

تعیین محتوای غذایی و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی عصاره مالت استخراج شده از دانه کینوا:

مطالعه مقایسه‌ای بین روش فراصوت و بن ماری

کاظم روشنی^۱، مژگان امتیازجو^{۲*}، محمد ربانی^۳، محمد جواد شکوری^۴، سارا موحد^۵

^۱ دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ *استاد، گروه زیست شناسی دریا، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ استادیار، گروه شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۴ استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۵ دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

چکیده

در این تحقیق، عصاره مالت بذر کینوا با استفاده از ترکیبی از روش‌های اولتراسونیک و بین ماری به دست آمد. زمان فراصوت (۵ تا ۵۰ دقیقه) و زمان بن ماری (۲۰ تا ۱۸۰ دقیقه) بر اساس حداکثر درصد آنتی اکسیدان بهینه شد. دمای بن ماری بین ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. تأثیر پارامترهای مختلف از جمله نسبت حلال‌ها (اتانول: ۲۵ و ۵۰ درصد، آب: ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد)، دمای ثابت بن ماری (۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد) و دمای استخراج (۲۵ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد) با زمان‌های اولتراسونیک (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) و بن ماری (۱۲۰ دقیقه) انتخابی بر روی خواص عصاره مالت در نظر گرفته شد. حداکثر مقدار فعالیت مهار رادیکال آنتی اکسیدان به ترتیب به زمان ۵ دقیقه (۴۷/۷ درصد) و ۱۲۰ دقیقه (۴۰/۴ درصد) برای روش اولتراسونیک و بن ماری اختصاص یافت. عصاره مالت کینوا فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی با مقدار کمتر IC_{50} معادل ۱۱/۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد. محتوای فنل کل و محتوای فلاونوئید کل به ترتیب از ۵۳۴/۳۵ تا ۲۷۹۳/۴۹ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم و ۰/۱۲ تا ۳/۲۲ میلی‌گرم کوئرستین بر ۱۰۰ گرم بود. محتوای پروتئین بالا (۳۷/۲ درصد) با اتانول: آب (۲۵:۷۵ درصد)، زمان اولتراسونیک ۱۵ دقیقه، زمان بن ماری ۱۲۰ دقیقه، دمای بن ماری ۴۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد و دمای استخراج ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. میزان ویتامین B₆ (پیریدوکسین) و ویتامین B₉ (اسید فولیک) به ترتیب در محدوده ۸/۰ تا ۷۶/۲ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم و ۳۴/۲ تا ۵۹/۲ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم بود. بیشترین میزان مواد معدنی حاوی کلسیم، منیزیم، فسفر و آهن در عصاره مالت به ترتیب ۴۹/۴۶، ۷۴/۸۹، ۱۱۵/۷۵ و ۵/۴۹ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم بود. بهترین اثر ضد سرطانی بر روی رده‌های سلولی HT۲۹ با زنده ماندن سلولی ۹۸/۳۱ درصد و سپس ۹۴/۴۲ درصد با غلظت ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مالت کینوا مشاهده شد. این عصاره مالت به عنوان منبعی از غذاهای کاربردی می‌تواند نقش مهمی در پیشگیری از سرطان داشته باشد.

کلمات کلیدی: کینوا، مالت، روش فراصوت، روش بن ماری، فعالیت ضد سرطان

*مسئول مکاتبات: moz_emtyazjoo@yahoo.com

اخیراً تعداد زیادی از مردم به رژیم غذایی روزانه خود هم از نظر ارتقاء سلامت و هم از نظر پیشگیری از بیماری‌ها توجه بیشتری دارند. بر اساس گزارش‌ها، یکی از سالم‌ترین غذاها غلات کامل است که برای پیشگیری از بیماری‌های مزمن مانند بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان و دیابت مفید است (۱۸). یکی از پر مصرف‌ترین غلات کامل کینوا است که به دلیل ارزش غذایی کامل و عملکرد گسترده آن در کوه‌های آند^۱ به عنوان غلات مادر نامیده می‌شود (۵۲). این گیاه متعلق به خانواده چنوپودیوم^۲ است و به صورت محلی در شیلی، بولیوی و پرو می‌روید. همچنین، این محصول به طور گسترده در شرق آسیا، آفریقا، اروپا و آمریکا یافت شده است (۴۴، ۴۷). اندازه کوچک دانه کینوا بین ۸/۱ تا ۲/۲ میلی‌متر است. محبوبیت فزاینده آنها به دلیل سازگاری عالی آنها با شرایط آب و هوایی و خاک است. رشد بیش از ۲۵۰ نوع دانه کینوا ثابت شده است و موقعیت‌های جغرافیایی، شرایط محیطی و تنوع ژنتیکی بر ترکیب شیمیایی و تغذیه‌ای آنها تأثیر می‌گذارد (۳۲). محتوای دانه کینوا شامل کربوهیدرات (۶/۷۷ درصد)، پروتئین (۹/۱۲ درصد)، طیف اسید آمینه متعادل شده (لیزین و متیونین)، لیپیدها (۵/۶ درصد)، مواد مغذی معدنی (۳ درصد)، فیبر غذایی، ویتامین‌ها (B₁، B₂، B₆، C و E) و همچنین غنی از آهن، پتاسیم، کلسیم، منیزیم و فسفر است (۳۸، ۲۱، ۵۰). بتالین‌ها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی منجر به تولید دانه‌هایی با رنگ‌های مختلف (سفید، قرمز و سیاه) می‌شوند (۴۲). علاوه بر این، ترکیبات زیست‌فعال (بتالین‌ها و پپتیدهای زیست‌فعال، ساپونین‌های تری‌ترپنوئید، فیتواکدی استروئیدها^۳ و فنل‌ها) با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی در ساختار کینوا وجود دارد (۲۹).

مشخص شده است که افزایش استرس اکسیداتیو با بسیاری از بیماری‌های مضر مانند سرطان، آلزایمر و افسردگی مرتبط است. برای جلوگیری از خطرات بیماری‌های مختلف مانند سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در کینوا تأثیر مفیدی بر سلامت انسان می‌گذارد (۴۸). از این رو، استرس اکسیداتیو را می‌توان با آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش داد، که می‌تواند به حفظ وضعیت سالم کمک کند (۵۴). با توجه به تحقیقات انجام شده، کینوا را می‌توان به عنوان یک غذای عملکردی طبیعی برای پیشگیری از بیماری‌ها معرفی کرد (۳۶، ۱۴). کینوا به دلیل ارزش غذایی بالا و خواص درمانی عالی و عدم وجود گلوتن می‌تواند مورد توجه افراد

^۱ Andes

^۲ Chenopodiaceae

^۳ Phytoecdysteroids

مسن، کودکان، زنان مستعد پوکی استخوان، افراد مبتلا به دیابت و بیماری سلیاک، ورزشکاران پر تحرک، افراد مبتلا به کم خونی و افراد دارای اضافه وزن باشد (۳۴،۱۲).

اگرچه کیفیت غذایی دانه‌های کینوا بالا است، اما با فرآیندهای مختلف مانند مالت سازی می‌توان به کیفیت بالاتری دست یافت [۳]. فرآیند مالت‌سازی که شامل خیساندن (هیدراتاسیون)، جوانه‌زنی و کوره‌زنی می‌شود، می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر محتوای فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دانه‌ها تأثیر بگذارد (۲۲،۵).

روش‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات زیست فعال کینوا استفاده شده است. استفاده از حلال‌های آلی در این روش‌ها باعث افزایش راندمان استخراج می‌شود. از طرفی به دلیل نیاز به مراحل بعدی تصفیه می‌تواند منجر به کاهش گزینش پذیری و افزایش زمان و هزینه شود. علاوه بر این، این حلال‌ها سمی بوده و اثرات منفی بر صنایع غذایی و دارویی دارند (۳۳). برای غلبه بر این اشکالات، روش‌های استخراج به کمک اولتراسونیک^۱، استخراج به کمک مایکروویو، استخراج سیال فوق بحرانی^۲ و استخراج با آب فوق گرم^۳ مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۴۱). راندمان استخراج و گزینش پذیری این روش‌ها بالاتر است، زمان استخراج آنها کوتاه‌تر است و همچنین نیازی به حلال‌های آلی سمی ندارند. در واقع، این رویکردها روش‌های سبز، سازگار با محیط زیست، سریع و قابل اعتماد هستند (۲۰،۳۰،۳۷).

استخراج به کمک فراصوت به عنوان یک "فناوری سبز" شناخته شده است که اخیراً به دلیل مزایای عالی مانند زمان استخراج کوتاه، استفاده از حجم حلال کم، اثر زیست محیطی کم، عدم استفاده از ابزار پیچیده و هزینه کم مورد توجه قرار گرفته است. اساس این روش استفاده از امواج مافوق صوت با فرکانس بین ۲۰ کیلوهرتز تا ۱۰ مگاهرتز است که بین امواج قابل شنیدن و محدوده مایکروویو قرار دارند (۱۱). آگولار^۴ و همکاران (۲۰۱۹)، فرآیند مالت‌سازی را به‌عنوان جایگزینی برای به دست آوردن آرد کینوا با کیفیت

^۱ Ultrasound-assisted extraction (UAE)

^۲ Supercritical fluid extraction

^۳ Superheated water extraction

^۴ Aguilar

غذایی بالا در سه گونه مختلف بررسی کردند (۳). موفاری^۱ و همکاران (۲۰۲۱)، استخراج ترکیبات فعال زیستی را از کینوا مالت دار با استفاده از مخلوط آب-اتانول در تحت شرایط بحرانی مورد مطالعه قرار دادند (۳۳).

