^*$)

۳-۱-رطوبت

نتایج میزان رطوبت نمونه‌های تولیدی در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که یافته‌ها نشان می‌دهد، با جایگزینی آرد گندم سالم با آرد گندم سن زده از میزان رطوبت کلوچه‌ها به طور معنی داری ($P < 0.05$) کاسته شد. همچنین نتایج حاکی از حفظ رطوبت بیشتر در نمونه‌های حاوی اسید آسکوربیک طی یک ماه نگهداری بود.

بدین منظور از یک طرح کاملاً تصادفی بر پایه فاکتوریل دو عامله استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار Mini-Tab 17 و به منظور مقایسه میانگین از آزمون توکی با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد ($P < 0.05$). کلیه آزمایشات بجز ویژگی‌های حسی با سه تکرار انجام گرفت. برای ویژگی‌های حسی ۳۰ تکرار در نظر گرفته شد (تعداد تکرار در پخت (۳) × تعداد ارزیاب‌ها (۱۰)). رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel بود.

۳-نتایج و بحث

Table 1: The effect of bug-damage wheat and acid ascorbic on the moisture of cookies during 1 month.

Treatments	Bug-damage wheat (%)	Acid ascorbic (ppm)	Moisture (%)		
			2 hours	2 weeks	1 month
1 (Control)	-	-	13.27±0.50 ^{cd}	11.20±0.30 ^{defg}	11.20±0.30 ^{fgh}
2	-	30	14.87±0.35 ^{ab}	13.60±0.56 ^{ab}	13.60±0.56 ^{ab}
3	-	60	15.60±0.36 ^a	14.13±0.32 ^a	14.13±0.32 ^a
4	10	-	12.80±0.36 ^{cd}	10.10±0.57 ^{fgh}	10.10±0.57 ^{fgh}
5	10	30	13.80±0.26 ^{bc}	12.37±0.56 ^{bcd}	12.37±0.56 ^{cde}
6	10	60	14.83±0.31 ^{ab}	13.43±0.47 ^{ab}	13.43±0.47 ^{abc}
7	20	-	12.47±0.55 ^{de}	9.77±0.38 ^{gh}	9.77±0.38 ^{gh}
8	20	30	12.77±0.60 ^{cde}	11.77±0.78 ^{cde}	11.77±0.78 ^{cde}
9	20	60	13.67±0.49 ^{bcd}	13.17±0.40 ^{abc}	13.17±0.40 ^{bcd}
10	30	-	11.70±0.44 ^e	8.87±0.35 ^h	8.87±0.35 ^h
11	30	30	12.83±0.25 ^{cde}	10.33±0.47 ^{efgh}	10.33±0.47 ^{efg}
12	30	60	13.40±0.46 ^{cd}	11.33±0.61 ^{def}	11.33±0.61 ^{def}

Different letters in each column represent significant difference from one another ($p < 0.05$).

نتایج نشان داد با افزودن اسید آسکوربیک به فرمولاسیون کلوچه، نمونه‌های تولیدی از رطوبت بیشتری طی یک ماه ماندگاری برخوردار بودند. این اثر به دلیل تقویت شبکه گلوتهی در خمیرهای حاصل از گندم سن زده توسط اسید آسکوربیک که یک عامل اکسیدکننده است، می‌باشد. مکانیسم عمل اسید آسکوربیک به عنوان بهبوددهنده به این ترتیب است که نخست اسید آسکوربیک با حضور اکسیژن به دی هیدروآسکوربیک اسید تبدیل می‌شود. هم زمان با این واکنش، گلوتهایون (GSH) که یک تری پپتید طبیعی در آرد است توسط آنزیم گلوتهایون دهیدروژناز به گلوتهایون دی سولفید (GSSG) تبدیل می‌گردد [۹]. در واقع دهیدروآسکوربیک اسید موجب ایجاد پیوندهای عرضی در ساختار پروتئین می‌شود [۱۴]. بر طبق تحقیقات انجام شده مهم ترین تاثیر اسید آسکوربیک اکسید کردن اکسید نمودن گروه‌های تیول (-SH) موجود در گلوتهایون، از واکنش‌های جانبی این گروه‌ها با پیوندهای دی سولفیدی (S-S) که

به طور کل براساس نتایج مشخص شد نمونه فاقد آرد گندم سن زده و حاوی ۶۰ پی پی ام اسید آسکوربیک دارای بیشترین میزان رطوبت در مقایسه با سایر نمونه‌های تولیدی (۱۲) نمونه) بودند. کمترین میزان رطوبت طی یک ماه نگهداری در نمونه حاوی ۳۰ درصد آرد گندم سن زده و فاقد اسید آسکوربیک مشاهده شد. در این راستا Caballero و همکاران (۲۰۰۵) و Hariri و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند فراورده‌های پخت تهیه شده از گندم سن زده به دلیل تخریب شبکه گلوتهی و کاهش گلوتهایون ایندکس، توانایی کمتری در حفظ رطوبت طی فرایند پخت و پس از آن دارند [۲۳ و ۲۴]. حضور آرد گندم سن زده آرد سن زده در فرمولاسیون فراورده های پخت با کاهش میزان رطوبت و فعالیت آبی مواجه شد. کاهش رطوبت و فعالیت آبی از دیدگاه میکروبی حائز اهمیت است، زیرا با کاهش میزان فعالیت آبی و کاهش آب در دسترس میکروارگانیسم‌ها، فعالیت میکروبی در فراورده کاهش و مدت زمان ماندگاری آن افزایش می‌یابد. همچنین

زایلاناز و امولسیفایر سدیم استئاروئیل ۲-لاکتیلات) بر کیفیت نان سنگک پرداخت. در این تحقیق فرمول بهینه بهبوددهنده حاوی ۷۰ پی پی ام اسید آسکوربیک، ۳۶ میلی گرم آنزیم زایلاناز و ۰/۶ درصد امولسیفایر سدیم استئاروئیل ۲-لاکتیلات بود که منجر به افزایش میزان جذب آب و رطوبت نان در مقایسه با نمونه فاقد این افزودنی‌ها شد [۲۵].

۲-۳-حجم مخصوص

نتایج میزان حجم مخصوص نمونه‌های تولیدی در شکل ۱ ارائه شده است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد نمونه حاوی ۱۰ درصد آرد گندم سن‌زده و ۳۰ پی پی ام اسید آسکوربیک دارای بیشترین میزان حجم مخصوص در مقایسه با سایر کلوچه‌های تولیدی بود. لازم به ذکر است نمونه فاقد آرد گندم سن‌زده و ۶۰ پی پی ام اسید آسکوربیک و نمونه حاوی ۳۰ درصد آرد گندم سن‌زده و فاقد اسید آسکوربیک به طور مشترک دارای کمترین میزان حجم مخصوص بودند.

برای خمیر واکنش تخریبی به حساب می‌آید، جلوگیری نموده و باعث بهبود شبکه گلوتهی می‌شود و در نهایت حفظ بهتر رطوبت طی فرایند پخت و زمان ماندگاری بهتر اتفاق می‌افتد [۱۷]. Shokraie و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی خواص رئولوژیکی و کیفی پاستای تهیه شده از آرد گندم سن‌زده و اسید آسکوربیک پرداختند. نتایج نشان داد افزایش گندم سن‌زده در فرمولاسیون بر میزان رطوبت نمونه‌های تولیدی اثری نداشت. این در حالی بود که حضور اسید آسکوربیک منجر به افزایش رطوبت شد [۹]. Sheikholeslami و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی اثر مخلوط اسید آسکوربیک و صمغ گوار در بهبود آرد گندم ضعیف شده ناشی از مخلوط با آرد جو بدون پوشینه پرداختند. نتایج این پژوهش حاکی از آن بود حضور ۲ درصد آرد جو بدون پوشینه، ۱ درصد صمغ گوار و ۲۰۰ پی پی ام اسید آسکوربیک منجر به حفظ بهتر رطوبت طی مدت زمان نگهداری شد [۱۷]. میرزایی (۱۳۹۲) به مطالعه فرموله نمودن و ارزیابی تأثیر چند نوع بهبوددهنده (ترکیبی از اسید آسکوربیک، آنزیم

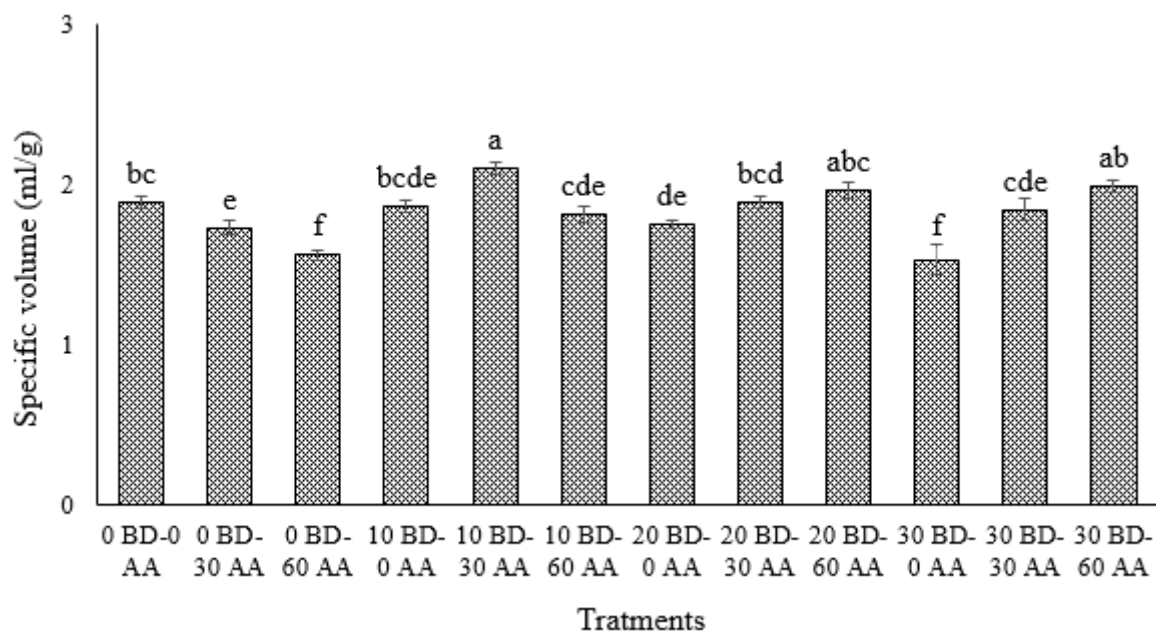


Fig 1: The effect of bug-damage wheat (BD) and acid ascorbic (AA) on the specific volume of cookies. Different letters represent significant difference from one another ($p < 0.05$).

فاکتورهای مختلفی نظیر تعداد حباب‌های هوای ورودی به خمیر یا خروجی از آن (طی فرایند مکانیکی بهم‌زدن خمیر، حباب هوا وارد می‌شود و طی ورز دادن، قالب زدن و چانه‌گیری بخشی از حباب‌های هوا خارج می‌گردد) یا

حجم فرآورده‌های نانوائی فاکتور مهمی است که در ظاهر و بازارپسندی نقش بسزایی دارد و ویژگی مهمی در ارزیابی محصول نهایی است. حجم محصولات نانوائی تحت تأثیر

حباب‌های تولید شده از فعالیت بیولوژیکی (فعالیت مخمر) و شیمیایی (نظیر بیکینگ پودر و جوش شیرین)، حفظ و نگهداری آن‌ها در خمیر و حین پخت و همچنین تبخیر مناسب آب، وجود انواع افزودنی‌ها بستگی دارد و اگر در یک مورد اختلالی ایجاد شود، حجم کاهش می‌یابد [۲۶] و [۲۷]. همانطور که نتایج اثر متقابل آرد گندم سن زده و اسید آسکوربیک نشان داد در سطوح بالای آرد گندم سن زده (سطح ۳۰ درصد) کاهش حجم مخصوص در مقایسه با نمونه شاهد چشمگیر و تنها در بالاترین سطح مصرف اسید آسکوربیک آسیب تکنولوژیکی ناشی از جایگزینی ۳۰ درصد از آرد گندم سالم با آرد گندم سن زده قابلیت جبران داشت. Siviri و همکاران (۲۰۰۰) علت آسیب به ویژگی‌های تکنولوژیکی فراورده‌های پخت از جمله کاهش حجم را در نتیجه استفاده از آرد گندم سن زده در فرمولاسیون این دسته از فراورده‌ها را این چنین گزارش کردند که پروتئاز سن یا از طریق از هم پاشیدن پلیمرهای گلوتمین و یا با تحت تاثیر قرار دادن تجمع مولکول‌های گلوتمن، باعث تضعیف خمیر حاصل از گندم سن زده می‌شود [۸]. با تجزیه شدن گلوتمن در نتیجه آنزیم پروتئاز سن گندم، شبکه گلوتمنی ضعیفی در خمیر فراورده‌های نانوائی ایجاد می‌شود که قادر به نگهداری گاز حاصل از فرایند تخمیر نیست و محصول تولیدی از ارتفاع، حجم و تخلخل کمی برخوردار خواهد بود و بافت و ساختار آن با نمونه حاصل از آرد گندم سالم قابل مقایسه نیست [۹]. همچنین Ozulku و Siviri Ozay (۲۰۲۰) گزارش کردند اثر تخریبی پروتئاز سن روی خاصیت نانوائی گندم و بروز مشکلات در تهیه فراورده‌های نانوائی زمانی بروز می‌کند که گلوتمن و نشاسته دانه در اثر آنزیم‌های گوارشی سن تجزیه شوند [۷]. چون گلوتمن در اثر تجزیه شدن دیگر قدرت نگهداری گازهای حاصل از فرایند تخمیر و هوادهی شیمیایی و فیزیکی را در خود ندارد در نتیجه فراورده‌های پخت تولید شده از آرد گندم سن زده خلل و فرج (تخلخل) و حجم خوبی ندارند و حالت تردی آن‌ها کمتر از نمونه‌های تهیه شده از گندم سالم است [۲۸]. یافته‌های Dizlek و Ozar (۲۰۱۷) با مطالعه کاربرد آرد سن زده در فرمولاسیون نان

نشان داد کیفیت پخت از جمله افزایش افت وزن، کاهش تخلخل و حجم با جایگزینی آرد گندم سالم با سن زده و افزایش سطح جایگزینی کاهش یافت. در ارتباط با بهبود ویژگی‌های بافتی فراورده‌های نانوائی در نتیجه افزودن اسید آسکوربیک به فرمولاسیون نیز گزارشاتی موجود است [۱۰]. Maforimbon و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند مهم‌ترین تاثیر اسید آسکوربیک اکسید کردن گروه‌های سولفیدریل موجود در خمیر است که در نتیجه‌ی آن شبکه گلوتمنی تقویت می‌شود [۱۵]. با بهبود این شبکه، کشش‌پذیری خمیر حاصل از آرد گندم سن زده افزایش، سفتی بافت فراورده نانوائی حاصل از آن کاهش و حجم افزایش می‌یابد [۱۱]. Kiyashko و Slideltsey (۲۰۲۲) با کاربرد اسید آسکوربیک به عنوان یک بهبوددهنده با عملکرد اکسیدکنندگی بر ویژگی‌های رئولوژیکی خمیر و تکنولوژیکی و حسی نان گزارش کرد افزودن اسید آسکوربیک به فرمولاسیون نان منجر به بهبود ویژگی‌های رئولوژیکی خمیر و افزایش حجم و تخلخل نمونه‌های تولیدی شد. اثر نهایی اسید آسکوربیک افزایش قابلیت خمیر در نگهداری گاز، بهبود گسترش خمیر، افزایش میزان مقاومت خمیر و در نهایت افزایش حجم و تولید محصولی با ساختار سلولی ریز و یکنواخت است [۱۶]. از سویی، اسید آسکوربیک باید به مقدار لازم مصرف گردد و چنانچه بیش از حد مناسب استفاده شود، نه تنها اثر بهبوددهنگی ندارد، بلکه آثار زیان باری از خود نشان داده، و سبب سفت شدن خمیر، کاهش حجم و نامطلوب شدن بافت فراورده تولیدی می‌گردد [۱۲]. غیور اصلی و همکاران (۱۳۸۷) به بررسی تأثیر آنزیم آلفا آمیلاز و اسید آسکوربیک بر خصوصیات رئولوژیکی خمیر و حجم مخصوص نان اشرودل پرداختند. نتایج نشان داد اسید آسکوربیک بر افزایش قدرت خمیر و قابلیت کشش خمیر و افزایش حجم مخصوص نان نقش مؤثری داشت و بهترین اثر در مقدار ۱۰۰ پی‌پی‌ام مشاهده شد [۲۹].

۳-۳- سفتی بافت

درصد آرد گندم سن زده (فاقد اسید آسکوربیک) با سپری شدن یک ماه از زمان پخت بیش از سایر نمونه های تولیدی بود اما این افزایش سفتی بافت در نمونه شاهد (فاقد آرد گندم سن زده و اسید آسکوربیک) بیشتر از سایر تیمارها بود که این امر نشان دهنده بیشتر بودن سرعت بیاتی نمونه شاهد در مقایسه با دیگر کلوچه های تولیدی است.

نتایج میزان سفتی بافت نمونه های تولیدی در جدول ۲ ارائه شده است. همانطور که یافته ها نشان می دهد، نمونه حاوی ۱۰ درصد آرد گندم سن زده و ۳۰ پی پی ام اسید آسکوربیک و نمونه حاوی ۲۰ درصد آرد گندم سن زده و ۶۰ پی پی ام اسید آسکوربیک به طور مشترک دارای کمترین میزان سفتی بافت پس از یک ماه نگهداری بودند. لازم به ذکر است تمام نمونه های تولیدی طی مدت زمان نگهداری افزایش سفتی بافت داشتند. هرچند میزان سفتی بافت نمونه حاوی ۳۰

Table 2: The effect of bug-damage wheat and acid ascorbic on the firmness of cookies during 1 month.

Treatments	Bug-damage wheat (%)	Acid ascorbic (ppm)	Firmness (N)		
			2 hours	2 weeks	1 month
1 (Control)	-	-	19.72±0.69 ^g	9.24±0.68 ^{bc}	19.72±0.69 ^{ab}
2	-	30	14.88±0.58 ^{fg}	8.03±0.85 ^{cde}	14.88±0.58 ^{fg}
3	-	60	15.38±0.54 ^{efg}	6.94±0.51 ^{efg}	15.38±0.54 ^{efg}
4	10	-	17.00±0.82 ^{cde}	8.38±0.48 ^{cd}	17.00±0.82 ^{cdg}
5	10	30	14.57±0.52 ^g	6.61±0.25 ^{fg}	14.57±0.52 ^g
6	10	60	15.46±0.79 ^{efg}	7.05±0.12 ^{defg}	15.46±0.79 ^{efg}
7	20	-	18.12±0.62 ^{bc}	10.20±0.20 ^b	18.12±0.62 ^{bc}
8	20	30	16.21±0.47 ^{defg}	6.96±0.26 ^{efg}	16.21±0.47 ^{defg}
9	20	60	14.65±0.25 ^g	6.27±0.24 ^g	14.65±0.25 ^g
10	30	-	19.99±0.72 ^a	13.75±0.76 ^a	19.99±0.72 ^a
11	30	30	17.92±0.28 ^{cd}	8.71±0.29 ^c	17.92±0.28 ^{cd}
12	30	60	16.42±0.43 ^{cdef}	7.94±0.27 ^{def}	16.42±0.43 ^{cdef}

Different letters in each column represent significant difference from one another ($p < 0.05$).

از خصوصیات تکنولوژیکی آن نظیر حجم و تخلخل بستگی دارد. حفظ رطوبت از سفت شدن و حتی شکننده شدن پوسته نمونه تولیدی پس از فرایند تولید و حتی طی پخت جلوگیری می کند و بافت محصول نرم تر می شود. از سوی دیگر افزایش حجم و تخلخل به دلیل حضور تعداد بیشتر حباب های هوا در نمونه و پخش یکنواخت آن ها، دو فاکتور اثرگذار بر میزان نرمی بافت و کاهش فشردگی بافت درونی فراورده های نانویی است [۳۱]. از این رو قابل پیش بینی بود که نمونه های دارای حجم بیشتر از سفتی بافت کمتری در بازه زمانی بلافاصله پس از پخت برخوردار باشند. از طرفی این انتظار وجود داشت که نمونه هایی که از رطوبت بیشتر در مدت زمان نگهداری برخوردار بودند، دارای بافت نرم تری باشند. زیرا با توجه به یکسان بودن آب فرمولاسیون برای ۱۲ تیمار، نمونه های دارای محتوای رطوبت بیشتر در بازه زمانی بلافاصله پس از پخت از توانایی بیشتری در حفظ رطوبت طی مدت زمان نگهداری برخوردارند. این نمونه ها از مهاجرت سریع رطوبت از بافت درونی به پوسته جلوگیری

بافت یکی از شاخص های مهم کیفی مواد غذایی است که طی فرایندهای غذایی و همچنین انبار کردن می تواند به دلایل مختلف تغییر کند. بافت به مجموعه ای از خصوصیات غذا گفته می شود که بتوان با انگشت ها، زبان یا دندان آن را احساس کرد. ارزیابی بافت مواد غذایی شامل اندازه گیری پاسخ فراورده های غذایی است هنگامی که در معرض نیروهایی مثل بریدن، جویدن، فشردن یا کشیده شدن قرار می گیرد، و به عبارت دیگر به خصوصیات رئولوژیکی غذا بستگی دارد. دندان ها، زبان و فک نیرویی به غذا اعمال می کنند و اینکه چه عکس العملی در برابر نیروها از خود نشان می دهد به نوعی بیانگر بافت غذاها بوده و مشخص می کند که غذا سفت، ترد، روان و غیره است [۳۰]. میزان سفتی بافت فراورده های پخت در بازه زمانی بلافاصله پس از پخت به عواملی نظیر حفظ رطوبت محصول طی فرایند پخت (هرچند اهمیت رطوبت طی مدت زمان نگهداری به دلیل اثرگذاری آن بر شدت بیاتی محصول بیشتر است) و برخی

