

(مقاله پژوهشی)

بررسی خصوصیات ضد اکسایشی و ضد میکروبی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده گیاه پونه‌سای بینالودی (*Nepeta Binaludensis*)

افسانه عظیمی محله^۱، سید علی مرتضوی^۲، پروین شرایعی^{۳*}، الهام آذرپژوه^۴، راضیه نیازمند^۴

۱- دانش آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

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

۳- استادیار پژوهش بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان

رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

۴- استادیار گروه شیمی مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۱

چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی خواص ضد اکسایشی و ضد میکروبی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده گیاه پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaludensis*) در شرایط آزمایشگاهی و مدل غذایی (دوغ) انجام پذیرفت. بدین منظور، عصاره پونه‌سای بینالودی با کمک فرآیند میدان پالس الکتریک (ولتاژ ۶۰۰۰ ولت و تعداد پالس ۶۰) استخراج شد و خواص ضد اکسایشی آن در مقادیر مختلف (۰/۵، ۲، ۴ و ۶ درصد) در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی‌بوتیل‌تولون (۰/۱ درصد) بر پایداری اکسایشی روغن تخلیص شده سویا مورد پایش قرار گرفت. همچنین خواص ضد میکروبی عصاره آزاد (۰/۲ و ۰/۶ درصد) و ریزپوشانی شده (۱ و ۳ درصد) در مقایسه با نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (با غلظت ۰/۱ درصد) در شرایط آزمایشگاهی و مدل غذایی (دوغ) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد تمامی غلظت‌های عصاره نپتاینالودنسیس، حائز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره با غلظت ۶ درصد (۱۱/۹۹ ساعت)، بیشتر از قدرت آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی‌بوتیل‌تولون (۸/۰۳ ساعت) بود. نتایج نشان داد عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی در غلظت ۴ درصد، دارای خاصیت ضد قارچی و ضد میکروبی بیشتری از سوربات پتاسیم (در غلظت ۰/۱ درصد) می‌باشد. همچنین، عصاره آزاد و ریزپوشانی شده قادر به کنترل رشد کپک و مخمر با حفظ خصوصیات حسی و فنی در دوغ بودند و کمترین میزان رشد کپک و مخمر بعد از ۲۱ روز نگهداری در شرایط یخچال در نمونه حاوی ۳ درصد عصاره ریزپوشانی شده مشاهده گردید که معادل اثر نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم بود.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنی، کپک و مخمر، عصاره، ضد اکسایشی، گیاه پونه‌سای بینالودی، دوغ.

۱-مقدمه

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی، یکی از مهم‌ترین افزودنی‌های غذایی می‌باشند که نقش مهمی در طولانی شدن عمر نگهداری مواد غذایی و کاهش ضایعات دارند (۴۴). اهمیت این افزودنی‌ها به حدی است که بدون بهره‌گیری از آن‌ها، تولید و مصرف بسیاری از اقلام و فرآورده‌های غذایی تقریباً غیرممکن می‌شود. به همین دلیل قوانینی در کشورهای مختلف برای کنترل کاربرد افزودنی‌های خوراکی سنتزی وضع شده است که این قوانین باعث محدودیت در کاربرد آن‌ها و افزایش ایمنی غذایی می‌شود (۴۳). ترکیبات موثر عصاره‌های گیاهان دارویی، یکی از منابع با ارزش برای تولید افزودنی‌های طبیعی هستند (۱۲ و ۱۹). گونه پونه‌سای بینالودی با نام علمی *Nepeta binaludensis*، یکی از گیاهان دارویی نادر و چند ساله می‌باشد که در کوه‌های بینالود واقع در استان خراسان رویش می‌کند (۲۹). جنس نپتا (از خانواده نعنائیان) شامل ۲۸۰ گونه می‌باشد که در بخش بزرگی از مرکز و جنوب اروپا و غرب، مرکز و جنوب آسیا توزیع شده است که نیمی از گونه‌های موجود در ایران ثبت شده است (۲۲). گونه پونه‌سای بینالودی گونه‌ای بومی است که در طب سنتی به دلیل خواص ضداسپاسم، مدر کننده، ضدسرفه و تب‌بر استفاده می‌شود (۱۶ و ۲۳). بنابراین، به نظر می‌رسد این گیاه دارای ترکیبات فعال زیستی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی باشد. اکسایش لیپیدی از جمله مشکلات بزرگ در استفاده از روغن‌ها و چربی‌های خوراکی است که باعث تولید مواد مضر در آنها می‌شود و سلامت انسان را به خطر می‌اندازد (۴۰). اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله روش‌های رایج برای بهبود پایداری روغن‌های خوراکی است. نگرانی ناشی از مصرف آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به لحاظ مسایل مربوط به سلامت و ایمنی و نیز محدودیت در حدود مجاز مصرف، مصرف کنندگان مواد غذایی را به استفاده از فرآورده‌های طبیعی در مواد غذایی ترغیب نموده است (۳۹). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ترکیبات فنلی هستند که در همه بخش‌های یک گیاه وجود دارد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی اساساً به

دلیل خصوصیات اکسایشی و کاهش آنهاست که این امکان را به آنها می‌دهد که به عنوان یک عامل احیاء کننده، دهنده هیدروژن و خنثی کننده اکسیژن یگانه عمل کنند. به علاوه آنها توانایی شلاته کردن فلزات را نیز دارند. این ترکیبات واکنش‌های اکسایشی روغن‌ها، چربی‌ها و ترکیبات محلول در چربی را به تأخیر می‌اندازند و بنابراین از توسعه عطر و طعم نامطبوع در اثر اکسایش ممانعت به عمل می‌آورند (۱۷). خلیقی سیگارودی و همکاران (۱۳۹۲) نشان دادند که عصاره گیاه نپتا پوگونسپرم^۱ می‌تواند به عنوان منبع سرشار از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای درمان برخی بیماری‌ها در نظر گرفته شود (۵). کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها نیز یکی از مهم‌ترین جنبه‌های نگهداری مواد غذایی است. دوغ، نوشیدنی لبنی مغذی و مقوی است که از ترکیب ماست، آب، اسانس‌های گیاهی و نمک به دست می‌آید و طبق آخرین آمارهای منتشر شده، میزان تولید سالانه دوغ (گازدار و بدون گاز) در ایران ۱۲۰۰۰۰ تن می‌باشد (۸). کپک‌ها و مخمرها از عمده‌ترین عوامل فساد دوغ هستند. مخمرها، باعث تولید گاز و تغییر طعم دوغ بدون تأثیر نامطلوب بر مصرف کننده می‌شوند، اما رشد کپک‌ها باعث تغییر طعم و رنگ دوغ در حد گسترده می‌شود (۳۸). گاهی اوقات تولیدکنندگان دوغ برای اجتناب از رشد این میکروارگانیسم‌ها، از نگهدارنده‌هایی مانند سوربات‌پتاسیم استفاده می‌کنند. پایداری سوربات‌پتاسیم به نوع ماده غذایی (pH)، ترکیبات (اسیدهای آلی، افزودنی‌های دیگر)، فعالیت آبی، تعداد میکروب‌ها، عوامل نگهدارنده، رطوبت، دمای نگهداری و نحوه بسته‌بندی بستگی دارد. سوربات-پتاسیم بر همه مراحل رشد کپک‌ها شامل تولید اسپور و تشکیل ریشه‌ها اثر گذاشته و با جلوگیری از رشد کپک، باعث کنترل تولید سموم قارچی می‌گردد. هم‌چنین، اکثر مخمرها نیز با غلظت ۰/۰۱ تا ۰/۲ درصد سوربات مهار می‌شوند. میزان سوربات‌پتاسیم طی نگهداری به دلیل رشد میکروبی، اکسایش یا واکنش با اجزا مواد غذایی کاهش می‌یابد (۲۱). مقدار قابل قبول دریافت روزانه سوربات

