

(مقاله پژوهشی)

ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی و عملکردی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین جوانه گندم

سکینه قلیچ^۱، پیمان آریایی^{۲*}، محمد احمدی^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۹

DOI: 10.30495/jfst.2021.1940928.1757

چکیده

پپتیدهای زیست فعال موجود در پروتئین هیدرولیز شده دارای خواص عملکردی مناسب و فعالیت آنتی اکسیدانی بالا می باشد. هدف از این مطالعه، تولید پروتئین هیدرولیز شده از جوانه گندم با بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی و عملکردی در آن می باشد. بدین منظور پروتئین هیدرولیز شده جوانه گندم توسط آنزیم های تجاری آلکالاز و فلاورزایم (pH بهینه فعالیت آلکالاز ۸/۵، فلاورزایم ۷)، در بازه های زمانی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه تولید شد. مقادیر درجه هیدرولیز، خواص عملکردی (pH ۷) شامل حلالیت، خاصیت کف زایی و امولسیون کنندگی و همچنین خواص آنتی اکسیدانی شامل خنثی سازی رادیکال آزاد DPPH و ABTS و قدرت احیاء کنندگی فریک اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز از درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به آنزیم فلاورزایم برخوردار بود. همچنین افزایش زمان هیدرولیز، تاثیر مثبتی بر پارامترهای مذکور داشت ($p < 0/05$). به طوری که بیشترین مقادیر درجه هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد (۲۸/۲۶ درصد) و این تیمار بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی و خواص عملکردی را دارا بود ($p < 0/05$). به طور کلی می توان گفت پروتئین هیدرولیز شده حاصل از جوانه گندم (توسط آنزیم آلکالاز) بهترین ویژگی های عملکردی و آنتی اکسیدانی را از خود نشان داد. بنابراین می توان از آن به عنوان جایگزین پروتئین های حیوانی در رژیم غذایی و همچنین بعنوان ترکیبات عملگرا در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، آنزیم های تجاری، جوانه گندم، آنتی اکسیدانی، خواص عملکردی.

۱- مقدمه

در حال حاضر پپتیدهای زیست فعال با استقبال روزافزونی برای استفاده در فرمولاسیون مواد غذایی فراسودمند مواجه هستند. پروتئین‌ها علاوه بر خواص تغذیه‌ای نقش مهمی در فرآیند کردن و توسعه مواد غذایی دارند. این ترکیبات مسئول بروز بسیاری از ویژگی‌های عملکردی بوده و بنابراین تأثیر به‌سزایی بر نظر مصرف‌کننده در مورد ماده غذایی خواهند داشت (۲۱). اهمیت ویژگی‌های عملکردی بسته به نوع محصولی که پروتئین در آن استفاده می‌شود متفاوت است. به منظور استفاده بهتر از پروتئین‌ها به عنوان اجزاء غذایی و به این علت که بیشتر پروتئین‌ها به صورت دست نخورده قادر به تأمین خواص مطلوب و مورد نظر صنعت نمی‌باشند، بنابراین بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها ضروری به نظر می‌رسد (۱). اصلاح آنزیمی پروتئین‌ها با استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک به منظور شکست باندهای پپتیدی خاص و اصلاح پروتئین‌ها به طور گسترده در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ویژگی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی تحت تأثیر شرایط هیدرولیز (دما، pH، نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان) و نوع آنزیم قرار می‌گیرد. پپتیدهای حاصل از هیدرولیز از نظر ویژگی‌های تغذیه‌ای، عملکردی و بیولوژیکی با پروتئین‌های اولیه متفاوت هستند. مطالعه‌های انجام شده نشان داد علاوه بر ویژگی‌های تغذیه‌ای پروتئین‌های هیدرولیز شده این ترکیبات دارای چندین اثر بیولوژیکی نیز می‌باشند. این مطالعه‌ها شامل استفاده از آنزیم‌های تجاری (آلکالاز، تریپسین، فلاورزایم، پیپسین، پانکراتین، کیموتریپسین و غیره) در شرایط مختلف هیدرولیز از جمله زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا، pH مخصوص هر آنزیم و دما می‌باشد (۱۴، ۲۰، ۲۴). در سال‌های اخیر، پروتئین‌های هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی و سلامتی بخش از منابع حیوانی و گیاهی بسیاری مانند شیر، لوبیای سویا، جوانه گندم، کانولا، پروتئین زرده ی تخم مرغ، جاندار دریایی blood clams، صدف خوراکی و ضایعات ماهی و میگو تولید شده اند (۸). در بین منابع گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده، منابع گیاهی به دلیل قیمت مناسب تر و آلرژی‌زایی کمتر،

بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۰). گندم یکی از سه محصول عمده غلات است که سطح کاشت آن ۲۶ درصد عملکرد دانه را شامل می‌شود و بیش از نیمی از تولید غذای اصلی را به خود اختصاص داده است. نسبت جوانه گندم حدود ۲ درصد در دانه کامل گندم است که به عنوان مغذی‌ترین قسمت دانه گندم محسوب می‌شود. جوانه گندم فرآورده جانبی حاصل از آسیاب گندم بوده و منبع عمده ویتامین‌ها و ترکیبات عملکردی مانند فرولیک اسید، فنیک اسید، گلوکاتایون، فیتواسترول و همچنین مواد معدنی، فیبر رژیمی و فلاونوئیدها می‌باشد. نظر به ارزش تغذیه‌ای بالا و ویژگی‌های عملکردی مناسب، متخصصان تغذیه، از جوانه گندم به عنوان خزانه مغذی طبیعی و منبع زندگی بشر یاد می‌کنند. جوانه گندم همچنین غنی از اسیدهای آمینه به ویژه اسیدهای آمینه ضروری که در بسیاری از دانه‌های غله‌ای کمیاب هستند مانند لیزین، متیونین و ترونین می‌باشد، به همین دلیل، یکی از منابع مهم و با ارزش پروتئین‌های گیاهی به شمار می‌رود (۱۲، ۱۴، ۳۳). صادقیان و همکاران (۱۳۹۸) به بررسی اثر زمان فرایند هیدرولیز (۰-۳۰۰ دقیقه) با هر یک از آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین را بر درجه هیدرولیز پروتئین کینوا پرداختند. نتایج حاکی از افزایش پیوسته درجه هیدرولیز در طول زمان فرآیند بود. بالاترین درجه هیدرولیز پروتئین کینوا مربوط به نمونه هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز و در زمان ۳۰۰ دقیقه به دست آمد. اگرچه در سایر بازه‌های زمانی، تفاوتی بین مقدار این شاخص در نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز و پانکراتین مشاهده نشد (۱). با توجه به اینکه جوانه گندم با داشتن ترکیبات با ارزش تغذیه‌ای بالا، اثرات مفیدی روی سلامتی انسان داشته و در عین حال منبع پروتئینی ارزان‌قیمتی است که سالانه به مقدار زیادی طی فرایند آسیاب گندم در سراسر جهان، به صورت ضایعات از دست می‌رود، می‌توان پروتئین موجود در آن را که به عنوان یکی از بهترین منابع پروتئین‌های گیاهی شناخته می‌شود، به منظور مصارف انسانی، استخراج و یا هیدرولیز کرده و در فرمولاسیون مواد غذایی به کار برد. هدف از مطالعه حاضر تولید پپتید از جوانه گندم توسط آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی این پپتیدها می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

جوانه گندم از کارخانه آردتابان (تهران) تهیه شد. آنزیم آلکالاز L2.4 (استخراج شده از *Bacillus licheniformis*) و فلاورزایم 500L (استخراج شده از *Aspergillus oryzae*) از شرکت نووازیم، دانمارک تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان فعالیت آنزیمی به صورت واحد آنسون به ازای هر کیلوگرم پروتئین به سوبسترا (Au/kg protein) ارائه شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از شرکت مرک آلمان تهیه و از درجه آزمایشگاهی برخوردار می‌باشند.

۲-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده

۲-۲-۱- آماده‌سازی ایزوله پروتئین از جوانه گندم

جوانه گندم پس از تمیز شدن به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های آن تحت دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و سپس به مدت ۸ ساعت توسط n-هگزان چربی‌زدایی و در دمای اتاق خشک شد. جوانه گندم فاقد چربی با استفاده آسیاب چکشی آزمایشگاهی آسیاب و آرد حاصله پس از غربال شدن بامش ۷۰، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (۳۴). آرد جوانه گندم فاقد چربی در محلول ۱ mol/L NaCl (۱:۸ w/v) در دمای محیط برای ۳۰ دقیقه همزده و سپس pH آن روی ۹/۵ تنظیم شد. بعد از ۳۰ دقیقه همزدن، سوسپانسیون در ۸۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی در pH ۴ با استفاده از ۱ mol/L HCl جهت رسوب پروتئین‌ها تنظیم شد و دوباره در ۸۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوبات چندین بار با آب مقطر شسته و در آب مقطر حاوی NaOH تا pH ۷ تنظیم شد. ذرات پراکنده با استفاده از خشک‌کن انجمادی (FDB-550، ایران، کره جنوبی) خشک شد (۳۴).

۲-۲-۲- هیدرولیز ایزوله پروتئینی حاصل از جوانه گندم

۵۰ گرم نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن (DHS, 700، ایران) به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. سپس با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH

بهینه فعالیت آنزیم‌ها (آلکالاز ۸/۵، فلاورزایم ۷)، رسانده شد. نمونه مادر حمام آبی متحرک (لاتویا، بیوسان، لتونی) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه و پس از هر بار نمونه‌گیری (زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۳۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از خشک شدن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع رویی جمع‌آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد، سپس با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (مدل Operon FDB-550، ساخت کشور کره) به صورت پودر در آمد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (۲۹).

۲-۳- درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و سپس با دور ۶۷۰۰ rpm و زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان هیدرولیز از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید (۱۹):

معادله (۱)

(میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد / میزان پروتئین در نمونه) = درجه هیدرولیز

۲-۴- ترکیب اسید آمینه

۱ گرم پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شد. سپس با استفاده از فنیل ایزو تیوسیانات^۱ (PITC) عمل مشتق‌سازی اسیدهای آمینه انجام شد. میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line (آلمان) و با استفاده از آشکار ساز فلورسنت (RF-530، کنور، آلمان) تعیین شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از فتال

دی-آلدئید^۱ (OPA) مشتق شده و با استفاده از ستون C18 با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه با آشکارساز فلورسانس آنالیز شدند (۱۳).

۲-۵-۵-اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

۲-۵-۱- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

بدین منظور ۱ میلی لیتر از تیمارهای مختلف پروتئین هیدرولیز شده به طور جداگانه با ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۶۰ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده و سپس جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۱۷ nm در مقابل شاهد (آب مقطر) خوانده شد. (۶)

معادله (۲)

۱۰۰×(جذب شاهد / جذب شاهد-جذب نمونه) = درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

۲-۵-۲- اندازه گیری قدرت احیا کنندگی آهن (FRAP)

این آزمون مطابق روش Bougategf و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. ۰/۵ میلی لیتر نمونه محلول با ۲/۵ میلی لیتر فسفات بافر ۰/۲ مولار (pH ۶/۶) و با ۲/۵ میلی لیتر فریک سیانید پتاسیم ۱ درصد ترکیب شد و ترکیب فوق به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۵۰ درجه قرار داده شد و سپس با ۲/۵ میلی لیتر، تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد ترکیب و با دور ثابت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و ۲/۵ میلی لیتر از لایه بالایی این محلول با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی لیتر فریک کلرید (FeCl₃) ۰/۱ درصد ترکیب شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و سپس جذب در ۷۰۰ نانومتر قرائت شد (۶).

۲-۵-۳-اندازه گیری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش ABTS

ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد ABTS (۲،۲-آزینوبیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) باروش Memarpoor-Yazdi و همکاران (۲۰۱۲) تعیین شد (۱۸). محلول رادیکال ABTS با مخلوط کردن ۵ میلی لیتر از ۷ABTS میلی مولار و ۸ میکرومولار

1-o-phthalaldialdehyde

پتاسیم پروسولفات ۱۴۰ میلی مولار مهیا شد و ۱۶ ساعت در دمای محیط در تاریکی نگهداری شد، ۰/۵ میلی لیتر از محلول موجود با ۴۰ میلی لیتر بافر فسفات (۵ میلی مولار، pH ۴/۴، حاوی ۰/۲ NaCl) تاجذب محلول رادیکال ABTS بتواند در ۷۳۴ نانومتر عدد 0.02 ± 0.07 به دست آید، ترکیب شد. ۶۵ میکرومولار نمونه محلول با ۶۵ میکرومولار بافر فسفات ترکیب شد ۶۶/۶۷ میکرومولار از این مخلوط با ۹۱۰ میکرو-مولار محلول ABTS ترکیب شد و ۶۶/۶۷ میکرومولار بافر فسفات به عنوان شاهد با ۹۱۰ میکرومولار محلول ABTS ترکیب شد و پس از ۱۰ دقیقه در دمای محیط در تاریکی قرار گرفت و جذب در ۷۳۴ نانومتر قرائت شد. فعالیت پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

معادله (۳)

۱۰۰×(میزان جذب کنترل / میزان جذب نمونه) - ۱ = درصد پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS

۲-۶-۲- خواص عملکردی

۲-۶-۱- حلالیت

حلالیت پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از روش Mukherjee و Bera (۱۹۸۹) انجام شد. یک گرم نمونه را در ۱۰۰ میلی لیتر محلول آب مخلوط کرده و با استفاده از سود و اسید ۰/۱ نرمال pH آن را به ۱۰-۲ تنظیم کرده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط کرده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰ سانتریفوژ انجام شده و محتوای نیتروژن در سوپرناتانت نمونه با استفاده از روش کلدال تعیین شد و درصد پروتئین قابل حل با استفاده از معادله (۴۲) محاسبه شد (۵).

معادله (۴)

۱۰۰×(گرم وزن نمونه اولیه / گرم وزن آب ماده جامد محلول در سوپرناتانت) = تدیس حلالیت در آب

۲-۶-۲- ظرفیت و پایداری امولسیون کنندگی

به ۳ گرم نمونه، ۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۵۰ میلی لیتر روغن کلزا اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با هموژنایزر (APU500b، دیلکوفناور، ایران) هموژنیزه شد سپس به مقدار مساوی در ۴ لوله آزمایش تقسیم گردید و با سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰g به مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفوژ (بهداد، ایران) شد EC طبق معادله (۵) زیر گزارش شد (۲۶).

معادله (۵)

حجم کل / حجم قسمت امولسیفیه شده = EC(%)

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و نتیجه به صورت میانگین با انحراف معیار گزارش گردید. آنالیز آماری تیمارها توسط جدول آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار (SPSS version 18) صورت گرفت. برای بیان اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد و نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel ترسیم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مقادیر درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز به‌عنوان یک پارامتر ناظر بر میزان هیدرولیز پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد، این فاکتور بیشتر به‌عنوان یک شاخص جهت مقایسه میان پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی مختلف کاربرد دارد. از طرفی درجه هیدرولیز یکی از مهمترین فاکتورهای بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده است که میزان شکسته شدن پیوندهای پپتیدی رایبان می‌کند و باید کنترل گردد (۲۹). نتایج مربوط به درجه هیدرولیز (جدول ۱) نشان‌دهنده این نکته است که کارایی هیدرولیز آنزیمی بسته به شرایط فرآیند، نوع آنزیم و زمان هیدرولیز متفاوت است. به طوری که با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر درجه هیدرولیز افزایش یافت. بر اساس نتایج به دست آمده از اثر زمان بر هیدرولیز پروتئین، با افزایش زمان واکنش، هیدرولیز آنزیمی بایک فاز سریع آغاز می‌شود و در این مرحله تعداد بسیار زیادی از پیوندهای پپتیدی شکسته می‌شود. همچنین، افزایش زمان فرآیند موجب طولانی‌تر شدن فعالیت آنزیم و اثر آن بر سوبسترا می‌گردد (۱۹). همچنین درجه هیدرولیز توسط آلکالاز بیشتر از فلاورزایم بوده است. آلکالاز به دلیل تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالا در مدت زمان کم، به طور مکرر توسط محققین مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳، ۱۹، ۲۹، ۳۱).

۱۰ میلی‌لیتر روغن گیاهی کلزا با ۳۰ میلی‌لیتر محلول پروتئینی ۱ درصد مخلوط شد و pH آنها در پنج pH متفاوت ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ تنظیم شد سپس با هموژنایزر با سرعت ۲۰۰۰ rpm به مدت یک دقیقه هموژنیزه شد سپس با میکروسپیلر ۵۰ میکرولیتر از قسمت مایع ته لوله برداشته که این عمل در زمان‌های $t=0'$ و $t=10'$ انجام گرفت. سپس نمونه‌های به دست آمده در زمان‌های صفر و ده دقیقه با ۵ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات ۱٪ مخلوط شد و جذب محلول رقیق شده با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد (۲۶).

معادله (۶)

$$ESI = A_0 \times \Delta t / \Delta A$$

$$\Delta A = A_0 - A_{10}, \Delta t = 10 \text{ min}$$

۳-۶-۲- اندازه‌گیری ظرفیت و پایداری کف‌کنندگی

برای اندازه‌گیری ظرفیت کف‌کنندگی ۲۰ میلی‌لیتر محلول‌های پروتئینی با pH ۵-۸ تهیه شد و در استوانه مدرج ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس به مدت یک دقیقه با هموژنایزر با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد. حجم مخلوط نهایی قرائت شد. درصد افزایش حجم در زمان صفر نسبت به حجم اولیه به عنوان ظرفیت کف‌کنندگی در نظر گرفته شد (معادله ۷) (۲۵).

معادله (۷)

حجم نمونه قبل تشکیل کف / حجم نمونه در زمان‌های مختلف بعد از تشکیل کف - حجم نمونه قبل تشکیل کف = ظرفیت کف‌کنندگی (۷)

برای محاسبه میزان پایداری کف، حجم کف در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه بعد از تشکیل کف قرائت شد. سپس با استفاده از رابطه بالا، درصد حجم کف باقی‌مانده در هر یک از زمان‌های مذکور به عنوان شاخص پایداری کف گزارش شد (۲۵). (معادله ۸)

معادله (۸)

$$\text{پایداری کف} = \frac{V_0 \times 100}{\Delta V}$$

V_0 : مقدار حجم کف در زمان صفر، ΔV : تغییرات حجم کف

در بازه زمانی

جدول ۱- مقادیر درجه هیدرولیز پروتئین های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم های مختلف

فلاورزایم	آلکالاز	آنزیم
		زمان هیدرولیز (دقیقه)
$6/50 \pm 0/82^{Bc}$	$11/36 \pm 0/33^{Ac}$	۱۰
$13/51 \pm 0/50^{Bb}$	$20/40 \pm 0/54^{Ab}$	۲۰
$17/25 \pm 1/51^{Ba}$	$28/26 \pm 1/74^{Aa}$	۳۰

(۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین \pm انحراف از معیار)

(۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (A, B)

(۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (a, b, c, ...)

۳-۲- ترکیب اسید آمینه

مطالعه ترکیب اسیدهای آمینه مواد مغذی مانند پروتئین هیدرولیز شده برای درک ارزش غذایی، خواص عملکردی و خواص آنتی اکسیدانی آن ها ضروری است. خاصیت بیواکتیو پروتئین و پپتید هیدرولیز شده به شدت تحت تأثیر پروفایل اسید آمینه می باشد (۲۷). نتایج مربوط به ترکیب اسید آمینه پروتئین های هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز و فلاورزایم در زمان ۳۰ دقیقه (با توجه به بالاتر بودن درجه هیدرولیزاسیون) نشان داد، بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم گلو تامیک اسید $15/45$ ، $13/99$ درصد و پس از آن اسید آمینه اسپارتیک اسید $9/11$ ، $9/35$ درصد (به ترتیب) بوده است. این نتایج با نتایج Attia و همکاران (۲۰۱۱) هم خوانی داشت (۴). آن ها بالاترین مقادیر اسید آمینه پروتئین جوانه گندم را به ترتیب گلو تامیک اسید ($14/64$ درصد) و اسپارتیک اسید ($12/76$ درصد) اعلام نمودند. همچنین با نتایج Zhu و همکاران (۲۰۰۶) هم خوانی داشت (۳۴). آنها نیز بالاترین مقادیر اسید آمینه ایزوله پروتئین جوانه گندم را به ترتیب گلو تامیک اسید ($15/08$ درصد) و اسپارتیک اسید ($9/34$ درصد) اعلام نمودند. تنها اسید آمینه محدود مطابق FAO/WHO ۱۹۹۰ برای آنزیم آلکالاز، فنیل آلانین

و برای آنزیم فلاورزایم، فنیل آلانین و لیزین بوده است. در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که جوانه گندم منبع خوبی از اسیدهای آمینه ضروری و پروتئین با کیفیت بالا است (۹). و این نتایج با نتایج Attia و همکاران (۲۰۱۱) هم خوانی داشت (۴). به طور کلی، ترکیب اسید آمینه هیدرولیزهای پروتئین منعکس کننده ترکیبات ایزوله پروتئین است، که نشان می دهد روند هیدرولیز پروتئین تأثیر منفی بر ترکیب اسید آمینه هیدرولیزها ندارد (۳). مشخصات اسید آمینه هیدرولیز شده تا حد زیادی به پروتئاز مورد استفاده وابسته است. اسیدهای آمینه، رادیکال های آزاد را با اهدای پروتون خنثی می کنند، رادیکال های آزاد محلول در چربی (رادیکال های پراکسید) که در سراسر اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده تولید می شوند. توسط اسیدهای آمینه آبگریز مانند لوسین، والین، آلانین و پرولین خنثی می شوند (۲۲). بنابراین، می توان ادعا کرد که پروتئین های هیدرولیز شده به دلیل وجود اسیدهای آمینه مختلف ممکن است اثرات مفیدی بر روی چندین نوع رادیکال آزاد داشته باشند و همچنین اسیدهای آمینه مذکور در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود، بنابراین به نظر می رسد خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری نیز داشته باشند.

جدول ۲- ترکیب اسید آمینه موجود در پروتئین هیدرولیز شده

FAO/ WHO, 1990	فلاورزایم	آلکالاز	اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)
	۲/۶۹	۲/۹۹	هیستدین ^۱
۲/۸۰	۴/۲۵	۳/۹۰	ایزو لوسین ^{۱،۲}
۶/۶۰	۶/۸۵	۷/۱۵	لوسین ^{۱،۲}
۵/۸۰	۵/۵۵	۶/۲۵	لایزین ^۱
	۳/۰۵	۲/۵۹	متیونین ^{۱،۲}
۶/۳۰	۴/۶۵	۴/۸۹	فنیل آلانین ^{۱،۲}
۳/۴	۴/۲۵	۴/۰۹	تروئین ^{۱،۲}
۳/۵	۵/۹۸	۵/۶۵	والین ^۱
	۷/۲۱	۶/۹۹	آرژنین ^۱
	۹/۱۱	۹/۳۵	آسپارتیک اسید
	۴/۸۹	۵/۰۵	پروлін ^۲
	۵/۱۵	۴/۹۵	سرین
	۷/۹۸	۸/۷۵	آلانین ^۲
	۰/۱۲	۰/۱۵	سیستئین
	۱۳/۹۹	۱۵/۴۵	گلوتامیک اسید
۱/۱	۲/۹۸	۳/۱۵	تیروزین ^۲
	۵/۳۵	۵/۸۹	گلايسين
	۴۷/۲۹	۴۵/۷۶	نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه
	۰/۸۹	۰/۸۳	نسبت اسید آمینه ضروری به اسید آمینه غیر ضروری
	۹۴/۰۷	۹۷/۲۴	میزان اسید آمینه کل
	۲/۶۹	۲/۹۹	^۲ HAA

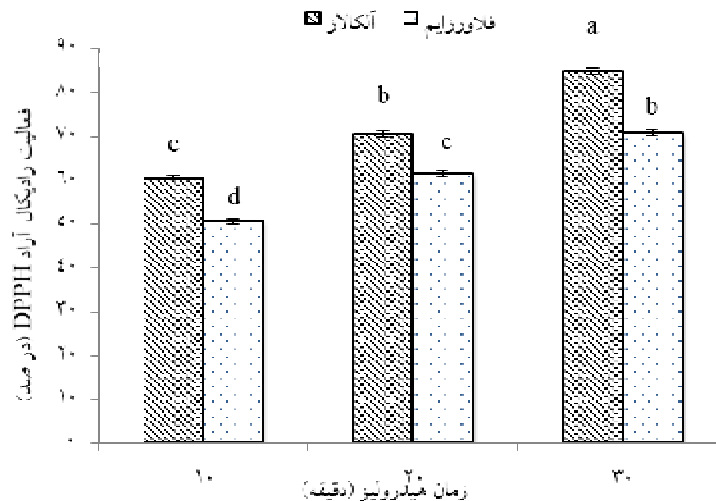
^۱ اسید آمینه ضروری^۲ مجموع اسیدهای آمینه آبگریز (آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروزین، فنیل آلانین، تربیتوفان، پرولین، متیونین و سیستئین)

۳-۳- خاصیت آنتی اکسیدانی

۳-۳-۱- فعالیت رادیکال آزاد DPPH

آزمون فعالیت رادیکال آزاد DPPH معمولاً برای اندازه گیری توانایی مهار رادیکال آزاد یک نمونه استفاده می شود. DPPH، رادیکال چربی دوستی است که دارای جذب بیشینه در طول موج ۵۱۷ نانومتر می باشد که تمایل به پذیرش پروتون دارد، بنابراین، هنگامی که ترکیبی دارای پروتون آزاد وجود داشته باشد، همانند آنتی اکسیدان، با از بین بردن رادیکال آزاد DPPH منجر به کاهش جذب اندازه گیری می شود. بنابراین خاصیت آنتی اکسیدانی چنین ترکیبی به عنوان توانایی آن در مهار رادیکال های DPPH بیان می شود (۲). با توجه به نتایج تمامی پروتئین های هیدرولیز شده (شکل ۱) توانایی بالایی برای حذف رادیکال آزاد DPPH دارا بودند و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود و با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت. به طوری که پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود (۸۴/۹۶ درصد). ویژگی آنزیم، نوع و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک تولید

شده از طریق هیدرولیز از جمله دلایل اصلی فعالیت رادیکال آزاد DPPH می باشد. بنابراین به نظر می رسد، آنزیم آلکالاز احتمالاً پپتیدهایی تولید می کند که اهداکننده الکترون یا هیدروژن هستند، که می توانند با رادیکال های آزاد واکنش دهند و محصولات پایدارتری ایجاد کنند، واکنش زنجیره ای رادیکال را خاتمه دهند (۲۰). Karami و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی (فعالیت رادیکال آزاد DPPH) پروتئین هیدرولیز شده جوانه گندم توسط آنزیم پپسین، آلکالاز و پروتئیناز پرداختند، آنها نیز اعلام نمودند پروتئین هیدرولیز شده جوانه گندم دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بود و همانند مطالعه حاضر خاصیت آنتی اکسیدانی توسط آنزیم آلکالاز بالاتر از پروتئیناز بود (۱۴). Varedesara و همکاران (۲۰۲۱) نیز اعلام نمودند با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده هسته انگور افزایش یافت. متغیرهای مستقل هیدرولیز تأثیر مستقیمی بر فعالیت آنزیم داشته و به دنبال آن بر خواص ضد اکسایش پپتیدهای نهایی مؤثرند. بنابراین ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده از طریق انجام بیش از یک نوع روش درک بهتری از فعالیت آنها ارائه میدهد (۲۹).

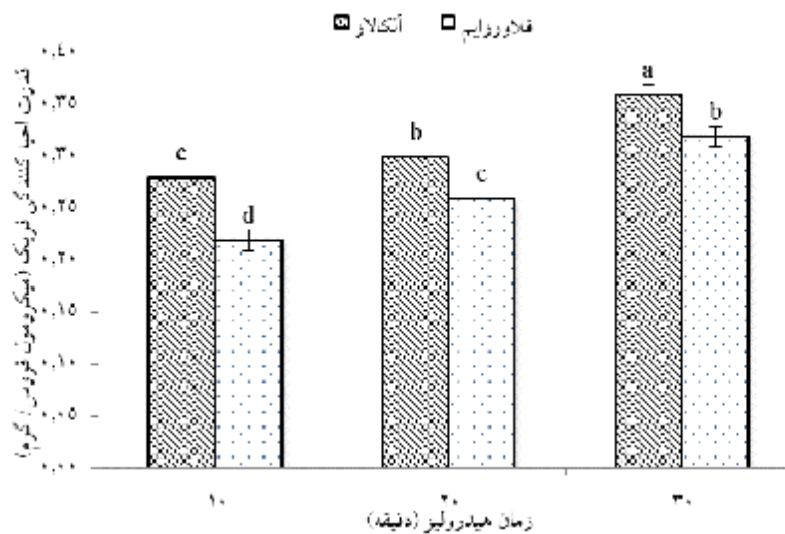


شکل ۱- مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH

۳-۳-۲- قدرت احیاءکنندگی فریک

روش سنجش قدرت احیاء آهن پتانسیل اهدای الکترون یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی مانند پپتیدها را ارزیابی می‌کند که در نتیجه Fe^{3+} به یون Fe^{2+} کاهش می‌یابد. پتانسیل آنتی‌اکسیدانی یک ترکیب زیست‌فعال با قدرت کاهش‌دهنده آن ارتباط مستقیم دارد که این امر در مطالعات قبلی تایید شده است (۲، ۳۱). نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد (شکل ۲) تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده توانایی بالایی برای قدرت احیاء آهن دارا بودند دارا بودن توانایی قدرت احیاء آهن در پروتئین هیدرولیز شده سایر پروتئین‌های گیاهی نظیر کنجاله دانه کدو (۲۰)، بذر هویج (۳۲)، گزروغنی (*Moringa oleifera*) (۲) و گیاه آشلاتوس (*Amaranthus cruentus*) (۲۳)، نیز اعلام شد. قدرت احیاءکنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود و با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر قدرت احیاءکنندگی یون آهن افزایش یافت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان ۳۰ دقیقه بالاترین فعالیت

آنتی‌اکسیدانی را دارا بود (۳۶/۰ میکرومول فروس/گرم)، که این نتایج می‌تواند با این واقعیت همراه باشد که هیدرولیز با استفاده از آنزیم‌های مختلف ممکن است باعث تولید پپتیدهایی با طول و ساختارهای مختلف و متعاقباً پتانسیل‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی شود. آلکالاز یک آنزیم با خاصیت گسترده است، که می‌تواند پیوندهای پپتیدی را از داخل زنجیره پپتید جدا کند و باعث آزاد شدن پپتیدهای الیگو/ پلی زنجیره کوتاه یا متوسط حاوی آمینواسیدهای آب‌گریز مانند فنیل آلانین، تروئین، لوسین، متیونین و والین می‌باشد (۲۰). همچنین با افزایش زمان هیدرولیز و کاهش اندازه پپتیدهای تولیدی بر قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد توسط پپتیدها افزوده شد. نتایج مشابهی توسط Varedesara و همکاران (۲۰۲۱) در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده هسته انگور مشاهده شد آنها نیز اعلام نمودند با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر قدرت احیاء آهن افزایش یافت و آنزیم آلکالاز دارای قدرت احیاء آهن بالاتری نسبت به آنزیم فلاورزایم بود (۲۹).



شکل ۲- مقادیر قدرت احیاءکنندگی آهن

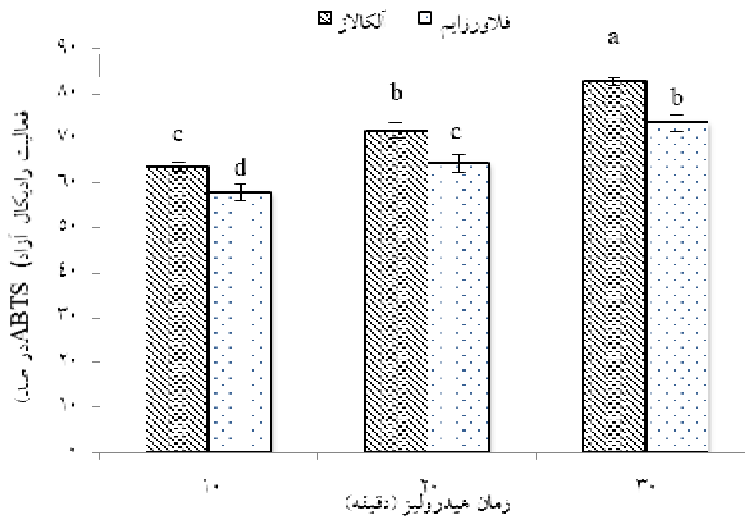
۳-۳-۳- فعالیت رادیکال آزاد ABTS

ارزیابی مهار رادیکال محلول در آب ABTS یکی دیگر از شاخص‌های تعیین قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدان و اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر این شاخص است. عملکرد هر آنزیم از نظر نوع رهاش اسیدهای آمینه خاص (لیپوفیل یا هیدروفیل) می‌تواند

بر مهار رادیکال‌های آزاد مؤثر باشد. این پپتیدها از طریق اهداء اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد موجب توقف با کاهش سرعت فرآیند اکسیداسیون می‌شوند. نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد (شکل ۳) تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده توانایی بالایی برای حذف رادیکال آزاد ABTS دارا بودند

انجام فعالیت‌ها بر اساس مکانیسم‌های واکنش چندگانه وجود دارد (۲). دارا بودن توانایی حذف رادیکال آزاد ABTS در پروتئین‌های هیدرولیز شده سایر پروتئین‌های گیاهی بذر هویج (۳۲)، گزروغنی (*Moringa oleifera*) (۲)، جوانه گندم (۱۴) و گیاه آشلاتوس (*Amaranthus cruentus*) (۲۳)، نیز گزارش شده است.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود. به طور کلی، همه پروتئین‌های هیدرولیز شده حاوی پپتیدها هستند که اهداکننده هیدروژن بودند و می‌توانند با رادیکال‌ها برای تبدیل محصولات غیرقابل پیش‌بینی واکنش نشان دهند، بنابراین واکنش زنجیره رادیکال را خاتمه می‌دهند. با وجود چندین اتم هیدروژن و اسیدهای آمینه اهداکننده الکترون برای برخی پپتیدها، امکان



شکل ۳- مقادیر فعالیت رادیکال آزاد ABTS

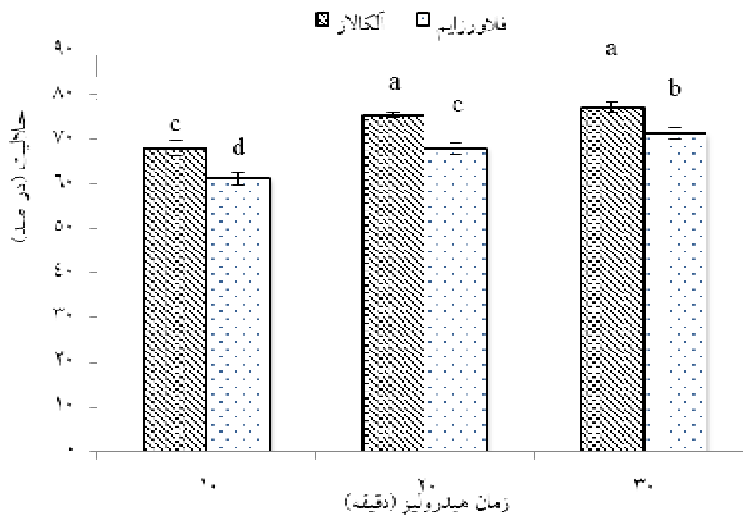
زمان ۲۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری نداشت. هیدرولیز آنزیمی به‌طور بالقوه باعث افزایش گروه‌های پروتئین قطبی و یونیزاسیون می‌شود که می‌تواند پیوندهای هیدروژنی قوی‌تر با آب تشکیل دهد. در نتیجه، پروتئین‌ها پس از هیدرولیز حلالیت بالاتری دارد (۱۶). بنابراین تفاوت در حلالیت پروتئین‌های هیدرولیز شده به اندازه پپتید، تعادل آب‌گریزی آب‌دوستی و همچنین بار پپتیدهای تولید شده در طول هیدرولیز بستگی دارد. حلالیت بالای پروتئین هیدرولیز شده‌ی، یک ویژگی مفید برای بسیاری از مواد غذایی محسوب می‌شود (۲۸). علاوه بر این، پروتئین‌های بزرگتر (طول زنجیره پپتیدی بلندتر) به‌طور کلی دارای حلالیت کمتری نسبت به کوچکترها دارد زیرا کاهش آنروپی هنگام ته‌نشینی برای این پروتئین‌ها (پپتیدها) کمتر است. همان‌طور که ذکر شد با افزایش زمان هیدرولیز طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد همچنین پروتئین‌های حاصل از

۴-۳- خواص عملکردی

۴-۳-۱- حلالیت

از بین تمام خواص عملکردی پروتئین‌ها، حلالیت بیشترین تأثیر را در ارتباط با سودمندی پروتئین هیدرولیز شده در سیستم‌های غذایی را نشان می‌دهد. سایر خصوصیات خواص عملکردی مانند کف و امولسیون‌ویژگی‌های ژل‌سازی معمولاً به محلول بودن پروتئین در محیط مربوطه نیاز دارند. بنابراین، به‌نظر می‌رسد، پروتئین‌های نامحلول پتانسیل کاربرد بسیار کمی در مواد غذایی دارند (۳۰). با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده از حلالیت (شکل ۴) بالایی برخوردار بودند و حلالیت پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز در تمامی زمان‌های هیدرولیز بالاتر بود و با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر حلالیت افزایش یافت. به‌طوری‌که پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه بالاترین حلالیت را دارا بود اما با

آنزیم آلکالاز نیز طول زنجیره پپتیدی کوتاهتری داشتند، بنابراین پروتئین‌ها حلالیت بالاتری نیز دارند (۳۰). Ma و همکاران، (۲۰۱۸) نیز اعلام نمودند با افزایش زمان هیدرولیز، حلالیت پروتئین از هیدرولیز آنزیمی پروتئین سویا افزایش یافت (۱۶).

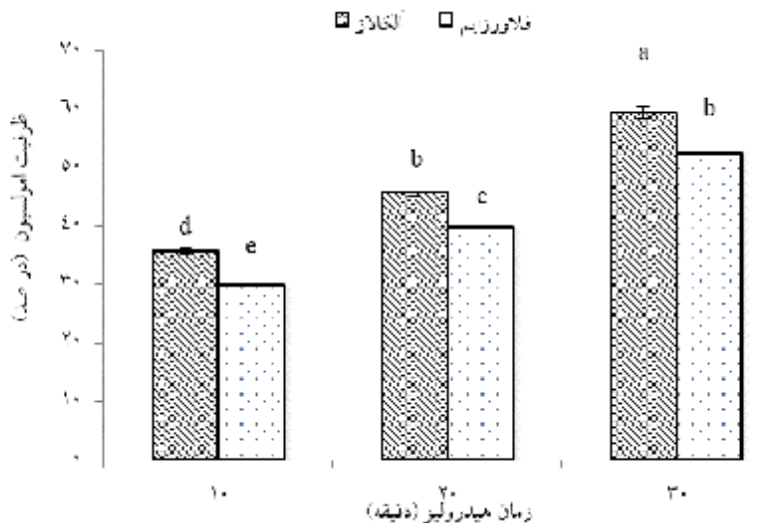


شکل ۴-مقادیر حلالیت تیمارهای مختلف

با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده از ظرفیت امولسیون و پایداری امولسیون بالایی برخوردار بودند. یافته‌ها حاکی از عدم قابلیت استفاده از پروتئین‌های گیاهی هیدرولیز نشده با هدف غنی‌سازی و امولسیون‌کنندگی در محصولات مختلف غذایی و در pH اسیدی است. Mazloomi-Kiyapey و همکاران (۲۰۱۹) گزارش نمودند که ایزوله پروتئین دانه کدو تنبل از قابلیت امولسیون‌کنندگی پایین برخوردار است (۱۷).

۳-۴-۲- خواص امولسیون‌کنندگی

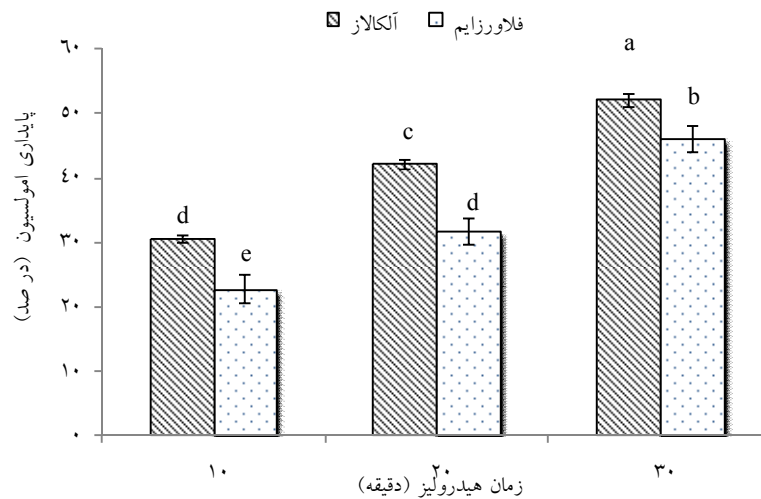
مکانیسم امولسیون نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده به عنوان جذب قطرات روغن، پوشاندن آن‌ها و جلوگیری از ارتباط آن‌ها پس از همگن‌سازی تعریف شده است. در طول هیدرولیز، حلالیت هیدرولیزها افزایش می‌یابد و آن‌ها به حد فاصل آب-روغن منتقل می‌شوند (۱۷). نتایج مربوط به ظرفیت امولسیون‌کنندگی (شکل ۵) و پایداری امولسیون با هم (شکل ۶)، هم‌خوانی داشت.



شکل ۵-مقادیر ظرفیت امولسیون تیمارهای مختلف

گرفته می شوند. در حین هیدرولیز، تعادل بین توالی های آبگریز و آب دوست از هیدرولیز منجر به افزایش ظرفیت امولسیون هیدرولیز می شود (۱۷، ۱۵). به عنوان یک شاخص مؤثر در فرآیند هیدرولیز، امولسیون کنندگی پروتئین ها تحت تأثیر درجه هیدرولیز قرار می گیرد و با افزایش درجه هیدرولیز نیز ظرفیت امولسیون کنندگی افزایش می یابد.

ظرفیت امولسیون پروتئین هیدرولیز شده و پایداری امولسیون توسط آنزیم آلکالاز در تمامی زمان های هیدرولیز بالاتر بود و با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر ظرفیت امولسیون و پایداری امولسیون افزایش یافت. از آن جا که پروتئین های هیدرولیز شده حاوی توالی آبگریز و آب دوست هستند که برای خواص سطحی ضروری می باشند، این اجزا به عنوان عوامل فعال سطح در نظر



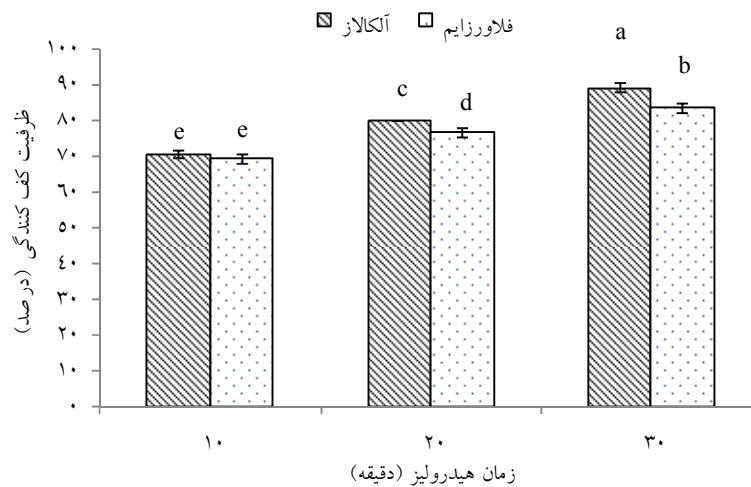
شکل ۶- مقادیر پایداری امولسیون تیمارهای مختلف

هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه بالاترین ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف را دارا بود. تحقیقات مختلفی، اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی و زمان هیدرولیز بر ظرفیت و پایداری کف کنندگی هیدرولیز شده های پروتئینی را بررسی کرده اند. عواملی مانند حلالیت پروتئین ها، درجه هیدرولیز، نوع پپتیدها حاصل، قابلیت تشکیل فیلم، از موارد مؤثر بر این شاخص ها هستند (۷). بدین شکل که اثر افزایش درجه هیدرولیز تحت تأثیر زمان فرآیند و نوع آنزیم بر کاهش طول زنجیره پپتیدها و عملکرد آن ها در ایجاد و پایداری سازی کف مؤثر است. یکی از مواردی که در پایداری کف مؤثر است، پروفیل آمینواسید پروتئین است. وجود دو آمینواسید پرولین و لایزین در پروتئین ها موجب افزایش شمار پیوندهای هیدروژنی و متعاقب تراکم بار پروتئین می شود. به این طریق این دو آمینواسید کف را پایداری می کنند (۱۱). بنابراین در پروتئین

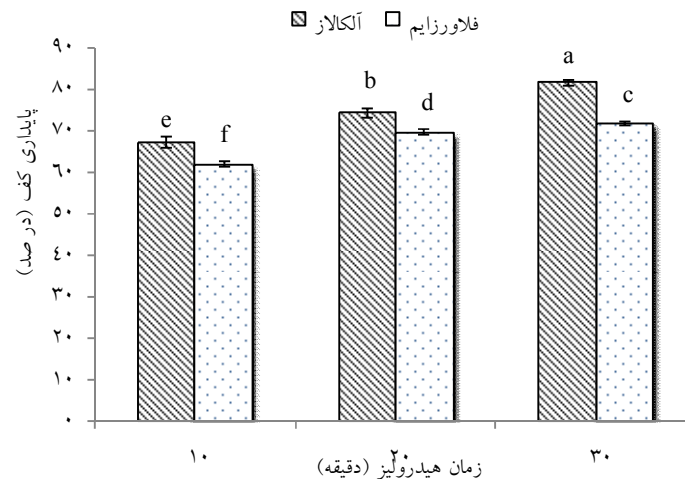
۳-۴-۳- خواص کف کنندگی

به دلیل فعالیت سطحی بالا، پروتئین ها مسئول تولید کف می باشند. پروتئین های محلول می توانند کشش سطحی رابط مایع و هوا را کاهش دهند و از ارتباط حباب ها جلوگیری کنند. علاوه بر این، مولکول های پروتئین می توانند باز شوند و با یکدیگر واکنش نشان دهند و یک فیلم پروتئینی چند لایه تشکیل دهند که منجر به انعطاف پذیری بالاتر در رابط آب و هوا شود. در نتیجه، شکستن حباب ها مشکل شده و کف مستحکم ایجاد می شود (۱۷). نتایج مربوط به کف کنندگی (شکل ۷) و پایداری کف (شکل ۸) با هم هم خوانی داشت. با توجه به نتایج تمامی پروتئین های هیدرولیز شده از کف کنندگی بالایی برخوردار بودند و کف کنندگی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز در تمامی زمان های هیدرولیز بالاتر بود، با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر ظرفیت کف کنندگی افزایش یافت. به طوری که پروتئین

آبکافی که غلظت این دو اسید آمینه بالاست، پایداری کف مطلوبی انتظار می‌رود. در مطالعه حاضر نیز این دو اسید آمینه در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود.



شکل ۷- مقادیر کف‌کنندگی تیمارهای مختلف



شکل ۸- مقادیر پایداری کف تیمارهای مختلف

۴- نتیجه‌گیری

مهم‌ترین هدف از تولید پروتئین هیدرولیز شده، استفاده از بخش پروتئینی مواد غذایی، افزایش جذب و هضم این ترکیبات از طریق کاهش اندازه آن‌ها و افزایش ارزش غذایی و خواص زیستی آن‌ها می‌باشد. در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پپتیدهای به دست آمده از هیدرولیز آنزیمی جوانه گندم تعیین شد. نتایج مربوط به ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که از میان آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، آنزیم

آلکالازی می‌تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیز، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و خواص عملکردی بالاتری تولید کند و همچنین افزایش زمان هیدرولیز تأثیر مثبتی بر روی ویژگی‌های مذکور داشت. بنابراین پروتئین هیدرولیز شده جوانه گندم می‌تواند به عنوان جایگزین پروتئین‌های حیوانی در رژیم غذایی مردم در کشورهای در حال توسعه و همچنین به عنوان ترکیبات عملکردی در فرمولاسیون مواد غذایی مطرح باشند.