می کنند و به عبارتی خروج رطوبت و از دست دادن آب که عامل اصلی بیاتی و سفت شدن بافت فراورده های نانوائی طی انبارمانی است، بسیار کند صورت می گیرد. اما این نکته نباید نادیده گرفته شود که چنانچه میزان اسید آسکوربیک بیش از اندازه نیاز فرمول باشد، نه تنها به عنوان یک بهبوددهنده عمل نمی کند بلکه منجر به سفت شدن بافت نمونه های تولیدی می شود [۱۷]. نکته قابل توجه این است که جایگزینی آرد گندم سالم با آرد گندم سن زده در مقادیر کم نه تنها منجر به کاهش کیفیت بافت کلوچه ها و افزایش سفتی ساختار درونی آن ها نشد، بلکه عملکرد مثبت بر بافت داشت که در نتیجه آن بافتی نرم تر مشاهده شد. Amal و همکاران (۲۰۱۴) با کاربرد آنزیم پروتئاز در فرمولاسیون کوکی بهبود ویژگی های فیزیکی (ضخامت، قطر، بهبود ویژگی های پهن شدگی) را گزارش کردند. این محققان بیان کردند آنزیم پروتئاز با اثرگذاری بر گلوتن و کاهش الاستیسیت، کاهش انقباض و چروکیدگی خمیر پس از قالب زنی منجر به بهبود بافت (کاهش سختی) کوکی های تولیدی شد [۳۲]. همچنین سرایی و کریمی (۱۳۹۳) با بررسی استفاده از آرد گندم سن زده و مقایسه آن با آردهای قوی حاوی آنزیم پروتئاز میکروبی بر بهبود کیفیت بیسکوئیت گزارش کردند سختی بیسکوئیت های تولید شده توسط آرد سن زده نسبت به بیسکوئیت های تولید شده از آردهای قوی حاوی آنزیم پروتئاز کمتر بود که منجر به تردی بیشتر و بافت مطلوب تر فراورده نهایی شد. این محققان بیان نمودند استفاده از آرد سن زده در فراورده های نیازمند آرد ضعیف (نظیر انواع کلوچه و کوکی، بیسکوئیت، کراکر، کیک و ...) در صورت استفاده صحیح از آن می تواند کارآمد باشد و نه تنها منجر به کاهش کیفیت بافت نمی شود بلکه بافت را بهبود بخشیده و با ایجاد بافتی نرم تر، جویدن را تسهیل و احساس دهانی را ارتقا می دهد. این در حالی بود که سطوح بالای مصرف آرد گندم سن زده بدون حضور افزودنی های اکسیدکننده و بهبوددهنده ها نظیر اسید آسکوربیک، اسید سیتریک، آنزیم ترانس گلوتامیناز و ... در فرمولاسیون فراورده های پخت توصیه نشد [۳۳]. Ozar و Dizlek (۲۰۱۶)

و Dizlek و Ozar (۲۰۱۷) به بررسی استفاده از آرد گندم با ۲۰/۶ درصد سن زدگی مخلوط با آرد گندم سالم در سطوح صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد پرداختند. در این پژوهش ها به منظور افزایش کیفیت آرد گندم سن زده از مواد افزودنی مختلف از جمله استرهای دی استیل تارتاریک اسید، مونو و دی گلیسرید، ترانس گلوتامیناز، اسید سیتریک و اسید آسکوربیک استفاده شد. نتایج به وضوح نشان داد با افزایش بیش از ۲۰ درصد آرد گندم سن زده در فرمولاسیون نان، بازده خمیر، حجم، نسبت ارتفاع به عرض نان به شدت کاهش و سفتی بافت افزایش یافت و تنها در حضور افزودنی ها بخصوص ترکیبات اکسیدکننده می توان بافت نمونه های تولیدی را بهبود داد [۲۸ و ۱۰]. Zheng و همکاران (۲۰۲۲) به مطالعه عملکرد آنزیم ترانس گلوتامیناز و اسید آسکوربیک بر بافت نان حاوی آرد گندم سیاه پرداختند. نتایج این محققان نشان داد حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز در مقایسه با اسید آسکوربیک منجر به ساختار خمیری پیوسته تری شد. هر دو افزودنی بر سختی، چسبندگی و انسجام بافت نان های تولیدی اثر مثبت داشتند [۵]. Sheikholeslami و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی اثر مخلوط اسید آسکوربیک و صمغ گوار بر بهبود آرد گندم ضعیف شده ناشی از مخلوط با آرد جو بدون پوشینه پرداختند. در این تحقیق از سطوح صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد آرد جو بدون پوشینه، سطوح صفر، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد صمغ گوار و سطح ۲۰۰ پی پی ام اسید آسکوربیک استفاده کردند. نتایج این پژوهش حاکی از آن بود حضور ۲ درصد آرد جو بدون پوشینه، ۱ درصد صمغ گوار و ۲۰۰ پی پی ام اسید آسکوربیک منجر به بهبود ویژگی های بافتی نان از جمله کاهش سفتی بافت و حفظ حجم طی مدت زمان نگهداری شد [۱۷]. پورحاجی و صحرائیان (۱۳۹۷) از اسید آسکوربیک در سطوح متفاوت در فرمولاسیون دونات استفاده نمودند. اسید آسکوربیک در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ پی پی ام به عنوان پرواکسیدان موجب تأثیرگذاری بر ویژگی های بافتی و ظاهری شد و در نهایت بازارپسندی محصول افزایش یافت [۳۴]. شیخ الاسلامی و همکاران (۱۳۸۸) از صمغ گوار و اسید آسکوربیک برای بهبود خواص

رئولوژیک و ویژگی‌های پخت آرد گندم سن‌زده استفاده نمودند. نتایج نشان داد که افزودن گوار و اسید آسکوربیک به صورت مستقل و متقابل توانست خصوصیات رئولوژیکی خمیر و کیفیت بافت نان حاصل از گندم سن‌زده را بهبود بخشد و بهترین اثر در سطح ۰/۵ درصد صمغ گوار و ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسید آسکوربیک مشاهده گردید [۳۵].

۴-۳-رنگ

نتایج مؤلفه‌های رنگی ($L^*a^*b^*$) سطح نمونه‌های تولیدی در جدول ۳ ارائه شده است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد حضور آرد گندم سن‌زده در فرمولاسیون کلوچه منجر به تیره‌تر شدن رنگ نمونه‌های تولیدی شد. به طوری که مؤلفه رنگی L^* و b^* کاهش و مؤلفه رنگی a^* افزایش یافت. این در حالی بود که براساس نتایج مشخص شد حضور اسید آسکوربیک و افزایش سطح مصرف آن در فرمولاسیون کلوچه منجر به روشن‌تر شدن رنگ نمونه‌های تولیدی شد.

Table 3: The effect of bug-damage wheat and acid ascorbic on the crust color ($L^*a^*b^*$ values) of cookies.

Treatments	Bug-damage wheat (%)	Acid ascorbic (ppm)	Crust color		
			L^*	a^*	b^*
1 (Control)	-	-	59.67±0.93 ^{bc}	0.72±0.06 ^d	22.30±1.28 ^b
2	-	30	61.50±1.83 ^{ab}	0.72±0.08 ^d	19.50±0.56 ^{cde}
3	-	60	63.77±1.17 ^a	0.71±0.10 ^d	18.22±0.93 ^e
4	10	-	56.43±0.76 ^{de}	1.23±0.05 ^{bc}	22.83±0.80 ^b
5	10	30	59.53±1.01 ^{bcd}	1.19±0.02 ^c	20.90±0.60 ^{bcd}
6	10	60	59.93±0.56 ^{bc}	1.20±0.09 ^c	18.90±0.75 ^{de}
7	20	-	53.93±0.95 ^{ef}	1.47±0.08 ^a	25.17±0.49 ^a
8	20	30	58.23±0.71 ^{cd}	1.43±0.09 ^{ab}	22.30±0.60 ^b
9	20	60	59.93±1.12 ^{bc}	1.44±0.04 ^{ab}	19.00±0.66 ^{de}
10	30	-	50.63±1.35 ^g	1.60±0.06 ^a	26.37±0.72 ^a
11	30	30	52.10±0.85 ^{fg}	1.54±0.08 ^a	22.17±0.86 ^b
12	30	60	54.03±0.91 ^{ef}	1.51±0.03 ^a	21.77±0.68 ^{bc}

Different letters in each column represent significant difference from one another ($p < 0.05$).

به همین علت، اگر به فرمولاسیون اصلی ماده غذایی، ماده‌ای اضافه شود که دارای سوبسترای مؤثر بر این واکنش‌ها باشد، تغییرات رنگ افزایش می‌یابد. همانطور که اشاره شد حضور آرد گندم سن‌زده در فرمولاسیون کلوچه منجر به تیره‌تر شدن رنگ نمونه‌های تولیدی شد. علت این امر را چنین می‌توان توجیه نمود که پروتئاز سن گندم، اثر تخریب‌کننده بر هر دو پروتئین گلپادین و گلوتهنین دارند و در نتیجه سبب تولید پپتیدهای کوچک‌تر و اسیدهای آمینه می‌شوند. افزایش سطح پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد که با عمل پروتئازها آزاد می‌شوند، باعث افزایش شدت واکنش مایلارد و تیره‌تر شدن رنگ می‌شود [۶]. Bonet و همکاران (۲۰۰۵) میزان ۱/۲ برابری گروه‌های سولفیدریل [۳۹] و Perez و همکاران (۲۰۰۵) میزان حدوداً ۶ برابری گروه‌های سولفیدریل را در نمونه‌های سن‌زده نسبت به سالم گزارش کردند [۴۰]. با اینکه آنزیم سن، پروتئاز است نه ردوکتاز، میزان گروه‌های سولفیدریل در گندم سن‌زده افزایش یافته است. افزایش

از بین ویژگی‌های مواد غذایی، رنگ مهم‌ترین ویژگی دیداری است که اغلب به کیفیت غذا نیز ربط داده می‌شود. رنگ سطحی ماده غذایی اولین ویژگی کیفی آن است که مورد ارزیابی مصرف‌کننده قرار می‌گیرد و می‌تواند بر پذیرش ماده غذایی حتی قبل از ورود غذا به دهان تأثیر بگذارد. مصرف کنندگان اغلب از روی رنگ در مورد ارزش غذایی، ایمنی، عطر و طعم، زمان نگهداری و سایر ویژگی‌های محصولات خوراکی قضاوت می‌کنند و به این علت است که در بسیاری از موارد بین رنگ و خصوصیات ذکر شده همبستگی خوبی وجود دارد. درکی که از رنگ بوجود می‌آید به مشاهده‌کننده و شرایطی که رنگ در آن دیده می‌شود، بستگی دارد [۳۶، ۳۷ و ۳۸]. تغییرات رنگ در مواد غذایی به عوامل متعددی بستگی دارد. دما و زمان پخت از جمله مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تغییرات رنگ است و عامل این تغییرات واکنش‌های قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی یا واکنش مایلارد که در ماده غذایی رخ می‌دهد، نسبت داده شده است.

افزودن ۰/۰۳ درصد اسید آسکوربیک (براساس وزن آرد) سبب روشن تر و شیشه‌ای رنگ نمونه‌ها شد [۱۶]. پورحاجی و صحرائیان (۱۳۹۷) در نتیجه حضور اسید آسکوربیک در فرمولاسیون دونات افزایش مؤلفه رنگی L^* و به عبارتی میزان روشنایی محصول نهایی را گزارش کردند [۳۴]. میرزایی (۱۳۹۲) با فرموله نمودن و ارزیابی تأثیر چند نوع بهبوددهنده (ترکیبی از اسید آسکوربیک، آنزیم زایلاناز و امولسیفایر سدیم استئاروئیل ۲-لاکتیلات) بر کیفیت نان سنگک بیان نمودند نمونه نان حاوی بهبوددهنده روشن تر (کاهش مؤلفه قرمزی و زردی) از نمونه شاهد بود [۲۵].

۵-۳- ویژگی‌های حسی

براساس نتایج ارزیابی حسی و تمام پارامترهای مورد بررسی (فرم و شکل، خصوصیات سطح بالایی، سفتی و نرمی بافت، پوکی و تخلخل و قابلیت جویدن، بو و مزه) (جدول ۴) و در نهایت پذیرش کلی (شکل ۲) می‌توان گفت نمونه حاوی ۱۰ درصد آرد گندم سن زده و ۳۰ پی‌پی‌ام اسید آسکوربیک (اولویت اول)، نمونه شاهد (نمونه فاقد آرد گندم سن زده و اسید آسکوربیک) (اولویت دوم) و نمونه حاوی ۲۰ درصد آرد گندم سن زده و ۶۰ پی‌پی‌ام اسید آسکوربیک (اولویت سوم) سه نمونه برتر پژوهش حاضر بودند. اما از آن جا که هدف از این تحقیق جایگزینی بخشی از آرد گندم سالم با آرد گندم سن زده و ارزش‌آفرینی بود، نمونه‌های حاوی آرد گندم سن زده (اولویت اول و سوم) به عنوان بهترین نمونه‌ها به لحاظ ویژگی‌های حسی معرفی می‌شوند.

گروه‌های سولفیدریل ملاحظه شده در گلوتن آسیب‌دیده، یک شکست مولکولی گلوتن را نشان می‌دهد [۴۱]. این افزایش گروه‌های سولفیدریل می‌تواند به فعالیت پروتئولیتیکی گلوتن سن زده نسبت داده شود که گروه‌های مخفی را در دسترس می‌کند یا میزان پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین که اسیدهای آمینه سیستئین بیشتری دارند را افزایش می‌دهد و از این طریق در افزایش شدت رنگ فراورده‌های پخت نقش دارد [۳۹]. بنابراین این انتظار وجود داشت با جایگزینی آرد گندم سالم با آرد گندم سن زده مؤلفه رنگی L^* کاهش و مؤلفه‌های رنگی a^* و b^* افزایش یابد و به عبارتی رنگ نمونه‌های حاوی گندم سن زده تیره‌تر باشد. همچنین نتایج پژوهش حاضر نیز به وضوح نشان داد حضور اسید آسکوربیک و افزایش سطح مصرف آن در فرمولاسیون کلوچه منجر به روشن تر شدن رنگ نمونه‌های تولیدی شد. اسید آسکوربیک با اکسید نمودن رنگدانه‌های موجود در آرد در روشن تر شدن رنگ نقش دارد. همچنین هموار و یکنواخت شدن سطح خمیر و فراورده پخت حاوی اسید آسکوربیک باید یکی از عوامل مؤثر در روشن تر شدن رنگ دانست [۵]. در این زمینه Purlis و Salvadori (۲۰۰۹) براساس یافته‌های تحقیق خود بیان نمودند که تغییرات سطح پوسته، مسئول روشنایی آن است و سطوح منظم و صاف نسبت به سطوح چین‌دار توانایی بیشتری در افزایش میزان مؤلفه رنگی L^* پوسته یا انعکاس نور (درخشندگی) دارد [۴۲]. Kiyashko و Slideltsey (۲۰۲۲) به مطالعه کاربرد اسید آسکوربیک به عنوان یک بهبوددهنده با عملکرد اکسیدکنندگی در نان پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد

Table 4: The effect of bug-damage wheat and acid ascorbic on the sensory properties of cookies.

Treatments	Bug-damage wheat (%)	Acid ascorbic (ppm)	Sensory properties		
			Form and Shape	Surface	Subsurface
1 (Control)	-	-	3.70±0.67 ^{bc}	4.10±0.74 ^{ab}	4.00±0.47 ^a
2	-	30	3.20±0.63 ^{cd}	3.50±0.53 ^{abcd}	3.50±0.53 ^{ab}
3	-	60	2.70±0.67 ^{def}	2.60±0.69 ^{de}	2.80±0.63 ^{bc}
4	10	-	3.10±0.57 ^{cde}	3.70±0.67 ^{abc}	3.50±0.71 ^{ab}
5	10	30	4.60±0.52 ^a	4.40±0.70 ^a	4.00±0.67 ^a
6	10	60	3.70±0.48 ^{bc}	3.30±0.67 ^{bcd}	3.50±0.53 ^{ab}
7	20	-	2.30±0.48 ^{ef}	2.90±0.57 ^{cde}	2.60±0.52 ^c
8	20	30	3.00±0.67 ^{cdef}	3.80±0.42 ^{abc}	3.30±0.48 ^{abc}
9	20	60	4.10±0.57 ^{ab}	4.10±0.88 ^{ab}	3.90±0.326 ^a
10	30	-	2.20±0.42 ^f	2.30±0.48 ^e	2.50±0.71 ^c

11	30	30	2.60±0.52 ^{def}	3.10±0.57 ^{cde}	3.20±0.42 ^{abc}
12	30	60	3.20±0.63 ^{cd}	3.40±0.69 ^{bcd}	3.20±0.42 ^{abc}
Treatments	Bug-damage wheat (%)	Acid ascorbic (ppm)	Sensory properties		
			Firmness and Softness	Chewiness	Odor and Taste
1 (Control)	-	-	3.80±0.42 ^{ab}	3.70±0.48 ^{ab}	3.60±0.52 ^a
2	-	30	3.60±0.52 ^{abc}	3.40±0.52 ^{abc}	2.40±0.52 ^{bc}
3	-	60	3.50±0.53 ^{abc}	2.60±0.70 ^{def}	1.30±0.48 ^d
4	10	-	3.90±0.32 ^a	2.90±0.57 ^{cdef}	2.30±0.48 ^{bc}
5	10	30	3.90±0.57 ^a	3.80±0.79 ^a	3.60±0.52 ^a
6	10	60	4.00±0.63 ^a	2.90±0.32 ^{cdef}	2.20±0.63 ^{bc}
7	20	-	3.80±0.63 ^{ab}	2.30±0.48 ^{ef}	2.00±0.71 ^{bcd}
8	20	30	3.90±0.57 ^a	3.00±0.47 ^{bcd}	2.10±0.32 ^{bcd}
9	20	60	3.70±0.67 ^{ab}	3.20±0.42 ^{ab}	2.70±0.67 ^b
10	30	-	2.50±0.71 ^d	2.20±0.42 ^f	1.60±0.70 ^{cd}
11	30	30	2.80±0.42 ^{cd}	2.50±0.53 ^{def}	2.00±0.47 ^{bcd}
12	30	60	3.00±0.47 ^{bcd}	2.60±0.52 ^{def}	2.10±0.31 ^{bcd}

Different letters in each column represent significant difference from one another ($p < 0.05$).

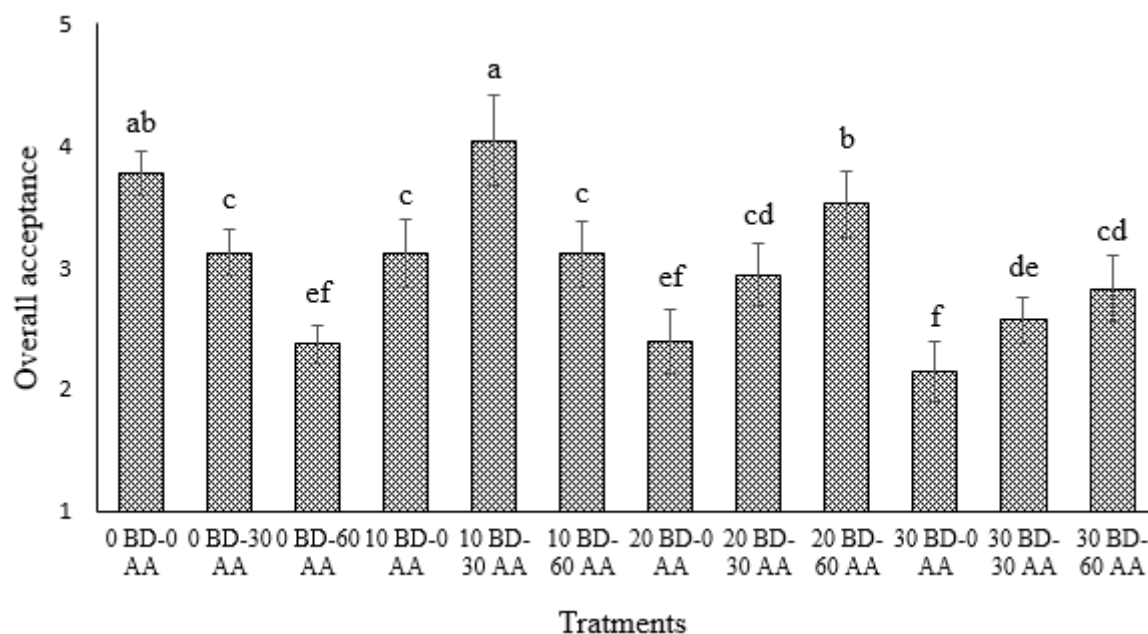


Fig 2: The effect of bug-damage wheat (BD) and acid ascorbic (AA) on the overall acceptance of cookies. Different letters represent significant difference from one another ($p < 0.05$).

خوب و رهایش هرچه بیشتر مواد طعم‌زا می‌شود. از این رو قابل توجه است نمونه‌هایی که از امتیاز بافت (سفتی و نرمی بافت، پوکی و تخلخل و قابلیت جویدن) بهتری برخوردار بودند، دارای امتیاز بو و مزه بیشتری بودند. همانطور که نتایج نشان داد سطوح بالای مصرف آرد گندم سن‌زده به خصوص سطح ۳۰ درصد منجر به کاهش کیفیت کلوچه‌های تولیدی شد و حتی سطح ۲۰ درصد از این آرد تنها در حضور اسید آسکوربیک به ویژه در سطح ۶۰ پی‌پی‌ام عملکرد مثبتی بر ویژگی‌های حسی داشت. در زمینه کاربرد آرد گندم سن‌زده

Koliandris و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند درک بو و مزه و رهایش مواد مولد آن‌ها بستگی به نوع بافت نمونه دارد و در بافت‌هایی که پیوستگی بیشتر است و بافت خوشایند مصرف‌کننده یا ارزیابان چشایی است، درک بو و مزه بیشتر است [۴۳]. Boland و همکاران (۲۰۰۴) این امر را به طریق دیگری توجیه کردند و اعتقاد داشتند برهمکنش‌های بین مواد مولد بو و مزه در محصولات با بافت و ساختار مناسب بهتر اتفاق افتاده است که این امر منجر به افزایش احساس دهانی

۴- نتیجه گیری

این پژوهش با هدف ورود آرد گندم سن زده به عنوان یکی از ضایعات کشاورزی به چرخه خوراکی، این آرد جایگزین آرد گندم سالم در فرمولاسیون کلوچه سنتی زابلی شد و برای جبران خسارات ناشی از سن زدگی از اسید آسکوربیک به عنوان یک اکسیدکننده با عملکرد مثبت بر کمیت و کیفیت آردهای ضعیف استفاده گردید. نتایج نشان داد با جایگزینی آرد گندم سالم با آرد گندم سن زده از میزان رطوبت کلوچه‌ها کاسته شد. این در حالی بود که اسید آسکوربیک در حفظ رطوبت نمونه‌های تولیدی طی فرایند پخت و پس از آن موفق عمل نمود. همچنین نتایج نشان داد نمونه حاوی ۱۰ درصد آرد گندم سن زده و ۳۰ پی پی ام اسید آسکوربیک دارای بیشترین میزان حجم مخصوص و کمترین میزان سفتی بافت (طی یک ماه نگهداری) در مقایسه با سایر کلوچه‌های تولیدی بود. حضور آرد گندم سن زده در فرمولاسیون کلوچه منجر به تیره تر شدن رنگ نمونه‌های تولیدی شد. این در حالی بود که یافته‌ها به وضوح نشان دادند حضور اسید آسکوربیک و افزایش سطح مصرف آن در فرمولاسیون کلوچه منجر به روشن تر شدن رنگ نمونه‌های تولیدی شد. در نهایت براساس نتایج ارزیابی حسی و تمام پارامترهای مورد بررسی (فرم و شکل، خصوصیات سطح بالایی و پایینی، سفتی و نرمی بافت، پوکی و تخلخل و قابلیت جویدن، بو و مزه) و امتیاز پذیرش کلی می‌توان گفت نمونه حاوی ۱۰ درصد آرد گندم سن زده و ۳۰ پی پی ام اسید آسکوربیک (اولویت اول)، نمونه شاهد (نمونه فاقد آرد گندم سن زده و اسید آسکوربیک) (اولویت دوم) و نمونه حاوی ۲۰ درصد آرد گندم سن زده و ۶۰ پی پی ام اسید آسکوربیک (اولویت سوم) سه نمونه برتر پژوهش حاضر بودند. اما از آن جا که هدف از این تحقیق جایگزینی بخشی از آرد گندم سالم با آرد گندم سن زده و ارزش آفرینی بود، نمونه‌های حاوی آرد گندم سن زده (اولویت اول و سوم) به عنوان بهترین نمونه‌ها به لحاظ ویژگی‌های حسی معرفی می‌شوند.