عصاره در غلظت‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی و غذایی (دوغ) به صورت آزاد و ریزپوشانی شده در مقایسه با نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم انجام پذیرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

گیاه پونه‌سای بینالودی در اواخر خرداد ۱۳۹۵ بعد از یک شستشوی کلی به دلیل گرفتن گرد و خاک سطحی نمونه‌ها در محلی خشک و بدور از نور آفتاب خشک شدند. نمونه‌های خشک شده در کیسه‌های پلاستیکی بسته بندی و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شدند. معرف فولین سیوکالچو، TPTZ^۱، DPPT^۲، متانول، کربنات سدیم^۳، سولفات آهن II، کلرید آهن III شش آبه، اسات سدیم سه آبه، پتاسیم کلراید، اسید کلریدریک غلیظ و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت‌های مرک، سیگما-آلدریج، شارلو و کالدون با درجه تجزیه‌ای^۱ خریداری شدند. ۲-۲- فرآیند استخراج ترکیبات موثر گیاه پونه‌سای بینالودی استخراج ترکیبات موثر با استفاده از حلال اتانول و با کمک فرآیند میدان پالس الکتریکی انجام شد. بدین منظور، ابتدا گیاه پونه‌سای بینالودی به نسبت ۱ به ۱۰ وزنی حجمی با اتانول مخلوط و در ولتاژ ۶۰۰۰ ولت و تعداد پالس ۶۰ پالس دهی گردید. برای اعمال میدان پالس الکتریکی از دستگاه میدان‌های الکتریکی پالسی قوی ساخت آزمایشگاه فن‌آوری‌های نوین پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، با قابلیت ایجاد میدان‌های الکتریکی با ولتاژهای ۷ و ۲۰ کیلوولت، با فرکانس حداکثر ۲ هرتز استفاده گردید. سپس عملیات استخراج عصاره با هم زدن شدید به مدت ۴۸ ساعت در محیط تاریک ادامه یافت. محلول تحت خلاء صاف گردید و با تبخیر کننده دوار تحت خلاء (مدل Laborota 4000 efficient، ساخت کشور آلمان) تحت دمای ۴۵ درجه سلسیوس تا حد آبگیری کامل تغلیظ

پتاسیم، ۲۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن اعلام شده است و استفاده طولانی مدت آن منجر به واکنش‌های حساسیتی، تهوع، اسهال و از دست رفتن مواد مغذی می‌شود (۶ و ۲۶). محمدپور و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند اسانس گیاه پونه‌سای بینالودی بر علیه باسیلوس سرئوس (۳/۱۲۵) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اشرشیاکلی (۳/۱۲۵) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، استافیلوکوکوس اورئوس (۶/۲۵) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کاندیدا آلبیکنس (۱۲/۵) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) خواص مهارکنندگی دارد (۳۳). از آنجائیکه که عصاره استخراجی از گیاهان غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی است و پایداری این ترکیبات در شرایط محیطی مختلف پایین است، استفاده از روشی که بتواند این ترکیبات را در برابر عوامل محیطی حفظ کند و همچنین آزادسازی آن را در زمان معین و به صورت کامل محقق نماید، دارای اهمیت ویژه ای می‌باشد. یکی از روش‌های محافظت اجزاء فعال و حساس طی فرآیند، ریزپوشانی است. ریزپوشانی فرآیندی است که در آن یک ماده و یا مخلوطی از مواد توسط مواد دیگری پوشانیده و یا به دام انداخته می‌شوند. ریزپوشانی ترکیبات موثره در صنایع غذایی و داروسازی برای پوشاندن مواد رنگی، عطری و سایر مواد موثره به کار می‌رود. این تکنیک بدلیل حمل و نقل ساده، بهبود ماندگاری محصول نهایی، کاهش تبخیر، تجزیه یا واکنش با سایر ترکیبات ماده غذایی حین فرآیند، بهبود ایمنی مواد غذایی و آزادسازی کنترل شده ترکیبات موثره در صنایع غذایی کاربرد فراوان دارد. برای به دست آوردن ریزپوشانی موفق انتخاب مواد دیواره و روش خشک کردن مناسب، ضروری است (۳۷ و ۴۲). بر طبق بررسی‌های به عمل آمده، مشخص شده است که تاکنون تحقیقی در خصوص ارزیابی خصوصیات ضد اکسایشی و ضد میکروبی عصاره گیاه نپتا بینالودی انجام نشده است و یا در دسترس نیست. بنابراین، با توجه به اهمیت استفاده از افزودنی‌های طبیعی، پژوهش حاضر با اهداف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی بر پایداری اکسایشی روغن تخلیص شده سویا در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی‌بوتیل تولوئن و بررسی فعالیت ضد میکروبی

1- 2, 4, 6-tris (2-pyridyl)-s-triazine

2-2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

3- Analytical Grade

۲-۵- آزمون رسیمت

برای تعیین شاخص پایداری اکسایشی روغن، از دستگاه رسیمت استفاده شد. برای این منظور ۰/۵، ۲، ۴ و ۶ درصد عصاره پونه‌سای بینالودی و نیز ۰/۱ درصد از آنتی‌اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل تولوئن به روغن تخلیص شده سویا اضافه شد. برای حل کردن عصاره و آنتی‌اکسیدانهای سنتزی در روغن ابتدا این مواد در مقدار کمی کلروفرم حل و سپس به روغن اضافه شدند. بعد از اختلاط، کلروفرم در آون تحت خلا با دمای کمتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. سه گرم از مخلوطهای فوق در دستگاه رسیمت در دماهای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان هوای ۲۰ لیتر بر ساعت قرار داده شد (۳۲).

۲-۶- ریزپوشانی عصاره

ابتدا محلول‌های مالتودکسترین با درجه هیدرولیز ۷ (۲۶/۹۵ درصد)، صمغ عربی (۲۹/۳۶ درصد) و مالتودکسترین با درجه هیدرولیز ۲۰ (۴۳/۶۸ درصد) محلول تهیه گردید (لازم به توضیح است که ترکیب دیواره بعد از بهینه‌سازی با استفاده از روش سطح پاسخ به دست آمده است). سپس محلول‌ها برای ۳۰ دقیقه با مخلوط‌کن مغناطیسی مخلوط شدند و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال برای کامل شدن فرآیند هیدراتاسیون نگهداری شدند (۴۷). سپس ترکیبات هسته (عصاره پونه‌سای بینالودی خشک شده انجمادی) با مواد دیواره به نسبت ۱ به ۵ مخلوط شدند. محلول‌های تهیه شده به منظور یکنواخت شدن به مدت ۳۰ دقیقه با همزن مغناطیسی همزده شدند. محلول‌های حاوی مواد دیواره و هسته (حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر از هر نمونه) در خشک‌کن انجمادی در دمای ۵۵- درجه سلسیوس با فشار ۰/۱۵ میلی‌متر جیوه طی ۲۰ ساعت خشک شدند. نمونه‌های خشک شده تا زمان انجام آزمایشات بعدی، در تاریکی و دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

۲-۷- تهیه دوغ

ابتدا دوغ مطابق آیین کار تهیه و تولید دوغ گرمادیده بدون گاز به شماره استاندارد ۱۰۵۲۸ تهیه شد. در مرحله نهایی تهیه دوغ سوربات پتاسیم به عنوان نگهدارنده شیمیایی ضد

گردید. جهت جلوگیری از کف کردن و همچنین جهت رسیدن به دمای مناسب برای ورود به خشک‌کن انجمادی، محلول تغلیظ شده به مدت ۱۹ ساعت در فریزر با دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری و سپس به خشک‌کن انجمادی (مدل Operon FDB- 550، ساخت کشور کره) منتقل شد. نمونه‌ها در خشک‌کن انجمادی در دمای ۵۵- درجه سلسیوس با فشار ۰/۱۵ میلی‌متر جیوه طی ۲۰ ساعت خشک شدند. نمونه‌های خشک شده تا زمان انجام آزمایشات بعدی، در تاریکی و دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

۲-۳- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد میکروب

ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره پونه‌سای بینالودی، با روش رقیق‌سازی لوله ای^۱ تعیین شد. برای تعیین خواص ضدباکتریایی از دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با شماره ATCC۲۵۹۲۳ به عنوان گرم مثبت و اشریشیاکلای O157:H7 با شماره ATCC۱۲۶۹ به عنوان گرم منفی و برای تعیین خواص ضدقارچی از کپک اسپرژیلوس نایجر با شماره ATCC۱۶۴۰۴ استفاده شد. میزان برای تعیین کدورت نمونه‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-1600 A و طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده شد.