۵- منابع

- protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15, pp. 301-313.
9. FAO/WHO., 1990. Energy and protein requirements. Report of joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724.
10. Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F. and Varidi, M.J., 2015. Extraction Optimization of Fenugreek Seed Protein, *science of food and agriculture*, 15, pp. 3165-3176.
11. Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C. and Montero, M. P., 2009. Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(3), pp. 585-592.
12. Gomez, M., Gonzalez, J. and Oliete, B., 2012. Effect of extruded wheat germ on dough rheology and bread quality. *Food Bioprocess Technology*, 5(6), pp. 2409-2418.
13. Hamzeh, A., Rezaei, M. and Khodabandeh, S. 2019., Antiproliferative and antioxidative activities of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein hydrolysates as affected by degree of hydrolysis. *Food Measure*, 12, pp. 721-727.
14. Karami, Z., Peighambaroust, S.H., Hesari, J., Akbari-Adergani, B. and Andreu, D., 2019. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 32, pp. 100450.
15. Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F. and Hayes, K. D., 2009. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*). *J Food Sci*, 74(2), pp. 126-133.
16. Ma, W., Qi, B., Sami, R., Jiang, L., Li, Y. and Wang, H., 2018. Conformational and Functional Properties of Soybean Proteins Produced by Extrusion-Hydrolysis Approach. *Int J Anal Chem*, 23, pp. 918-932.
1. صادقیان امین، ی، صادقی ماهونک، ع، قربانی، م، اعلمی، م، و جوشقانی، ح، ۱۳۹۸. اثر زمان فرآیند بر ویژگی های عملکردی و آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کینوآ با آلکالاز و پانکراتین. علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۴ (۴)، صص. ۱۰۲-۸۹
2. Aderinola, T., Fagbemi, T., Enujiugha, V., Monisola Alashi, A., Emmanuel .and Aluko, R., 2018. Amino acid composition and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Heliyon*, 10, pp. 862-877.
3. Alashi, A.M., Blanchard, C.L., Mailer, R.J., Agboola, S.O., Mawson, A.J., Rong, H., Malomo, S.A., Girgih, A.T. and Aluko, R.E., 2014. Blood pressure lowering effects of Australian canola protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, 55, pp. 281-287.
4. Attia, R.S. and Abou-Gharbia, H.A., 2011. Evaluation and Stabilization of Wheat Germ and Its Oil Characteristics. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol*, 8(2), pp. 31-39.
5. Bera, M.B. and Mukherjee, R.K., 1989. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *J. Food Sci*, 54(1), pp. 142-145.
6. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2009. Antioxidant & free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 14, pp. 1198-1205.
7. Chen, L., Chen, J., Ren, J. and Zhao, M., 2011. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocoll*, 25(5), pp. 887-97.
8. Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T. and Ding, G. F., 2015. Antioxidant and anticancer peptides from the

- (Vicia Faba) Proteins Hydrolysates Produced by Alcalase and Trypsin, *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 9(1), pp.1-10.
25. Shahidi, F. and Onodenaloro, A., 1995. Water dispersions of Myofibrillar Proteins from Capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, pp. 51-54.
 26. Slizyte, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M. and Rustad, T., 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*gadus morhua*) Backbones. *Process Biochemistry*, 44, pp.668-677.
 27. Taheri, A. and Bakhshizadeh, A., 2020. Antioxidant and ACE Inhibitory Activities of Kawakawa (*Euthynnus affinis*) Protein Hydrolysate Produced by Skipjack Tuna Pepsin. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2, pp. 148-166.
 28. Tanuja, S., Viji, P., Zynudheen, A.A. and Joshy, C.G., 2012. Composition, functional properties and antioxidative activity of hydrolysates prepared from the frame meat of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Egypt. J. Biol*, 14(1), pp.28-36.
 29. Varedesara, M.S., Ariaii, P. and Hesari, J., 2021. The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of Lactobacillus casei in it. *Food Sci Nutr*, 9, pp. 2180-2190.
 30. Wouters, A.G.B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K. and Delcour, J.A., 2016. Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein Hydrolysates in food systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 15, pp.786- 800.
 31. Yaghoubzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R. and Fattahi, E., 2020. Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Bioactive Peptides from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Skin Hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, pp.625-632.
 17. Mazloomi-Kiyapey, S.N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E. and Nourmohammadi, E., 2015. Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *ARYA Atheroscler*, 15(5), pp. 218-227.
 18. Memarpour-Yazdi, M., Asoodeh, A. and Chamani, J., 2012. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Funct Foods*, 4(1), pp.278-286.
 19. Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M. and Keshavarz, M. 2012. A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*, 18(7), pp.950-956.
 20. Nour mohammadi, E., SadeghiMahoonak, A., Alami, M. and Ghorbani, M., 2017. Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil cake protein. *International Journal of Food Properties*, 20(12), pp.3244-3255.
 21. Ogunwolu, S.O., Henshaw, O.F., Mock, H.P. and Santros, A., 2009. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. *Food Chemistry*, 115, pp. 852-658.
 22. Rabiei, S., Rezaei, M., Asgharzade, S., Nikoo, M. and Rafeian-Kopaei, M., 2019. Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, pp.1-10.
 23. Ramkisson, A., Shanece, D., Depika, S., Venter, S. and Mellem, J. 2020. In vitro anticancer and antioxidant potential of Amaranthus cruentus protein and its hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 40 (2), pp.634-639.
 24. Samaei, S., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A. and Aalami, M., 2020. Antioxidant Activity of Faba Bean

- Transport Across Caco-2 Cells. *Journal of Food Science*, 84, pp. 2139- 2146.
34. Zhu, K.X, Zhou, H.M. and Qian, H., 2006. Antioxidant and free radicalscavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemisrty*, 41, pp. 1296–1302.
32. Ye, N., Hu, P., Xu, S., Chen, M., Wang, S., Hong, J. and Cai, T., 2018. Preparation and characterization of antioxidant peptides from carrot seed protein. *Journal of Food Quality*, 22, pp. 1–9.
33. Zhang, J., Wen, C., Li, C., Duan, Y., Zhang, H. and Ma, H., 2019. Antioxidant Peptide Fractions Isolated from Wheat Germ Protein with Subcritical Water Extraction and Its

(Original Research Paper)
Evaluation of Antioxidant and Functional Properties of Hydrolyzed Protein with Enzymatic Hydrolysis of Wheat Germ Protein

Sakineh Ghelich¹, Peiman Ariayi^{2*}, Mohammad Ahmadi³

1-Ph.D student of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

2-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Received:20/09/2021

Accepted:03/11/2021

Abstract

The bioactive peptides in the hydrolyzed protein have led to high antioxidant activity and good functional properties in these proteins. The aim of this study was to produce hydrolyzed protein from wheat germ and analyze its antioxidant and functional properties. For this purpose, hydrolyzed wheat germ protein was produced by commercial enzymes alcalase and flavourzyme enzyme (Optimal pH of alcalase activity 8.5, flavourzyme 7) at intervals of 10, 20 and 30 minutes. Degrees of hydrolysis, functional properties including solubility, foaming and emulsifying properties, as well as antioxidant properties including free radical scavenging DPPH and ABTS and ferric reducing power were measured. The results showed that the protein hydrolyzed by alcalase had a higher degree of hydrolysis than the enzyme flavourzyme. Also, increasing the hydrolysis time had a positive effect on the mentioned parameters ($p < 0.05$). The highest values of hydrolysis by alcalase were observed in 30 minutes (28.26%) and this treatment had the highest antioxidant activity and functional properties ($p < 0.05$). In general, it can be said that hydrolyzed protein from wheat germ (by alcalase enzyme) has the best functional and antioxidant properties and therefore can be used as a substitute for animal based protein in the diet as well as active ingredients in food formulations.

Keywords:Hydrolyzed Protein, Commercial Enzymes, Wheat Germ, Antioxidant, Functional Properties.

*Corresponding Author: p.aryaye@yahoo.com

(مقاله پژوهشی)

نوشیدنی فراسودمند ترکیبی حاوی عصاره‌های گیاهان خانواده چلیپائیان جهت بهبود سیستم ایمنی

زهرا لطیفی^۱، سعید عابدیان کناری^{۲*}، علی اکبر مشایخ^۳

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

۲- استاد، ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۳- استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی و اجتماعی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۸

DOI: 10.30495/jfst.2022.1949356.1772

چکیده

سیستم ایمنی بدن ارتباط تنگاتنگی با سلامت انسان دارد. بر این اساس، غذاهای فراسودمند حاوی ترکیبات فعال زیستی می‌توانند به‌عنوان بهبوددهنده سیستم ایمنی محسوب شوند. هدف از مطالعه حاضر تولید نوشیدنی فراسودمند ترکیبی، حاوی عصاره‌های گیاهان خانواده چلیپائیان (کلم سفید، کلم قرمز، کلم بروکلی و گل کلم) جهت بهبود سیستم ایمنی می‌باشد. بدین منظور عصاره‌های هیدروآتانولی (۷۰ درصد) از چهار گونه کلم تهیه شد، سپس میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH بررسی گردید. سپس نوشیدنی‌هایی ترکیبی از چهار عصاره با غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ تهیه گردید و موش‌های آزمایشگاهی با دوز یک‌سی‌سی، طی ۱۵ روز متوالی تغذیه شدند. سیستم ایمنی با بررسی فاکتورهای IgG، IFN- γ ، IL-4، IL-10 و IL-17 توسط روش الایزای غیررقابتی ارزیابی شد. نتایج به دست آمده حاکی از بالا بودن فنل ($1/63 \pm 0/024 \text{ mg GA/g}$) و فلاونوئید تام (mg) آزاد مربوط به کلم قرمز به مقدار ۹۸/۲۶ درصد در غلظت ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بود. نتایج ارزیابی سیستم ایمنی نشان داد که سه فاکتور IgG، IL-10 و IL-17 در موش‌ها، در نوشیدنی فراسودمند با غلظت عصاره ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ افزایش یافت؛ به طوری که فاکتور IgG در گروه شاهد برابر با $10/81 \pm 6/68 \text{ mg/ml}$ و در گروه سوم با غلظت عصاره ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ به $27/35 \pm 20/86 \text{ mg/ml}$ افزایش یافت. نتایج نشان داد که عصاره گیاهان خانواده چلیپائیان واجد پتانسیل بالایی برای استفاده در محصولات غذایی با هدف افزایش کیفیت و ارزش تغذیه‌ای را دارند.

واژه‌های کلیدی: گیاهان چلیپائیان، عصاره گیاهی، خواص فیتوشیمیایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، سیستم ایمنی.

۱- مقدمه

سیستم ایمنی یک سیستم دفاعی فوق العاده پیچیده است که از میزبان در برابر میکروارگانیسم‌های مهاجم و در برابر سلول‌های بدخیم محافظت می‌کند. این سیستم عضو بدن، بسیار پیچیده و منظم است و شامل همکاری و تعامل تعدادی از انواع سلول‌های مختلف، محصولات سلولی، بافت‌ها و اندام‌ها می‌شود. پاسخ‌های ایمنی را می‌توان با سیستم عصبی و غدد درون‌ریز تنظیم کرد (۵۴). ترکیبات فیتوشیمیایی دارای پتانسیل‌های درمانی مانند آنتی‌اکسیدان، ضد دیابت، تقویت حافظه، کاهش کلسترول، خاصیت‌سازگاری، ضد سرطان و فعالیت تنظیم‌کننده سیستم ایمنی می‌باشند. ترکیبات طبیعی با فعالیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی را می‌توان به صورت ترکیبات با وزن مولکولی بالا و پایین طبقه‌بندی کرد. ترپنوئیدها، ترکیبات فنلی و آلکالوئیدها درین ترکیبات بهبود دهنده سیستم ایمنی با وزن مولکولی پائین، پلی‌ساکاریدها در میان ترکیبات با وزن مولکولی بالا غالب هستند (۶). میوه‌ها و سبزیجات که اغلب به عنوان "محصولات تازه" نامیده می‌شوند، اجزای مهم یک رژیم غذایی سالم هستند. به‌طور کلی غذاهای گیاهی منبعی با طیف گسترده‌ای از ترکیبات زیست‌فعال هستند که به عنوان مواد فیتوشیمیایی نیز شناخته می‌شوند. بسیاری از مواد فیتوشیمیایی دارای خواص دارویی هستند (۲۲). خانواده چلیپائیان^۱ از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهان گل‌دار یا آنژیوسپرم‌ها^۲ و متعلق به راسته کلم‌سانان^۳ هستند. این خانواده متشکل از گیاهان یکساله، دوساله و همچنین چند ساله است (۴۲). سبزیجات خانواده چلیپائیان، منبعی غنی از مواد تقویت‌کننده سلامتی می‌باشند که خطر بسیاری از بیماری‌ها را کاهش می‌دهند. ترکیبات فنلی و اسیدآسکوربیک، آنتی‌اکسیدان اصلی سبزیجات خانواده چلیپائیان هستند؛ در حالی که آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی‌ها تنها ۲۰ درصد از کل ظرفیت ضدرادیکالی را برعهده دارند (۴۰). گل کلم به خانواده چلیپائیان تعلق دارد و نام علمی آن *Brassica oleracea var. botrytis* است، که به‌گل نیز معروف است. گل کلم حاوی تعدادی ترکیبات مؤثر است که در پیشگیری

و مبارزه با انواع سرطان مانند سرطان سینه، روده بزرگ و پروستات مفید است و هم‌چنین در درمان دیابت مؤثر است. علاوه بر این، گل کلم حاوی عناصر معدنی مانند فسفر، پتاسیم، گوگرد و غیره است؛ گیاهان خانواده چلیپائیان با داشتن ترکیبی بنام سولفورافان منجر به کاهش قابل توجهی در احتمال ابتلاء به سرطان روده بزرگ می‌شوند (۱۸). کلم بروکلی (*Brassica oleracea var. italica*) یک گیاه سبزی خوراکی از خانواده کلم‌ها است که سرگل بزرگ آن به عنوان یک سبزی خورده می‌شود (۳۶، ۴۶) و محصول مخصوص فصل سرما است. این سبزی مهم و با ارزش سرشار از ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضدسرطانی است. خواص ضدسرطانی کلم بروکلی به سبب ویتامین C (اسیدآسکوربیک)، ویتامین E (آلفا توکوفرول)، فلاونوئیدها (کوئرستین و کامپفرول)، کاروتنوئیدها (کاروتن و لوتئین) و گلوکوزینات‌ها است (۱۰، ۲۹). کلم قرمز (*Brassica oleracea var. capitata f. rubra*) یک منبع غذایی غنی از مواد شیمیایی گیاهی، به‌ویژه (پلی)فنولیک‌ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، اسیدآسکوربیک، α -توکوفرول، β -کاروتن، لوتئین و غیره است (۴۸). آنتوسیانین‌ها رنگدانه‌های واکنشی محلول در آب با خواص سلامتی بخش هستند که بر اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی آن‌ها است (۱۵). کلم سفید (*Brassica oleracea var. capitata f. alba*) یکی از محصولات اصلی چلیپائیان است که به‌طور گسترده به عنوان منبع اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ترپنوئیدها و فیبر و مواد آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است (۳، ۴۴). علاوه بر این، منبع غنی از ویتامین‌ها (مانند K، A، C، فولات، تیامین و ریوفلاوین)، مواد معدنی (کلسیم، پتاسیم و منیزیم) و اسید آمینه تریپتوفان است (۵۷). کلم یکی از سبزیجات پر مصرف در سراسر جهان به دلیل دسترسی راحت آن در بازارهای محلی و قیمت مناسب است. کلم سفید منبع غنی از مواد مغذی و سرشار از مواد فیتوشیمیایی تقویت‌کننده سلامتی است (۲۵، ۴۷). دریافت روزانه آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق رژیم غذایی برای دستیابی به متابولیسم متعادل و سالم، بسیار مهم است. نوشیدنی‌ها و سیله‌ای مناسب برای انتقال مواد مغذی و ترکیبات زیست‌فعال به بدن و هم‌چنین تسهیل فراهمی زیستی

1-Brassicaceae
2-Angiosperm
3-Brassicales

گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی با اختصاص کد هر بارיום شناسایی گردید. گل کلم، کلم بروکلی، کلم سفید و گل قرمز به ترتیب دارای کدهای اختصاصی 410B0*IMPSB، 409B0*IMPSB و 411B0*IMPSB می‌باشند. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل DPPH، معرف فولین-سیو کالتیو، اسید گالیک، اتانول و کلرید آلومینیوم از شرکت Merck (آلمان) و معرف کوئرستین و متانول از شرکت Applichem (آلمان) تهیه شدند.

۲-۲- آماده‌سازی عصاره‌های گیاهی

عصاره گیری از چهار نوع کلم شامل کلم سفید، کلم قرمز، گل کلم و کلم بروکلی به روش خیساندن (ماسراسیون^۱) انجام پذیرفت. پس از خریداری این گیاهان و شستشوی کامل، آن‌ها را در شرایط سایه قرار داده تا کاملاً خشک شوند و سپس با استفاده از دستگاه آسیاب (Moulinex، مدل PDA1، فرانسه) پودر گردیدند. پودر گیاهی خشک شده در ظروف پلاستیکی در دمای یخچال تا زمان عصاره گیری نگهداری شدند. ۳۰ گرم وزن دقیق نمونه پودر خشک شده گیاه توسط ترازوی دیجیتال (شرکت FWE، مدل FH-200H، ژاپن) توزین شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق بصورت جداگانه در ۱۵۰ میلیلیتر اتانول (Merck، آلمان) ۷۰ درصد خیسانده شدند. سپس، محووبات از طریق کاغذ صافی و اتمن شماره ۴۲ در یک بشر ۲۵۰ میلی لیتری فیلتر و حلال هیدرو اتانولی توسط دستگاه روتاری اوپراتور (Stuart RE300 Rotary Evaporator) در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد تبخیر گردید. سپس توسط دستگاه خشک-کن انجمادی (شرکت ZIRBUS، مدل D-37539، آلمان) خشک و به پودر تبدیل شدند. در پایان عصاره‌ها در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد و در مکان تاریک، تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شدند (۸).

۲-۳- اندازه‌گیری میزان فنل تام

در این روش میزان ترکیبات فنلی تام به روش فولین-سیو کالتیو اندازه‌گیری شد (۳۸). در این روش ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره با غلظت ۵۰ μg/ml برداشته شد. سپس به آن ۲/۵ میلی لیتر محلول فولین-سیو کالتیو اضافه گردید. بعد از ۵ دقیقه،

آن‌ها هستند. ترکیبات زیست‌فعال، مانند مواد شیمیایی گیاهی (به عنوان مثال، فیتواستروژن‌ها، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و غیره)، فیبر رژیمی، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب، پروبیوتیک‌ها و مواد معدنی، می‌توانند در نوشیدنی‌ها گنجانده شوند. در سراسر جهان، آمارها به وضوح روند رو به رشد مصرف نوشیدنی‌های فراسودمند را به دلیل محتوای مواد مغذی، بسته‌بندی مناسب، طراحی، سهولت حمل و نقل و ذخیره‌سازی و طبیعت پایدار نشان می‌دهند (۱۳). نوشیدنی‌های فراسودمند را می‌توان به صورت لبنی، میوه و سبزیجات، بر اساس حبوبات، غلات، قهوه یا جای طبقه‌بندی کرد. ویژگی‌های عملکردی این نوشیدنی‌ها نیازها و شیوه‌های مختلف زندگی از جمله افزایش انرژی، مبارزه با روند پیری، خستگی و استرس، یا هدف قرار دادن بیماری‌ها را بر طرف می‌کند (۴۵). پلیفنول‌ها یک گروه بزرگ و متنوع از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند که بسیاری از آن‌ها به طور طبیعی در گیاهان خانواده چلیپائیان وجود دارند که با حضور چندین گروه فنلی مشخص می‌شوند (۴۱). گروه‌های هیدروکسیل پلی‌فنول‌ها در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد با اهدای اتم هیدروژن یا الکترون، شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی و غیرفعال کردن زنجیره‌های رادیکال آزاد نقش بسیار مهمی دارند (۱۹). مطالعاتی پیرامون تأثیر برخی از گونه‌های گیاهان دارویی بر سیستم ایمنی صورت گرفته است ولی تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثرات دارویی مواد مؤثره موجود در گیاهان خانواده چلیپائیان روی سیستم ایمنی صورت نگرفته است. بنابراین هدف از این مطالعه، تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات مؤثره عصاره گیاهان نام‌برده و تولید نوشیدنی‌های فراسودمند حاوی عصاره این گیاهان و بررسی تأثیر این ترکیبات بر سیستم ایمنی ذاتی، اختصاصی (هومورال و سلولی) در موش و بهبود سیستم ایمنی است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده

چهار نوع کلم شامل کلم سفید، کلم قرمز، کلم بروکلی و گل کلم از مزرعه‌ای در شهرستان بابل واقع در استان مازندران، ایران خریداری و پس از عملیات آماده‌سازی شد. بذور گیاهان تهیه شده با استفاده منابع معتبر گیاه‌شناسی در بانک بذر پژوهشکده

محلول عصاره با غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ استفاده گردید تا رقت سازی انجام گردد و محلول هایی با غلظت ۲۰۰، ۴۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰ ساخته شد (روش رقیق سازی). در مرحله بعد از هر محلول ۱ میلی لیتر به لوله جدید منتقل و به هر کدام ۱ میلی لیتر DPPH اضافه گردید. محلول شاهد یا کنترل حاوی ۱ میلی لیتر متانول و ۱ میلی لیتر DPPH بود که برای هر عصاره یک کنترل لحاظ شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی نگه داشته شد و سپس جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در غلظت های مختلف از عصاره های مختلف خوانده شد. سپس با استفاده از فرمول زیر درصد مهار رادیکال آزاد محاسبه شد.

$$R = \left[\frac{A_B - A_S}{A_B} \right] \times 100$$

A_B = جذب بلانک (جذب DPPH رقیق شده با متانول به نسبت ۱:۱)

A_S = جذب نمونه یا استاندارد

۲-۶- تولید نوشیدنی فراسودمند

به منظور تهیه نوشیدنی فراسودمند مطابق با روش بیان شده توسط Hajmohammadi و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییرات عمل گردید. بدین منظور مقدار مشخص از غلظت عصاره ها که بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی (800 و $400 \mu\text{g/ml}$) را داشتند با 0.05 درصد اسانس خوراکی و 0.1 درصد پودر استویا به عنوان شیرین کننده طبیعی مخلوط و در ادامه برای ایجاد یکنواختی و کاهش میزان دوفاز شدن نمونه ها از 0.5 درصد صمغ کتیرا از قبل آماده شده استفاده گردید و در نهایت pH نمونه با افزودن اسید سیتریک ثابت شد؛ تمامی ترکیبات مخلوط شده با آب در یک مخزن دارای هم زدن در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه جهت دستیابی به یک مخلوط یکنواخت همزده شد. سپس با ستوریزاسیون نمونه ها درین ماری با دمای 85 درجه سانتیگراد و به مدت ۲۰ ثانیه انجام گرفت. نمونه ها پس از بسته بندی در بطری های 250 میلی لیتری در یخچال نگهداری شدند (۱۴).

۲-۷- گروه بندی و تیمار حیوان آزمایشگاهی

در این تحقیق از موش های کوچک نژاد آزمایشگاهی (C57) در محدوده وزنی 23 ± 2 گرم تهیه شده از انستیتو پاستور شهرستان آمل استفاده گردید. به موش های مورد آزمایش طرح، ۲ هفته

۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم اضافه شد و به محلول به مدت ۲ ساعت استراحت داده شد. بعد از گذشت این مدت زمان، جذب نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش (Pharmacia Biotech, Novaspec II, Netherlands) در طول موج 760 نانومتر در برابر نمونه شاهد اندازه گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد اسید گالیک هم محلول های استاندارد اسید گالیک با غلظت های 200 ، 400 ، 1000 ، 25 و 50 تهیه شد. سپس نتایج به عنوان محتوای تام فنولی عصاره بر اساس میزان معادل (میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره) گزارش گردید.

۲-۴- اندازه گیری میزان فلاونوئید تام

در این روش میزان ترکیبات فلاونوئیدی تام در کل عصاره ها بر اساس روش جانگ و همکاران (۲۰۰۶) و با استفاده از معرف کلرید آلومینیوم انجام شد (۲۳). در این آزمایش ابتدا 0.5 میلی لیتر از هر عصاره با غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ برداشته، سپس $1/5$ میلی لیتر متانول و 100 میکرو لیتر از کلرید آلومینیوم، 100 میکرو لیتر از پتاسیم استات 1 مولار و 3 میلی لیتر آب به آن اضافه شد. پس از 30 دقیقه جذب نمونه ها در ازای هر عصاره غلظت های 800 ، 200 ، 100 ، 50 ، 25 ، $12/5$ ، $6/25$ و $3/125$ اندازه گیری شد. سپس 1 میلی لیتر از هر عصاره با 1 میلی لیتر از بافر فسفات و 1 میلی لیتر پتاسیم فروسیانید مخلوط شد و به مدت 20 دقیقه در دمای 50 درجه سلسیوس در بنماری گذاشته شد. سپس به آن 1 میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید اضافه شد و در نهایت 1 میلی لیتر از محلول فوق را با 1 میلی لیتر آب دیونیزه، 0.2 میلی لیتر کلرید آهن (III) مخلوط کرده و جذب نمونه ها در طول موج 415 نانومتر خوانده شد و نتیجه به عنوان محتوای تام فلاونوئید عصاره بر اساس میزان معادل "میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره" گزارش گردید.

۲-۵- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به روش DPPH

توانایی دهنده گی الکترون یا اتم هیدروژن عصاره ها بر اساس میزان فعالیت گیرندگی رادیکال آزاد ۲- و- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) سنجش شد (۲۴). جهت آماده سازی و رقیق سازی نمونه ها، غلظت های مختلف مورد نیاز بود لذا از

۲-۷-۲- نمونه‌گیری از خون

بعد از پایان طرح آزمایشی، موش‌ها یک شب (به مدت ۱۰ ساعت) از آب و غذا محروم ماندند (۱۰). سپس برای تهیه خون به صورت استریل از قلب و سینوس چشمی موش خونگیری گردید. هم‌چنین هنگام خون‌گیری، توجه شد که خون با موی حیوان تماس پیدا نکند. عمل خون‌گیری، تحت بیهوشی عمیق با استنشاق اتر انجام شد (۵۲).

۲-۸- اندازه‌گیری سرم IgG (ایمنی هومورال)، سیتوکین‌های اینترفرون-گاما (IFN- γ)، اینترلوکین-۴ (IL-4)، اینترلوکین-۱۷ (IL-17) (ایمنی سلولی) و اینترلوکین-۱۰ (IL-10) سرم موش ابتدا با سانتریفیوژ خون کامل موش در 4°C به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شد. سطح IgG و سطح سیتوکین‌های مختلف، از جمله اینترفرون-گاما (IFN- γ)، اینترلوکین-۴ (IL-4)، اینترلوکین-۱۷ (IL-17) و اینترلوکین-۱۰ (IL-10) در نمونه سرم با استفاده از کیت IgG طبق دستورالعمل‌های سازنده توسط شرکت کارمانیا پارس ژن توسط دستگاه الایزا اندازه‌گیری شدند (۵۲).

۲-۹- تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار صورت پذیرفت. آنالیز آماری جهت ارزیابی این فاکتورها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام و نتایج به صورت میانگین مثبت، منفی انحراف معیار بیان شدند. جهت مقایسه میانگین‌ها برای متغیرهای مورد بررسی و هم‌چنین برای اختلاف میانگین‌ها به ترتیب، از آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون دانکن در سطح ۹۵ درصد استفاده شد. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۶ استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ترکیبات فنولیک کل

در شکل (۱)، نتایج میزان فنل تام در عصاره‌های هیدروآتانولی برخی از گیاهان خانواده چلیپاییان ارائه شده است. مطابق با نتایج به دست آمده بین تمام عصاره‌های هیدروآتانولی هر چهار گیاه مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0/05$) به طوری که بالاترین میزان فنل تام در عصاره‌های هیدروآتانولی کلم سفید ($1/63 \pm 0/24 \text{ mg GAE}/100\text{g}$) و کلم بروکلی

قبل از شروع آزمایش‌ها، اجازه سازگاری داده شد. آنها در یک چرخه‌روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) در اتاق حیوانات نگهداری شدند و به آب و غذای مخصوص جوندگان دسترسی داشتند. اتاق حیوانات در دمای ۲۹-۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۰-۷۰ درصد حفظ شد (۵۲). شرایط نگهداری و آزمایشگاهی برای تمام موش‌ها، یکسان در نظر گرفته شده است. لازم به ذکر است، کلیه اصول اخلاقی در مورد نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید وزارت بهداشت، مدنظر قرار گرفته شد (کد-IR-IAU.SARI.REC.1400-086). با توجه به مطالعات حیوانی و با در نظر گرفتن اینکه مواجهه ۱۵ روزه می‌تواند مدت زمان قابل قبولی جهت بررسی اثرات سم و بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌ها (افزایش یا کاهش) باشد (۴، ۳۱)، مواجهه به صورت ۱۵ روز متوالی مورد بررسی گرفت.

۲-۷-۱- آزمایشات ایمنی

این بخش از مطالعه روی موش‌های آزمایشگاهی ماده کوچک نژاد ($C57$) در محدوده وزنی 23 ± 2 گرم انجام گرفت ($n=5$). تعداد ۱۵ سر موش به طور تصادفی به ۳ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند و سرم فیزیولوژی را به صورت گاواژ روزانه دریافت کردند. گروه‌های دیگر به عنوان گروه‌های تیمار عمل کردند و بصورت دو دوز تیمار شدند که شامل ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای هر موش بود. نوشیدنی‌های فراسودمند به صورت گاواژ، به مدت ۱۵ روز متوالی به میزان یک‌سی‌سی به موش‌ها خوراندند شدند (۴۳، ۵۲). بدین منظور طرحی از گروه‌بندی موش‌های آزمایشی در زیرارائه شده است. در طول آزمایش‌ها، غذا و آب بصورت آزاد فراهم شد و وزن بدن و مصرف خوراک هفتگی اندازه‌گیری گردید (۵۰).

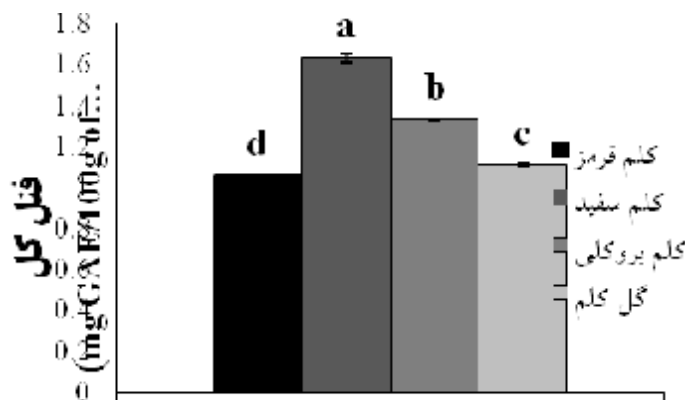
گروه ۱ نمونه شاهد یا کنترل سالم: مصرف سرم فیزیولوژی به صورت گاواژ (هر روز)

گروه ۲: تیمار عصاره انواع کلم با دوز $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ بصورت گاواژ (هر روز)

گروه ۳: تیمار عصاره انواع کلم با دوز $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ بصورت گاواژ (هر روز)

وجود داشت که اختلاف معنی داری ($p < 0.05$) با سایر گیاهان مورد بررسی داشت.

پائین ترین وجود داشت. (1.33 ± 0.04 mg GAE/100g) و بیشترین میزان فنل تام در کلم قرمز (1.62 ± 0.01 GAE/100g mg)



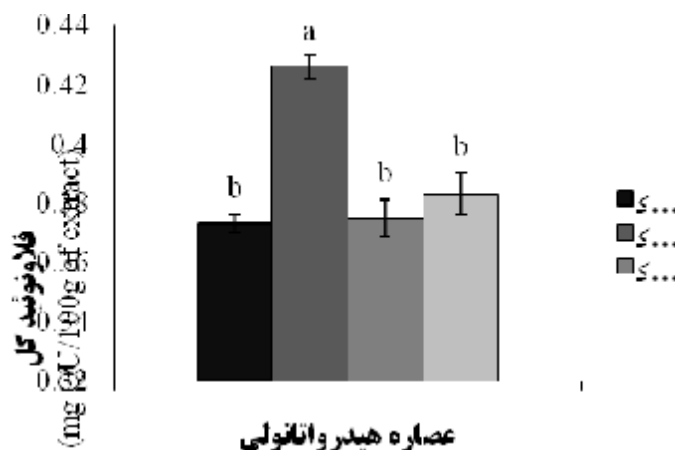
شکل ۱- بررسی میزان فنل تام (mg GA/100g) در عصاره های هیدروآتانولی گیاهان خانواده چلیپائیان (کلم قرمز، کلم سفید، کلم بروکلی و گل کلم)

که از مقادیر فنل تام کلم بروکلی در مطالعه حاضر بالاتر می باشد. در گزارشات ذکر شده در مطالعه حاضر و سایر محققان نتایج مختلفی از میزان فنل تام وجود دارد که علت آن را می توان به تنوع گسترده بین کل فنول های موجود در میوه ها یا سبزیجات مختلف و یا حتی برای میوه یا سبزیجات مشابه بیان کرد که توسط نویسندگان مختلف گزارش شده است؛ این اختلافات ممکن است به دلیل پیچیدگی این گروه از ترکیبات و روشهای استخراج و آنالیز باشد (۳۲).

۳-۲- میزان فلاونوئید کل

نتایج میزان فلاونوئید تام در عصاره های هیدروآتانولی برخی از گیاهان خانواده چلیپائیان در شکل (۲) گزارش شده است. نتایج نشان داد که بالاترین میزان فلاونوئید در عصاره هیدروآتانولی کلم سفید (0.426 ± 0.004 mg QE/100g) وجود داشت به طوری که با سایر گیاهان مورد بررسی اختلاف معنی داری داشتند ($p < 0.05$). در چهار گیاه مورد بررسی، بین کلم قرمز (0.375 ± 0.006 mg QE/100g) و گل کلم (0.383 ± 0.007 mg QE/100g) اختلاف معنی داری در میزان فلاونوئید وجود نداشت ($p > 0.05$).

ترکیبات فنلی ممکن است مستقیماً به اثر آنتی اکسیدانی کمک کنند، بنابراین لازم است محتوای فنلی کل بررسی شود (۱). چندین مطالعه نشان داده است که مصرف فنولیک از گیاهان دارویی می تواند با کاهش خطر ابتلاء به تصلب شرایین برای سلامتی انسان مفید باشد (۹). در مطالعه حاضر میزان فنل تام در گیاهان مورد بررسی از 1.062 تا 1.63 mg GA/100g متغیر بود که بالاترین میزان مربوط به عصاره هیدروآتانولی کلم سفید و پائین ترین میزان مربوط به عصاره هیدروآتانولی کلم قرمز بود. در مطالعه Singh و همکاران (۲۰۰۷)، مقدار فنول تام در ۶ واریته کلم بروکلی بین محدوده $0.82/9$ - $44/5$ ، در ۱۸ واریته کلم سفید بین محدوده $0.34/4$ - $12/6$ و ۲ واریته گل کلم بین محدوده $0.16/3$ - $21/8$ mg/100g گزارش گردید (۵۲). در مطالعه ای دیگر نیز مقادیر بالای فنول تام در کلم بروکلی (822 ± 89 μg/g)، گل کلم (278 ± 15 μg/g) و کلم سفید (153 ± 21 μg/g) گزارش شده است (۴). در مطالعه Thomas و همکاران (۲۰۱۸)، محتوای پلی فنول کل بین بخش های مختلف گیاه از محصولات جانبی کلم بروکلی از $3/8 \pm 0/2$ mg/g تا $6/1 \pm 0/3$ mg/g گزارش شده است (۵۳).



شکل ۲- بررسی میزان فلاونوئید کل (mg QE/100g) در عصاره‌های هیدرو اتانولی برخی از گیاهان خانواده چلیپائیان (کلم قرمز، کلم سفید، کلم بروکلی و گل کلم)

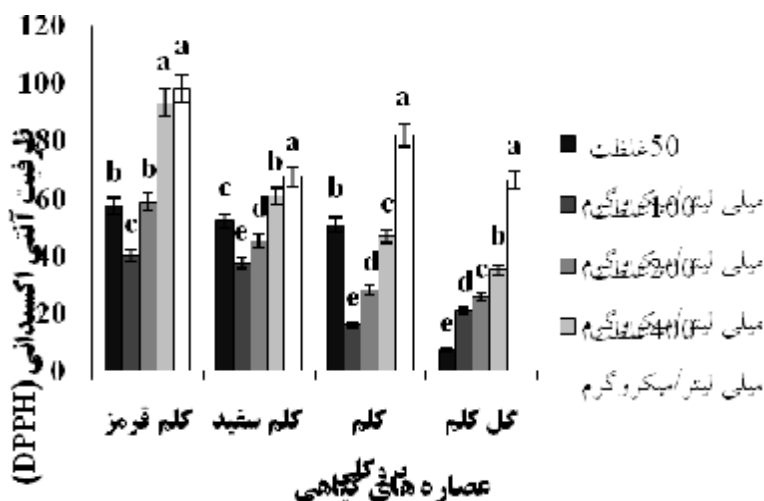
آنتی‌اکسیدانی گیاهی است. باین وجود، بازده عصاره، محتوای پلی فنولیک و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی حاصل از مواد گیاهی به دلیل وجود ترکیبات مختلف آنتی‌اکسیدانی با ویژگی‌های شیمیایی متنوع و قطبیت‌های مختلف که ممکن است محلول یا غیر محلول باشند در یک حلال خاص، به شدت به ماهیت حلال و روش استخراج بستگی دارد (۵۱، ۲۱). حلال‌های قطبی اغلب برای استخراج پلی فنل‌ها از یک ماتریس گیاهی استفاده می‌شوند. مناسب‌ترین این حلال‌ها (گرم یا سرد) مخلوط‌های آبی حاوی اتانول، متانول، استون و اتیل استات هستند (۵۱). بنابراین نوع حلال مورد استفاده در مطالعه حاضر (حلال اتانولی ۷۰٪) انتخاب مناسبی جهت استخراج ترکیبات پلی فنولی بوده است.

۳-۳- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

مهار رادیکال آزاد عصاره‌های هیدرو اتانولی برخی از گیاهان خانواده چلیپائیان با روش DPPH مقایسه شده با اسید گالیک به عنوان استاندارد تعیین گردید. نتایج از معادله خط بر اساس منحنی استاندارد به دست آمده که بر اساس تأثیر میزان غلظت در بازدارندگی در شکل (۳) مربوط به عصاره هیدرو اتانولی نشان داده شده است. شکل (۳) نشان می‌دهد که کلم قرمز نسبت به سایر گیاهان مورد بررسی در تمامی غلظت‌های تهیه شده، بالاترین توانایی مهار رادیکال DPPH را دارد به طوری که در غلظت ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ دارای بالاترین ویژگی

فلاونوئیدها طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند اثرات جلوگیری از تکثیر سلولی، القاء آپوپتوز، مهار آنزیم، ضد باکتری و خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. علاوه بر این، برخی از یافته‌ها نشان می‌دهند که فلاونوئیدها دارای خواص بالینی مختلفی از جمله اثرات ضد التهاب، ضد تومور و ضد ویروسی هستند (۱). در مطالعه حاضر میزان فلاونوئید تام در گیاهان مورد بررسی از ۰/۳۷۳ mg QE/100g تا ۰/۴۲۶ متغیر بود که بالاترین میزان مربوط به عصاره هیدرو اتانولی کلم سفید بود. در مطالعه Bahorun و همکاران (۲۰۰۴)، میزان فلاونوئید تام در کلم بروکلی (۳۱۶±۴۵ $\mu\text{g/g}$)، گل کلم (۱۷۲±۱۱ $\mu\text{g/g}$) و کلم سفید (۱۰۲±۹ $\mu\text{g/g}$) گزارش شده است (۴). در مطالعه Oancea و همکاران (۲۰۱۹)، نتایج مربوط به محتوای کل فلاونوئیدها، تغییرات بین ۱۷۷۷/۳۶-۳۰۴۷/۵۳ mgQE/100g رادرفت نمونه عصاره هیدرو متانولی و هیدرو متانولی اسیدی شده کلم قرمز بررسی شده از مناطق مختلف رومانی، لهستان، هلند و آلمان صرف نظر از نوع کاربردی سیستم‌های حلال استخراجی، گزارش شده است (۳۷). در مطالعه Thomas و همکاران (۲۰۱۸)، میزان فلاونوئید کل کلم بروکلی از mg/g ۲/۴±۰/۱ تا ۵/۴±۰/۶ گزارش شده است (۵۳). در مطالعه‌ای از Koh و همکاران (۲۰۰۹)، مقادیر فلاونوئید کل برای کلم بروکلی ۰/۰۰۳-۱/۱ mg/g گزارش شده است (۲۹). استخراج با حلال یک تکنیک پر کاربرد برای جداسازی ترکیبات

مهارکنندگی است و در مقابل، گل کلم بجز غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۸۰۰، دارای کمترین ویژگی مهارکنندگی است.



شکل ۳-مقایسه توانایی مهار یا خنثی سازی رادیکال DPPH توسط عصاره های هیدروآتانولی برخی از گیاهان خانواده چلیپانیان (کلم قرمز، کلم سفید، کلم بروکلی و گل کلم)

گیاهان براسیکا بین کلم بروکلی و کلم سفید، بالاترین میزان مهارکنندگی با IC_{50} برابر با $0.75 \pm 0.07 \text{ mg/ml}$ در کلم بروکلی گزارش شده است (۲۰). که نتایج هر دو مطالعه با مطالعه حاضر مطابقت دارد و میزان بازدارندگی در کلم بروکلی علی الخصوص در غلظت بالاتر، بیشتر از کلم سفید بود. در مطالعات ذکر شده (۲۰، ۱۹)، بیان گردید که گیاهانی که ترکیبات فنولی بالایی داشتند دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نیز بوده اند و همچنین نتایج سایر مطالعات نیز نشان داده اند که گیاهانی با ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بالا، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری دارند (۱۷). از طرف دیگر به نظر می رسد که ترکیبات فنولی که به صورت گسترده در گیاهان یافت می شوند و قدرت آنتی اکسیدانی بالایی دارند، به صورت مؤثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل می کنند. در ضمن شاید پائین بودن میزان ترکیبات غیرقطبی در گیاهان، دلیل پائین بودن میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های تهیه شده با حلال های غیرقطبی باشد (۲۴). نتایج بررسی درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH حاکی از این بود که بین محتوای فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها ارتباط مستقیمی وجود ندارد. کلم سفید با وجود بالاتر بودن میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتی اکسیدانی

در روش مهار DPPH، فعالیت آنتی اکسیدانی با کاهش جذب اندازه گیری شد زیرا رادیکال آزاد DPPH از یک ترکیب آنتی اکسیدانی، یک رادیکال الکترون یا هیدروژن دریافت می کند تا به یک مولکول پایدار تبدیل شود (۱). رادیکال های آزاد بسیار واکنش پذیر هستند و می توانند با اکثر مولکول های مجاور خود واکنش نشان دهند. این مولکول ها شامل لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک، پروتئین ها و کربوهیدرات ها هستند و در ایجاد و پیشرفت چندین بیماری مزمن از جمله پیری، سرطان و بسیاری از بیماری ها ارتباط دارند (۲۰). یافته های این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، میزان درصد مهارکنندگی نیز افزایش یافت و کلم قرمز بالاترین میزان مهارکنندگی و گل کلم پائین ترین میزان مهارکنندگی را داشت. در مطالعه ای از حلال های ۶۰ درصد متانول، اتانول و استون جهت استخراج عصاره از کلم بروکلی و کلم سفید استفاده شده است، که نتایج آن ها بالاترین ظرفیت مهار رادیکال DPPH با IC_{50} $0.71 \pm 0.06 \text{ mg/ml}$ در عصاره متانولی کلم بروکلی را نشان داد؛ روند مشابهی برای کلم سفید و کلم بروکلی نیز مشاهده شد، بطوری که عصاره متانولی بیشترین ظرفیت مهار رادیکال DPPH را نشان داد (۱۹). هم چنین در بررسی ظرفیت مهار رادیکال DPPH

کم‌تراز حد انتظار و نامنظمی را نشان داد، همچنین کلم قرمز با وجود دارا بودن محتوای فنولی پائین‌تر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی از خود نشان داد. نتیجه آن که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی فقط بر اساس محتوای فنولی آن‌ها قابل توضیح نیست بلکه به بررسی سایر خصوصیات مناسب آنها نیز نیاز دارد (۲۶). این عدم ارتباط، با مطالعه‌ای دیگر مطابقت دارد (۱۲).

۳-۴- ارزیابی سیستم ایمنی

فاکتورهای ارزیابی سیستم ایمنی از جمله ایمنی هومورال (IgG)، اینترفرون-گاما (IFN- γ)، اینترلوکین-۴ (IL-4)، اینترلوکین-۱۰ (IL-10) و اینترلوکین-۱۷ (IL-17) در موشهای آزمایشگاهی تیمار شده با نوشیدنی‌های فراسودمند ترکیبی حاوی عصاره‌های گیاهان خانواده چلیپائیان (کلم قرمز، کلم سفید، کلم بروکلی و گل کلم) در جدول (۱) گزارش شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که در هر فاکتور ارزیابی شده بین تیمارها

با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). مطابق با نتایج ارائه شده در جدول (۱) سه فاکتور ایمنی هومورال (IgG)، اینترلوکین-۱۰ (IL-10) و اینترلوکین-۱۷ (IL-17) در موش‌ها با افزایش غلظت عصاره به $800 \mu\text{g/ml}$ در نوشیدنی فراسودمند افزایش یافت. به طوری که فاکتور IgG در گروه شاهد برابر با $10.81 \pm 6.68 \text{ mg/ml}$ بود، در گروه دوم این فاکتور برابر با $20.94 \pm 13.91 \text{ mg/ml}$ بود ولی در گروه سوم با افزایش غلظت عصاره از $400 \mu\text{g/ml}$ به $800 \mu\text{g/ml}$ در نوشیدنی به $27.35 \pm 20.86 \text{ mg/ml}$ افزایش یافت که این اختلاف معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). فاکتور اینترفرون-گاما (IFN- γ) در گروه موش‌های تیمار شده با نوشیدنی حاوی $400 \mu\text{g/ml}$ عصاره بالاتر از دو گروه دیگر بود اما این اختلاف معنی‌دار نبود ($p > 0.05$)، و اینترلوکین-۴ (IL-4) در موش‌های تحت مطالعه در گروه ۲ و ۳ نسبت به گروه شاهد تغییر چشمگیری نداشت و در گروه شاهد بالاتر از دو گروه تحت تیمار بود.

جدول ۱- بررسی فاکتورهای ارزیابی سیستم ایمنی در موش‌های تحت تیمار با نوشیدنی‌های فراسودمند*

فاکتورهای مورد ارزیابی	گروه (۱)	گروه (۲)	گروه (۳)
اینترفرون-گاما (pg/ml)	$5.48 \pm 1.73^{a**}$	6.31 ± 2.74^a	3.79 ± 1.30^a
ایمونوگلوبولین-G (mg/ml)	10.81 ± 6.68^a	20.94 ± 13.91^a	27.35 ± 20.86^a
اینترلوکین-۴ (pg/ml)	4.72 ± 3.63^a	2.55 ± 0.71^a	3.20 ± 1.46^a
اینترلوکین-۱۰ (pg/ml)	15.49 ± 6.72^a	13.97 ± 4.07^a	19.89 ± 12.62^a
اینترلوکین-۱۷ (pg/ml)	7.27 ± 5.01^a	5.50 ± 2.90^b	9.31 ± 4.68^a

* داده‌ها بر حسب (میانگین \pm انحراف معیار) در پنج تکرار گزارش شده است.

** حروف کوچک (a) مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده عدم اختلاف معنادار ($P < 0.05$) بر اساس آزمون دانکن بین داده‌ها است.