هدف از این کار بررسی فواید تغذیه‌ای عصاره مالت دانه کینوا به عنوان یک غذای سالم و کاربردی کشت شده در ایران است. عصاره مالت با استفاده از روش اولتراسونیک همراه با بن ماری به دست آمد. فعالیت آنتی اکسیدانی، محتوای فنلی کل^۲، محتوای فلاونوئید کل^۳، محتوای پروتئین کل، ویتامین گروه B (B^{۱۲}، B^۹) و مواد معدنی (کلسیم، منیزیم، فسفر، آهن) مربوط به عصاره مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، اثر ضد سرطانی آن در مقابل HT-۲۹ به عنوان رده سلولی آدنوکارسینومای کولورکتال انسان مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

دانه کینوا با رنگ قهوه‌ای کشت شده در ایران که از بازار خریداری شده بود، استفاده شد. اتانول، ۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل، کلرید آلومینیوم، اسید نیتریک، اسید سولفوریک غلیظ، اسید بوریک، اسید کلریدریک، اسید استیک، متانول، ایزوپروپانول و هگزان سولفونیک اسید از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

۲-۲- تهیه نمونه و استخراج مالت کینوا با استفاده از فراصوت

بذر کینوا به مدت ۴ ساعت در آب مقطر خیسانده شد تا رطوبت بذرها به ۵۵ درصد برسد. سپس، بذرها به مدت ۲ روز در دستگاه جوانه زنی مجهز به سنسور دما و رطوبت با حجم ۴۰۰ لیتر (دانسیته: ۸۰×وزن: ۸۰×ارتفاع ۱۶۵ سانتی‌متر) قرار داده شدند، جایی که دما و رطوبت روی ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ درصد تنظیم شد. هنگامی که ارتفاع جوانه‌ها به ۷ تا ۱۰ میلی‌متر رسید، بذرها را جوانه زده در خشک کن (Binder, Germany) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند تا به رطوبت ۵ تا ۸ درصد برسند. دانه‌های خشک شده آسیاب شدند تا برای مرحله استخراج آماده شوند (۷). پودر به دست آمده با حلال آب/اتانول در

^۱ Mufari

^۲ Total phenolic content (TPC)

^۳ Total flavonoid content (TFC)

سه غلظت مختلف (۰:۱۰۰ حجمی/حجمی، ۲۵:۷۵ حجمی/حجمی، ۵۰:۵۰ حجمی/حجمی) مخلوط شد. مخلوط‌های تهیه شده با استفاده از روش بن ماری ساده (water bath, Azotech, Iran) به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای استخراج حرارت داده شدند. سپس، مخلوط‌ها در حمام اولتراسونیک (Bandelin, Germany، ۲۰ کیلوهرتز، ۲۵۰ وات) در سه زمان ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. پس از استخراج، مخلوط‌ها با سیستم فیلتراسیون خلاء و با استفاده از کاغذ صافی واتمن (گرید ۴۰) فیلتر شدند. به منظور تغلیظ و جداسازی اتانول، عصاره به‌دست‌آمده به دستگاه روتاری منتقل شد و فرآیند در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط خلاء انجام شد (۱۹).

۲-۳- استخراج مالت با استفاده از دمای بالا

پودر طبق روش قبلی بدست آمد. با آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد به روش بن ماری حرارت داده شد. برای ادامه استخراج، دمای مخلوط به تدریج افزایش یافت و به ۹۰ درجه سانتی‌گراد رسید. پس از آن، مخلوط توسط سیستم فیلتراسیون خلاء با کاغذ صافی واتمن (گرید ۴۰) فیلتر شد (۱۶).

۲-۴- تهیه تیمارها

ده تیمار براساس درصد‌های مختلف آب و اتانول، زمان و دمای بن ماری، زمان فراصوت و دمای استخراج برای مطالعه اثر پارامترهای مختلف انتخاب شدند که ویژگی‌های این تیمارها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات ۱۰ تیمار شامل درصد آب و اتانول، زمان و دمای بن ماری، زمان اولتراسونیک و دمای استخراج

تیمار	اتانول (درصد)	آب (درصد)	زمان بن ماری (دقیقه)	دمای بن ماری (درجه سانتی گراد)	زمان اولتراسونیک (دقیقه)	دمای استخراج (درجه سانتی گراد)
۱	۰	۱۰۰	۱۲۰	۴۵-۴۰	۵	۲۵
۲	۰	۱۰۰	۱۲۰	۴۵-۴۰	۱۰	۲۵
۳	۰	۱۰۰	۱۲۰	۴۵-۴۰	۱۵	۲۵
۴	۲۵	۷۵	۱۲۰	۴۵-۴۰	۵	۲۵
۵	۲۵	۷۵	۱۲۰	۴۵-۴۰	۱۰	۲۵
۶	۲۵	۷۵	۱۲۰	۴۵-۴۰	۱۵	۲۵
۷	۵۰	۵۰	۱۲۰	۴۵-۴۰	۵	۲۵
۸	۵۰	۵۰	۱۲۰	۴۵-۴۰	۱۰	۲۵
۹	۵۰	۵۰	۱۲۰	۴۵-۴۰	۱۵	۲۵
شاهد	۰	۱۰۰	۱۲۰	۴۵-۴۰	---	۹۰

Treatment ۱: ۰ min ultrasonic, ۱۲۰ min bain-marie & ۰% alcohol, Treatment ۲: ۱۰ min ultrasonic, ۱۲۰ min bain-marie & ۰% alcohol, Treatment ۳: ۱۰ min ultrasonic, ۱۲۰ min bain-marie & ۰% alcohol, Treatment ۴: ۰ min ultrasonic, ۱۲۰ min bain-marie & ۲۵% alcohol, Treatment ۵: ۱۰ min ultrasonic, ۱۲۰ min bain-marie & ۲۵% alcohol, Treatment ۶: ۱۰ min ultrasonic, ۱۲۰ min bain-marie & ۲۵% alcohol, Treatment ۷: ۰ min ultrasonic, ۱۲۰ min bain-marie & ۵۰% alcohol, Treatment ۸: ۱۰ min ultrasonic, ۱۲۰ min bain-marie & ۵۰% alcohol, Treatment ۹: ۱۰ min ultrasonic, ۱۲۰ min bain-marie & ۵۰% alcohol

۵-۲- آنالیز شیمیایی عصاره

۵-۲-۱ تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی

با توجه به روش ارائه شده توسط موفاری و همکاران (۳۹)، با تغییرات جزئی، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره مالت دانه کینوا در حضور

۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط اسپکتروفتومتر (Varian, Cary ۱۰۰ bio, Australia) در طول موج ۵۱۷

نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. ظرفیت مهار رادیکال^۱ مربوط به عصاره از طریق معادله (۱) تعیین شد.

$$RSA (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

که در آن A_0 و A_1 به ترتیب جذب کنترل و جذب DPPH در حضور عصاره هستند (۴۳).

^۱ Radical scavenging capacity (RSC)

۲-۲-۵- تعیین کل ترکیبات فنلی

طبق روش شالاشویلی و همکاران (۴۵)، کل ترکیبات فنلی بر اساس اسید گالیک با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۱ که مجهز به ستون C۱۸ بود، محاسبه شد. شناسایی اجزاء ترکیب فنلی در ۲۷۱ نانومتر با استفاده از آشکارساز UV-Vis انجام شد. شستشو با آب: متانول (۵۰:۵۰ حجمی/حجمی) به عنوان یک فاز متحرک با سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه انجام شد.

۲-۳-۵- تعیین محتوای فلاونوئید کل

محتوای فلاونوئید کل با روش پیشنهادی چانگ^۲ و همکاران اندازه گیری شد (۱۳). ۵ میلی لیتر محلول کلرید آلومینیوم (۲درصد) با ۵ میلی لیتر عصاره مالت کینوا مخلوط شد. جذب مخلوط پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر ثبت شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون از کوئرستین^۳ به عنوان استاندارد استفاده شد. نتایج بر اساس میلی گرم معادل کوئرستین (QE) در ۱۰۰ میلی لیتر عصاره مالت بذر کینوا بیان شد.