۲-۴- تخلیص روغن سویا

تخلیص روغن سویا با استفاده از کروماتوگرافی ستونی چندلایه‌ای (آلومینا- سیلیکاژل) به همراه اصلاحاتی در روش بلهاج و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت (۱۴). برای اطمینان از حذف ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، روغن دوبار از ستون پر شده با آلومینا و سیلیکاژل عبور داده شد و مقادیر ترکیبات پلی‌فنلی کل و عدد پراکسید بعد از هر مرحله تخلیص اندازه‌گیری شد.

بدست آمد. نتایج بر اساس میلی گرم اسید گالیک بر گرم نمونه خشک با استفاده از معادله برازش داده شده بر منحنی استاندارد گزارش گردید (۴۷).

۲-۱۰- تعیین قدرت احیا کنندگی آهن III (FRAP)
ابتدا محلولی شامل ۱۰۰ میلی گرم نمونه در ۲ میلی لیتر متانول تهیه شد و ۳۰ میکرو لیتر آن با ۹۰۰ میکرو لیتر محلول FRAP و ۹۰ میکرو لیتر آب مقطر در لوله آزمایش مخلوط شد. لوله آزمایش بعد از ورتکس در بن ماری قرار گرفت و پس از رسیدن دمای آن به ۳۷ درجه سلسیوس، مقدار جذب در مقابل شاهد و در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. مقدار آهن II با استفاده از معادله برازش داده شده بر منحنی استاندارد (مقدار جذب محلول های استاندارد سولفات آهن II با غلظت های ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرومول در لیتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر) به دست آمد (۱۵).

۲-۱۱- تعیین قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH
ابتدا محلول ۰/۰۰۶ درصد رادیکال آزاد DPPH در متانول تهیه شد. سپس به لوله های آزمایش دارای یک میلی لیتر محلول متانولی نمونه با غلظت های مختلف (بسته به قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد)، یک میلی لیتر از محلول فوق اضافه شد. لوله های آزمایش بعد از همزدن به مدت یک ساعت در جای تاریک نگهداری شدند و سپس جذب آنها در طول موج ۵۱۲ نانومتر در برابر شاهد قرائت گردید. درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد طبق رابطه ۱ محاسبه شد. رابطه (۱)

$$A\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

که در آن: A% درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH، A_c جذب شاهد و A_s جذب نمونه است. پس از ترسیم نمودار درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد در برابر غلظت نمونه، منحنی مناسب روی داده ها برازش داده شد و سپس غلظتی را که در آن، نمونه قادر به مهار کردن ۵۰ درصد

میکروبی در سطح ۰/۱ درصد و همچنین عصاره استخراجی پونه سالی بینالودی به شکل آزاد در دو سطح ۰/۲ و ۰/۶ درصد و عصاره ریزپوشانی شده به مقدار ۱ و ۳ درصد به عنوان جایگزین سوربات پتاسیم به دوغ در شرایط استریل اضافه شدند و در بطری های پلی اتیلنی با دانسیته بالا بسته بندی و در یخچال (دمای ۵ درجه سلسیوس) به مدت ۲۸ روز نگهداری شدند. بلافاصله پس از تولید، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از تولید آزمون های شمارش کلی کپک و مخمر، میزان ترکیبات فنلی کل و ارزیابی حسی (تست هدونیک ۵ امتیازی) بر روی نمونه ها انجام شد (۲).

۲-۸- کشت و شمارش کپک و مخمر در محصول دوغ
آزمون میکروبی شامل شمارش کلی کپک و مخمر طبق استاندارد ۲-۱۰۸۹۹ و با استفاده از محیط کشت یست گلوکز کلرامفنیکل آگار^۱ و آماده سازی نمونه ها مطابق با استاندارد ۴-۸۹۲۳ انجام شد (۱ و ۳). پلیت های کشت داده شده در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز گرمخانه گذاری شدند. در نهایت تعداد کلنی های تشکیل شده مورد بررسی و شمارش قرار گرفت.

۲-۹- تعیین ترکیبات فنلی
محتوای فنل کل عصاره با معرف فنل سیوکالچو اندازه گیری شد. محتوای فنل کل به عنوان معادل اسید گالیک در میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن تازه گیاه بیان گردید. به ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره نمونه (با متانول ۱:۱۰ حجمی / حجمی رقیق شده) ۶ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۵۰۰ میکرو لیتر معرف فنل سیوکالچو اضافه گردید، بعد از ۸ ثانیه تا ۸ دقیقه در دمای اتاق ۱/۵ میلی لیتر کربنات سدیم (۲۰ درصد وزنی / حجمی) اضافه گردید. عصاره مخلوط شد و اجازه داده شد که ۳۰ دقیقه در ۴۰ درجه سانتی گراد بماند و سپس جذب در ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. میزان ترکیبات فنولی کل موجود در نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین شد. منحنی استاندارد با ترسیم داده های جذب اسید گالیک در طول موج ۷۶۵ نانومتر در غلظت های ۱۰۰ تا ۹۵۰ پی پی ام

رادیکال‌های آزاد است تحت عنوان IC_{50} محاسبه گردید (۲۴).

۱۲-۲- تعیین اجزای ترکیبات فنلی

ابتدا، ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره با استفاده از رقیق کردن با متانل و عبور از کاغذ صافی (۰/۲ فیلتر میکرومتر) تهیه شد. آنالیز ترکیبات فنلی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا همراه طیف سنجی جرمی دو طرفه انجام یافت. کروماتوگرافی مایع مجهز به پمپ‌های دودویی LC ۵۴-AD ۳۰، گاززودا DGU-20A3R، ستون CTO-10ASvp و اتمسفر SIL-30AC انجام یافت. ستون جداکننده بر اساس فاز معکوس C_{18} (۱۵۰ در ۴/۶ میلی‌متر، ۳ میکرومتر) انجام یافت. ستون تحلیلی نمونه بر اساس فاز متحرک A (۰/۱ درصد اسید فرمیک، ۵ میلی‌مولار (فرمات آمونیوم و آب) و فاز متحرک B (۰/۱ درصد اسید فرمیک، ۵ میلی‌مولار فرمات آمونیوم و متانول) انجام یافت. دمای ستون در ۴۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. سرعت جریان حلال و حجم تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و ۴ لیتر تنظیم شد (۳۰).

۱۳-۲- آزمون حسی دوغ

مقایسه تیمارهای مختلف بر ویژگی‌های حسی مورد نظر (رنگ، عطر و طعم و پذیرش کلی) توسط ده نفر ارزیاب آموزش دیده به روش روندا و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد (۴۲). به این منظور، از روش ارزیابی هدونیک ۵ نقطه‌ای (=۱ غیر قابل قبول (خیلی بد)، ۵ = خیلی خوب) برای بررسی این ویژگی‌ها استفاده شد. ارزیابی حسی تمام نمونه های دوغ یک روز پس از پخت و در دمای اتاق انجام شد.