در فرمولاسیون فراورده‌های پخت و اثرات مثبت و منفی آن بر کمیت و کیفیت محصول نهایی چندین مطالعه انجام شده است [۴۴]. Dizlek و Ozar (۲۰۲۳) گزارش کردند استفاده از آرد گندم سن زده بدون حضور اکسیدکننده‌ها در فرمولاسیون فراورده‌های پخت سبب ایجاد بافت، قابلیت جویدن، فرم و شکل، رنگ، بو و مزه نامطلوب شد که در نتیجه آن کاهش کیفیت مشاهده گردید [۱۱]. اکرامیان و همکاران (۱۴۰۲) در تولید وافل از آرد گندم با ۱۰۰ درصد سن زدگی استفاده نمودند. نتایج این محققان نشان داد بالاترین امتیاز پذیرش کلی در ارزیابی حسی در نمونه حاوی ۰/۵ درصد آرد گندم سن زده (گندم با ۱۰۰ درصد سن زدگی) مشاهده شد. در این پژوهش گزارش شد حضور آرد گندم سن زده در فراورده‌های حاوی آرد گندم ضعیف عملکرد مثبت دارد و نه تنها کیفیت کاهش نمی‌یابد، بلکه ویژگی‌های حسی افزایش می‌یابد [۶]. همچنین گزارشاتی مبنی بر بهبود ویژگی‌های حسی در نتیجه حضور اسید آسکوربیک در فرمولاسیون فراورده‌های پخت حاوی آرد ضعیف یا آرد گندم سن زده وجود دارد. در یافته‌های حاصل از این مطالعات آمده است نان حاوی اسید آسکوربیک از عطر و مزه بهتری برخوردار بود. Kiyashko و Slideltsey (۲۰۲۲) به مطالعه کاربرد اسید آسکوربیک به عنوان یک بهبوددهنده با عملکرد اکسیدکنندگی بر ویژگی‌های حسی نان پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد افزودن ۰/۰۳ درصد اسید آسکوربیک (براساس وزن آرد) به فرمولاسیون، عطر و مزه نان را بهبود بخشید و سبب نرم تر شدن بافت و احساس دهانی مطلوب شد [۱۶]. Zeidvand و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی سطوح متفاوت (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵۰ درصد) اسید لاکتیک، اسید آسکوربیک و آزودی کربن امید بر ویژگی‌های کیفی نان سنگک پرداختند. براساس یافته‌ها مشخص شد حضور افزودنی‌های استفاده شده در فرمولاسیون نان سبب بهبود ویژگی‌های حسی (مزه، بو، رنگ و بافت) و کاهش بیاتی شد [۱۲].

۵- منابع

- [1] Mahrousi, T. and Pourfarzad, A. (2021). An investigation of quality and shelf-life of rice bran fortified Fouman cookie using symmetric and asymmetric multivariate methods. *Journal of Food Researches*, 31(1): 95-114.
- [2] AleemZaker, M. D., Genitha, T. R. and Hashmi, S. I. 2012. Effects of defatted soy flour incorporation on physical, sensorial and nutritional properties of biscuits. *Journal of Food Process & Technology*, 3: 1-4.
- [3] Aziah, A. A., Noor, A. Y. and Ho, L. H. 2012. Physicochemical and organoleptic properties of cookies incorporated with legume flour. *International Food Research Journal*, 19(4). 1539-1543.
- [4] Maghaydah, S., Abdul-Hussain, S., Ajo, R., Tawalbeh, Y. and Elshoryi, N. 2013. Effect of lupine flour on baking characteristics of gluten free cookies. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(5): 600-605.
- [5] Zeng, Q., Wei, T., Song, Y., Guo, X., Jiang, H. and Zhang, G. 2022. Comparative study on composite buckwheat dough and steamed bread modified by transglutaminase and ascorbic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(2): 1273-1282.
- [6] Ekramian, H., Saeedi Asl, M. R. Karimi, M. Sheikholeslami, Z. and Pedram Niya, A. (2023). Comparison the Effect of Sunn Pest Flour wheat and Microbial Protease on Waffle Production. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 15(2): 151-162.
- [7] Ozulku, G. and Siviri Ozay, D. 2020. Improving the bread quality of suni-bug damaged wheat flours by sourdough bread making and liquid rye sour. *Acta Alimentaria*, 49(2): 170-180.
- [8] Siviri, D. H. D., Sapirstein, W., Bushuk, and Korsel, H. 2002. Wheat intercultivar difference in susceptibility of glutenin protein to effects of bug protease. *Cereal Chemistry*, 79 (1): 41-44.
- [9] Shokraie, M., Salehifar, M. and Afshin Pazhooh, R. 2018. Rheological and quality characteristics of pasta produced from sunn pest damaged wheat flour and ascorbic Acid. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20: 935-963.
- [10] Dizlek, H. and Ozar, M. S. 2017. Improvement bread characteristics of high level sunn pest (*Eurygaster integriceps*) damaged wheat by using transglutaminase and some additives. *Journal of Cereal Science*, 77: 90-96.
- [11] Dizlek, H. and Ozar, M. S. 2023. Comparison of transglutaminase and L-ascorbic acid additives in improving the quality of bread made from sunn pest (*Eurygaster integriceps*) damaged wheat. *International Journal of Food Science and Technology*, 58(3): 1275-1283.
- [12] Zeidvand, S., Movahhed, S. and Rajaei, P. 2023. Effect of lactic acid, acid ascorbic and azodicarbonamid on microstructure and organoleptic properties of Sangak bread. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 13(2): 61-69.
- [13] Every, D., Motoi, L. S. C. and Simmons, L. D. 2008. Predicting wheat quality consequences of the ascorbic acid improver effect. *Journal of Cereal Science*, 48: 339-348.
- [14] Faccio, G., Flander, L., Buchert, J., Saloheimo, M. and Nordlund, E. 2012. Sulfhydryl oxidase enhances the effects of ascorbic acid in wheat dough. *Journal of Cereal Science*, 55: 37-43.
- [15] Maforimbo, E., Nguyen, M. and Skurray, G. R. 2006. The effect l-ascorbic acid on the rheological properties of soy-wheat dough: a comparison of raw and physically modified soy flours. *Journal of Food Engineering*. 72: 339-345.
- [16] Kiyashko, N. and Slideltsey, O. 2022. The use of ascorbic acid as an improver of oxidative action in production of wheat bread. *International Scientific Conference on Agricultural Machinery Industry "INTERAGROMASH 2022"*, 574: 2544-2549.
- [17] Sheikholeslami, Z., Karimi, m., Komeili, H. R. and Mahfouzi, M. 2018. A new mixed bread formula with improved physicochemical properties by using hull-less barley flour at the presence of guar gum and ascorbic acid. *LWT*, 93: 628-633.
- [18] AACC. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th Ed., Vol. 2. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- [19] Bassinello, P. Z., Freitasb, D. D. G. C., Ascherib, J. L. R., Takeitib, C. Y., Carvalhoa, R. N., Koakuzua, S. N., and Carvalhoc, A. V. 2011. Characterization of cookies formulated with rice and black bean extruded flours. *Procedia Food Science*, 1: 1645 – 1652.
- [20] Naji-Tabasi, S., and Mohebbi, M. 2014. Evaluation of cress seed gum and xanthan gum effect on macrostructure properties of gluten-free bread by image processing. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 9(1): 100-110.
- [21] Yaseen, A.A., Shouk, A.H., and Ramadan, M.T. 2010. Corn-wheat pan bread quality as affected by hydrocolloids. *Journal of American Science*, 6(10): 684-690.
- [22] Jalali, M., Sheikholeslami, Z., Elhamirad, A. H., Haddad Khodaparast, M. H. and Karimi, M. 2019. The effect of Balangu Shirazi (*Lallemantia Royleana*) gum on the quality of gluten-free pan bread containing pre-gelatinization simple corn flour with microeave. *Carpethain Journal of Food Science and Technology*, 11(2): 68-83.
- [23] Caballero, A., Bonet, A., Rosell, C. M. and Gomez, M. 2005. Effect of microbial transglutaminase on the rheological and thermal properties of insect damaged wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 42:93-100.
- [24] Hariri, G., Williams, P. C., and El-Haramein, F. J. 2000. Influence of pentatomid insects on the physical dough properties and two-layered flat

bread baking quality of Syrian Wheat. *Journal of Cereal Science*, 31:111-118.

[25] Mirzaei, M. (2012). Formulating and evaluating the effect of several types of improvers on the quality of Sangak bread. Master thesis of Food Science and Industry, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology.

[26] Sahraiyani, B., Karimi, M. and Sheikholeslami, Z. (2018). Evaluation and Comparison of Effect of Lepidium Sativum Seed Gum and Xanthan on Texture and Functional Properties of Gluten Free Cake (Rice-Corn). *Food Engineering Research*, 17(65): 1-14.

[27] Velez-Ruiz, J. and Sosa-Morales, M. 2003. Evaluation of physical properties of dough of donuts during deep-fat frying at different temperatures. *International Journal of Food Properties*, 6: 341-353.

[28] Dizlek, H. and Ozar, M. S. 2016. The improvement of bread characteristics of sunn pest (*Eurygaster integriceps*) damaged bread wheat by blending application and using additives. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 8(3): 427-437.

[29] Ghayour Asli, M. A., Haddad Khodaparast, M. and Karimi, M. Effect of Alpha amylase and Ascorbic acid on rheological properties of dough and specific volume of strudel bread. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 4(2): 45-55.

[30] Lee, K. and Brennand, C. P. 2005. Physicochemical, textural and sensory properties of a fried cookie system containing soy protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*, 40: 501-508.

[31] Sahraiyani, B., Pourhaji, F. and Alizadeh Behbahani, B. (2021). Evaluation of the effect of cheese powder and ultrasonic wave on physicochemical and sensory properties of gluten-free oil cake. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 17(4): 423-435.

[32] Amal, A.H., Esam, H.M., and Abo EL-Fath, A. 2014. Improving dough rheology and cookie quality by protease enzyme. *American Journal of Food Science and Nutrition Research*, 1(1):1-7.

[33] Sarai, M. and Karimi, M. 2013. Investigating the use of aged wheat flour in the production of soft biscuits and comparing it with protease enzyme in strong flour for the production of soft biscuits. The third national conference of food science and industry. Khorasan Razavi, Qochan, 1-12.

[34] Pourhaji, F. and Sahraiyani, B. (2018). Evaluating the Oxidative Stability of Doughnut Containing Ascorbic Acid and Green Tea Extract During Storage Using Principal Component Analysis (PCA). *Food Engineering Research*, 41-56.

[35] Sheikholeslami, Z., Mortazavi, S. A. Porazarang, H. and Nasiri, M. Effect of guar gum and ascorbic acid on rheological and baking properties of insect damaged wheat flour. *Food Processing and Preservation Journal*, 1(3): 65-82.

[36] Pedreschi, F., Leon, J., Mery, D. and Moyano, P. 2006. Development of a computer vision system to measure the color of potato chips. *Food Research International*, 39: 1092-1098.

[37] Romani, S., Rocculi, P., Mendoza, F. and Rosa, M. D. 2009. Image characterization of potato chip appearance during frying. *Journal of Food Engineering*, 93: 487-494.

[38] Sahin, S. and Sumnu, S. G. 2010. Advances in deep-fat drying of foods. CRC press, new York.

[39] Bonet, A., P. A. Caballero, M. Gomez, and C. M. Rosell. 2005. Microbial transglutaminase as a tool to restore the functionality of gluten from insect-damaged wheat. *Cereal Chemistry*. 82(4):425-430.

[40] Perez, G., A. Bonet and C. M. Rosell. 2005. Relationship between gluten degradation by *Aelia* spp. and *Eurygaster* spp. and protein structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85:1125-1130.

[41] Werteker, M. and Kramreither G. 2008. Relation between susceptibility to wheat bug attack and digestibility of glutenin. *Journal of Cereal Science*, 47(2): 226-232.

[42] Purlis, E. and Salvadori, V. 2009. Modelling the browning of bread during baking. *Food Research International*, 42: 865-870.

[43] Koliandris, A., Lee, A., Ferry, A., Hill, S. and Mitchell, J. 2008. Relationship between structure of hydrocolloid gels and solutions and flavor release. *Food Hydrocolloids*, 22: 623-630.

[44] Boland, B., Buhr, K., Giannouli, P. and van Ruth, S. M. 2004. Influence of gelatin, starch, pectin and artificial saliva on the release of 11 flavor compounds from model gel systems. *Food Chemistry*, 86: 401-411.



Scientific Research

Investigation of the effect of bug-damaged wheat and ascorbic acid on the physicochemical and sensory characteristics of Zabol traditional cookie

Narges Mir¹, Gholamhossein Haghayegh^{2*}, Mohammad Amin Miri², Bahareh Sahraian³

1- M.S. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zabol , Zabol, Iran

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

3- Department of Food Quality and Safety, Food Science and Technology Research Institute, ACECR Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 2024/4/3

Accepted: 2024/5/8

Keywords:

Ascorbic acid,
Zabol, Traditional cookies,
Bug-damage wheat,
Technological properties.

DOI: 10.22034/FSC.T.22.158.254.

*Corresponding Author E-
gh2002_haghayegh@yahoo.com

Haghayegh@uoz.ac.ir

ABSTRACT

Bug-damage wheat is one of the agricultural wastes, which by entering the human cycle will significantly contribute to the industry of baking products. Therefore, in the present study, bug-damage wheat flour at levels of 10, 20 and 30% was replaced by healthy wheat flour in the formulation of traditional Zaboli cookies and ascorbic acid at levels of 30 and 60 pp was used to compensate. The results showed that the amount of moisture, ash, fat, protein, Falling's number and Zeleny's number of healthy and bug-damage wheat flour could not be a suitable indicator to detect healthy and bug-damage wheat. This was despite the fact that the amount of wet gluten and gluten index were effective parameters for distinguishing between healthy and healthy and bug-damage wheat, and the amount of gluten and gluten index was higher in the flour sample obtained from healthy wheat. Also, the results showed that by replacing healthy and bug-damage wheat flour, the moisture level of cookies decreased. Ascorbic acid was successful in maintaining the moisture of the cookies during the baking process and after. In addition, based on the results, it was indicated that the sample containing 10% bug-damage wheat flour and 30 ppm of ascorbic acid had the highest specific volume and the lowest firmness during one month of storage. The presence of bug-damage wheat flour and ascorbic acid in the formulation led to the darker and lighter color of the samples, respectively. Based on the overall acceptance score, it was determined that the sample containing 10% bug-damage wheat flour and 30 ppm ascorbic acid (first priority), the control sample (without bug-damage wheat flour and ascorbic acid) (second priority) and the sample containing 20 The percentage of bug-damage wheat flour and 60 ppm of ascorbic acid (third priority) were the three best samples. But since the purpose of using bug-damage wheat flour, the samples containing bug-damage wheat flour (first and third priority) are introduced as the best samples in terms of technological and sensory properties.



بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از پنیر لیقوان

مهدی حسین‌زاده^۱، صمد وجدی حکم‌آباد^۲ و جلیل خندقی^{۳*}

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران.
۲. استادیار گروه علوم دامی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران.
۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران.
۴. گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۴	عامل اصلی حضور میکروفلور خاص مانند باکتری‌های لاکتیک اسید در محصولات لبنی تهیه شده از شیر خام مانند پنیر لیقوان، روش‌های سنتی آماده‌سازی این محصولات است. تعداد زیادی از این باکتری‌ها میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بوده و بعنوان مثال گونه‌های بسیاری از باکتری‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس و پدیوکوکوس که در غذاها یافت شده‌اند، ویژگی پروبیوتیکی نشان داده‌اند. در تحقیق حاضر پس از جداسازی فنوتیپی باکتری‌های لاکتیک اسید از ۲۵ نمونه پنیر سنتی لیقوان، جدایه‌ها با استفاده از آزمون PCR اختصاصی جنس‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس و پدیوکوکوس تایید شدند. سپس ویژگی‌های پروبیوتیکی شامل مقاومت به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان، خواص ضد میکروبی، خاصیت خودتجمعی و تجمع مشترک، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و قدرت همولیزکنندگی سویه‌های منتخب مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس آزمون‌های تشخیص بیوشیمیایی و مولکولی، از بین ۸۴ سویه‌ی منتخب، تعداد ۵۸ جدایه به‌عنوان لاکتوباسیلوس (۲۹ جدایه)، انتروکوکوس (۱۸ جدایه) و پدیوکوکوس (۱۱ جدایه) شناسایی شدند. غربال‌گری این جدایه‌ها برای زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان نشان داد که ۲۶/۱ درصد جدایه‌ها (۱۴ جدایه) مقاومت بالای ۵۰ درصد داشتند. همچنین، تعداد نه جدایه از سویه‌های منتخب اثر ضد میکروبی قوی روی لیستریا مونوسیتوجنز و استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین کپک‌های اسپرژیلوس فلاووس و پنی‌سیلیوم سیترونیوم نشان دادند. به‌علاوه، بر اساس قابلیت خودتجمعی و تجمع مشترک، تعداد چهار جدایه‌ی LS106، LS71، LS33 و LS6 (متعلق به دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس) انتخاب شدند. در نهایت، بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی حاکی از حساسیت این جدایه‌ها به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار رفته بود بطوریکه تمام جدایه‌ها نسبت به تتراسایکلین و آمپی‌سیلین حساس بودند. همچنین خاصیت همولیتیکی در هیچ‌یک از این چهار جدایه مشاهده نشد. بنابراین، این جدایه‌ها به‌عنوان گزینه‌های مناسب برای استفاده در محصولات غذایی تخمیری و بهره‌گیری از خواص سودمند آن‌ها معرفی می‌شوند.
کلمات کلیدی: پروبیوتیک، پنیر لیقوان، لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس	
DOI:10.22034/FSCT.22.158.270. * مسئول مکاتبات: khandaghi@iausa.ac.ir	

۱-مقدمه

مصرف محصولات لبنی تخمیری به علت وجود فلور میکروبی مفید در آن و متابولیت‌های آن‌ها، نقش به‌سزایی در سلامت مصرف‌کنندگان دارد. روش‌های سنتی جهت آماده‌سازی محصولات لبنی تهیه شده از شیر خام دام‌های مختلف مانند گاو و بز و گوسفند عامل حضور میکروبیوتای خاص در این محصولات است که معمولاً از دسته باکتری‌های لاکتیک اسید هستند [۱]. تحقیقات نشان داده است که این باکتری‌های مفید به‌واسطه متابولیت‌هایی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و پپتیدهای فعال زیستی مانند باکتریوسین‌ها و ترکیبات شبه باکتریوسینی، می‌توانند به صنعت غذا در تولید فرآورده‌های سلامت محور کمک به‌سزایی بکنند [۲]. پنیر به عنوان یک عضو مهم خانواده لبنیات، منبع خوبی برای پروتئین، کلسیم و فسفر محسوب می‌شود. آنچه سبب وجود آمدن انواع پنیرها شده است روش‌های متنوع تولید آن یعنی دلمه کردن، آبگیری و رساندن پنیر می‌باشد [۳]. یکی از محصولات لبنی تخمیری سنتی ایران، پنیر لیقوان است که نوعی پنیر بدون استارتر و نیمه سفت است که به‌طور سنتی از مخلوط شیر میش، بز در روستای لیقوان در تبریز تهیه می‌شود. میزان تولید پنیر در منطقه لیقوان سالانه بیش از ۳۱۵۰ تن است و این پنیر به دلیل طعم خاص آن، پرفرودارترین نوع پنیرهای سنتی ایران است. مهم‌ترین وجه تمایز پنیر لیقوان با سایر محصولات مشابه، استفاده از شیر خام بدون افزودن کشت استارتر در فرمولاسیون آن است [۴].

باکتری‌های اسیدلاکتیک^۱ یا LAB گروه هتروژنی از کوکسی‌ها یا باسیل‌های گرم مثبت و بدون اسپور هستند که بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناسی، متابولیک و فیزیولوژیک در یک گروه قرار گرفته‌اند. متابولیت اصلی تولید شده توسط آن‌ها، اسیدلاکتیک حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها است [۵]. این باکتری‌ها دارای کاربرد بسیار زیادی در صنعت غذا می‌باشند به طوری‌که تخمیر لاکتیکی علاوه بر افزایش زمان ماندگاری، باعث بهبود

خواص ارگانولپتیک غذاها نیز می‌شود [۶]. همچنین باکتری‌های اسید لاکتیک اصلی‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بوده و گونه‌های بسیاری از باکتری‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس، لاکتوکوکوس و پدیدوکوکوس که در غذاها یافت شده‌اند، ویژگی پروبیوتیکی از خود نشان دادند [۷].

به دلیل اهمیت فراوان این باکتری‌ها، جداسازی و شناسایی گونه‌های جدید این باکتری‌ها از منابع مختلف غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است. عموماً شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک بر اساس ویژگی‌های مختلف فنوتیپیکی (ریخت‌شناسی سلول، شرایط رشد و الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها) انجام می‌شود [۸] ولی این روش‌ها بخصوص در تمایز سویه‌های باکتری‌های LAB نتایج طبقه‌بندی واضحی را ارائه نمی‌کنند. بنابراین تشخیص به‌کمک روش‌های مولکولی مانند توالی‌یابی ژن‌های 16/23 S rRNA و یا آزمون‌های PCR اختصاصی جنس و گونه^۲ به عنوان ابزار موثری برای شناسایی این گروه از باکتری‌ها در مواد غذایی تخمیری انجام می‌شود [۹] به‌طوریکه، مطالعات بسیاری در زمینه کاربرد روش‌های مولکولی برای شناسایی جدایه‌های LAB از غذاهای مختلف انجام شده است [۱، ۱۰].