گروه (۱): نمونه شاهد یا کنترل سالم: مصرف سرم فیزیولوژی بصورت گاواژ (هر روز)

گروه (۲): تیمار عصاره انواع کلم با غلظت $400 \mu\text{g/ml}$ بصورت گاواژ (هر روز)

گروه (۳): تیمار عصاره انواع کلم با غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ بصورت گاواژ (هر روز)

این دسته از پروتئین‌ها که دارای فعالیت آنتی‌بادی هستند بنام ایمونوگلوبولین (Ig) نیز نامیده می‌شوند، زیرا نقش مهمی در ایمنی بدن دارند و جزء پروتئین‌های کروی یا گلوبولین‌ها هستند. ایمونوگلوبولین‌ها در سرم خون و مایعات بافتی تمام پستانداران یافت می‌شوند و حدود بیست درصد پروتئین‌های پلاسما را در انسان شامل می‌شوند. بیشترین مقدار ایمونوگلوبولین بدن IgG می‌باشد و حدود ۵۰ تا ۷۵ درصد کل ایمونوگلوبولین‌ها

سیستم ایمنی انسان می‌تواند همراه با افزایش تدریجی رژیم غذایی ناکافی، سبک زندگی ناسالم، استرس و قرار گرفتن در معرض عوامل مضر محیطی مختل شود. با این حال، در مقایسه با ترکیبات فعال زیستی مشتق شده از حیوانات، اثرات تعدیل‌کننده ایمنی ترکیبات مشتق شده از گیاهان کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (۲۹). پروتئین‌هایی که می‌توانند به طور اختصاصی به آنتی‌ژن متصل شوند، آنتی‌بادی یا پادتن خوانده می‌شوند؛

را تشکیل می‌دهد (۲۷). در مطالعه حاضر مشاهده گردید که فاکتور IgG در موش‌های تحت تیمار با غلظت عصاره $\mu\text{g/ml}$ ۸۰۰ در نوشیدنی فراسودمند ($20/86 \pm 27/35 \text{ mg/ml}$) نسبت به گروه شاهد ($10/81 \pm 6/68 \text{ mg/ml}$) افزایش چشمگیری داشته‌است که وجود ترکیبات زیست فعال در ترکیب گیاهان خانواده چلیپاییان توانسته باعث افزایش IgG و در نتیجه منجر به افزایش سیستم ایمنی در موش‌ها گردد. این نتایج با تأثیر ترکیبات زیست فعال موجود در گیاهان از جمله اثر عصاره پالپ و هسته پاپایا (۲) و هم‌چنین اثر عصاره برگ مورینگا اولیفر (۳۹) بر روی افزایش ایمونوگلوبولین‌های G در موش‌ها مطابقت دارد. سیتوکین‌ها، پلی‌پپتیدهایی هستند که در پاسخ به میکروب‌ها و سایر آنتی‌ژن‌ها تولید شده و باعث هدایت و تنظیم واکنش‌های ایمنی یا التهابی می‌شوند از آن‌جا که اکثر سیتوکین‌ها توسط لکوسیت‌ها تولید شده و روی سایر لکوسیت‌ها اثر می‌گذارند، لذا این سیتوکین‌ها را اینترلوکین نیز می‌نامند. دو فاکتور $\text{IFN-}\gamma$ و IL-4 جزء سیتوکین‌های التهابی هستند که با از طریق عوامل دفاع ذاتی و با عوامل دفاع اختصاصی و یا هر دو عمل می‌کنند (۳۱). در مطالعه حاضر این دو فاکتور در موش‌های تحت تیمار نسبت به گروه شاهد تغییر چشمگیری نداشتند. فاکتور IL-4 جزء سیتوکین‌های ضد التهابی می‌باشد که این سیتوکین را می‌توان به لحاظ مهار ماکروفاژهای فعال به عنوان سیتوکین مهارکننده ایمنی ذاتی و ایمنی سلولی به حساب آورد. در بررسی انجام شده مشاهده گردید این فاکتور در موش‌ها با افزایش غلظت عصاره در نوشیدنی فراسودمند، افزایش یافته است. خانواده اینترلوکین-۱۷ (IL-17) مجموعه‌ای از سیتوکین‌ها است که در هر دو پاسخ التهابی و مزمن شرکت می‌کنند که در موش‌های تغذیه شده با نوشیدنی فراسودمند ترکیبی عصاره انواع کلم با غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۸۰۰ این فاکتور نسبت به دو گروه دیگر افزایش داشته است. در مطالعه‌ای گزارش شده که اختلال در تولید IL-17، می‌تواند منجر به پاسخ‌های التهابی و آسیب بافتی ریه، به علت انباشت بیش از حد نوتروفیل شود (۵۵). ترکیبات فعال زیستی مختلف مشتق شده از غذاهای طبیعی، به ویژه حیوانی، مانند شیر، صدف، تخم مرغ، ماهی، گوسفند و غیره ثابت شده است که در تقویت ایمنی ذاتی و ایجاد سازگاری

و افزایش مقاومت در برابر عفونت‌ها و بیماری‌ها مؤثر هستند (۷، ۲۸). اما با این حال، در مقایسه با ترکیبات فعال زیستی مبتنی بر حیوانات، در چندین مطالعه اثرات تعدیل‌کننده سیستم ایمنی ترکیبات فعال زیستی مشتق شده از گیاهان گزارش شده است. در حال حاضر، چندین مطالعه گزارش شده که ترکیبات فعال زیستی مشتق شده از گندم (۱۶)، جو (۳۴)، سویا (۵۸)، ودانه کتان (۵۶) می‌تواند تأثیرات مثبتی بر سیستم ایمنی انسان داشته باشد (۳۰). نتایج مطالعه‌ای نشان می‌دهد که اولیگوپپتیدهای گردو با غلظت‌های WBmg/kg ۴۴۰-۱۱۰ باعث تعدیل سیستم ایمنی (IL-2، IL-10، IL-12) و بهبود تولید ایمونوگلوبولین (IgM و IgG و IgA) در طول دوره آزمایش گردید (۳۳). ترکیب عصاره غنی از آنتوسیانین برنج سیاه (BRAE) و اسیدرزمارینیک (RA) بر همکنش‌های افزایشی رادر کاهش سطوح میلوپراکسیداز (MPO) و اکسیدنیتریک (NO) و هم‌چنین بیان برخی واسطه‌های التهابی (IL-6، IL-1 β و iNOS) به ویژه در دوز mg/kg ۱۰۰ نشان داد، هم‌چنین رژیم غذایی BRAE و RA، به تنهایی و به صورت ترکیبی، علائم و التهاب کولیت ناشی از دکستران سولفات سدیم (DSS) را در موش‌ها کاهش داد (۵۹). در مطالعه‌ای نقش آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی کلم سفید و قرمز (*oleracea Brassica*) در محافظت کبدی به وسیله N-نیترودی‌اتیل‌آمین (NDEA) در کبد موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفت؛ نتایج نشان داد که کلم‌های سفید و قرمز هر دو باعث کاهش سرطان کبدی در موش‌های تحت تیمار با NDEA و CCL4 و هم‌چنین باعث بهبود عملکرد کبد و کلیه، به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی کلم قرمز شدند (۴۳). مطالعه‌ای با هدف بررسی اثر محافظتی مخلوط عصاره‌چای سبز (GTE) و عصاره هسته انگور (GSE) بر سرکوب ایمنی ناشی از اشعه در موش صحرائی انجام شده است، موش‌های صحرائی نر در معرض یک دوز واحد تابش گاما (۵ و ۱۰ گری) قرار گرفتند سپس با گاوآژ با مخلوط GTE و GSE (به ترتیب ۱۰۰ میلی‌گرم: ۲۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن)، به مدت ۱۴ روز متوالی تیمار شدند. سطح سیتوکین‌های التهابی فاکتور نکروز توموری- α و پروتئین واکنشی C پس از تابش اشعه گاما افزایش یافته و با تجویز مخلوط به میزان قابل توجهی کاهش یافت. علاوه بر این، گروه‌های تحت تیمار با

2. Amin, A.H., Bughdadi, F.A., Abo-Zaid, M.A., Ismail, A.H., El-Agamy, S.A., Alqahtani, A., El-Sayyad, H.I., Rezk, B.M. and Ramadan, M.F., 2019. Immunomodulatory effect of papaya (*Carica papaya*) pulp and seed extracts as a potential natural treatment for bacterial stress. *Journal of food biochemistry*, 43, p.e13050.
3. Aziz, M. and Karboune, S., 2018. Natural antimicrobial /antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58, pp.486-511.
4. Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A. and Aruoma, O. I., 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, pp.1553-1561.
5. Barberis, C. L., Carranza, C. S., Magnoli, K., Benito, N. and Magnoli, C.E., 2019. Development and removal ability of non-toxicogenic *Aspergillus* section *Flavi* in presence of atrazine, chlorpyrifos and endosulfan. *Revista Argentina de microbiologia*, 51, pp. 3-11.
6. Brindha, P. 2016. Role of phytochemicals as immunomodulatory agents: A review. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 10.
7. Chalamaiah, M., Yu, W. and Wu, J., 2018. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chemistry*, 245, pp. 205-222.
8. Chauhan, H. and Singh, M., 2019. Phytochemical characterization and antibacterial potential of Indian and Chinese cabbage genotypes against human pathogens in Uttarakhand, India *International Journal of Recent Scientific Research*, 17(12), pp. 36462-36466.
9. Cruz, A. B., Pitz, H. D. S., Veber, B., Bini, L. A., Maraschin, M. and Zeni, A. L. B., 2016. Assessment of bioactive metabolites and hypolipidemic effect of polyphenolic-rich red cabbage extract. *Pharmaceutical biology*, 54, pp. 3033-3039.
10. Deng, Z., Rong, Y., Teng, Y., Mu, J., Zhuang, X., Tseng, M., Samykutty, A., Zhang, L., Yan, J. and Miller, D., 2017. Broccoli-derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell AMP-activated protein kinase. *Molecular Therapy*, 25, pp. 1641-1654.

مخلوط آنتی‌اکسیدان افزایش قابل توجهی در تمام پارامترهای خون و کاهش قابل توجهی در سطح کلسترول و تری‌گلیسرید نشان دادند (۱۱). در نهایت می‌توان بیان کرد که افزایش پاسخهای ایمنی ذاتی و انطباقی در موش‌های آزمایشگاهی با تیمار نوشیدنی فراسودمند ترکیبی عصاره گیاهان خانواده چلیپائیان شامل کلم قرمز، کلم سفید، کلم بروکلی و گل کلم باعث ایجاد تغییراتی در مکانیسم فیزیولوژیکی شده که منجر به بهبود ایمنی‌های سلولی و هومورال گردیده است.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اتانول حلالی کارآمد برای استخراج عصاره از چهار گیاه خانواده چلیپائیان (کلم قرمز، کلم سفید، کلم بروکلی و گل کلم) بوده است. نتایج به دست آمده حاکی از بالا بودن میزان فنل و فلاونوئید تام در عصاره هیدراتانولی کلم سفید بود. در بررسی‌های انجام شده تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، در روش DPPH، بالاترین میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد به عصاره هیدراتانولی کلم قرمز تعلق داشت. در این مطالعه، ارزیابی سیستم ایمنی با بررسی فاکتورهای ایمنی هومورال (IgG)، اینترفرون-گاما (IFN- γ)، اینترلوکین-4 (IL-4)، اینترلوکین-10 (IL-10) و اینترلوکین-17 (IL-17) در موش‌های آزمایشگاهی تیمار شده با نوشیدنی‌های فراسودمند ترکیبی حاوی عصاره‌های گیاهان خانواده چلیپائیان توسط روش ELISA صورت پذیرفت. با مقایسه تأثیرات بر پاسخ‌های ایمنی هومورال ناشی از ترشح سیتوکین‌ها و تولید آنتی‌بادی توسط فاکتور IgG، تأثیرات مثبت تیمار نوشیدنی‌های فراسودمند بر ایمنی هومورال سبب تحریک تولید آنتی‌بادی و تعامل بین سیستم ایمنی ذاتی و سازگار شده است. این نتایج نشان می‌دهد که نوشیدنی فراسودمند تولیدشده می‌تواند یک عامل درمانی امیدوارکننده با توانایی بهبوددهندگی سیستم ایمنی در غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ عصاره باشد.

۵- منابع

1. Ahmed, F. A. and Ali, R. F., 2013. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh and processed white cauliflower. *BioMed research international*, 2013.

- Product Communications*, 6, 1934578X1100600923.
21. Jakopic, J. and Veberic, R., 2009. Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta Agriculturae Slovenica*, pp. 93, p. 11.
 22. Jongen, W. 2002., *Fruit and vegetable processing: Improving quality*, Elsevier.
 23. Jung, C.-H., Seog, H.-M., Choi, I.-W., Park, M.-W. and Cho, H.-Y., 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 39, pp. 266-274.
 24. Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. and Sokmen, A., 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food chemistry*, 100, pp.584-589.
 25. Kaulmann, A., Andre, C. M., Schneider, Y.-J., Hoffmann, L. and Bohn, T., 2016. Carotenoid and polyphenol bioaccessibility and cellular uptake from plum and cabbage varieties. *Food chemistry*, 197, pp. 325-332.
 26. Kaur, S. and Mondal, P., 2014. Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *J Microbiol Exp*, 1, p. 00005.
 27. Khan, S.R., Van Der Burgh, A.C., Peeters, R.P., van Hagen, P.M., Dalm, V.A. and Chaker, L., 2021. Determinants of Serum Immunoglobulin Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in immunology*, 12, p.1103.
 28. Kiewiet, M.B., Faas, M.M. and De Vos, P., 2018. Immunomodulatory protein hydrolysates and their application. *Nutrients*, 10, p. 904.
 29. Koh, E., Wimalasiri, K., Chassy, A. and Mitchell, A., 2009. Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. *Journal of food composition and analysis*, 22, pp.637-643.
 30. Kure, C., Timmer, J. and Stough, C., 2017. The immunomodulatory effects of plant extracts and plant secondary metabolites on chronic neuroinflammation and cognitive aging: a mechanistic and empirical review. *Frontiers in pharmacology*, 8, pp. 117.
 31. Lippitz, B.E., 2013. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *The lancet oncology*, 14, pp. 218-228.
 32. Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R. and Carle, R., 2009. Residues of grape
 11. El-Desouky, W., Hanafi, A. and Abbas, M. M., 2017. Radioprotective effect of green tea and grape seed extracts mixture on gamma irradiation induced immune suppression in male albino rats. *International journal of radiation biology*, 93, pp. 433-439.
 12. Ghasemi, K., Ghasemi, Y. and Ebrahimzadeh, M. A., 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci*, 22, pp. 277-281.
 13. Ghoshal, G. & Kansal, S. K. 2019. The emerging trends in functional and medicinal beverage research and its health implication. *Functional and medicinal beverages*. Elsevier.
 14. Hajmohammadi, A., Pirouzifard, M., Shahedi, M. and Alizadeh, M., 2016. Enrichment of a fruit-based beverage in dietary fiber using basil seed: Effect of Carboxymethyl cellulose and Gum Tragacanth on stability. *LWT*, 74, pp. 84-91.
 15. He, J. and Giusti, M. M., 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*, 1, pp.163-187.
 16. Horiguchi, N., Horiguchi, H. and Suzuki, Y., 2005. Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69, pp. 2445-2449.
 17. Hussain, H., Al-Harrasi, A. and Green, I. R. 2016 .Frankincense (*Boswellia*) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier.
 18. Jaafar, N. A., 2020. In vitro efficacy assessment of cauliflower (*Brassica oleracea* Var Botrytis) alcoholic extract in mortality percentage of motile stage of mite (*Teranychusurticae* Koch). *Annals of Tropical Medicine and Health*, 23, pp.94-102.
 19. Jaiswal, A. K., Abu-Gahnam, N. and Gupta, S., 2012. A comparative study on the polyphenolic content, antibacterial activity and antioxidant capacity of different solvent extracts of *Brassica oleracea* vegetables. *International journal of food science & technology*, 47, pp. 223-231.
 20. Jaiswal, A. K., Rajauria, G., Abu-Gahnam, N. and Gupta, S., 2011. Phenolic composition, antioxidant capacity and antibacterial activity of selected Irish *Brassica* vegetables. *Natural*

42. Raza, A., Hafeez, M.B., Zahra, N., Shaukat, K., Umbreen, S., Tabassum, J., Charagh, S., Khan, R.S.A. and Hasanuzzaman, M., 2020. The plant family *Brassicaceae*: Introduction, biology, and importance. *The plant family brassicaceae*. Springer.
43. Rezq, A. A., 2017. Antioxidant Role of Cabbage (*Brassica oleracea*) Ethanolic Extract in Hepatoprotective of N-nitrosodiethylamine Induced Initiation of Hepatocellular Carcinoma in Rat Liver. *Egyptian Journal of Nutrition*, 32, p. 2.
44. Seong, G.U., Hwang, I.W. and Chung, S.K., 2016. Antioxidant capacities and polyphenolics of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. *Food Chemistry*, 199, pp. 612-618.
45. Sethi, S., Tyagi, S.K. and Anurag, R.K., 2016. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of food science and technology*, 53, pp. 3408-3423.
46. Shu, J., Liu, Y., Li, Z., Zhang, L., Fang, Z., Yang, L., Zhuang, M., Zhang, Y. and Lv, H., 2016. Detection of the diversity of cytoplasmic male sterility sources in broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) using mitochondrial markers. *Frontiers in plant science*, 7, p. 927.
47. Silambarasan, T., Manivannan, J., Raja, B. and Chatterjee, S., 2016. Prevention of cardiac dysfunction, kidney fibrosis and lipid metabolic alterations in L-NAME hypertensive rats by sinapic acid—Role of HMG-CoA reductase. *European Journal of Pharmacology*, 777, pp. 113-123.
48. Singh, J., Upadhyay, A.K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K.P. and Rai, M., 2006. Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Scientia Horticulturae*, 108, pp. 233-237.
49. Singh, J., Upadhyay, A.K., Prasad, K., Bahadur, A. and Rai, M., 2007. Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in *Brassica* vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, pp. 106-112.
50. Subramanian, V. and Gowry, S., 2011. Antitumor activity and antioxidant role of *Brassica oleracea Italica* against ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2, pp. 275-285.
51. Sultana, B., Anwar, F. and Ashraf, M., 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 112, pp. 551-559.
33. Mao, R., Wu, L., Zhu, N., Liu, X., Hao, Y., Liu, R., Du, Q. and Li, Y., 2020. Immunomodulatory effects of walnut (*Juglans regia* L.) oligopeptides on innate and adaptive immune responses in mice. *Journal of Functional Foods*, 73, p. 104068.
34. Mao, R., Wu, L., Zhu, N., Liu, X., Liu, R. and Li, Y., 2019. Naked Oat (*Avena nuda* L.) Oligopeptides: Immunomodulatory Effects on Innate and Adaptive Immunity in Mice via Cytokine Secretion, Antibody Production, and Th Cells Stimulation. *Nutrients*, 11, p. 927.
35. Marigoudar, S.R., Mohan, D., Nagarjuna, A. and Karthikeyan, P., 2018. Biomarker and histopathological responses of Lates calcarifer on exposure to sub lethal concentrations of chlorpyrifos. *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, pp. 327-335.
36. Marino, D., Ariz, I., Lasa, B., Santamaría, E., Fernández-Irigoyen, J., González-Murua, C. and Aparicio Tejo, P.M., 2016. Quantitative proteomics reveals the importance of nitrogen source to control glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*. *Journal of experimental botany*, 67, pp. 3313-3323.
37. Oancea, S., Mila, L. and Ketney, O., 2019. Content of Phenolics, in vitro Antioxidant Activity and Cytoprotective Effects against Induced Haemolysis of Red Cabbage Extracts. *Biotech. Lett*, 24, pp. 1-9.
38. Ordonez, A.A.L., Gomez, J.D. and Vattuone, M.A., 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food chemistry*, 97, pp. 452-458.
39. Patel Rameshvar, K., Patel, M.M., Kanzariya, N.R., Vaghela, K.R., Patel, R.K. and Patel, N.J., 2010. In-vitro hepatoprotective activity of *Moringa oleifera* Lam. leave on isolated rat hepatocytes. *Int. j. ph. sci*, 2, pp. 457-463.
40. Podsedek, A., 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40, pp. 1-11.
41. Qaderi, M.M., Kurepin, L.V. and Reid, D.M., 2006. Growth and physiological responses of canola (*Brassica napus*) to three components of global climate change: temperature, carbon dioxide and drought. *Physiologia Plantarum*, 128, pp. 710-721.

- heteromeric receptor complex. *The Journal of Immunology*, 177, pp. 36-39.
56. Udenigwe, C.C., Lu, Y.L., Han, C.H., Hou, W.C. and Aluko, R.E., 2009. Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chemistry*, 116, pp. 277-284.
 57. Verma, A.K., Pathak, V., Singh, V.P. and Umaraw, P., 2016. Storage study of chicken meatballs incorporated with green cabbage (*Brassica oleracea*) at refrigeration temperature (4±1°C) under aerobic packaging. *Journal of applied animal research*, 44, pp. 409-414.
 58. Yimit, D., Hoxur, P., Amat, N., Uchikawa, K. and Yamaguchi, N. 2012. Effects of soybean peptide on immune function, brain function, and neurochemistry in healthy volunteers. *Nutrition*, 28, pp.154-159.
 59. Zhao, L., Zhang, Y., Liu, G., Hao, S., Wang, C. and Wang, Y., 2018. Black rice anthocyanin-rich extract and rosmarinic acid, alone and in combination, protect against DSS-induced colitis in mice. *Food & function*, 9, pp.2796-2808.
 - activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14, pp.2167-2180.
 52. Sy, J.B.A., Hsu, T.C., Limaye, A. and Liu, J.R., 2020. Oral administration with a traditional fermented multi-fruit beverage modulates non-specific and antigen-specific immune responses in BALB/c mice. *Plos one*, 15, e0233047.
 53. Thomas, M., Badr, A., Desjardins, Y., Gosselin, A. and Angers, P., 2018. Characterization of industrial broccoli discards (*Brassica oleracea* var. *italica*) for their glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/MS and spectrophotometric methods. *Food chemistry*, 245, pp. 1204-1211.
 54. Tometten, M., Blois, S., Kuhlmei, A., Stretz, A., Klapp, B.F. and Arck, P.C., 2006. Nerve growth factor translates stress response and subsequent murine abortion via adhesion molecule-dependent pathways. *Biology of reproduction*, 74, pp. 674-683.
 55. Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Bos, T.V., Gurgel, J., Derry, J., Tocker, J. and Peschon, J., 2006. Cutting edge: interleukin 17 signals through a

(Original Research Paper)

Functional Beverage Containing Extracts of Plants of the Family *Brassicaceae* to Improve the Immune System

Zahra Latifi¹, Saeid Abedian Kenari^{2*}, Ali Akbar Mashayekh³

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

2-Professor, Department of immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

3-Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities and Social Sciences, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Iran.

Received:08/01/2022

Accepted:07/03/2022

Abstract

The immune system is closely related to human health. Accordingly, functional foods containing bioactive compounds can be considered as of the immune system boosters. The aim of the present study was to produce a functional beverage containing extracts of family *Brassicaceae* plants (white cabbage, red cabbage, broccoli and cauliflower) to improve the immune system in female laboratory mice. For this purpose, hydroethanolic extracts were prepared from four types of cabbage, then the amount of total phenolic and flavonoid compounds and antioxidant capacity by DPPH method for extracts were evaluated. The functional beverage were prepared by combining four extracts with concentrations of 400 and 800 µg/ml and laboratory mice were fed daily with doses of 1 cc for 15 consecutive days. Immune system was assessed by examining IgG, IFN-γ, IL-4, IL-10 and IL-17 by Non-competitive ELISA method. The results showed high levels of phenol (1.63 ± 0.024 mg GA/g) and total flavonoids (0.426 ± 0.004 mg QE/g) in white cabbage hydroethanolic extract. Also in DPPH method, the highest rate of free radical scavenging was related to red cabbage with 98.26% at a concentration of 800 µg/ml. The results of immune system evaluation showed that three factors of IgG, IL-10 and IL-17 in mice were increased by increasing the concentration of the extract to 800 µg/ml in the functional beverage; IgG factor increased to 10.81 ± 6.68 mg/ml in the control group and to 27.35 ± 20.86 mg/ml in the third group with 800 µg/ml extract concentration. The results showed that the extracts of plants of the *Brassicaceae* family have a high potential for use in food products with the aim of increasing the quality and nutritional value.

Keywords: *Brassicaceae* Plants, Plant Extract, Phytochemical Properties, Antioxidant Capacity, Immune System.

*Corresponding Author: abedianlab@yahoo.co.uk

(مقاله پژوهشی)

اثر ضد اکسایشی عصاره پوست مرکبات بر کنترل اکسایش روغن کانولا

حسین عالی^۱، مریم عزیزخانی^{۲*}، فهیمه توریان^۲

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران.

۲-دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۷

DOI: 10.30495/jfst.2022.1950916.1777

چکیده

هدف از این پژوهش مقایسه فعالیت ضد اکسایشی عصاره پوست مرکبات (کشت شده در شمال و جنوب ایران) بر اکسایش روغن کانولا در شرایط تسریع شده طی ۵ روز بود. عصاره های اتانولی پوست مرکبات تهیه شده با روش فراصوت (توان ۱۵۰ وات، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه) در مقایسه با عصاره های تولید شده از طریق روش استخراج معمولی، راندمان استخراج و ترکیبات فنلی بالاتری را نشان دادند. پوست نارنج جنوبی بیشترین مقدار ترکیبات فنلی کل (۱/۷۸ میلی گرم اسید گالیک در گرم) را داشت و پس از آن پوست نارنج شمالی (۱/۴۶ میلی گرم اسید گالیک در گرم)، لیموی جنوبی (۱/۲۵ میلی گرم اسید گالیک در گرم)، لیموی شمالی (۱/۰۲ میلی گرم اسید گالیک در گرم)، پرتقال جنوبی (۱/۳۲ میلی گرم اسید گالیک در گرم) و پوست پرتقال شمالی (۱/۱۰ میلی گرم اسید گالیک در گرم) قرار گرفتند. ترکیبات فنلی عصاره پوست مرکبات جنوب ایران بیشتر از میزان ترکیبات فنلی در عصاره پوست مرکبات شمال بود. پایداری اکسایشی و نیز فعالیت جذب رادیکال آزاد (DPPH) عصاره پوست نارنج جنوبی از سایر تیمارها بالاتر بود و به دنبال آن عصاره نارنج شمالی، پرتقال جنوبی، پرتقال شمالی، لیموی جنوبی و لیموی شمالی قرار گرفتند. با توجه به نتایج، عصاره های پوست مرکبات حاوی مقدار قابل توجهی ترکیبات فنلی بوده و به عنوان آنتی اکسیدان های طبیعی پتانسیل واکنش با رادیکال های آزاد و جلوگیری از اکسایش چربی ها را دارند.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، پایداری اکسایشی، عصاره، روغن کانولا، مرکبات.

۱- مقدمه

آنتی اکسیدان ها یکی از پرکاربردترین گروه های افزودنی های خوراکی به شمار می روند و نقش کلیدی در جلوگیری از ایجاد طعم های تندی و فساد ناشی از اکسایش اسیدهای چرب اشباع نشده ایفا می کنند. با این حال، استفاده تجاری از آنتی اکسیدان های مصنوعی (سنتزی) به شدت توسط مراجع قانونی کنترل می شود، آگاهی مصرف کنندگان در مورد افزودنی های غذایی افزایش می یابد و توجه به بحث ایمنی مواد غذایی باعث افزایش تمایل به استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی به عنوان جایگزین ترکیبات مصنوعی شده است. گزارش شده است که اسانس ها و عصاره بسیاری از گیاهان دارای درجات مختلف فعالیت های از آنتی اکسیدانی هستند که باعث پایداری اکسایشی چربی ها و روغن های می شود (۴). پایداری اکسایشی روغن ها در طول فرایند سرخ کردن عمیق مسئله مهمی در حفظ کیفیت آنها به شمار می رود. سرخ کردن روشی متداول برای تولید و تهیه غذاها در سراسر جهان محسوب می شود. نزدیک به نیمی از سفارشات غذا برای وعده های روزانه شامل یک یا چند وعده از محصولات سرخ شده در رستوران ها و مراکز تهیه غذا می باشد. در طول سرخ کردن عمیق، روغن در معرض دمای بالا در مجاورت هوا و رطوبت قرار می گیرد و دچار فساد اکسایشی می گردد (۷). اثبات شده است که اکسایش چربی می تواند منجر به تغییرات در ارزش عملکردی، حسی، تغذیه ای و حتی ایمنی غذاهای سرخ شده گردد (۴). علاوه بر این، واکنش بین لیپیدهای پراکسید شده و پروتئین ها باعث پلیمریزاسیون، تسریع تشکیل رنگدانه های قهوه ای و برخی عوارض مانند پیری زودرس، سرطان زایی، آسیب به DNA، پارکینسون، تشکیل تومور و بیماری های کرونری قلب می شود (۱). اگرچه پوست و محصولات جانبی مرکبات معمولاً به عنوان زباله های کشاورزی محسوب می شوند اما منابع غنی از آنتی اکسیدان های طبیعی می باشند. چندین مطالعه کارایی آنتی اکسیدانی عصاره های پوست انار، پوست سیب زمینی، تفاله چغندر قند و غیره را در روغن های گیاهی مورد بررسی قرار داده اند (۱۰، ۱۶). فرآورده های جانبی فرآوری مرکبات به طور طبیعی منبع غنی فلاونوئیدها هستند. پوست که تقریباً نیمی از جرم

میوه را تشکیل می دهد حاوی بیشترین مقدار فلاونوئیدها در مرکبات است. عصاره هایی که از پوست میوه مرکبات استخراج می شود دارای پتانسیل بالایی به عنوان منبع آنتی اکسیدان در جلوگیری از واکنش های اکسایشی می باشند (۲۵). در یک مطالعه، Londono-Londono و همکاران (۲۰۱۰) عصاره و ترکیبات فلاونوئیدی پوست مرکبات (لیمو ترش، پرتقال نارنگی) آمریکای جنوبی را از طریق بهینه سازی استخراج با کمک امواج فراصوت با کارایی بالا استخراج نموده و فعالیت آنتی اکسیدانی این اجزا را گزارش کردند (۱۴). Hegazy و Ibrahim (۲۰۱۲) به ارزیابی کارایی حلال های آلی مختلف مانند متانول، اتانول، دی کلرومتان، استون، هگزان و اتیل استات برای استخراج عصاره و فلاونوئیدها از پوست پرتقال و بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی و ضدرادیکالی آن ها پرداختند. نتایج ایشان نشان داد که عصاره اتانولی پوست پرتقال دارای بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد (۱۱). در مطالعه Singh و همکاران (۲۰۲۰) اعلام شد که عصاره پوست مرکبات را می توان به عنوان منبع ترکیبات نگهدارنده آنتی اکسیدانی برای تولید محصولات غذایی جدید مورد استفاده قرار داد چرا که نه تنها بی خطر و ایمن هستند بلکه دارای فعالیت های ارتقا دهنده سلامت نیز می باشند (۲۱). در شمال و جنوب ایران مرکبات (به ویژه پرتقال، نارنج و لیمو) در مقیاس وسیع تولید شده، ماده اولیه واحدهای تولیدی و کارخانجات تولید آبمیوه، کنساتره و کنسرو میوه را تشکیل داده و در نهایت ضایعات این کارخانجات بدون فرآوری دور ریخته می شوند. با توجه به ضرورت افزایش تولید داخلی و خودکفایی در زمینه مواد اولیه و نیز تاکید مقامات و مراجع غذایی کشور بر پیشرفت صنایع تبدیلی در حوزه کشاورزی و غذا، استفاده از ضایعات مربوط به پوست مرکبات جهت استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی با قیمت مناسب و کارایی بالا برای حصول اهداف فوق مفید به نظر می رسد. عمده مطالعات انجام شده در خصوص استخراج و ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی و یا ضد میکروبی اسانس پوست مرکبات انجام گرفته است. لذا، در این پژوهش به بررسی و مقایسه فعالیت ضد اکسایشی عصاره پوست مرکبات (پرتقال، نارنج و لیمو) شمال (مازندران)

(Iranevaporator RV10 V-C model, Azin Co.,) در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تغلیظ، به روش انجمادی خشک Iran(Dorsatech Co.,) و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۲-۳-اندازه گیری ترکیبات فنلی کل

میزان ترکیبات فنلی عصاره لیوفیلیزه به روش فولین-سیوکالچو تعیین شد. به طور خلاصه، ۰/۲ میلی لیتر نمونه عصاره با ۱/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالچو مخلوط و پس از ۵ دقیقه، ۱/۵ میلی لیتر محلول کربنات سدیم (غلظت ۶۰ گرم در لیتر) به مخلوط اضافه شد. پس از ۹۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق میزان جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (T80 model, PG Instrument Co., Australia) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج نمونه‌ها بر اساس معادل اسید گالیک در گرم بیان شد. منحنی استاندارد با تهیه غلظت‌های مختلف اسید گالیک و قرائت جذب برای هر غلظت در ۷۶۵ نانومتر ترسیم گردید (۱۸).

۲-۴-آزمون ارزیابی فعالیت ضد اکسایشی به روش گیرندگی

رادیکال آزاد DPPH^۱

در این مطالعه، فعالیت مهار رادیکال آزاد عصاره‌ها با توجه به روش Okhli و همکاران (۲۰۲۰) اندازه گیری شد (۱۹). عصاره در متانول آبی ۵۰ درصد (حجمی/حجمی) با غلظت نهایی ۵ گرم در لیتر حل شد. سپس، ۰/۱ میلی لیتر از محلول عصاره با ۲ میلی لیتر از محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH در متانول مخلوط و در دمای اتاق در تاریکی به مدت ۶۰ دقیقه نگهداری شد. جذب این محلول در ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد هر نمونه عصاره با استفاده از معادله صورت زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \left(\frac{\text{جذب اولیه}}{\text{جذب نهایی}} - \text{جذب اولیه} \right) = \text{مهار رادیکال آزاد} (\%)$$

جذب اولیه و جذب نهایی، به ترتیب، مقادیر جذب DPPH در زمان صفر و پس از ۶۰ دقیقه می‌باشند

و جنوب (کرمان) ایران در پایدارسازی اکسایشی روغن کانولا پرداخته خواهد شد.

۲-مواد و روش

۲-۱-مواد اولیه

کلیه مواد شیمیایی و محلول‌ها (با درجه آزمایشگاهی) جهت انجام آزمایشات از شرکت شارلو (شارلو، اسپانیا) تهیه شد. پرتقال، نارنج و لیمو از بازار محلی شهرهای تنکابن و بم تهیه شدند. میوه‌ها پس از شستشوی سطحی، پوست گیری شدند. پوست میوه‌ها، پس از قطعه‌قطعه کردن به تکه‌هایی با ابعاد حدود ۱ در ۱ سانتی‌متر، بلافاصله در دمای منفی ۲۳ درجه سانتی گراد ذخیره شد تا اکسایش ترکیبات زیست فعال به حداقل برسد. روغن کانولای تصفیه شده فاقد آنتی‌اکسیدان از شرکت کشت و صنعت شمال تهیه شد.

۲-۲-تهیه عصاره اتانولی پوست مرکبات

جهت استخراج عصاره، پوست مرکبات (برای هر نمونه از مرکبات ۱۰۰ گرم پوست تهیه شد) با حلال اتانول (۸۰ درصد حجمی/حجمی و نسبت نمونه به حلال ۱ گرم به ۲۰ میلی لیتر) مخلوط شده و با استفاده از همزن مخلوط کن (MCL-HX model, MeCan Co., China) جهت افزایش بازده استخراج، استخراج در حمام فراصوت انجام شد. نمونه‌ها به یک بالن ژوژه (۱۰۰ میلی لیتری) منتقل شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق تحت فراصوت (توان ۱۵۰ وات، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه) (S30H model, Alma Co., Germany) قرار گرفتند. سپس، با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ تحت خلاء فیلتر شدند. به منظور حذف مواد روغنی و افزایش کارایی فرایند تغلیظ، عصاره‌ها با آن-هگزان مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام فراصوت (۱۵۰ وات در دمای اتاق) نگهداری شدند. پس از تیمار با فراصوت، فاز هیدروالکلی از محلول جدا و با دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (RF Iran) 10000 model, Orum Tajhiz Gostar Co., عصاره‌های حاصل با استفاده از اوپراتور دوار تحت خلاء

۲-۵-افزودن عصاره‌ها به روغن

برای تهیه محیط سرخ کردن، عصاره پوست مرکبات و آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT (بوتیل هیدروکسی تولوئن^۱) به ترتیب با غلظت‌های ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام و ۲۰۰ پی‌پی‌ام به روغن کانولا افزوده شد. غلظت‌های عصاره‌ها بر اساس پیش‌آزمون‌های انجام شده جهت تعیین غلظت نهایی آزمون مشخص گردید. سپس نمونه با اولتراتوراکس با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه همگن شد.

۲-۶-آزمون ارزیابی پایداری اکسایشی

ارزیابی پایداری اکسایشی نمونه‌های روغن با استفاده از دستگاه رنسیمت (مدل Metrohm Rancimat 743، سوئیس) انجام شد (۱۹).

۲-۷-ارزش توتوکس

ارزش توتوکس با استفاده از ارزش‌های پراکسید و آنیسیدین مطابق روش AOCs (۱۹۹۸) و بر اساس معادله زیر محاسبه گردید (۲):

$$\text{عدد آنیسیدین} + (\text{عدد پراکسید}) \times ۲ = \text{ارزش توتوکس}$$

۳-نتایج و بحث

۳-۱-ترکیبات فنلی کل

یکی از محصولات فرعی صنایع آب‌میوه، کمپوت و میوه خشک در ایران، پوست میوه به ویژه پوست مرکبات است. این محصول جانبی ارزشمند دارای مقدار قابل توجهی ترکیبات فنلی است. از آن جایی که عوامل متعددی مانند آب و هوا، ترکیب خاک و گونه میوه تأثیر زیادی بر نوع و میزان ترکیبات شیمیایی پوست مرکبات دارند، محتوای فنلی کل پوست نارنج، لیمو و پرتقال کشت شده در شمال و جنوب ایران تعیین شد. با توجه به داده‌های ارائه شده در جدول ۱، عملکرد استخراج لیموی جنوب و نارنج شمال به ترتیب بیشترین (۱/۹۶ درصد وزنی-وزنی) و کمترین (۱/۵۳ درصد وزنی-وزنی) در بین نمونه‌ها بود (۰/۰۱ < p) و تفاوت قابل توجهی بین بازده استخراج پوست مرکبات شمال و جنوب

وجود داشت (۰/۰۱ < p). پوست نارنج دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی کل و پس از آن پوست پرتقال و لیمو در مرتبه‌های بعدی قرار داشتند (۰/۰۱ < p). میزان ترکیبات فنلی به دست آمده برای پوست مرکبات جنوب ایران به طور معنی داری بیشتر از ترکیبات فنلی پوست مرکبات شمال بود (۰/۰۱ < p). تفاوت میزان ترکیبات فنلی نمونه‌های شمالی و جنوبی را می‌توان ناشی از تأثیر دمای بالاتر و اقلیم خشک‌تر جنوب ایران نسبت به نواحی شمالی دانست (۱۳). همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بازده استخراج نمونه‌های تیمار شده با فراصوت به طور قابل توجهی بالاتر از نمونه‌های شاهد (بدون تیمار فراصوت) بود که بیانگر اثر امواج فراصوت بر تخریب ساختار دیواره سلولی و تسهیل آزادسازی ترکیبات فنلی از سلول‌های تخریب شده است. مطابق تحقیقات قبلی، فراصوت تأثیر مثبتی بر بازده استخراج اسیدهای فنلیک پوست مرکبات دارد و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بهترین حالت برای حفظ پایداری ترکیبات فنلی است (۱۵). مونتر و کالدرون و همکاران (۲۰۱۹) گزارش نمودند که استفاده از تیمار فراصوت (۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ وات طی ۵، ۱۷/۵ و ۳۰ دقیقه در دمای محیط) میزان ترکیبات فعال زیستی استخراج شده از پوست پرتقال را تا ۵۵ درصد افزایش می‌دهد (۱۷). هم‌چنین، دهقان و همکاران (۱۳۹۸) اعلام نمودند که یک گرم اسانس پوست پرتقال حاوی ۰/۱۶ میلی گرم ترکیبات فنلیک بر مبنای اسید گالیک بر حسب ماده خشک می‌باشد (۶). در مطالعه ای که توسط آیدین و همکاران (۲۰۲۱) انجام شد، ترکیبات فنلی پوست پرتقال و لیمو تیمار شده با فراصوت، به ترتیب ۱/۰۳ و ۰/۹۸ میلی گرم معادل اسید گالیک در گرم بود و بازده استخراج برای پرتقال و لیمو ۱/۶ و ۱/۸ درصد (وزنی-وزنی) بود (۳). ترکیبات فنلی اصلی پوست پرتقال هسپریدین، نارینجین و نئوهسپریدین هستند (۵). پوست نارنج، دارای فلاونوئیدهای پلی متوکسیله و فلاونوئید C- و O- گلیکوزیدها و پوست لیمو حاوی هسپرتین، هسپریدین واریوسیتین به عنوان فراوان‌ترین فلاونوئیدهاست (۲۵)،

(۲۳، ۹)

جدول ۱- بازده استخراج و محتوای ترکیبات فنلیک (TPC) در نمونه‌های پوست مرکبات

عصاره پوست مرکبات	بازده استخراج (درصد وزنی/وزنی)	TPC (میلی گرم اسید گالیک در گرم)
پرتقال شمال-شاهد	۱/۲۰ ^c	۰/۷۵ ^a
پرتقال شمال-US*	۱/۶۸ ^f	۱/۱۰ ^d
نارنج شمال-کنترل	۱/۱۴ ^b	۱/۰۵ ^c
نارنج شمال-US	۱/۵۳ ^e	۱/۴۶ ^f
لیمو شمال-کنترل	۱/۰۹ ^b	۰/۶۹ ^a
لیمو شمال-US	۱/۸۵ ^h	۱/۰۲ ^c
پرتقال جنوب-کنترل	۱/۳۱ ^d	۰/۹۶ ^b
پرتقال جنوب-US	۱/۷۴ ^g	۱/۳۲ ^c
نارنج جنوب-کنترل	۰/۹۷ ^a	۱/۲۹ ^c
نارنج جنوب-US	۱/۶۰ ^c	۱/۷۸ ^g
لیمو جنوب-کنترل	۱/۱۷ ^b	۰/۹۰ ^b
لیمو جنوب-US	۱/۹۶ ⁱ	۱/۲۵ ^c

*US: پیش تیمار فراصوت

a-i: نشان دهنده اختلاف آماری معنا دار در هر ستون

۲-۳- جذب رادیکال آزاد DPPH

با توجه به این که پیش تیمار یا فراصوت موجب افزایش قابل توجه در میزان ترکیبات فنلی استخراج شده از پوست مرکبات گردید در آزمون DPPH تنها از عصاره به دست آمده به روش فراصوت جهت بررسی توانایی جذب رادیکال آزاد استفاده شد. واضح است که با افزایش میزان ترکیبات فنلی ظرفیت جذب رادیکال DPPH نیز افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر، مطابق جدول ۲، پتانسیل عصاره‌ها در مقایسه با BHT در به دام انداختن رادیکال آزاد بدین صورت بود: <BHT نارنج جنوب < نارنج شمال < پرتقال جنوب < لیمو جنوب < پرتقال شمال < لیمو شمال (p < ۰/۰۵). در واقع، فلاوانون‌های اصلی پوست پرتقال که نارینجین و هسپرتین هستند آنتی اکسیدان‌های نسبتاً ضعیفی به شمار می‌روند زیرا فاقد گروه کاتکول (۱، ۲-دی هیدروکسی بنزن)، که ساختار ضروری و تعیین کننده در آنتی اکسیدان‌های فنلی قوی است می‌باشند (۸). در نتیجه، بسیار آهسته با رادیکال پایدار DPPH واکنش می‌دهند. همچنین لازم به

ذکر است که آنتی اکسیدان‌های غیر فنلی مانند آسکوربات که در لیمو و پرتقال به مقدار قابل توجهی وجود دارند می‌توانند تا حدی مسئول فعالیت ضد اکسایشی عصاره‌ها باشند. از آن جا که میزان ترکیبات فنلی تام در عصاره نارنج بیشتر از سایر عصاره‌ها به دست آمد، پتانسیل جذب رادیکال آزاد نیز در عصاره‌های نارنج بالاتر بود (p < ۰/۰۵). در مطالعه Rehman و همکاران (۲۰۰۶)، فعالیت ضد اکسایشی عصاره الکلی انواع مختلف مرکبات با اندازه‌گیری مقدار پراکسید محتوای اسید چرب آزاد و ارزش یدی طی ۶ ماه نگهداری روغن ذرت تصفیه شده در دمای ۲۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد. نتایج نشان داد که عصاره الکلی مرکبات دارای فعالیت ضد اکسایشی بسیار قوی است که تقریباً برابر فعالیت با آنتی اکسیدان BHT می‌باشد. ایشان استفاده از عصاره پوست مرکبات را به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی برای جلوگیری از تندید در روغن‌ها و چربی‌ها توصیه نمودند (۲۴). همچنین، در مطالعه OU و همکاران (۲۰۱۵) ترکیب شیمیایی و فعالیت‌های عملکردی اسانس‌های پوست مرکبات گونه‌های

استفاده از آنالیز کروماتوگرافی انجام شد. فعالیت ضد اکسایشی توسط روش مهار رادیکال DPPH مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که اجزای اصلی استخراج شده لیمون (۸۵/۲۲ درصد)، بتا- میرسن (۴/۳ درصد) و آلفا-پینن (۱/۲۹ درصد) بودند. با توجه به توانایی جذب رادیکال DPPH، اسانس پوست بیشتر از لیمون تنها فعالیت ضد اکسایشی داشت. اسانس به دست آمده نتایج امیدوارکننده ای را جهت کاربرد به عنوان یک عامل نگهدارنده زیستی نشان داد (۲۲). در مطالعه دهقان و همکاران (۱۳۹۸)، طبق نتایج آزمون PPH و قدرت احیاء کنندگی، اسانس پوست پرتقال فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد، هر چند فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری نسبت به TBHQ داشت (۶).

Citrus grandis و *Citrus paradisi* (*C. paradise*) (*C. Osbeck* (L.) مورد بررسی قرار گرفت. لیمون ماده اولیه اسانس پوست *C. grandis* و *C. paradisi* بود. به علاوه، اسانس پوست *C. grandis* غنی از ترکیبات اکسیژن دار یا نیتروژنه بود. ترتیب فعالیت های مهار رادیکال های آزاد اسانس مرکبات بدین صورت بود: اسانس *C. paradisi* < اسانس *C. grandis*. اسانس *grandis* فعالیت ضد میکروبی بهتری نسبت به اسانس *C. paradise* نشان داد (۲۰)، Teneva و همکاران (۲۰۱۹) مطالعه ای با هدف بررسی ترکیب شیمیایی، آنتی اکسیدان و فعالیت ضد میکروبی پوست *Citrus aurantium* L. انجام دادند. شناسایی ترکیبات شیمیایی با

جدول ۲- فعالیت ضد رادیکالی عصاره پوست مرکبات استخراج شده با فراصوت

عصاره پوست مرکبات	فعالیت جذب رادیکال آزاد (درصد)
پرتقال شمال	۱۹/۷۱ ± ۱/۶۵ ^f
نارنج شمال	۴۰/۱۱ ± ۲/۵۰ ^c
لیمو شمال	۱۵/۸۵ ± ۰/۹۲ ^g
پرتقال جنوب	۳۷/۵۰ ± ۴/۲۵ ^d
نارنج جنوب	۵۲/۵ ± ۳/۱۱ ^b
لیموی جنوب	۳۰/۰۵ ± ۲/۷۸ ^e
BHT	۱۰۰ ^a

a-g: نشان دهنده اختلاف آماری معنا دار در هر ستون

مشاهده شد. مطابق جدول ۳، به غیر از BHT که در تمام روزها بالاترین پایداری را نشان داد، کمترین و بیشترین پایداری اکسایشی در روز اول برای روغن کانولای حاوی، به ترتیب، عصاره لیموی شمال (۲/۵ ساعت) و عصاره نارنج جنوب (۳/۹ ساعت) و عصاره پرتقال جنوب (۳/۹ ساعت) ثبت شد ($p < 0/05$). در کل دوره نگهداری، پس از BHT، عصاره نارنج جنوب بالاترین پایداری را در روغن کانولا تحت شرایط تسریع شده ایجاد نمود ($p < 0/05$). با افزایش مدت زمان نگهداری نمونه های روغن پایداری اکسایشی آنها کاهش یافت ($p < 0/05$). در مطالعه Okhli و همکاران (۲۰۲۰) طی بررسی تاثیر اسانس لیمو بر پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان، میزان پایداری از مقدار

۳-۳- پایداری اکسایشی در نسیمت

پایداری اکسایشی مدت زمان رسیدن به نقطه ای است که یکی از شاخص های اکسایشی مانند مقدار پراکسید یا کربونیل، به طور ناگهانی طی شرایط تسریع کننده اکسایش افزایش می یابد. در این روش، افزایش سرعت فرآیند اکسایش فراتر از حد طبیعی یکی از ابزارهای مهم کنترل کیفیت برای تعیین زمان ماندگاری محصول حاوی لیپید به شمار می رود. تغییرات در پایداری اکسایشی روغن کانولا تحت تأثیر عصاره اتانولی پوست مرکبات و BHT در طول نگهداری در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در جدول ۳ نشان داده شده است. کاهش مداوم پایداری اکسایشی با افزایش مدت نگهداری در تمامی نمونه ها

اولیه (۴/۱۳ ساعت) به ۳/۵۱ ساعت طی ۵ روز نگهداری در
 دمای ۶۵ درجه سانتیگراد کاهش یافت (۱۹). تاثیر پایدارکنندگی
 عصاره‌ها طی شرایط تسریع شده اکسایش به صورت زیر بود:

جدول ۳- پایداری اکسایشی (بر حسب ساعت) نمونه‌های روغن کانولا تیمار شده با عصاره پوست مرکبات

عصاره پوست مرکبات	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵
شاهد	۱/۶ ± ۰/۰۵ ^{gA}	۱/۴ ± ۰/۰۰ ^{fB}	۱/۲ ± ۰/۰۶ ^{fC}	۱/۱ ± ۰/۰۰ ^{hD}	۰/۹۵ ± ۰/۰۱ ^{gE}
پرتقال شمال (۱۰۰۰ پی پی ام)	۳/۷ ± ۰/۱۱ ^{dA}	۳/۵ ± ۰/۰۵ ^{dB}	۳/۱ ± ۰/۱۰ ^{bC}	۲/۸ ± ۰/۰۸ ^{eD}	۲/۴ ± ۰/۲۱ ^{dE}
نارنج شمال (۱۰۰۰ پی پی ام)	۳/۸ ± ۰/۱۰ ^{cB}	۳/۹ ± ۰/۲۳ ^{bA}	۳/۴ ± ۰/۱۹ ^{cC}	۳/۳ ± ۰/۴۱ ^{bD}	۲/۶ ± ۰/۲۶ ^{cE}
لیمو شمال (۱۰۰۰ پی پی ام)	۲/۵ ± ۰/۲۷ ^{fA}	۲/۵ ± ۰/۱۲ ^{eA}	۲/۴ ± ۰/۰۸ ^{eB}	۲/۰ ± ۰/۱۵ ^{gC}	۱/۸ ± ۰/۰۵ ^{fD}
پرتقال جنوب (۱۰۰۰ پی پی ام)	۳/۹ ± ۰/۱۶ ^{bA}	۳/۷ ± ۰/۰۹ ^{eB}	۳/۴ ± ۰/۱۸ ^{cC}	۳/۰ ± ۰/۲۳ ^{cD}	۲/۶ ± ۰/۳۱ ^{cE}
نارنج جنوب (۱۰۰۰ پی پی ام)	۳/۹ ± ۰/۲۲ ^{bA}	۳/۹ ± ۰/۱۴ ^{bA}	۳/۵ ± ۰/۲۰ ^{bB}	۳/۱ ± ۰/۱۷ ^{dC}	۲/۸ ± ۰/۱۰ ^{bD}
لیمو جنوب (۱۰۰۰ پی پی ام)	۳/۱ ± ۰/۱۰ ^{eA}	۲/۵ ± ۰/۰۶ ^{eB}	۲/۵ ± ۰/۲۵ ^{dB}	۲/۳ ± ۰/۱۰ ^{fC}	۲/۰ ± ۰/۰۷ ^{eD}
BHT (۲۰۰ پی پی ام)	۴/۵ ± ۰/۲۵ ^{aA}	۴/۱ ± ۰/۳۶ ^{aB}	۴/۵ ± ۰/۱۱ ^{aA}	۴/۰ ± ۰/۲۸ ^{aC}	۴/۲ ± ۰/۱۵ ^{aD}

a-g: نشان دهنده اختلاف آماری معنا دار در هر ستون

A-E: نشان دهنده اختلاف آماری معنا دار در هر سطر

۳-۴- شاخص توتوکس

شاخص پراکسید و شاخص آنیسیدین به ترتیب نشانگر میزان پیشرفت اکسیداسیون اولیه و ثانویه و ارزش توتوکس به طور کلی بیانگر وضعیت پیشرفت اکسایش در چربی‌ها و روغن‌هاست (۱۲). نتایج این مطالعه نشان داد که شاخص پراکسید، آنیسیدین و توتوکس با گذشت زمان افزایش یافت (جدول ۴ الی ۶). پس از BHT، عصاره پوست نارنج جنوب کمترین مقدار پراکسید، آنیسیدین و توتوکس را نشان داد. به طور مثال، شاخص توتوکس در روز اول و پنجم به ترتیب معادل ۸/۶ و ۵۲/۸ میلی اکی والان در کیلوگرم بود ($p < 0/05$) (جدول ۶). در پایان روز پنجم ذخیره سازی، شاخص توتوکس برای نمونه های روغن کانولا حاوی عصاره پوست نارنج شمال، پرتقال جنوب، پرتقال شمال، لیمو جنوب و لیمو شمال به ترتیب ۵۴/۹، ۵۹/۶، ۶۱/۷، ۶۲/۵ و ۶۴/۵ میلی اکی والان در کیلوگرم به دست آمد که به طور معنی داری بیشتر از روز اول بود ($p < 0/05$). طبق نتایج،

عصاره‌های پوست نارنج موثرترین فعالیت ضد اکسایشی را در جلوگیری از اکسایش روغن در مقایسه با سایر تیمارها نشان دادند ($p < 0/05$). عصاره‌های پوست لیمو بالاترین ارزش پراکسید، آنیسیدین و توتوکس را نشان دادند ($p < 0/05$). هم چنین، در روز پنجم شاخص‌های پراکسید، آنیسیدین و توتوکس نمونه‌های روغن کانولا حاوی عصاره پوست پرتقال شمال و لیمو جنوب مشابه بودند ($p > 0/05$). در مطالعه Okhli و همکاران (۲۰۲۰)، در خصوص بررسی فعالیت ضد اکسایشی اسانس و عصاره پوست لیمو در نمونه‌های روغن آفتابگردان اعلام شد که ارزش توتوکس به ترتیب برابر ۸/۴ و ۵۰/۲۱ میلی اکی والان در کیلوگرم در روز اول و پنجم ذخیره سازی بوده است (۱۹). همچنین، Aydin و همکاران (۲۰۲۱) گزارش نمودند که عصاره‌های اتانولی لیمو، پرتقال و نارنگی موجب کاهش شاخص‌های پراکسید و آنیسیدین و در نتیجه ارزش توتوکس در روغن آفتابگردان نسبت به نمونه کنترل شدند (۳).