۱۴-۲- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شدند. میانگین‌های حاصل از انجام آزمون‌ها با نرم‌افزار MStatC و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد ($p < 0/05$) مقایسه شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره پونه‌سای بینالودی (آزاد و ریزپوشانی شده)

ویژگی‌های عصاره اتانولی گیاه پونه‌سای بینالودی قبل و بعد از ریزپوشانی دارای مقدار قابل توجهی ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. ریزپوشانی عصاره اتانولی، باعث کاهش ترکیبات فنلی در حدود ۱/۰۴ درصد گردید (از ۴۲۵/۹۳ به ۴۱۰/۹۵ میلی‌گرم بر گرم). همان‌طور که از جدول ۱ مشاهده می‌شود، عصاره استخراج شده دارای مقدار قابل توجهی ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که نشان دهنده بقای ماده هسته در دیواره می‌باشد. مشخص شده‌است نوع ترکیبات دیواره و هسته بر میزان فراریت ترکیبات ریزپوشانی شده تاثیر بسزایی دارد. هر چه میزان فراریت اجزای تشکیل دهنده ماده هسته بیشتر باشد، سبب افزایش میزان خروج آنها از داخل ریزکپسول‌ها طی فرآیند خشک شدن می‌گردد (۴۱). انعطاف‌پذیری و ابعاد ملکولی دیواره‌های مورد استفاده، نیز نقش مهمی در خروج ترکیبات هسته دارند؛ چون بطور مستقیم به انتشار مولکولی ترکیبات به داخل پوسته اطراف ریزکپسول‌ها و جایجایی آنها به سطح تاثیر می‌گذارند (۱۰). همان‌طور که از جدول ۱ مشاهده می‌شود، بین میزان ترکیبات فنلی با قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (قدرت احیاءکنندگی آهن سه ظرفیتی و قدرت گیرندگی رادیکال آزاد) ریزکپسول‌های تهیه شده، رابطه مستقیمی وجود دارد. ترکیبات فنلی به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی، نقش مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد، فلزات سنگین، و جلوگیری از تشکیل هیدروپراکسیدها در سلول‌های گیاهی دارند (۳۵). هم‌چنین از جدول ۱ مشاهده می‌شود، عصاره آزاد و ریزپوشانی شده پونه‌سای بینالودی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی به مراتب بالاتر از توکوفرول بودند.

جدول ۱- میزان ترکیبات فنلی و قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی عصاره پونه سای بینالودی (آزاد و ریزپوشانی شده)

| نتایج | ترکیبات فنلی کل (میلی گرم بر گرم) | قدرت گیرندگی رادیکال آزاد (درصد) | قدرت احیاء کنندگی آهن سه ظرفیتی (میکرومول آهن II بر لیتر) |
|---------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| عصاره آزاد | 425/93 ± 5 ^a | 75/06 ± 0/05 ^a | 1696/06 ± 14/99 ^a |
| عصاره ریزپوشانی شده | 410/95 ± 2/59 ^b | 70/96 ± 0/24 ^b | 1609/15 ± 3/63 ^b |
| آلفا توکوفرول | - | 25/48 ± 0/95 ^c | 104/54 ± 2/64 ^c |

*ارقام دارای حروف مشترک در هر ستون (حروف کوچک) (میانگین ± انحراف معیار) از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن 0/05 < P).

۲-۳- اجزای ترکیبات فنلی عصاره

مقادیر اجزای ترکیبات فنلی عصاره در جدول ۲ نشان داده شده است. ترکیبات فنلی عصاره اتانولی شامل اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، روتین، اسید پاراکوماریک، اسید رزماریک، کمپفرول، آپژنین می باشد. این ترکیبات

فنلی با قدرت آنتی اکسیدانی بالا شرایط ضد فساد، ضد باکتری، ضد سرطان، ضد قند خون، حفاظت در برابر بیماری های قلبی را نیز فراهم می کنند (۲۸ و ۴۵). همانطور که مشاهده می شود اسید رزماریک ترکیبات عمده ترکیبات فنلی عصاره بودند.

جدول ۲- ترکیبات فنلی عصاره پونه سای بینالودی

| ترکیبات فنلی | زمان بازداری | عصاره (میلی گرم بر گرم) |
|-----------------------|--------------|-------------------------|
| کلروژنیک | ۱۷/۳۳ | ۱۶/۲۹۴ |
| اسید کافئیک | ۱۹/۶۶ | ۲۲/۲۴۱ |
| روتین | ۲۷/۸۳ | ۲۹/۷۰۸ |
| وانیلین | ۳۱/۸۳ | ۲/۵۳۹ |
| اسید پاراکوماریک اسید | ۳۲/۸۶ | ۱۶/۲۰۵ |
| اسید رزماریک | ۳۵/۱۵ | ۲۳۵/۷۰۴ |
| کمپفرول | ۳۶/۰۸ | ۲۰/۷۷۷ |
| آپژنین | ۴۲/۷۲ | ۱۰۵/۷۸۰ |
| ترکیبات فنلی کل | | ۴۴۹/۲۵۱ |

کوکسال و همکاران (۲۰۱۷) نیز مشاهده کردند اسید رزماریک ترکیب عمده ترکیب فنلی گیاه نپتا تراچونیتیکا^۱ است (۳۰). اسید رزماریک باعث مهار تولید گلیکولایتیک ATP (عامل ایجاد سرطان) و سیتوکین های ضد التهابی می شود (۲۷).

۳-۳- بررسی تاثیر عصاره پونه سای بینالودی بر پایداری اکسایشی روغن سویا
اثر افزودن ۰/۵، ۲، ۴ و ۶ درصد عصاره پونه سای بینالودی و نیز ۱۰۰ پی پی ام هیدروکسی بوتیل تولوئن بر شاخص پایداری اکسایشی روغن تخلیص شده روغن سویا (دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس و سرعت جریان هوا ۲۰ لیتر بر ساعت) در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- شاخص پایداری اکسایشی (ساعت) روغن تخلیص شده سویا در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس در حضور ۰/۵، ۲، ۴ و ۶ درصد عصاره پونه‌سای بینالودی و نیز ۰/۰۱ درصد آنتی‌اکسیدان هیدروکسی بوتیل تولوئن

| پایداری اکسایشی (ساعت) | تیمار |
|------------------------|-------|
| ۶/۹۸±۰/۱۳ | d |
| ۸/۰۳±۰/۰۱ | b |
| ۷/۲۴±۰/۲ | c |
| ۷/۸۹±۰/۰۴ | b |
| ۸/۹۲±۰/۲۵ | b |
| ۱۱/۹۹±۰/۱۵ | a |

* ارقام دارای حروف مشترک در هر ستون (میانگین± انحراف معیار) از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن ۰/۰۵ < P).

اکسایش شده، به این ترتیب اسیدهای چرب چند غیر اشباع و روغن‌های حاوی این اسیدهای چرب را در برابر اکسایش حفظ می‌نمایند. از طرفی، اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی در روغن‌ها به غلظت این ترکیبات، دما، محتوای اسیدچرب و فیزیکی روغن بستگی دارد (۱۳). مظاهری کلهوردی و همکاران (۱۳۹۳) و محققى ثمرین و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند اثر عصاره دانه رازیانه و پوست سیب زمینی در پایداری روغن سویا به دلیل حضور ترکیبات فنلی موجود در این عصاره‌ها بوده است (۷ و ۹).