از ویژگی‌های سودمند پروبیوتیک‌ها می‌توان به افزایش فراهمی زیستی مواد مغذی، اصلاح و تعدیل فلور میکروبی دستگاه گوارش، اثرات ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا، کاهش سطح کلسترول سرم خون و جلوگیری از سرطان [۱۱] اشاره کرد. پروبیوتیک‌ها برای اعمال اثرات خود، باید در برابر pH پایین و نمک‌های صفاوی مقاومت داشته باشند تا در دستگاه گوارش فوقانی زنده بمانند و سپس با چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال روده کلونیزه شوند [۱۲]. سایر ویژگی‌های پروبیوتیکی ضروری این میکروارگانیسم‌ها، بی‌خطر بودن آن‌ها برای مصرف‌کننده است که عدم مقاومت

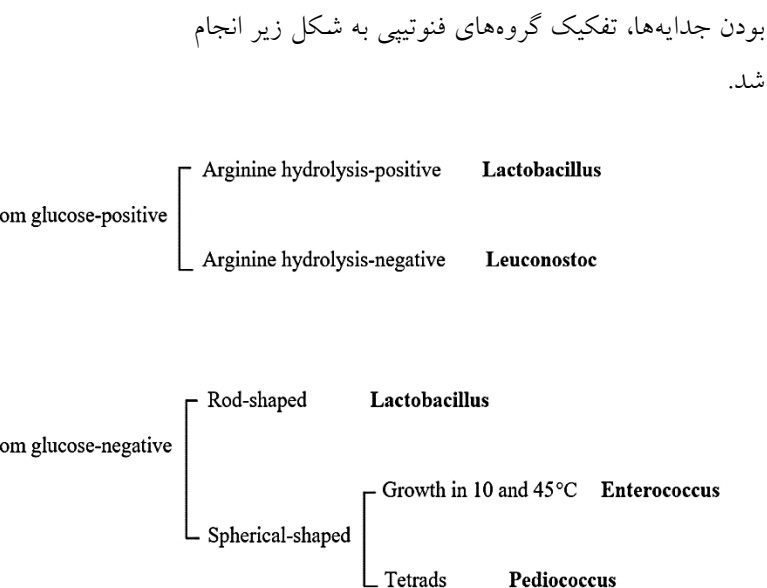


Figure1. Differentiation scheme for lactic acid bacteria isolated from Lighvan cheese

۲-۳- تایید تشخیص به روش مولکولی

شناسایی مولکولی جدایه‌ها پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج (Pouya Gene Azma-PD115-50 Iran)، انجام گرفت. برای این منظور واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر آغازگر اختصاصی جنس، ۰/۲ میکرومولار dNTP، ۲ میکرومولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase در دستگاه ترموسایکلر (PTC 200 Waltham, USA) انجام گرفت. سیکل‌های حرارتی بکار رفته برای همه آغازگرها شامل پنج دقیقه واسرشت سازی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و هفت دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس در پایان چرخه‌ی حرارتی بود. برای آغازگر مختص جنس پدیوکوکوس ۳۰ چرخه حرارتی شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها (Annealing) در دمای ۶۱ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و توسعه آغازگر (Elongation) در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه انجام گرفت. برای آغازگرهای مختص جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس ۳۰ چرخه حرارتی بصورت Touchdown شامل واسرشت سازی در

دارویی به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی از مهم‌ترین آن‌ها است [۱۳].

اگرچه در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی بر روی جدایه‌های پروبیوتیک غذاهای تخمیری سنتی ایرانی انجام شده است [۱۴، ۱۵]، جستجو برای یافتن سویه‌های موثر دیگر هنوز هم ادامه دارد چرا که در مناطق مختلف میکروفلور این محصولات با توجه به شرایط فصلی و دیگر عوامل محیطی می‌تواند متغیر باشد [۱۶]. این موضوع تلاش برای یافتن جدایه‌های وحشی با توان پروبیوتیک در محصولات تخمیری هر منطقه جغرافیایی را توجیه می‌نماید. با توجه به مطالب ذکر شده، جداسازی و بررسی جمعیت باکتری‌های لاکتیک اسید از پنیر سنتی لیقوان و شناسایی خواص پروبیوتیکی و جنبه‌های ایمنی این جدایه‌ها مهمترین اهداف پژوهش حاضر را تشکیل می‌دهد.

۲-۲ روش کار

۲-۱- نمونه‌برداری

این مطالعه در زمستان سال ۱۴۰۲ و به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتیک اسید از پنیر سنتی لیقوان انجام گرفت. برای این کار، تعداد ۲۵ نمونه پنیر سنتی لیقوان به‌صورت تصادفی از محل‌های تولید در منطقه لیقوان تبریز برداشت شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه واقع در تبریز منتقل شدند.

۲-۲- جداسازی باکترهای لاکتیک اسید

برای جداسازی اولیه باکتری‌های لاکتیک اسید، از خصوصیات فنوتیپیکی آن‌ها استفاده شد [۱۷، ۱۸]. برای این منظور مقدار یک گرم از نمونه پنیر به ۹ میلی‌لیتر محلول استریل سرم فیزیولوژی اضافه شده و پس از تهیه رقت‌های متوالی ده برابر، نمونه‌ها در سطح محیط کشت MRS آگار کشت شدند. به‌منظور ایجاد شرایط رشد بهینه باکتری‌های مزوفیل و ترموفیل، پلیت‌ها ۲۴-۷۲ ساعت در شرایط بیهوازی و در دو دمای ۳۰ و ۴۲ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند. تعداد پنج پرگنه با ریخت‌شناسی متفاوت از هر پلیت انتخاب و پس از تایید گرم مثبت و کاتالاز منفی

انجام گرفت. توالی آغازگرهای بکار رفته در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم برماید الکتروفورز شد (Bio-Rad, USA).

دمای ۹۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها از دمای ۵۹ تا ۵۶ درجه برای آغازگر مختص جنس انتروکوکوس و ۵۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها از دمای ۵۹ تا ۵۲ درجه برای آغازگر مختص جنس لاکتوباسیلوس و سپس توسعه آغازگرها در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه

Table1. Genus-specific primers used for the detection of LAB isolates from Lighvan cheese

Primers	Primers Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
Lactobacillus genus-specific primers			
LbLMA1-rev	F: CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	209	[۱۹]
R16-1	R: CTTGTACACACCGCCCGTCA		
Enterococcus genus-specific primers			
Ent1	F: TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	[۲۰]
Ent2	R: AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
Pediococcus genus-specific primers			
Pedio_F	F: GAAGTCGTGTACGTTGAAAAGTGCTGA	701	[۲۱]
Pedio_R	R: AGTGGAAGTCCATGTGTAG		

۲-۴-۲- اثرات ضد میکروبی

روش انتشار در چاهک برای تعیین فعالیت ضد باکتریایی ایزوله‌های LAB منتخب بر روی باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت لیستریا مونوسیتوجنز و استافیلوکوکوس ارئوس و دو باکتری شاخص گرم منفی اشرشیاکلی و سالمونلا انتریکا استفاده شد [۱۰]. ابتدا باکتری‌های بیماری‌زای شاخص در سطح محیط MRS agar کشت و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، چاهک‌های با قطر ۵ میلی‌متر در این پلیت‌ها ایجاد شده و ۵۰ میکرولیتر از فیلتر شده‌ی (از طریق فیلتر ۰/۲ میکرومتر) کشت تازه لاکتیک اسید باکتری‌های منتخب به هر چاهک اضافه شد. به این منظور فرم خنثی شده فیلتر شده‌ها (pH=۷/۲) که با آنزیم کاتالاز تیمار شده است استفاده گردید. پس از انکوباسیون یک شبه پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، مناطق عدم رشد دارای قطر بالاتر از ۱۰ میلی‌متر به عنوان اثر ضد میکروبی قوی در نظر گرفته شد.

برای بررسی فعالیت ضد قارچی نیز کپک‌های آسپرژیلیوس فلاووس و پنی‌سیلیوم سیترونیوم استفاده شد (Wang et al., 2012). برای این کار محیط کشت PDA ۳ حاوی غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ درصد (v/v) از سوسپانسیون‌های

۲-۴-۲- بررسی خواص پروبیوتیکی

۲-۴-۱- مقاومت به شرایط معادل دستگاه گوارش انسان
برای ارزیابی زنده‌مانی ایزوله‌های LAB در محیط مشابه معده‌ی انسان، بررسی تحمل هم‌زمان سویه‌ها به اسید و پپسین (pH سوسپانسیون میکروبی به ۲/۵ رسانده شده و مقدار ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به آن پپسین اضافه شد) انجام شد. پس از یک و سه ساعت انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه (با توجه مدت زمان طبیعی توقف غذا در محیط معده در انسان)، آن‌ها در محیط MRS agar کشت سطحی شده و تعداد باکتری‌های زنده مانده گزارش گردید (۲۲). همچنین مقاومت جدایه‌ها به شرایط معادل روده کوچک با تلقیح رسوبات سلولی کشت تازه جدایه‌های LAB در MRS broth حاوی ۰/۳ درصد صفرا (w/v) و یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر پانکراتین (pH=۸) انجام شد. پس از دو و چهار ساعت انکوباسیون آن‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (با توجه مدت زمان طبیعی توقف غذا در روده در انسان)، باکتری‌های زنده مانده شمارش شد [۲۲] و در نهایت از باکتری‌های منتخب که مقاومت بالاتری به اسید و صفرا از خود نشان دادند برای ادامه کار استفاده گردید.

سلسیوس به حالت سکون قرار گرفت و در پایان، خاصیت تجمع مشترک مطابق رابطه زیر محاسبه شد.

$$\text{Co-aggregation \%} = [(A_p + A_L)/2 - (A_{\text{mix}})/(A_p + A_L)/2] \times 100$$

A_p ، A_L و A_{mix} به ترتیب جذب نوری سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زا، جدایه‌های LAB و مخلوط آن‌ها پس از ۴ ساعت انکوباسیون در طول موج ۶۲۰ نانومتر می‌باشد.

۲-۴-۴- مقاومت آنتی‌بیوتیکی

حساسیت لاکتیک اسید باکتری‌های منتخب به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی با استفاده از روش انتشار دیسک^۶ انجام گرفت [۲۵]. برای این منظور، پس از تهیه کشت چمنی از سوسپانسیون کشت تازه جدایه‌های LAB (معادل با استاندارد نیم مک‌فارلند) روی محیط کشت MRS agar، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل ونکوماکسین ($30\mu\text{g}$)، سفیگزیم ($5\mu\text{g}$)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، کلیندامایسین ($2\mu\text{g}$)، تتراسایکلین ($30\mu\text{g}$)، کلرامفنیکل ($30\mu\text{g}$)، آمپی‌سیلین ($10\mu\text{g}$)، اریتروماکسین ($5\mu\text{g}$)، آزیترومایسین ($15\mu\text{g}$)، جنتامایسین ($10\mu\text{g}$)، سفتریاکسون ($30\mu\text{g}$) تهیه شده از شرکت پادتن طب ایران، با فواصل مناسب روی محیط کشت قرار داده شد. میانگین دو قطر عمود بر هم هاله عدم رشد شکل گرفته پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ثبت گردید.

۲-۴-۵- خاصیت همولیتیکی

به منظور ارزیابی قدرت همولیز کنندگی، جدایه‌های LAB در محیط کشت آگار خون‌دار حاوی ۵ درصد خون گوسفند، کشت و گرم‌خانه‌گذاری شدند (۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس). تشکیل هاله همولیز شفاف و یا تغییر رنگ سبز رنگ در اطراف پرگنه‌ها به ترتیب به عنوان همولیز بتا و آلفا در نظر گرفته شد [۲۶].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی باکتری‌های لاکتیک اسید

فیلترشده جدایه‌های لاکتیک اسید باکتری تهیه و پس از جامد شدن محیط کشت تکه‌ای با قطر حدود ۵ میلی‌متر از کلنی تازه کپک شاخص (با جدا کردن قطعه قارچی از محیط خارجی پرگنه کپک رشد کرده در پلیت) در مرکز آن تلقیح شد. پلیت‌ها تا یک هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شده و حداقل غلظت بازدارنده از رشد^۴ هر کپک بدست آمد. سپس رشد کلنی کپک (میانگین دو قطر عمود بر هم) در پلیت‌های تیمار شده (T) و شاهد (C) اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رشد (I) در این غلظت بصورت زیر محاسبه گردید [۲۳].

$$I (\%) = [(C-T)/C] \times 100$$

۲-۴-۳- خاصیت خود تجمعی^۵ و تجمع مشترک^۶

این دو ویژگی به روش اسپکتروفوتومتری تعیین شده است [۲۴]. پس از گرم‌خانه‌گذاری جدایه‌های LAB در محیط MRS broth (۲۴ ساعت، ۳۷ درجه سلسیوس) و تهیه سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند، رسوب سلول‌ها با دو بار سانتریفیوژ کردن در دستگاه سانتریفیوژ بهسان مدل MC10 (۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه) جدا و پس از شسته شدن، مجدداً در همان حجم فسفات بافر وارد شد. سپس مخلوط حاصل ورتکس شده و مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس به حالت سکون قرار داده شد. درصد خاصیت تجمعی با استفاده از رابطه زیر بدست آمد.

$$\text{Auto-aggregation \%} = 1 - (A_F/A_0) \times 100$$

A_0 و A_F به ترتیب جذب نوری پایانی و اولیه سوسپانسیون جدایه‌های LAB می‌باشد که در طول موج ۶۲۰ نانومتر اسپکتروفوتومتر (Cecil-aquarius, UK) اندازه‌گیری شده است.

برای بررسی خاصیت تجمع مشترک نیز پس از تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی به روش اشاره شده، حجم‌های مساوی از هر سوسپانسیون جدایه‌ی LAB با هر کدام از باکتری‌های بیماری‌زای /شریشیا کولی و سالمونلا انتریکا مخلوط و پس از ورتکس شدن، ۴ ساعت در ۳۷ درجه

6- Co-aggregation

7 -Disk Diffusion Method

4- Minimum inhibitory concentration

5 -Auto-aggregation

پایان، تعداد ۵۸ جدایه به عنوان لاکتوباسیلوس (۲۹ جدایه)، انتروکوکوس (۱۸ جدایه)، پدیوکوکوس (۱۱ جدایه) تایید شدند. شکل ۱ یکی از تصاویر ژل آگارز مربوط به تایید مولکولی جدایه‌های LAB نمونه‌های پنیر لیقوان را نشان می‌دهد.

از مجموع ۱۲۵ پرگنه‌ی سفید تا خاکستری جداسازی و خالص‌سازی شده از پلیت‌های مختلف محیط کشت MRS agar، ۸۴ جدایه (۶۷/۲ درصد) پس از انجام آزمون‌های فنوتیپی به عنوان لاکتوباسیلوس (۳۹ جدایه)، انتروکوکوس (۲۵ جدایه) و پدیوکوکوس (۲۰ جدایه) انتخاب و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر یک از جنس‌های باکتریایی مذکور توسط آزمایش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. در

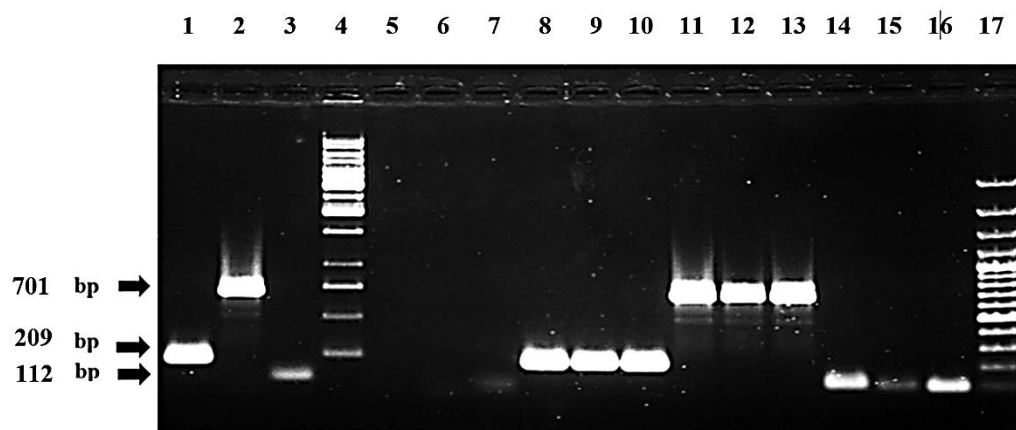


Figure 2. Image of the 1.5% gel agarose (Invitrogen, G501802) of PCR products of Lighvan cheese isolates using genus-specific primers for *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Pediococcus* genera described in Table 1. Lane 4: 1Kbp marker (Sinaclon SL 7051, Iran); Lane 17: 100bp marker (Sinaclon SL 7031, Iran); Lanes 1-3: positive control for *Lactobacillus plantarum* (PTCC 1058), *Pediococcus pentosaceus* (ATCC 25744) and *Enterococcus faecalis* (PTCC 1237); Lane 5-7: negative control (without template DNA); Lanes 8-16: DNA samples isolated from Lighvan cheese.

۲-۳- خواص پروبیوتیکی جدایه‌ها

۳-۲-۱- مقاومت به شرایط معادل دستگاه گوارش انسان در جدول ۲ جدایه‌های LAB که درصد بقای آن‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده انسان بالاتر از ۵۰ بوده و برای ادامه مطالعه انتخاب شده‌اند، نشان داده شده است. باکتری‌های پروبیوتیک باید بتوانند ۲ تا ۳ ساعت در محیط معده انسان (با pH حدود ۳ و آنزیم پپسین) دوام آورده و سپس در مدت حدود ۴ ساعت از روده کوچک (با حضور صفرا و آنزیم‌های گوارشی مانند پانکراتین) به سلامت عبور کنند تا اثرات مفید خود را بروز دهند [۳۲، ۳۳] لذا مقاومت نسبت به اسید و صفرا مهم‌ترین و اولین ویژگی یک باکتری پروبیوتیک محسوب می‌شود. در تحقیق حاضر ۲۶/۱ درصد جدایه‌های لاکتیک اسید باکتری که متعلق به جنس‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس و پدیوکوکوس بودند مقاومت خوبی (بالای ۵۰ درصد) در شرایط معادل دستگاه گوارش از

باکتری‌های اسید لاکتیک نقش اصلی را در رسیدن و تهیه انواع غذاهای تخمیری دارند و بنابراین به کارگیری چنین باکتری‌هایی که خاصیت پروبیوتیکی نیز از خود نشان دهند، در فرآورده‌های غذایی به منظور بهبود سلامت مصرف کنندگان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۲۷]. از طرفی باکتری‌های پروبیوتیک موجود در محصولات تخمیری سستی و بومی هر منطقه‌ای به دلیل سازگاری بیشتر با محیط، مورد توجه بیشتری هستند [۲۸] و بر همین اساس، مطالعات زیادی برای شناسایی و معرفی جمعیت باکتری‌های LAB غذاهای متنوع سستی ایرانی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی آن‌ها انجام شده است [۵، ۲۹]. در همین راستا، در گذشته نیز گونه‌های مختلف جنس لاکتوباسیلوس [۳۰]، انتروکوکوس [۱۰] و پدیوکوکوس [۳۱] با خواص پروبیوتیکی از غذاهای تخمیری ایرانی جدا شده است.

مقاومت‌های پایین‌تر جدایه‌های LAB به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان، در توافق با نتایج مطالعه حاضر است [۳۶، ۱۰].

خود نشان دادند. این یافته در تضاد با نتایج تحقیقات دیگری است که بقای بالایی (۷۱ تا ۷۶ درصد) برای باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از محصولات لبنی تخمیری گزارش کرده‌اند [۳۴، ۳۵]. البته گزارشات محققین دیگری مبنی بر

Table2. Survival of LAB isolates under artificial human GI tract conditions

Isolates	Survival Rate (%) after 3 h in Simulated Gastric juice ^a	Survival Rate (%) after 4 h in Simulated gut juice ^b	LAB genus
LS6	68.68±0.92	51.65±1.13	<i>Enterococcus</i>
LS9	74.14±0.38	77.95±0.78	<i>Lactobacillus</i>
LS13	79.92±0.51	54.59±0.89	ND
LS17	66.98±1.14	53.34±0.34	<i>Enterococcus</i>
LS18	53.33±0.97	54.93±0.72	<i>Lactobacillus</i>
LS33	61.82±0.48	56.39±0.31	<i>Lactobacillus</i>
LS37	72.23±0.41	75.37±0.43	<i>Lactobacillus</i>
LS50	51.20±0.43	47.42±0.76	ND
LS58	73.64±0.52	78.39±0.42	<i>Enterococcus</i>
LS59	86.90±0.69	70.62±0.17	<i>Enterococcus</i>
LS64	74.19±0.51	78.01±0.27	<i>Pediococcus</i>
LS71	56.49±1.13	54.63±0.55	<i>Lactobacillus</i>
LS83	52.20±0.01	58.04±0.48	ND
LS85	48.68±0.92	51.65±1.13	<i>Pediococcus</i>
LS99	74.14±0.38	77.95±0.78	<i>Pediococcus</i>
LS106	79.92±0.51	54.59±0.89	<i>Enterococcus</i>
LS118	66.98±1.14	53.34±0.34	<i>Lactobacillus</i>

Data are mean ± standard deviation of three independent experiments.

^a, phosphate-buffered saline solution (adjusted to pH 3) containing 3 mg mL⁻¹ pepsin.

^b, PBS solution containing 0.3% bile salts and 1 mg mL⁻¹ pancreatin.

باکتری‌های لاکتیک اسید این تحقیق بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی در توافق با یافته‌های دانشمندان دیگر است [۳۴، ۳۵]. اثرات ضد میکروبی باکتری‌های لاکتیک اسید به متابولیت‌های مختلف تولید شده مانند اسید، پراکسید هیدروژن و یا ترکیبات باکتریوسینی آن‌ها نسبت داده می‌شود [۳۷]. با توجه به اینکه در تحقیق حاضر فیلتر شده سوسپانسیون باکتری‌های LAB پس از خنثی شدن pH و تیمار شدن با آنزیم کاتالاز مورد آزمایش قرار گرفت لذا اثرات مذکور را می‌توان به متابولیت‌های باکتریوسینی نسبت داد. در مطالعات دیگر هم به نقش این ترکیبات در خواص ضد میکروبی باکتری‌های LAB اشاره شده است [۲، ۳۸].