جدول ۴- شاخص پراکسید (میلی اکی والان در کیلوگرم) نمونه روغن کانولا تیمار شده با عصاره پوست مرکبات

پوست مرکبات	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵
شاهد	۸/۸±۰/۳۱ ^{aA}	۱۳/۹±۰/۱۵ ^{aB}	۱۸/۲±۰/۰۵ ^{aC}	۲۴/۴±۰/۰۸ ^{aD}	۲۷/۹±۰/۰۵ ^{aE}
پرتقال شمال (۱۰۰۰ پی ام)	۴/۱±۰/۰۷ ^{cA}	۷/۸±۰/۰۸۵ ^{eB}	۱۳/۷±۰/۰۱۲ ^{dC}	۱۷/۵±۰/۰۵۱ ^{cD}	۲۲/۰±۰/۰۹۶ ^{eE}
نارنج شمال (۱۰۰۰ پی ام)	۳/۵۵±۰/۱۰ ^{dA}	۷/۷±۰/۰۱۵ ^{dB}	۱۱/۷±۰/۰۴۰ ^{eC}	۱۵/۵±۰/۰۲۰ ^{eD}	۱۹/۲±۰/۰۲۹ ^{eE}
لیمو شمال (۱۰۰۰ پی ام)	۴/۳±۰/۰۹۰ ^{bA}	۹/۵±۰/۰۰۷ ^{bB}	۱۵/۲±۰/۰۳۸ ^{bC}	۱۸/۵±۰/۰۴۵ ^{bD}	۲۲/۴±۰/۰۱۷۱ ^{bE}
پرتقال جنوب (۱۰۰۰ پی ام)	۳/۶±۰/۰۱۴ ^{cdA}	۷/۰±۰/۰۲۰۵۵ ^{eB}	۱۰/۰±۰/۰۱۸ ^{fC}	۱۵/۶±۰/۰۱۷۲ ^{dD}	۲۰/۳۶±۰/۰۶۰ ^{dE}
نارنج جنوب (۱۰۰۰ پی ام)	۳/۳±۰/۰۱۹ ^{eA}	۶/۷±۰/۰۱۰ ^{fB}	۹/۷±۰/۰۲۵ ^{gC}	۱۴/۲±۰/۰۲۱ ^{fD}	۱۸/۳±۰/۰۵۵ ^{fE}
لیموی جنوب (۱۰۰۰ پی ام)	۴/۲±۰/۰۰۸ ^{bA}	۸/۳±۰/۰۱۴ ^{cB}	۱۳/۸±۰/۰۵۹ ^{cC}	۱۷/۱±۰/۰۹۰ ^{cD}	۲۱/۴±۰/۰۲۵ ^{cE}
BHT (۲۰۰ پی ام)	۲/۶±۰/۰۱۵ ^{fA}	۷/۸۵±۰/۰۱۱ ^{gB}	۸/۸±۰/۰۷۲ ^{hC}	۱۳/۹±۰/۰۲۲ ^{gD}	۱۶/۳±۰/۰۳۳ ^{gE}

a-f: نشان دهنده اختلاف آماری معنا دار در هر ستون

A-E: نشان دهنده اختلاف آماری معنا دار در هر سطر

جدول ۵- شاخص آنسیدین نمونه روغن کانولا تیمار شده با عصاره پوست مرکبات

پوست مرکبات	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵
شاهد	۵/۸±۰/۲۷۱ ^{aA}	۱۰/۸±۰/۰۳۳ ^{aB}	۱۴/۰±۰/۰۶۸ ^{aC}	۱۹/۶±۰/۰۱۰ ^{aD}	۲۴/۲±۰/۰۵۷ ^{aE}
پرتقال شمال (۱۰۰۰ پی ام)	۲/۲±۰/۰۰۵ ^{cA}	۵/۶±۰/۰۱۸ ^{eB}	۹/۲±۰/۰۱۶ ^{dC}	۱۲/۹±۰/۰۲۳ ^{cD}	۱۸/۷±۰/۰۴۰ ^{cE}
نارنج شمال (۱۰۰۰ پی ام)	۲/۰±۰/۰۰۸ ^{dA}	۴/۳±۰/۰۱۹ ^{dB}	۷/۸±۰/۰۵۷ ^{eC}	۱۲/۴±۰/۰۶۵ ^{eD}	۱۷/۰±۰/۰۲۵ ^{eE}
لیمو شمال (۱۰۰۰ پی ام)	۳/۶±۰/۰۱۷ ^{bA}	۶/۴±۰/۰۰۰ ^{bB}	۱۲/۴±۰/۰۶۶ ^{bC}	۱۵/۷±۰/۰۹۲ ^{bD}	۱۹/۸±۰/۰۰۷ ^{bE}
پرتقال جنوب (۱۰۰۰ پی ام)	۲/۱±۰/۰۰۹ ^{cA}	۴/۵±۰/۰۰۵ ^{eB}	۸/۵±۰/۰۴۷ ^{fC}	۱۴/۱±۰/۰۷۶ ^{dD}	۱۷/۵±۰/۰۲۹ ^{dE}
نارنج جنوب (۱۰۰۰ پی ام)	۱/۸±۰/۰۱۱ ^{eA}	۴/۰±۰/۰۰۷ ^{fB}	۸/۱±۰/۰۷۵ ^{gC}	۱۲/۰±۰/۰۰۹ ^{fD}	۱۶/۲±۰/۰۴۱ ^{fE}
لیموی جنوب (۱۰۰۰ پی ام)	۲/۷±۰/۰۱۲ ^{bA}	۶/۸±۰/۰۸۵ ^{cB}	۱۲/۳±۰/۰۰۹ ^{cC}	۱۵/۶±۰/۰۸۲ ^{cD}	۱۹/۶±۰/۰۶۷ ^{cE}
BHT (۲۰۰ پی ام)	۱/۸±۰/۰۲۰ ^{fA}	۶/۳۵±۰/۰۲۵ ^{gB}	۷/۱±۰/۰۳۵ ^{hC}	۱۰/۶±۰/۰۰۴ ^{gD}	۱۳/۸±۰/۰۱۰ ^{gE}

a-f: نشان دهنده اختلاف آماری معنا دار در هر ستون

A-E: نشان دهنده اختلاف آماری معنا دار در هر سطر

جدول ۶- شاخص توتوکس (میلی اکی والان در کیلوگرم) نمونه روغن کانولا تیمار شده با عصاره پوست مرکبات

پوست مرکبات	روز ۱	روز ۲	روز ۳	روز ۴	روز ۵
شاهد	۲۳/۵ ± ۲/۷۱ ^{aA}	۳۸/۶ ± ۱/۹۵ ^{aB}	۵۰/۷ ± ۲/۱۸ ^{aC}	۶۸/۵ ± ۳/۱۳ ^{aD}	۸۰/۱ ± ۵/۲۰ ^{aE}
پرتقال شمال (۱۰۰۰ پی پی ام)	۱۰/۵ ± ۰/۲۵ ^{cA}	۲۱/۲ ± ۰/۳۴ ^{eB}	۳۶/۸ ± ۰/۱۰ ^{dC}	۴۹/۶ ± ۰/۴ ^{eD}	۶۲/۷ ± ۰/۵۰ ^{eE}
نارنج شمال (۱۰۰۰ پی پی ام)	۹/۱ ± ۰/۲۰ ^{dA}	۱۶/۷ ± ۰/۸۵ ^{dB}	۳۱/۴ ± ۰/۵۷ ^{eC}	۴۳/۶ ± ۰/۳۱ ^{eD}	۵۵/۴ ± ۰/۷۲ ^{eE}
لیمو شمال (۱۰۰۰ پی پی ام)	۱۲/۲ ± ۰/۹۰ ^{bA}	۲۵/۵ ± ۳/۱۰ ^{bB}	۴۲/۸ ± ۲/۱۰ ^{bC}	۵۲/۹ ± ۱/۷۵ ^{bD}	۶۴/۵ ± ۱/۰۵ ^{bE}
پرتقال جنوب (۱۰۰۰ پی پی ام)	۹/۸ ± ۰/۳۵ ^{cdA}	۱۸/۵ ± ۲/۰۹ ^{eB}	۲۸/۵ ± ۲/۰۶ ^{fC}	۴۵/۵ ± ۱/۳۳ ^{dD}	۵۵/۷ ± ۰/۷۱ ^{dE}
نارنج جنوب (۱۰۰۰ پی پی ام)	۸/۶ ± ۰/۵۲ ^{eA}	۱۷/۵ ± ۰/۴۲ ^{fB}	۲۷/۵ ± ۰/۳۰ ^{gC}	۴۰/۴ ± ۱/۷۵ ^{fD}	۵۲/۸ ± ۰/۱۷ ^{fE}
لیموی جنوب (۱۰۰۰ پی پی ام)	۱۱/۱ ± ۰/۱۰ ^{bA}	۲۳/۵ ± ۰/۲۱ ^{cB}	۳۹/۹ ± ۲/۰۵ ^{cC}	۵۰/۰ ± ۲/۳۹ ^{cD}	۶۲/۵ ± ۳/۱۱ ^{cE}
BHT (۲۰۰ پی پی ام)	۶/۱ ± ۰/۵۰ ^{fA}	۱۵/۷ ± ۰/۹۵ ^{gB}	۲۴/۵ ± ۱/۱۵ ^{hC}	۳۸/۵ ± ۱/۸۵ ^{gD}	۴۶/۵ ± ۱/۵۸ ^{gE}

a-f: نشان دهنده اختلاف آماری معنا دار در هر ستون

A-E: نشان دهنده اختلاف آماری معنا دار در هر سطر

۴- نتیجه گیری

عصاره های اتانولی پوست مرکبات تهیه شده با روش فراصوت در مقایسه با عصاره های تولید شده از طریق روش استخراج مرسوم (بدون استفاده از فراصوت) دارای ترکیبات فنلی بیشتری بودند. پوست نارنج جنوبی بیشترین مقدار TPC را داشت و پس از آن پوست نارنج شمال، لیموی جنوبی، لیموی شمالی، پرتقال جنوبی و پوست پرتقال شمالی قرار گرفتند. میزان ترکیبات فنلی پوست مرکبات جنوب ایران بیشتر از TPC پوست مرکبات شمال بود. فعالیت ضد اکسایشی عصاره پوست نارنج جنوبی در بین تیمارهای دیگر (به جز BHT) بالاترین میزان را داشت و به دنبال آن عصاره نارنج شمالی و لیمو قرار گرفتند. عصاره پوست پرتقال اثر مهارکنندگی ضعیف تری نسبت به سایر عصاره ها در برابر اکسایش لیپید نشان داد. با توجه به نتایج، عصاره های پوست حاوی ترکیبات فنلی به عنوان آنتی اکسیدان های طبیعی پتانسیل واکنش با رادیکال های آزاد تولید شده از اکسایش لیپید را دارند.

۵- منابع

1. Adibhtala, R. M. and Hatcher, J. F., 2010. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from

- molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox signaling*, 12, pp.125-169.
2. AOCS, F. D., 1998. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. *AOCS*, 5, pp. 2-93.
 3. Aydin, S., Sayin, U., Sezer, M. Ö. and Sayar, S., 2021. Antioxidant efficiency of citrus peels on oxidative stability during repetitive deep-fat frying: Evaluation with EPR and conventional methods. *Journal of Food Processing and Preservation*, e15584.
 4. Brewr, M., 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, pp. 221-247.
 5. Chen, X.-M., Tait, A. R. and Kitts, D. D. 2017. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry*, 218, pp. 15-21.
 6. Dehghan, B., Esmailzadeh Kenari, R. and Raftani Amiri, Z., 2019. Investigate the Antioxidant Properties of Orange Peel Essential Oil (Citrus sinensis) on the Stability of Soybean Oil During Storage

- extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 16, pp. 57-62.
16. Mohadaly, A. A. A., Hassanein, M. F. R., Mahmoud, A., Sarhan, M. A. and Smetanska, I., 2013. Phenolics extracted from potato, sugar beet, and sesame processing by-products. *International Journal of Food Properties*, 16, pp.1148-1168.
 17. Montero-Calderon, A., Cortes, C., Zulueta, A., Frigola, A. and Esteve, M. J., 2019. Green solvents and Ultrasound-Assisted Extraction of bioactive orange (*Citrus sinensis*) peel compounds. *Scientific Report*, 9, pp. 1-8.
 18. Noreen, H., Semmar, N., Farman, M. and Mcculiagh, J. S., 2017. Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10, pp. 792-801.
 19. Okhli, S., Mirzaee, H. and Hosseini, S. E., 2020. Antioxidant activity of citron peel (*Citrus medica* L.) essential oil and extract on stabilization of sunflower oil. *OCL*, 27, 32.
 20. Ou, M.-C., Liu, Y.-H., Sun, Y.-W. and Chan, C.-F., 2015. The composition, antioxidant and antibacterial activities of cold-pressed and distilled essential oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, pp. 11-16.
 21. Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A. and Singh, N., 2020. Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, 132, pp. 109-114.
 22. Teneva, D., Denkova-Kostavo, R., Goranov, B., Hristova-Ivanova, Y., Slavchev, A., Denkova, Z. and Kostov, G., 2019. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L zest against some pathogenic microorganisms. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 74, pp. 105-111.
 7. Erkan, N., Ayranci, G. and Ayranci, E., 2009. A kinetic study of oxidation development in sunflower oil under microwave heating: effect of natural antioxidants. *Food Research International*, 42, pp. 1171-1177.
 8. Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M. and Dangels, O., 2003. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 615-622.
 9. Haggag, E., Mahmoud, I., Abou-Mostafa, E. and Mabry, T., 1999. Flavonoids from the leaves of *Citrus aurantium* (sour orange) and *Citrus sinensis* (sweet orange). *Asian Journal of Chemistry*, 11, pp. 707-714.
 10. Hasnaoui, N., Wathelet, B. and Jimenez-Araujo, A., 2014. Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. *Food Chemistry*, 160, pp. 196-203.
 11. Hagazy, A. and Ibrahim, M., 2012. Antioxidant activities of orange peel extracts. *World applied sciences journal*, 18, pp. 684-688.
 12. Hyatt, J. R., Zghang, S. and Akoh, C. C., 2021. Comparison of antioxidant activities of selected phenolic compounds in O/W emulsions and bulk oil. *Food Chemistry*, 349, p. 129037.
 13. Kabtni, S., Sdouga, D., Battibrebey, I., Save, M., Trifi-Farah, N., Fauconnier, M.-L. and Marghali, S., 2020. Influence of climate variation on phenolic composition and antioxidant capacity of *Medicago minima* populations. *Scientific Reports*, 10, pp. 1-15.
 14. Londono-Londono, J., De Lima, V. R., Lara, O., Gil, A., Pasa, T. B. C., Arango, G. J. and Pienda, J. R. R., 2010. Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 119, pp. 81-87.
 15. Ma, Y.-Q., Chen, J.-C., Liu, D.-H. and Ye, X.-Q., 2009. Simultaneous

24. Ziaur, R., 2006. Citrus peel extract-A natural source of antioxidant. *Food Chemistry*, 99, pp. 450-454.
25. Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C. and Zhou, Z., 2016. Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, pp. 885-896.
23. Xi, W., Lu, J., Qun, J. and Jiao, B., 2017. Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars. *Journal of Food Science and Technology*, 54, pp. 1108-1118.

(Original Research Paper)
**Antioxidant Effect of Citrus Peel Extract on Oxidation Control of
Canola Oil**

Hossein Aali¹, Maryam Azizkhani^{2*}, Fahimeh Tooryan²

1-M.Sc Student of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

2-Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Received:27/01/2022

Accepted:23/03/2022

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effects of extracts of different citrus fruits peel on the oxidation of canola oil during 5-day accelerated condition and compare the antioxidant activity of the peel extracts from citrus fruits (cultivated in north and south of Iran). The citrus peel ethanolic extracts prepared by ultrasound-assisted technique (150 w, 40 °C, and 30 min) showed significantly higher extraction efficiency and phenolic compounds in comparison to the extracts produced through the conventional extraction method. Southern Bitter orange peels had the highest amount of TPC (1.78 mg GAE/g) followed by northern bitter orange (1.46 mg GAE/g), southern lemon (1.25 mg GAE/g), northern lemon (1.02 mg GAE/g), southern orange (1.32 mg GAE/g), and northern orange (1.10 mg GAE/g)peels. TPCs of citrus peels of the south of Iran were higher than TPCs of north-cultivated citrus fruits. The oxidative stability and the free radical scavenging(DPPH) activity of southern bitter orange peel extract was the highest among the other treatments followed by northern bitter orange, southern orange, northern orange, southern lemon, and northern lemon extracts. According to the results, the peel extracts containing phenolic compounds as natural antioxidants have the potential of reacting with the free radicals produced from lipid oxidation.

Keywords: Antioxidant, Canola oil, Citrus, Extract, Oxidative Stability.

*Corresponding Author: azizkhani.maryam@gmail.com

(مقاله پژوهشی)

بهینه‌سازی تثبیت آنزیم پکتیناز بر سیلیکا آئروژل و کاربرد آن در استخراج ترکیبات فنلی تفاله انگور

اسماعیل فرامرزی آق گنبد^۱، لیلا امیرخانی^{۲*}، سید مهدی هدایت زاده^۳، فهیمه درخشان فرد^۲

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی شیمی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۲- استادیار، گروه مهندسی شیمی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۳- استادیار، گروه مهندسی شیمی، واحد ایلمچی، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلمچی، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۲

DOI: 10.30495/jfst.2022.1939051.1771

چکیده

یکی از کاربردهای تجاری آنزیم پکتیناز، پکتین زدایی و شفاف‌سازی آب‌میوه‌ها و استخراج ترکیبات فنلی از میوه‌ها است. تثبیت پکتیناز یکی از روش‌های پایدارسازی آن است که امکان جداسازی آنزیم از واکنش و استفاده مجدد از آن را فراهم ساخته و در نتیجه هزینه استفاده آنزیم در صنعت را کاهش می‌دهد. در این تحقیق آنزیم پکتیناز حاصل از اسپرژیلوس نایجر بر روی سیلیکا آئروژل آبدوست به روش جذب سطحی تثبیت گردید. جذب سطحی شامل برهمکنش‌های هیدروژنی، آبگریز و وان‌دروالس بین حامل جامد و مولکول‌های جذب شونده هستند و به دلیل سادگی، باقی ماندن فعالیت کاتالستی بالا و قابلیت استفاده مجدد حامل‌ها بعد از غیر فعال شدن آنزیم‌های تثبیت شده، پتانسیل اقتصادی بالاتری را در مقایسه با سایر روش‌های تثبیت دارد. پایه‌های سیلیکا آئروژل حاوی پکتیناز توسط آزمون‌های طیف‌سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه و میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین خواص شدند. پارامترهای تاثیرگذار در تثبیت آنزیم (زمان تثبیت، نسبت آنزیم به پایه و pH) با استفاده از روش سطح پاسخ مطالعه و کاربرد آنزیم تثبیت شده در استخراج ترکیبات فنلی از تفاله انگور بررسی گردید. نتایج به دست آمده از آزمون‌های تعیین خواص و اندازه‌گیری بازده تثبیت، نشان از تثبیت موثر آنزیم بر پایه سیلیکا آئروژل داشت. شرایط بهینه برای تثبیت، در pH معادل ۵، نسبت آنزیم به پایه معادل ۰/۱ و زمان ۸۹/۲ دقیقه به دست آمد. بازده تثبیت در این شرایط ۷۸/۱ درصد بود. نتایج آزمایشگاهی و مدل‌سازی تفاوت معناداری با هم نداشتند که نشان از کفایت مدل به دست آمده داشت. میزان استخراج ترکیبات فنلی توسط آنزیم پکتیناز تثبیت شده بر پایه سیلیکا آئروژل از تفاله انگور، ۷۸/۷٪ و ۷۸/۷٪ درصد گیرندگی رادیکال آزاد ۵۵/۷٪، نسبت به حالتی که تیمار آنزیمی انجام نگرفت، افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: تثبیت آنزیم، پکتیناز، سیلیکا آئروژل، تفاله انگور، ترکیبات فنلی.

*مسئول مکاتبات: l-amirkhani@iau-ahar.ac.ir

۱- مقدمه

پکتینازها (E.C.3.2.1.15)، کاربردهای مهمی در صنایع نساجی، کاغذسازی، دارویی، تصفیه پساب و همچنین شفاف سازی و کاهش کدورت آب میوه ها و در نتیجه بهبود کیفیت، بازده و قابلیت فیلتراسیون آن ها دارند. این آنزیم ها، ترکیبات پکتیکی را از طریق شکستن باند α - و β -گلیکوزیدی بین دو باقیمانده گالاکتورونیک، تجزیه می کنند (۲۳، ۲۱، ۱۰). همچنین تیمار میوه ها با پکتیناز به آزادسازی ترکیبات فنلی از پوست میوه کمک می کند. این ترکیبات، می توانند نقش مهمی به عنوان آنتی اکسیدان جهت حفظ سلامتی و پیشگیری از بیماری های قلبی و عروقی و انواع سرطان ها داشته باشند (۱۴). از آنجا که دیواره سلولی میوه ها، از سلولز، همی سلولز، پکتین، پروتئین و همچنین ترکیبات فنولی متصل به پلی ساکاریدها از طریق باندهای هیدروژنی و آب گریز، تشکیل شده است، آنزیم های مختلفی مثل سلولاز، پکتیناز، و همی سلولاز می توانند به عنوان عوامل هیدرولیزکننده برای تخریب دیواره سلولی و سهولت آزادسازی ترکیبات فنولی مورد استفاده قرار بگیرند. این آنزیم ها همچنین می توانند برای افزایش نفوذ دیواره سلولی که منجر به آزادسازی ترکیبات فنولی و افزایش بازده استخراج ترکیبات بیواکتیوی شود، مورد استفاده قرار گیرند. مکانیسم دیگر احتمالا اثر مستقیم آنزیم در شکستن پیوندهای استری و اتری بین فنول ها و دیواره سلولی پلیمری گیاه است. آنزیم ها در تحقیقات مختلفی برای استخراج ترکیبات فنولی از گیاهان و میوه ها مثل انگور، گوجه فرنگی و سیب ... مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۶). در تحقیقی که توسط فرناندز^۱ و همکارانش در سال ۲۰۱۵ بر روی تاثیر آنزیم های پکتیناز، سلولاز و تاناز بر روی استخراج ترکیبات فنولی از پوست و دانه انگور صورت گرفته است، پکتیناز بیشترین تاثیر بر استخراج ترکیبات فنولی داشته و ۲/۵ برابر افزایش در بازده استخراج را در مقایسه با نمونه کنترل نشان داد (۱۳). با این حال کاربرد این آنزیم ها در صنعت، به دلیل پایداری کم آنها در شرایط عملیاتی مختلف و نیز مشکلات مربوط به بازیابی و

استفاده مجددشان، محدود شده است. تثبیت آنزیم بر روی یک پایه، می تواند روش مناسبی برای تهیه بیوکاتالیست مناسب در کاربردهای خاص باشد (۹) روش های مختلفی مانند به دام اندازی در آلژینات، جذب سطحی روی پایه های رزینی، آلومینا و نانوذرات سیلیکایی و پیوندهای کووالانسی با پایه هایی چون شیشه های متخلخل و نایلون برای تثبیت آنزیم پکتیناز مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال یافتن پایه ها و روش های جدید برای تثبیت آنزیم ها، اهمیت زیادی در تکنولوژی آنزیم دارد (۵، ۲۵). پایه مناسب برای تثبیت آنزیم باید دارای تخلخل، مساحت سطح و ظرفیت بالا بوده و علاوه بر پایداری مکانیکی و شیمیایی مناسب، طول عمر زیادی نیز داشته باشد (۱۹، ۱). آئروژل ها جزء پیشرفته ترین مواد در زمینه علم مواد بوده و به دلیل خواص منحصر به فردشان، کاربردهای تکنولوژیکی متعددی در صنایع مختلف دارند. آئروژل های سیلیکایی از شبکه ای با پیوندهای عرضی ذرات سیلیکاساخته شده اند (۲، ۴). این ساختارها موادی با خواص غیر عادی مثل مساحت سطح ویژه بالا (۵۰۰ تا ۱۲۰۰ مترمربع بر گرم)، تخلخل بالا (۸۰ تا ۹۹/۸ درصد)، چگالی پایین (تا ۰/۰۰۵ گرم بر سانتی متر مکعب)، هدایت حرارتی پایین (۰/۰۰۲ وات بر متر بر کلین)، سرعت صوت پایین (۱۰۰ متر بر ثانیه)، شفافیت فوق العاده زیاد (تقریباً ۹۰٪) در ناحیه مرئی، ثابت دی الکتریک بسیار پایین (۱/۰ تا ۲/۰) و ضریب شکست پایین (تقریباً ۱/۰۵) هستند. سنتز آئروژل های سیلیکایی از سال ۱۹۳۰ که اولین بار توسط آقای کیسلرانجام شد تا کنون به تفضیل مورد توجه و بررسی قرار گرفته است (۱۱، ۱۵، ۱۷). تولید تجاری آئروژل های سیلیکایی و بهره برداری گسترده از آنها در کاربردهای مختلف به دلیل دو مشکل عمده استفاده از پیش ماده های گران قیمت و خطرناک آلکوکسیدهای سیلیکونی و نیز روش خشک کردن فوق بحرانی محدود می شود. خشک کردن فوق بحرانی به دلیل استفاده از اتوکلاوهای گران قیمت، خطرناک بوده و مصرف انرژی بالایی داشته و امکان تولید این مواد را به صورت پیوسته محدود می کند. استفاده از ماده اولیه ارزان قیمت و بی خطر سدیم سیلیکات و روش خشک کردن در دما و فشار محیط تحت

شرایط خاص، هزینه‌های مربوط به سنتز این مواد تا حد قابل توجهی پایین می‌آورد (۲۰). در سال‌های اخیر تحقیقاتی در خصوص تثبیت آنزیم‌ها بر پایه سیلیکا آئروژل انجام شده است. در این تحقیقات، آنزیم لیپاز با منابع مختلف بر روی آئروژل‌های سیلیکایی و کامپوزیت‌های آن‌ها به روش کپسوله کردن تثبیت شده است. آئروژل‌های مورد استفاده با مواد اولیه مختلف سنتز و به روش فوق بحرانی خشک شدند. در این کارها، اثر پارامترهای مختلف از قبیل نوع ماده اولیه، آب‌دوستی یا آب‌گریزی پایه، ساختار حفرات، پیرسازی^۱ در حلال‌های مختلف، نوع فرایند خشک کردن و نیز پارامترهای تاثیرگذار در واکنش‌های هیدرولیز، استریفیکاسیون و ترانس استریفیکاسیون^۲ بر فعالیت آنزیم لیپاز بررسی شده است (۶، ۷، ۲۴). در کارهای تحقیقاتی انجام شده ثابت شده است که نه مرحله ژلاسیون و نه مرحله خشک کردن فوق بحرانی تاثیری در آنزیم کپسوله شده در سیلیکا آئروژل ندارند. لیپاز پخش شده در ماتریس جامد آئروژل تمایل کمی برای تجمع نسبت به لیپاز آزاد داشته به همین دلیل مقدار سایت‌های در دسترس برای آنزیم بالا بوده و فعالیت آنزیم در حالت تثبیت شده حتی در برخی موارد بالاتر از آنزیم آزاد بود (۱۲، ۱۸، ۲۲). در تحقیقی که توسط امیرخانی و همکارانش در خصوص تثبیت آنزیم لیپاز بر روی پایه سیلیکا آئروژل مغناطیسی سنتز شده در دما و فشار محیط، انجام شد، پتانسیل بالای این پایه‌ها در حفظ فعالیت اولیه آنزیم و قابلیت بالای جداسازی و استفاده مجدد آن‌ها از محیط واکنش نشان داده شد (۳). در این تحقیق بعد از سنتز آئروژل‌های سیلیکایی آبدوست در شرایط دما و فشار محیط با استفاده از ماده ارزان قیمت سدیم سیلیکات، بهینه‌سازی تثبیت آنزیم پکتیناز بر روی این پایه به روش جذب سطحی انجام شد و پس از تعیین خواص، این بیوکاتالیست‌ها در استخراج ترکیبات فنلی از تفاله انگور، مورد استفاده قرار گرفتند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد اولیه به کار رفته در سنتز سیلیکا آئروژل آبدوست، شامل سدیم سیلیکات با چگالی ۱/۳۵ گرم بر سانتیمتر مکعب، هیدروکسید آمونیوم، هگزان نرمال، ایزوپروپیل الکل، تری متیل کلروسیلان^۳ (TMCS) و رزین‌های تبادل یونی بودند که همه این مواد از شرکت مرک تهیه شدند. در فرایند تثبیت آنزیم نیز پکتیناز آسپرژیلوس نایجرو پلی گالاکتورونیک اسید از شرکت سیگما آلدردیج و ۳ و ۵ دی‌نیترو سالیسیک اسید و سدیم استات از شرکت مرک خریداری گردید.

۲-۲- تجهیزات و آزمون‌ها

آئروژل‌های سیلیکایی در ظروف تفلونی سنتز شدند. این ظروف درب‌دار غیر قابل نفوذ به هوا بوده و از خروج حلال‌ها و عوامل اصلاح‌کننده سطح جلوگیری کرده و برای انجام مراحل مختلف سنتز به کار رفتند (شکل ۱). در کلیه مراحل سنتز، درب این ظروف به منظور جلوگیری از خروج بخارات و خشک شدن سطح ژل، توسط پیچ‌های تعبیه شده در قسمت بالای آن کاملاً بسته شد. به منظور تامین درجه حرارت و واکنش‌ها در دمای مشخص و نیز به منظور خشک کردن ژل‌ها بعد از انجام مراحل واکنش از آون استفاده گردید. از کوره الکتریکی (شرکت شیماز، ساخت کشور ایران) به منظور کلسینه کردن و حرارت دادن نمونه‌ها در دماهای بالا استفاده شد. برای تنظیم و کنترل pH محلول سل از pH متر (Hanna pH meter, checker, HI98103) و برای رقیق کردن و انجام تبادل یونی و افزودن یکنواخت کاتالیست به مخلوط واکنش، از همزن مغناطیسی (Stuart Scientific)، ساخت انگلستان) استفاده شد. برای تعیین مساحت سطح ویژه، حجم و توزیع اندازه حفرات از آنالیز جذب و دفع نیتروژن توسط دستگاه BEL Sorp-II mini ساخت کشور ژاپن استفاده شد. آنالیز میکروسکوپی الکترونی روبشی با وضوح بالا با استفاده از دستگاه FESEM (Mira 3-XMU, Tescan USA Inc.)

محدوده طول موج ۴۰۰-۴۰۰۰ nm مطالعه شد. برای خشک کردن نمونه های تفاله انگور، آون تحت خلا (Lab Tech، ساخت کشور کره جنوبی) استفاده شد.

انجام گرفت. گروه های عاملی موجود در نانوکامپوزیت ها با استفاده از آنالیز طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه (FTIR, PU 9800, from Philips, Netherlands) در

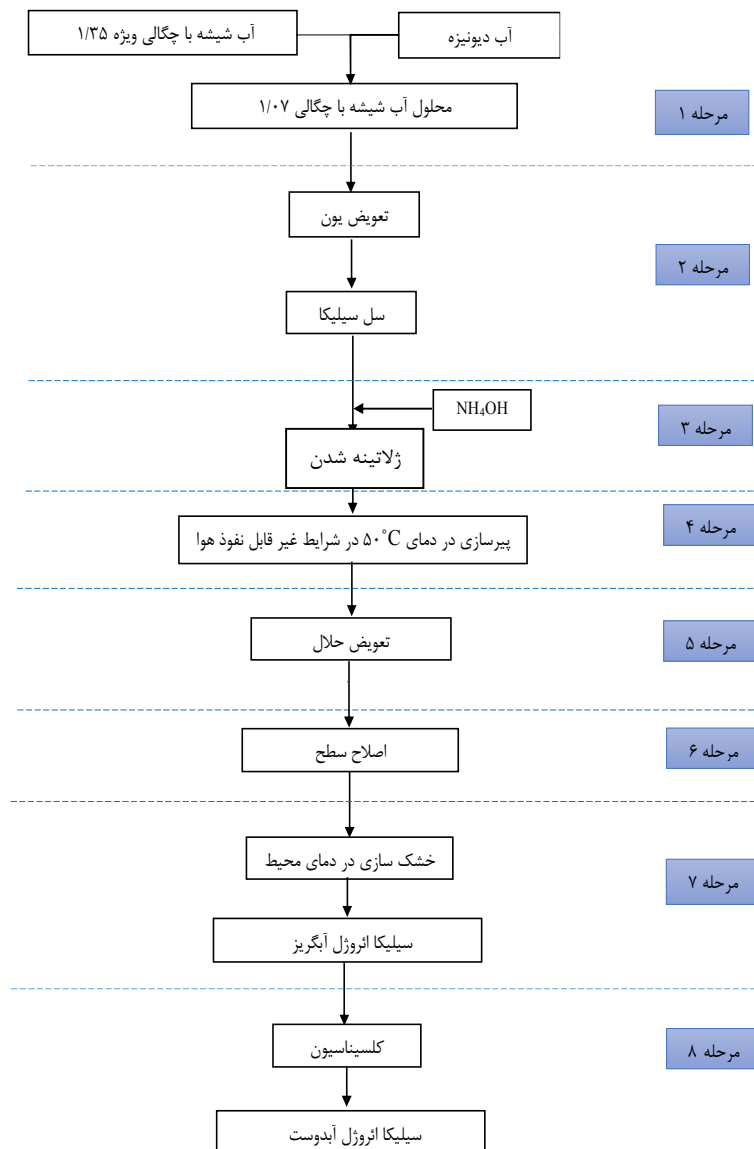


شکل ۱- ظروف تفلونی سنتز سیلیکا آئروژل

سانتی گراد به مدت ۱۸۰ دقیقه نگه داشته می شود تا در مرحله پیرسازی شبکه سیلیکایی تقویت شود (مرحله ۴). در مرحله پنجم آب موجود در حفرات ژل با ایزوپروپیل الکل و نرمال هگزان تعویض می شود. این کار با قرار دادن ژل ها در هر کدام از محلول ها به مدت ۱۸ ساعت و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، انجام می شود. بعد از تعویض حلال و تخلیه حلال های اضافی، ژل های خیس، در محلول اصلاح سطح که شامل تری متیل کلروسیلان و هگزان با نسبت حجمی ۱ به ۴ می باشد، به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، غوطه ور می شوند. در مرحله پایانی ژل های اصلاح سطح شده در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت و سپس به ترتیب در هر کدام از دماهای ۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ درجه سانتی گراد، به مدت ۲ ساعت خشک می شوند. به منظور تولید سیلیکا آئروژل آب دوست عملیات کلسینه کردن، با حرارت دادن نمونه ها در کوره الکتریکی، در دمای ۵۰۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۲ ساعت انجام می گردد.

۲-۳- روش سنتز سیلیکا آئروژل آب دوست

سنتز سیلیکا آئروژل خالص آب دوست با استفاده از ماده اولیه سدیم سیلیکات و خشک کردن در دما و فشار محیط شامل هفت مرحله می باشد (شکل ۲). در مرحله اول، محلول سدیم سیلیکات با چگالی ۱/۳۵ با آب دیونیزه به نسبت ۱ به ۴ رقیق می شود تا به چگالی ۱/۰۷ برسد. در مرحله دوم به منظور حذف یون های Na^+ ، از رزین های تبادل یونی با نسبت حجمی مساوی به محلول سدیم سیلیکات رقیق شده اضافه گردید. محلول حاصل و رزین های تبادل یونی توسط همزن مغناطیسی به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه مخلوط شدند. بعد از تشکیل سیلیسیک اسید با pH در حدود ۲، محلول هیدروکسید آمونیوم (۱/۰ مولار)، به محلول اضافه می شود تا pH آن به منظور انجام ژلانیته شدن به ۴ افزایش پیدا کند. سل سیلیکایی بدست آمده سریعاً به ظروف تفلونی انتقال پیدا کرده و در مرحله سوم هیدروژل تشکیل می گردد. ژل تشکیل شده در آون در دمای ۵۰ درجه



شکل ۲- مراحل سنتز سیلیکا آتروژل آب دوست

۲-۴- تثبیت پکتیناز

برای تثبیت پکتیناز، ۱۰ میلی لیتر محلول پکتیناز (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر سدیم استات ۵۰ میلی مولار) با مقدار مشخص پایه سیلیکا آتروژل و در زمان معین، بر اساس طراحی آزمایش، مخلوط شد تا فرآیند جذب کامل شود. تثبیت در دمای محیط و سرعت هم زدن ۵۰۰ دور در دقیقه انجام شد. پس از آن، سوسپانسیون فیلتر گردید تا پایه‌ها با پکتیناز تثبیت شده جدا شود. پایه‌های جدا شده با بافر فسفات شسته شدند تا آنزیم جذب نشده

حذف گردد و سپس در هوا خشک شدند. محلول‌های فیلتر شده و شستشو برای اندازه‌گیری پروتئین جمع‌آوری گردید. غلظت پروتئین به روش لوری تعیین شد (۲).

۲-۵- بازده تثبیت

درصد بازده تثبیت از معادله ۱ محاسبه می‌شود:

۲-۶- طراحی آزمایش، بهینه یابی و آنالیز آماری

برای تثبیت آنزیم پکتیناز بر پایه های سیلیکا آتروژل، از طرح مرکب مرکزی^۱ (CCD) سه فاکتوری، با شش نقطه محوری ($\alpha=2$)، هشت نقطه مکعب و شش نقطه مرکزی، مجموعاً مشتمل بر ۲۰ آزمایش استفاده شد. روش سطح پاسخ^۲ (RSM)، برای تخمین اثرات متغیرهای مستقل بر متغیرهای پاسخ یعنی بازده جذب آنزیم تثبیت شده استفاده شد. نرم افزار مورد استفاده برای طراحی

آزمایش ها، دیزاین اکسپر نسخه ۱۳ بود. در تثبیت آنزیم پکتیناز، اثر پارامترهای زمان تثبیت، نسبت آنزیم به پایه و pH، بر بازده جذب آنزیم تثبیت شده مورد مطالعه قرار گرفت. جهت یافتن محدوده بهینه، یک سری آزمایشات اولیه به منظور بررسی اثر پارامترهای تاثیرگذار بر شرایط تثبیت آنزیم انجام شد و با توجه به این آزمایشات اولیه، محدوده پارامترها و سطوح آنها تعیین شد که مطابق جدول ۱ بود.

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح آنها در تثبیت آنزیم

فاکتور	متغیرها	واحد	سطح بالای محوری (+ α)	سطح بالای فاکتوریل (+1)	سطح مرکزی (0)	سطح پایین فاکتوریل (-1)	سطح پایین محوری (- α)
X ₁	pH	-	6	5/5	5	4/5	4
X ₂	نسبت آنزیم به پایه	(w/w)	0/195	0/15	0/105	0/6	0/15
X ₃	زمان تثبیت	دقیقه	150	120	90	60	30

۲-۷- آماده‌سازی نمونه‌های تفاله انگور

نمونه‌های تفاله انگور قرمز (گونه انگور قرمز سردشت) از کارخانه پاکدیس در شهرستان ارومیه به صورت تازه تهیه شد و در آزمایشگاه در داخل فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری تا در زمان مناسب آزمایش‌ها بر روی آن صورت پذیرد. در هنگام شروع آزمایش‌ها نمونه‌ها با استفاده از دستگاه آون تحت خلا در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و مدت ۶-۴ ساعت، خشک شده و پس از خشک شدن، توسط خردکن برقی به دقت خرد شد و برای یکنواخت کردن اندازه ذرات، با الک مش ۸۰ الک گردید. پس از آسیاب کردن مجدداً نمونه‌ها به داخل فریزر منتقل شدند تا ترکیبات فنلی موجود در نمونه‌ها دچار آسیب نشوند.

۲-۸- تیمار آنزیمی

برای رهایش ترکیبات فنلی از تفاله انگور، یک گرم از نمونه خرد شده تفاله انگور با ۵۰ میلی‌گرم از آنزیم تثبیت شده در ۱۰ میلی‌لیتر بافر سدیم استات ۰/۱ مولار (pH=۵) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تحت اختلاط همزن با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی جمع‌آوری و فیلتر گردید و مورد آنالیز قرار گرفت. به دلیل اختلاف چگالی تفاله انگور و پایه‌های حاوی آنزیم تثبیت شده، با دادن زمان لازم برای ته‌نشینی تفاله انگور، جداسازی آنزیم تثبیت شده جهت استفاده مجدد آن، امکان پذیر شد (۸). برای تهیه نمونه شاهد تمام مراحل ذکر شده، بدون افزودن آنزیم تثبیت شده انجام شد.

۲-۹- تعیین مقدار ترکیبات فنلی

غلظت ترکیبات فنلی با استفاده از روش فولین-سیوکالتیو^۱ اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول استخراجی را با ۰/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو و ۱۰ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۱ مولار مخلوط کرده و بعد از یک ساعت،

جذب نمونه در دستگاه در ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک موجود در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول استخراجی گزارش گردید. جهت رسم منحنی استاندارد از رقت‌های ۷۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید گالیک استاندارد استفاده شد (۸).

۲-۱۰- اندازه‌گیری درصد گیرندگی رادیکال آزاد

به منظور اندازه‌گیری درصد گیرندگی رادیکال آزاد نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر، محلول ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل^۲ (DPPH) با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار را با حل کردن ۳/۹ میلی‌گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول تهیه شد. محلول برای تکمیل واکنش به مدت نیم ساعت در تاریکی نگه داشته شد. ۲ میلی‌لیتر از نمونه با ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط شد. این محلول به شدت تکان داده شده و در تاریکی به مدت نیم ساعت دیگر انکوبه شد. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۲۷). درصد گیرندگی رادیکال از رابطه ۲ بدست می‌آید.

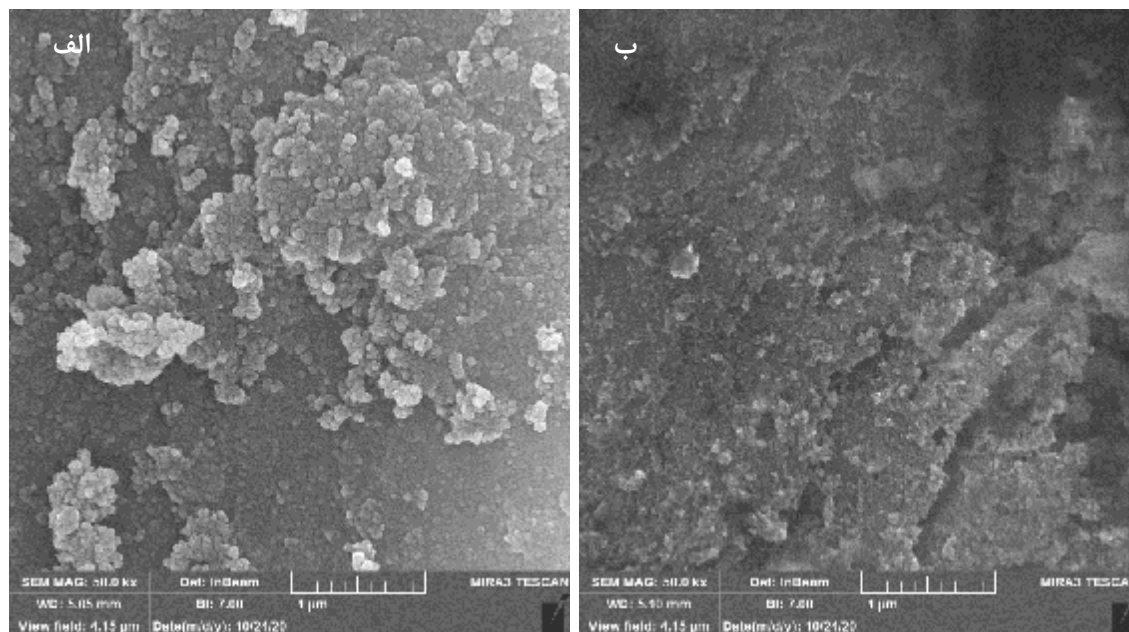
$$\text{رابطه (۲)} \quad 100 \times (1 - A_s/A_c) = \text{درصد گیرندگی رادیکال آزاد}$$

در این رابطه A_s و A_c به ترتیب جذب نمونه و جذب شاهد می‌باشد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- خواص فیزیکوشیمیایی پایه و پکتیناز تثبیت شده

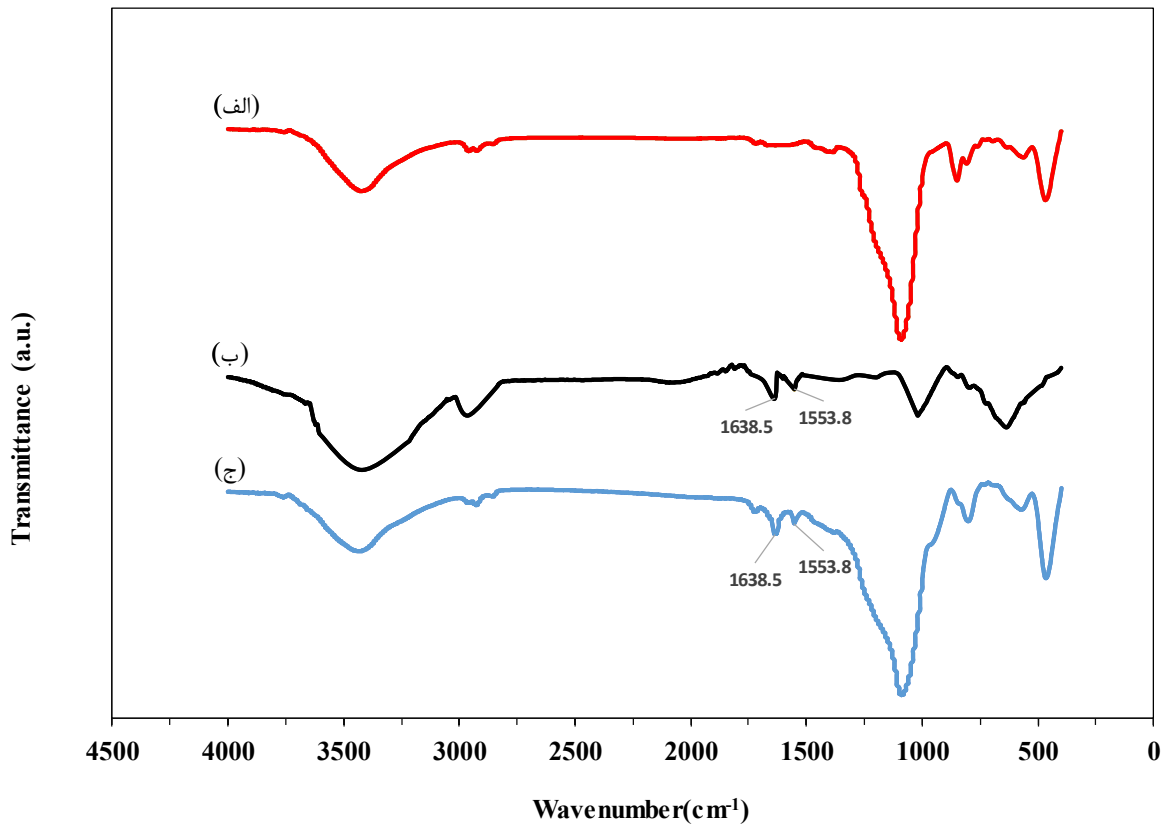
شکل ۳ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سیلیکا آئروژل آب‌دوست را قبل و بعد از تثبیت آنزیم پکتیناز نشان می‌دهد. اشکال میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان می‌دهد که اندازه منافذ و میزان تخلخل پایه به دلیل ایجاد برخی پیوندها، پس از جذب پکتیناز کاهش یافته است. از سوی دیگر، پس از تثبیت، یک لایه از آنزیم ممکن است سطح تکیه‌گاه‌ها را بپوشاند و تخلخل را کاهش دهد.