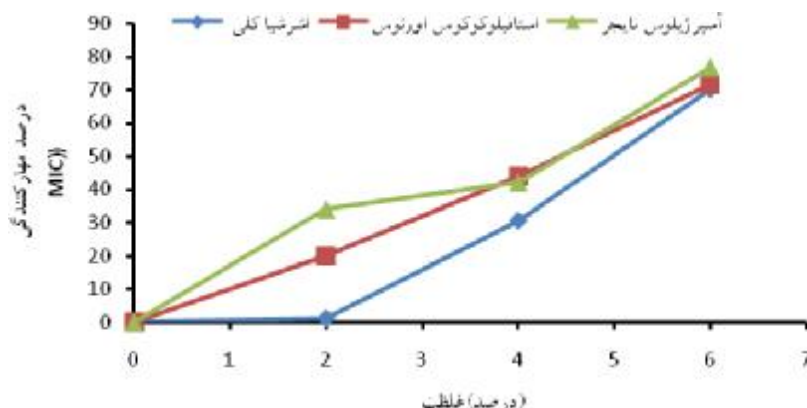
۳-۴ بررسی تاثیر عصاره پونه‌سای بینالودی بر بازدارندگی از میکروارگانسیم‌ها

نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره پونه‌سای بینالودی در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد حداقل غلظت بازدارندگی عصاره پونه‌سای بینالودی در غلظت ۴ درصد برای استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کولی و آسپرژیلوس نایجر به ترتیب ۴۴، ۳۰/۵۶ و ۴۲ درصد بود. همچنین نتیجه حداقل غلظت بازدارندگی برای غلظت ۰/۱ درصد سوربات پتاسیم برای استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و آسپرژیلوس نایجر به ترتیب ۵/۵، ۱۴/۲ و ۳۸ درصد بود. بنابراین، عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی در غلظت ۴ درصد عصاره، دارای خاصیت ضدقارچی و میکروبی بیشتری از سوربات پتاسیم (در غلظت

رنسیت از جمله روشهای تسریع شده بسیار شناخته شده در سنجش اکسایش پذیری روغن‌هاست که با استفاده از اعمال دما و تزریق هوا به داخل روغن، تغییر غلظت اسیدهای آلی تولید شده در اکسایش (اساسا اسید فرمیک) را بر اساس هدایت الکتریکی به طور خودکار اندازه‌گیری و تحت عنوان شاخص پایداری اکسایشی بیان می‌کند. این روش به منظور بررسی آثار آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف در روغن و نیز پایداری اکسایشی انواع روغن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۲۵). همانطور که در جدول ۴ نشان داده شده است کلیه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی، شاخص پایداری اکسایشی نمونه‌های روغن تخلیص شده سویا را در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس افزایش دادند. عصاره با غلظت ۶ درصد نسبت به سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به- مراتب اثر پایدارکنندگی بیشتری از خود نشان داد، به طوری که پایداری اکسایشی نمونه شاهد را از ۶/۹۸ به ۱۱/۹۹ ساعت افزایش داد و سبب بهبود پایداری اکسایشی روغن تخلیص شده روغن سویا تا حدود ۱/۷۲ برابر شد. این پدیده، احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فنلی در عصاره اتانولی گیاه نپتا بینالودی و خواص آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات می‌باشد. به طور کلی، ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان‌هایی هستند که به خاطر داشتن عوامل احیاء کننده، قدرت هیدروژن دهنده، فرونشاندن اکسیژن یگانه و گیرندگی فلزات سنگین، سبب شکستن واکنش‌های زنجیره‌ای

فسفوریل‌اسیون اکسایشی، مهار کاتالاز و افزایش هیدروژن پراکسید در سلول می‌باشد. اما بر باکتری‌ها اثر ضد میکروبی کمتری دارد (۲۰).

۰/۱ درصد می‌باشد. سوربات پتاسیم، بر طیف وسیعی از کپک‌ها و مخمرها موثر است. علت این پدیده، به دلیل مهار آنزیم‌های دهیدروژناز در اکسیداسیون اسیدچرب، مهار آنزیم‌های حاوی سولفیدریل و در نتیجه جفت نشدن



شکل ۱- بررسی عمل مهارکنندگی عصاره پونه سای بینالودی بر روی استافیلوکوکوس اورنوس، اشرشیا کلی و آسپرژیلوس نایجر و درصد مهارکنندگی سوربات پتاسیم در غلظت ۰/۱ درصد، ۱۴/۲ درصد در اشرشیا کلی، ۵/۵ درصد برای استافیلوکوکوس اورنوس و ۳۲ درصد برای آسپرژیلوس نایجر.

حداقل غلظت بازدارندگی در محدوده ۱۰۰۰ الی ۳۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بودند (۳۱).

۳-۵- تأثیر عصاره ریزپوشانی شده و آزاد بر میزان

ترکیبات فنلی کل، خواص حسی و میکروبی دوغ

نتایج ارزیابی حسی دوغ (عطر و طعم، بو و پذیرش کلی) تحت تاثیر افزودن عصاره ریزپوشانی شده (با غلظت ۱ و ۳ درصد) و عصاره خشک شده انجمادی (۰/۲ و ۰/۶ درصد) در مقایسه با نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (۰/۱ درصد) و نمونه شاهد (فاقد هر نوع ماده افزودنی) در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان داد نمونه دوغ حاوی عصاره ریزپوشانی شده با غلظت ۱ درصد با کسب امتیاز خوب، بیشترین امتیاز را برای خصوصیات عطر و طعم، بو و ظاهر کلی داشت و از نظر خصوصیات حسی تفاوت آماری معنی داری با نمونه دوغ حاوی سوربات پتاسیم نداشت ($P < 0.05$). این موضوع نشان دهنده آن است که بیشتر مصرف کنندگان خصوصیات حسی دوغی را ترجیح

وجود ترکیبات فنلی موجود در گیاهان دارویی اهمیت این گیاهان را برای تولید آنتی بیوتیک‌های طبیعی و جدید در علوم پزشکی دو چندان ساخته است. بیرینجی ییلدیریم و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت ضد میکروبی و ضد توموری را در عصاره‌های تهیه شده حلال‌های مختلف (آب، اتانول و متانول) را در ۱۶ گیاه دارویی مختلف رشد یافته در ترکیه را بررسی نمودند. بهترین فعالیت ضد میکروبی در عصاره‌های اتانولی و متانولی نپتا آلبا^۱ گزارش گردید (۱۸). نتایج نشان داد که عصاره این گیاه بر روی باکتری گرم مثبت و گرم منفی موثر بود. کومر و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند روغن اسانس مشتق شده از نپتا کیلیاریس^۲ و نپتا کلارکی^۳ را موثرترین تیمارهای علیه فوزاریوم اکسی پوروم^۴ با ارزش

1- *Nepeta alba*
2- *Nepeta ciliaris*
3- *Nepeta clarkei*
4- *Fusarium oxysporum*

می دهند که دارای مقدار کمتر عصاره ریزپوشانی باشد. مالتودکسترین و صمغ عربی سبب بهتر شدن خواص حسی اخوان مهدوی و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند ریزپوشانی با در فرمولاسیون ژله شد (۱۱).

جدول ۵- میانگین امتیاز داورن به شاخص عطر و طعم، بو و ظاهر کلی دوغ یک روز پس از تولید تحت تاثیر افزودن عصاره ریزپوشانی شده (با غلظت ۱ و ۳ درصد) و عصاره خشک شده انجمادی (۲/۰ و ۶/۰ درصد) در مقایسه با افزودن نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (۱/۰ درصد) و نمونه شاهد (فاقد هر نوع ماده افزودنی).

| تیماز | عطر و طعم | بو | ظاهر کلی |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| شاهد | ۴±۰/۸۲ ^{ab} | ۴±۰/۸۲ ^b | ۴±۰/۸۲ ^a |
| سوربات ۰/۱ درصد | ۳/۴±۰/۵۲ ^{bc} | ۴/۴±۰/۵۱ ^a | ۴/۴±۰/۵۲ ^a |
| عصاره خشک شده انجمادی، ۰/۲ درصد | ۳/۲±۰/۴۲ ^{cd} | ۳/۶±۰/۵۱ ^{bc} | ۳/۴±۰/۵۲ ^b |
| عصاره خشک شده انجمادی، ۰/۶ درصد | ۲/۶±۰/۵۲ ^d | ۲/۶±۰/۵۲ ^c | ۲/۸±۰/۴۲ ^c |
| عصاره ریزپوشانی شده، ۱ درصد | ۴/۲±۰/۴۲ ^a | ۴/۲±۰/۴۲ ^a | ۴/۴±۰/۵۲ ^a |
| عصاره ریزپوشانی شده، ۳ درصد | ۲/۶±۰/۴۲ ^d | ۲/۸±۰/۴۲ ^c | ۲/۸±۰/۴۲ ^c |

* ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن $P < 0.05$).