۲-۶- تعیین محتوای پروتئین کل

محتوای پروتئین کل با روش کجلدال با توجه به روش پیشنهادی توسط آگولار^۴ و همکاران اندازه گیری شد (۳). ابتدا نمونه با اسید سولفوریک غلیظ و کاتالیزور مخلوط شد و مرحله هضم انجام شد. سپس، مرحله تقطیر با کمک معرف اسید بوریک ۴ درصد انجام شد. در نهایت، محلول باقیمانده با اسید کلریدریک ۱/۰ نرمال تیترا شد. درصد پروتئین طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Protein (\%)} = \text{Nitrogen(\%)} \times 6.25 \quad (۲)$$

۲-۷- تعیین مقدار ویتامین های B۶ و B۹

ویتامین B۶ و B۹ با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بر اساس روش آلابوردا^۵ و همکاران اندازه گیری شد (۴). کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل Waters مجهز به یک ستون C۱۸ و یک آشکارساز مرئی-فرابنفش (GBC-LC ۱۲۰۵) بود که در طول موج

^۱ High-performance liquid chromatography (HPLC)

^۲ Chang

^۳ Quercetin

^۴ Aguilar

^۵ Alaburda

۲۸۰ نانومتر تنظیم شد. فاز متحرک شامل مخلوطی از ۱ گرم هگزان سولفونیک اسید با ۲۰ میلی لیتر اسید استیک بود که با متانول ۲۵ درصد به حجم ۲۵۰ میلی لیتر رسانده شد. حجم تزریق و سرعت جریان به ترتیب ۲۰ میکرولیتر و ۱ میلی لیتر بر دقیقه بود.

۸-۲- تعیین مواد معدنی

ده میلی لیتر اسید نیتریک به ۵ میلی لیتر نمونه عصاره مالت اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت حرارت داده شد تا نمونه هضم شود. سپس نمونه توسط کاغذ صافی واتمن درجه ۴۰ فیلتر شد و عناصر توسط پلاسما جفت شده القایی^۱ (مدل VISTA-PRO، استرالیا) تعیین شدند (۴۰).

۹-۲- مراحل تعیین زمان بهینه استخراج به روش بن ماری و فراصوت

مقدار ۱۰۰ گرم پودر دانه کینوا در یک فلاسک حجمی ۵۰۰ میلی لیتری به حجم رسید و به روش بن ماری حرارت داده شد تا به دمای معینی بین ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد برسد. سپس برای اجرای آزمون DPPH هر ۲۰ دقیقه نمونه برداری انجام شد.

در روش فراصوت، عصاره مالت به مدت ۱۲۰ دقیقه با استفاده از روش بن ماری حرارت داده شد و سپس به حمام اولتراسونیک (Bandelin، آلمان، ۲۰ کیلوهرتز، ۲۵۰ وات) منتقل شد. هر ۵ دقیقه یکبار نمونه برداری شد و تست DPPH روی نمونه‌ها اعمال شد.

۱۰-۲- فعالیت ضد سرطانی

با توجه به روش جو^۲ و همکاران، این آزمون انجام شد (۲۵). برای کشت سلولی، رده های سلولی HT۲۹ و HEK ۲۹۳ از انستیتو پاستور ایران به دست آمد و در محیط کشت دی ام ای ام^۳ با گلوکز بالا غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو، زیر ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند (انکوباتور ۵۳ لیتری، Shimaz، ایران). به منظور بررسی اثر سمیت عصاره‌ها بر رده‌های سلولی، از روش رنگ سنجی^۴ (۵،۴-دی میتیل تiazول-۲-یل)-۲-۵، دی فیل تترازولیم برومید^۴ استفاده شد. عصاره ها به روش

^۱ Inductively coupled plasma (ICP)

^۲ Ju

^۳ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

^۴ MTT

خشک کردن انجمادی خشک شدند و غلظت‌های مختلف ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس رده‌های سلولی سرطان و رده‌های سلولی طبیعی با غلظت‌های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت تحت درمان قرار گرفتند. پس از این مدت، محتویات پلیت ۹۶ خانه به دقت حذف شد و رنگ MTT به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در دی اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن، رنگ MTT از صفحه خارج شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده توسط سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل شد. در نهایت جذب نوری رنگ حاصل توسط دستگاه ثبت‌کننده الیزا (Hiperion, Germany) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و میزان بقای سلول‌ها از طریق معادله (۳) محاسبه شد. این آزمایش برای هر غلظت ۳ بار تکرار شد و دوز IC_{۵۰} نیز محاسبه شد.

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{A_t - A_b}{A_c - A_b} \times 100 \quad (3)$$

که در آن، A_t، A_b و A_c به ترتیب نشان‌دهنده مقدار جذب ترکیب آزمایش، مقدار جذب ماده بلانک و مقدار جذب کنترل هستند (۳۵).

۲-۱۱- تجزیه و تحلیل آماری

هر آزمایش با سه تکرار انجام شد. میانگین مقدار \pm انحراف استاندارد^۱ برای بیان همه نتایج اعمال شد. مقایسه بین داده‌های حاصل از آزمایشات مختلف با نرم‌افزار IBM SPSS Statistics ۲۵ اجرا شد. تفاوت معنی‌دار یا غیرمعنی‌دار در مقدار میانگین پارامترها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از دانکن تعقیبی در $P < 0.05$ ارزیابی شد.

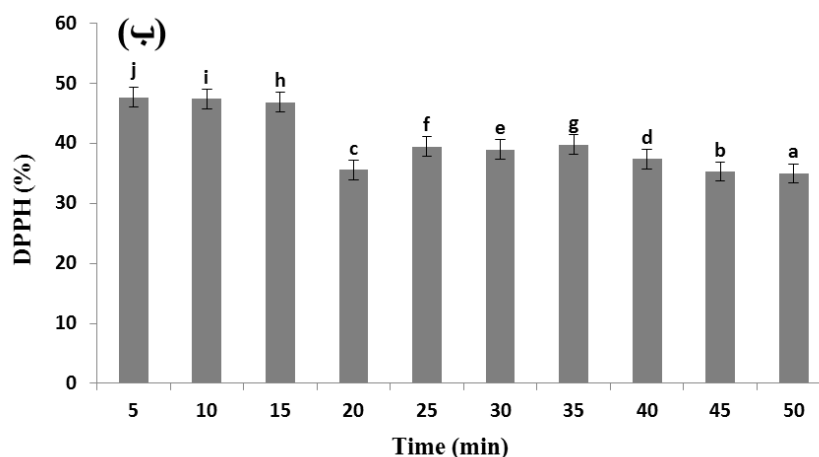
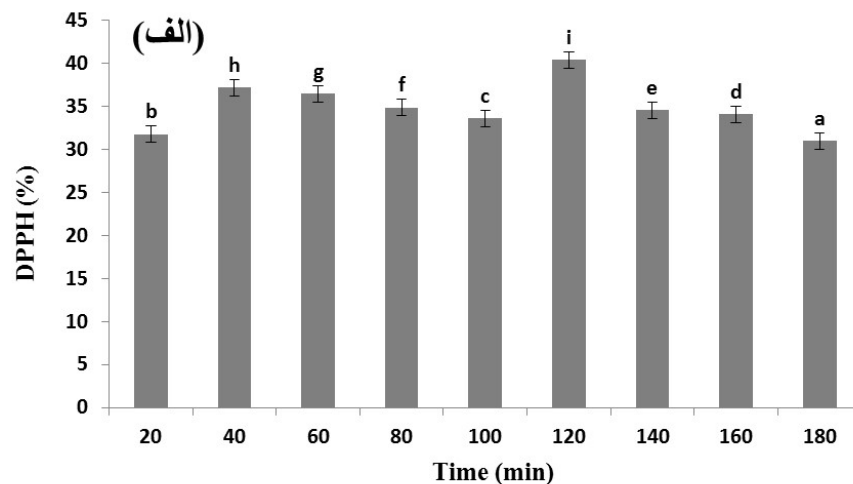
۳- نتایج و بحث

۳-۱- بهینه‌سازی زمان‌های استخراج به روش بن ماری و فراصوت

بهترین دما برای فعالیت آنزیم‌های دانه از جمله پروتئاز، آمیلاز و لیپاز ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد است (۵۱). منحنی مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان‌های مختلف (۱۸۰-۲۰ دقیقه) رسم شد و بالاترین مقدار DPPH مربوط به ۱۲۰ دقیقه بود (شکل ۱الف).

^۱ Standard deviation (SD)

در روش فراصوت، منحنی مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان‌های مختلف (۵-۵۰ دقیقه) ترسیم شد و بیشترین مقدار در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه مشاهده شد (شکل ۱ ب).