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سیلیکا آئروژل آب دوست (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت آنزیم پکتیناز

هیدروکسیل بر روی پایه‌ها-، اتصال سطحی آنزیم به پایه و بازده تثبیت و تمایل آنزیم به بیومولکول‌ها را افزایش می‌دهد (۲۸). همچنین نتایج آنالیز طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه تایید می‌کند که بعد از تثبیت آنزیم پکتیناز گروه‌های آمینی تشکیل شده است. آنزیم پکتیناز دو باند مشخصه در $(\text{cm})^{-1}$ $1553/8$ و $(\text{cm})^{-1}$ $1638/5$ دارد، که مربوط به گروه‌های آمین نوع اول و دوم است. این پیک‌ها در پایه بعد از تثبیت پکتیناز قابل مشاهده است. این امر دلالت بر جذب آنزیم پکتیناز در این پایه‌ها دارد. نتایج مشابهی در تعیین خواص فیزیکوشیمیایی پایه و آنزیم تثبیت شده در تحقیقات انجام گرفته در خصوص تثبیت آنزیم لپاز بر روی پایه سیلیکا آئروژل مغناطیسی به دست آمده است (۲).

آنالیز طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه برای تایید جذب پکتیناز بر روی سیلیکا آئروژل آب دوست استفاده شد. شکل ۴ طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه پایه را قبل و بعد از تثبیت آنزیم نشان می‌دهد. در هر دو طیف، یک پیک پهن در حدود $(\text{cm})^{-1}$ 3450 وجود داشت که نشان دهنده وجود گروه‌های O-H و آب دوست بودن پایه بود. در مراحل سنتز سیلیکا آئروژل به روش خشک کردن در دما و فشار محیط، پایه‌های سنتز شده خاصیت آب‌گریزی دارند که محیط مناسبی برای تثبیت و عملکرد آنزیم پکتیناز نمی‌باشد. از این رو در مرحله نهایی سنتز پایه‌ها، آنها در دمای 500 درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت کلسینه شدند تا خاصیت آب دوستی پیدا کنند. وجود گروه‌های هیدروکسیل در آنالیز طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه، آب دوست شدن پایه‌ها را تایید کرد. وجود گروه‌های عاملی



شکل ۴- طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه پایه‌ها قبل و بعد از تثبیت پکتیناز: (الف) سیلیکا آئروژل آب‌دوست (ب) آنزیم پکتیناز (ج) سیلیکا آئروژل آب‌دوست- پکتیناز

بیشتریک عبارت بر متغیرهای پاسخ مورد مطالعه است. مدل‌های کاهش یافته بعد از حذف عبارت‌های کم‌اهمیت بدست آمد. نتایج دلالت بر آن داشت که در مورد این پایه‌ها، ضریب تعیین (R^2) مدل برای پاسخ درصد تثبیت آنزیم ۰/۹۴۳۶ بود (جدول ۳). مقادیر بالای R^2 بدست آمده، مناسب بودن مدل پیشنهادی برای پیش‌بینی مقدار بازده تثبیت با استفاده از این روش را تایید کرد. علاوه بر این با بودن مقادیر F برای مدل پیشنهادی، مناسب بودن مدل را تایید کرد.

۳-۳- آنالیز سطوح پاسخ

همان طور که در جدول ۲ نیز مشخص است، بازده تثبیت از ۵۸ تا ۷۹ درصد تغییر می‌کند. جدول ۳ نشان می‌دهد که در بین عبارت‌های خطی، نسبت آنزیم به پایه و عبارت‌های درجه دوم تمام متغیرهای مستقل اثر معناداری ($p < 0/05$) بر بازده تثبیت

۳-۲- برازش مدل سطح پاسخ

به منظور بهینه‌سازی شرایط تثبیت آنزیم، تاثیر سه فاکتور pH، نسبت آنزیم به پایه و زمان تثبیت در ۵ سطح با استفاده از روش سطح پاسخ بر بازده تثبیت مطالعه شد. با توجه به سه فاکتور اصلی در نظر گرفته شده، نرم افزار ۲۰ آزمایش طراحی کرد که نتایج آزمایشگاهی بدست آمده برای بازده تثبیت آنزیم به عنوان پاسخ، بر اساس طرح مرکب مرکزی در جدول ۲ نشان داده شده است. معادله ۳ برای برازش داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i,j=1}^n a_{ij} x_i x_j$$

ضرایب رگرسیون تخمینی برای مدل‌نهایی کاهش یافته و همچنین اهمیت رگرسیون‌ها در جدول ۳ آمده است. باید توجه شود که مقادیر پایین شاخص p و نسبت‌های بالای F نشان‌دهنده اهمیت

نمودار کانتور دو بعدی و سطح پاسخ سه بعدی نشان داده شده است. حضور انحنا در این شکل تایید می کند که تغییر مقدار بازده تثبیت به صورت یک تابع غیرخطی وابسته به pH و زمان است. همان طور که از این شکل مشخص است در زمان ثابت با افزایش pH (تا محدوده pH معادل ۵)، بازده تثبیت به طور چشمگیری افزایش می یابد. این افزایش در زمان های میانی، قوی تر است. این نتایج با مقادیر نتایج آزمایشگاهی جدول ۲ در تطابق است. همچنین این نتیجه با نتایج بدست آمده در تحقیقی که آنزیم لیپاز را بر روی پایه های بر پایه سیلیکا تثبیت کرده اند در توافق است (۳). از شکل ۵ می توان نتیجه گرفت که افزایش زمان های بالاتر از ۹۰ دقیقه منجر به کاهش فعالیت آنزیم می شود. وقتی نسبت آنزیم به پایه افزایش پیدا می کند بازده تثبیت هم افزایش می یابد، ولی بعد از مقادیر میانی به دلیل اشباع شدن سایت های متخلخل و عدم جذب آنزیم بیشتر، بازده تثبیت کاهش پیدا می کند.

آنزیم تثبیت شده دارند. نتایج جدول ۳ نشان می دهد که عبارت های درجه دوم متغیرهای مستقل، به دلیل بالا بودن مقادیر F، بیشترین اهمیت و اثر را بر بازده آنزیم تثبیت شده دارند. همچنین نتایج به دست آمده برای ضرایب رگرسیون نشان می دهد که پارامترهای اصلی اثر مثبت بر بازده تثبیت دارند. این امر بدان معناست که در مقادیر $X_2 < 0.105$ ، با افزایش نسبت آنزیم به پایه، بازده تثبیت افزایش می یابد. نتایج عکس برای اثرات همه متغیرهای مستقل در سطوح بالای برای بازده تثبیت آنزیم به دست آمد. همان طور که از جدول ۳ مشخص است همه پارامترهای درجه دوم دارای ضرایب رگرسیون منفی هستند. از طرفی به غیر از اثر برهمکنش بین نسبت زمان تثبیت و pH، سایر برهمکنش ها، اثرات معناداری بر روی بازده تثبیت آنزیم ندارند. شکل ۵ اثر برهمکنش پارامترها بر بازده تثبیت، نشان می دهد. اثر درصد های مختلف pH و زمان تثبیت بر فعالیت ویژه آنزیم تثبیت یافته (در نسبت آنزیم به پایه معادل ۰/۱۰۵) در شکل ۵ به صورت

جدول ۲- آزمایش های طراحی شده از روش طرح مرکب مرکزی برای تثبیت آنزیم بر روی پایه های سیلیکا آروژل آب دوست و نتایج آزمایشگاهی و

پیش بینی شده

شماره آزمایش	pH	نسبت آنزیم به پایه (w/w)	زمان تثبیت (دقیقه)	بازده تثبیت (%)	پیش بینی شده
۱	۴/۵	۰/۰۶	۶۰	۶۶	۶۷/۸۳
۲	۵/۵	۰/۰۶	۶۰	۷۰	۷۲/۴۶
۳	۴/۵	۰/۱۵	۶۰	۵۸	۶۰/۲۱
۴	۵/۵	۰/۱۵	۶۰	۶۶	۶۷/۳۳
۵	۴/۵	۰/۰۶	۱۲۰	۶۷	۶۹/۲۱
۶	۵/۵	۰/۰۶	۱۲۰	۶۵	۶۶/۳۳
۷	۴/۵	۰/۱۵	۱۲۰	۶۷	۶۸/۰۸
۸	۵/۵	۰/۱۵	۱۲۰	۶۶	۶۷/۷۱
۹	۴	۰/۱۰۵	۹۰	۵۹	۵۷/۱۰
۱۰	۶	۰/۱۰۵	۹۰	۶۳	۶۱/۳۵
۱۱	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۰	۶۷/۸۵
۱۲	۵	۰/۱۹۵	۹۰	۶۳	۶۱/۶۰
۱۳	۵	۰/۱۰۵	۳۰	۶۹	۶۶/۸۵
۱۴	۵	۰/۱۰۵	۱۵۰	۷۰	۶۸/۶۰
۱۵	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۸	۷۷/۹۱
۱۶	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۹	۷۷/۹۱
۱۷	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۸	۷۷/۹۱
۱۸	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۸	۷۷/۹۱
۱۹	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۹	۷۷/۹۱
۲۰	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۹	۷۷/۹۱

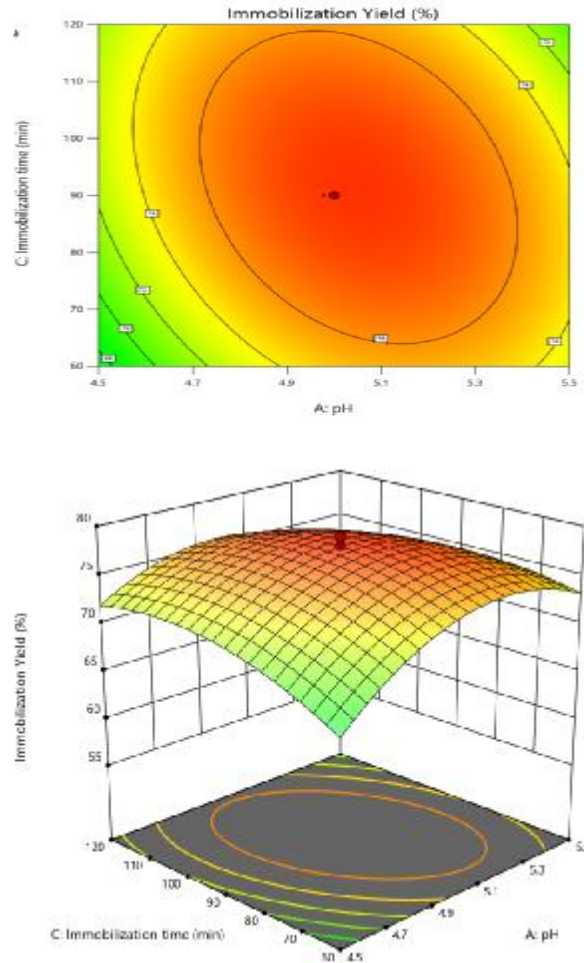
جدول ۳- احتمال اهمیت (شاخص P، نسبت F)، ضرایب رگرسیون، R^2 و R^2 تعدیل شده برای مدل تثبیت آنزیم بر روی پایه سیلیکا آئروژل آب‌دوست

ضریب رگرسیون	بازده تثبیت (%) (Y)	متغیرها		پارامترها
		نسبت F	شاخص P	
-۴۶۸/۵۷	a_0			
۱۹۷/۲۷۶	a_1	۰/۰۸۶۳	۳/۶۲	X_1 اصلی
۵۹/۸۰۶	a_2	۰/۰۱۸۹	۷/۸۳	X_2
۱/۰۲۲	a_3	۰/۴۵۱۶	۰/۶۱۳۷	X_3
-۱۸/۶۸۲	a_{11}	<۰/۰۰۰۱	۱۰۹/۹	X_1^2 درجه دوم
-۱۶۲۷/۳۸۵	a_{22}	<۰/۰۰۰۱	۵۴/۷۲	X_2^2
-۰/۰۰۲۸۳	a_{33}	۰/۰۰۰۲	۳۲/۶۴	X_3^2
۲۷/۷۷۸	a_{12}	۰/۴۴۷۱	۰/۶۲۶۲	X_{12} برهمکنش
-۰/۱۲۵	a_{13}	۰/۰۳۹	۵/۶۴	X_{13}
۱/۲۰۴	a_{23}	۰/۰۶۶۷	۴/۲۳	X_{23}
		<۰/۰۰۰۱	۱۸/۵۹	رگرسیون
		۰/۹۴۳۶		R^2
		۰/۸۹۲۹		R^2 adjusted

۳-۴- بهینه‌یابی و تایید شرایط تثبیت

زمانی مقدار نسبت آنزیم به پایه، زمان و pH می‌تواند بهینه شود که مقدار بازده تثبیت آنزیم، حداکثر گردد. بهینه‌یابی عددی برای یافتن سطوح بهینه دقیق متغیرهای مورد مطالعه، استفاده شد. شرایط بهینه تثبیت به صورت مقابل بدست آمد: ۰/۱ نسبت آنزیم به پایه، ۸۹/۲ دقیقه زمان واکنش و pH معادل ۵.

بیشترین مقدار بازده تثبیت پیش‌بینی شده توسط مدل در این شرایط ۷۸/۱۴ بود. شرایط بهینه با استفاده از تست آزمایشگاهی ($۷۷ \pm ۰/۵$) تایید شد و در تطابق خوبی با نتایج پیش‌بینی شده بود که بر این امر دلالت داشت که مدل بدست آمده از روش سطح پاسخ به خوبی رابطه بین فاکتورها و پاسخ را در تثبیت آنزیم پکتیناز توصیف می‌کند.



شکل ۵- نمودار کانتور دوبعدی و سطح پاسخ سه بعدی تغییرات میزان بازده تثبیت با pH و زمان تثبیت

گیرندگی رادیکال آزاد، بدون تیمار و بعد از تیمار آنزیم پکتیناز مقایسه گردید. جدول ۴ میزان ترکیبات فنلی و درصد گیرندگی رادیکال آزاد تفاله انگور را بدون تیمار آنزیمی و بعد از تیمار آنزیمی نشان می دهد. آزادسازی ترکیبات فنلی، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) را بعد از تیمار آنزیمی نشان داد. بعد از تیمار آنزیمی محلول حاوی تفاله انگور، میزان استخراج ترکیبات فنلی ۷۸٪ و درصد گیرندگی رادیکال آزاد ۵۵٪ نسبت به حالتی که تیمار آنزیمی انجام نگرفت، افزایش یافت.

۳-۵- میزان فنل کل و درصد گیرندگی رادیکال آزاد

به منظور استخراج ترکیبات فنلی میوه ها، روش های مختلفی بر پایه استخراج با حلال های آلی مضر و سمی وجود دارد. درحالی که استخراج با آنزیم یک روش استخراج سبز می باشد. این روش توسط محققین دیگر برای استخراج ترکیبات فنلی دانه انگور مورد استفاده قرار گرفته است (۲۶). به منظور بررسی عملکرد آنزیم تثبیت شده بر آزادسازی ترکیبات فنلی، تفاله انگور توسط این بیوکاتالیست تیمار گردیده و میزان فنل کل و درصد

جدول ۴- میزان ترکیبات فنلی و درصد گیرندگی رادیکال آزاد تفاله انگور قبل و بعد از تیمار آنزیمی

بدون تیمار آنزیمی	بعد از تیمار با آنزیم تثبیت شده پکتیناز
میزان فنل کل (میلی گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ میلی لیتر محلول)	۷۵/۶±۴/۶ ^a
درصد گیرندگی رادیکال آزاد (DPPH)	۱۳۵/۱±۵/۹ ^b
	۷۱/۳±۳/۲ ^b
	۴۵/۸±۲/۵ ^a

*حروف متفاوت در هر ردیف بیانگر تفاوت معنادار بین مقادیر می‌باشد (p < 0.05)

۴- نتیجه‌گیری

با استفاده از روش سطح پاسخ مطالعه گردید. شرایط بهینه برای تثبیت، در pH معادل ۵، نسبت آنزیم به پایه معادل ۰/۱ و زمان ۸۹/۲ دقیقه به دست آمد. بازده تثبیت در این شرایط ۷۸/۱ درصد بود. تفاله‌انگور منبع ارزان قیمتی از ترکیبات فنلی است که می‌تواند مزایای اقتصادی مهمی را ایجاد کند. کاربرد آنزیم تثبیت شده در استخراج ترکیبات فنلی از تفاله انگور بررسی گردید. میزان استخراج ترکیبات فنلی و درصد گیرندگی رادیکال آزاد بعد از تیمار با آنزیم به طور معناداری (p < ۰/۰۵) بهبود پیدا کرد. نتایج نشان می‌دهد استفاده از آنزیم پکتیناز تثبیت شده بر روی سیلیکا آئروژل، جهت استخراج ترکیبات فنلی در صنعت آب میوه، می‌تواند امیدوارکننده باشد.

استفاده از آنزیم‌ها به عنوان بیوکاتالیست یکی از روش‌های مهم در صنایع غذایی، برای آماده‌سازی یا تیمار محصولات است. در هر حال بیشتر آنزیم‌های طبیعی انتخاب‌پذیری و واکنش‌پذیری بالا را فقط تحت شرایط نرمال نشان می‌دهند. تحت دماهای بالا و pH های در محدوده اسیدی و یا قلیایی، آنزیم‌ها به راحتی به دلیل تغییر ماهیت دادن غیر فعال می‌شوند. به منظور غلبه بر این مشکلات و امکان استفاده از آنزیم‌ها در فرایندهای پیوسته و تجاری به منظور استفاده مکرر و چند باره از آنزیم‌ها به علت قیمت بالای آن‌ها، از روش تثبیت آنزیم استفاده می‌شود. تثبیت آنزیم‌ها در یک حامل غیر قابل حل در آب، یک روش بیولوژیکی برای افزایش کاربردهای آنزیم در روش‌های پیوسته و استفاده‌های تجاری و در مقیاس بالا است. روش‌های مختلفی برای تثبیت آنزیم‌ها وجود دارد. در بین روش‌های تثبیت آنزیم، جذب سطحی فیزیکی، به دلیل قیمت نسبتاً پایین، سادگی، سرعت و باقی ماندن فعالیت کاتالیستی بالا و قابلیت استفاده مجدد حامل‌های گران‌قیمت بعد از غیر فعال شدن آنزیم‌های تثبیت‌شده، پتانسیل اقتصادی بالاتری را در مقایسه با سایر روش‌ها دارد. در این تحقیق آنزیم پکتیناز که یکی از آنزیم‌های پرکاربرد در صنایع غذایی و خصوصاً صنعت تولید آب‌میوه است بر روی پایه‌های متخلخل سیلیکا آئروژل به روش جذب سطحی تثبیت و تعیین خواص گردید. جهت یافتن شرایط بهینه برای تثبیت آنزیم پکتیناز، تاثیر پارامترهایی چون زمان تثبیت، نسبت آنزیم به پایه و pH در بازده تثبیت،

۵- منابع

1. Alagöz, D., Tükel S.S. and Yildirim, D., 2016. Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, pp. 426–432.
2. Amirkhani, L., Moghaddas, J. and Jafarizadeh-Malmiri, H., 2019. Optimization of biodiesel production using immobilized *Candida rugosa* lipase on magnetic Fe₃O₄-silica aerogel, *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 38(2), pp.193-201.
3. Amirkhani, L., Moghaddas, J. and Jafarizadeh-Malmiri, H., 2016. *Candida rugosa* lipase immobilization on

- interactions between the enzyme and the gel. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 350(0), pp. 23-30.
13. Fernández, K., Vega, M. and Aspé, E., 2015. An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins. *Food Chemistry*, 168, pp.7–13.
 14. Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J. and Mahajan, R., 2016. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, 6, p.47.
 15. Gesser, H.D. and Goswami P.C. 1989. Aerogels and Related Porous Materials. *Chemical Review*, 89, pp. 765-788.
 16. Ghandahari Yazdi, A.P., Barzegar, M. Sahari M.A. and Ahmadi Gavlighi, H., 2018. Optimization of the enzyme-assisted aqueous extraction of phenolic compounds from pistachio green hull. *Food Science & Nutrition*, 7, pp. 356-366.
 17. Husing, N. and Schubert, U., 2005. *Aerogels*. Wiley.
 18. Karout, A., Chopard, C. and Pierre, A.C., 2007. Immobilization of a lipoxygenase in silica gels for application in aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44(3-4), pp. 117-127.
 19. Lee, C.-H., Lin, T.-S. and Mou, C.-Y., 2009. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today*, 4, pp. 165-179.
 20. Leventis, N. and Koebel, M. M., 2011. *Aerogels Handbook*. Springer.
 21. Li, T., Wang, N. Li, S., Zhao, Q., Guo M. and Zhang, C., 2007. Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support. *Biotechnology Letters*, 29(9), pp. 1413-1416.
 22. Maury, S., Buisson, P., Perrard, A. and Pierre, A.C., 2005. Compared esterification kinetics of the lipase from *Burkholderia cepacia* either free or encapsulated in a silica aerogel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32(5-6), pp. 193-203.
 4. Bangi, U.K.H., Rao, A.V. and Rao, A.P., 2008. A new route for preparation of sodium-silicate-based hydrophobic silica aerogels via ambient-pressure drying. *Science and technology of advanced materials*, 9, p. 035006.
 5. Brena, B., González-Pombo, P. and Batista-Viera, F., 2013. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobilization of Enzymes and Cells*, 1051, pp.15-31.
 6. Buisson, P., Hernandez, C., Pierre M. and Pierre A.C., 2001. Encapsulation of lipases in aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 285(1-3), pp.295-302.
 7. Buisson, P. and Pierre A.C., 2006. Immobilization in quartz fiber felt reinforced silica aerogel improves the activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39(1-4), pp. 77-82.
 8. Chamorro, S., Viveros, A., Alvarez, I., Vega, E. and Brenes, A., 2012. Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. *Food Chemistry*, 133, pp. 308–314.
 9. Dal Magro, L., de Moura, K.S., Backes, B.E., de Menezes, E.W., Benvenutti, E.V. and Nicolodi, S. *et al.*, 2019. Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. *Biotechnology Reports*, 24, e00373.
 10. Delcheva, G., Pishtiyski, I., Dobrev, G. and Krusteva S., 2007. Immobilization of *Aspergillus niger* Pectinase on Polyacrylonitrile Copolymer Membrane. *Trends in Applied Sciences Research*, 2, pp. 419-425.
 11. Dorcheh, A.S. and Abbasi M.H., 2008. Silica aerogel: synthesis, properties and characterization. *Journal of materials processing technology*, 199, pp. 10-26.
 12. El Rassy, H., Maury, S., Buisson, P. and Pierre, A.C., 2004. Hydrophobic silica aerogel-lipase biocatalysts: Possible

26. Tambuk, P., Tomaskovic, D., Tomaz, I., Maslov, L., Stupic, D. and Kontic, J.K., 2016. Application of pectinases for recovery of grape seeds phenolics. *3 Biotech*, 6, p. 224.
27. Zahedi, M., Memar Maher, B., Anarjan, N. and Hamishehkar, H., 2021. Investigation the synergistic effects of licorice, garlic and fennel essential oils Microemulsions as natural antioxidant and antibacterial agents. *Food Hygiene*, 11, pp. 23-36.
28. Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T. and Pinelo, M., 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(3), p. 92.
23. Mohammadi, M., Khakbaz Heshmati, M., Sarabandi, K., Fathi, M., Lim, L.-T. and Hamishehkar, H., 2019. Activated alginate-montmorillonite beads as an efficient carrier for pectinase immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, pp.253-260.
24. Orcaire, O., Buisson, P. and Pierre, A.C., 2006. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42(3-4), pp. 106-113.
25. Ramirez, H. L., Briones, A.I., Úbeda, J. and Arevalo, M., 2013. Immobilization of pectinase by adsorption on an alginate-coated chitin support. *Biotecnología Aplicada*, 30, pp.101-104.

(Original Research Paper)

Optimization of Pectinase Enzyme Immobilization on Silica Aerogel and Its Application in the Extraction of Phenolic Compounds of Grape Pomace

Ismaeil Faramarzi Agh Gonbad¹, Leila Amirkhani^{2*}, Seyyed Mahdi Hedayat Zadeh³, Fahimeh Derakhshan Fard²

1-Ph.D Student of Chemical Engineering, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

3-Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Ilkhchi Branch, Islamic Azad University, Ilkhchi, Iran.

Received:02/01/2022

Accepted:11/03/2022

Abstract

One of the commercial applications of the pectinase enzyme is pectinization and clarification of fruit juices and extraction of phenolic compounds from the fruits. Pectinase immobilization is one of the stabilization methods that makes it possible to separate the enzyme from the reaction and reuse it, thus reducing the cost of using the enzyme in the industry. In this study, the pectinase enzyme from *Aspergillus niger* was immobilized on hydrophilic silica aerogel by the adsorption method. Adsorption involves hydrogen, hydrophobic, and van der Waals interactions between solid carriers and adsorbed molecules, and due to their simplicity, high catalytic activity, and reusability of carriers after inactivation of immobilized enzymes, has higher economic potential, compared to other immobilization methods. Properties of silica aerogel containing pectinase were determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM) analysis. Effective parameters in enzyme immobilization (immobilization time, enzyme to support ratio, and pH) were studied using the Response Surface Methodology (RSM) and the application of immobilized enzyme in the extraction of phenolic compounds from the grape pomace was investigated. Results obtained from properties analysis and measurement of immobilization efficiency showed effective immobilization of the enzyme on the silica aerogel supports. Optimal conditions for immobilization were obtained at pH 5, enzyme to support ratio of 0.1, and time of 89.2 minutes. The immobilization efficiency in these conditions was 78.1%. Experimental results and modeling were not significantly different, which showed the adequacy of the model. Extraction of phenolic compounds from the grape pomace by pectinase immobilized on silica aerogel supports, increased by 78.7% and free radical scavenging by 55.7%, compared to the case without enzymatic treatment.

Keywords: Enzyme Immobilization, Pectinase, Silica Aerogel, Grape Pomace, Phenolic Compounds.

*Corresponding Author: l-amirkhani@iau-ahar.ac.ir

(مقاله پژوهشی)

ارزیابی شرایط بهینه استخراج بتائین از ملاس چغندر قند به روش کروماتوگرافی تعویض یونی

سمر خیامیم^{۱*}، بابک بابایی^۲، حمید نوشاد^۲، داریوش طالقانی^۲

۱-استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۲-موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۸

DOI: [10.30495/jfst.2022.1952874.1779](https://doi.org/10.30495/jfst.2022.1952874.1779)

چکیده

چغندر قند علاوه بر قند از نظر آمینواسیدهایی مانند گلايسين بتائين حائز اهمیت است زیرا واجد خواص دارویی در طیور، آبزیان و حتی انسان می باشد به طوری که اخیراً در تولید داروهای ضد سرطان از آن استفاده می شود. این تحقیق با هدف بهینه سازی استخراج بتائین از ملاس چغندر قند به روش کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد. ابتدا به منظور بهینه سازی شرایط استخراج مواد تزریقی مختلف در ستون کروماتوگرافی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه سطح و با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل مواد تزریقی به ستون شامل: کلرید پتاسیم، ساکارز خالص و بتائین خالص؛ فاکتور دوم شامل سه درجه حرارت مختلف ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درجه سانتی گراد و فاکتور سوم سه نوع رزین آزمایشگاهی، تجاری ۱ و تجاری ۲ با منشا پتاسیمی جهت استخراج در ستون کروماتوگرافی بود. حجم خروجی مواد از ستون کروماتوگرافی برای هر سه ماده شیمیایی به طور معنی داری با یکدیگر متفاوت بود. بهترین درجه حرارت برای جداسازی بتائین حدود ۷۵ درجه سانتی گراد و بهترین رزین، رزین تجاری ۱ بود که به طور معنی داری نسبت به رزین های دیگر با سرعت و مقدار و راندمان استحصال بیشتر بتائین را از ستون تفکیک می کرد. در مرحله دوم بتائین ملاس پس از سختی گیری، بر اساس شرایط بهینه تعیین شده در مرحله اول استخراج گردید. بر این اساس درصد خلوص بتائین استخراج شده از ملاس به ترتیب حدود ۵۴، ۶۴ و ۷۹ درصد با میانگین ۶۵/۶۶ درصد به دست آمد. این آزمایش به صورت آزمایشگاهی اجرا شد که نتایج آن در فاز صنعتی می تواند برای کارخانجات قند کشور به منظور استحصال بتائین از ملاس چغندر قند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: استخراج گلايسين بتائين، درجه حرارت، رزین، کروماتوگرافی، ملاس.

۱- مقدمه

بتاین به عنوان تری متیل گلايسين، گلايسين بتاين، ليزين و اگزینورین شناخته می‌شود. گلايسين بتاين که بیشتر به عنوان بتاين مصطلح است از نظر ساختار و نه بیوشیمیایی ساده‌ترین آمینو اسید است (۱۲). این ماده محلول در آب بوده و به طور وسیعی در حیوانات، گیاهان، میکرو ارگانیزم‌ها، منابع غنی غذایی مثل غذاهای دریایی به خصوص بی‌مهرگان دریایی (حدود یک درصد)، جوانه یا سبوس گندم (حدود یک درصد) و اسفناج (حدود ۰/۷ درصد) وجود دارد. به عبارتی بتاين در بدن اکثر موجودات ساخته می‌شود اما در بعضی از گیاهان و مهره داران ذخیره می‌گردد. از جمله گیاهان ذخیره کننده بتاين، گیاه چغندر قند است (۱۰). بتاين در اندام‌های مختلف چغندر قند وجود دارد مقدار بتاين در برگ بیشتر از دمبرگ و در دمبرگ بیشتر از ریشه چغندر قند است (۴) اما توزیع آن در قسمت‌های مختلف ریشه یکسان است (۲۰). بتاين حدود پنج درصد ماده خشک موجود در ملاس را تشکیل می‌دهد (۶). در چغندر وحشی نیز مقدار گلايسين بتاين بیشتر از چغندر قند و چغندر علوفه‌ای است (۲۲). در گیاهان، تنش‌های خشکی، شوری و گرما سنتز بتاين را در میتوکندری تحریک کرده که منجر به تجمع این ماده در سلول‌ها می‌شود. افزایش مقدار گلايسين بتاين تحت تاثیر شوری در گیاه املج (*Phyllanthus embelica*) (۱۵) سالی کورنیا و سودا (۲۱)، برنج (۹)، چغندر وحشی و علوفه‌ای (۲۲) اسفناج (۱۰) و در تنش خشکی در چغندر قند (۴ و ۲۴) گزارش شده است. بتاين بیشتر از ۵۰ سال است که به عنوان ماده کمکی به غذای حیوانات اضافه می‌شود. بتاين به غذای ماهی پرورشی به عنوان اسمولیت اضافه می‌شود تا از ماهی در مقابل تنش عبور از شوری کم به زیاد محافظت کند (۱۰). افزودن بتاين در جیره غذایی جوجه گوشتی باعث افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی گردید و وزن سینه جوجه گوشتی بیشتر و چربی محوطه بطني کمتر شد (۳). بتاين عصاره چغندر نقش مهمی در سرم‌زایی سلول‌های سرطانی دارد (۱۶). مصرف توام عصاره

ریشه چغندر لبویی با داروی ضد سرطان دوگروزوبيسين می‌تواند باعث کاهش دوز داروی مصرفی گردد. به طوری که بیشترین اثر در نسبت ۱ به ۵ عصاره ریشه به دوگروزوبيسين و با دوزهای IC50، IC75 و IC90 برای از بین بردن سلول‌های سرطانی پانکراس و دوز IC90 برای سلول‌های سرطانی سینه به دست آمد (۱۷). به طور کلی بتاين در کاهش التهاب و بتاين به عنوان ماده آنتی اکسیدان، کاهش التهاب، القا فاز دو آنزیم‌ها، ضد جهش‌زایی و موثر در فعالیت‌های بازدارنده شیمیایی در بدن انسان مطرح می‌شود (۱۹). جداسازی بتاين از ملاس چغندر قند در صنعت قند با کروماتوگرافی تعویض یونی و کروماتوگرافی غربال‌ملکولی امکان پذیر است. برای این منظور از رزین تعویض کاتیونی اسید قوی و آمونیاک به عنوان فاز متحرک (۷) و یا از آب به عنوان فاز متحرک (۱۴) استفاده می‌کردند. در این روش، راندمان بتاين استحصالی ۹۹/۸ درصد به دست آمد که جهت مصارف دارویی مطلوب بود. بستر تبادل کاتیونی (رزین) ضعیف از نوع هیدروژنی بستر مناسبی تشخیص داده شد. این نوع رزین جداسازی کروماتوگرافی را در PH اسیدی مهیا می‌کند. بر خلاف روش‌های دیگر که عملیات بازیابی به چندین مرحله کروماتوگرافی نیازمند است (۱۸)، در این روش بازیابی گلايسين بتاين از ملاس فقط در یک مرحله کروماتوگرافی به دست می‌آید (۲۳). حداکثر حجم خروجی گلايسين بتاين در رزین فرم سدیمی از ۵۲ درصد از حجم بستر بدست می‌آید در حالی که در رزین فرم هیدروژنی از ۱۲۸ درصد حجم بستر بدست می‌آید (۲۳). ملاس دارای مقادیر مختلفی از مواد است. بازیابی قند از ملاس از ملاس چغندر، فرآیندی است که با استفاده از کروماتوگرافی batch و هم (SMB (simulated moving bed) به عنوان روشی برای بازیافت ساکارز که به علت دخالت مواد غیرقندی (نمک، رافینوز، آمینو اسیدها) از ملاس کریستاله نمی‌شود، به صورت تجاری درآمده است (۸). براساس آمار تولید چغندر قند طی سال‌های گذشته در ایران، حدود پنج درصد مقدار ریشه چغندر قند وارد شده به کارخانه به صورت ملاس از آن خارج می‌شود (۲).

استخراج بتائین از ملاس چغندر قند در کشور انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- طراحی ستون

به منظور جداسازی بتائین از ملاس روش کروماتوگرافی ستونی که امکان تعمیم آن به روش^۱ (SMB) وجود دارد انتخاب شد. بر این اساس سه ستون شیشه‌ای به عنوان بستر رزین به منظور استفاده روش کروماتوگرافی تعویض یونی ستونی^۲ در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند کرج در سال ۱۳۹۷، ساخته، نصب، و فعال گردید (شکل ۱). مراحل مختلف اسیدشویی با اسید کلریدریک ۰/۲ مولار، آب شویی و نمک شویی کلرید سدیم ۰/۴ مولار روی ستون‌ها انجام و رزین‌ها تعیین ظرفیت شدند. ستون‌های کروماتوگرافی بستر اصلی مطالعات تبادل کاتیونی هستند. این ستون‌ها با رزین پر شده و در واقع بستر رزین^۳ را تشکیل می‌دهند. ستون رزین، یک فیلتر مولکولی کاملاً ریز را تشکیل می‌دهد. مواد مختلف ملاس اندازه‌ها و خصوصیات متفاوت داشته و سرعت حرکت آن‌ها در ستون‌ها (بستر رزین) متفاوت است (۲۶). در تهیه بعضی از رزین‌ها و ملاس چغندر قند با دو کارخانه در سطح کشور همکاری شد.

۲-۲- بهینه‌سازی شرایط جداسازی در ستون کروماتوگرافی

سپس به منظور بهینه‌سازی جداسازی بتائین، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه سطح و با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول سه ماده تزریقی به ستون شامل نمک کلرید پتاسیم، ساکارز خالص و بتائین خالص؛ فاکتور دوم شامل سه درجه حرارت مختلف ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد و فاکتور سوم سه نوع رزین شامل رزین آزمایشگاهی (سایز بسیار ریز)، و رزین تجاری ۱ (سایز متوسط) و رزین تجاری ۲ (رزین پتاسیمی با سایز درشت) بود. با توجه به تعیین ظرفیت رزین‌ها و محدود بودن ظرفیت رزین، همه مواد با

بنابراین به طور مثال در یک کارخانه با ظرفیت مصرف ۲۰۰ هزار تن ریشه در سال و تولید ۱۰ هزار تن ملاس) می‌توان نسبت به استخراج حداقل ۴۰۰ تن بتائین اقدام نمود. هزینه هر کیلو بتائین در کشور حدود ۳۰۰۰۰۰-۲۰۰۰۰۰ ریال گزارش شده است. لذا حداقل درآمد ناخالص کارخانه مذکور از فروش بتائین حدود ۴۰ میلیارد ریال برآورد می‌شود این سود بر فعالیت‌های اقتصادی و سود حاصله از تولید شکر، ملاس و تفاله و الکل گیری افزوده می‌گردد. لذا صرفه اقتصادی بالایی برای صاحبان صنایع قند به همراه خواهد داشت. از طرفی بر اساس آمار انجمن صنفی کارخانجات قند کشور در سال ۱۳۹۹، حدود ۲۲۸ هزار تن ملاس در کل کشور تولید شد از این مقدار ملاس ۱۳۶۸۰ تن بتائین قابل استحصال است (۲). لازم به ذکر است که بر اساس آمار سایت گمرک کشور (۱۳۹۷) میزان واردات کوکو آمید و بتائین از کشورهای مختلف اروپایی و ترکیه در سال ۱۳۹۷ به مقدار ۵۳۲۰۰ کیلوگرم به ارزش ۳۱۸۸۹۲۵۱۲۰ ریال و معادل ۷۵۹۳۵ دلار (به نرخ دولتی) بوده است (۱). بنابراین با توجه به واردات کوکو آمید و بتائین در کشور که در حال حاضر برابر ۵۳ تن است، در صورت بکارگیری روش‌های مناسب استخراج بتائین ضمن قطع واردات می‌توان نسبت به خود کفایی و حتی صادرات سالانه ۱۳۶۲۷ تن بتائین اقدام نمود که واجد ارزش آوری برای کشور خواهد بود. با توجه به این که سطح زیر کشت چغندر قند در ایران حدود ۱۰۰ هزار هکتار است استخراج این مواد موثره علاوه بر قند می‌تواند در تولید داروهای موثر برای انسان و طیور مورد توجه قرار گیرد. در حال حاضر بتائین به صورت تجاری در جیره طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد که عمدتاً این محصول به کشور وارد می‌گردد. استخراج بتائین از ملاس چغندر قند می‌تواند کشور را از واردات این مواد به خصوص مواد مکمل غذایی برای طیور و آبزیان بی‌نیاز نماید. لذا این پروژه به منظور مشخص کردن بهترین روش و بهینه‌سازی

1- Simulated Moving Bed

2- Column ion Exchange resin

3 -Resin Bed

فواصل ۲۵ میلی لیتر (۲۵، ۵۰، ۷۵، و....) به ترتیب توسط شکست سنج^۱، هدایت سنج^۲ و PH متر از نظر مواد جامد محلول، هدایت الکتریکی و اسیدیته اندازه گیری شده و تا شستشوی کامل ستون و صفر شدن کامل خروجی ها این کار ادامه یافت. از منحنی ها برای متوسط زمان نگهداری مواد در ستون استفاده شد (۸).

۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری توسط نرم افزار MSTATC انجام و مقایسه میانگین ها در سطح پنج درصد توسط آزمون چند دامنه دانکن انجام شد. به منظور رسم گراف ها و تعیین سرعت خروج مواد از ستون از نرم افزار Excel استفاده گردید.

۲-۴- استخراج بتائین از ملاس

برای استخراج بتائین از ملاس ابتدا ملاس سختی گیری شد. برای این منظور ابتدا مقدار خاکستر ملاس حدود ۰/۹ درصد تعیین شد. سپس بریکس ملاس چغندر قند به ۶۰ درصد تغییر، اسیدیته به ۹ رسانده شد. کربنات پتاسیم جهت سختی گیری اضافه و سانتریفیوژ شد. سپس اسیدیته محلول ملاس به هفت رسانده شده در حجم مورد نظر میزان بتائین جداسازی شده و برای خالص سازی مجدداً از ستون رد شد. بتائین خارج شده رنگ بری شده و در آون خلا در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی گراد تغلیظ گردید (۱۱). اندازه گیری بتائین به روش اسپکتروفتومتری به روش حلال اسیدسولفوریک و معرف دیدید پتاسیم انجام شد (۱۳ و ۲۴). پس از تهیه محلول های استاندارد با غلظت های صفر تا ۳۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از محلول پایه ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بتائین خالص آزمایشگاهی با خلوص ۱۰۰ درصد مقدار جذب گلاسیس بتائین توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۶۵ نانومتر قرائت و مقدار بتائین بر اساس حاصل ضرب عدد منحنی در درجه رقت و بر اساس وزن نمونه محاسبه گردید.

سطح رقت ده درصد به ستون ها تزریق شدند. از طرفی به علت این که زمان خروج مواد مختلف ملاس از رزین متفاوت است، لذا نوع ماده شامل ساکارز، بتائین و نمک کلرید پتاسیم به عنوان سه ماده اصلی تشکیل دهنده ملاس بر حجم خروجی از ستون تاثیر گذار خواهد بود (۱۱). لذا بررسی خصوصیات جداسازی ستون برای هر ماده به صورت مجزا ضروری می باشد (۸). برای انجام آزمایش هر ماده در درجه حرارت های مورد نظر در سه و بعضی مواقع چهار تکرار از ستون های رزینی کروماتوگرافی عبور داده شد. برای اعمال درجه حرارت از دستگاه حمام آبی ۱۰ لیتری مجهز به ترموستات کنترل دما مدل WISD (شرکت Witeg آلمان) استفاده شد.



شکل ۱- ستون های رزینی جهت جداسازی بتائین از ملاس با دستگاه حمام آبی با قابلیت کنترل درجه حرارت در سطح آزمایشگاهی

خروجی های هر ستون از حجم ۲۵ میلی لیتر تا ۸۰۰ میلی لیتر با

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بهینه‌سازی شرایط جداسازی در ستون کروماتوگرافی

اثر مواد تزریقی به ستون، نوع رزین، اثر متقابل مواد و درجه حرارت، اثر متقابل مواد و رزین در سطح یک درصد و اثر درجه حرارت در سطح پنج درصد بر میزان حجم خروجی

ستون‌ها اثر معنی‌دار داشت. هم‌چنین اثر مواد تزریقی و درجه حرارت و اثر متقابل آن‌ها در سطح یک درصد و اثر متقابل رزین در درجه حرارت و رزین در مواد تزریقی بر درصد مواد جامد محلول (بریکس) در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین مربعات مواد تزریقی به ستون کروماتوگرافی، درجه حرارت و نوع رزین بر حجم خروجی مواد و درصد ماده جامد

محلول

منابع تغییر	درجه آزادی	حجم خروجی	ماده جامد محلول
ماده تزریقی به ستون	۲	۲۴۱۳۹۵/۵۳**	۲/۱۱**
درجه حرارت	۲	۱۷۱۸۹/۵۱*	۱/۰۹**
ماده × درجه حرارت	۴	۱۷۲۲۹/۰۹**	۰/۹۱**
نوع رزین	۲	۲۸۰۲۷/۷۰**	۰/۱۶ ^{ns}
ماده*رزین	۴	۵۹۱۸۵/۶۹**	۰/۱۷*
درجه حرارت*رزین	۴	۳۱۰۱/۵۵ ^{ns}	۰/۱۸*
ماده* درجه حرارت*رزین	۸	۴۶۴۲/۳۵ ^{ns}	۰/۰۷ ^{ns}
خطا	۵۴	۳۵۱۴/۶۶	۰/۰۶
ضریب تغییرات		۳۳/۴۱	۳۹/۰۱

^{ns} و ** به ترتیب نشانگر عدم معنی داری و معنی داری در سطوح احتمال پنج و یک درصد می باشند.

در کروماتوگرافی تعویض یونی، هم‌زمان مولکول‌های کوچک اجزای غیر یونی به داخل منافذ رزین نفوذ کرده (جذب می‌شوند) و مولکول‌های بزرگتر به سطح رزین می‌چسبند. نمک‌های حاوی سدیم و پتاسیم بخش قابل توجه ملاس چغندر قند را تشکیل می‌دهند که با توجه به شعاع اتمی کوچک و بار یونی منفرد به راحتی به منافذ رزین نفوذ و عبور کنند. ساکارز با فرمول $C_{12}H_{22}O_{11}$ به دلیل تشکیل پیوند هیدروژنی با ملکول‌های آب (فاز متحرک) از حلالیت بالا (۲۰۰ گرم در ۱۰۰ سانتیمتر مکعب در ۲۵ درجه سانتیگراد) برخوردار است. بتائین با فرمول $C_5H_{11}NO_2$ شامل دو گروه عاملی ست یک گروه عاملی کاتیونی با بار مثبت که هیچ اتم هیدروژنی ندارد و یک گروه عاملی با بار منفی است که به دلیل دارا بودن هم زمان بار مثبت و منفی می‌تواند اثر جاذبه روی رزین‌های تبادل کاتیونی داشته باشد و موجب شود تا حرکت این ترکیب را در منافذ رزین

نسبت به سایر ترکیبات موجود کندتر شود. بر همین اساس قبل از تزریق ملاس، نمک خالص کلرید پتاسیم، ساکارز و بتائین خالص به ستون تزریق شدند تا در دما و سرعت ثابت زمان خروج مشخص شود. حجم خروجی ترکیبات فوق الذکر با غلظت ۱۰ درصد در سرعت و دمای ثابت سه ماده نشان می‌دهد ابتدا نمک کلرید پتاسیم از ستون‌ها خارج شده (۱۰۳ میلی‌لیتر) و سپس ساکارز و بتائین به ترتیب با حجم‌های خروجی حدود ۱۴۶ و ۲۸۴ میلی‌لیتر از ستون‌ها خارج می‌شوند (جدول ۲). این نتیجه با روند جداسازی در مطالعات قبلی مطابقت دارد (۱۱). این روش به طور شفاف نتایج جداسازی مواد را نشان می‌دهد و می‌توان با آن دوره زمانی تغییر خروج مواد را تشخیص داد به طوری که در تزریق ساکارز و کلرید پتاسیم به ستون ابتدا نمک و سپس ساکارز خارج شد ساکارز از دقیقه ۲۰ شروع به خارج شدن کرده و در دقیقه ۹۰ به سطح ثابتی رسید (۸). بتائین

از وقوع از بین رفتن ساکارز طی معکوس سازی (شکسته شدن) جلوگیری شود (۱۱). برای استخراج بهینه بتائین وجداسازی مطلوب بتائین از بخش های ملاس روش های دیگری شامل فاز تغییر و فاز جداسازی استفاده شده است که در فاز تغییر ملاس در معرض آنزیم های ایندولیناز یا فروکتوسیل ترانسفراز قرار گرفته و ملاسی با فرم فروکتان ایجاد می شود و سپس این ملاس در فاز جداسازی قرار می گیرد. در این روش نیز برای جداسازی از ستون کروماتوگرافی با سیستم تبادل کاتیونی به فرم سدیمی استفاده می شود. فرم سدیمی بایون های دیگر جایگزین نشده و این مساله جداسازی گلايسين بتائين را بهتر می نماید (۲۵).