۳-۲-۲- خاصیت ضد میکروبی

از مجموع ۱۴ جدایه منتخب در آزمون قبل که نوع باکتری آن شناخته شده بود، به ترتیب نه و شش جدایه، اثرات بازدارندگی قوی (دارای منطقه عدم رشد بزرگ‌تر از ۱۰ میلی‌متر) بر روی لیستریا مونوسایتوجنز و استافیلوکوکوس آئروس نشان دادند (جدول ۳). اثرات ضد میکروبی جدایه‌ها روی باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی کمتر بود به‌طوری‌که به ترتیب هفت و پنج جدایه دارای خاصیت ضد میکروبی بر روی اشرشیا کولی و سالمونلا انتریکا بودند و از بین آن‌ها فقط سه و یک جدایه LAB، هاله عدم رشد با قطر بیشتر از ۱۰ میلی‌متر ایجاد کرد (جدول ۳). اثرات ضد میکروبی قوی‌تر

Table3. Antibacterial effect of selected LAB isolates against indicator pathogens

Isolates	Zone diameter (mm) around			
	<i>Salmonella enterica</i> (PTCC 1709)	<i>Escherichia coli</i> (PTCC 1276)	<i>Staphylococcus aureus</i> (PTCC 1764)	<i>Listeria monocytogenes</i>

(PTCC 1163)				
LS6	0	5.48±0.16	7.21±0.26	12.01±0.33
LS9	6.26±0.06	17.47±0.23	12.64±0.28	16.50±0.21
LS17	0	0	0	0
LS18	0	0	11.26±0.05	10.58±0.19
LS33	2.30±0.17	13.59±0.19	21.58±0.20	20.49±0.14
LS37	0	8.54±0.09	0	13.43±0.18
LS58	0	0	0	2.64±0.21
LS59	12.31±0.15	11.43±0.18	18.41±0.20	22.24±0.23
LS64	0	0	0	7.26±0.05
LS71	4.43±0.10	8.54±0.25	13.71±0.19	18.35±0.10
LS85	0	0	8.65±0.24	11.30±0.17
LS99	0	0	0	4.53±0.24
LS106	0	0	16.38±0.15	15.54±0.09
LS118	5.73±0.10	2.46±0.10	0	0

Data are mean ± standard deviation of three independent experiments.

این غلظت برای جدایه‌های منتخب آورده شده است. تا کنون اثرات ضدقارچی باکتری‌های مختلفی در برابر طیف وسیعی از کپک‌ها به اثبات رسیده است [۳۹] و در میان این باکتری‌ها باکتری‌های LAB نیز به چشم می‌خورد [۴۰، ۴۱]. حتی تحقیقاتی در مورد بکارگیری ترکیبات ضدقارچ حاصل از لاکتوباسیلوس پلانترام به‌عنوان قارچ‌کش و بر علیه کپک‌های بیماری‌زای گیاهی انجام گرفته است [۲۳].

همچنین بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره فیلترشده ۱۴ جدایه LAB در بازدارندگی از رشد شعاعی پرگنه کپک‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *پنی‌سیلیوم سیتروپوم* نشان داد که به‌جز ۳ جدایه‌ی LS18، LS64 و LS99 بقیه جدایه‌ها خاصیت ضدقارچی داشتند. در جدول ۴ حداقل غلظت بازدارنده از رشد هر کپک (MIC) و درصد بازدارندگی در

Table 4. Antifungal effect of selected LAB isolates against indicator molds

Isolates	MIC (%)	Growth inhibition (%) of <i>Aspergillus flavus</i> (PTCC 5004)		Growth inhibition (%) of <i>Penicillium citrinum</i> (PTCC 5304)	
		MIC (%)		MIC (%)	
LS6	30	14±0.10		24±0.04	
LS9	40	10±0.09		9±0.55	
LS17	70	16±0.22		13±0.36	
LS18	-	-		-	
LS33	20	21±0.25		29±0.30	
LS37	100	15±0.30		24±0.34	
LS58	60	25±0.17		10±0.20	
LS59	30	21±0.48		22±0.11	
LS64	-	-		-	
LS71	20	27±0.07		25±0.06	
LS85	40	23±0.53		18±0.65	
LS99	-	-		-	
LS106	20	20±0.11		31±0.23	
LS118	100	9±0.40		11±0.30	

Data for growth inhibition (%) are mean ± standard deviation of three independent experiments.

است. بر این اساس، قابلیت خودتجمعی، تجمع با/شرشیا کولی و تجمع با *سالمونلا انتریکا* به ترتیب در محدوده ۲۱/۲۲ تا ۷۸/۶۰، ۳۱/۴۹ تا ۸۸/۳۳ و ۳۰/۱۴ تا ۸۰/۰۷ متغیر بود. جدایه‌هایی که ارقام بالاتر از ۵۰ درصد برای آن‌ها به

۳-۲-۳- خاصیت خودتجمعی و تجمع مشترک

نتایج مربوط به توانایی جدایه‌های برگزیده LAB در تجمع با همدیگر و چسبیدن و تجمع با دو باکتری بیماری‌زای *شرشیا کولی* و *سالمونلا انتریکا* در جدول ۵ نشان داده شده

است [۱۰، ۱۲]. همچنین اتصال باکتری‌های پروبیوتیک به باکتری‌های بیماری‌زا در محیط روده می‌تواند از چسبیدن آن‌ها به جداره روده ممانعت به‌عمل آورده و یک مکانیسم دفاعی در برابر تهاجم این باکتری‌های بیماری‌زا به جدار روده محسوب می‌گردد [۵].

ثبت رسید برای ادامه آزمایشات انتخاب گردیدند. ویژگی تجمع باکتری‌ها که در چسبیدن و کلونیزه شدن آن‌ها در اپیتلیوم روده کوچک نقش دارد، یکی از قابلیت‌های مهم و حیاتی یک باکتری پروبیوتیک محسوب می‌شود [۴۲] و بنابراین در بیشتر مطالعات انجام گرفته در مورد بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های LAB، مورد توجه بوده

Table5. Aggregation activities of selected LAB isolates

Isolates	Auto-aggregation (%)	Co-aggregation (%) with	
		<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>
LS6	78.60±0.49	88.33±0.18	80.07±0.35
LS9	38.46±0.13	40.30±0.22	50.85±0.40
LS18	40.26±0.24	36.49±0.66	39.57±0.59
LS33	79.53±0.45	59.46±0.36	69.19±0.54
LS37	51.43±0.30	44.46±0.24	30.14±0.39
LS59	21.22±0.39	31.49±0.49	42.44±0.61
LS71	67.57±0.41	87.52±1.33	70.86±0.10
LS85	40.78±0.51	47.87±0.20	35.75±0.40
LS106	56.52±0.37	76.65±0.52	70.43±0.19

Data are mean ± standard deviation of three independent experiments.

کوهی و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که هیچ یک از انتروکوکوس‌های جدا شده از پنیر موتال به وانکومایسین مقاوم نبودند. حساسیت باکتری‌های پروبیوتیک به آنتی‌بیوتیک‌های رایج پزشکی از دو جنبه حائز اهمیت است. اول اینکه شایه بیماری‌زایی برخی باکتری‌های LAB مانند انتروکوکوس‌ها وجود دارد و مثلاً انتروکوکوس‌های مقاوم به ونکومایسین یکی از چالش‌های جدی در حوزه عفونت‌های بیمارستانی است [۴۳]. به‌علاوه امکان انتقال افقی ژن^۸ مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بین پروبیوتیک‌ها و سایر باکتری‌های مقیم دستگاه گوارش از جمله باکتری‌های بیماری‌زا، لزوم ارزیابی و حصول اطمینان از حساسیت پروبیوتیک‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج بالینی را روشن می‌سازد [۴۴].

۳-۲-۴- مقاومت آنتی‌بیوتیکی

نتایج حساسیت جدایه‌های منتخب LAB به یازده آنتی‌بیوتیک رایج درمانی در جدول ۶ آورده شده است. در مجموع، جدایه‌ها حساسیت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده نشان دادند بطوریکه تمام جدایه‌ها نسبت به تتراسایکلین و آمپی‌سیلین حساس بودند. مقاومت چهار جدایه به کلیندامایسین و ۳ جدایه نسبت به ونکومایسین و سفتریاکسون نیز به‌عنوان بالاترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به ثبت رسید. مقاومت جدایه‌های LAB به وانکومایسین در مطالعه حاضر با مطالعات قبلی که نشان می‌دهد بسیاری از گونه‌های لاکتوباسیلوس مقاومت بالایی به وانکومایسین دارند، توافق دارد [۴۱]. برخلاف یافته‌های ما،

Table6. Antibiotic resistance in selected LAB isolates

Antibiotics	Inhibition zone diameter (mm) for LAB isolates			
	LS106	LS71	LS33	LS6
Vancomycin	13.5±0.36 (R)	10.6±0.11 (R)	15.4±0.08 (I)	7.3±0.09 (R)
Cefixime	15.5±0.14 (R)	27.4±0.14 (S)	18.1±0.05 (S)	16.3±0.09 (S)
Penicillin	30.6±0.36 (S)	29.4±0.08 (S)	27.3±0.16 (I)	31.1±0.17 (S)
Clindamycin	0 (R)	10.8±0.09 (R)	0 (R)	0 (R)
Tetracycline	31.3±0.11 (S)	25.5±0.15 (S)	23.4±0.09 (S)	29.3±0.15 (S)
Chloramphenicol	22.1±0.38 (S)	26.5±0.18 (S)	18.6±0.15 (I)	29.4±0.23 (S)
Ampicillin	25.2±0.39 (S)	27.4±0.14 (S)	18.5±0.14 (S)	22.3±0.14 (S)

Erythromycin	26.4±0.22 (S)	20.7±0.33 (I)	24.3±0.22 (S)	21.3±0.39 (S)
Azithromycin	13.4±0.08 (I)	23.5±0.21 (S)	13.7±0.08 (I)	17.4±0.09 (I)
Gentamicin	18.7±0.09 (S)	18.5±0.13 (S)	17.4±0.08 (S)	14.5±0.06 (I)
Ceftriaxone	4.3±0.06 (R)	28.3±0.28 (S)	21.2±0.16 (R)	15.1±0.19 (R)

Data are mean ± standard deviation of three independent experiments.

(I) indicates intermediate sensitivity (R) resistance and (S) susceptibility to the antibiotics based on CLSI, 2018 guideline.

دو سویه LS106 و LS6 متعلق به جنس ائروکوکوس و دو

سویه LS33، LS71 متعلق به جنس لاکتوباسیلوس که در

مطالعه حاضر از پنیر لبقوان جدا شدند، توانایی زنده ماندن

در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش انسان را داشتند.

همچنین، این جدایه ها ویژگی های پروبیوتیکی دیگری مانند

فعالیت ضد میکروبی و تجمع و کلونیزاسیون در روده را دارا

بودند. فقدان قدرت همولیز کنندگی این جدایه ها و

حساسیت آن ها به آنتی بیوتیک های رایج درمانی به کار رفته،

این جدایه ها را به گزینه های مناسبی برای استفاده در

محصولات غذایی و بهره گیری از مزایای سلامت بخشی

آن ها تبدیل می کند. ارزیابی وجود عوامل بیماری زا

به خصوص در جدایه های ائروکوک و انجام تست های *in*

vivo بر روی مدل های حیوانی به منظور حصول اطمینان

بیشتر از ایمنی آن ها برای مطالعات آینده توصیه می شود.

۳-۲-۵- خاصیت همولیتیکی

بررسی قدرت همولیز کنندگی چهار جدایه LS106، LS71،

LS33 و LS6 نشان داد که هیچ یک از آن ها هاله همولیز شفاف

یا سبز رنگ تشکیل نداده و فاقد خاصیت همولیز آلفا یا بتا

بودند. یکی از جنبه های مهم مرتبط با ایمن بودن باکتری های

پروبیوتیک عدم قدرت همولیز کنندگی آن ها است تا

به واسطه ای این ویژگی سبب تخریب سلول های جداره روده

نشده و آن برای ورود و کلونیزه شدن باکتری های بیماری زا

مستعد نکنند (۲۶). همانند مطالعه ای حاضر، در تحقیقات

دیگر انجام شده روی باکتری های لاکتیک جدا شده از

غذاهای تخمیری نیز عدم خاصیت همولیتیکی به ثبت رسیده

است [۴۵، ۵].

۴- نتیجه گیری

۵- منابع

[1] Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., Eslami, S. & Hejazi, M.A. (2019). Probiotic properties of *Enterococcus* isolated from artisanal dairy products. *Frontiers in microbiology*, 10:300.

[2] Salek, F., Mirzaei, H., Khandaghi, J., Javadi, A. & Nami, Y. (2023). Identification of enterocins and *in vitro* characterization of their antimicrobial and anticancer activity in *Enterococcus* strains isolated from traditional fermented products. *Food Hygiene*, 13(2), 17-32 (In Persian).

[3] Johnson, M.A. (2017). 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 52-65.

[4] Rashtchi, P., Bazmi, A., Noshirvani, N. & Moosavy, M.H. (2021). Comparison of the microbial, physicochemical, and sensorial properties of raw and pasteurized Lighvan cheeses during ripening time. *Food Science & Nutrition*, 9(10), 5527-5535.

[5] Soleimani, H., Shokri, R., Nami, Y., Khandaghi, J. & Panahi, B. (2023). Potential probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from Duimaj, an Iranian traditional snack food, using

biochemical, molecular and computational approaches. *LWT*, 184, 115091.

[6] Soltan Dallal, M.M., Hosseini, M., Davoodabadi, A., Rajabi, Z. & Zamani, S. (2016). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in traditional pickles and salted pickles from Tehran, Iran. *Razi Journal of Medical Sciences*, 23(143), 81-90 (In Persian).

[7] Koohsari, H., Rashti, Z. & Arab, S. (2019). The Isolation of lactic acid bacteria from local dairy products of Gorgan township with the ability to inhibit the growth of some gastrointestinal pathogens. *Journal of Food Microbiology*, 6(3), 22-36 (In Persian).

[8] Nasrollahzadeh, A., Khomeiri, M. & Mahmoudi, M. (2019). Genetic identification and evaluation of antibacterial activity of lactic isolates derived from Masske butter against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(93), 23-33. (In Persian).

[9] Moraes, P.M., Perin, L.M., Silva Júnior, A. & Nero, L.A. (2013). Comparison of phenotypic and

- molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44,109-112.
- [10] Kouhi, F., Mirzaei, H., Nami, Y., Khandaghi, J. & Javadi, A. (2022). Potential probiotic and safety characterisation of *Enterococcus* bacteria isolated from indigenous fermented Motal cheese. *International Dairy Journal*,126,105247.
- [11] Mathur, H., Beresford, T.P. & Cotter, P.D. (2020). Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates. *Nutrients*,12(6),1679.
- [12] Aali, N. & Khandaghi, J. (2022). Evaluation of probiotic properties of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* species isolated from Pousti cheese of Gilan province in 2020. *Journal of Food Microbiology*, 9(2), 60-70. (In Persian).
- [13] Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R. , Mättö, J. & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3),197-215.
- [14] Azizi, F., Najafi, M.B.H. & Edalatian Dovom, M.R. (2017). The biodiversity of *Lactobacillus* spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. *AMB Express*, 7(1),176-183.
- [15] Edalatian Dovom, M.R., Habibi Najafi, M.B. & Mortazavi, S.A. (2014). Identification of Anti-microbial Producing *Enterococci* Isolated from Iranian Raw Milk Cheeses Using Polyphasic Approach. *Applied Food Biotechnology*, 1(2), 19-24.
- [16] Hassanzadazar, H., Mardani, K., Yousefi, M. & Ehsani, A. (2017). Identification and molecular characterisation of lactobacilli isolated from traditional Koopeh cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 70(4), 556-561.
- [17] Ahmadi, S., Khomiri, M., Khosroushahi, A. & Kashaninezhad, M. (2009). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) from Iranian traditional Lighvan cheese. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*,16(3),136-146 (In Persian).
- [18] Carr, F.J., Chill, D. & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.
- [19] Dubernet, S., Desmasures, N. & Guéguen, M.A. (2002). PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS microbiology letters*, 214(2), 271-275.
- [20] Nasiri, M. & Hanifian, S. (2022). *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in pasteurized milk: Prevalence, genotyping, and characterization of virulence traits. *LWT*,153:112452.
- [21] Cousin, F.J., Le Guellec, R., Chuat, V., Dalmaso, M., Laplace, J.M. & Cretenet, M. (2019). Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods. *International journal of food microbiology*, 291:17-24.
- [22] Turková, K., Mavrič, A., Narat, M., Rittich, B., Španová, A., Rogelj, I. & Matijašić, B.B. (2013). Evaluation of *Lactobacillus* strains for selected probiotic properties. *Folia microbiologica*, 58(4), 261-267.
- [23] Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H. & Qi, W. (2012). Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PloS one*, 7(1), e29452.
- [24] Collado, M.C., Surono, I., Meriluoto, J. & Salminen, S. (2007). Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *Journal of food Science*, 72(3), M89-M93.
- [25] National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2018). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 9th ed. Approved standard M11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- [26] Angmo, K., Kumari, A. & Bhalla, T.C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-food Science and Technology*, 66, 428-35.
- [27] Ljungh, A. & Wadstrom, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current issues in intestinal microbiology*, 7(2), 73-90.
- [28] Munekata, P.E., Pateiro, M., Tomasevic, I., Domínguez, R., da Silva Barretto, A.C., Santos, E.M. & Lorenzo, J.M. (2022). Functional fermented meat products with probiotics—A review. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 91-103.
- [29] Afshari, A., Hashemi, M., Tavassoli, M., Eraghi, V. & Noori, S.M.A. (2022). Probiotic bacteria from 10 different traditional Iranian cheeses: Isolation, characterization, and investigation of probiotic potential. *Food Science & Nutrition*, 10(6), 2009-2020.
- [30] Nami, Y., Haghshenas, B., Bakhshayesh, R.V., Jalaly, H.M., Lotfi, H., Eslami, S. & Hejazi, M.A. (2018). Novel autochthonous lactobacilli with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk. *LWT*, 98, 85-93.
- [31] Vidhyasagar, V. & Jeevaratnam, K. (2013). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. *Journal of Functional foods*, 5(1), 235-243.
- [32] Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
- [33] Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., et al. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386s-392s.
- [34] Haghshenas, B., Nami, Y., Almasi, A., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., et al. (2017). Isolation and characterization of probiotics from dairies. *Iranian journal of microbiology*, 9(4), 234-243.
- [35] Mulaw, G., Sisay Tessema, T., Muleta, D. & Tesfaye, A. (2019). In vitro evaluation of probiotic

properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products. *International journal of microbiology*, 2019, 7179514.

[36] Nigatu, J.M., Tuji, F.A. & Tefera, A.T. (2015). Evaluation of the antagonistic effect of six mixed cultures of lactic acid bacteria, isolated from the Ethiopian fermented milk ergo, against some foodborne pathogens inoculated into the Ethiopian cottage cheese ayib. *African Journal of Microbiology Researches*, 9(29), 1789-1797.

[37] De Vuyst, L. & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Microbial Physiology*, 13(4), 194-199.

[38] Sami, A., Khandaghi, J. & Abbasgholizadeh, N. (2022). Evaluation of Safety Aspects and Antagonistic Activity of Enterococcus Strains Isolated from Traditional Pot Cheese. *Journal of Health*, 13(1), 7-16 (In Persian).

[39] Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J. & Kenne, L. (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7554-7557.

[40] Prema, P., Smila, D., Palavesam, A. & Immanuel, G. (2010). Production and characterization of an

antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 379-386.

[41] Mahjoory, Y., Mohammadi, R., Hejazi, M.A. & Nami, Y. (2023). Antifungal activity of potential probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains and their role against toxigenic aflatoxin-producing aspergilli. *Scientific Reports*, 13(1), 388.

[42] Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in applied microbiology*, 31(6), 438-442.

[43] Harbarth, S., Cosgrove, S. & Carmeli, Y. (2002). Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1619-1628.

[44] Frieri, M., Kumar, K. & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369-378.

[45] Chouraddi, R., Kumar, S., Kumar, B., Bhatia, M., Varada, V.V., Tyagi, N. & Mallapa, R.H. (2023). Techno-functional characterization of fecal lactobacilli isolates of *Bos indicus* calves for probiotic properties. *Veterinary Research Communications*, 47(3), 1285-1302.



Scientific Research

Investigation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Lighvan cheese

Mehdi Hoseinzadeh¹, Samad Vajdi Hokmabad² and Jalil Khandaghi *^{3,4}

1. MSc Graduate of Microbiology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
2. Assistant professor of Animal Sciences, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
3. Assistant professor of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
4. *Corresponding author: Department of food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2024/5/23

Accepted: 2024/11/24

Keywords:

Probiotic,
Lighvan cheese,
Lactobacillus,
Enterococcus

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.270.

*Corresponding Author E-
gh2002_haghyegh@yahoo.com

khandaghi@iausa.ac.ir

The main reason for the presence of specific microbiota, particularly lactic acid bacteria in dairy products made from raw milk, such as Lighvan cheese, is the traditional methods of preparing these products. A large number of these bacteria are probiotic microorganisms, and for example, many species of *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Pediococcus* bacteria presented in foods have shown probiotic properties. In the current study, genus-specific PCR detection for the *Lactobacillus*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* genera was used to confirm the isolates of lactic acid bacteria that had been phenotypically isolated from 25 samples of traditional Lighvan cheese. Subsequently, the probiotic properties of the isolates, including resistance in simulated gastrointestinal tract conditions, antagonistic properties, auto-aggregation and co-aggregation attributes, antibiotic resistance and hemolytic activities of the selected strains were evaluated. Based on biochemical and molecular detection tests, among the 84 selected strains, 58 isolates were identified as *Lactobacillus* (29 isolates), *Enterococcus* (18 isolates) and *Pediococcus* (11 isolates). Screening of these isolates for survival in human GI tract conditions showed that 26.1% of the isolates (14 isolates) had resistance levels above 50%. Also, nine isolates of the selected strains showed potent antibacterial activity against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, as well as *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* molds. Moreover, based on the ability of auto-aggregation and co-aggregation features, four isolates LS106, LS71, LS33 and LS6 (belonging to *Lactobacillus* and *Enterococcus* genera) were selected. Finally, the investigation of antibiotic resistance revealed the sensitivity of these isolates to majority of the used antibiotics, so that all isolates were susceptible to tetracycline and ampicillin. Also, not one of these four isolates exhibited hemolytic properties. As a result, these isolates are recommended as suitable candidates for usage in fermented food products, taking advantage of their beneficial properties.



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

تولید نوشیدنی لبنی فراسودمند سین بیوتیک بر پایه شیر، عصاره قارچ گانودرما و لاکتوباسیلوس کازی آزاد و کپسوله

مهدیس جمشیدی طهرانیان^۱، محمد جوکی^۲، محمدجواد شکوری^{۳*}، سارا جعفریان^۴

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

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

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۷/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۸

کلمات کلیدی:

نوشیدنی لبنی،

فراسودمند،

گانودرما،

لاکتوباسیلوس کازنی،

کپسولاسیون

DOI:10.22034/FSCT.22.158.283.