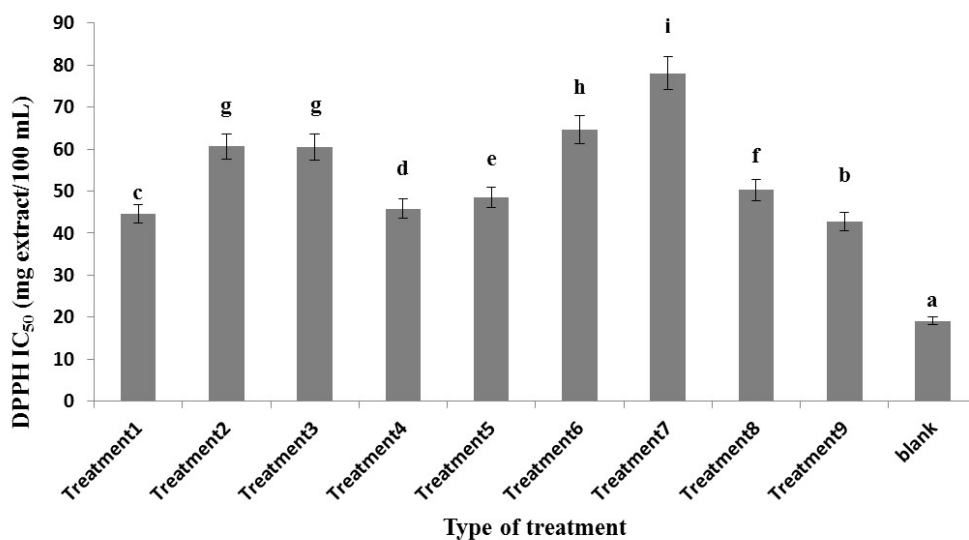


شکل ۱- تاثیر زمان‌های مختلف (الف) بن ماری و (ب) اولتراسونیک بر درصد ظرفیت آنتی اکسیدانی

۲-۳- آنالیز آنتی اکسیدانی

برای بیان اثرات مهار رادیکال آزاد در DPPH از شاخص IC_{50} استفاده شد. IC_{50} معادل غلظت عصاره است که میزان رادیکال‌های آزاد DPPH را به نصف کاهش می‌دهد (۳۱). بنابراین مقدار کمتر آن نشان دهنده فعالیت بیشتر عصاره است. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، کمترین مقدار مربوط به شاهد (۱۱/۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و سپس نمونه ۹ (۷۰/۴۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و

همچنین بالاترین IC_{50} مربوط به نمونه ۷ (۰۵/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر) بود. تفاوت قابل توجهی در تمام تیمارها به وضوح قابل مشاهده است. انسیسو-روکا^۱ و همکاران، مقادیر IC_{50} مربوط به بذر ۲۰ رقم کینوا را نشان دادند که کمترین و بیشترین مقدار به پاسانکالا^۲ و T-۳۸ با IC_{50} به ترتیب ۱۰/۱۹ و ۱۶/۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر اختصاص یافت (۱۰). در مطالعه دیگر، مقادیر DPPH دو نوع کینوا، از جمله نوع سطح دریای ژاپن (JQ) و نوع آلتیپلانو^۳ بولیوی توسط انسیمبا^۴ و همکاران گزارش شد که به ترتیب ۱/۷۲ و ۲/۵۹ درصد بود (۵۳). DPPH عصاره کینوا سیاه، سفید و قرمز توسط تانگ^۵ و همکاران مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که درجه رنگ پوسته دانه بر فعالیت آنتی اکسیدانی تأثیر می‌گذارد. بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به کینوا سیاه (۵/۶ میکرومول TE/g) و به دنبال آن کینوا قرمز و سفید بود (۴۹). عوامل ژنتیکی، زراعی و محیطی می‌توانند در تغییر فعالیت آنتی اکسیدانی موثر باشند (۱۵). علاوه بر این، روش‌های مختلف استخراج ممکن است تا حدی این تفاوت‌ها را از نتایج ما توضیح دهد.



شکل ۲- فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره مالت کینوا در رادیکال آزاد DPPH (مقادیر میانگین با حروف مختلف تفاوت معنی داری

دارد ($p < 0.05$)

^۱ Enciso-Roca
^۲ Pasankalla
^۳ Altiplano
^۴ Nsimba
^۵ Tang

۳-۳- آنالیز TPC و TFC

محتوای فنل کل و محتوای فلاونوئید کل عصاره مالت کینوا با شرایط استخراج مختلف در جدول ۲ آورده شده است. طبق جدول ۲، بیشترین مقدار TPC به تیمار ۶ (۴۹/۲۷۹۳ میلی گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم) با مخلوط اتانول: آب (۲۵:۷۵ درصد) به عنوان حلال و زمان اولتراسونیک ۲۵ دقیقه اختصاص دارد. از سوی دیگر، نمونه شاهد (۳۵/۵۳۴ میلی گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم) کمترین مقدار TPC را نشان می دهد. دیاز-والنسیا^۱ و همکاران، سه نمونه کینوا را با کد BNP، RPP و WSaP که از موسسه تحقیقات کشاورزی پرو به دست آمده بود، مورد ارزیابی قرار دادند و TPC به ترتیب ۱/۶۱، ۹/۹۵ و ۶/۵۹ میلی گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم بود که کمتر از مقادیر یافت شده در این مطالعه بود (۲۶). مطالعه دیگر نشان می دهد که بذر کینوا کشت شده در کره حاوی ۵۰/۱۴ میلی گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم TPC است (۲۴). هور^۲ و همکاران گزارش کردند که TPC از ۴۱ میلی گرم گالیک اسید بر کیلوگرم به ۸۰ میلی گرم گالیک اسید بر کیلوگرم عصاره کینوا پس از ۵ بار تخمیر افزایش یافت (۲۳).

همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، تیمار ۹ دارای حداکثر TFC (۲۲/۳ میلی گرم کوئرستین بر ۱۰۰ گرم) و سپس تیمار ۷ (۸۹/۲ میلی گرم کوئرستین بر ۱۰۰ گرم) است. تأثیر فرآیندهای حرارتی مختلف بر TFC کینوا توسط شارما^۳ و همکاران مورد بررسی قرار گرفت (۴۶). بالاترین TFC مربوط به فرآیند مایکروویو (۷۸/۱۶ میلی گرم کوئرستین بر ۱۰۰ گرم) با زمان ۵/۳ دقیقه بود. در مطالعه دیگری، افزایش دما (از ۱۰۰ به ۱۹۰) منجر به افزایش TFC (از ۸۲/۱۷ به ۹۷/۴۸ میلی گرم کوئرستین بر ۱۰۰ گرم) در مالت سبز کینوا شد (۶). محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها می تواند از گونه ای به گونه دیگر بر اساس عوامل محیطی مختلف مانند دما، بارندگی و ترکیب خاک تغییر کند (۹). حلال های مختلف عصاره احتمالاً می تواند دلیل دیگری باشد، آب و متانول نشان دهنده TFC و TPC قابل توجهی در مقایسه با سایر حلال های مورد استفاده (هگزان، استون، اتانول و اتیل استات) برای استخراج بودند (۲۴).

^۱ Diaz-Valencia

^۲ Hur

^۳ Sharma

جدول ۲- نتایج تجزیه و تحلیل محتوای فنل کل و محتوای فلاونوئید کل مربوط به عصاره مالت کینوا با شرایط مختلف

تیمار	محتوای فنل کل (mg GAE/۱۰۰ g)	محتوای فلاونوئید کل (mg QE/۱۰۰ g)
۱	۸۰/۱۷۴۰±۹/۲۱ ^b	۱۲/۲±۰.۸/۰ ^c
۲	۲۰/۲۶۵۹±۷/۴۴ ^f	۱۴/۰±۰.۳/۰ ^a
۳	۹۰/۲۳۶۸±۰.۹/۱۰ ^d	۹۳/۱±۰.۶/۰ ^d
۴	۱۹/۲۴۳۸±۷۰/۱۲ ^{de}	۲۰/۱±۰.۸/۰ ^c
۵	۷۵/۲۳۰۵±۸۴/۱۳ ^d	۱۷/۱±۰.۵/۰ ^c
۶	۴۹/۲۷۹۳±۵۹/۱۰ ^f	۴۸/۰±۰.۵/۰ ^b
۷	۲۹/۲۶۰.۳±۲۱/۱۱ ^{ef}	۸۹/۲±۰.۳/۰ ^g
۸	۹۳/۱۷۴۳±۲۳/۱۲ ^b	۵۳/۲±۰.۴/۰ ^f
۹	۰.۱/۲۰.۲۰±۴۵/۱۰ ^c	۲۲/۳±۱۱/۰ ^h
شاهد	۳۵/۵۳۴±۸/۰ ^a	۱۲/۰±۰.۳/۰ ^a

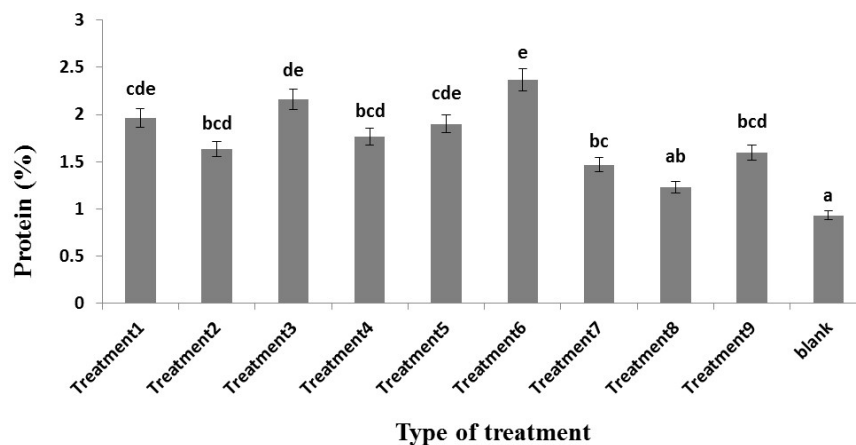
مقادیر نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار است. مقادیر میانگین با حروف مختلف تفاوت معنی داری دارند ($p < 0.05$)