آرامتر از ساکارز حرکت می کند، لذا مقداری از بتائین در محصول ملاس قندزدایی شده در کارخانجات وجود دارد. اگرچه با دستکاری مناسب میزان جریان بازیافت، ۷۰٪-۶۵٪ از بتائین می تواند در جریان محصولات جانبی با نمک ها حذف شود. جداسازی نمک ها در ۹۹-۹۷٪ موارد خیلی خوب است. محصول نهایی قندزدایی می تواند رنگی در سطح بالا داشته باشد. در قندزدایی ملاس در کارخانجات، رنگزدایی و غیرمعدنی سازی محصول با تبادل یون به منظور کاهش رنگ تا ۸۰٪ و افزایش خلوص ساکارز تا ۹۵٪ قابل انجام است. درجه حرارت جریان قندزدایی محصول در زمانی که از ستون رزین کاتیونی هیدروژنی عبور می کند باید تا کمتر از ۱۵ درجه سانتیگراد نگه داشته شود تا

جدول ۲- مقایسه میانگین حجم محلول خروجی و درصد مواد جامد محلول در ستون‌های کروماتوگرافی با تزریق سه نوع ماده در درجه

حرارت‌های مختلف و سه نوع رزین

ماده تزریقی	درجه حرارت	رزین	حجم خروجی (میلی لیتر در دقیقه)
کلرید پتاسیم			۱۰۲/۷۸ ^c
ساکارز			۱۴۵/۸۳ ^b
بتاین			۲۸۳/۷۸ ^a
	۲۵		۱۷۷/۲۳ ^{ab}
	۵۵		۲۰۲/۷۹ ^a
	۷۵		۱۵۲/۳۲ ^b
کلرید پتاسیم	۲۵		۱۰۵/۵۶ ^d
کلرید پتاسیم	۵۵		۹۱/۶۷ ^d
کلرید پتاسیم	۷۵		۱۱۱/۱۱ ^{cd}
ساکارز	۲۵		۱۲۷/۷۹ ^{cd}
ساکارز	۵۵		۱۶۹/۴۴ ^{bc}
ساکارز	۷۵		۱۴۰/۲۹ ^{cd}
بتاین	۲۵		۲۹۸/۵۶ ^a
بتاین	۵۵		۳۴۷/۲۲ ^a
بتاین	۷۵		۲۰۵/۵۶ ^b
		آزمایشگاهی	۲۰۸/۸۰ ^a
		تجاری ۱	۱۴۴/۴۳ ^b
		تجاری ۲	۱۷۹/۱۷ ^a
کلرید پتاسیم	*	آزمایشگاهی	۸۱/۹۴ ^c
کلرید پتاسیم	*	تجاری ۱	۱۰۰ ^c
کلرید پتاسیم	*	تجاری ۲	۱۲۶/۳۹ ^c
ساکارز	*	آزمایشگاهی	۱۲۲/۲۲ ^c
ساکارز	*	تجاری	۱۲۷/۷۸ ^c
ساکارز	*	تجاری ۲	۱۸۷/۵ ^b
بتاین	*	آزمایشگاهی	۴۲۲/۲۲ ^a
بتاین	*	تجاری	۲۰۵/۵ ^b
بتاین	*	تجاری ۲	۲۲۳/۶۱ ^b
*	۲۵	آزمایشگاهی	۲۱۲/۵ ^a
*	۲۵	تجاری	۱۴۱/۶۱ ^a
*	۲۵	تجاری ۲	۱۷۷/۷۸ ^a
*	۵۵	آزمایشگاهی	۲۴۴/۴۴ ^a
*	۵۵	تجاری	۱۵۰ ^a
*	۵۵	تجاری ۲	۲۱۳/۸۹ ^a
*	۷۵	آزمایشگاهی	۱۶۹/۴۴ ^a
*	۷۵	تجاری	۱۴۱/۶۷ ^a
*	۷۵	تجاری ۲	۱۴۵/۸۳ ^a

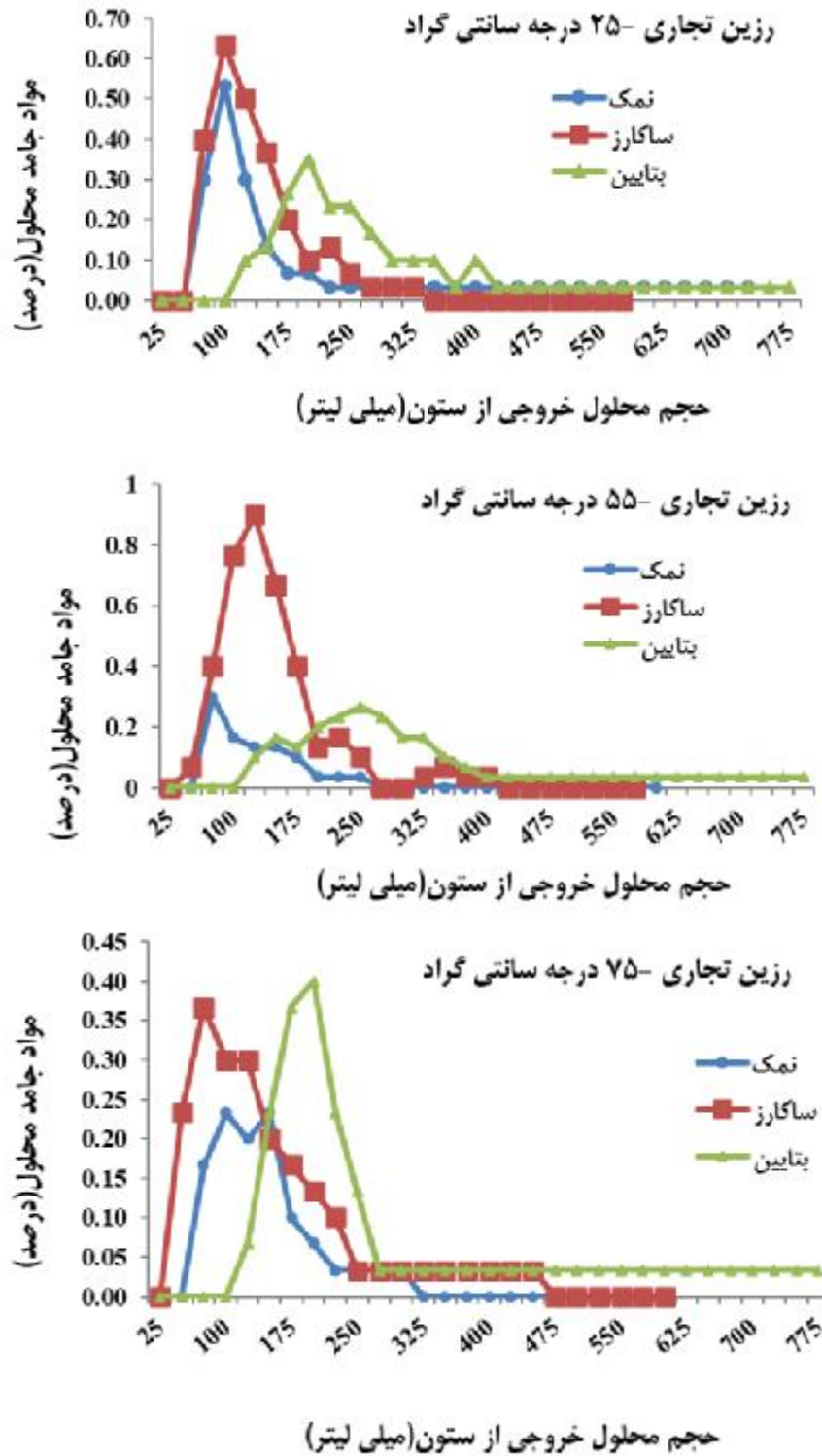
اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) نمی‌باشند

جداسازی بتائین از ملاس با توجه به غلظت ساکارز ۵۰٪، خاکستر ۱۰٪ و بتائین ۶٪ در ملاس، موجب همپوشانی خروج دو ترکیب ساکارز و بتائین از ستون کروماتوگرافی است. افزایش دمای فاز متحرک برای ترکیبات خالص مورد بررسی، موجب افزایش سرعت خروج ساکارز و کاهش همپوشانی خروج همزمان ساکارز و بتائین موجود در ملاس از ستون رزین گردید (شکل ۱). لذا مشاهده شد که در درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی گراد مواد تزریقی به ستون کروماتوگرافی سریعتر و به طور متوسط در حجم ۱۵۲ میلی لیتر از ستون ها خارج می شوند. با کاهش درجه حرارت خروج مواد از ستون ها دیرتر و در حجم بیشتری از محلول عبور کرده از ستون، اتفاق می افتد (جدول ۲). همچنین بهترین درجه حرارت برای خروج بتائین از ستون ها درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی گراد است که به طور معنی دار نسبت به دو درجه حرارت دیگر (۵۵ و ۲۵ درجه سانتی گراد) بتائین سریعتر و با حجم کمتر محلول (۲۰۶ میلی لیتر) از ستون ها خارج می شود (جدول ۲). کنترل خروج ساکارز و بتائین در دو رزین تجاری ۱ و تجاری ۲ با تعیین ساکارز به روش پلاریمتری و درصد مواد جامد محلول (بریکس) به روش رفرکتومتری نشان داد که کمترین همپوشانی خروج ساکارز و بتائین در درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی گراد به دست آمد (شکل ۲). با محاسبه سطح زیر منحنی و راندمان استحصال مشخص گردید که در رزین تجاری ۱ و درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی گراد راندمان استحصال ۴۶/۳۲ درصد بود در حالی که در این رزین و در درجه حرارت ۵۵ و ۲۵ درجه سانتی گراد راندمان استحصال ۱۳/۹۱ و ۹/۰۹ درصد بود (داده ها نشان داده نشده است). در آزمایش دیگری نیز تفکیک مواد در ستون کروماتوگرافی در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد انجام شد و درجه حرارت بیشتر از ۶۰ درجه برای استحصال مناسب شناخته شد (۸). در مقایسه سه رزین نیز مشخص

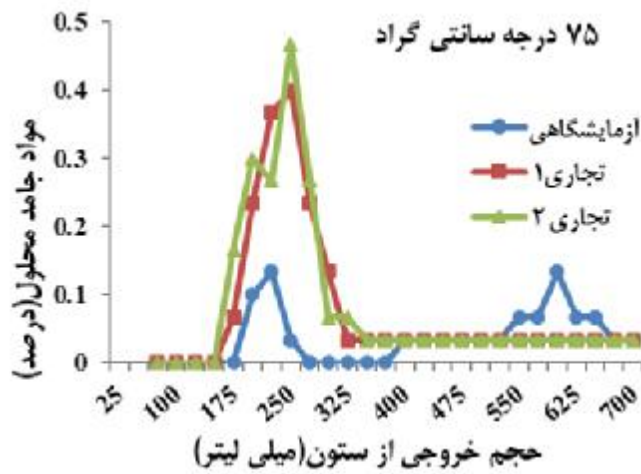
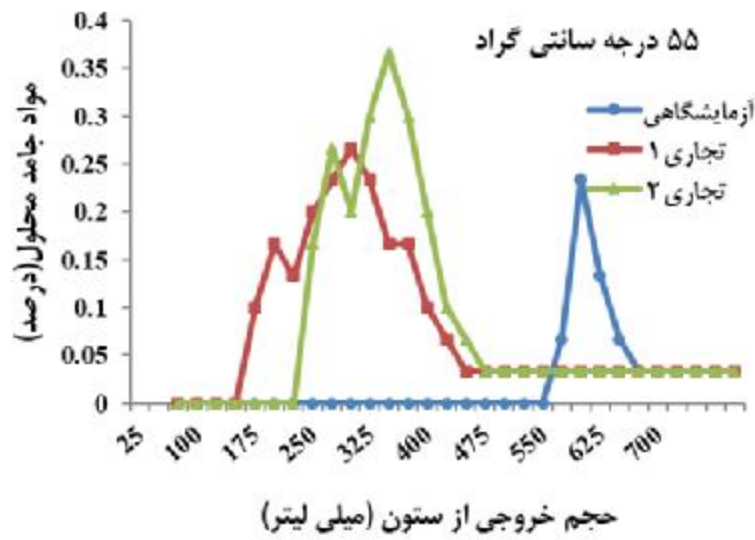
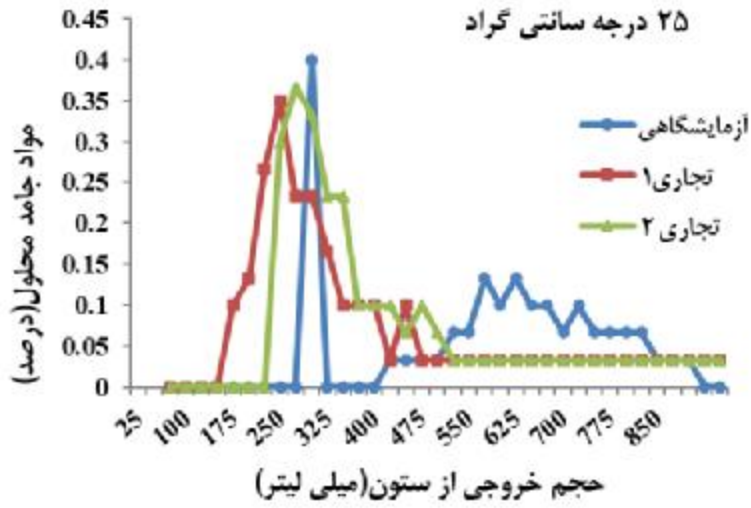
شد که رزین تجاری ۱ به طور معنی دار نسبت به دو رزین دیگر قادر به تفکیک مواد با سرعت بیشتر و حجم مواد کمتر است (جدول ۲). در بین این رزین ها ستون حاوی رزین آزمایشگاهی بسیار دیرتر از دو ستون دیگر (۴۲۲ میلی لیتر در مقابل ۲۰۰ میلی لیتر) بتائین را تفکیک نمود (جدول ۲). ذرات ریز این رزین باعث کندی حرکت بتائین در داخل آن شده و کندی روند تفکیک بود. در این رزین با وجودی که بتائین آخرین مرحله از رزین (شکل ۲ ب و ج) با راندمان ۶۵ تا ۱۰۰ درصد طی دماهای مختلف (داده ها بر اساس محاسبه سطح زیر منحنی بوده که ارائه نشده است) خارج شد، اما رزین آزمایشگاهی از نظر قیمت برای کارخانه به صرفه نیست از طرفی در کارخانه با سرعت بالای کار روند کند استخراج بتائین از این رزین نمی تواند اقتصادی باشد. در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد سرعت تفکیک بتائین در هر سه رزین مشابه بود این در حالی است که با افزایش دما سرعت تفکیک بتائین در رزین های تجاری ۱ و تجاری ۲ افزایش یافته در حالی که در رزین آزمایشگاهی در درجه حرارت های بالا نیز سرعت تفکیک بسیار کند بود (شکل ۲ و جدول ۲). راندمان استحصال بتائین در رزین آزمایشگاهی طی درجه حرارتهای مختلف بین ۱۰۰-۶۵ درصد اما به مقدار کم و بسیار کند بود. این راندمان در رزین تجاری ۱ بین ۴۶-۹ درصد متغیر اما با مقدار زیاد و روند سریع و در رزین تجاری ۲ این راندمان حتی منفی بوده و با خروج ساکارز همزمان بود (داده ها ارائه نشده است). استخراج بتائین در رزین کاتیونی قوی^۱ از خلوص ۵ تا حداکثر ۶۰ درصد متفاوت است. در رزین کاتیونی ضعیف به فرم هیدروژن^۲ ایجاد باند هیدروژنی از دلایل نگهداری بتائین روی رزین است در این رزین در شرایط اسیدی خلوص بتائین از ۱۹ به ۸۹ درصد رسید که در این رزین می توان با یک بار جریان به جای چند بار جریان به خلوص رسید (۲۳).

1- Strong Acid Cation Exchange Resin, Na +/ K + SAC

2- Weak Acid Cation Exchange Resin, H + WAC



شکل ۲- خروج نمک (کلرید پتاسیم)، ساکارز، و بتائین برحسب درصد مواد جامد محلول (بریکس) از ستون با رژیم تجاری ۱ در درجه حرارت‌های ۲۵، ۵۵ و ۷۵ درجه سانتی گراد



شکل ۳- مقایسه سه رزین از نظر میزان خروج بتایین برحسب درصد مواد جامد محلول (بریکس) در درجه حرارت های مختلف ۲۵، ۵۵ و ۷۵ درجه سانتی گراد

۳-۲- اندازه گیری خلوص بتاین استخراج شده

میزان غلظت بتاین استخراج شده و درصد خلوص آن برای سه تکرار آزمایش به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۶۵ نانومتر مطابق جدول ۳ بود. با توجه به این که محلول اصلی مورد

آزمایش با غلظت ۱۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر تهیه شده بود لذا خلوص بتاین با تقسیم مقدار غلظت بر اساس رقت بر مقدار غلظت اولیه بدست آمد.

جدول ۳- غلظت بتاین استخراج شده از ملاس (میکروگرم در میلی لیتر) و درصد خلوص در سه بار تکرار آزمایش

تکرار	غلظت بر اساس رقت (میکرو گرم در میلی لیتر)	درصد خلوص
۱	۵۴۱	۵۴
۲	۶۳۹	۶۴
۳	۷۸۵	۷۹

بر اساس این جدول میانگین خلوص بتاین معادل ۶۵/۶۶ درصد به دست آمد. لازم به ذکر است که اعداد به دست آمده بر اساس منحنی استاندارد حاصل از بتاین آزمایشگاهی بدست آمده است. بتاین ۵/۵-۴/۵ درصد ملاس را تشکیل می دهد اما در قسمت جداسازی می توان به خلوص ۸۰-۲۵ درصد رسید. عبور بیشتر مواد از ستون می تواند به خلوص بیشتر کمک کند. که البته این شیوه نظر به ضرورت بدست آوردن حالت ثابت بسیار زمان بر بوده و نیاز به آنالیز مقدار زیادی نمونه دارد (۸).

به علت این که یک ماده صد در صد طبیعی است و استخراج آن به مواد شیمیایی زیادی نیاز ندارد بسیار در سلامت انسان موثر می باشد. از طرفی با توجه به این که سطح زیر کشت چغندر قند در کشور حدود ۱۰۰ هزار، با صنعتی شدن این پروژه بیش از ۱۳۰۰۰ تن بتاین تولید خواهد شد که در ارزآوری برای کشور بسیار موثر خواهد بود. بتاین موجود در ملاس ریشه چغندر قند قبل یا بعد از این که ملاس وارد کارخانه الکل گیری شود قابل استحصال بوده و لذا استخراج بتاین از ملاس می تواند به عنوان یک فرآیند جانبی در کارخانه های قند و الکل گیری مورد توجه قرار گیرد و در افزایش اشتغال موثر باشد. برای این منظور روش استخراج کروماتوگرافی تعویض یونی ستونی جهت جداسازی بتاین از ملاس انتخاب شد. ستون های مورد نیاز طراحی و ساخته شد. این روش قابل تعمیم به Simulated moving bed بوده که به راحتی در کارخانجات قند قابل صنعتی شدن و استفاده است. در این راستا بهترین شرایط برای جداسازی بتاین از ملاس شامل نوع رزین و درجه حرارت مناسب تعیین گردید به طوری که رزین تجاری یک بهتر از رزین آزمایشگاهی در تفکیک بتاین از ستون کروماتوگرافی موثر بود و همچنین بهترین دما برای تفکیک درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی گراد بود. در رزین

۴- نتیجه گیری

چغندر قند گیاهی چند منظوره بوده و علاوه بر تاثیر به سزایی که در تولید قند کشور و خود کفایی در این محصول دارد، ملاس آن در صنایع الکل سازی مورد استفاده قرار می گیرد. این گیاه به علت داشتن بتاین از نظر مصارف دارویی از جمله داروهای ضد سرطان نیز مورد توجه است. بتاین موجود در برگ و ریشه چغندر از سایر گیاهان زراعی بیشتر بوده و در شرایط تنش های محیطی افزایش می یابد. از طرفی بتاین موجود در ملاس چغندر قند به علت داشتن خواص بسیار زیاد به عنوان ماده کمکی به غذای طیور و ماهی پرورشی اضافه می شود و سالانه حدود ۳۰۰-۵۰ تن از این ماده وارد کشور می شود. بتاین

https://www.irica.ir/file_manager/1396015/1396015.htm

۲. انجمن صنفی کارخانجات قند و شکر ایران، ۱۳۹۹.

صورت عملکرد بهره برداری کارخانه های قند چغندری و نیشکری کشور در سال ۱۳۹۹.

<http://www.isfs.ir/amalkard/HTML/1399.pdf>

۳. نعمتی، الف، ۱۳۸۰. اثرات جایگزینی کولین بوسیله

بتائین بر روی عملکرد و کیفیت لاشه در جوجه های

گوشتی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه ایلام.

ایران.

4. Abdollahian Noghbi, M., 1999. Ecophysiology of sugar beet cultivars and weed species subjected to water deficiency stress. PhD Thesis. The University of Reading. England.

5. Abdollahian Noghbi, M. and Sadeghian Motahar, S. Y., 2002. Changes in the concentration of glycinbetaine, glutamin and sugars in sugar beet subjected to soil moisture deficit. *Proceeding of the 65th IIRB congress. Belgium*.

6. Asadi, M., 2007. *Beet sugar hand book*. Wiley and son Inc. 884 pages.

7. Brown, R. J., Nees, R. A. and Arthur, N., 1952. Recovery of nitrogenous and other compounds. U.S. Patent No. 2586295.

8. Bubnik, Z., Pour, V., Gruberova, A., Starhova, H., Hinkova, A. and Kadlec, P., 2004. Application of continuous chromatographic separation in sugar processing. *Journal of Food Engineering*, 61, pp.509-513.

9. Cha-um, S., Kirdmanee, Ch. and Supaibulwatana, K., 2004. Biochemical and physiological responses of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa* L. ssp indica cv. KDML105) to salt stress. *Science Asia*, 30, pp. 247-253.

10. Craig, S. A. S., 2014. Betaine in human nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, pp. 539-549.

11. Clarke, S. J. and Rouge, B., 1995. Softening and purification of molasses

تجاری اودرجه حرارت ۷۵ درجه سانتی گراد راندمان استحصال حدود ۵۰ درصد بود که بسیار بهتر از رزین تجاری ۲ و دماهای دیگر بود. با وجودی که راندمان استحصال بتائین در رزین آزمایشگاهی بهتر از رزین تجاری ۱ بود اما مقدار کم بتائین استحصال شده، و روند کند خروج بتائین از آن و نیز قیمت گزاف این رزین در بازار، نشان می دهد که این رزین نمی تواند راهکار مناسبی برای استفاده اقتصادی در کارخانجات باشد. از طرفی با خروج نمک های مخلف از ستون مشخص گردید که ابتدا ناخالصی ها و نمک های ملاس سپس ساکارز و در نهایت بتائین از ستون کروماتوگرافی خارج می شود. این امر نشان می دهد ساکارز خارج شده قبل از بتائین می تواند در کارخانجات تولید اسید سیتریک که در داخل کشور وجود دارند مورد استفاده قرار گیرد لذا استخراج بتائین از ملاس تاثیر سوئی بر استخراج این ماده نخواهد داشت. میانگین درصد خلوص بتائین به دست آمده ۶۵/۶۶ درصد بود. این درصد خلوص برای مصارف طیور و آبزیان مناسب بوده و برای خلوص بیشتر می توان تعداد دفعات عبور ملاس از ستون را افزایش داد. نظر به اجرای این پروژه در فاز آزمایشگاهی و پایلوت نیمه صنعتی، پایلوت صنعتی آن در کارخانه ای در شمال غرب کشور آغاز شده است.

۵- سپاسگزاری

فاز آزمایشگاهی و نیمه صنعتی این پروژه با حمایت ستاد گیاهان دارویی و طب سنتی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری و در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند طراحی و اجرا گردید که به این ترتیب از همکاران محترم مراکز فوق الذکر تشکر و قدردانی می شود.

۶- منابع

۱. آمار گمرک جمهوری اسلامی ایران، ۱۳۹۷. آمار

واردات به تفکیک ماه، کشور طرف معامله، گمرک

و کد تعرفه، طی سال ۱۳۹۷

- E., 2002. Use of a weakly acid cation exchange resin for chromatographic separation of carbohydrates. WO/2002/027038.
19. Lechner, J. F. and Stoner, G. D., 2019. Red beetroots and betalines as cancer chemoprotective agents. *Molecules*, 24, pp.1-12,1602
doi:10.3390/molecules24081602.
 20. Mahn, K., Hoffmann, C. and Marlander, B., 2002. Distribution of quality components in different morphological sections of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy*, 17, pp. 29–39.
 21. Moghaieb, R. E. A., Saneoka, H. and Fujita, K., 2004. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritime*. *Plant Science*, 166, pp. 1345-1349.
 22. Niazi, B. H., Athar, M. and Rozema, J., 2004. Salt tolerance in the fodder beet and sea beet: Analysis of Biochemical relations. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30 (1-2), pp.78-88.
 23. Saari, P., 2011. Industrial scale chromatographic separation of valuable compounds from biomass hydrolysates and side streams. *PhD thesis*. School of chemical Technology, Aalto university. Finland.
 24. Shaw, B., Thomas, T. H. and Cooke, D. T., 2002. Response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to drought and nutrient deficiency stress. *Plant Growth Regulation*, 37, pp. 77-83.
 25. Van, L. J., and Wach, W., 2011. Process for the recovery of betaine from molasses. WO2011141175 A1.
 26. Watkins, R. and Bacon, C., 2016. Soap from sugar beet. *British Sugar Beet Review*, 84(1), pp. 25-27.
 - or syrup. United States Patent No.5,454,875
 12. Gorham, J., 1995. Betaines in higher plants – biosynthesis and role in stress metabolism. In: (ed. Walsgrove, R. M.) *Amino acids and their derivatives in higher plants*. P:173-203. Cambridge University Press, Cambridge.
 13. Grieve, C. M. and Grattan, S. R., 1983. Rapid assay for determination of water-soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, 70, pp.303-307.
 14. Heikkila, O. H., Jaakko, A. M. and DED. Millner, JJ. Virtanen., 1981. Betaine recovery process. Us patent 4359430 A.
 15. Jaleel, C. A., Manivannan, P., Lakshmanan, G. M. A., Sridharan, R. and Panneerselvam, R., 2007. NaCl as a physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. *Comptes Rendus Biologies*, 330, pp.806-813.
 16. Kapadia, G. J., Azuine, M.A., Rao, G.S., Aria, T., Lida, A. and Tokuda, H., 2011. Cytotoxic effect of the red beet root (*Beta vulgaris* L.) extract compared to doxorubicin (Adriamycin) in the human prostate (PC-3) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(3), pp.280-284.
 17. Kapadia, G.J., Rao, G.S., Ramachandran, C., Iida, A., Suzuki, N. and Tokuda, H., 2013. Synergistic cytotoxicity of red beet root (*Beta vulgaris* L.) extract with doxorubicin in human pancreatic, breast and prostate cancer cell lines. *Journal of complementary and Integrative Medicine*, 10(1), pp. 113-122.
 18. Karki, A., Heikkilä, H., Jumppanen, J., Tiihonen, J., Tervala, T., Mäyrä, N., Ravanko, V., Paananen, H. and Paatero,

(Original Research Paper)
Optimizing Betaine Extraction from Sugar Beet Molasses by Ion Exchange Chromatography Method

Samar Khayamim.^{1*}, Babak Babae², Hamid Noshad ², Dariush Taleghani ²

1- Assistant professor of Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

2- Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Received:17/02/2022

Accepted:27/04/2022

Abstract

Sugar beet is important for amino acids like glycine betaine beside sugar because it has medicinal effects in poultry, fish and also in human as it is used for anti-cancer drugs. This design was conducted in order to optimize betaine extraction from sugar beet molasses in ion exchange chromatography method. Firstly, an experiment was conducted in factorial based on completely randomized design with three replications for optimizing suitable extraction condition of different injected materials to chromatography column. The first factor was injected materials including potassium chloride, pure sucrose and betaine, the second factor was related to column temperature including 25, 50 and 75°C and the third factor was different resins including experimental, commercial 1 and 2 resins. The extracted volumes of these injected materials were significantly different. The best temperature for betaine extraction was 75°C. the best resin for betaine extraction was commercial resin 1 in which betaine was extracted with more quantity and efficiency and faster in comparison with other resins. Secondly betaine of sugar beet molasses was extracted based on optimum condition at first step. The purity of extracted betaine was 54, 64 and 79% with mean of 65.66. This experiment was conducted in experimental level which would be useful for performing at industrial level in different sugar factories of the country to extract betaine from sugar beet molasses

KeyWords: Chromatography, Glycine Betaine Extraction, Molasses, Resin, Temperature.

*Corresponding Author: samar.khayam@gmail.com

(مقاله پژوهشی)

تولید پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی با استفاده از آنزیم آلکالاز: بررسی تاثیر زمان هیدرولیز و غلظت پروتئین هیدرولیز شده بر قابلیت آنتی اکسیدانی آن

آیسان ایزانلو^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، هدی شهری طبرستانی^۳، شیما کاوه^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۹

DOI: [10.30495/jfst.2022.1956962.1791](https://doi.org/10.30495/jfst.2022.1956962.1791)

چکیده

به دلیل نگرانی‌هایی که در مورد ایمنی و سلامت آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHT و BHA وجود دارد کاربرد ترکیبات طبیعی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی، نظیر پپتیدهای زیست‌فعال مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. هدف این پژوهش تعیین زمان مناسب هیدرولیز پروتئین پودر قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) با آنزیم آلکالاز به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی بالا بود. جهت انجام این پژوهش ابتدا قارچ خوراکی به پودر تبدیل گردید و سپس عمل هیدرولیز در طی زمان‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ دقیقه با نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و تیمار مناسب براساس اندازه‌گیری قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه تولیدی تعیین گردید. نتایج نشان داد که زمان ۲۰۰ دقیقه جهت رسیدن به حداکثر خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسب می‌باشد. در مرحله بعد تاثیر غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده در شرایط بهینه (۱۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر روی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی در مقایسه با اسید آسکوربیک (با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی آزمون‌های مورد بررسی محصول تولیدی رفتاری وابسته به غلظت از خود نشان داد و با افزایش غلظت میزان مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن و قدرت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافت و در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نتایج قابلیت آنتی‌اکسیدانی مشابه با اسید آسکوربیک (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده تولیدی پتانسیل مناسبی جهت استفاده به‌عنوان یک افزودنی فراسودمند و به‌عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در فرمولاسیون‌های غذایی دارد.

واژه‌های کلیدی: زمان هیدرولیز، هیدرولیز آنزیمی، قارچ خوراکی، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، پروتئین هیدرولیز شده.

۱-مقدمه

اکسیداسیون لیپیدها منجر به تجزیه اسیدهای چرب و تغییر در بافت، طعم و ظاهر مواد غذایی و در نتیجه کاهش کیفیت آن‌ها می‌گردد. هم‌چنین مشخص شده است که تنش‌های اکسیداتیو نقش مهمی در بروز برخی از بیماری‌های وابسته به سن ایفا می‌کنند. عواملی که در این بیماری‌ها نقش دارند پراکسیدهای لیپیدی و ترکیباتی با وزن مولکولی کم می‌باشند که در مرحله نهایی واکنش‌های اکسیداسیون تولید می‌گردند. بنابراین برای جلوگیری از اثرات منفی این واکنش در مواد غذایی و حفاظت از بدن در برابر این بیماری‌ها، جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و تشکیل رادیکال‌های آزاد فرآیندی حائز اهمیت می‌باشد (۲۷). در صنعت غذا از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHA و BHT جهت جلوگیری از اکسیداسیون استفاده می‌شود و با وجود این که این آنتی‌اکسیدان‌ها در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قدرت بیشتری دارند اما از نظر ایمنی و سلامتی آن‌ها نگرانی‌هایی وجود دارد، این امر منجر به افزایش توجه محققین به شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای استفاده در مواد غذایی و دارویی شده است (۲۱). استرس اکسایشی^۱، از عوامل اصلی افت کیفیت و فساد مواد غذایی می‌باشد. علاوه بر این، مصرف رادیکال‌های آزاد و هیدروپراکسیدهای حاصل از این واکنش با خطر ابتلا به بیماری‌هایی نظیر سرطان، اختلالات عصبی و پیشرفت فرآیند پیری همراه می‌باشد. در همین راستا، کاربرد ترکیبات طبیعی با ویژگی آنتی‌اکسیدان، نظیر پیتیدهای زیست فعال مورد توجه بسیاری از محققین می‌باشد (۲). مکانیسم دقیق آنتی‌اکسیدانی پیتیدها، هنوز به درستی شناخته شده نیست؛ هرچند که محققین، توانایی مهار رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن، شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی و اهدای پروتون را از جمله عوامل شرکت‌کننده در این مکانیسم می‌دانند. با این حال، اثرگذاری هریکه از فاکتورهای فوق‌الذکر در مهار اکسایش مواد غذایی به تنهایی کافی نیست و بروز چنین عملکردی در گرو مشارکت عوامل زنجیره‌ای دخیل در آن می‌باشد. به‌طور کلی ویژگی آنتی‌اکسیدانی پیتیدها با ویژگی ساختاری، آبگریزی و ترکیب اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده زنجیره پیتیدی در ارتباط

می‌باشد. پیتیدهای آنتی‌اکسیدان، توالی‌های کوتاه زنجیر حاوی ۱۰-۱۲ اسید آمینه می‌باشند که حضور اسیدهای آمینه خاص نظیر، تیروزین، تریپتوفان، متیونین، سیستئین و هیستیدین در زنجیره پیتیدی موجب اثربخشی هرچه بیشتر ویژگی آنتی‌اکسیدانی، به‌ویژه توانایی مهار رادیکال‌های آزاد در آن‌ها می‌گردد. اویسی پور و همکاران (۲۰۰۹)، بلانسا و همکاران (۲۰۰۷) و گومارز و همکاران (۲۰۱۷) به ترتیب خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از ضایعات ماهی قزل‌آلا، شیر و بذر کتان را به اثبات رساندند (۱۲، ۸، ۲۵). منابع گیاهی و حیوانی متعددی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده مناسب هستند، منابع گیاهی به دلیل قیمت مناسب‌تر و آلرژی‌زایی کمتر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲۲). بوگاتف و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی ساردین با استفاده از آنزیم‌های پروتئازی، به این نتیجه دست یافتند که با افزایش درجه هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده نیز افزایش می‌یابد و پیتیدهای با وزن مولکولی پایین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز هستند (۷). زائو و همکاران (۲۰۱۲) و آماپا پاراتی و همکاران (۲۰۱۴)، به ترتیب با هیدرولیز پروتئین برنج و صدف خوراکی گزارش کردند که با افزایش غلظت پیتیدهای حاصل قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH افزایش می‌یابد (۳۵، ۳۰). باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) با هیدرولیز پروتئین ضایعات نوعی ماهی^۲، گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد، آن‌ها علت این امر را افزایش پیتیدهای دهنده‌ی هیدروژن که قابلیت واکنش با رادیکال‌های آزاد را دارند، بیان کردند (۶). یو و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که فرآیند هیدرولیز آنزیمی به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین ماهی *Misgurnus anguillicaudatus* شده است و با افزایش درجه هیدرولیز قابلیت مهار رادیکال هیدروکسیل به ۵۶ درصد رسید (۳۴). پدرام‌نیا و همکاران (۲۰۱۷) با هیدرولیز پروتئین دانه هندوانه با آنزیم پپسین نشان دادند که با افزایش غلظت آنزیم و زمان آنزیم‌زنی قدرت شلاته‌کنندگی ابتدا افزایش

(*Agaricus bisporus*) از بازار محلی شهرگران تهیه شدند.

۲-۲-آماده سازی قارچ خوراکی

قارچ‌های خریداری شده ابتدا شسته و قطعه قطعه شده سپس توسط آب داغ آنزیم‌بری (فرو بردن در آب جوش به مدت ۳ دقیقه و سپس فرو بردن در آب یخ) شدند. سپس در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون تا زمانی که رطوبت آن‌ها به زیر ۱۰ درصد برسد، خشک شدند. در نهایت قارچ‌های خشک شده به کمک آسیاب آزمایشگاهی تبدیل به پودر شده و پس از عبور از الک با مش ۸۰ در کیسه‌های پلی‌پروپیلنی بسته بندی و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شدند (۱۳).

۲-۳-اندازه گیری ترکیبات شیمیایی

۲-۳-۱-اندازه گیری میزان پروتئین

میزان پروتئین نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده) با استفاده از روش کج‌دال اندازه گیری شد. به این صورت که ۱ گرم از نمونه به درون لوله هضم کج‌دال افزوده شد و به آن ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و یک قرص کاتالیزور کج‌دال افزوده شد. از یک لوله هضم بدون نمونه و حاوی اسید و کاتالیزور به عنوان شاهد استفاده شد. عمل هضم به مدت ۱۲۰ دقیقه و با توان ۸۰ دستگاه تا شفاف شدن محتوی دستگاه انجام شد. پس از سرد شدن و خروج بخارات اسیدی مرحله‌ی تقطیر با استفاده از سود ۴۰ درصد و اسید بوریک ۴ درصد با استفاده از دستگاه تقطیر انجام گرفت. در نهایت تیتراسیون نمونه با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در حضور معرف متیل رد و تا ارغوانی شدن نمونه صورت گرفت. درصد ازت نمونه با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد (۵).

معادله (۱):

$$\text{درصد ازت نمونه} = \frac{14 \times N \times (V_1 - V_2)}{m} \times 100$$

در رابطه فوق N نرمالیت اسید کلریدریک، V_1 حجم اسید مصرفی برای نمونه، V_2 حجم مصرفی برای شاهد و m وزن نمونه بر حسب گرم می‌باشد. به منظور محاسبه درصد پروتئین میزان ازت در فاکتور پروتئین (۶/۲۵) ضرب و میزان آن محاسبه گردید.

یافته و در ادامه کاهش می‌یابد (۱). چی و همکاران (۲۰۱۵) و ژو و همکاران (۲۰۰۸) به ترتیب با هیدرولیز آنزیمی پروتئین جاندار دریایی *Tegillarca granosa* و گیاه یونجه، فعالیت مهاررادیکال هیدروکسیل پپتیدهای حاصل را وابسته به غلظت گزارش کردند (۹، ۳۲). قارچ به عنوان یکی از قدیمی‌ترین مواد غذایی با ارزش غذایی در نظر گرفته می‌شود، و ارزش غذایی آن قابل مقایسه با ماهی و گوشت، می‌باشد (۱۶). قارچ منبع مناسبی از اسیدهای آمینه ضروری متعدد، پروتئین‌ها، ویتامینها، مواد معدنی و غیره است به همین دلیل مصرف آن رو به افزایش است. از نظر ارزش غذایی کلاهک قارچ به طور متوسط دارای رطوبت 90.76 ± 0.34 ، پروتئین 33.65 ± 0.15 ، چربی 0.20 ± 0.48 ، کربوهیدرات 20.59 ± 0.27 ، فیبر 33.11 ± 0.11 ، خاکستر 10.17 ± 0.20 درصد بر مبنای وزن خشک و ارزش غذایی ساقه قارچ به طور متوسط شامل رطوبت 90.01 ± 0.27 ، پروتئین 19.01 ± 0.24 ، چربی 2.0 ± 0.42 ، کربوهیدرات 31.41 ± 0.18 ، فیبر 38.08 ± 0.18 ، خاکستر 9.5 ± 0.22 درصد بر مبنای وزن خشک می‌باشد. با توجه به ویژگی‌های مذکور، قارچ می‌تواند به عنوان منبع مناسبی از مواد مغذی و ترکیبات سلامتی زادر صنایع غذایی گوناگون کاربرد داشته باشد (۲۴). یکی از اجزای تغذیه‌ای مهم قارچ پروتئین است، و بنابراین منبع خوبی جهت تولید پپتیدهای زیست‌فعال می‌باشد (۱۹). هدف از این پژوهش تعیین زمان بهینه هیدرولیز پروتئین قارچ خوراکی با آنزیم‌های آلکالاز جهت حصول به حداکثر قابلیت آنتی‌اکسیدانی و سپس مقایسه قابلیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات تولید شده در غلظت‌های مختلف با اسید آسکوربیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان پر کاربرد در صنعت می‌باشد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

آلکالاز، DPPH، پتاسیم فری سیانید، فریک کلراید، تری کلرواستیک اسید، آسکوربیک اسید از شرکت سیگما، اتانول ۹۶٪، سود، اسید کلریدریک، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، اسید فسفریک از شرکت مرک و قارچ خوراکی دکمه‌ای

۲-۳-۲- اندازه گیری میزان رطوبت

۲ گرم نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده) در ظروف فلزی آلومینیومی مخصوص اندازه گیری رطوبت توزین شد و تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن در دیسکاتور و توزین مجدد میزان رطوبت از طریق معادله (۲) محاسبه گردید (۵).

معادله (۲)

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{(W_1 - W_2)}{m} \times 100$$

در رابطه فوق W_1 وزن ظرف و نمونه قبل خشک کردن و W_2 وزن ظرف و نمونه بعد از خشک کردن m وزن نمونه می باشد.

۲-۳-۳- اندازه گیری میزان خاکستر

۲ گرم نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده) در بوته چینی با وزن مشخص توزین گردید و پس از سوزاندن اولیه روی هیتر، بوته حاوی نمونه به کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد منتقل شد. عمل حرارت دهی در کوره تا زمانی که رنگ خاکستر روشن شود ادامه یافت. پس از سرد کردن بوته در دیسکاتور و توزین مجدد، مقدار خاکستر نمونه از طریق معادله (۳) محاسبه گردید (۵).

معادله (۳)

$$\text{درصد خاکستر} = \frac{(W_1 - W_2)}{m} \times 100$$

در رابطه فوق W_1 وزن بوته و خاکستر و W_2 وزن بوته m وزن نمونه می باشد.

۲-۳-۴- اندازه گیری میزان چربی

برای اندازه گیری چربی ۳ گرم نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده) روی کاغذ صافی توزین شد و پس از بستن کاغذ صافی در قسمت استخراج کننده دستگاه سوکسله قرار داده شد. پس از متصل کردن بالن با وزن مشخص، بالن با حلال هگزان پر و عمل استخراج به مدت ۴ ساعت انجام شد. در مرحله بعد، پس از قرار دادن بالن ها در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، جهت خارج کردن حلال باقیمانده، بالن مجدداً توزین شد. درصد چربی با استفاده از طریق معادله (۴) محاسبه گردید (۵).

معادله (۴)

$$\text{درصد چربی} = \frac{(W_1 - W_2)}{m} \times 100$$

در رابطه فوق W_1 وزن ثانویه بالن، W_2 وزن اولیه بالن و m وزن نمونه می باشد.

۲-۴-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده

جهت انجام هیدرولیز با آلکالاز از روش هی و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییرات استفاده شد (۱۳). ۵۰ گرم پودر قارچ رادربالن حجمی توزین و در ۱۰۰۰ میلی لیتر بافر فسفات (pH=۸) مخلوط گردید. سپس به منظور بهینه سازی تولید پروتئین های هیدرولیز شده با حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی، عمل هیدرولیز در طی زمان های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ دقیقه با نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ (بر مبنای پژوهش های قبلی) و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت. پس از اتمام زمان هیدرولیز به منظور غیرفعال کردن آنزیم، محلول پروتئینی تلقیح شده با آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب قرار داده شد. هر تیمار به طور جداگانه در سانتریفیوژی یخچالدار با ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و سوپرناتانت حاصل با خشک کن انجمادی برای به دست آوردن پودر پروتئین هیدرولیز شده خشک شد. پودر حاصل تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱). سپس در مرحله بعد قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده در زمانهای مختلف توسط روش های فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل اندازه گیری گردید.

۲-۴-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

ابتدا پودر های هیدرولیز شده در آب مقطر (۴۰ mg/ml) حل شدند. سپس، ۱/۵ ml از هر نمونه با ۱/۵ ml از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵ mM) مخلوط و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ nm خوانده

هیدرولیز شده بهینه مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله بعد تاثیر غلظت های مختلف (۱۰ تا ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) بر روی خصوصیات آنتی اکسیدانی محصول تولیدی و مقایسه آن با اسید آسکوربیک (با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۵-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

برای تعیین تاثیر غلظت پروتئین هیدرولیز شده (۵۰ mg/ml - ۱۰) بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH از روش چی و همکاران (۲۰۱۵) که در بخش ۲-۱-۴ شرح داده شد استفاده گردید (۹).

۲-۵-۲- تعیین قدرت احیاء کنندگی یون آهن

برای تعیین تاثیر غلظت پروتئین هیدرولیز شده (۵۰ mg/ml - ۱۰) بر قدرت احیاء کنندگی یون آهن از روش احمدی و همکاران (۲۰۰۷) که در بخش ۲-۴-۲ شرح داده شد استفاده گردید (۳).

۲-۵-۳- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

برای تعیین تاثیر غلظت پروتئین هیدرولیز شده (۵۰ mg/ml - ۱۰) قدرت احیاء کنندگی یون آهن از روش پری تو و همکاران (۱۹۹۹) که در بخش ۲-۴-۳ شرح داده شد استفاده گردید (۲۶).

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش اثر زمان های مختلف هیدرولیز (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ دقیقه) بر ویژگی های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی و همچنین تاثیر غلظت های مختلف تیمار بهینه (غلظت ۵۰-۱۰ mg/ml) بر ویژگی های آنتی اکسیدانی با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه آزمون ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چنددامنه ای دانکن جهت بررسی معنی دار بودن متغیر در $P < 0.05$ و رسم نمودارها نیز با نرم افزار Excel 2013 انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ترکیب شیمیایی

ترکیبات شیمیایی پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده حاصل از آن در جدول ۱ آورده شده است. همان طور که در جدول

شد (۹). درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله ۵ محاسبه گردید:

معادله (۵)

$$(\%) = \left[\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right] \times 100$$

۲-۴-۲- قدرت احیاء کنندگی آهن

ابتدا پودر های هیدرولیز شده در آب مقطر (۴۰ mg/ml) حل شد. سپس ۱ میلی لیتر از هر نمونه با ۲/۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر از فری سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط گردید، و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن، ۰/۵ میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه ساتریفوز شد. سپس ۱ میلی لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی لیتر فریک کلراید ۰/۱ درصد (حجمی/وزنی) مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، خوانده شده و میزان جذب به عنوان قدرت احیاء کنندگی آهن گزارش گردید. حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاء کنندگی است (۳).

۲-۴-۳- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

ابتدا ۰/۱ ml از نمونه حل شده در آب مقطر (۴۰ mg/ml) با ۱ ml از معرف (اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی مولار) در لوله ایندورف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد و نتایج جذب به عنوان قدرت آنتی اکسیدانی کل گزارش گردید. از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بیشتر است (۲۶).

۲-۵-۲- بررسی تاثیر غلظت بر خصوصیات آنتی اکسیدانی

تیمار بهینه هیدرولیز شده

پس از تعیین زمان بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با حداکثر قابلیت آنتی اکسیدانی، شرایط مذکور جهت تولید

چربی را به ترتیب $2/48 \pm 0/20$ و $2/00 \pm 0/24$ گزارش نمودند (۲۴). علت تفاوت ترکیبات شیمیایی نمونه به کار گرفته شده ی این پژوهش با پژوهش های قبل را می توان به دلیل اختلاف در نوع واریته و نوع فرآیند خشک کردن نسبت داد. بعد از فرآیند هیدرولیز، میزان پروتئین در محصول هیدرولیز شده حاصل برابر با $31/94$ درصد بود. دلیل افزایش میزان پروتئین در محصول تولیدی فرآیند هضم آنزیمی و به دنبال آن سانتریفوژ محصول تولیدی بود که موجب حذف یکسری ترکیبات موجود در قارچ از جمله چربی و همچنین ترکیبات معدنی متصل به ساختار می گردد.

زیر مشاهده می گردد، میزان رطوبت پودر قارچ برابر با $0/52$ $6/2 \pm$ درصد بود. مقدار رطوبت قارچ خوراکی در حدود 90 درصد بود که در طی فرآیند خشک کردن به این میزان کاهش داده شد. میزان چربی و خاکستر پودر قارچ بر اساس وزن خشک، به ترتیب $(3/8 \pm 0/15)$ و $(7/66 \pm 0/17)$ بود؛ که به ترتیب کمتر و بیشتر از مقادیر گزارش شده در منابع می باشد (۲۴). میزان پروتئین پودر قارچ برابر با $26/6 \pm 1$ درصد اندازه گیری شد. اوپوه (۲۰۰۹) میزان پروتئین موجود در کلاهک و ساقه قارچ را به ترتیب $33/65 \pm 0/15$ و $19/01 \pm 0/24$ ، میزان خاکستر را به ترتیب $10/17 \pm 0/20$ و $9/5 \pm 0/22$ ، و میزان

جدول ۱- ترکیب شیمیایی پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده قارچ (بر حسب درصد)

ترکیب	پودر قارچ	پروتئین هیدرولیز شده قارچ
پروتئین ($N \times 6/25$)	$26/6 \pm 0/17$	$31/94 \pm 1/41$
چربی	$3/8 \pm 0/15$	-
رطوبت	$6/02 \pm 0/52$	$8/79 \pm 0/17$
خاکستر	$7/66 \pm 0/12$	$4/26 \pm 0/23$
کربوهیدرات (اختلاف از سایر ترکیبات)	$55/92 \pm 0/15$	$55/01 \pm 0/7$

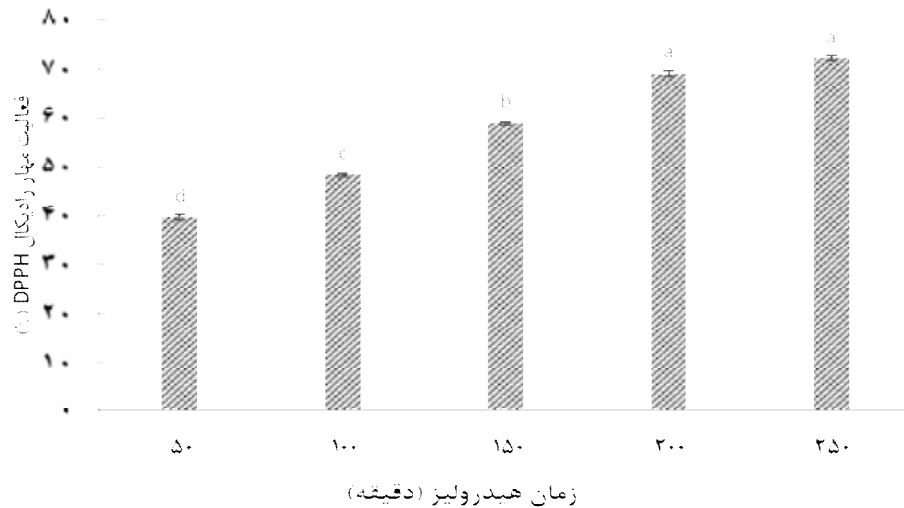
* اعداد بر مبنای وزن خشک گزارش شدند.

* میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار

آن رابه ترکیبات پایدار تبدیل کنند و به واکنش های زنجیره ای رادیکالی خاتمه دهند. قدرت آنتی اکسیدانی به نوع پروتئاز به کار رفته، شرایط هیدرولیز، توالی و ترکیب آمینواسیدی پپتیدهای حاصل بستگی دارد. گزارش شده است که تری پپتیدهایی که دارای لیزین یا تریپتوفان در انتهای C هستند قدرت آنتی اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان می دهند (۲۸). جامدار و همکاران (۲۰۱۰)، یوو همکاران (۲۰۰۹) و لی چن همکاران (۲۰۰۷)، نیز به ترتیب با هیدرولیز پروتئین های سویا، ماهی تیان و کلاژن خوکی، رابطه ی مستقیمی را بین قدرت مهار رادیکال DPPH و درجه هیدرولیز گزارش کردند که موافق با نتایج این تحقیق بود (۱۵،۲۰،۳۴).

۳-۲- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

DPPH، رادیکال آزاد محلول در چربی است که دارای ماکزیم جذب در 517 نانومتر است و پس از دریافت هیدروژن از یک ترکیب آنتی اکسیدان به ترکیبی پایدار تبدیل می شود و جذب آن کاهش می یابد (۳۴،۳۵). نتایج حاصل از ارزیابی زمان هیدرولیز نشان می دهد که با افزایش زمان هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال DPPH، پروتئین های هیدرولیز شده به میزان قابل توجهی افزایش یافت ($P < 0/05$)، به طوری که در مورد نمونه های حاصل از آلکالاز در محدوده ی $39/7-72/21$ درصد بود. بنابراین افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به تولید پپتیدهای دهنده ی پروتون شده که می توانند با رادیکال DPPH، واکنش داده و

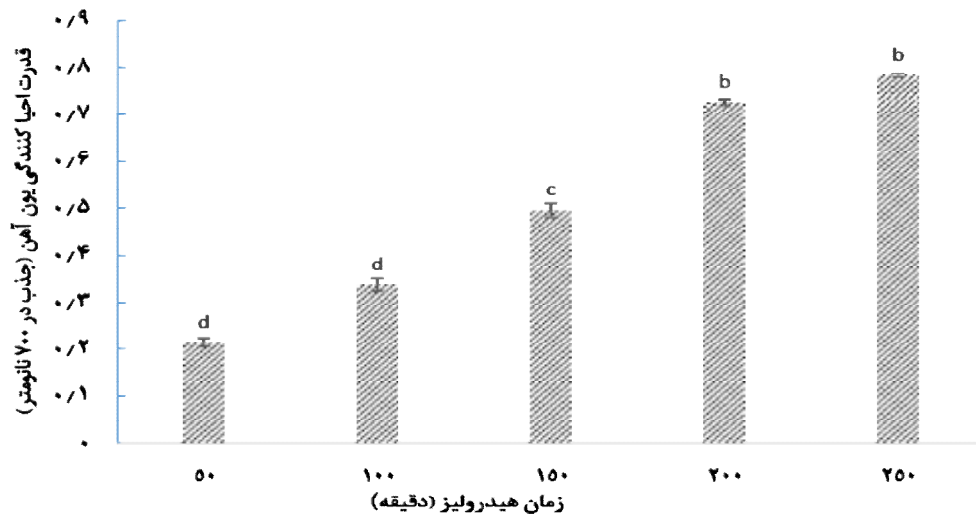


شکل ۱- تاثیر زمان هیدرولیز بر فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی

۳-۳- قدرت احیاءکنندگی یون آهن

ارزیابی قدرت احیاءکنندگی در جهت سنجش قابلیت الکترون‌دهندگی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به کار می‌رود. مطالعات مختلف نشان دادند که ارتباط مستقیمی بین قدرت احیاءکنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیست فعال وجود دارد (۳۳). همان‌طور که در شکل ۲، مشاهده می‌گردد، در تمامی نمونه‌های حاصل از هیدرولیز با آلکالاز با افزایش زمان هیدرولیز، قدرت احیاءکنندگی یون آهن افزایش یافت ($p < 0/05$). این یافته‌ها حاکی از تاثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم آلکالاز بر افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین اولیه می‌باشد. به‌طور کلی افزایش زمان با افزایش درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاءکنندگی می‌شود. این امر می‌تواند به دلایل مختلفی باشد از جمله این که، افزایش میزان هیدرولیز منجر به آزاد شدن آمینواسیدهای آزاد می‌گردد که به‌عنوان منبع اضافی از الکترون‌ها و پروتون‌ها عمل می‌کنند (۳۶). از طرف دیگر افزایش درجه هیدرولیز منجر به در دسترس قرار گرفتن بیشتر آمینواسیدهای الکترون دهنده مانند

لیزین، تریپتوفان و هیستیدین می‌گردد که در نتیجه قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد (۱۵). یو و همکاران (۲۰۰۹)، زو و همکاران (۲۰۰۸)، وو و همکاران (۲۰۰۳)، به ترتیب افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از ماهی تیان، زئین و ماهی ماکرل را گزارش کردند (۳۴،۳۶،۳۱). بررسی‌ها نشان داده است که با افزایش زمان و پیشرفت فرآیند هیدرولیز و شکسته شدن بیشتر زنجیره‌های پپتیدی، پپتیدهای با قابلیت دادن الکترون جهت احیای یون آهن سه‌ظرفیتی به یون آهن دو ظرفیتی افزایش می‌یابند (۱۷). افزایش زمان هیدرولیز می‌تواند منجر به افزایش رهایش پپتیدهای دهنده الکترون شود و در نتیجه قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد. این نتایج موافق با یافته‌های خانتافت و همکاران (۲۰۱۱) بود که با هیدرولیز پروتئین گوشت ماهی گزارش کردند که افزایش زمان هیدرولیز همراه با افزایش درجه‌ی هیدرولیز منجر به افزایش قدرت احیاءکنندگی پپتیدهای حاصل گردید (۱۸) که با نتایج سایر محققین در این زمینه هم‌خوانی دارد (۱۵، ۱۷، ۲۳).

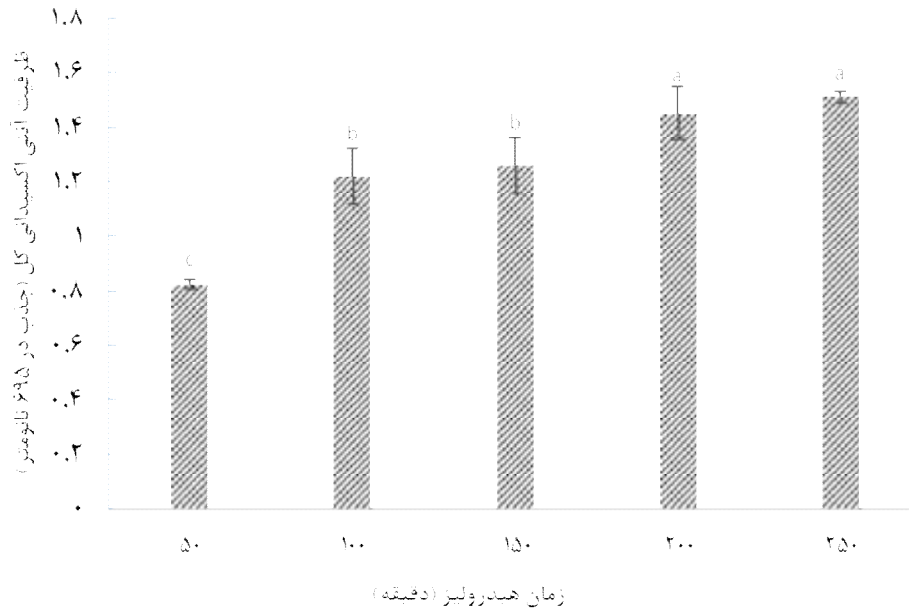


شکل ۲- تاثیر زمان هیدرولیز بر قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از قارچ خوراکی

۳-۴- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بر مبنای احیای مولیدین ۶ ظرفیتی به مولیدین ۵ ظرفیتی است و روشی کمی برای بررسی قدرت آنتی اکسیدانی ترکیبات محلول در آب و محلول در چربی (قدرت آنتی اکسیدانی کل) است که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیدین در محیط اسیدی همراه است (۲۶). در این پژوهش هیدرولیز به میزان قابل توجهی منجر به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی پروتئین قارچ خوراکی گردید، افزایش زمان هیدرولیز همراه با افزایش درجه هیدرولیز پروتئین منجر به افزایش قابل توجه قدرت آنتی اکسیدانی نمونه ها شد و با ادامه ی فرآیند هیدرولیز تا ۲۵۰ دقیقه قدرت آنتی اکسیدانی به طور معنی داری افزایش یافت هر چند تفاوت معنی داری با زمان ۲۰۰ دقیقه مشاهده نشد ($p < 0/05$). در واقع با افزایش زمان فعالیت آنزیم های آلکالاز، رها سازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهندگی افزایش یافته است. این پپتیدها توانسته اند رادیکال های آزاد را به ترکیباتی پایدار با واکنش پذیری کمتر

تبدیل کنند و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی کل نمونه ها با افزایش زمان افزایش یافته است (۴). افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با افزایش زمان هیدرولیز نشان می دهد که آنزیم آلکالاز با شکستن زنجیره ی پروتئینی توانسته پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهندگی تولید کند که منجر به تبدیل رادیکال های آزاد به ترکیباتی پایدارتر شده در نتیجه قدرت آنتی اکسیدانی کل افزایش یافته است (۴). تغییر در طول زنجیره های پپتیدی با گذشت زمان هیدرولیز نیز تأثیر به سزایی در قدرت ضد اکسایش دارد و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین دارای فعالیت ضد اکسایش قوی تری هستند (۴). افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده نشان از عملکرد مناسب آنزیم آلکالاز در تولید پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهندگی دارد و در نتیجه رادیکال های آزاد به ترکیباتی پایدارتر تبدیل شده اند و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل افزایش یافته است (۴).



شکل ۳- تاثیر زمان هیدرولیز بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده قارچ

است. نتایج بیانگر این است که پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی از نظر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH رفتاری وابسته به غلظت از خود نشان می‌دهد و با افزایش غلظت میزان مهار رادیکال آزاد DPPH آن افزایش یافت. بین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH هیدرولیز شده حاصل در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و از نظر قابلیت مهارکنندگی مشابه اسید آسکوربیک عمل نمودند. باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) و چی و همکاران (۲۰۱۵) به ترتیب با هیدرولیز پروتئین ماهی *Aphanopus carbo* و *Tegillarca granosa* فعالیت مهار رادیکال DPPH پپتیدهای حاصل را وابسته به غلظت گزارش کردند (۹،۶). ژائو و همکاران (۲۰۱۲) با هیدرولیز پروتئین برنج با آنزیم‌های آلکالاز، فلاورزیم، پروتامکس، نوترناز و تریسین مشاهده کردند که بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH مربوط به پپتیدهای حاصل از آنزیم پروتامکس است و پپتیدهای حاصل از تمامی آنزیم‌ها، رفتاری وابسته به غلظت از خود نشان می‌دهند و قدرت آنتی اکسیدانی آن‌ها در بیشترین غلظت از قدرت آنتی اکسیدانی ویتامین ث کمتر است. این محققان گزارش کردند که فعالیت آنتی اکسیدانی

۳-۵- تاثیر غلظت بر خصوصیات آنتی اکسیدانی تیمار

بهینه هیدرولیز شده

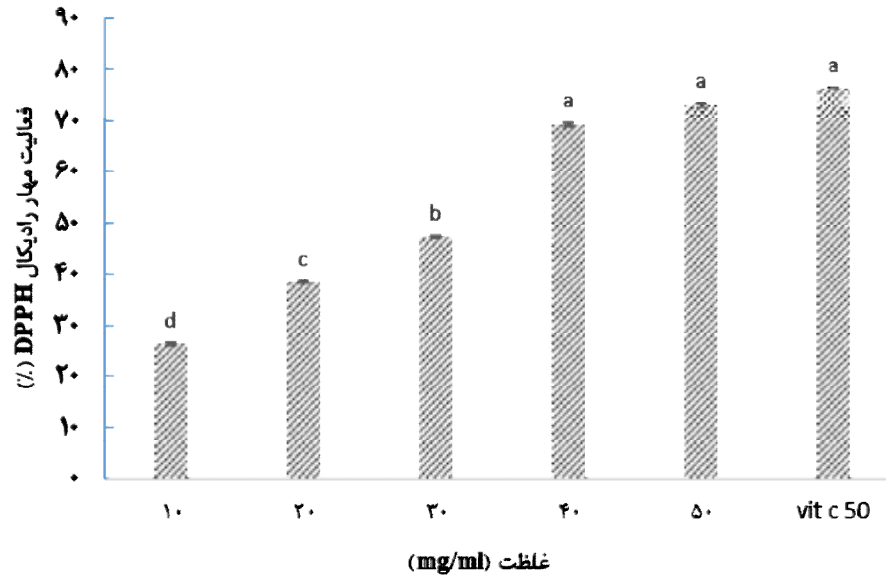
نتایج حاصل از بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده در طی زمان‌های مختلف در بخش قبل نشان داد که افزایش زمان هیدرولیز منجر به افزایش قابلیت آنتی اکسیدانی محصول تولیدی می‌گردد اما بین نمونه‌های هیدرولیز شده در زمان‌های ۲۰۰ و ۲۵۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p < 0.05$) در نتیجه زمان ۲۰۰ دقیقه جهت تولید تیمار بهینه مورد استفاده قرار گرفت. سپس در شرایط بهینه حاصل (زمان ۲۰۰ دقیقه، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲ درصد) هیدرولیز انجام شد و فعالیت آنتی اکسیدانی تیمار بهینه از نظر قدرت مهار رادیکال DPPH، احیاءکنندگی یون آهن و آنتی اکسیدانی کل، در غلظت‌های ۵۰-۱۰۰ (mg/ml) در مقایسه با اسید آسکوربیک (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) سنجیده شد.

۳-۵-۱- تاثیر غلظت بر میزان مهار رادیکال آزاد DPPH

تاثیر غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی (غلظت ۵۰-۱۰۰ mg/ml) بر روی میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در مقایسه با اسید آسکوربیک در شکل ۴ آورده شده

پروتئین صدف خوراکی گزارش کردند که با افزایش غلظت پپتیدهای حاصل قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می یابد (۳۰).

پپتیدهای حاصل از هیدرولیز به نوع آنزیم و شرایط هیدرولیز بستگی دارد و با افزایش غلظت پپتیدها می توان به قدرت آنتی اکسیدانی مشابه آنتی اکسیدان های سنتزی (ویتامین ث) دست پیدا کرد (۳۶). آمایا پارواتی و همکاران (۲۰۱۴) با هیدرولیز

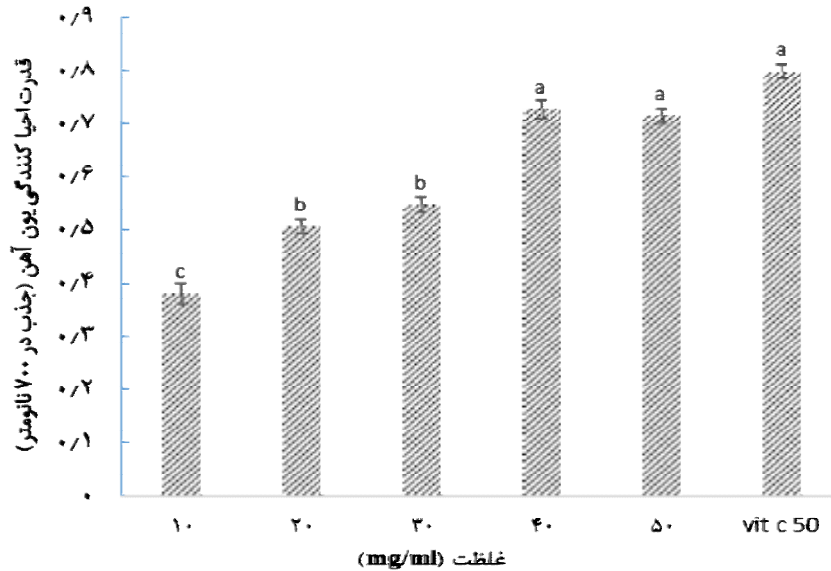


شکل ۴- مقایسه قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی در غلظت های مختلف در مقایسه با اسید آسکوربیک

وجود نداشت و از نظر میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن مشابه اسید آسکوربیک عمل نمودند. کامبی و همکاران (۲۰۰۸) و ژی و همکاران (۲۰۰۸) نیز به ترتیب با هیدرولیز پروتئین کانولا و گیاه یونجه، قدرت احیاء کنندگی پپتیدهای حاصل را وابسته به غلظت گزارش کردند (۱۰، ۳۲). این نتایج در تطابق با نتایج تحقیقات اومایا پارواتی و همکاران (۲۰۱۴)، زائو و همکاران (۲۰۱۲) به ترتیب تاثیر غلظت های متفاوت را بر قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده صدف خوراکی، برنج و دانه شنبلیله بررسی کردند، می باشد (۳۰، ۳۵).

۳-۵-۲- تاثیر غلظت بر قدرت احیاء کنندگی یون آهن

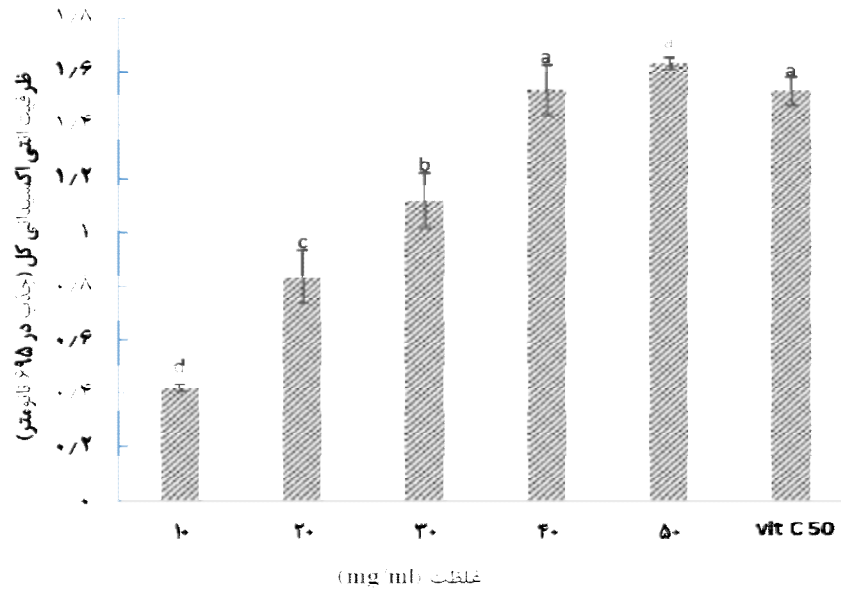
تاثیر غلظت های مختلف پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی (غلظت ۱۰-۵۰ mg/ml) بر روی میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن در مقایسه با اسید آسکوربیک در شکل ۵ آورده شده است. نتایج بیانگر این است که پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی از نظر میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن رفتاری وابسته به غلظت از خود نشان می دهد و با افزایش غلظت، میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن آن افزایش یافت. بین میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن هیدرولیز شده حاصل در غلظت های ۴۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر اختلاف معنی داری



شکل ۵-مقایسه قدرت احیاء کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی در غلظت‌های مختلف در مقایسه با اسید آسکوربیک

(۲۰۰۹) با تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی *Mustelus mustelus*، گزارش کردند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیز شده‌های حاصل وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت به‌میزانی چشمگیر افزایش می‌یابد، اما کمتر از قدرت آنتی‌اکسیدانی BHA است (۷). آما یا پارواتی و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی صدف خوراکی را وابسته به غلظت گزارش کردند و بیان کردند که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در غلظت ۱ (mg/ml) حاصل شد اما از نمونه‌ی کنترل (ویتامین ث) کمتر بود (۳۰).

۳-۵-۳-تأثیر غلظت بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل
تأثیر غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی (غلظت ۱۰-۵۰ mg/ml) بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در مقایسه با اسید آسکوربیک در شکل ۶ آورده شده است. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی از نظر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل رفتاری وابسته به غلظت از خود نشان می‌دهد و با افزایش غلظت، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل آن افزایش یافت. بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیز شده حاصل در غلظت‌های ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و از نظر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل مشابه اسید آسکوربیک عمل نمودند. بوگاتف و همکاران



شکل ۶-مقایسه قدرت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده قارچ در غلظت های مختلف در مقایسه با اسید آسکوربیک

۴- نتیجه گیری

اکسیداسیون و تشکیل رادیکال های آزاد در مواد غذایی و همچنین اندام های هوازی امری اجتناب ناپذیر است. رادیکال های آزاد منجر به بروز بیماری های خطرناکی مانند بیماری های قلب و عروقی، آلزایمر و ... می شوند. در صنعت مواد غذایی از آنتی اکسیدان های سنتزی جهت ممانعت از اکسیداسیون استفاده می شود اما عوارض جانبی این ترکیبات باعث افزایش توجه صنعت غذا و محققین برای شناسایی و استخراج آنتی اکسیدان های طبیعی شده است. در میان آنتی اکسیدان های طبیعی، پروتئین های هیدرولیز شده از جمله ترکیبات زیست فعال هستند که خواص سلامتی بخش متفاوتی از جمله خواص آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهند. در این پژوهش هیدرولیز پروتئین قارچ با آنزیم آلکالازی طی زمان های ۲۵۰-۵۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد نسبت آنزیم به سوبسترای ۲٪ انجام شد. بررسی خواص آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده ها نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیز تا ۲۰۰ دقیقه، خواص آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH، احیاء کنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل) افزایش یافت اما افزایش بیشتر زمان هیدرولیز تاثیر معنی داری بر قابلیت آنتی اکسیدانی آن نداشت. از سوی دیگر بررسی تاثیر غلظت پروتئین هیدرولیز شده قارچ بر فعالیت

آنتی اکسیدانی نشان دهنده ی وابستگی فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده های حاصل به غلظت مورد استفاده بود. در تمامی خواص آنتی اکسیدانی مورد بررسی قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده قارچ در غلظت های ۵۰ (mg/ml) و ۴۰ با خاصیت آنتی اکسیدانی ویتامین ث به عنوان یک آنتی اکسیدان سنتزی در غلظت (mg/ml) ۵۰، تفاوت معنی داری نداشت. این امر حاکی از قابلیت بالای پروتئین هیدرولیز شده ی قارچ تولیدی در این پژوهش جهت رقابت با آنتی اکسیدان های سنتزی می باشد. بنابراین، هیدرولیز آنزیمی پروتئین قارچ با آنزیم آلکالاز راهکاری مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با ویژگی های آنتی اکسیدانی قابل توجه می باشد؛ به طوری که با مطالعات بیشتر و بررسی خواص سلامتی بخش آن به صورت درون تنی می توان از پروتئین هیدرولیز شده تولیدی به عنوان جایگزین آنتی اکسیدان های سنتزی در فرمولاسیون های غذایی به کار برد.

۵-منابع

۱. پدرام نیا، ا، مرتضوی، ع، صادقی ماهونک، ع، الهامی راد، ا، و آرمین، م، ۱۳۹۶. بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه

- and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15, pp. 301-313.
10. Cumby, N., Zhong, Y., Nacz, M. and Shahidi, F., 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109(1), pp.144-148.
 11. E Silva, F.G.D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F.M. and Miralles, B., 2017. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 76, pp. 140-146.
 12. Guimaraes, F., and Maria, F., 2017. Identification of peptides released from Flaxseed (*linum Usitatissimum*) protein by alcalase® hydrolysis: antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 76, pp.140-146
 13. He, J.Z., Ru, Q.M., Dong, D.D. and Sun, P.L., 2012. Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules*, 17(4), pp. 4373-4387.
 14. Hernandez-Ledesma, B., Quiros, A., Amigo, L. and Recio, I., 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17(1), pp. 42-49.
 15. Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V. and Sharma, A., 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), pp.178-184.
 16. Janakat, S., Al-Fakhiri, S. and Sallal, A. K., 2004. A promising peptide antibiotic from *Terfezia claveryi* aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vitro. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological* (Citrullus lanatus) با ارزیابی فعالیت چلات کنندگی با استفاده از روش سطح پاسخ. نوآوری در علوم و فناوری غذایی، ۹(۴)، صص. ۱۳۳-۱۲۳.
 ۲. سلمانیان، ش، صادقی ماهونک، ع، خمیری، ماستری فراهانی، م، ۱۳۹۲. اسیدهای فنولی، فعالیت ضد رادیکالی و ضد میکربی عصاره متانولی برگ‌های اوجی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران ۸(۲)، صص. ۱۵۴-۱۴۵.
 3. Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M., 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems. *Food Chemistry*, 105(1), pp. 57-64.
 4. Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102(4), pp.1233-1240.
 5. Association of Official Agricultural Chemists., 1975. *Official methods of analysis* (Vol. 222). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
 6. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N.M. and Nunes, M.L., 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process biochemistry*, 45(1), pp.18-24.
 7. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), pp.1198-1205.
 8. Blanca, H. L., Ana, Q., Lourdes, A., and Isidra, R., 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17, pp. 42-49.
 9. Chi, C.F., Hu, F.Y., Wang, B., Li, T. and Ding, G.F., 2015. Antioxidant

- Society of Ethiopia*, 23(3), pp.391-398.
25. Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115(1), pp.238-242.
 26. Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), pp. 337-341.
 27. Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G. and Kim, S.K., 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), pp.562-569.
 28. Saito, K., Jin, D.H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T. and Nokihara, K., 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), pp.3668-3674.
 29. Sun, Q., Shen, H. and Luo, Y., 2011. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, 48(1), pp.53-60
 30. Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G. and Balasubramanian, T., 2014. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(3), pp.343-353.
 31. Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(10), pp.810-813.
 17. Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H. and Ahn, C.B., 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42(9), pp.1266-1272.
 18. Khantaphant, S., Benjakul, S. and Ghomi, M.R., 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brown stripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), pp.1139-1148.
 19. Lavi, I., Nimri, L., Levinson, D., Peri, I., Hadar, Y. and Schwartz, B., 2012. Glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* inhibit colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Journal of Gastroenterology*, 47(5), pp.504-518.
 20. Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. and Wu, Y., 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 102(4), pp.1135-1143.
 21. Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W. and Liu, J., 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106(2), pp.444-450.
 22. Matthäus, B., 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), pp. 3444-3452.
 23. Nourmohammadi, E. and Sadeghi Mahoonak, A. R., 2019. Health implications of bioactive peptides: A Review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 88 (5), pp. 319-343.
 24. Oboh, G. and Shodehinde, S.A., 2009. Distribution of nutrients, polyphenols and antioxidant activities in the pilei and stipes of some commonly consumed edible mushrooms in Nigeria. *Bulletin of the Chemical*

- anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), pp.235-240.
35. Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X.D., Zhong, H., Wang, S., Sun, W. and Zhou, Q., 2012. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chemistry*, 134(3), pp.1360-1367.
36. Zhu, L., Chen, J., Tang, X. and Xiong, Y. L., 2008. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), pp. 2714-2721.
- austriasicus*). *Food Research International*, 36(9-10), pp.949-957.
32. Xie, Z., Huang, J., Xu, X. and Jin, Z., 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2), pp. 370-376.
33. Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A.A., Algur, Ö.F. and Bilaloğlu, V., 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of Tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), sage (*Salvia triloba* L.), and Black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), pp. 5030-5034.
34. You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. and Yang, B., 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus*

(Original Research Paper)

Production of Hydrolyzed Protein from Edible Mushroom Using Alcalase Enzyme: Investigation of the Effect of Hydrolysis Time and Concentration of Protein Hydrolysate on Its Antioxidant Capacity

Isan Izanloo¹, Alireza Sadeghi Mahoonak^{2*}, Hoda Shahiri Taberestani³, Shima Kaveh⁴

1-MS.c Student 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-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4-Ph.D Student of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received:18/04/2022

Accepted:09/05/2022

Abstract

Due to concerns about the safety and long-term health of synthetic antioxidants such as BHT and BHA, the use of natural compounds with antioxidant properties, such as bioactive peptides, has attracted the attention of many researchers. The aim of this study was to determine the optimum hydrolysis time of edible mushroom protein (*Agaricus bisporus*) with alcalase enzyme to produce protein hydrolyzate with high antioxidant properties. For this study, first edible mushrooms were converted into powder and then was hydrolyzed in different times of 200, 150, 100, 50 and 250 minutes with an enzyme to substrate of 2% at temperature of 50 °C and then appropriate treatment based on antioxidant properties of the produced sample was determined. The results showed that hydrolysis time 200 minutes is suitable to achieve maximum antioxidant properties. Next, the effect of different concentrations (10 to 50 mg/ml) of hydrolyzed protein prepared under optimal conditions on the antioxidant properties of the product compared to ascorbic acid (50 mg/ml) was investigated. In all the tests, the product showed a concentration-dependent behavior and with increasing concentration, the DPPH free radical scavenging, iron ion reduction power and total antioxidant power increased and in concentrations of 40 and 50 mg/ml the antioxidant power was similar to ascorbic acid (50 mg/ml). The results showed that the hydrolyzed protein produced has the potential to be used as a functional ingredient and as an alternative to synthetic antioxidants in food formulations.

Keywords: Hydrolysis Time, Enzymatic Hydrolysis, Edible Mushroom, Antioxidant Properties, Protein Hydrolysate.

*Corresponding Authors: sadeghiaz@gau.ac.ir

(مقاله پژوهشی)

مطالعه تغییرات بار میکروبی انکپسوله و آزاد آب میوه‌های سین بیوتیک صنعتی به روش RSM-D-Optimal با کرت خردشده

محمدیار حسینی^{۱*}، محمد علیزاده^۲، محمود رضازادباری^۲

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۰۵

DOI: [10.30495/jfst.2022.1955557.1787](https://doi.org/10.30495/jfst.2022.1955557.1787)

چکیده

در سال‌های اخیر مصرف کنندگان علاوه بر در نظر گرفتن ویژگی‌های تغذیه‌ای که به صورت متعارف از یک ماده غذایی مورد نظر است به خصوصیات سلامت بخش محصول نیز توجه ویژه‌ای دارند. در این پژوهش به بررسی تاثیر ۵ متغیر شامل اینولین، زمان نگهداری، نوع میوه (سیب، آلبالو)، نوع میکروپ (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی) و نوع پوشش (انکپسوله و آزاد) بر پاسخ کنترل کیفی بار میکروبی آبمیوه های انکپسوله و آزاد پرداخته شد. آنالیز واریانس داده ها در سطح ۵ درصد نشان داد که در تمامی نمودارها متغیرهای مستقل اثرات معنی دار (p) بر متغیر وابسته در این پژوهش داشتند. نتایج نشان داد با در نظر گرفتن اینولین مقدار میکروارگانیسرها بیشتر می شود و در حضور و عدم حضور نوع میوه در شمارش کلی تغییرات چشمگیری ایجاد نمی شود ولی نوع میوه می تواند روی تعداد میکروارگانیسرها تاثیر داشته باشد. تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در محیط بیش از لاکتوباسیلوس کازئی مشاهده شد. با در نظر گرفتن نوع میوه و افزایش زمان تخمیر کاهش میکروارگانیسرها را داریم که مربوط به pH محیط این میوه ها است. با افزایش زمان نگهداری و با در نظر گرفتن انکپسولاسیون در مراحل اولیه کمتر از میکروارگانیسرها غیرانکپسوله می باشد و اختلاف بین آنها معنی دار است. با در نظر گرفتن نوع میوه، شمارش کلی در لاکتوباسیلوس کازئی بیش از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می باشد چون در مراحل اولیه، رشد لاکتوباسیلوس کازئی که pH رشد متعادل تری نسبت به اسیدوفیلوس دارد و در طول زمان با کاهش pH جمعیت آن ها کمتر می شود.

واژه های کلیدی: آب میوه، پروبیوتیک، پری بیوتیک، فیزیوشیمیایی، شمارش کلی.

۱- مقدمه

به کارگیری پروبیوتیک‌ها در پیشگیری از بیماری‌ها و بهبود وضعیت سلامتی انسان و دام پیشینه‌ای چندین هزار ساله دارد. پروبیوتیک‌ها یا مواد حیات بخش در مقابل آنتی‌بیوتیک قرار می‌گیرد. در سال‌های اخیر مصرف کنندگان علاوه بر در نظر گرفتن ویژگی‌های تغذیه‌ای که به صورت متعارف از یک ماده غذایی مورد نظر است به خصوصیات سلامت بخش محصول نیز توجه ویژه‌ای دارند. به طور عمده پروبیوتیک‌هایی که بیش از همه کانون تحقیقات قرار گرفته‌اند، باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک شامل گونه‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم هستند. سازو کار تأثیر پروبیوتیک‌ها در بدن انسان از طریق تعدیل pH روده، تولید ترکیبات مهارکننده رشد باکتری‌ها، رقابت برای جذب مواد غذایی و تقویت سیستم ایمنی میزبان بروز می‌کند (۲۴). ماده غذایی سین بیوتیک فرآورده‌های پروبیوتیک حاوی پری بیوتیک است که در بردارنده دست کم یک ویژگی سلامت بخش مشخص، افزون بر خواص تغذیه‌ای پایه می باشد. غذاهای پروبیوتیک به دسته‌ای از فرآورده‌های غذایی گفته می‌شود که شامل یک یا مخلوطی از کشت‌های باکتریایی زنده و مفید هستند که مصرف آن‌ها باعث ایجاد تعادل در فلور میکروبی روده و در نهایت سبب افزایش سلامتی انسان می‌شود (۱ و ۳۰). پری بیوتیک‌ها ترکیباتی هستند که در برابر آنزیم‌ها و ترکیبات ترشح شده در بزاق و روده کوچک هضم ناپذیر یا اندک هضم هستند تا دست نخورده یا با شکست جزئی در محیط روده در دسترس پروبیوتیک‌ها قرار گیرند و به عنوان منابع کربن یا انرژی، رشد و فعالیت این میکروارگانیسم‌ها را به طور انتخابی تحریک کنند. از مهم ترین پری بیوتیک‌های طبیعی و ساختگی می‌توان به فروکتو-الیگوساکاریدها (FOSs) که ممکن است به صورت خطی یا شاخه دار باشند اشاره کرد و مهم ترین آن اینولین می‌باشد (۴). اینولین در طبیعت به صورت کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای در گیاهان، یا به صورت پلی ساکاریدهای خارج سلولی در برخی از میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شود. درجه پلیمریزاسیون اینولین با توجه به نوع گیاه و میکروارگانیسم از ۲ تا ۶۰ متغیر است، با

افزایش طول زنجیره‌ی فروکتوزی از قابلیت انحلال و میزان شیرینی این ترکیبات کاسته می‌شود به طوری که ترکیبات اینولین با درجه پلی‌مریزاسیون ۸-۲ که به اینولالیگوساکاریدها معروفند دارای بالاترین قابلیت انحلال در آب و شیرینی معادل ۳۰٪ شیرینی ساکارز می‌باشند (۳۱ و ۳۱). آب میوه‌ها دارای مواد مغذی مفیدی مانند مواد معدنی، ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند و می‌توانند ماده‌ای مناسب برای کشت باکتری باشد. این مواد از پتانسیل بالا برای تبدیل شدن به محصولات پروبیوتیک برخوردارند زیرا فرآورده‌ای سلامت بخش هستند و برخلاف فرآورده‌های لبنی فاقد ترکیبات ناسازگار با بدن نظیر لاکتوز بوده و منجر به محروم شدن بخشی از جمعیت از مصرف آن نمی‌شوند (۷ و ۳۰). آب سیب یک نوشیدنی عمومی است و توسط عموم مردم به صورت کسانتره نیز استفاده می‌شود. ۹۰ درصد میوه‌ها دارای اسید آسکوربیک و مقدار فنل بالا هستند. آب سیب به عنوان یک منبع خوب در تولید آبمیوه استفاده می‌شود (۴). برای بررسی طیف زیاد آبمیوه‌ها آب آلبالو به عنوان آبمیوه اسیدی نیز در نظر گرفته شده است. متداولترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در محصولات پروبیوتیک مربوط به گروه باکتری‌های لاکتیک اسید هستند که شامل نژادهای خاصی از جنس لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس هستند. کیونگ و همکاران (۲۰۰۶) آب کلم پروبیوتیک را با باکتری‌های اسید لاکتیک مطالعه کردند و نتایج نشان داد که لاکتوباسیلوس کازئی در pH کم قادر به بقا نیست و زودتراز بین می‌رود (۱۹). دانا و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی نشان دادند که آب کرفس پروبیوتیک ترش مزه می‌باشد و نیاز به اصلاحات دارد (۶). کراساکوپت و همکاران (۲۰۰۸)، آب میوه‌های پروبیوتیک را در مقیاس آزمایشگاهی بررسی کردند و نتایج نشان داد که کیفیت محصولات را می‌توان تا یک ماه حفظ نمود (۱۷ و ۱۸). در تحقیقی خلخالی و همکاران (۱۳۸۷)، نوشیدنی پروبیوتیکی ماء الشعیر را با چهار گونه لاکتوباسیلوس بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که ماء الشعیر در شرایطی که حاوی مخمر باشد بقا و ماندگاری چهار باکتری اسید لاکتیک بیشتر خواهد بود و این ماندگاری در شرایط دمایی اتمسفر بهتر

شد. محیط کشت MRS، آلزینات سدیم، کلرید کلسیم، Tween80، کیتوزان، اسید استیک منجمد، سود، کاغذ واتمن شماره ۴ و بطری شیشه‌ای از شرکت فرآیندسازان خریداری شدند. مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این تحقیق با درجه خلوص بالا تهیه شد.

۲-۲- آماده‌سازی محیط کشت‌ها

لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را هر کدام به‌طور جداگانه به داخل ۱۰ سی سی محیط کشت MRS broth تلقیح گردید. لاکتوباسیلوس کازئی را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۳ روز و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را برای ۲ روز تحت شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس هر کدام از محیط کشت‌ها را به داخل ۹۵ سی سی محیط کشت MRS broth منتقل شد و تحت شرایط بالا برای هر کدام انکوبه‌گذاری انجام گردید. بعد از پایان انکوبه‌گذاری برای استخراج سلول‌ها، با سرعت ۱۵۰۰g برای ۱۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شد و دو بار با آب مقطر شسته شد. سوسپانسیون سلولی هر باکتری پروبیوتیک به دو بخش تقسیم گردید. یک بخش برای میکروانکپسولاسیون (۱۵ گرم از هر نمونه) و بخش دیگر برای سلول‌های آزاد (۱۵ گرم برای هر نمونه) در آب میوه صورت گرفت. قسمتی که برای سلول آزاد می‌باشد هر سلول را جداگانه در آب مقطر در دمای یخچال نگهداری شد (۲).

۲-۳- میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها

قسمت جدا شده هر سلول توسط سرنگ استریل برای میکروانکپسولاسیون (تقریباً ۱۵ گرم برای هر نمونه)، با آب مقطر شسته شد و هر سلول در ۵ سی سی آب مقطر به صورت جداگانه ریخته و هر نمونه را با ۲۰ سی سی سدیم آلزینات ۲٪ کاملاً میکس شد. مخلوط‌های حاصل در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید (توجه شود که دو نمونه کلرید کلسیم حاوی Tween80 نیز استریل گردد). سپس سوسپانسیون‌های سلولی را با سرنگ استریل که حاوی قطر سوزن ۰/۱۱ میلی‌متر می‌باشد، به داخل هر نمونه ۸۰ سی سی کلرید کلسیم ۰/۰۵ مولار استریل (محلول شامل ۰/۱

است) (۱۵). پور آگاهی و همکاران (۱۳۸۹)، نوشیدنی‌های میوه‌ای را بر پایه لبنی بررسی کردند و نشان دادند که مصرف نوشیدنی حاوی پروبیوتیک به عنوان یک نوشیدنی سالم از طریق تثبیت فلور میکروبی طبیعی روده، تعادل اعمال متابولیک و تقویت سیستم ایمنی در رژیم غذایی افراد مختلف به صورت عامل پشتیبان و راهکاری درمانی، مناسب و موثر به ویژه برای گیاهخواران، افراد مبتلا به آلرژی نسبت به تولیدات لبنی، افراد مبتلا به بیماری‌های گوارشی و غیر گوارشی ارزشمند و مطلوب محسوب می‌گردد (۲۸). پیرا و همکاران (۲۰۱۰) بر روی آب سیب تخمیر شده پروبیوتیک تحقیق کردند و نشان دادند که لاکتوباسیلوس کازئی دارای بیشترین رشد در این محصول می‌باشد (۲۷). همچنین ایاسه و همکاران (۱۳۹۷) پژوهش‌هایی در مورد آب هویج پروبیوتیک، دولت‌آبادی و همکاران (۲۰۱۶) در مورد بقای پروبیوتیک‌ها در آب پرتقال پاستوریزه، زندگی و همکاران (۲۰۱۶) نوشیدنی‌های ترکیبی - تخمیری پروبیوتیک بر پایه آب سیب، صباغ پور و همکاران (۱۴۰۰) آب آناناس پروبیوتیک، هویج و چغندر قرمز، قضاوی و همکاران (۲۰۱۸) روی آب انار پروبیوتیک و بابایی و همکاران (۲۰۱۸) و کینگ و همکاران (۲۰۰۶) تولید نوشیدنی‌های پروبیوتیک آب گوجه انجام داده‌اند (۲ و ۳ و ۸ و ۱۰ و ۱۶ و ۳۹). از آن جا که آب میوه فرآورده‌ای پرمصرف و پرفرودار است و مصرف آن در بین سنین متغیر رایج است، در این مطالعه به تولید محصول جدیدی که در تولید صنعتی آرمیوه‌های سیب و آلبالو سین بیوتیک که حاوی میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک و ترکیبات پری بیوتیک می‌باشد، پرداخته شده است. هدف از انتخاب دو نوع آب میوه سیب و آلبالو، تفاوت چشمگیر pH بین آن‌ها است و نیز مرسوم بودن این آب میوه‌ها در بین عموم مردم جامعه می‌باشد. لازم به ذکر است که اکثر آب میوه‌ها در این دامنه pH قرار دارند.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد

سویه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران واقع در کرج خریداری

پوشش دهی صورت گیرد. کیتوزان پوشش داده شده با دانه‌ها (سلول‌ها) با آب مقطر شسته شد و در آب مقطر ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. این سلول‌های انکپسوله برای همان روز استفاده شد. یک سی سی از دانه‌های انکپسولاسیون دو نمونه ای باکتری و یک سی سی از سوسپانسیون سلول آزاد دو نمونه باکتری به ۲۰۰ سی سی آب میوه تتراپک که فرآیند پاستوریزاسیون را طی کرده بود اضافه گردید. (اگر کنسانتره خالص استفاده کنیم آب میوه باید پاستوریزه شود، سپس آب میوه هادریطری های استریل (Can) نگهداری شوند و درب بندی گردند) و در دمای یخچال (۴°C) طبق زمان طرح، آزمایش گردید (۵).

۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات این پروژه با استفاده از RSM-D-Optimal با کرت خرد شده در قالب ۵۷ تیمار مطابق جدول ۱ انجام شد و آنالیز آن با نرم افزار SAS 4.5 صورت گرفت.

درصد Tween80) می باشد، تزریق گردید. بعد از نیم ساعت در دو نمونه حاوی کلرید کلسیم پدیده ژل صورت گرفت که دانه‌ها با آب مقطر شسته شدند و در آب مقطر در دمای ۴ درجه سانتیگراد به طور جداگانه نگهداری گردید. (دو نمونه ۱۵ گرمی در آب مقطر تهیه شد). ۰/۴ گرم کیتوزان را با ۹۰ سی سی آب مقطر اسیدی شده (با ۰/۴ سی سی اسید استیک منجمد) حل گردید سپس آب مقطر اضافه شد تا به غلظت نهایی ۰/۴٪ رسید. pH را با اضافه کردن سود ۱ مولار به ۵/۷-۶ تنظیم شد. سپس این ترکیب با کاغذ واتمن شماره ۴ تا حجم ۱۰۰ سی سی فیلتر شد. از این محلول دو نمونه تهیه شد. سپس محلول‌های ۱۰۰ سی سی را در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. ۱۵ گرم از دانه‌های (سلول‌ها) شسته شده مرحله قبل (در داخل آب ۴ درجه سانتیگراد) به محلول کیتوزان ریخته شد و به آرامی با سرعت ۱۰۰ rpm به مدت ۴۰ دقیقه همزده شد تا پدیده

جدول ۱- طرح آزمایشات برای تیمارهای مختلف

	Run	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
Plot type	Order	A: Inulin %	B: Time days	C: Fruit type	D: Microbe type	E: Capsulated
i14	1	0	0	Apple	L.c	Capsulated
i15	2	0	28	Sour cherry	L.a+L.c	Free
	3	0.35	28	Sour cherry	L.a	Capsulated
	4	0.35	28	Apple	L.c	Capsulated
	5	0.35	0	Apple	L.a	Capsulated
wp caps	6	0	14	Apple	L.a+L.c	Capsulated
	7	0	28	Sour cherry	L.c	Capsulated
	8	0.175	14	Sour cherry	L.a	Free
i8	9	0	28	Sour cherry	L.a+L.c	Free
	10	0.2625	14	Apple	L.a+L.c	Capsulated
wp l.c+l.a	11	0.0875	21	Apple	L.a+L.c	Free
	12	0.175	14	Sour cherry	L.c	Capsulated
i9	13	0.35	0	Apple	L.c	Free
i10	14	0.35	28	Apple	L.a+L.c	Free
i11	15	0	0	Sour cherry	L.a+L.c	Capsulated
i12	16	0.0875	21	Apple	L.c	Capsulated
i13	17	0.0875	7	Sour cherry	L.a+L.c	Free

	18	0.35	28	Sour cherry	L.c	Free
wp sour	19	0	28	Sour cherry	L.a	Free
	20	0.0875	21	Sour cherry	L.a+L.c	Capsulated
	21	0.35	28	Apple	L.a+L.c	Free
sp la+l.c	22	0.35	28	Sour cherry	L.a+L.c	Capsulated
i5	23	0.175	28	Apple	L.a	Free
i6	24	0.35	28	Sour cherry	L.a+L.c	Capsulated
	25	0.175	0	Apple	L.a+L.c	Free
sp free	26	0.35	0	Sour cherry	L.a	Free
	27	0.175	14	Apple	L.c	Free
i7	28	0.175	0	Sour cherry	L.a	Capsulated
	29	0.35	0	Sour cherry	L.a	Free
	30	0	28	Apple	L.c	Free
	31	0.35	0	Apple	L.c	Free
Wp Free	32	0	0	Sour cherry	L.c	Free
	33	0	28	Sour cherry	L.a	Free
	34	0.35	14	Apple	L.a	Free
i1	35	0.2625	14	Apple	L.a+L.c	Capsulated
i2	36	0.35	0	Sour cherry	L.c	Capsulated
i3	37	0	0	Apple	L.a	Free
	38	0.35	28	Sour cherry	L.c	Free
	39	0	0	Apple	L.c	Capsulated
Wp L.c	40	0.35	0	Sour cherry	L.c	Capsulated
	41	0	0	Sour cherry	L.c	Free
	42	0.35	28	Apple	L.c	Capsulated
	43	0	0	Apple	L.a	Free
spApple	44	0	28	Apple	L.c	Free
	45	0	28	Sour cherry	L.c	Capsulated
	46	0	28	Apple	L.a	Capsulated
wpCaps	47	0.35	0	Apple	L.a	Capsulated
	48	0	14	Sour cherry	L.a	Capsulated
	49	0	14	Sour cherry	L.a	Capsulated
	50	0.35	14	Sour cherry	L.a+L.c	Free
sp sour	51	0.35	28	Sour cherry	L.a	Capsulated
	52	0	28	Apple	L.a	Capsulated
wpApple	53	0.35	14	Apple	L.a	Free
	54	0.175	0	Apple	L.a+L.c	Free
	55	0	14	Apple	L.a+L.c	Capsulated
	56	0.35	14	Sour cherry	L.a+L.c	Free
	57	0	0	Sour cherry	L.a+L.c	Capsulated

۳-نتایج و بحث

اطمینان ۵ درصد و معنی دار نبودن عدم برازش برای این شاخص را نشان می دهد. مقادیر ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده نشان می دهد مدل انتخابی برای این پژوهش به درستی لحاظ شده است.