عصاره ریزپوشانی شده با ترکیب دیواره بهینه ۳ درصد و نمونه حاوی ۰/۱ درصد سوربات پتاسیم مشاهده شد. اثر بازدارندگی از رشد کپک و مخمر توسط سوربات پتاسیم، همانطور که قبلاً نیز ذکر گردید، احتمالاً به دلیل مهار آنزیم‌های دهیدروژناز، سولفیدریل اکسیداز و کاتالاز در سلول میکروبی می‌باشد (۲۰). حیدری‌نیا و همکاران (۲۰۰۶)، نیز تحقیقاتی در رابطه با اثر نگهدارندگی بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم در مواد غذایی بر آسپرژیلوس نیجر انجام داده و گزارش نمودند که سوربات پتاسیم باعث مهار رشد آسپرژیلوس می‌گردد (۴). محافظت از رشد کپک و مخمر توسط عصاره ریزپوشانی شده و آزاد عصاره پونه‌سای بینالودی، احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فنلی می‌باشد.

نتایج ارزیابی ترکیبات فنلی و میکروبی دوغ (تعداد کل کپک و مخمر) تحت تاثیر افزودن عصاره ریزپوشانی شده و عصاره خشک شده انجمادی طی ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس) در مقایسه با افزودن نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم و نمونه شاهد (فاقد هر نوع ماده افزودنی) به ترتیب در جدول‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است. همانطور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود، با افزایش زمان نگهداری، میزان رشد کپک و مخمر افزایش یافت؛ اما، هر دو نوع افزودنی طبیعی و سنتزی سبب کاهش میزان رشد کپک و مخمر در نمونه‌های تولیدی نسبت به نمونه شاهد شدند. کمترین میزان رشد کپک و مخمر بعد از ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال در نمونه حاوی ۳ درصد

جدول ۶- میزان رشد کپک و مخمر (لگاریتم شمارش میکروبی) در دوغ طی ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس) تحت تاثیر افزودن عصاره ریزپوشانی شده (با غلظت ۱ و ۳ درصد) و عصاره خشک شده انجمادی (۰/۲ و ۰/۶ درصد) در مقایسه با افزودن نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (۰/۱ درصد) و نمونه شاهد (فاقد هر نوع ماده افزودنی)

| تیمار | مدت زمان نگهداری (روز) | | | | |
|---------------------------------|------------------------|---|-------------------------|------------------------|------------------------|
| | ۱ | ۷ | ۱۴ | ۲۱ | ۲۸ |
| شاهد | - | - | ۰/۳۳±۰/۵۸ ^a | ۰/۰۷ ^a | ۲/۹±۰/۱۷ ^a |
| | | | | ۰/۵۲± | |
| | | | | ۱ | |
| سوربات ۰/۱ درصد | - | - | - | - | - |
| عصاره خشک شده انجمادی، ۰/۲ درصد | - | - | ۰/۳۳±۰/۵۸ ^a | ۲/۲۶±۰/۲۴ ^a | ۲/۹±۰/۱۷ ^a |
| عصاره خشک شده انجمادی، ۰/۶ درصد | - | - | ۰/۳۳±۰/۵۸ ^a | ۰/۳۳±۰/۵۷ ^b | ۱/۴۶±۰/۱۵ ^b |
| عصاره ریزپوشانی شده، ۱ درصد | - | - | ۰/۳۳± ۰/۵۸ ^a | ۰/۶۷±۰/۵۸ ^b | ۰/۱۷ ^{bc} |
| | | | | | ۱/۲± |
| عصاره ریزپوشانی شده، ۳ درصد | - | - | - | - | ۱/۱±۰/۱۷ ^c |

* ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن $P < 0/05$).

ترکیبات فنلی را دارا بود. مشخص شده است ترکیبات فنلی با دارا بودن خواص ضد میکروبی به لپیدهای غشاء سلولی و میتوکندری وارد می‌شوند و ضمن تغییر شکل سلولی و ایجاد نفوذ پذیری بیشتر آن‌ها، باعث خروج یون و دیگر محتویات سلولی می‌گردند. اگرچه خروج مقادیر مشخصی از مواد داخل باکتری، می‌تواند برای سلول قابل تحمل باشد، ولی خروج مقادیر زیاد محتویات سلولی با خروج مولکول‌ها و یون‌های حیاتی سبب مرگ سلول می‌شود (۳۶).

همانطور که از جدول ۷ مشخص است، میزان ترکیبات فنلی در همه نمونه‌های دوغ، طی نگهداری کاهش یافت. اما میزان کاهش ترکیبات فنلی در نمونه‌های ریزپوشانی شده کمتر از نمونه‌های آزاد بود؛ که احتمالاً به علت اثر محافظتی مواد دیواره می‌باشد. همچنین، مقایسه بین تیمارها نشان می‌دهد که ریزپوشانی می‌تواند ثبات و عمر مفید ماندگاری ترکیبات فنلی را بطور معنی‌داری افزایش دهد ($P < 0/05$)، بطوری که نمونه دوغ حاوی عصاره ریزپوشانی شده با غلظت ۳ درصد در آخرین روز نگهداری بیشترین میزان

جدول ۷- نتایج ارزیابی ترکیبات فنلی دوغ (میلی‌گرم بر ۱۰ گرم) طی ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس) تحت تاثیر افزودن عصاره آبی ریزپوشانی شده (با غلظت ۱ و ۳ درصد) و عصاره خشک شده انجمادی (۰/۲ و ۰/۶ درصد) در مقایسه با افزودن نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (۰/۱ درصد) و نمونه شاهد (فاقد هر نوع ماده افزودنی)

| تیمار | مدت زمان نگهداری (روز) | | | | |
|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | ۱ | ۷ | ۱۴ | ۲۱ | ۲۸ |
| شاهد | ۳۷/۵۸±۰/۹۱ ^{cA} | ۳۷/۵۲±۱ ^{cA} | ۳۷/۰۸±۰/۳۷ ^{bA} | ۳۳/۱±۰/۶۳ ^{cB} | ۲۱/۰۲±۱/۲۴ ^{cC} |
| سوربات ۰/۱ درصد | ۴۰/۶۷±۱/۱۱ ^{bA} | ۳۹/۶±۱/۱۷ ^{bA} | ۳۷/۳۹±۰/۳۸ ^{abB} | ۳۵/۲۲±۰/۷۴ ^{bcC} | ۳۴/۵۸±۰/۳۷ ^{bc} |
| عصاره خشک شده انجمادی، ۰/۲ درصد | ۴۱/۱۶±۲/۰۴ ^{bA} | ۴۰/۰۶±۲/۰۷ ^{bAB} | ۳۷/۸۲±۰/۳۸ ^{abB} | ۳۴/۵۸±۰/۳۷ ^{cC} | ۳۳/۹۴±۰/۳۷ ^{bc} |
| عصاره خشک شده انجمادی، ۰/۶ درصد | ۴۳/۱۶±۰/۶۳ ^{abA} | ۴۱/۶۳±۰/۶۸ ^{abB} | ۴۰/۰۵±۰/۳۹ ^{abc} | ۳۷/۸۲±۰/۳۸ ^{abd} | ۳۵/۴۳±۰/۳۷ ^{bE} |
| عصاره ریزپوشانی شده، ۱ درصد | ۴۲/۲۴±۲/۳۸ ^{bA} | ۴۰/۰۷±۲/۳۸ ^{bA} | ۳۸/۷۵±۳/۸۱ ^{abAB} | ۳۸/۵±۲/۱۵ ^{aAB} | ۳۵/۴۴±۰/۹۸ ^{bb} |
| عصاره ریزپوشانی شده، ۳ درصد | ۴۵/۸۴±۱/۶۲ ^{aA} | ۴۳/۹۴±۱/۶۲ ^{AB a} | ۴۰/۵±۳/۸۲ ^{aBC} | ۴۰/۲۹±۲/۷ ^{aBC} | ۳۸/۰۵±۱/۳۸ ^{aC} |

* ارقام دارای حروف مشترک در هر ردیف (حروف بزرگ) و ستون (حروف کوچک) (میانگین± انحراف معیار) از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن $P < 0/05$).