۴-۳- آنالیز محتوای پروتئین

شکل ۳ محتوای پروتئین کینوا مالت شده را در شرایط مختلف (دمای ثابت بن ماری ۴۵-۴۰ درجه سانتی گراد، زمان ثابت بن ماری ۱۲۰ دقیقه، دمای ثابت استخراج ۲۵ درجه سانتی گراد (نمونه شاهد ۹۰ درجه سانتی گراد)، زمان های مختلف فراصوت ۱۵-۵ دقیقه و نسبت های مختلف حلال آب و اتانول) نشان می دهد. نتایج نشان می دهد که کل پروتئین تیمار ۶ (۲/۳۷ درصد) و سپس تیمار ۳ (۲/۱۶ درصد) بیشتر از بقیه است. بالا بودن محتوای پروتئین تیمار ۶ می تواند به دلیل برهمکنش پروتئین-پلی ساکارید موجود در کینوا در زمان فراصوت بالاتر (۱۵ دقیقه) باشد. در دماهای بالاتر از ۱۲۰ درجه سانتی گراد تجمع شروع می شود و باعث واکنش هیدرولیز می شود که می تواند بر محتوای پروتئین تاثیر منفی بگذارد. پروتئین خام دانه های کینوا متنوع است. این ممکن است به دلیل مکان ها و روش های آنالیز مختلف و همچنین شرایط مختلف مانند انواع خاک، ترکیب مواد معدنی، کاربرد کود و زمان نمونه برداری باشد که در آن مطالعات انجام شده است (۳۶). سانچز-گارسیا و همکاران (۴۲)، نشان دادند که کینوا سفید (خام) و کینوا سیاه (خام) به ترتیب ۸/۶۰ و ۱۰/۱۸ درصد پروتئین دارند. منگوتی^۱ و همکاران (۲)، گزارش کردند که درصد پروتئین دانه های کینوا و کینوا هیدرولیز شده به ترتیب ۱۶ و ۸/۸ درصد است. الحکیم و همکاران، کل پروتئین های ذخیره بذر را در گونه های مصری وحشی، آمریکایی و رنگین

^۱ Meneguetti

کمان به ترتیب ۱۷/۱۶، ۱۸/۳۹ و ۱۶/۲۷ درصد به دست آوردند (۱). در این مطالعه، پس از مالت‌سازی، پروتئین با منبع طبیعی ممکن است به پروتئین‌ها یا پپتیدهای با وزن مولکولی کم هیدرولیز شود و افزایش فعالیت آنزیم رخ می‌دهد که منجر به کاهش محتوای پروتئین می‌شود (۲۸).



شکل ۳- محتوای پروتئین ۱۰ تیمار (حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی دار در مجموعه داده‌ها ($p < 0.05$))

۳-۵- تجزیه و تحلیل ویتامین B۶ و B۹

یک نوع ماده آلی ویتامینی است موجود در غذاها که برای حفظ عملکردهای فیزیولوژیکی طبیعی انسان ضروری است. نقش ویتامین‌ها در رشد، متابولیسم و تکامل انسان است (۱۴). میزان ویتامین B۶ و B۹ بدست آمده در عصاره مالت کینوا در شرایط مختلف در جدول ۳ آورده شده است. حداکثر مقدار ویتامین B۶ مربوط به نمونه شاهد (۷۶/۲ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) و سپس تیمار ۳ (۶۸/۲ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) است. علاوه بر این، تیمار ۷ با محتوای ویتامین B۹ برابر ۵۹/۲ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم نشان دهنده ارزش بالاتری نسبت به نمونه‌های دیگر است. ۳۰ رقم بذر کینوا توسط چن و همکاران مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محتوای ویتامین B۶ آنها در محدوده ۱۰۲/۰ تا ۹۴۷/۰ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم بود (۱۴). مطالعه دیگر نشان داد که میزان ویتامین B۹ موجود در دانه‌های کینوا کشت شده در ایران ۰/۰۹۷ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم است (۴۴). هالوین^۱ و همکاران گزارش کردند که محتوای ویتامین B۶ در دانه‌های

^۱ Hälvín

کینوا ۲۵/۰ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم است (۱۷). برخی از عوامل مانند منشاء نمونه و تکنیک‌های مختلف آنالیز می‌توانند بر محتوای به‌دست آمده ویتامین‌ها تأثیر بگذارند (۱۷).

جدول ۳- نتایج تجزیه و تحلیل محتوای ویتامین‌های B۶ و B۹ مربوط به عصاره مالت کینوا با شرایط مختلف

تیمار	B۶ (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم)	B۹ (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم)
۱	۸/۰±۰.۸/۰ ^a	۴۲/۲±۰.۳/۰ ^{bcd}
۲	۹۶/۰±۰.۹/۰ ^{ab}	۳۵/۲±۰.۴/۰ ^a
۳	۶۸/۲±۰.۷/۰ ^g	۳۷/۲±۰.۴/۰ ^{ab}
۴	۴۹/۲±۱.۲/۰ ^f	۳۸/۲±۰.۴/۰ ^{abc}
۵	۹۶/۱±۱.۲/۰ ^e	۳۶/۲±۰.۲/۰ ^{ab}
۶	۷۸/۱±۱.۳/۰ ^{de}	۴۴/۲±۰.۵/۰ ^{cd}
۷	۶۳/۱±۱.۲/۰ ^{cd}	۵۹/۲±۰.۲/۰ ^e
۸	۰۵/۱±۰.۹/۰ ^b	۴۵/۲±۰.۴/۰ ^{cd}
۹	۴۸/۱±۰.۷/۰ ^c	۴۹/۲±۰.۵/۰ ^d
شاهد	۷۶/۲±۱.۶/۰ ^g	۳۴/۲±۰.۲/۰ ^a

مقادیر نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار است. مقادیر میانگین با حروف مختلف تفاوت معنی داری دارند ($p < 0.05$)

۳-۶- آنالیز محتوای معدنی

مواد معدنی نقش مهمی در حفظ و ارتقای سلامت روحی و جسمی انسان دارند. آنها همچنین برای رشد و نگهداری سلول‌های عصبی، بافت‌های بدن، ماهیچه‌های خونی، استخوان‌ها و دندان‌ها مفید هستند. جدول ۴ محتوای مواد معدنی (کلسیم، منیزیم، فسفر، آهن) را در عصاره مالت کینوا نشان می‌دهد. حداکثر مقدار کلسیم به شاهد (۴۶/۴۹ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) و سپس تیمار ۹ (۴۱/۲۷ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) اختصاص یافت. نمونه شاهد (۸۹/۷۴ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) و تیمار ۲ (۶۵/۵۵ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) دارای بالاترین مقادیر منیزیم بودند. محتوای فسفر در شاهد (۷۵/۱۱۵ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) و پس از آن تیمار ۴ (۳۳/۹۹ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) بیشتر از بقیه بود. بیشترین مقدار آهن مربوط به شاهد (۵/۴۹ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) و سپس تیمار ۱ (۳/۴۹ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) بود. بایندر^۱ و همکاران اثر زمان جوانه زنی را بر محتوای معدنی آرد کینوا مالت دار بررسی کردند (۸). کلسیم، منیزیم و آهن آرد کینوا سفید مالت دار با جوانه زنی ۲۴ ساعته به ترتیب ۶۵/۸۳، ۵۶/۱۱۱ و ۹۸/۱۲ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم بود. علاوه بر این، آرد کینوا سیاه مالت دار به

^۱ Bhinder

ترتیب حاوی ۰۸/۶۲، ۷۲/۲۲۰ و ۱۰/۹۹ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم کلسیم، منیزیم و آهن است. دانه‌های کینوا بالغ بدون گل پوش توسط کونیشی^۱ و همکارانش آنالیز شدند. نتایج نشان داد که دانه‌های پوست کنده شامل کلسیم، فسفر، پتاسیم، منیزیم، آهن و روی به ترتیب با مقادیر ۵۵/۱، ۴۰۴/۹، ۶۵۶، ۴۶۷/۹، ۱۴/۲ و ۴ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم بودند (۲۷). تفاوت میزان مواد معدنی در مطالعه حاضر با سایر مطالعات را می‌توان به شسته شدن برخی از مواد معدنی در حین خیساندن بذرها نسبت داد. همچنین، مواد معدنی می‌توانند در کاتالیز آنزیمی کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها شرکت کنند که منجر به انتقال آن‌ها به ریشه می‌شود و در طی فرآیند تخلیه از بین می‌رود (۸).