* مسئول مکاتبات:

mj.shakori@gmail.com

قارچ گانودرما با نام علمی *G.lucidum* جزء یکی از مهمترین رستنی‌ها در طب سنتی محسوب می‌شود، و در طی سالیان متمادی به عنوان اکسیری سنتی و مؤثر در درمان انواع بیماری‌ها شناخته شده بود. امروزه تمایل مصرف کنندگان به محصولات غذایی فراسودمند مانند انواع نوشیدنی‌های پروبیوتیک رو به افزایش است، لذا در این پژوهش به تولید نوشیدنی لبنی فراسودمند سین بیوتیک بر پایه شیر، عصاره گانودرما و لاکتوباسیلوس کازنی آزاد و کپسوله پرداخته شده است. در فاز اول عصاره گیری، عصاره قارچ گانودرما به روش پراکولاسیون استخراج شد؛ سپس در فاز دوم کپسولاسیون باکتری‌های پروبیوتیک انجام گرفت. در فاز سوم نوشیدنی لبنی فراسودمند در ۶ سطح (D1 تیمار شاهد (فاقد عصاره قارچ گانودرما و کپسول لاکتوباسیلوس کازنی)، D2 تیمار حاوی عصاره قارچ گانودرما، D3 نوشیدنی حاوی باکتری لاکتوباسیلوس کازنی آزاد، D4 نوشیدنی حاوی باکتری لاکتوباسیلوس کازنی کپسوله شده، D5 نوشیدنی حاوی عصاره قارچ گانودرما و باکتری لاکتوباسیلوس کازنی آزاد، D6 نوشیدنی حاوی عصاره قارچ گانودرما و باکتری لاکتوباسیلوس کازنی کپسوله شده) تولید گردید. پارامترهای مورد بررسی در این تحقیق شامل: ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی در تیمارها بود. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS V.25 در سطح احتمال ($p \leq 0.05$) انجام گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که میانگین هیدرولیز پروتئین شیر تا ساعت ۴۰ روند افزایشی و در ادامه تا ساعت ۱۲۰ روند کاهشی داشته است. ارزیابی حسی امتیاز عطر در برخی از تیمارهای نوشیدنی اختلاف آماری معنی داری نشان داد، به طوری که نوشیدنی حاوی عصاره قارچ گانودرما و لاکتوباسیل کازنی کپسوله از بیشترین و نوشیدنی تهیه شده از عصاره تنها، از کمترین امتیاز عطر برخوردار بوده‌اند. بررسی pH نشان داد که باکتری لاکتیکی در پایان دوره رشد لگاریتمی خود pH را به ۴/۵ کاهش داده که از نظر تکنولوژیکی و ممانعت از رشد سایر میکروارگانیسم های ناخواسته مورد توجه است. همچنین نتایج حاصل از شمارش کلی باکتری ها، و شمارش باکتری های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس منفی بوده است و رشدی مشاهده نشده است. لذا می توان گفت نوشیدنی لبنی فراسودمند تولید شده در این پژوهش به عنوان محصولی با مدت زمان ماندگاری متوسط که می تواند در بهترین حالت با توجه به زندهمانی باکتری در طی مدت زمان ۳۰ روز ماندگاری در یخچال بسیار مناسب و در حد ۶/۷ لگاریتم عرضه شود تا بیشترین فواید سلامتی بخش را داشته باشد.

۱- مقدمه

از دیرباز سلامت مواد غذایی از لحاظ میکروبی یکی از دغدغه‌های مهم مصرف‌کنندگان، تولیدکنندگان و سازمان‌های کنترل کننده بوده است. میکروارگانیسم‌های آلوده کننده مواد غذایی می‌توانند باعث ایجاد فساد، کاهش عمر نگهداری و از بین رفتن خواص ارگانولپتیکی ماده غذایی شده و حتی می‌تواند منجر به بیماری فرد گردند [۱]. در سال‌های اخیر توجه بیشتری به عملکرد سوم غذاها شده است. عملکرد سوم در غذاها، نقش ترکیبات غذایی در پیشگیری از بیماری‌ها، توسط تعدیل سیستم‌های فیزیولوژیکی می‌باشد. فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد جهش و ضد میکروبی، مثال‌هایی از نقش این ترکیبات می‌باشند. به دلیل افزایش نگرانی برای رژیم غذایی سالم، در بسیاری از کشورهای جهان تلاش‌هایی برای توسعه غذاها با عملکرد سوم انجام شده است. غذاها دارای عملکرد سوم که غذاها فراسودمند نامیده می‌شوند، عامل مهمی در سالم ماندن افراد معرفی شده‌اند [۲]. لبنیات غنی شده می‌توانند حاوی ترکیبات زیست فعال باشند، تا هم باعث افزایش مقبولیت و هم بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای و دارویی شوند [۳]. همچنین ترکیبات مختلفی برای تولید این محصولات می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد که به پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، سین‌بیوتیک‌ها، اسیدهای چرب غیراشباع، فیبرهای گیاهی، مواد معدنی، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات فیتوشیمیایی و اخیراً رنگدانه‌ها اشاره کرد [۴].

استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به عنوان عوامل بسیار مناسب محافظت کننده مواد غذایی مطرح هستند. ایجاد عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای سنتزی، عدم ایجاد مقاومت دارویی سلامت و بهداشت محیط زیست از مزایای استفاده از داروهای گیاهی است [۵، ۶]. استفاده از عصاره‌های گیاهی برای تولید محصولات لبنی می‌تواند سبب کاهش خطر بیماری‌های مزمن مانند سرطان، پوکی استخوان و بیماری‌های قلب شوند. عصاره‌هایی مانند: گلوکزاینولات، آنتی‌اکسیدان‌ها، آنتوسیانین‌ها، لیکوپن و ترکیبات فنولیک مثل فلاونوئیدها استفاده می‌شوند [۷، ۸].

قارچ *Ganoderma lucidum* Karst. متعلق به شاخه Basidiomycota، می‌باشد [۸]. این گونه، دارای بازیدیوکارب لوبیایی شکل با پایه‌ای معمولاً به صورت جانبی، می‌باشد. سطح فوقانی بازیدیوکارب دایره‌های متحدالمرکز دارد و به رنگ‌های قهوه‌ای نارنجی، قرمز، بنفش، سیاه-قهوه‌ای با حاشیه‌ای سفید یا زرد تا قهوه‌ای قرمز دیده می‌شود [۹].

گزارش‌های متعددی در مورد مواد بیولوژیک فعال موجود در این قارچ، تاکنون به چاپ رسیده است، دارای مواد فعال بسیاری بوده که از مهم‌ترین آنها می‌توان به تریتروئیدها، پلی‌ساکاریدها، نوکلئوتیدها، استرول‌ها، استروئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، پیتیدها و بسیاری از مواد کمیاب دیگر اشاره کرد [۱۰]. از مواد دیگر موجود در این قارچ، ملانین است، ملانین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تقویت سیستم ایمنی، محافظت کننده در برابر اشعه و ضد جهش می‌باشد [۱۰].

لاکتوباسیلوس کازئی باکتری گرم مثبت، غیراسپورزا، بی‌هوازی اختیاری، میله‌ای شکل با انتهای گرد، منفرد و یا جفت در قالب زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شود [۱۱]. لاکتوباسیلوس کازئی از باکتری‌های تخمیر کننده بوده و بیشتر محصولات آنها اسید لاکتیک است و همچنین دارای خاصیت پروبیوتیکی هستند بنابراین، لاکتوباسیلوس کازئی یکی از باکتری‌های پروبیوتیکی است که پتانسیل کاربردی ویژه‌ای در تولید فرآورده‌های شیری پروبیوتیکی مانند ماست دارد. لاکتوباسیل‌ها شناخته شده‌ترین فلور طبیعی واژن هستند و توانایی آن‌ها در تولید pH و حفظ محیط اسیدی است. مصرف این باکتری در ترکیبات دارویی توازن طبیعی باکتری و قارچ را در دستگاه گوارش تنظیم می‌کند [۱۲]. فعالیت این باکتری بیش از سایر گونه‌های لاکتوباسیلوس‌های یافت شده در فرآورده‌های تخمیری شیری بوده و قادر به تخمیر طیف وسیعی از کربوهیدرات‌های موجود در محیط است [۱۳].

۲-۲- عصاره‌گیری از قارچ گانودرما به روش

پرکولاسیون

در این پژوهش جهت عصاره‌گیری از اتانول ۸۰ درصد و از روش پرکولاسیون استفاده شد. حلال اتانول ۸۰٪ به عنوان یک حلال قطبی در استخراج حداکثری مواد مؤثره گانودرما مناسب بوده است. بدین ترتیب عمل شد که ۵۰ گرم از پودر نمونه گیاهی مورد نظر را در داخل دکانتور ریخته، و سپس مرحله مرحله به آن اتانول ۸۰ درصد افزوده شد. افزودن اتانول را تاجایی ادامه داده که تمامی حجم گیاه داخل دکانتور خیس شده و اتانول به صورت کامل به خورد نمونه برود و مقداری از اتانول هم در روی سطح نمونه داخل دکانتور باشد. پس از ۲۴ ساعت عصاره بدست آمده را با کاغذ صافی صاف نموده و با کمک دستگاه روتاری، حلال اتانول موجود در عصاره خارج گردید.

۲-۳- آماده سازی کشت ذخیره و تولید نوشیدنی لبنی

فراسودمند

از باکتری‌های رشد یافته در محیط MRS¹ برای تهیه نمونه فریزری استفاده و باکتریها در فریزر و در حضور گلیسرول 30% v/v و شیر خشک بدون چربی 10% W/V نگهداری گردید (آح و همکاران، ۲۰۰۰). برای تهیه نمونه پیش کشت، ۱ میلی لیتر از نمونه فریزری به ۱۰ میلی لیتر محیط استریل اضافه و در دمای ۳۷ درجه گرمخانه گذاری گردید. پس از رسیدن رشد به انتهای فاز لگاریتمی براساس منحنی رشد، کشتها در دور ۵۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سلولها جداسازی می شوند. جمعیت مایه تلقیح با استفاده از نمونه نیم مک فارلند استاندارد و نسبت تلقیح ۱ حجم سوسپانسیون باکتری به ۱۰ حجم شیر در نظر گرفته شدند و غلظت عصاره گانودرما به مقدار ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است. تیمارهای مورد مطالعه مطابق با لیست زیر می باشد، شیرهای تلقیح شده برای مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و با فاصله ۲۴ ساعت،

شیر که به عنوان یک غذای کامل در نظر گرفته می‌شود دارای فراورده‌های زیادی است که توسط عموم مردم مصرف می‌شود، و از آنجایی که سین‌بیوتیک‌ها نوعی مکمل تغذیه‌ای حاوی ترکیبی از باکتری‌های پروبیوتیک و اجزاء غذایی پری‌بیوتیک هستند، و پری‌بیوتیک‌ها، اجزای غذایی هضم ناپذیر یا هضم پذیر اندک، در برابر آنزیم‌های گوارشی بدن انسان هستند که رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را به طور انتخابی تحریک می‌کنند و باعث بهبود سلامت میزبان می‌شوند. لذا نوشیدنی‌های لبنی فراسودمند سین‌بیوتیک به عنوان یکی از محصولات مهم شیر از اهمیت خاصی برخوردار هستند. بر این اساس در این پژوهش به بررسی و تولید نوشیدنی لبنی فراسودمند سین‌بیوتیک بر پایه شیر، عصاره گانودرما و لاکتوباسیلوس کازویی آزاد و کپسوله پرداخته شده است.

۲-مواد و روش های آزمایش

در این پژوهش محیط های کشت MRS، MRS Agar، Broth، و گلیسرول، DPPH، سدیم آلزینات و دیگر مواد آزمایشگاهی مصرفی از شرکت مرک آلمان خریداری گردید، باکتری *Lactobacillus casei* با شماره PTCC 1608 از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، و شیر استریلیزه کم چرب از شرکت کاله آمل خریداری گردید. این تحقیق در نیمه اول و پاییز سال ۱۴۰۲ در واحد آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نور انجام شد.

۲-۱- تهیه قارچ گانودرما و آماده سازی گیاه برای انجام

عصاره گیری

قارچ گانودرما با نام علمی *Ganoderma lucidum* از شرکت تجاری تحقیقاتی مهرزیست پژوهان آماد خریداری گردید و پس از بررسی و حذف قسمت‌های نامناسب، جهت عصاره گیری آماده گردید.

۲-۵-۳- فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

برای ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، μl 80، از سرم نمونه‌های شیر تخمیر شده یا آب، به $720 \mu\text{l}$ محلول 0.002% DPPH (w/v) در اتانول اضافه شده، برای ۱۰ ثانیه مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شدند. میزان جذب محلول حاصل در ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری و درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۱۵]:

$$\text{درصد فعالیت مهارکنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

از منحنی استاندارد ترولوکس $0.250 \mu\text{M}$ برای بیان فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب $\mu\text{MTE/mg protein}$ استفاده شد.

۲-۵-۴- فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

در این آزمون با مخلوط کردن محلول ABTS ۷ میلی مولار و پرسولفات پتاسیم $2/45$ میلی مولار تولید و بعد از ۱۲ تا ۱۶ ساعت نگهداری در شرایط تاریکی، محلول تهیه شده با استفاده از بافر فسفات ۵ میلی مولار با $\text{pH} = 7.4$ رقیق شد تا میزان جذب در 734 nm نانومتر به 0.02 ± 0.07 برسد. نمونه مورد آزمایش به میزان ۲۵ میکرولیتر به ۱ میلی لیتر محلول ABTS اضافه و بعد از ۶ دقیقه میزان جذب نمونه در طول موج 734 nm نانومتر اندازه گیری شد. درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۱۵]:

$$\text{درصد فعالیت مهارکنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

از منحنی استاندارد ترولوکس $0.400 \mu\text{M}$ برای بیان فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب $\mu\text{MTE/mg protein}$ استفاده شد.

۲-۵-۵- میزان مواد جامد محلول (بریکس)

ابتدا دستگاه با آب مقطر روی عدد صفر کالیبره گردید. چند قطره از محلول نوشیدنی، روی سل رفراکتومتر (کروز، آلمان) قرار داده شد، یکنواخت و سپس پخش گردید و غلظت آن

نمونه برداری انجام و از نظر pH، پروتئولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت (سلیمانزاده و همکاران، ۲۰۱۶).

۲-۴- تیمارهای مختلف نوشیدنی لبنی فراسودمند

نوشیدنی لبنی بدون افزودن عصاره گانودرما و لاکتوباسیلوس کازئی (D1)

نوشیدنی لبنی حاوی حاوی عصاره گانودرما (D2)

نوشیدنی لبنی حاوی لاکتوباسیلوس کازئی آزاد (D3)

نوشیدنی لبنی حاوی لاکتوباسیلوس کازئی کپسوله (D4)

نوشیدنی لبنی حاوی عصاره گانودرما و لاکتوباسیلوس کازئی آزاد (D5)

نوشیدنی لبنی حاوی عصاره گانودرما و لاکتوباسیلوس کازئی کپسوله (D6)

۲-۵-۱- اندازه گیری میزان هیدرولیز پروتئین های شیر

شدت پروتئولیز با استفاده از روش نورسنجی ارتو-فتال دی آلدئید (OPA (O-phthalaldehyde بر اساس روش چارچ و همکاران اندازه گیری گردید. برای این منظور محلول تازه OPA شامل 25 mL سدیم تتراهیدروبورات 100 mM ، $5/2 \text{ mL}$ محلول 20% SDS و 40 mg OPA در 1 mL میلی لیتر متانول محلول و $100 \mu\text{l}$ مرکاپتولتانول با آب مقطر به حجم نهایی 50 mL رسانده و 1 mL از آن به $25 \mu\text{L}$ نمونه اضافه گردید و بعد از ۲ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، میزان جذب نور در طول موج 340 nm اندازه گیری شد. از محلول L- لوسین با غلظت $1/0 - 4 \text{ mg/mL}$ برای رسم منحنی استاندارد و تعیین میزان آمین های آزاد استفاده می گردد [۱۴].

۲-۵-۲- فعالیت آنتی اکسیدانی شیر

فعالیت آنتی اکسیدانی محصول تخمیر شیر به وسیله باکتری مورد تحقیق از طریق دو مکانیسم مهارکنندگی رادیکالهای ABTS و DPPH³ بررسی گردید [۱۵].

۲-۵-۱۰- شمارش تعداد باکتری اشیشیاکلی

برای شمارش باکتری اشیشیاکلی از محیط کشت VRBA⁶ استفاده شد. به طوری که ۰/۱ میلی لیتر از فاز آبی سوسپانسیون تهیه شده مورد مطالعه با محلول پیتون استریل در پلیت حاوی محیط کشت وایولت رد بایل آگار اضافه گردید. پس از مخلوط کردن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند [۲۰].

۲-۵-۱۱- ارزیابی حسی

جهت ارزیابی خصوصیات حسی محصول از تعداد ۱۵ ارزیاب غیرحرفه ای و از روش هدونیک ۵ نقطه‌ای (خیلی خوب=۵، خوب=۴، متوسط=۳، بد=۲، و خیلی بد=۱) استفاده گردید. به این ترتیب که یک اتاق ساکت دارای نور و تهویه مناسب و چند صندلی برای ارزیابی حسی آماده شد، قبل از انجام هر آزمون به هر ارزیاب راهنمایی های لازم در مورد نحوه انجام آزمون و مصرف نوشیدنی و آب ولرم بعد از مصرف هر نمونه ارائه گردید، در هنگام ارزیابی تنها یک ارزیاب وارد اتاق ارزیابی حسی شده و هیچ گونه ارتباطی با سایر ارزیاب ها نداشت [۲۱].

۲-۵-۱۲- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق تولید نوشیدنی لبنی فراسودمند سین بیوتیک بر پایه شیر، عصاره گانودرما و لاکتوباسیلوس کازی آزاد و کپسوله با استفاده از طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از روش اندازه گیری های تکرار شده در سطح احتمال ($p < 0.05$) انجام گرفته است. تیمارها در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفته و نتایج بدست آمده با استفاده از روش های آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way - ANOVA) و آنالیز واریانس تک متغیره (GLM Univariate) در سطح احتمال ($P < 0.05$) مورد بررسی قرار گرفته و همچنین مقایسه میانگین ها با استفاده از روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ($P < 0.05$) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته است. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS

در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد قرائت گردید و نتیجه برحسب درجه بریکس (گرم مواد جامد محلول در صد گرم محلول) بیان گردید [۱۶].

۲-۵-۶- اندازه گیری ماده خشک

مقدار ۲ گرم از نمونه در پلیت هایی که قبلاً به وزن ثابت رسیده بود، توزین گردید و در بن ماری ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس پلیت ها در آون ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت حرارت داده شدند. نمونه ها پس از سرد شدن در دسیکاتور توزین گردیدند [۱۷].

۲-۵-۷- اندازه گیری pH

جهت انجام این آزمون از روش استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ با استفاده از PH متر اندازه گیری شد. مقدار ۵ گرم از شربت را وزن کرده، داخل ارلن ریخته و بعد از کالیبره کردن PH متر، pH نمونه ها قرائت گردید [۱۷].

۲-۵-۸- شمارش کلی باکتری ها

به منظور انجام آزمایش های میکروبی ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت های تهیه شده از نوشیدنی به محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA) از پیش تهیه شده با دمای حدود ۴۲-۴۴ درجه سانتی گراد اضافه گردید. سپس پلیت ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ در انکوباتور قرار گرفتند [۱۸].

۲-۵-۹- شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از رقت تهیه شده از تیمار مورد نظر را در سطح محیط کشت برد پارکر آگار^۴ به صورت کشت سطحی^۵ کشت داده شد، و توسط میله پخش کننده شیشه ای پخش گردید. پلیت ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ الی ۴۸ ساعت نگهداری گردیدند. کلنی های احتمالی به رنگ سیاه براق با لبه نازک سفید (هاله شفاف و بی رنگ) در اطراف به منزله باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می باشند [۱۹].

6-Violet Red Bile Agar

4-Baird parker Agar
5- Surface plate count method

V.25 انجام گرفته و نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL رسم گردیده است.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه گیری میزان هیدرولیز پروتئین های شیر

یکی از روشهای متداول برای بررسی میزان تولید پپتیدهای زیست فعال فرآیند تخمیر می باشد و ارزیابی درجه هیدرولیز براساس میزان گروههای آمین آزاد به عنوان یک فاکتور مهم برای بررسی پپتیدهای تولید شده در طی فرآیند تخمیر می باشد. نتایج آنالیز واریانس داده های حاصل از میزان هیدرولیز پروتئین شیر تخمیری در نوشیدنی لبنی

فراسودمند حاوی تیمارهای عصاره گانودرما، لاکتوباسیلوس کازئی آزاد و کپسوله در مقایسه با نمونه شاهد در مدت زمان ۱۲۰ ساعت تخمیر در نمودار (۱) نشان می دهد که با گذشت زمان تا ساعت چهارم میزان هیدرولیز پروتئین در تیمارها روند افزایش و سپس تا ساعت ۱۲۰ روند کاهشی داشته است. لذا در ساعت چهارم تیمار حاوی عصاره گانودرما و لاکتوباسیل کازئی کپسوله با میانگین ۴/۰۶ و نمونه شاهد با میانگین ۱/۰۱ از بیشترین و کمترین مقدار بترتیب برخوردار بوده اند. هر تیمار در ساعت های ۴۰ و ۸۰ از بیشترین و کمترین میزان هیدرولیز پروتئین بترتیب برخوردار بوده اند.

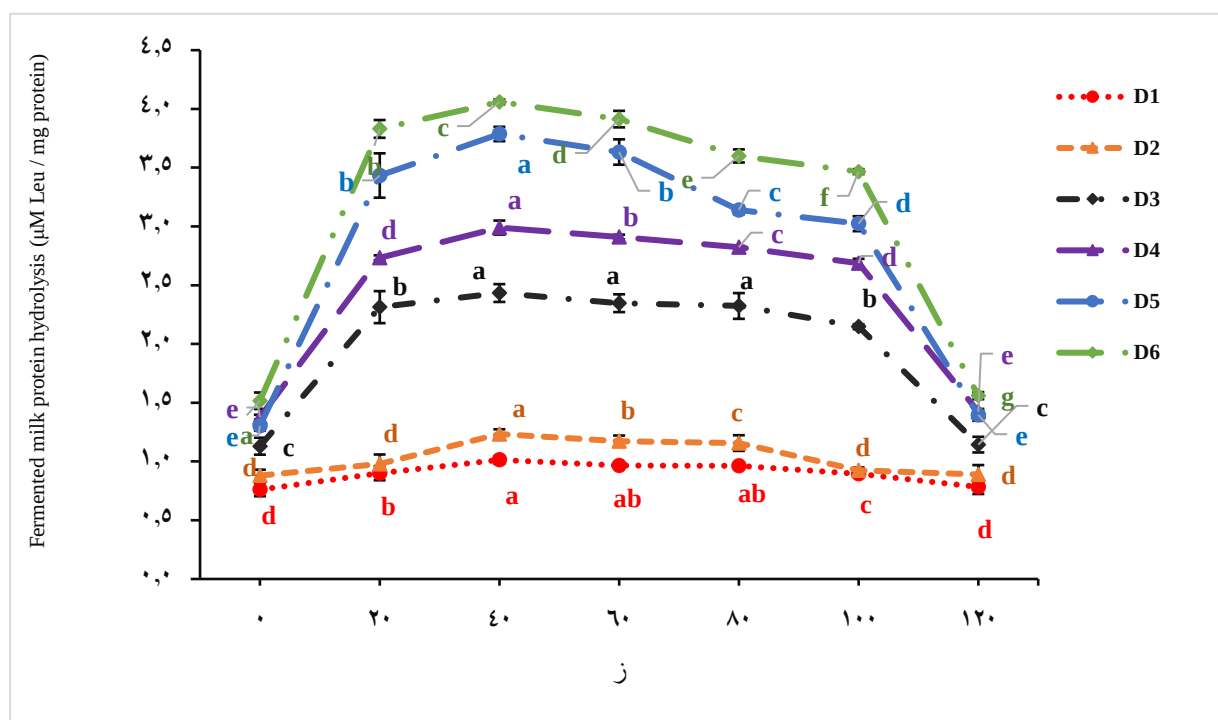


Chart 1- Comparison of the average hydrolysis of milk proteins in the investigated treatments during 120 hours of fermentation (Dairy drink without adding Ganoderma and Lactobacillus casei extract (D1), Dairy drink containing Ganoderma extract (D2), Dairy drink containing free lactobacillus casei (D3), Dairy drink containing Lactobacillus casei capsules (D4), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei Azad (D5), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei capsule (D6)).