آخرین روز نگهداری بیشترین میزان ترکیبات فنلی را دارا بود.

۵-منابع

۱. بی نام. ۱۳۸۵. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایش - سوسپانسیون اولیه ورق های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی- قسمت چهارم: مقررات ویژه برای آماده سازی محصولات به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده های آنها. استاندارد ملی ایران شماره ۴- ۸۹۲۳. اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
۲. بی نام. ۱۳۸۶. دوغ- آیین کار تهیه و تولید، استاندارد شماره ۱۰۵۲۸. اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
۳. بی نام. ۱۳۸۷. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جامع برای شمارش کپک ها و مخمرها، قسمت دوم: روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی (a_w) مساوی یا کم- تر از ۰/۹۵. استاندارد ملی ایران، شماره ۲ - ۱۰۸۹۹. اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
۴. حیدری نیا، ا، کلانتر، ه، غفراوی، ا، سدادی، ع. ۱۳۸۵. اثر حفاظتی سدیم بنزوات و پتاسیم سوربات با غلظت های مختلف در مواد غذایی بر روی اسپرژیلوس نایجر. نهمین کنگره سراسرس تغذیه ایران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز.
۵. خلیقی سیگارودی، ف،، اهوازی، م، ابراهیم زاده معبود، ح، معبود،، رحیمی فرد، ن. ۱۳۹۲. بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس و اثرات آنتی اکسیدانی، محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی عصاره گیاه *Nepeta pogonosperma*. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۹۸-۱۸۵.

به طور کلی با توجه به آزمون حسی و میکروبی نمونه های دوغ حاوی ترکیبات مختلف، می توان چنین نتیجه گیری نمود که هر چند تیمار ریزپوشانی در سطح ۳ درصد در آخرین روز نگهداری بیشترین میزان ترکیبات فنلی و کمترین بار میکروبی را دارا بود، اما از آنجایی که بیشتر مصرف کنندگان خصوصیات حسی دوغی را ترجیح دادند که دارای مقدار ۱ درصد عصاره ریزپوشانی بود، بنابراین، می توان عصاره ریزپوشانی شده پونه سالی بینالودی در سطح ۱ را به عنوان جایگزینی برای نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم معرفی نمود که در کنار حفظ ترکیبات فنلی و کاهش بار میکروبی توانست رضایت حسی مصرف کنندگان را به میزان قابل توجهی جلب نماید.

۴-نتیجه گیری

نتایج نشان داد تمامی غلظت های عصاره پونه سالی بینالودی، حائز فعالیت آنتی اکسیدانی بودند و قدرت آنتی اکسیدانی عصاره پونه سالی بینالودی با غلظت ۶ درصد بیشتر از قدرت آنتی اکسیدان سنتزی هیدروکسی بوتیل تولوئن بود. هم چنین نتایج فعالیت ضدقارچی و باکتریایی عصاره در سیستم مدل نشان داد، عصاره گیاه پونه سالی بینالودی در غلظت ۴ درصد، دارای خاصیت ضدقارچی و میکروبی بیشتری از سوربات پتاسیم (در غلظت ۰/۱ درصد) می باشد. نتایج ارزیابی میکروبی دوغ (تعداد کل کپک و مخمر) تحت تاثیر افزودنی های طبیعی و سنتزی، طی ۲۷ روز نگهداری در شرایط یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس)، نشان داد با افزایش زمان نگهداری، میزان رشد کپک و مخمر افزایش یافت، اما هر دو نوع افزودنی طبیعی و سنتزی سبب کاهش میزان رشد کپک و مخمر در نمونه های تولیدی نسبت به نمونه شاهد شدند. کمترین میزان رشد کپک و مخمر بعد از ۲۱ روز نگهداری در دمای یخچال در نمونه حاوی ۳ درصد دیواره مالتودکسترین و نمونه حاوی ۰/۱ درصد سوربات پتاسیم مشاهده شد. مقایسه بین تیمارها نشان داد که ریزپوشانی می تواند ثبات و عمر مفید ماندگاری ترکیبات فنلی را بطور معنی داری در دوغ افزایش دهد، بطوری که نمونه با ترکیب تیمار ریزپوشانی در سطح ۳ درصد در

13. Arab – Tehrani, E., Jacquot, M., Gaiani, C., Imran, M., Desorby, S., and Linder, M. 2012. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long – chain polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food Science and Technology*, 25: 24-33.
14. Belhaj, N., Arab- Tehrani, E. and Linder, M. 2010. Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochemistry*, 45: 187-195.
15. Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70-76
16. Bicchi, C., Mashaly, M. and Sandra, P. 1984. Constituents of essential oil of Nepeta Nepetella. *Planta Medica*, 50: 96-98.
17. Bilger B. and Solhaug K. 2007. Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV- β irradiation. *Postharvest Biology and Technology*, 45:1-10.
18. Birinci Yildirim, A., Pehlivan Karakas, F. and Ucar Turker, A. 2012. In vitro antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 616-624.
19. Bobis, O., Dezmirean, D., Tomos, L. Flore, C. and M'arghitas, L. A. 2015. Influence of phytochemical profile on antibacterial activity of different medicinal plants against gram-positive and gram-negative bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51: 113-118.
20. Buazzi, M. M. and Marth, E. H. 1991. Mechanism in the inhibition of *Listeria monocytogenes* by potassium sorbate. *Food Microbiology*, 8: 249-56.
21. Campos, C. A., Alzamora, S. M., Gerschenson, L. N. 2000. Inhibitory action of potassium sorbate degradation products against *Staphylococcus aureus* growth in laboratory media. *International*
۶. قلی پور، م.، بابایی، ز.، محمدی، ز.، کریم زاده، ل.، اصفهانی زاده، م. ح.، عابدی، ص. ۱۳۹۲. استاندارد سازی و تعیین میزان سوربات پتاسیم در دوغ به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۲۳ (۱۰۹): ۳۴-۴۴.
۷. محققى ثمرین، آ.، پورآذرنگ، ه.، الهامی راد، ا.ح.، اشیبی، ز.، همت یار، ن. ۱۳۹۰. استخراج ترکیبات فنولیک پوست سیب زمینی راموس با دو روش فراصوت و پرکولاسیون و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آن در روغن سویا. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۸ (۱): ۸۱-۹۱.
۸. میرچولی برازق، ا.، صداقت، ن. ۱۳۹۸. بررسی تاثیر دما و بسته بندی بر ماندگاری دوغ بدون گاز. فصلنامه نوآوری در علوم و فناوری غذایی، ۲ (۳): ۱-۸.
۹. مظاهری کلهرودی، م.، بصیری، ع.، جلالی، ح. ۱۳۹۳. بررسی اثر ضد اکسایشی عصاره دانه رازیانه در روغن سویا و مقایسه آن با ضد اکساینده های سنتزی BHT و BHA. فصلنامه علوم و فناوری های نوین غذایی، ۱ (۳): ۱۵-۲۷.
۱۰. نجفی، م.، کدخدایی، ر. ۱۳۹۰. ریزپوشانی لیمون به روش خشک کردن انجمادی. نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، ۷ (۳): ۲۱۷-۲۱۰.
11. Akhavan Mahdavia, S., Jafarib, S. M., Assadpoora, E. and Ghorbani, M. 2016. Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation. *Journal of Food Engineering*, 181: 59-66.
12. Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L. and Gordon, M. H. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108: 55-63.