جدول ۴- نتایج آنالیز محتوای مواد معدنی مربوط به عصاره مالت کینوا با شرایط مختلف

تیمار	کلسیم (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم)	منیزیم (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم)	فسفر (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم)	آهن (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم)
۱	۵۱/۲۶±۱۱/۳ ^{dfg}	۱۲/۴۹±۳۵/۲ ^d	۴۲/۹۵±۵۳/۱۱ ^{cd}	۴۹/۳±۳۹/۰ ^d
۲	۵۱/۲۱±۷۶/۲ ^{bcd}	۶۵/۵۵±۶۵/۲ ^e	۹۴/۹۵±۳۸/۱۲ ^{cd}	۱۳/۲±۲۴/۰ ^{bc}
۳	۶۲/۲۳±۲۱/۳ ^{cdf}	۵۴/۳۶±۲۲/۲ ^c	۶۶/۵۴±۸۲/۱۱ ^b	۶۵/۱±۲۲/۰ ^b
۴	۹۶/۳۱±۰۷/۳ ^f	۵۳/۵۵±۲۴/۳ ^c	۳۳/۹۹±۵۸/۷ ^{cd}	۶۷/۰±۲۹/۰ ^a
۵	۵۸/۱۵±۷۴/۳ ^a	۵۹/۴۰±۱۱/۲ ^c	۰۱/۶۱±۲۸/۱۲ ^b	۸۶/۰±۲۹/۰ ^a
۶	۸۴/۲۱±۹۹/۲ ^{bcd}	۷۴/۲۳±۰۴/۳ ^b	۰۱/۵۲±۸۱/۱۲ ^b	۹۹/۰±۲۹/۰ ^a
۷	۵۷/۱۹±۷۱/۱ ^{abc}	۷۴/۱۸±۰۱/۲ ^a	۰۹/۲۴±۲۸/۱۰ ^a	۸۰/۰±۳۸/۰ ^a
۸	۲۶/۱۷±۰۸/۴ ^{ab}	۰۱/۱۶±۰۹/۲ ^a	۸۳/۲۷±۹۷/۵ ^a	۵۶/۰±۰۹/۰ ^a
۹	۴۱/۲۷±۹۱/۱ ^{ef}	۴۶/۱۵±۹۱/۲ ^d	۱۱/۹۳±۸۳/۱۲ ^c	۴۲/۲±۴۲/۰ ^c
شاهد	۴۶/۴۹±۹۵/۳ ^g	۸۹/۷۴±۲۵/۲ ^f	۷۵/۱۱۵±۸۳/۱۱ ^d	۴۹/۵±۳۶/۰ ^e

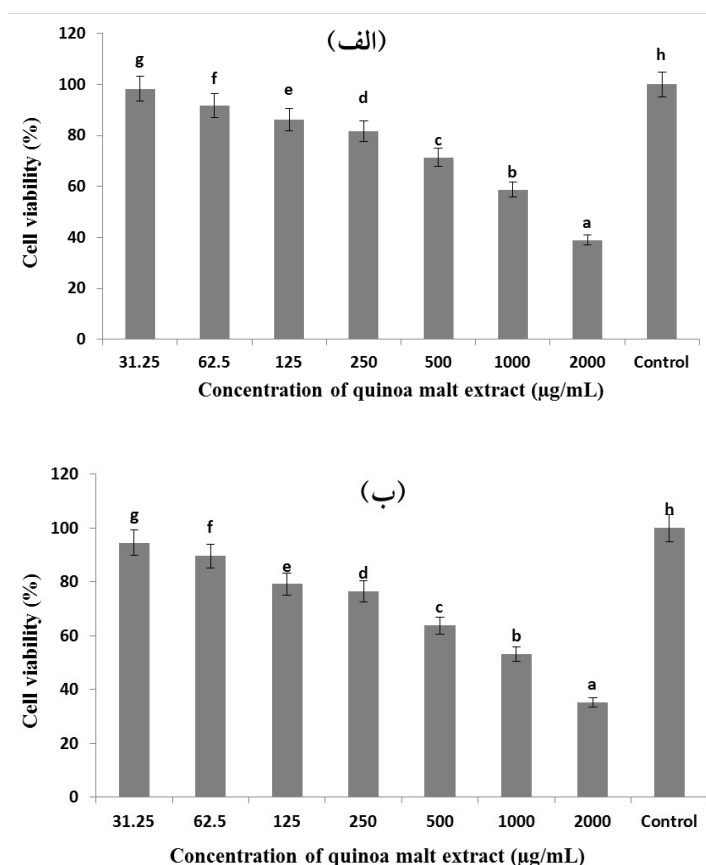
مقادیر نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار است. مقادیر میانگین با حروف مختلف تفاوت معنی داری دارند ($p < 0.05$)

۷-۳- آنالیز حیات سلول‌ها

زنده ماندن نسبی سلول در برابر غلظت‌های مختلف عصاره مالت کینوا (۲۰۰۰-۲۵/۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای بررسی اثر ضد سرطانی نمونه ۶ و شاهد ترسیم شد (شکل ۴). حداکثر درصد زنده ماندن سلولی به غلظت ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای نمونه شاهد (۹۸/۳۱ درصد) و تیمار ۶ (۹۴/۴۲ درصد) که IC_{۵۰} به ترتیب ۱۴۴۷ و ۱۰۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، نسبت داده شد. علاوه بر این، اثر عصاره مالت با غلظت‌های مختلف بر سلول‌های سلامت (رده سلولی HEK ۲۹۳) مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۵).

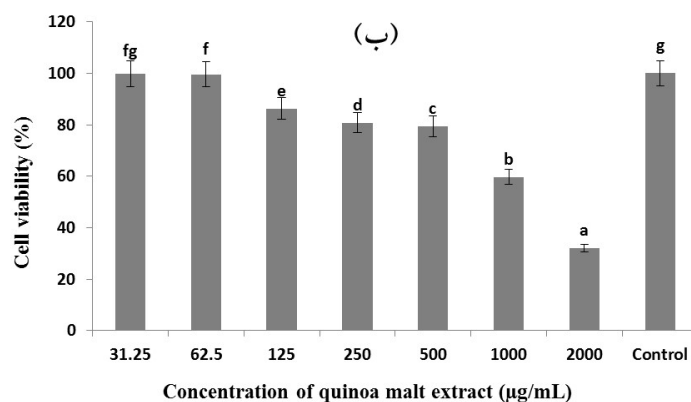
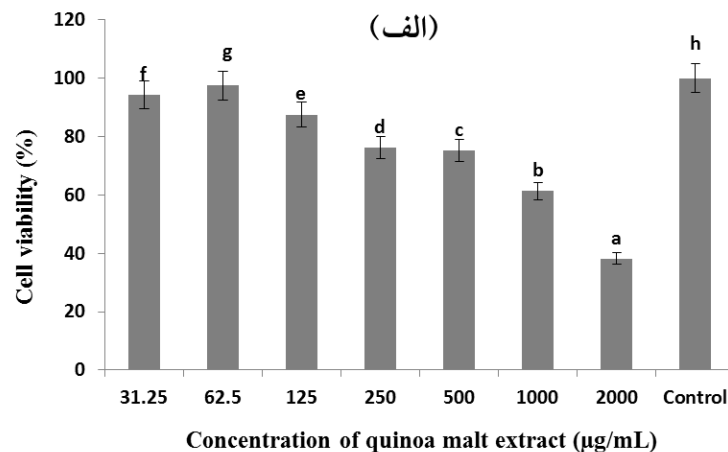
^۱Konishi

همانطور که نشان داده شد، غلظت‌های ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر با زنده‌مانی سلولی ۹۷/۴۳ درصد و ۹۹/۷۹ درصد به ترتیب نتایج قابل قبولی برای نمونه شاهد و تیمار ۶ داشتند. فعالیت ضد سرطانی سه نوع روغن دانه کینوا توسط شن^۱ و همکاران مورد مطالعه قرار گرفت. سمیت سلولی (IC_{۵۰}) سفید، قرمز و سیاه به ترتیب ۴/۶۷۴، ۳/۳۸۱ و ۹/۲۸۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۴۷). فعالیت سیتوتوکسیک عصاره بذرهاى مربوط به گونه‌های پونو^۲ و تی تی کاکا^۳ توسط استیکیک^۴ و همکاران مورد ارزیابی قرار گرفت (۴۸). نتایج نشان داد که زنده ماندن سلولی در غلظت‌های کمتر عصاره (۶/۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ۲۴ ساعت برای هر دو نوع کینوا بیشتر بود (حدود ۹۰ درصد).



شکل ۴- نمودارهای زنده ماندن سلولی (الف) نمونه شاهد و (ب) تیمار ۶ مربوط به رده سلولی HT_{۲۹}

^۱Shen
^۲Puno
^۳Titicaca
^۴Stikić



شکل ۵- نمودارهای زنده ماندن سلولی (الف) نمونه شاهد و (ب) تیمار ۶ مربوط به رده سلولی HEK ۲۹۳

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق عصاره مالت دانه کینوا در شرایط مختلف از نظر زمان، دما و نسبت حلال (آب و اتانول) استخراج شد. استخراج در زمان‌های مختلف برای روش‌های فراصوت و بن ماری انجام شد و پارامتر بهینه بر اساس بالاترین مقادیر DPPH به دست آمد. نتایج نشان داد که زمان بن ماری (۱۲۰ دقیقه) برای استخراج مالت بیشتر از زمان روش فراصوت (۵ دقیقه) است. ظرفیت آنتی اکسیدانی، محتوای فنلی و فلاونوئیدی، محتوای پروتئین کل، مقادیر ویتامین و مقادیر مختلف مواد معدنی عصاره مالت کینوا تحت شرایط مختلف ارزیابی شد. نتایج حاکی از ارزش غذایی بالا و سایر خواص موثر مانند فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره مالت بود. بررسی فعالیت ضد سرطانی عصاره مالت کینوا بر روی سلول‌های سرطانی کلون (HT۲۹) نشان داد که درصد زنده ماندن سلولی با سایر مطالعات انجام

شده بر روی سایر گونه‌های کینوا قابل مقایسه است. بنابراین، فرآیند مالت‌سازی در کینوا می‌تواند غذاها و نوشیدنی‌های بدون گلوتن تولید کند که منبع خوبی از مواد مغذی برای افراد مبتلا به بیماری سلیاک هستند. در واقع می‌توان تایید کرد که عصاره مالت کینوا یک محصول کارآمد و مفید برای تغذیه و سلامت انسان است.