در همین راستا، پرز-اسکالانت و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیقی با ارزیابی فعالیت ضد ترومبوتیک هیدرولیزهای پروتئین شیر توسط باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از شیرهای تخمیر شده تجاری، گزارش کردند که بعد از ۳۰ ساعت تخمیر میزان گروه های آمین آزاد به طور معناداری

افزایش یافت. آنها دلیل این امر را نیاز باکتری ها برای به دست آوردن نیتروژن از الیگوپپتیدها و اسیدهای آمینه از مسیر اصلی هیدرولیز پروتئین بیان کردند. علاوه بر این، لاکتوباسیلوس کازئی فعالیت پروتئولیتیک بالاتری را در زمانهای ۱ و ۸ ساعت در مقایسه با لاکتوباسیلوس جنسونی

در دیگر تیمارها تا ساعت چهارم، فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH افزایش یافت، و در ادامه از ساعت ۴۰ تا ساعت ۱۲۰ روند کاهشی بوده است. در طول دوره تیمار حاوی عصاره و لاکتوباسیلوس کازئی کپسوله و نمونه شاهد از بیشترین و کمترین مقدار بترتیب برخوردار بودند. در فعالیت مهار کنندگی رادیکال ABTS (نمودار ۳) در اکثر تیمارها تا ساعت بیستم، و فقط در تیمار حاوی عصاره و لاکتوباسیل کازئی کپسوله در ساعت چهارم، فعالیت مهار کنندگی رادیکال ABTS افزایش داشته است، و در ادامه تا ساعت ۱۲۰ روند کاهشی داشته است.

نشان داد. این افزایش می تواند مربوط به فعال شدن دیپتیدازها و تریپتیدازها باشد. همچنین مشخص شده است که گونه های لاکتوباسیلوس کازئی از ظرفیت بالاتری برای هیدرولیز کردن پپتیدهای کوچک و تولید گروه های آمین آزاد برخوردار هستند.

۲-۳- فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس مهار کنندگی

رادیکال آزاد DPPH و ABTS

نتایج فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH در مقایسه با نمونه شاهد در مدت زمان ۱۲۰ ساعت تخمیر در نمودار (۲) نشان می دهد که در نمونه شاهد، تیمار حاوی عصاره و تیمار حاوی لاکتوباسیل کازئی آزاد، تا ساعت بیستم، و

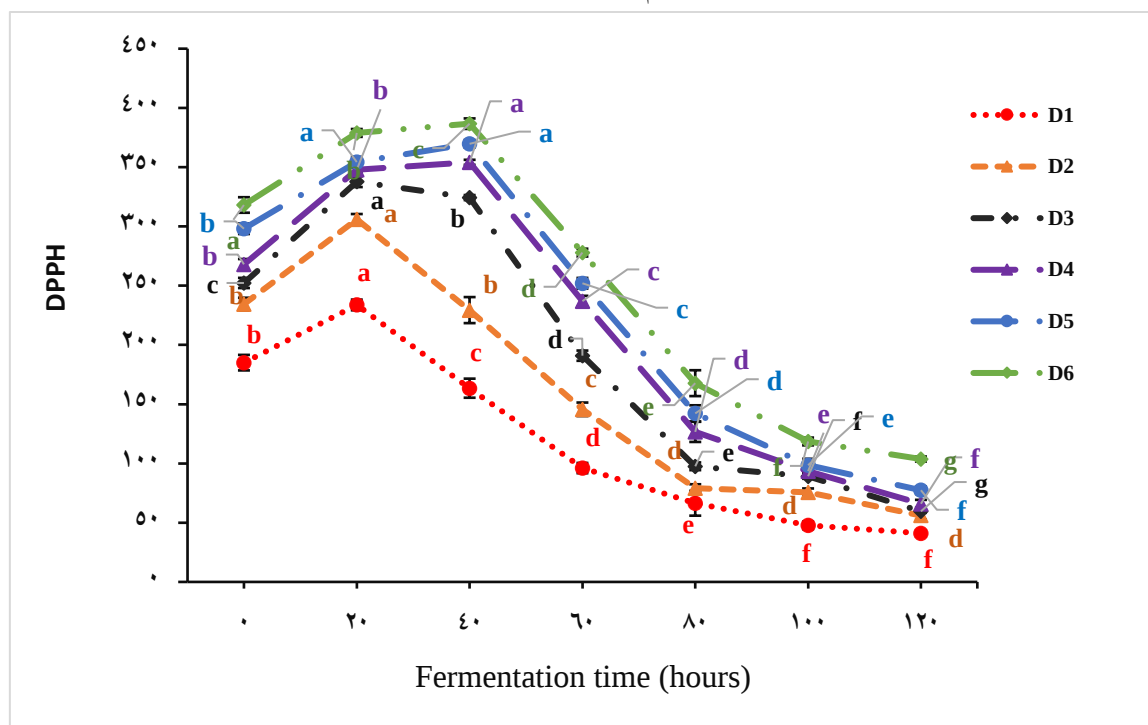


Chart 2 Comparison of the average DPPH radical inhibitory activity in different treatments of the investigated ultra-beneficial drinks (in a period of 120 hours) (Dairy drink without adding Ganoderma and Lactobacillus casei extract (D1), Dairy drink containing Ganoderma extract (D2), Dairy drink containing free lactobacillus casei (D3), Dairy drink containing Lactobacillus casei capsules (D4), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei Azad (D5), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei capsule (D6)).

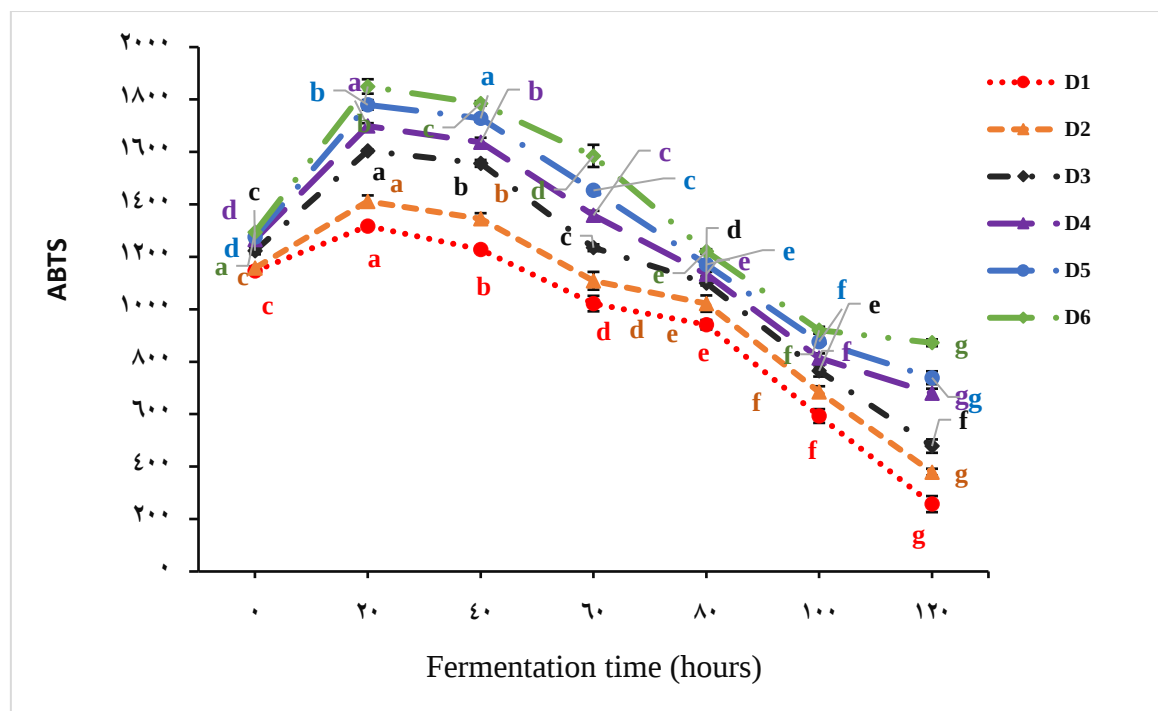


Chart 3- Comparison of the average ABTS radical inhibitory activity in different treatments of the studied ultra-beneficial drinks (in a period of 120 hours) (Dairy drink without adding Ganoderma and Lactobacillus casei extract (D1), Dairy drink containing Ganoderma extract (D2), Dairy drink containing free lactobacillus casei (D3), Dairy drink containing Lactobacillus casei capsules (D4), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei Azad (D5), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei capsule (D6)).

ویرتانی و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی تحت عنوان توسعه فعالیت آنتی اکسیدانی در آب پنیر شیر در طی تخمیر با باکتری های اسید لاکتیک، افزایش در فعالیت آنتی اکسیدانی را در طی تخمیر سرم شیر توسط سویه های باکتری اسید لاکتیک و ارتباط مستقیم بین پیشرفت پروتئولیز به وسیله لاکتوباسیلوس لاکتیس، لاکتوباسیلوس کرمورس و لاکتوباسیلوس جنسنی و فعالیت مهارکنندگی رادیکالها را گزارش کردند. لذا می توان گفت که کاهش یا عدم تغییر مشاهده شده بعد از ۴۰ ساعت در هر دو مکانیسم آنتی اکسیدانی DPPH و ABTS با وجود پروتئولیز افزایشی در طی این مرحله، بیانگر این است که احتمالاً در اثر فعالیت پروتئولیز بیشتر باکتری ها، پپتیدهایی با فعالیت آنتی اکسیدانی دچار تغییر ساختار و یا آبکافت بیشتر شده و بنابراین فعالیت آنها کاهش یافته است. در همین راستا جعفری و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی شیر خام و فرآورده های لبنی رایج در استان فارس ۳۰ نمونه شیر تخمیر نشده و تخمیر شده را بررسی

در همین راستا سلیمان زاده و همکاران (۲۰۱۶) با ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی شیر شتر و گاو تخمیر شده توسط باکتری اسید لاکتیک جدا شده از شیر شتر تخمیر شده سنتی، افزایش در فعالیت آنتی اکسیدانی شیر گاو تخمیر شده به وسیله سویه های باکتری اسید لاکتیک را در طی ۲۴ ساعت زمان تخمیر گزارش کردند. آنها همچنین در سال ۲۰۱۹ در پژوهشی با عنوان آنتی اکسیدان مشتق شده از β -کازئین و پپتید فعال مهارکننده ACE که از شیر شتر تخمیر شده توسط *Leuconostoc lactis* PTCC1899 گزارش کردند که فعالیت آنتی اکسیدانی مشاهده در طی ۲۴ ساعت تخمیر، همزمان با افزایش میزان گروه های آمین آزاد، بیانگر ارتباط بین فعالیت پروتئولیتیکی باکتری ها و توانایی آنها برای تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان می باشد. اگر چه مجموعه ای از متابولیت ها و پپتیدهای آنتی اکسیدان در جریان تخمیر می توانند عامل افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی باشند، اما در مطالعات بسیاری این فعالیت به حضور پپتیدهای آنتی اکسیدان مرتبط دانسته شده است [۲۲].

و نشان دادند که شیرهای تخمیری دارای فعالیت آنژی اکسیدانی بالاتری نسبت به شیرهای تخمیر نشده هستند.

۳-۳- میزان مواد جامد محلول (بریکس)

نتایج تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل از میانگین درصد بریکس در نوشیدنی لبنی فراسودمند حاوی تیمارهای عصاره گانودرما، لاکتوباسیلوس کازئی آزاد و کپسوله در مقایسه با نمونه شاهد در مدت ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچال در نمودار (۴) نشان

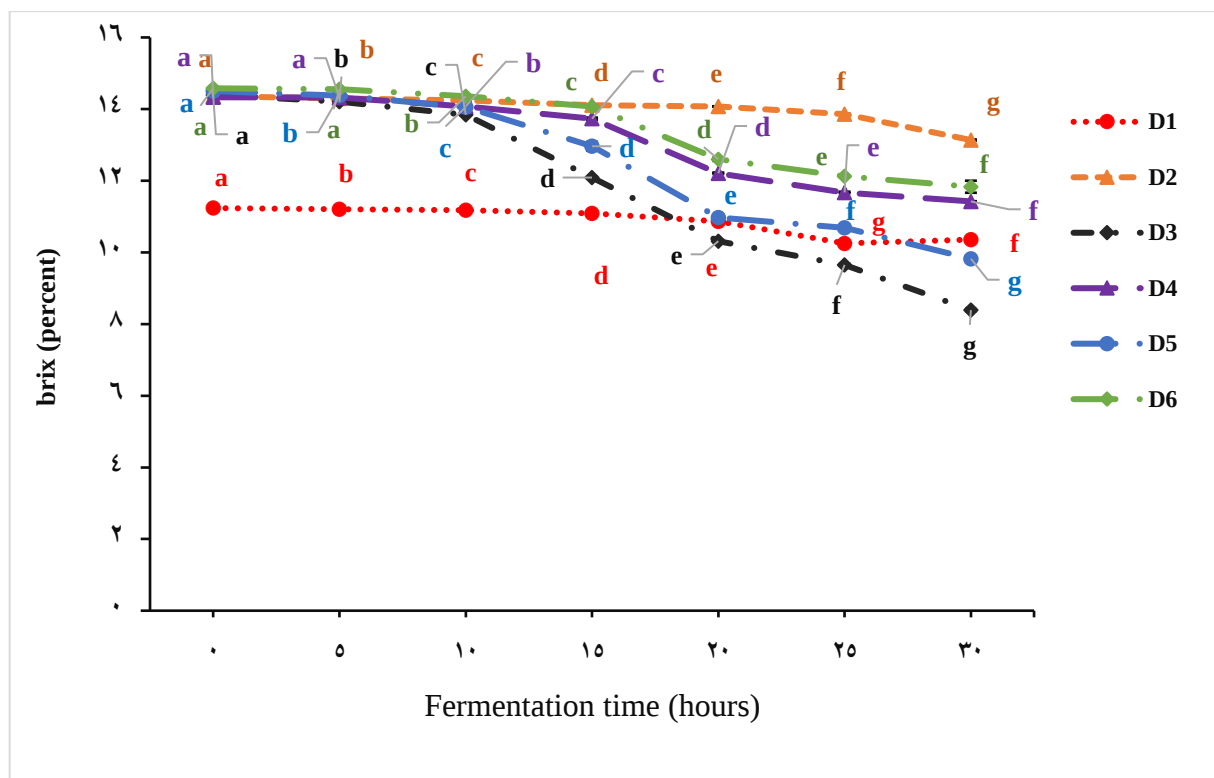


Chart 4- Comparison of the average Brix percentage in different treatments of the investigated ultra-beneficial drinks (in a period of 30 hours). (Dairy drink without adding Ganoderma and Lactobacillus casei extract (D1), Dairy drink containing Ganoderma extract (D2), Dairy drink containing free lactobacillus casei (D3), Dairy drink containing Lactobacillus casei capsules (D4), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei Azad (D5), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei capsule (D6)).

۳-۴- اندازه گیری ماده خشک

تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل از میانگین درصد ماده خشک در نوشیدنی لبنی فراسودمند حاوی تیمارهای عصاره گانودرما، لاکتوباسیلوس کازئی آزاد و کپسوله در مقایسه با نمونه شاهد در مدت ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچال در نمودار (۵) نشان می دهد

نتایج حاصل از پژوهش حاضر، با نتایج محققین دیگر که به بررسی بریکس نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک بر مبنای مخلوط آب آناناس، سیب و انبه پرداختند و بیان نمودند که به دلیل مصرف قندها و تولید اسیدهای آلی از مقادیر بریکس نمونه ها کاسته شده است مطابقت دارد [۲۳].

که تیمار حاوی عصاره و لاکتوباسیل کازئی کپسوله از بالاترین درصد ماده خشک در طول دوره برخوردار بوده است، که در روز ۱۵ با میانگین ۱۲/۸۷ درصد از بالاترین مقدار برخوردار بوده است.

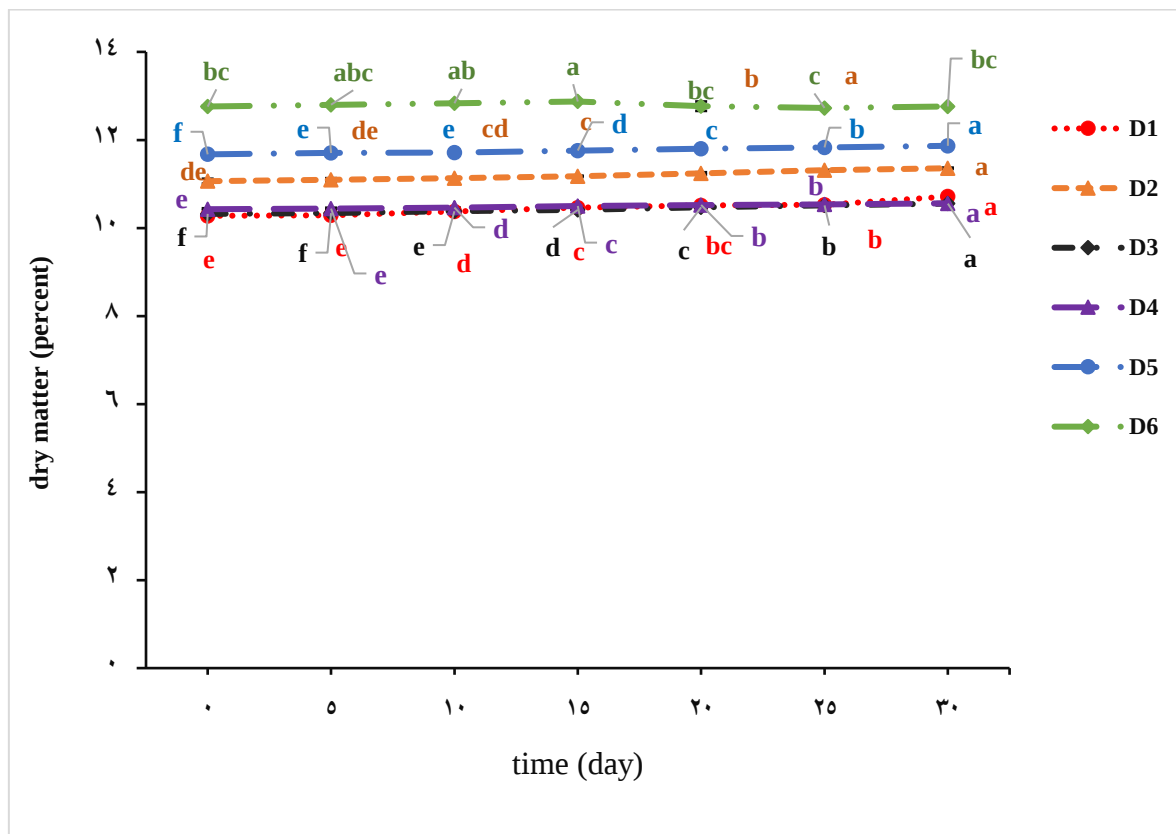


Chart 5- Comparison of the average percentage of dry matter in different treatments of the investigated super-beneficial drink (within 30 days) (Dairy drink without adding Ganoderma and Lactobacillus casei extract (D1), Dairy drink containing Ganoderma extract (D2), Dairy drink containing free lactobacillus casei (D3), Dairy drink containing Lactobacillus casei capsules (D4), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei Azad (D5), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei capsule (D6)).

۳-۵- اندازه گیری pH

نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچال در نمودار (۶) نشان داد که با گذشت زمان مقدار pH کاهش می یابد که این افت کاهش در تیمارهای حاوی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بسیار بیشتر بوده است، که این مقدار pH در تیمارهای حاوی لاکتوباسیلوس کازئی آزاد کمتر از لاکتوباسیلوس کازئی کپسوله بوده است.

pH جزء پارامترهای شاخص برای انجام تخمیر به وسیله کشت میکروبی است. توانایی باکتری های اسید لاکتیک برای تولید اسید در طی فرایند تخمیر شیر، با اندازه گیری pH مورد بررسی قرار گرفت. لذا نتایج آنالیز واریانس داده های حاصل از میانگین pH در نوشیدنی لبنی فراسودمند حاوی تیمارهای عصاره گانودرما، لاکتوباسیلوس کازئی آزاد و کپسوله در مقایسه با نمونه شاهد در مدت ۳۰ روز

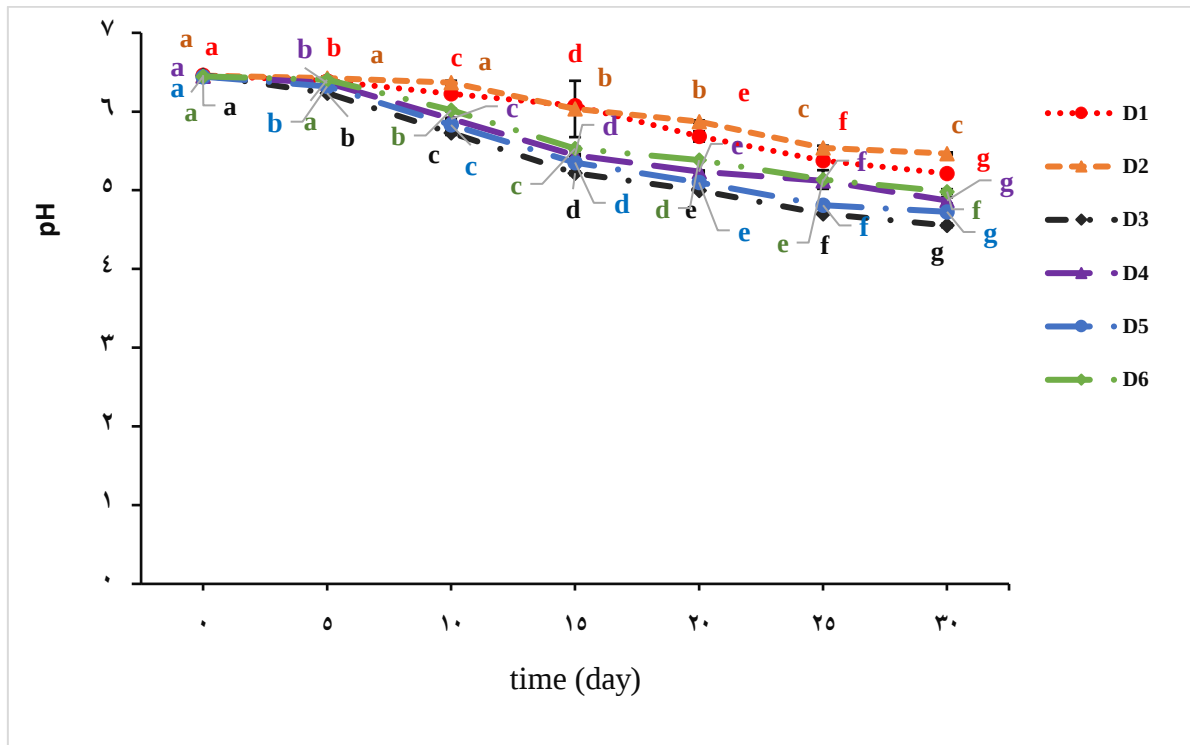


Chart 6-Comparison of the average pH level in different treatments of the examined ultra-beneficial drinks (in 30 days). (Dairy drink without adding Ganoderma and Lactobacillus casei extract (D1), Dairy drink containing Ganoderma extract (D2), Dairy drink containing free lactobacillus casei (D3), Dairy drink containing Lactobacillus casei capsules (D4), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei Azad (D5), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei capsule (D6)).