- Benth. oil and its major constituent (7R)-trans,trans-nepetalactone: A comparative study. *Industrial Crops and Products*, 55 : 70–74.
32. Mendez, E., Sanhueza, J., Speisky, H. and Valenzuela, A. 1996. Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73: 1033–1037.
 33. Mohammadpour, N., Emami S. A. and Asili, J. 2013. Identification of Volatile Oil Components of *Nepeta binaludensis* Jamzad by GC-MS and ¹³C-NMR Methods and Evaluation of its Antimicrobial Activity. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16 (1): 102 – 107.
 34. Mortazavi, A., Kasshani Nejad, M. and Ziaolhagh H. Food microbiology (W.C. Frazier), 1 rd ed. Mashhad: Ferdowsi University Press; 2002. p. 209-297.
 35. Nogala-Kalucka, M., Korczak, J., Dratwia, M., Lampart-Szczapa, E., Siger, A. and Buchowski, M. 2005. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. *Food Chemistry*, 93: 227–235.
 36. Pauli, A. 2006. α -Bisabolol from chamomile-A specific ergosterol biosynthesis inhibitor. *Journal of Aromatherapy*, 16:5-21.
 37. Pu, J. 2010. Development of stable microencapsulated astaxanthin powders using extracted astaxanthin from craw fish and shrimp by products, A thesis, B.E., Jiangnan University.
 38. Ronda, F., Gomes, M., Blanco, C.A. and Caballero, P.A. 2005. Effects of polyols and nondigestible oligosaccharides on the quality of sugar free sponge cakes. *Journal of Food Chemistry*, 90: 549-55
 39. Sagdic, O., Ozturk, I. and Kisi, O. 2012. Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. *Expert Systems with Applications*, 39: 6792- 6798.
 22. Davis, P. H. 1982. Flora of Turkey and the east Aegean islands (7), Edinburgh: Edinburgh University Press, pp. 400–461.
 23. De Pooter, H. L., Nicolai, B., De Buyck, L. F., Goetghebeur, P. and Schamp, N. M. 1987. The essential oil of *Nepeta nuda*. Identification of a new nepetalactone diastereoisomer. *Phytochemistry*, 26: 2311–2314.
 24. Ersus, S. and Yurdagel, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80:805-812
 25. Frankel, E.N. 1998. Lipid Oxidation. The Oily Press LTD.
 26. Godbole, M. Potassium Sorbate Dangers and Side Effects. (Online). Available at: <http://www.buzzle.com/articles/are-there-potassium-sorbate-dangers-and-side-effects.html> Accessed January 14, 2013.
 27. Han, S., Yang, S., Cai, Z., Pan, D., Li, Z., Huang, Z., Zhang, P., Zhu, H., Lei, L. and Wang, W. 2015. Anti-Warburg effect of rosmarinic acid via miR-155 in gastric cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 9: 2695–2703.
 28. Hosseinzadeh, H. and Nassiri-Asl, M. 2014. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of Endocrinological Investigation*, 37: 783–788.
 29. Jalil, A. and Jamzad, Z. 1999. Red Data Book of Iran: a Preliminary Survey of endemic, Rare and Endangered Plant Species in Iran. Institute of Forests and Rangelands Pub, pp: 784 - 5.
 30. Köksal, E., Tohma, H., Kılıç, O., Alan, Y., Aras, A., Gülçin, I. and Bursal, E. 2017. Assessment of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Nepeta trachonitica*: Analysis of Its Phenolic Compounds Using HPLC-MS/MS. *Scientia Pharmaceutica*, 85, 24.
 31. Kumar, V., Mathela, C. S., Tewari, G. and Singh, D. 2014. Antifungal activity of *Nepeta elliptica* Royle ex

40. Samarin, A.M., Poorazarang, H. Hematyar, N. and Elhamirad, A. 2012. Phenolics in potato peels: Extraction and utilization as natural antioxidants. *World Applied Sciences Journal*, 18(2): 191-195.
41. Soottitantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., and Linko, P. 2005. Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated d-limonene by spray drying. *Innovative Food Science of Emerging Technology*, 6 (1): 107-114.
42. Teodoro, R. A. R., Fernandes, R. V., Botrel, D. A., Borges, S. V. and de Souza, A. U. 2014. Characterization of microencapsulated rosemary essential oil and its antimicrobial effect on fresh dough, *Food and Bioprocess Technology*, 7(9): 2560-2569.
43. Tfouni, S. A. V., Toledo, M. C. F. 2002. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food Control*, 13(2): 117-123.
44. Torronen, R. 2009. Source and health effect of dietary ellagitannins. In S. Quideau (Ed.), Chemistry and biology of ellagitannins – an underestimated class of bioactive plant polyphenols. Singapore: Imperial College Press/World Scientific Publishing.
45. Upadhyay, R. and Rao, L. J. M. 2013. An outlook on chlorogenic acids- occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53: 968-984.
46. Usenik, V., Fabcic, J. and Stampar, F. 2008. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 107: 185-192.
47. Wang, G., Chen, J. and Shi, Y. 2013. Preparation of microencapsulated xanthophyll for improving solubility and stability by nanoencapsulation. *Journal of Food Engineering*, 117: 82-88.

(Original Research Paper)
Antioxidative and Antimicrobial Properties of Free and Microencapsulated Extracts of Nepeta (*Nepeta Binaludensis*)

Afsaneh Azimi Mahalleh¹, Seyyed Ali Mortazavi², Parvin Sharayeei^{3*}, Elham Azar Pazhooh³, Razieh Niazmand⁴

1-Ph.D Graduated of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

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

3- Assistant Professor, Department of Technical Researches and Agricultural Engineering, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization, Mashhad, Iran.

4-Assistant Professor, Department of Food chemistry, Food Science and Technology Research Institute, Mashhad, Iran.

Received:12/03/2018

Accepted:12/06/2018

Abstract

The present study was carried out with the aim of investigation on the antioxidant and antimicrobial effects of free and microencapsulated *Nepeta Binaludensis* extract in the model and food system (Dough). For this purpose, the *Nepeta Binaludensis* extract was extracted by using the pulse electric field process (voltage of 6000 volts and number of pulse 60) and its antioxidant properties in different concentration (0.5, 2, 4 and 6 %) on the oxidative stability of purified soybean oil were monitored in comparison with the synthetic antioxidant hydroxy butyl toluene (0.01%). Moreover, the antimicrobial properties of the free extract (0.2 and 0.6%) and the microencapsulated extract (1 and 3%) were evaluated in comparison with the synthetic preservative of potassium sorbate (0.1% concentration) in the model and Dough . The results showed that all concentrations of *Nepeta Binaludensis* extract had antioxidant activity and the antioxidant strength of the extract at a concentration of 6% (11.99 hours) was higher than the synthetic antioxidant activity of hydroxy butyl toluene (8.33 h). The results showed that *Nepeta Binaludensis* extract at 6% concentration had more antifungal and antimicrobial activity than potassium sorbate. In addition, the free and microencapsulated extracts were able to control the growth of mold and yeast by maintaining the sensory and phenolic characteristics in the dough. The lowest mold and yeast growth after 21 days of storage in a refrigerated condition was observed in a sample containing 3% of the microencapsulated extract which is equal to the effect of the chemical preservative, potassium sorbate.

Keywords: Phenolic Compounds, Mold and Yeast, Extract, Antioxidant, *Nepeta Binaludensis*, Dough

*Corresponding Author: parvin_sharayeei@yahoo.com