- [١] Abd El-Hakim AF, Mady E, Abou Tahoun AM, Ghaly MSA, Eissa MA. Seed Quality and Protein Classification of Some Quinoa Varieties. *Journal of Ecological Engineering*. ٢٠٢٢; ٢٣: ٢٤-٣٣. <http://dx.doi.org/١٠.١٢٩١١/٢٢٩٩٨٩٩٣/١٤٣٨٦٦>.
- [٢] Adriana Meneguetti Q, Adriana Brenzan M, Regina Batista M, Barbosa Bazotte R, Rodrigues Silva D, Aparicio Garcia Cortez D. Biological Effects of Hydrolyzed Quinoa Extract from Seeds of *Chenopodium quinoa* Willd. *Journal of Medicinal Food*. ٢٠١١; ١٤: ٦٥٣-٦٥٧. <https://doi.org/١٠.١٠٨٩/jmf.٢٠١٠.٠٠٩٦>.
- [٣] Aguilar J, Claudio Miano A, Obregon J, Soriano-Colchado J, Barraza-Jauregui G. Malting process as an alternative to obtain high nutritional quality quinoa flour. *Journal of Cereal Science*. ٢٠١٩; ٩٠: ١٠٢٨٥٨. <https://doi.org/١٠.١٠١٦/j.jcs.٢٠١٩.١٠٢٨٥٨>.
- [٤] Alaburda J, de Almeida AP, Shundo L, Ruvieri V, Sabino M. Determination of folic acid in fortified wheat flours. *Journal of Food Composition and Analysis*. ٢٠٠٨; ٢١: ٣٣٦-٣٤٢. <https://doi.org/١٠.١٠١٦/j.jfca.٢٠٠٧.١٢.٠٠٢>.
- [٥] Almaguer C, Kollmannsberger H, Gastl M, Becker T. Characterization of the aroma profile of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and assessment of the impact of malting on the odor-active volatile composition. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. ٢٠٢٣; ١٠٣: ٢٢٨٣-٢٢٩٤. <https://doi.org/١٠.١٠٠٢/jsfa.١٢٤١٨>.
- [٦] Ariel Carciochi R, Dimitrov K, Galvan D'Alessandro L. Effect of malting conditions on phenolic content, Maillard reaction products formation, and antioxidant activity of quinoa seeds. *Journal of Food Science and Technology*. ٢٠١٦; ٥٣: ٣٩٧٨-٣٩٨٥. <https://doi.org/١٠.١٠٠٧/s١٣١٩٧-٠١٦-٢٣٩٣-٧>.

- [V] Ariel Carciochi R, Galván-D'Alessandro L, Vandendriessche P, Chollet S. Effect of Germination and Fermentation Process on the Antioxidant Compounds of Quinoa Seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2016; 71: 361–367. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0567-0>.
- [A] Bhinder S, Kumari S, Singh B, Kaur A, Singh N. Impact of germination on phenolic composition, antioxidant properties, antinutritional factors, mineral content and Maillard reaction products of malted quinoa flour. *Food Chemistry*. 2021; 346: 128915. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128915>.
- [9] Borges LL, Alves SF, Sampaio BL, Conceição EC, Teresa F, Bara M, Paula JR. Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in *Myrcia tomentosa* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2013; 23: 230–238. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X201300500019>.
- [10] Carlos Enciso-Roca E, Javier Aguilar-Felices E, Aldo Tinco-Jayo J, Luis Arroyo-Acevedo J, Herrera-Calderon O. Biomolecules with Antioxidant Capacity from the Seeds and Sprouts of 20 Varieties of *Chenopodium quinoa* Willd. (Quinoa). *Plants*. 2021; 10: 2417. <https://doi.org/10.3390/plants10112417>.
- [11] Carreira-Casais A, Otero P, Garcia-Oliveira P, Pereira AG, Carpena M, Soria-Lopez A, Simal-Gandara J, Prieto MA. Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. *International Journal of Environmental Research and public Health*. 2021; 18: 9153. <https://doi.org/10.3390/ijerph18119153>.
- [12] Ceyhun Sezgin A, Sanlier N. A New Generation Plant For The Conventional Cuisine: Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.). *Trends in Food Science & Technology*. 2019; 86: 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.039>.
- [13] Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002; 10: 178–182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>.

- [14] Chen X, Zhang Y, Cao B, Wei X, Shen Z, Su N. Assessment and comparison of nutritional qualities of thirty quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seed varieties. *Food Chemistry: X*. 2023; 19: 100808. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100808>.
- [15] Choque-Quispe D, Ligarda-Samanez CA, Ramos-Pacheco BS, Leguía-Damiano S, Calla-Florez M, Magaly Zamalloa-Puma L, Colque-Condeña L. Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Protein Content of Three Varieties of Germinated Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Ingeniería e Investigación*. 2021; 41: e89831. <http://dx.doi.org/10.15446/ing.investig.v41n2.89831>.
- [16] Contreras-Jiménez B, Del Real A, Millan-Malo BM, Gaytán-Martínez M, Morales-Sánchez E, Rodríguez-García ME. Physicochemical changes in barley starch during malting. *Journal of the Institute of Brewing*. 2019; 125: 10–17. <https://doi.org/10.1002/jib.547>.
- [17] Hälvin K, Nisamedtinov I, Paalme T. Comparison of different extraction methods to determine free and bound forms of B-group vitamins in quinoa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014; 406: 3355–3366. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8122-z>.
- [18] Han Y, Chi J, Zhang M, Zhang Fan RS, Dong L, Huang F, Liu L. Changes in saponins, phenolics and antioxidant activity of quinoa (*Chenopodium quinoa willd*) during milling process. *LWT*. 2019; 114: 108381. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108381>.
- [19] He X, Wang B, Zhao B, Yang F. Ultrasonic Assisted Extraction of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Protein and Effect of Heat Treatment on Its In Vitro Digestion Characteristics. *Foods*, 2022; 11, 2771. <https://doi.org/10.3390/foods11052771>.
- [20] Herrero M, Cifuentes A, Ibanez E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae A review. *Food Chemistry*. 2006; 98: 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>.

- [21] Hirose Y, Fujita T, Ishii T, Ueno N. Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan. *Food Chemistry*. 2010; 119: 1300–1306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.008>.
- [22] Hu Y, Zhang J, Zou L, Fu C, Li P, Zhao G. Chemical characterization, antioxidant, immune-regulating and anticancer activities of a novel bioactive polysaccharide from *Chenopodium quinoa* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 99: 622–629. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.019>.
- [23] Hur J, Thanh Hanh Nguyen T, Park N, Kim J, Kim D. Characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) fermented by *Rhizopus oligosporus* and its bioactive properties. *AMB Express*. 2018; 8: 143. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0675-3>.
- [24] Hwa Park J, Jin Lee Y, Ho Kim Y, Sun Yoon K. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds Cultivated in Korea. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2017; 22: 195–202. <https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.3.195>.
- [25] Ju X, Wu X, Chen Y, Cui S, Cai Z, Zhao L, Hao Y, Zhou F, Chen F, Yu Z, Yang D. Mucin Binding Protein of *Lactobacillus casei* Inhibits HT-29 Colorectal Cancer Cell Proliferation. *Nutrients*. 2023; 15: 2314. <https://doi.org/10.3390/2Fnu1510.2314>.
- [26] Karen Diaz-Valencia Y, José Alca J, Antonia Calori-Domingues M, Jackeline Zanabria-Galvez S, Helena Da Cruz S. Nutritional composition, total phenolic compounds and antioxidant activity of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) of different colours. *Nova Biotechnol Chim*. 2018; 17: 74–85. <http://dx.doi.org/10.2478/nbec-2018-0008>.

- [27] Konishi Y, Hirano S, Tsuboi H, Wada M. Distribution of Minerals in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2004; 68: 231–234. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.231>.
- [28] Kumar M, Singh A, Bharti A, Sharma M. Effect of Malt ing Process on Nutritional and Physical Characteristics of Quinoa. *Astha Foundation, Meerut (U.P.) India*. 2021; 9: 2894–2899.
- [29] Lopez-Moreno M, Sabater-Munoz B, Teresa Iglesias-Lopez M, Miguel-Castro M, Garces-Rimon M. Red Quinoa hydrolysates with antioxidant bioactive properties on oxidative stress-induced *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT-Food Science and Technology*. 2023; 184: 115038. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115038>.
- [30] Mehta N, Jeyapriya S, Kumar P, Verma AK, Umaraw P, Kumar Khatkar S, Boora Khatkar A, Pathak D, Kaka U, Qurni Sazili A. Ultrasound-Assisted Extraction and the Encapsulation of Bioactive Components for Food Applications. *Foods*. 2022; 11: 2973. <https://doi.org/10.3390/foods11192973>.
- [31] Moga DK, Adipo N, Matu EN, Ng'ang'a J, Kirira PJ. Antioxidant and Antiproliferative Activity of *Azadirachta indica* A. Juss Extracts against Cancer Cell Lines: An experimental study. *African Journal of Health Sciences*. 2021; 34: 650–656.
- [32] Mu H, Xue S, Sun Q, Shi J, Zhang D, Wang D, Wei J. Research Progress of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Wild.): Nutritional Components, Technological Treatment, and Application. *Foods*. 2023; 12: 2087. <https://doi.org/10.3390/foods12102087>.
- [33] Mufari JR, Rodríguez-Ruiz AC, Bergesse AE, Miranda-Villa PP, Nepote V, Velez AR. Bioactive compounds extraction from malted quinoa using water-ethanol mixtures under subcritical conditions. *LWT - Food Science and Technology*. 2021; 138: 110574. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110574>.