۳-۶- شمارش کلی باکتری‌ها

نتایج حاصل از شمارش کلی باکتری ها، و شمارش باکتری های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس منفی بوده است و رشدی مشاهده نشده است.

۳-۷- ارزیابی حسی

نتایج آنالیز واریانس داده های حاصل از ارزیابی حسی امتیاز عطر در برخی از تیمارهای نوشیدنی دارای اختلاف آماری معنی داری بوده اند، به طوری که نوشیدنی حاوی عصاره گانودرما و لاکتوباسیل کازئی کپسوله از بیشترین و نوشیدنی تهیه شده از عصاره تنها، از کمترین امتیاز عطر برخوردار بوده اند، در حالی که، شاخص های ارزیابی حسی طعم، رنگ، بافت و پذیرش کلی در تیمارهای مختلف نوشیدنی لبنی فراسودمند تهیه شده فاقد اختلاف آماری معنی داری با یکدیگر بوده اند.

در همین راستا باقری و همکاران (۱۳۹۸) در پژوهشی با عنوان تولید شیر تخمیری فراسودمند توسط لاکتوباسیل های جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران، کاهش pH مقادیر ۶/۴۶ به ۳/۷۲ را در شیر تخمیری بعد از ۱۲ ساعت تخمیر به وسیله سویه های لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس گزارش کردند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که تفاوت در مقادیر pH اندازه گیری شده بعد از ۲۴ ساعت برای سویه های باکتری ممکن است به دلیل تفاوت در سرعت رشد و مسیر متابولیسمی متفاوت برای هر باکتری باشد. به طوری که لاکتوباسیلوس هلویتیکوس دارای مسیر تخمیر لاکتیکی همگن و دارای رشد تاخیری به دلیل نیازهای رشد بیشتر و قدرت بالاتر تولید اسید است در حالیکه لاکتوباسیلوس فرمنتوم دارای مسیر تخمیری ناهمگن، سرعت ملایمتر تولید اسید و رشد سریعتر است، که این مسأله می تواند در خصوص باکتری لاکتوباسیلوس کازئی هم صادق باشد.

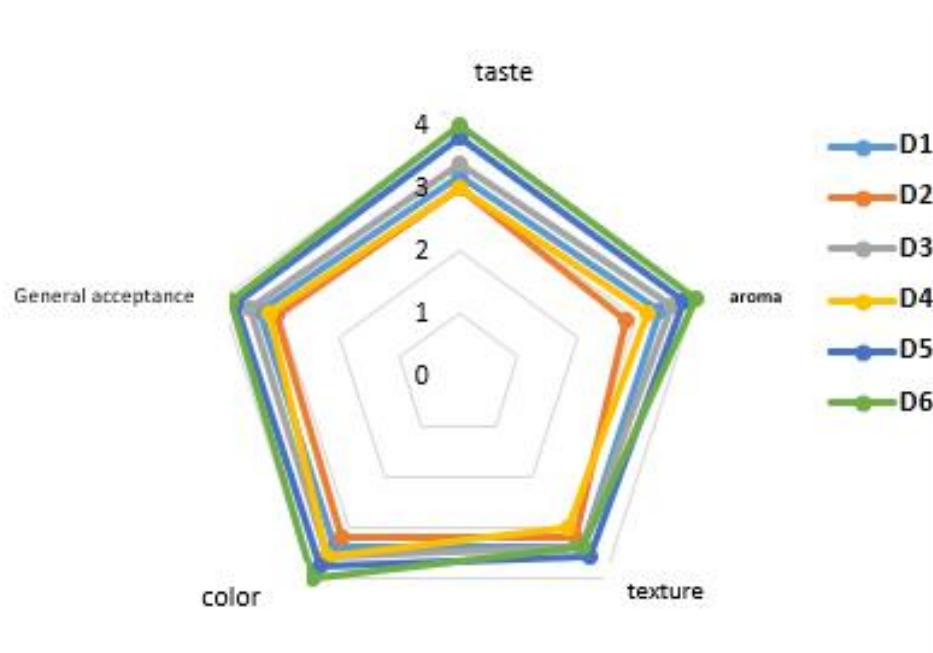


chart 7- The results of sensory evaluation in different treatments of ultra-beneficial dairy drink (Dairy drink without adding Ganoderma and Lactobacillus casei extract (D1), Dairy drink containing Ganoderma extract (D2), Dairy drink containing free lactobacillus casei (D3), Dairy drink containing Lactobacillus casei capsules (D4), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei Azad (D5), Dairy drink containing Ganoderma extract and Lactobacillus casei capsule (D6)).

۳-۸- نتیجه گیری نهایی

نوشیدنی تهیه شده از عصاره تنها، از کمترین امتیاز عطر برخوردار بوده‌اند، بررسی pH نشان داد که باکتری لاکتیکی در پایان دوره رشد لگاریتمی خود pH را به ۴/۵ کاهش داده که از نظر تکنولوژیکی و ممانعت از رشد سایر میکروارگانیسم‌های ناخواسته مورد توجه است. همچنین نتایج حاصل از شمارش کلی باکتری‌ها، و شمارش باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس منفی بوده است و رشدی مشاهده نشده است. نتایج به دست آمده از زنده‌مانی باکتری در طی مدت زمان ۳۰ روز ماندگاری در یخچال بسیار مناسب و در حد ۶/۷ لگاریتم در تیمار حاوی عصاره لاکتوباسیلوس کازیی کپسوله بوده است. لذا می‌توان گفت نوشیدنی لبنی فراسودمند تولید شده در این پژوهش به عنوان محصولی با مدت زمان ماندگاری متوسط و در مدت ۳۰ روز عرضه شود تا بیشترین فواید سلامتی بخش را داشته باشد.

ماندگاری پروبیوتیک‌ها در سیستم‌های غذایی، بستگی به فاکتورهای زیادی مانند گونه انتخاب شده، واکنش بین گونه‌های میکروبی موجود در محیط و اسیدیته نهایی محصول دارد. هدف از این پروژه تولید و تعیین خصوصیات نوشیدنی لبنی فراسودمند سین بیوتیک بر پایه شیر، عصاره گانودرما و لاکتوباسیلوس کازیی آزاد و کپسوله بوده است. از جنبه ویژگی‌های سلامتی‌بخش، نظیر افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی، فرآیند تخمیر منجر به بهبود قابل ملاحظه‌ای در این خواص گردید، نتایج حاصل نشان داد که میانگین هیدرولیز پروتئین شیر تا ساعت ۴۰ روند افزایشی و در ادامه تا ساعت ۱۲۰ روند کاهشی داشته است. ارزیابی حسی امتیاز عطر در برخی از تیمارهای نوشیدنی اختلاف آماری معنی داری نشان داد، به‌طوری که نوشیدنی حاوی عصاره گانودرما و لاکتوباسیل کازئی کپسوله از بیشترین و

۴- منابع

- [1] Sarabi-Jamab, M., Kavereh, Mena, Modares, M., 2019, optimization of the extraction of the extract containing anti-carob compounds from the leaves of the Norozak plant using the response surface method (RSM), Quarterly Journal of Research and Innovation in Food Industry Sciences, p. 16.
- [2] Rast Manesh, R. 1382. Enrichment of food with micronutrients, Tehran University Press.
- [3] Calvo, M.S., Whiting, S.J. and Barton, C.N., 2004. Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. The American journal of clinical nutrition, 80(6), pp.1710S-1716S.
- [4] Hesari, J., Alirezalu, K., Sadeghi, M.H., Rezaei, A. 2014. Investigating the quality characteristics and shelf life of multi-purpose colored yogurt enriched with sugar beet, spinach and tomato extracts, Journal of Food Industry Research. Tabriz University, Volume 25, pp. 26-35.
- [5] Ersouml, E., Yerlikaya, O. and Accedil, M., 2011. Effect of phenolic compounds on characteristics of strained yoghurts produced from sheep milk. African Journal of Agricultural Research, 6(23), pp.5351-5359.
- [6] El-Nor, S.A. and Khattab, M.S., 2012. Enrichment of Milk with Conjugated Linoleic Acid by Supplementing Diets with Fish and Sunflower Oil. Pakistan Journal of Biological Sciences, 15(14), pp.690-693.
- [7] Stratulat, I., Britten, M., Salmieri, S., Fustier, P., St-Gelais, D., Champagne, C.P. and Lacroix, M., 2014. Enrichment of cheese with bioactive lipophilic compounds. Journal of Functional Foods, 6, pp.48-59.
- [8] Chang, J.L., Marshall, R.T. & Heymann, H., 1995. Casein micelles partially hydrolyzed by chymosin to modify the texture of low fat ice cream. Journal Dairy Sci, 78: 2617.
- [9] Keizer G. 1998. The complete encyclopedia of mushrooms. Rebo International b.v., Lisse, The Netherlands..P. 125-167.
- [10] Badalyan SM, Gharibyan NG and Kocharyan AE. 2007. Perspective in usage of bioactive substances of medicinal mushrooms in Pharmaceutical and cosmetic industry. Int. J. Med. Mushr.; 9(3, 4): 275.
- [11] Tan Y.X, Chu G.L, Shen, R Q. Yu. 2008. A Signal-amplified Electrochemical Immunosensor for Aflatoxin B1 Determination in Rice. Analytical Biochemistry. 387: 82-86.
- [12] Jafarzadeh, H., Ivan Baqqa, R., Hasanzadeh, D., Soroush Barhaghi, M.H., Sayah Meli, M., Mohammadpour Asl., 2010. Comparison of the effect of Lactobacillus acidophilus vaginal suppositories with metronidazole vaginal tablets in regulating vaginal pH in patients with bacterial vaginosis. Tabriz nursing and midwifery magazine. Number 13. Page 19 12.
- [13] Aghajani, A.R., Pourahmad, R., Mahdavi Adeli, H.R., 2013. Production and storage of synbiotic yogurt containing Lactobacillus casei. Food science and nutrition. 10th year No. 1, pp. 19-31.
- [14] Bagheri, F., Mirdamadi, S., Mirzaei, M., Maliha Safavi, M., 2018. Production of beneficial fermented milk by lactobacilli isolated from traditional Iranian dairy products. New Food Technologies Quarterly, Volume 7, Number 2, pp. 255-243.
- [15] Son, S. ,Lewis, B.A.(2002). Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure–activity relationship. *J.Agric.Food Chem.*, 50(3), 468-472.
- [16] Haji-Ikari, F., Homayunirad, A., Rahimzadeh, Z., 2016. Investigating the effect of replacing sucrose with date juice on the physicochemical and sensory characteristics of malt beverage. Journal of Iranian Food Science and Industry Research, Volume 13, Number 4, pp. 646-637.
- [17] Salehi, F. 2017. Rheological and physical properties and quality of the new formulation of apple cake with wild sage seed gum (Salvia macrosiphon), Journal of Food Measurement and Characterization, 11: 2006-2012.
- [18] Noshirvani, N., Mohebi, A., 2023. Investigating the chemical and microbial characteristics of date sap during the production stages (from the raw material to the final product). Iranian Journal of Food Sciences and Industries, No. 139, Volume 20, pp. 120-129.
- [19] Tafengsazan, F., Khamari, M., Karim, G., Hosni, S., Hashemi, S.S. 2010. Evaluation of the microbial quality of butters supplied in Tehran in 2008. Iranian Journal of Medical Microbiology. Year 3, Number 1, pp. 36-42.

- [20] Sadeghi, A., Almasi, A., Bashiri, M., Mohammadi, M., 2015. Investigating the effectiveness of different disinfectants in reducing the microbial contamination of vegetables sold in Kermanshah. *Journal of Environmental Health Engineering*, third year, number 2. pp. 123-129.
- [21] Yarahmadi, B., Mahdavi, H.R., Moyidenejad, A., 2009. Investigation of total microbial load, coliform and *Escherichia coli* contamination of raw milk from the milking stage to delivery to the factory in Lorestan province. *Scientific-Research Quarterly of Lorestan University of Medical Sciences*, pp. 67-79.
- [22] Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., Kianirad, M., 2016. Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal). *Dairy. Sci. Technol.*, 96(4),443-457.
- [23] Mashayekh S, Hashemiravan M, Mokhtari FD.2015. Study on Chemical and Sensory Changes of probiotic fermented beverage based on mixture of pineapple, apple and mango juices. *J Chem Pharm Res*; 7: 1132-1137.
- [24] Pérez-Escalante, E., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., Añorve-Morga, J., González- Olivares, L.G., 2018. Antithrombotic activity of milk protein hydrolysates by lactic acid bacteria isolated from commercial fermented milks. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 61.
- [25] Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*, 102(1), 106-115.
- [26] Jafari, M., Jahed Khaniki ,G., Roshanzamir, M., Sadighara, P. 2017. Antioxidant activity of raw milk and dairy products commonly consumed in Fars province, Iran. *J. Food. Safe Hyg.*,3(1-2),21-6.



Scientific Research

Production of beneficial synbiotic dairy drink based on milk, extract mushroom Free and encapsulated Ganoderma and Lactobacillus casei

Mahdis Jamshidi Tehranian¹, Mohammad Joki², Mohammad Javad Shakori^{*3}, Sara Jafarian⁴

1-Department of Food Science and Industry, Noor Branch, Islamic Azad University, Noor, Iran

2 -Department of Food Science and Industry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3 -Department of Food Science and Industry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Department of Food Science and Industry, Noor Branch, Islamic Azad University, Noor, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2024/10/4

Accepted: 2025/2/16

Keywords:

Dairy drink,
beneficial,
Ganoderma,
Lactobacillus casei,
encapsulation

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.283.

*Corresponding Author E-
gh2002_haghyegh@yahoo.com

mj.shakori@gmail.com

Ganoderma mushroom with scientific name *G. clear*. It is considered one of the most important herbs in traditional medicine, and for many years it was known as a traditional and effective elixir in the treatment of various diseases. Today, consumers' desire for beneficial food products such as probiotic drinks is increasing, therefore, in this research, the production of a beneficial synbiotic dairy drink based on milk, Ganoderma extract and Lactobacillus casei free and capsule has been done. In the first phase of extraction, Ganoderma mushroom extract was extracted by percolation method; Then, in the second phase, the encapsulation of probiotic bacteria was done. In the third phase, the ultra-beneficial dairy drink 6 levels (D1 control treatment (without Ganoderma mushroom extract and Lactobacillus casei capsule), D2 Treatment containing Ganoderma mushroom extract, D3 A drink containing free Lactobacillus casei bacteria, D4 A drink containing encapsulated Lactobacillus casei bacteria, D5 A drink containing Ganoderma mushroom extract and Lactobacillus casei Azad bacteria, D6 Drink containing Ganoderma mushroom extract and Lactobacillus casei bacterium (encapsulated) was produced. The parameters examined in this research include: Physicochemical, microbial and sensory characteristics were in the treatments. Statistical analysis using software SPSS V.25 At the probability level ($0.05 \geq p$) was done. The results of this research showed that the average hydrolysis of milk protein increased until 40 hours and then decreased until 120 hours. The sensory evaluation of the aroma score showed a statistically significant difference in some of the drink treatments, so that the drink containing the extract mushroom Ganoderma and Lactobacillus casei capsule had the highest and the drink prepared from the extract alone had the lowest aroma score. review pH showed that lactic acid bacteria at the end of their logarithmic growth period pH reduced to 4.5, which is important from a technological point of view and preventing the growth of other unwanted microorganisms. Also, the results of total bacterial count, Escherichia coli and Staphylococcus aureus bacteria count were negative and no growth was observed. Therefore, it can be said that the ultra-beneficial dairy drink produced in this research is a product with an average shelf life that can in the best case, according to the viability of the bacteria during the period of 30 days, it is very suitable in the refrigerator and at the level of 6.7 logarithms. Offered to have the most health benefits.

Journal of food science and technology(Iran)

Properietor:	Food Science & Technology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University Association of Food Science & Technology (Iran)
Excutive Manager:	Dr. E. Sharifi Al Agha
Editors-in-Chief:	Dr. M. H. Azizi

Editorial Board: (Alphabetical order)

Azizi, M. H. Prof.
Abbasi. S. Associate Prof.
Ahmadi, H. Assistant Prof.
Hamidi Esfahani, Z. Associate Prof.
Hossaini, M. Assistant Prof.
Sahari, M. A. Prof.
Mohammadamin, M. Assistant Prof.
Vosoughi, M. Prof.
Rashidinejad, A. Rashidinejad

Editorial Secretary:	Neda Azizi
Literature and Technical Editor (Persian):	M. A. Sahari
Literature and Technical Editor (English):	M. H. Azizi
Layout:	Neda Azizi
Lithography & Print:	Center for Academic Publication

Address:	Food Science & Technology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University P.O.Box: 14115-336, Tehran, I. R. Iran. Web site: www.fsct.ir Tel:+98-21-48292475 Fax: +98-21-44180539
-----------------	---

**Instructions for Contributors to the
Journal of food science and technology(Iran)**

General

IJFST publishes the results of research in the various aspects of Science applying to the different areas of Food Science and Technology from all over the world. Four copies of the manuscript, not already sent for publication should be forwarded to the Editorial Office, Journal of Food Science and Technology, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University, P.O.Box.14115-336, Tehran, Iran.

PREPARATION OF THE MANUSCRIPTS

Manuscripts must be typed, double-spaced, line numbered, with margins on good grade A4 paper. The heading of each manuscript should include the title, author's name(s) and complete address(es).

The manuscript should usually be divided into the following sections: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and finally Reference. An abstract not exceeding 300 words should cite the reasons for doing work; objectives and topics covered brief description of methods used, result and conclusions.

Introduction should be short and include a brief statement of the problem that specifies the work, the finding of others and an explanation of the general approach and objectives, Methods should be based on experimental and survey data and should give sufficient details. Tables, figures and other illustrations in the results section should provide a clear understanding of the representative data obtained from the experiments.

Discussion section should interpret the data presented in the results section, giving particular attention to the problems presented in the introduction. Acknowledgement(s) should precede the references.

In references section, the author(s) is (are) encouraged to cite only the published, significant and up-to-date reference. References should be numbered sequentially in the order that they are cited in the text. The numbers should be enclosed in square brackets e.g. Glenn et al. [1]. References are collected in numerical order at the end of the manuscript under the heading "References"

JOURNAL ARTICLES

[1] Glenn, G.M., Younce, F.L. and Pitts, M.J.1991. Fundamental physical properties characterizing the hardness of wheat endosperm. *Journal of Cereal Science* 13: 179-194.

[2]Clark, A.H. 1987. The application of network theory to food systems. In "Food structure and Behavior", (J. M. V. Blanshard and P. Eillford, eds). Academic Press, London, pp: 13-34.

The manuscripts should also include a condensed running title (not exceeding 50 characters including spaces), a list of three to five keywords and a Persian abstract for non-Iranian authors the abstract will be converted into Persian by the journal's editor.

MANUSCRIPTS ON DISK

Office tools (Microsoft Word) should be used to prepare the final revised materials. The final revised manuscript saved on a 3 1/2 floppy disk along with its hard copy is required for final submission.

UNITS OF MEASUREMENT

The SI system is adopted as standard. As for abbreviations. If any non-standards are to be used, they should be defined in the text.

TABLES

Tables should be numbered in Arabic, each submitted on a separate sheet with an appropriate legend at top. First mention of tables in text must be in sequential order. Indicate first mention of each table in the margin of manuscript.

ILLUSTRATIONS

Figures are of two kinds: line drawings and photographs. Line drawings must be drawn using intense black on white: photographs must be of good contrast and sharp focus throughout. In addition to the usual line-drawn graphs, treat complicated formulas, flow diagrams, metabolic schemes and large or complex tables as figures. First mention of figures in text must be in sequential order. Indicate first mention of each figure in the margin of text. Use [] to indicate the number of formulas.

Figures are photographically reproduced, nearly always at a reduced size from the material provided by the authors. Plan for maximum reduction wherever possible, figures will be reduced to fit one journal column(69mm). All letters, numbers and symbols, thus, must be large enough in original to be at least 1.5mm high after reduction.

PREPARATION FOR PUBLICATION

Page author proofs will be sent to the authors for checking before publication. Alterations other than the correction of printers error will be allowed only at the editor's discretion. Manuscripts after being corrected must be returned to the editorial office within 15 days. Otherwise the editor reserves the right to correct the proofs himself and to send the material for publication.

Web site: www.fsct.ir

Contents

1- Determination of Reheating Time.....	1
2- Explaining the pattern of consumption and.....	15
3- Optimizing the functional characteristics	31
4- Investigating the effect of ohmic.....	50
5- Evaluation of Some Physicochemical and.....	63
6- Evaluation of the Effect of Ultra-High Temperature.....	80
7- Feasibility of producing a functional.....	99
8- Antioxidant and antibacterial activity.....	119
9- Coriander seed (<i>Coriandrum sativum</i>) essential.....	130
10- Evaluation of the chemical characteristics and.....	144
11- Studying the production of composite nanofibers.....	155
12- Evaluation of antioxidant properties and.....	172
13- Evaluation of probiotic and antifungal.....	185
14- Evaluation of the amount of acrylamide.....	201
15- Screening of effective factors in the growth.....	213
16- Microencapsulation of canthaxanthine with.....	227
17- Physicochemical, antioxidant and sensory.....	238
18- Investigation of the effect of bug-damaged.....	254
19- Investigation of probiotic potential.....	270
20- Production of beneficial synbiotic dairy.....	283