- [۳۴] Navruz Varli S, Şanlıer N. Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Cereal Science*. ۲۰۱۶; ۶۹: ۳۷۱–۳۷۶. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.05.004>.
- [۳۵] Patel S, Gheewala N, Suthar A, Shah A. In-Vitro cytotoxicity activity of *Solanum Nigrum* extract against Hela cell line and Vero cell line. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. ۲۰۰۹; ۱: ۳۸–۴۶.
- [۳۶] Pathan S, Siddiquim RA. Nutritional Composition and Bioactive Components in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Greens: A Review. *Nutrients*. ۲۰۲۲; ۱۴: ۵۵۸. <https://doi.org/10.3390/nu14030558>.
- [۳۷] Rodríguez-Meizoso I, Jaime L, Santoyo S, Senoráns FJ, Cifuentes A, Ibáñez E. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. ۲۰۱۰; ۵۱: ۴۵۶–۴۶۳. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.014>.
- [۳۸] Romano N, Micaela Ureta M, Guerrero-Sánchez M, Gómez-Zavaglia A. Nutritional and technological properties of a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) spray-dried powdered extract. *Food Research International*. ۲۰۲۰; ۱۲۹: ۱۰۸۸۸۴. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108884>.
- [۳۹] Romina Mufari J, Adrián Gorostegui H, Paola Miranda-Villa P, Estefanía Bergesse A, Calandri EL. Oxidative Stability and Characterization of Quinoa Oil Extracted from Wholemeal and Germ Flours. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. ۲۰۲۰; ۹۷: ۵۷–۶۶. <https://doi.org/10.1002/aocs.12308>.
- [۴۰] Ruales J, Nair BM. Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Food Chemistry*. ۱۹۹۳; ۴۸: ۱۳۱–۱۳۶. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90047-J](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90047-J).
- [۴۱] Sabah S, Sharifan A, Akhonzadeh Basti A, Jannat B, TajAbadi Ebrahimi M. Use of D-optimal combined design methodology to describe the effect of extraction parameters on the production of

quinoa–barley malt extract by superheated water extraction. *Food Science & Nutrition*. 2021; 9: 2147–2157.

<https://doi.org/10.1002/fsn3.2184>.

[42] Sanchez-García J, Munoz-Pina S, García-Hernández J, Heredia A, Andres A. Fermented quinoa flour: Implications of fungal solid-state bioprocessing and drying on nutritional and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*. 2023; 182: 114885. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114885>.

[43] Sayyari Z, Rabani M, Farahmandfar R, Esmailzadeh Kenari R, Mousavi Nadoshan R. The Effect of Nanocomposite Edible Coating Enriched with *Foeniculum vulgare* Essential Oil on the Shelf Life of *Oncorhynchus mykiss* Fish Fillets during the Storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2021; 30: 579–595. <https://doi.org/10.1080/10498850.2021.1901815>.

[44] Sekhavatizadeh SS, Hosseinzadeh S, Mohebbi G. Nutritional, antioxidant and polyphenol content of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) cultivated in Iran. *Future of Food: Journal on Food, Agriculture and Society*. 2021; 9: 1–12. <http://dx.doi.org/10.17170/kobra-2021-2163256>.

[45] Shalashvili A, Ugrekhelidze D, Mitaishvili T, Targamadze I, Zambakhidze N. Phenolic Compounds of Wines from Georgian Autochthonous Grapes, Rkatsiteli and Saperavi, Prepared by Georgian (Kakhetian) Technology. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*. 2012; 6: 99–103.

[46] Sharma S, Kataria A, Singh B, Effect of thermal processing on the bioactive compounds, antioxidative, antinutritional and functional characteristics of quinoa (*Chenopodium quinoa*). *LWT - Food Science and Technology*. 2022; 160: 113256. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113256>.

[47] Shen Y, Zheng L, Peng Y, Zhu X, Liu F, Yang X, Li H. Physicochemical, Antioxidant and Anticancer Characteristics of Seed Oil from Three *Chenopodium quinoa* Genotypes. *Molecules*. 2022; 27: 2453. <https://doi.org/10.3390/molecules27082453>.

[48] Stikić RI, Milinčić DD, Kostić AŽ, Jovanović ZB, Gašić UM, Lj Ž, Djordjević NZ, Savić SK, Czekus BG, Pešić MB. Polyphenolic profiles, antioxidant, and in vitro anticancer activities of the seeds

of Puno and Titicaca quinoa cultivars. *Cereal Chemistry*. 2020; 97: 626–633.
<https://doi.org/10.1002/cche.10278>.

[49] Tang Y, Li X, Chen PX, Zhang B, Hernandez M, Zhang H, Marcone MF, Liu R, Tsao R. Characterization of fatty acid, carotenoid, tocopherol/tocotrienol compositions and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. Genotypes. *Food Chemistry*. 2015; 174: 502–508.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.040>.

[50] Wanole PD, Pawar VS Dhadke SG. Effect of Malting on Nutritional and Anti-nutritional Properties of Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Biological Forum – An International Journal*. 2022; 14: 104–108.

[51] Whitehurst RJ, Oort MV. *Enzymes in Food Technology*, Wiley-Blackwell, Second edition, (2009), pp. 1–359.

[52] Wu G. *Nutritional Properties of Quinoa*, John Wiley & Sons, Inc. Chapter 11, (2015), pp. 193–210.
<https://doi.org/10.1002/9781118628041.ch11>.

[53] Yawadio Nsimba R, Kikuzaki H, Konishi Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. Seeds. *Food Chemistry*. 2008; 106: 760–766.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.004>.

[54] Yi Ng C, Wang M. The functional ingredients of quinoa (*Chenopodium quinoa*) and physiological effects of consuming quinoa: A review. *Food Frontiers*. 2021; 2: 329–356. <https://doi.org/10.1002/fft2.109>.

Determining the nutritional content and investigating the antioxidant and anticancer activity of malt extract extracted from quinoa seeds: a comparative study between ultrasound and bain-marie methods

Kazem Roshani¹, Mozghan Emtiazjoo^{1,*}, Mohammad Rabbani², Mohammad Javad Shakouri³, Sara Movahhed⁴

¹Department of Food Science and Technology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Marine Science and Technology, Faculty of Marine Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Department of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴Department of Food Science and Technology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁵Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Abstract

In this work, quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild) seed malt extract was obtained using a combination of ultrasonic and bain-marie methods. The ultrasonic time (0-20 min) and bain-marie time (20-180 min) were optimized based on the maximum percentage of antioxidant. The bain-marie temperature was considered between 40 to 80°C. The effect of various parameters, including the ratio of solvents (ethanol: 20 and 80%, water: 80, 70, and 100%), constant bain-marie temperature (40-80 °C), and extraction temperature (20 and 80 °C) with selected ultrasonic (0, 10, and 20 min) and bain-marie (120 min) times were considered on the properties of malt extract. The maximum DPPH value was assigned to the time of 0 min (47.7%) and 120 min (40.4%) for ultrasonic and bain-marie methods, respectively. Quinoa malt extract revealed good antioxidant activity with a lower amount of IC₅₀, equal to 19.11 mg/mL. The total phenol content (TPC) and total flavonoid content (TFC) were ranged from 0.34 to 2.93 mg GAE/100 g and 0.12 to 3.22 mg QE/100g, respectively. The high protein content (2.37%) was obtained with ethanol: water (20%:80%), ultrasonic time of 10 min, bain-marie time of 120 min, bain-marie temperature of 40-80°C, and extraction temperature of 20°C. Vitamin B₆ (pyridoxine) and vitamin B₉ (folic acid) content were in the range of 0.8 to 2.76 mg/100 g and 2.34 to 2.09 mg/100 g, respectively. The highest content of minerals containing Ca, Mg, P, and Fe in malt extract was 49.46, 74.89, 110.70, and 0.49 mg/100g, respectively. The best anticancer effect on HT29 cell lines with cell viability of 98.31% followed by 94.42% with a concentration of quinoa malt extract of 31.20 µg/mL was observed. This malt extract as a source of functional foods can play an important role in the cancer chemoprevention.

Keywords: *Chenopodium quinoa* Wild, Malt extract, Ultrasound, Nutrients, Anticancer activity

*Corresponding author: moz_emtiazjoo@yahoo.com