جدول ۲ نتایج مربوط به تحلیل آماری تغییرات بار میکروبی آب میوه را نشان می دهد. نتایج حاکی از معنی دار بودن شاخص های مدل رگرسیونی مربوط به این پاسخ در سطح

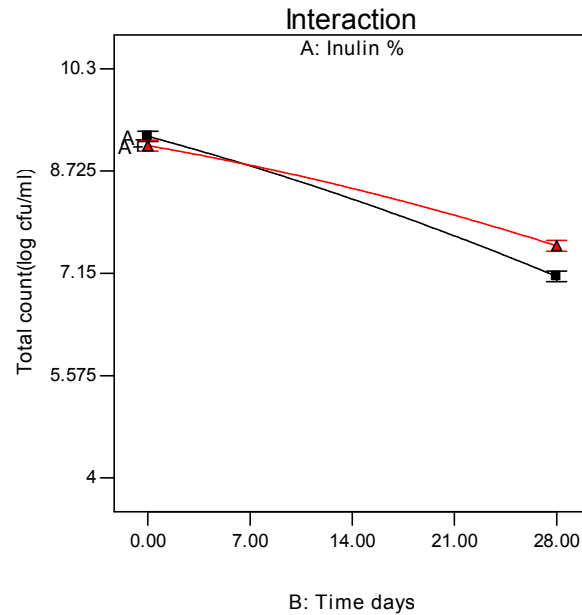
جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس و ضرایب مدل رگرسیون بار میکروبی

Source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F Value	p-value Prob > F
Model	134.5638	18	7.475764	294.1286	< 0.0001
A-Inulin %	0.13097	1	0.13097	5.152909	0.0297
B-Time days	35.60963	1	35.60963	1401.035	< 0.0001
C-Fruit type	6.696079	1	6.696079	263.4524	< 0.0001
D-Probiotic type	2.305071	2	1.152536	45.34568	< 0.0001
E-Capsulation	57.78156	1	57.78156	2273.374	< 0.0001
AB	0.706592	1	0.706592	27.80037	< 0.0001
AC	0.296509	1	0.296509	11.66592	0.0017
AD	3.272454	2	1.636227	64.37617	< 0.0001
AE	0.085072	1	0.085072	3.34708	0.0761
BC	4.607715	1	4.607715	181.2872	< 0.0001
BD	0.720667	2	0.360334	14.17707	< 0.0001
BE	8.116366	1	8.116366	319.3325	< 0.0001
CD	0.945889	2	0.472944	18.60765	< 0.0001
B^2	0.101075	1	0.101075	3.976738	0.0542
Residual	0.864166	34	0.025417		
Lack of Fit	0.654166	12	0.054514	5.710976	0.0002
Pure Error	0.21	22	0.009545		
Cor Total	135.4279	52			
R-Squared	0.993619				
Adj R-Squared	0.990241				

۳-۱- اثرات متقابل زمان نگهداری و درصد اینولین بر بار میکروبی آب‌میوه

شکل ۱ تاثیر متقابل زمان نگهداری آب‌میوه و درصد اینولین را بر روی شمارش کلی نشان می‌دهد. با افزایش زمان نگهداری مقدار میکروارگانیسم‌ها کمتر می‌شود که نشان‌دهنده این است که

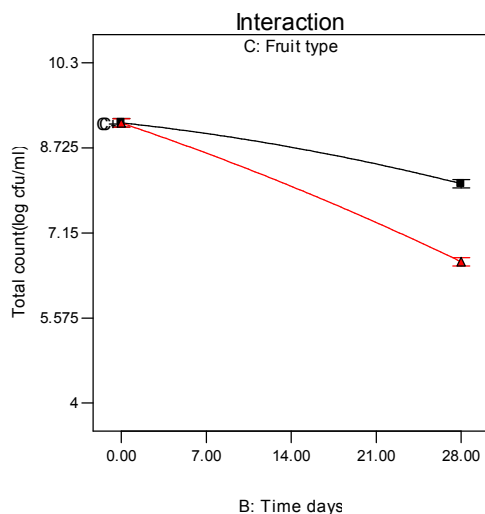
در محیط قندی زیادتری استفاده می‌شود و سوبسترای میکروارگانیسمها کم می‌شود که برای میکروب‌های انکپسوله و آزاد روند یکسانی دارد. این نتیجه با تحقیقات هایسا^۱ و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد که افزودن اینولین با تحریک استارترها شروع می‌شود (۱۱).



شکل ۱- اثرات متقابل زمان نگهداری و اینولین بر روی مقادیر شمارش کلی

رضایت بخش تری نسبت به دیگر باکتری های پروتولیتیکی بعد از گذشت زمان کافی با تامین مواد نیتروژنی آزاد از طریق پروتولیز پروتئین ها رشد مطلوب تری پیدا کرده و جمعیتش زیاد می شود (۳۴) یون^۲ و همکاران (۲۰۰۶) توانایی ماندگاری سلول ها را به نژاد مورد استفاده، واکنش بین گونه های موجود، شرایط کشت، مقادیر اکسیژن، اسیدیته نهایی محصول و غلظت اسیدها را مرتبط دانستند (۳۸).

۲-۳- اثرات متقابل زمان نگهداری و نوع میوه بر بار میکروبی آبمیوه
 شکل ۲ تاثیر متقابل زمان نگهداری و نوع میوه را بر روی شمارش کلی نشان می دهد. با در نظر گرفتن نوع میوه و افزایش زمان تخمیر، کاهش میکروارگانیسم ها را داریم که مربوط به pH محیط این میوه ها است که با کاهش pH محیط و کمبود مواد سوبسترا، تعداد سلول ها کم می شود. شیتا^۱ و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به دلیل داشتن فعالیت پروتولیتیکی

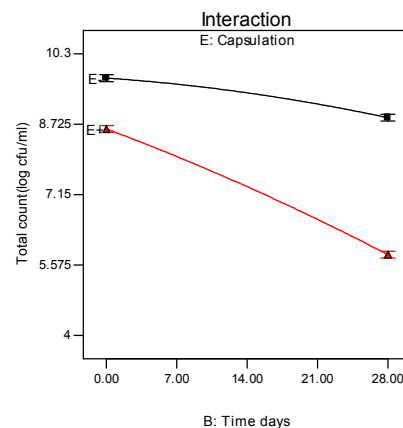


شکل ۲- اثرات متقابل زمان نگهداری و نوع میوه بر شمارش کلی

(۱۳). از بین رفتن لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در طول نگهداری می‌تواند مربوط به پایین بودن pH آب سیب (pH=۳/۸۳) و ترکیبات آب میوه باشد. وقتی که سلول‌ها در محیطی با pH پایین قرار می‌گیرند، برای حفظ pH درون سلولی خود، نیاز به مصرف انرژی بالایی دارند. لذا سایر وظایف اصلی سلولی تحت تاثیر استرس کمبود ATP قرار گرفته و سلول‌ها نمی‌توانند زنده بمانند (۱۲). اویواریس و همکاران (۲۰۱۹) و پاتل و همکاران (۲۰۱۷) انکپسولاسیون سلول‌های باکتری لاکتوباسیلوس پلانناروم با ترکیب صمغ‌ها را بررسی کردند و نشان دادند که انکپسولاسیون نقش حفاظت-کنندگی بیشتر و به تبع تاثیر مثبت بیشتری روی زنده‌مانی آن‌ها در مقایسه با کاربرد هر یک از صمغ‌ها به تنهایی دارد. نتایج حاصله دلالت بر مقاومت بالاتر سلول‌های باکتریایی انکپسوله شده در شرایط اسیدی آب آناناس در مقایسه با انواع نوع آزاد دارد و کاهش جمعیت پروبیوتیک‌های انکپسوله شده کمتر از باکتری‌های پروبیوتیک آزاد بود که به خصوص در تیمارهای ترکیبی، تحت تاثیر هم‌افزایی صمغ‌ها رخ داد. در واقع لایه پوششی ایجاد شده توسط ترکیب پلی‌ساکاریدهای کیتوزان + کتیرا با داشتن ساختاری فیزیکی و چند کاتیونی علاوه بر استحکام ساختار انکپسولاسیون، نقش محافظتی برای آن‌ها ایفا کرده و زنده‌مانی و مقاومت باکتری‌های پروبیوتیکی را در برابر شرایط اسیدی آب میوه/دستگاه گوارش افزایش می‌دهند (۱۲ و ۲۵).

۳-۳- اثرات متقابل زمان نگهداری و انکپسولاسیون بر بار میکروبی آبمیوه

شکل ۳ تاثیر متقابل زمان نگهداری و انکپسولاسیون را بر روی شمارش کلی نشان می‌دهد. با افزایش زمان نگهداری و با در نظر گرفتن انکپسولاسیون در مراحل اولیه رشد میکروارگانیسم‌های انکپسوله کمتر از میکروارگانیسم‌های غیر انکپسوله می‌باشد که علت آن تکثیر و رشد سریع میکروارگانیسم‌های آزاد در محیطی است که با آن سازگار هستند و اختلاف بین آن‌ها معنی دار است. منحنی نشان می‌دهد که محصول از سلامتی بخشی برخوردار است طوری که بایستی تعداد سلول در هر گرم یا میلی‌لیتر برابر ۱۰^۶-۱۰^۷ سلول در محلول داشته باشیم. در آبمیوه‌ها سطح میکروب باید بالاتر از مقدار تضمینی باشد تا بیشترین سود را در بدن داشته باشد که سطح بحرانی آن را عموماً ۱۰^۶ در نظر گرفته اند. پاتل و همکاران (۲۰۱۷) در گزارشی نشان دادند در دو دمای نگهداری ۲۵ و ۵ درجه سانتیگراد در تمام تیمارهای آزاد و انکپسوله در طول ۶۰ روز نگهداری تعداد میکروارگانیسم‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت (۲۵). حسینی و همکاران (۱۳۹۶) ثابت کردند زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در محیط‌های اسیدی پایین است (۱۲). همچنین حسین پور و همکاران ۲۰۱۹ در پژوهشی مشخص کردند که آب میوه‌ها ممکن است دارای مواد آنتی‌میکروبی طبیعی یا مواد افزودنی همچون رنگ دهنده‌ها و طعم دهنده باشند که می‌تواند موجب کاهش زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها شوند



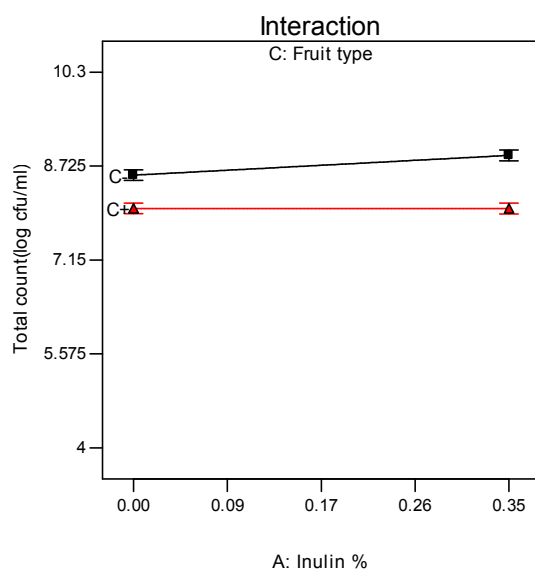
شکل ۳- اثرات متقابل گذر زمان و انکپسولاسیون بر روی مقادیر شمارش کلی

۳-۴- اثرات متقابل درصد اینولین و نوع میوه بر بار

میکروبی آبمیوه

شکل ۴ تاثیر متقابل درصد اینولین و نوع میوه را بر روی شمارش کلی نشان می‌دهد. با و بدون در نظر گرفتن نوع میوه در شمارش کلی تغییرات چشمگیری ایجاد نمی‌شود ولی نوع میوه می‌تواند روی تعداد میکروارگانیسم‌ها تاثیر داشته باشد و معنی‌دار است که احتمالاً در محیط میوه‌ها به علت وجود اسیدهای مختلف

تعداد میکروارگانیسم‌ها کاهش می‌یابد. پینگ^۱ و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که میکروارگانیسم‌ها مهم‌ترین منبع تولید اینولیناز هستند و در حضور یون‌های Na^+ ، K^+ ، Ca^{+2} ، بهتر فعالیت دارند ولی در حضور Mg^{+2} و Ag^+ فعالیت کمی دارند (۲۶) تاداشی^۲ و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه ای نشان دادند که برخی از باکتری‌ها هستند که ساکارز را به مواد قابل مفید مثل اینولین تبدیل می‌کنند (۳۷).



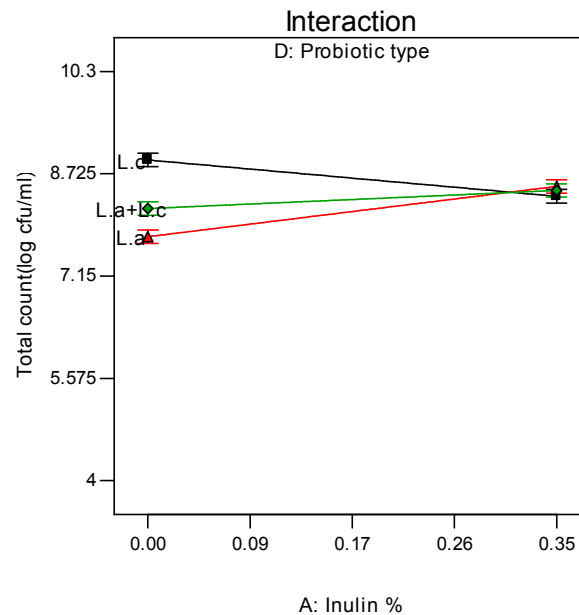
شکل ۴- اثرات متقابل اینولین و نوع میوه بر روی مقادیر شمارش کلی

1- Ping
2- Tadashi

۳-۵- اثرات متقابل درصد اینولین و نوع پروبیوتیک بر بار میکروبی آبمیوه

شکل ۵ تاثیر متقابل درصد اینولین و نوع پروبیوتیک را بر روی شمارش کلی نشان می‌دهد. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس چون با رشد خود باعث افزایش مقدار اسید در محیط می‌شود پس لذا از قند بیشتری استفاده می‌کند که این نتایج با نتایج سایر تحقیقات مطابقت دارد (۲۴)، ولی لاکتوباسیلوس کازئی تحمل pH اسیدی نسبت به اسیدوفیلوس کمتر است و کاهش مقدار میکروارگانیسم‌ها را داریم. مجموع این دو میکروارگانیسم نیز

حالت حدواسط را به دنبال دارد. این روند با مطالعه کراسکوپت^۱ و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد بدین صورت که لاکتوباسیلوس کازئی بقای آن بهتر از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس است که علت آن ویژگی‌های سازگاری آن است که در مقابل ترکیبات مهارکننده در آب‌میوه‌ها است (۱۵ و ۱۶). مارشال^۲ و همکاران (۱۹۹۷) در مطالعه‌ای نشان دادند که با افزایش غلظت پری بیوتیک، رشد و فعالیت پروبیوتیک آزاد افزایش یافته و طبیعتاً منجر به افزایش اسیدیته می‌گردد (۲۲).



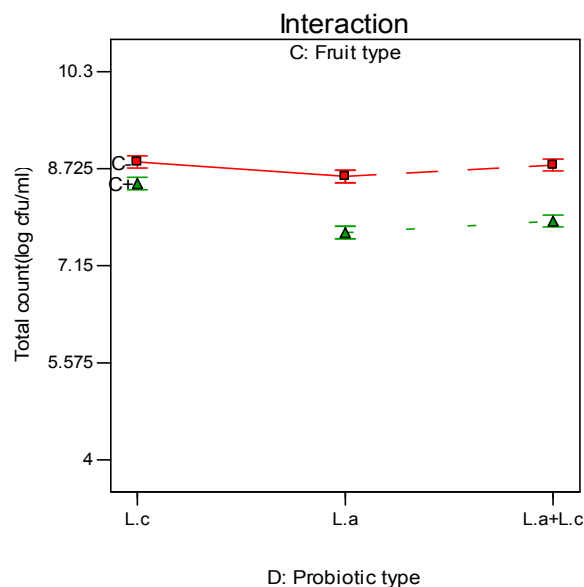
شکل ۵- اثرات متقابل درصد اینولین و نوع پروبیوتیک بر روی مقادیر شمارش کلی

۳-۶- اثرات متقابل نوع پروبیوتیک و نوع میوه بر بار میکروبی

آب میوه

شکل ۶ تاثیر متقابل نوع پروبیوتیک و نوع میوه را بر روی شمارش کلی نشان می دهد. با در نظر گرفتن نوع میوه، شمارش کلی در لاکتوباسیلوس کازئی بیش از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می باشد چون در مراحل اولیه، رشد لاکتوباسیلوس کازئی که pH رشد متعادل تری نسبت به اسیدوفیلوس دارد و در طول زمان با کاهش pH جمعیت آن ها کمتر می شود. مورارو و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که برای داشتن 10^7 میکروارگانیزم در محیط بایستی

۲۸ روز زمان در نظر بگیریم (۶). در پژوهشی گادوارد^۱ و همکاران (۲۰۰۳) و کیلا ساپتی^۲ و همکاران (۲۰۰۶) اعلام نمودند که میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک ها زنده ماننی آن ها را در ماست افزایش داده و آن را یک حامل مناسب برای پروبیوتیک ها قرار می دهد. شواهد و تحقیقات بسیاری وجود دارد که نشان می دهند که میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک ها برای محافظت از آن ها یک روش مناسب است که امکان استفاده از آن ها را در غذاهای اسیدی نظیر ماست فراهم می سازد (۱۰ و ۱۴).



شکل ۶- تاثیر متقابل نوع پروبیوتیک و نوع میوه بر روی مقادیر شمارش کلی

خنثی می‌باشد که در مقابل آنزیم‌های داخلی (کیتوزاناز، تریپسین، کیموتریپسین و لیزوزیم) مقاوم هستند (۲۹). با گذشت زمان به دلیل تولید متابولیت‌های مهار کننده از جمله انواع اسیدهای آلی، کاهش شدید pH رخ می‌دهد که این روند باعث کاهش میزان رشد صعودی سویه پروبیوتیک می‌شود. در مطالعه‌ای طباطبایی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که اینولین موجب تحریک رشد و فعالیت باکتری‌های آغازگر ماست و همچنین باکتری پروبیوتیک می‌گردد (۳۶).

۴- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق با توجه به جنبه صنعتی و اقتصادی نشان داد که می‌توان معرفی آب‌میوه سین‌بیوتیک به عنوان یک محصول جدید با فرهنگ سازی جامعه برای زمان مصرف آن مثل گروه لبنیات برنامه ریزی کرد و حداکثر زمان انقضا با توجه به آنالیز فیزیکوشیمیایی و حسی را یک ماه در نظر گرفت. همچنین نمونه‌هایی را که حاوی میکروارگانیسم‌های انکپسوله می‌باشند زمان نگهداری و خواص ارگانولپتیکی بهتری نسبت به بقیه را دارا می‌باشد. همچنین در میوه‌های اسیدی این زمان کمتر می‌شود که از روز بیست و یکم به بعد آنالیز فیزیکوشیمیایی آبمیوه تغییرات محسوسی می‌یابد.

۵- منابع

1. Aspri, M., Papademas, P. and Tsaltas, D., 2020. Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products. *Fermentation*, pp.6-30.
2. Ayaseh, A., Taban, H. and Yari Khosroshahi, A., 2017. Production of probiotic carrot juice with using of *Lactococcus lactis*. *Journal of Food Industry Research*, 27(4), pp.183-191 [In Persian].
3. Babaei, M., Hashemiravan, M. and Pourahmad, R. 2018. Production of probiotic beverage based on tomato juice and mixture of sweet pepper, celery and coriander juices. *Journal of Food Science and Technology*, 47(5), pp.331-341 [In Persian].
4. Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D. and Fito, P., 2011. Functional foods development: Trends

لاریش^۱ و همکاران (۱۹۹۴) گزارش دادند که یکی از عوامل موثر در فعالیتهای متابولیکی باکتریهای انکپسوله، اندازه لایه آلزینات است که با افزایش اندازه لایه آلزینات آزاد سازی متابولیت‌های حاصل از باکتریهای داخل کپسول و جذب مواد مغذی کمتر صورت می‌گیرد (۲۰). سولتان^۲ و همکاران (۲۰۰۰) با شمارش میکروبی پروبیوتیکها نشان دادند که پروبیوتیکهای داخل کپسول‌ها زنده هستند و فرآیند انکپسولاسیون باعث کاهش آنها نمی‌شود (۳۵). نسنی^۳ و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که لاکتوباسیلوس کازئی در دماهای کمتر بیشتر فعالیت دارند تنش‌های مکانیکی در زمان مخلوط کردن سوسپانسیون میکروبی می‌تواند به کاهش تعداد سلولهای باکتریایی منجر شود (۲۳). پینگ^۴ و همکاران (۲۰۰۷) گزارش دادند که استفاده از گلوکز، فروکتو الیگوساکاریدها و اینولین در محیط کشت RCM (*Reinforced clostridium*) سرعت رشد لاکتوباسیلوس کازئی را تقویت می‌کند... همچنین نشان دادند استفاده از اینولین نه تنها باعث افزایش میزان رشد بیفیدوباکتریوم‌ها می‌شود بلکه زمانیکه اینولین با شیر حل می‌شود حالتی مثل چربی پیدا می‌کند و می‌تواند به عنوان نگهدارنده در فرمولاسیون بستنی مورد استفاده قرار گیرد. در تحقیقی دیگر نشان دادند زمانی که pH و فرآورده‌های پروبیوتیکی به حدود ۴/۱ تا ۴/۴ برسد در این حالت میزان رشد سویه لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به علت تولید متابولیت اسیدی و کاهش شدید pH به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (۲۶). سزار^۵ و همکاران (۱۹۹۹) در مطالعه‌ای نشان دادند که پوشش دادن میکروب‌ها با آلزینات و دانه‌های کیتوزان می‌تواند میکروارگانیسمها را در برابر اسید و فلائوئیدها در آب میوه‌ها محافظت نماید. کوانگ^۶ و همکاران (۱۹۹۹) در مطالعه‌ای نشان دادند که کیتوزان پوشش داده شده با آلزینات به صورت

- 1- Larish
- 2- Sultana
- 3- Nebseny
- 4- Ping
- 5- Sezar
- 6- Quong

- on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*, 39, pp.1221-1227.
15. Khalkhali, S., Fazeli, M. R., Nourozi, J. and Salehi, M., 2009. Investigation of probiotic enrichment of beer drink using four species of *Lactobacillus*. *Microbiological knowledge*, pp. 59-63.
 16. King .V.A, Huang Hui. and Tsen. Jen., 2006. Fermentation of tomato juice by cell immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *Original Article*, pp. 1-6.
 17. Krasaekoopt. W. And Chea. P., 2007. Probiotication of fruit juices. *Faculty of Biotechnology*, 57.
 18. Krasaekoopt. W, Pianjareonlap. R. and kittisuriyanont.K., 2008. Probiotic Fruit Juices. *Biotechnology*.
 19. Kyung .Y.Y, Woodams.E.E. and Hang.Y.D., 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97, pp. 1427-1430.
 20. Larisch. B.C, Poncelet. D, Champagne. C.P. and Neufeld. R.J., 1994. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. *J. Microencapsulation*. 2, pp. 189-195.
 21. Iivares, A., Soto, C., Caballero, E. and Altamirano, C., 2019. Survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* (prepared by vibration technology) in fruit juice during cold storage. *Electronic Journal of Biotechnology*, 42, pp.42-48.
 22. Marshal .VM and Tamime, AY., 1997. Starter culture employed in the manufacture of biofermented milks. *International Dairy*, 50, pp.9-35.
 23. Nebesny .E, Zyzelewicz. D, Motyl. I. and Libudzisz .Z., 2006. Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. *Eur Food Res Technol*, 225, pp.33-42.
 24. Nguyen, B.T., Bujna, E., Fekete, N., Tran, A.T.M., Rezessy-Szabo, J.M., Prasad, R. and Nguyen, Q. D., 2019. Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Frontiers in Nutrition*, 9, pp. 6-54.
 25. Patel, A. R., 2017. Probiotic fruit and vegetable juices- recent advances and future perspective. *International Food Research Journal*, 24(5), pp.1850-1857.
 26. Pereira. A , Maciel. T. and Rodrigues .S., 2011. Probiotic beverage from cashew apple and Technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 22, pp.498-508.
 5. Bornef, F. R. J., Brouns. F, Tashiro. F. and Duvillier.V., 2002. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestive and Liver Disease*, 34(2), pp.111-120..
 6. Dana. M, Moraru .M, Bleoanca. I . and Segal, R., 2007. Probiotic vegetable juices. *Food Technology*, pp. 87 – 91.
 7. Dogahe, K. H., Darani K. K., Tofghi, A., Dadgar, M. and Mortazavian, A. M., 2015. Effect of process variables on survival of bacteria in probiotics enriched pomegranate juice. *British Biotechnology Journal*, 5(1), pp.37-50.
 8. Dowlatabadi, M., Mokhtarian, M., Mortazavi, S.A. and Elhami Rad, A.H., 2016. Investigation of multilayer encapsulation by method of external gelation on the survival of probiotic bacteria undergoing orange juice pasteurization. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 11(3), pp. 93- 102 [In Persian].
 9. Ghazavi, N., Moshtaghi, H., Bonyadian, M. and Abedi, R., 2018. Using *Lactobacillus acidophilus* in production of probiotic pomegranate juice. *Journal of Food Science and Technology*, 77(15), pp.99-107 [In Persian].
 10. Godward .G. and Kailasapathy. K., 2003. Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in yoghurt. *Milk Science International*, 58, pp.396-399.
 11. Haissa. R.C., Flavia .C.A ., Buriti. Inor. A. and Susana. M. I. S., 2008. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic. *Food Science and Technology*, 41, pp. 1037-1046.
 12. Hosseini, M., Rezazad Bari, M. And Alizadeh Khaledabad, M., 2017. Production of synbiotic juice: study on the effect pH, Brix, Formalin index and Rheological. *Journal of Food Science and Technology*, 63(14), pp.73-81 [In Persian].
 13. Hosseinpour, A., Shahsavari, S. and Mahmoudi, R., 2019. Chemical, sensory and survival properties of *Lactobacillus Plantarum* in peach juice. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences*, 23(4), pp.342-351 [In Persian].
 14. Kailasapathy. K., 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect

- from chitosan treated alginate beads. *Journal Microencap*,16(6), pp.687-696.
34. Shihata. A. and shah. N. P., 2000. Proteolytic profiles of yoghurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*,10, pp. 401-408.
35. Sultana, K., Godward .G., Reynolds . A. R., Peiris, P. and Kailasapathy, .K., 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, pp.47-62.
36. Tabatabaei, F. and Mortazavian. A., 2008 Influence of lactulose on the survival of probiotic strains in yoghurt. *World Applied Science Journal*, 3(1), pp.88-90.
37. Tadashi, Wada., Masao, Ohguchi. And Yoshio. I., 2003. A novel enzyme of bacillus That produces inulin from sucrose. *Biochem*, 97(6), pp.1327-1334.
38. Yoon, K.Y., 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97, pp. 1427-1430.
39. Zandi, M., Hashemiravan, M. and Berenji, S.H., 2016. Production of probiotic fermented mixture of carrot, beet and apple juices. *Journal of Paramedical Sciences*, 7(3), pp.17-23[In Persian].
- juice fermented with lactobacillus casei. *Food Technology Department*, pp. 44-60.
27. Ping .S, Andres. H., Hazel. M., 2007. Selective prebiotics support the growth of probiotic mono-culture in vitro. *Food Microbiology*,13, pp.134-139.
28. Pouragahi, S. and Fazeli, MR., 2009. Evaluation of probiotic enrichment of dairy-based fruit drinks under fermentation and non-fermentation conditions using the probiotic microorganism *Lactobacillus fermentum*. *Microbiological knowledge*, pp. 40-55.
29. Quong .D, Yeo J.N . and Neufeld. R.J., 1999. Stability of chitosan and poly-L-Lysin embranes coating DNA-alginate beads when exposed to hydrolytic enzymes. *Journal Microencapsulation*, 16(1), pp.73-82.
30. Rezaei, R., 2011. The effect of inulin and some gums on physicochemical, sensory and viability properties of probiotics in frozen yogurt. *Food Science Thesis, Gorgan University*.
31. Roberfroid. M. B., 2005. Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr*,93(1), pp. 13-25.
32. Sabbaghpour Langaroudi, S., Nouri, L. and Azizi, M. H., 2021. Production of probiotic pineapple juice with encapsulation of *Lactobacillus plantarum* by chitosan and tragacanth gums. *JFST*, 118(18), pp. 1-12.
33. Sezar, A. D. And Akbuga, J., 1999. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug

(Original Research Paper)

Study of Changes in Encapsulated and Free Microbial Load of Industrial Synbiotic Juices by Method RSM-D-Optimal with Split Plot

Mohammadyar Hosseini^{1*}, Mohammad Alizadeh², Mahmoud Rezazad Bari³

1-Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Ilam University, Ilam, Iran.

2- professor, Department of Food Science and Technology, Urmia University, Urmia, Iran.

Received:25/03/2022

Accepted:16/05/2022

Abstract

In recent years, consumers in addition to considering the nutritional characteristics that are normally a desired food, also pay special attention to the health characteristics of the product. In this study, the effect of 5 variables including inulin, storage time, type of fruit (apple, cherry), type of microbe (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and type of coating (encapsulated and free) on the quality control of total count were discussed. Analysis of variance of data at 5% level showed that in all graphs, independent variables had significant effects (p) on the dependent variable in this study. The results showed that by considering inulin, the amount of microorganisms increases and in the presence or absence of fruit type, there are no significant changes in the overall count, but fruit type can affect the number of microorganisms. The number of *Lactobacillus acidophilus* was observed in the environment more than *Lactobacillus casei*. By considering the type of fruit and increasing the fermentation time, we have a decrease in microorganisms, which is related to the pH of the environment of these fruits. With increasing storage time and considering encapsulation in the early stages, it is less than non-encapsulated microorganisms and the difference between them is significant. Considering the type of fruit, the total count in *Lactobacillus casei* is more than *Lactobacillus acidophilus* because in the early stages, the growth of *Lactobacillus casei*, which has a more balanced pH growth than *acidophilus*, decreases over time as the pH decreases.

Keywords: Juices, Probiotics, Prebiotics, Physicochemical, Total Count

*Corresponding Author: m.hosseini@ilam.ac.ir

(مقاله پژوهشی)

ارزیابی ویژگی های آنتی اکسیدانی و عملکردی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از جلبک کلرلا ولگاریس توسط هیدرولیز آنزیمی

شیمیا تقدیری^۱، مژگان امتیازجو^{۲*}، محمد حسین عزیزی^۳، پیمان آریایی^۴، مرجانه صداقتی^۵

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

۲- دانشیار، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت اعلیٰ، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۵- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۴

DOI: [10.30495/jfst.2022.1954308.1781](https://doi.org/10.30495/jfst.2022.1954308.1781)

چکیده

ریز جلبک ها از قدیمی ترین ساکنان اقیانوس ها و آب های شیرین هستند. یکی از مشهورترین آن ها، جلبک دریایی سبز رنگی به نام کلرلا ولگاریس است که در پژوهش حاضر خواص آنتی اکسیدانی و عملکردی پروتئین هیدرولیز شده از این جلبک مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور هیدرولیزات پروتئینی جلبک کلرلا ولگاریس توسط آنزیم های تجاری آلکالاز و فلاورزایم در بازه های زمانی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه تولید شد. نتایج مربوط به ویژگی های هیدرولیزات پروتئینی (درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئین) نشان داد، هیدرولیزات پروتئینی توسط آلکالاز از درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به آنزیم فلاورزایم برخوردار بود. همچنین افزایش زمان هیدرولیز، تاثیر مثبتی بر پارامترهای مذکور داشت ($p < 0.05$). به طوری که بیشترین مقادیر درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئین توسط آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد (به ترتیب ۳۷/۶۳ درصد و ۱۸/۴۴ درصد). همچنین بررسی ها نشان داد که جلبک کلرلا ولگاریس از اسیدهای آمینه ضروری بالایی برخوردار بود. در ادامه خاصیت آنتی اکسیدانی و عملکردی پروتئین ها (توسط هر دو آنزیم در زمان ۳۰ دقیقه) با وزن های مولکولی ۳، ۵ و ۱۰ کیلودالتون سنجیده شد. نتایج نشان داد، پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی ۳ کیلو دالتون علاوه بر خواص عملکردی مناسب، از بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی ($p < 0.05$) برخوردار بود. بنابراین می توان پروتئین هیدرولیز شده حاصل از جلبک کلرلا ولگاریس (توسط آنزیم آلکالاز) بعنوان جایگزین پروتئین های حیوانی در رژیم غذایی و همچنین بعنوان ترکیبات عملگرا در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، هیدرولیزات پروتئینی، جلبک کلرلا ولگاریس.

۱- مقدمه

پیتیدهای زیست فعال، بخش های پروتئینی خاصی هستند که جرم مولکولی آن ها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون و دارای ۲-۲۰ آمینو اسیدی باشند. این پیتیدها در ساختار پروتئینی اصلی غیر فعال بوده و بعد از آزاد شدن بر حسب نوع و توالی آمینواسیدی خود، تأثیر مثبتی بر عملکرد و شرایط بدن و در نتیجه سلامت فرد دارند، از جمله این تأثیرات می توان به اثرات ایمنی بخشی، ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد فشارخون و ضد سرطان اشاره نمود (۱، ۲). در سال های اخیر، پروتئین های هیدرولیز شده با خواص آنتی اکسیدانی و سلامتی بخش از منابع دریایی، حیوانی و گیاهی بسیاری مانند جلبک، شیر، لوبیای سویا، جوانه گندم، کانولا، پروتئین زرده ی تخم مرغ، صدف خوراکی، ضایعات ماهی و میگو تولید شده اند (۳، ۴). در بین منابع دریایی، گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده، منابع دریایی به ویژه جلبک ها به دلیل قیمت مناسبتر و آزرزی زایی کمتر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند (۵، ۶). ریز جلبک ها از قدیمی ترین ساکنان اقیانوسها و آب های شیرین هستند. یکی از مشهورترین آن ها، جلبک دریایی سبزنگی به نام کلرلا ولگاریس است. کلرلا ولگاریس تک سلولی و جزء آغازیان بوده که در خانواده جلبک ها قرار دارد. سلول های کروی آن با قطر حدود ۲-۱ میکرون معادل اندازه یک گلبول قرمز است. این جلبک حاوی ۸ اسید آمینه ضروری، ویتامین های A، C، E، B₁، B₆، B₁₂، بیوتین، املاح آهن، کلسیم، منیزم و روی، اسیدهای چرب ضروری امگا ۶ و امگا ۹ می باشد (۷، ۹، ۱۱). پژوهش های مختلفی پیرامون کاربرد این ریز جلبک در مواد غذایی صورت گرفته است که گویای ظرفیت بالای امولسیون کنندگی، پایداری امولسیون پروتئین حاصل از این جلبک و قابلیت رقابت آن با پروتئین های تجاری است (۹، ۱۰). کیفیت پروتئین موجود در ریز جلبک ها با برخی از منابع پروتئین سنتی مانند شیر، گوشت و تخم مرغ مشابه است. به طور کلی، محتوای پروتئین ریز جلبک در مقایسه با لپید و کربوهیدرات، بخش عمده ای را تشکیل می دهد (۸). از سوی دیگر به منظور بهبود خصوصیات پروتئین می توان از

روش های متعددی استفاده نمود که هیدرولیز آنزیمی یکی از این روش ها است. فرآیند هیدرولیز آنزیمی می تواند با استفاده از آنزیم ها با منشا داخلی (فرآیند اتولیز) و آنزیم های تجاری صورت پذیرد. کاربرد آنزیم های تجاری به جای استفاده از فرآیندهای شیمیایی و یا آنزیم های داخلی دارای مزایای بسیار زیادی است، زیرا کل فرآیند هیدرولیز کاملاً تحت کنترل است در نتیجه محصول و فرآورده هایی با خواص مشخص تولید می شود (۱۲). یکی از فاکتورهای تعیین کننده و مهم در هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم های تجاری، انتخاب آنزیم پروتئاز می باشد. انواع مختلفی از آنزیم های تجاری وجود دارند که به صورت موفقیت آمیزی برای هیدرولیز پروتئین های مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است. آنزیم هایی که برای هیدرولیز پروتئین های غذایی مورد استفاده قرار می گیرند، حداقل باید دارای یک ویژگی مشترک باشند، محصولات تولیدی از اثر آن ها باید از ارزش غذایی برخوردار باشند و اگر منشا میکروبی دارند، ارگانیزم تولید کننده آن ها باید غیر بیماری زا باشد (۲، ۱۳). آنزیم های مختلف مانند آلکالاز (دارای فعالیت اندوپروتئاز در شرایط قلیایی)، بروملین (اندوپیتیداز سیستمین با ویژگی های متعدد)، فلاورزایم (مخلوطی از اندوپیتیداز و آگزوپیتیداز)، پروتامکس (پروتئاز باکتریایی دارای مخلوطی از اندو و آگزوپیتیداز) جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خصوصیات کاربردی و آنتی اکسیدانی به کار می روند (۲). به هنگام انجام فرآیند هیدرولیز، پیتیدهای مختلف با وزن مولکولی متفاوت تولید می شوند. هرچه قدر وزن مولکولی پایین تر باشد پیتید تولید شده دارای خواص زیست فعال بوده و ممکن است توانایی آنتی اکسیدانی داشته باشد. به طور معمول، پیتیدهای با وزن مولکولی زیر ۱۰۰۰ دالتون دارای این ویژگی ها می باشند (۱۴، ۱۵). یکی از ویژگی های بارز هیدرولیزات های پروتئینی، خواص زیست فعالی آنها بوده که ناشی از وزن مولکولی نسبتاً پایین آن ها می باشد. امروزه از این هیدرولیزات های پروتئینی به علت دارا بودن خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی به عنوان مکمل و یا جایگزین پروتئین در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده می شود (۱۵، ۱۶، ۳۹). با توجه به مطالب بیان شده و اهمیت پروتئین

۳-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده

۵۰ گرم نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. در ادامه با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH بهینه فعالیت آنزیم‌ها (آلکالاز ۸/۵، فلاورزایم ۷/۵)، رسانده شد. نمونه‌ها در حمام آبی متحرک در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم‌آلکالاز و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم فلاورزایم در جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده، سپس آنزیم (۱ درصد) میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه شد و پس از هر بار نمونه‌گیری (زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۳۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع شناور جمع‌آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد، سپس با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجامادی به صورت پودر در آمد (۱۸). در ارتباط با آزمون‌های مربوط به هیدرولیز جلبک کلرلا و لگاریس مطالعه حاضر شامل ۶ تیمار بوده است (جدول ۱):

هیدرولیز شده و با توجه به این‌که در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده جلبک کلرلا و لگاریس تا بحال مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است، هدف از مطالعه حاضر تولید پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی جلبک کلرلا و لگاریس توسط آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی این پپتیدها بود.

۲- مواد و روش

۲-۱- مواد اولیه

جلبک کلرلا و لگاریس (ATCC® 30821)، به شکل پودر سبز رنگ از شرکت نور دارو در شهرستان گنبد کاووس تهیه شد. آنزیم آلکالاز (استخراج شده از *Bacillus licheniformis*) با کد p4860 و فلاورزایم (استخراج شده از *Aspergillus oryzae*) با کد ۲۳۳-۷۵۲-۲ از شرکت نووازیم، دانمارک تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از شرکت مرک آلمان تهیه و از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۲-۲- اندازه‌گیری میزان پروتئین کلرلا و لگاریس

بر اساس روش کلدال نمونه‌ها هضم و سپس با تیتراسیون مقدار (N×۶/۲۵) مقدار کل پروتئین رسوبی در فاز آبی محاسبه شد (۱۷).

جدول ۱- تیمارهای مختلف در این مطالعه

شماره تیمار	نام آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)
۱		۱۰
۲	آلکالاز	۲۰
۳		۳۰
۴		۱۰
۵	فلاورزایم	۲۰
۶		۳۰

۲-۴- درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به

کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و سپس با دور ۶۷۰۰ rpm و زمان

۲-۸-۱- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

۲-۸-۱- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

بدین منظور ۱ میلی لیتر از تیمارهای مختلف پروتئین هیدرولیز شده به طور جداگانه با ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده و سپس جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۱۷nm در مقابل شاهد خوانده شد و با استفاده از رابطه ۳، میزان مهار رادیکال آزاد بر حسب درصد گزارش گردید (۲۲).

فرمول

$$100 \times (\text{جذب شاهد} / \text{جذب شاهد-جذب نمونه}) = \text{درصد مهار رادیکال آزاد DPPH}$$

۲-۸-۲- اندازه گیری قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP)

این آزمون مطابق روش Bougaterf و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. در این روش آنتی اکسیدان ها نقش احیاء کنندگی دارند و باعث احیا آهن فریک به آهن فرو می شود. بسته به قدرت احیاء کنندگی عصاره، رنگ زرد محلول آزمایش به رنگ سبز یا آبی تغییر می یابد (۲۲). توضیح بیشتری در خصوص قراداد عدد آورده شود.

۲-۹- خواص عملکردی

۲-۹-۱- حلالیت

حلالیت پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از روش Bera و Mukherjee (۱۹۸۹) انجام شد. یک گرم نمونه را در ۱۰۰ میلی لیتر محلول آب مخلوط کرده و با استفاده از سود و اسید ۰/۱ نرمال pH آن را به ۱۰-۲ تنظیم کرده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط کرده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰ سانتریفیوژ انجام شده و محتوای نیتروژن در سوپرناتانت نمونه با استفاده از روش کلدال تعیین شد و درصد پروتئین قابل حل با استفاده از معادله (۴) محاسبه شد (۲۳).

معادله (۴)

$$100 \times (\text{گرم وزن نمونه اولیه} / \text{گرم وزن آب ماده جامد محلول در سوپرناتانت}) = \text{اندیس حلالیت در آب}$$

۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه گیری و میزان هیدرولیز از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید (۱۸):

فرمول (۱)

$$(\text{میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرو استیک اسید} / \text{میزان پروتئین در نمونه}) = \text{درجه هیدرولیز}$$

۲-۵- میزان بازیافت پروتئینی

میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت نمونه محلول به روش بیورت تعیین شد. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی استفاده گردید. شدت جذب نور در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر مدل T80 ساخت کشور انگلستان قرائت شد. میزان بازیافت پروتئینی از طریق فرمول ۲ محاسبه گردید (۱۹).

فرمول (۲)

$$100 \times (\text{میزان پروتئین موجود در نمونه} / \text{میزان پروتئین محلول موجود در پروتئین هیدرولیز شده}) = \text{بازیافت پروتئینی}$$

۲-۶- میزان اسید آمینه کل

پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شد. سپس با استفاده از فنیل ایزو تیوسیانات (PITC) عمل مشتق سازی اسیدهای آمینه انجام و میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line (آلمان) با استفاده از ستون C18 با آشکارساز فلورسنت (RF-530) انجام شد (۲۰).

۲-۷- جداسازی پپتیدها

جداسازی پپتیدها توسط اولترافیلتراسیون با سه فیلتر آمیکون با وزن مولکولی مختلف (MWCO) ۳، ۵ و ۱۰ کیلودالتون انجام شد. سه فرکشن ($3kDa > MW$) و ($5kDa - MW$)، ($10kDa - MW$) جدا گردید. ابتدا پروتئین هیدرولیز شده خام با استفاده از فیلتر آمیکون ۳، ۵ و ۱۰ کیلودالتون، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، مدت زمان ۱۰ دقیقه و با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Biophotometer، آمریکا) شد (۲۱).

۲-۹-۲- ظرفیت و پایداری امولسیون کنندگی

به ۳ گرم نمونه، ۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۵۰ میلی لیتر روغن کلزا اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با هموژنایزر هموژنیزه شد سپس به مقدار مساوی در ۴ لوله آزمایش تقسیم گردید و با سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰g به مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفوژ شد EC طبق معادله (۵) زیر گزارش شد (۲۴).

معادله (۵)

حجم کل / حجم قسمت امولسیفیه شده = EC (%)

۱۰ میلی لیتر روغن گیاهی کلزا با ۳۰ میلی لیتر محلول پروتئینی ۱۰ درصد مخلوط شد و pH آنها در پنج pH متفاوت ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ تنظیم شد سپس با هموژنایزر با سرعت ۲۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه هموژنیزه شد سپس با میکروسمپلر ۵۰ میکرولیتر از قسمت مایع ته لوله برداشته که این عمل در زمان‌های $t=0'$ و $t=10'$ انجام گرفت. سپس نمونه‌های به دست آمده در زمان‌های صفر و ده دقیقه با ۵ میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات ۱٪ مخلوط شد و جذب محلول رقیق شده با اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد (۲۴).

معادله (۶)

$$ESI = A_0 \times \Delta t / \Delta A$$

$$\Delta A = A_0 - A_{10}, \quad \Delta t = 10 \text{ min}$$

۲-۹-۳- اندازه‌گیری ظرفیت و پایداری کف کنندگی

برای اندازه‌گیری ظرفیت کف کنندگی ۲۰ میلی لیتر محلول‌های پروتئینی تهیه شد و در استوانه مدرج ۵۰ میلی لیتری ریخته شد. سپس به مدت یک دقیقه با التراترکس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد. حجم مخلوط نهایی قرائت شد. درصد افزایش حجم در زمان صفر نسبت به حجم اولیه به عنوان ظرفیت کف کنندگی در نظر گرفته شد (معادله ۷) (۲۵).

معادله (۷)

حجم نمونه قبل تشکیل کف / حجم نمونه در زمان‌های مختلف بعد از تشکیل کف - حجم نمونه قبل تشکیل کف = ظرفیت کف کنندگی (۱)

برای محاسبه میزان پایداری کف، حجم کف در زمان‌های ۵، ۱۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه بعد از تشکیل کف قرائت شد. سپس با استفاده از رابطه بالا، درصد حجم کف باقی مانده در هر یک از زمان‌های مذکور به عنوان شاخص پایداری کف گزارش شد (۲۵).

۲-۱۰-۱- ارزیابی آماری

طرح آماری مورد استفاده در این پژوهش طرح کاملاً تصادفی و شامل سه تکرار برای هر تیمار بوده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها، با توجه به نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت پذیرفت. از نرم افزار (SPSS version 18) برای آنالیز داده‌ها و Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میزان پروتئین اولیه

میزان پروتئین اولیه جلبک کلرلا ولگاریس برابر با $50/66 \pm 1/16$ درصد بوده است. پروتئین ترکیب اصلی جلبک‌ها می‌باشد به طوری که ۵۰-۷۰ درصد از وزن خشک اکثر جلبک‌ها، پروتئین می‌باشد (۲۶). بسته به نوع گونه، مواد مورد نیاز برای رشد و ترمیم و نگهداری سلول‌ها و شرایط رشد، جلبک کلرلا ولگاریس محتوای پروتئین برابر با ۴۳-۵۸ درصد از وزن خشک آن است (۹، ۲۷، ۲۸). همچنین مقادیر پروتئین هیدرولیز شده در تیمارهای مختلف مابین ۶۵/۱۵-۹۳/۴۶ درصد بوده است.

۳-۲- بررسی مقادیر درجه هیدرولیز

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز نشان می‌دهد که درجه هیدرولیز به طور معنی داری در حضور آنزیم آلکالاز بیشتر از فلاورزایم بود ($P < 0/05$) (جدول ۱) و تاثیر زمان بر درجه هیدرولیز معنی دار بود. همچنین تیمار با حضور آنزیم آلکالاز و در زمان ۳۰ دقیقه بیشترین درجه هیدرولیز را داشت ($P < 0/05$). بر اساس نتایج به دست آمده از اثر زمان بر هیدرولیز پروتئین مشخص گردید که با افزایش زمان واکنش، هیدرولیز آنزیمی با یک فاز سریع آغاز می‌شود در این مرحله تعداد بسیار زیادی از پیوندهای پپتیدی شکسته می‌شود. همچنین، افزایش زمان فرآیند موجب طولانی تر شدن فعالیت آنزیم و اثر آن بر سوبسترا می‌گردد (۲۹). انتخاب آنزیم نقش بسیار مهمی در تولید پروتئین

محلول از انواع غیر محلول و در نتیجه میزان بازدهی فرآیند در طی هیدرولیز آنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهم می باشد (۳۰). نتایج مربوط به بازیافت پروتئینی، پروتئین (جدول ۲) و درجه هیدرولیز در مطالعه حاضر باهم، هم خوانی دارد. به طوری که با افزایش درجه هیدرولیز و میزان بازیافت پروتئینی نیز افزایش پیدا می کند. نتایج مشابهی توسط سایر محققین گزارش شده است، آنهانیز گزارش نمودند با افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر بازیافت پروتئین و میزان پروتئین افزایش یافت (۱۳، ۱۸). در مجموع، تیمار با حضور آنزیم آلکالاز و در زمان ۳۰ دقیقه بیشترین بازیافت پروتئین را داشت ($P < 0.05$).

هیدرولیز شده دارد، زیرا هر آنزیم دارای الگوی متفاوتی در شکستن باندهای پپتیدی می باشد که در ترکیب آمینو اسیدی، وزن ملکولی و فعالیت زیستی پپتیدهای تولید شده اثر خواهد گذاشت (۱۳). آلکالاز به دلیل تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالا در مدت زمان کم، به طور مکرر توسط محققین مختلف مورد استفاده قرار می گیرد (۱۳، ۲۰).

۳-۳- بررسی مقادیر پروتئین و بازیافت پروتئینی

بازیافت پروتئینی یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم ها در هیدرولیز پروتئین های غذایی محسوب می شود که بیان کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین های

جدول ۲- درجه هیدرولیز، محتوای پروتئین و بازیابی پروتئین هیدرولیز پروتئین کلرلا و لگاریس

نام آنزیم	زمان هیدرولیز	درجه هیدرولیز (درصد)	مقادیر پروتئین (درصد)	بازیافت پروتئینی (درصد)
آلکالاز	۱۰	۱۸/۹۸±۰/۳۸ ^d	۷۰/۸۲±۱/۲۵ ^d	۱۳/۹۸±۰/۲۱ ^e
	۲۰	۲۷/۶۳±۰/۵۶ ^b	۸۲/۳۰±۱/۸۵ ^b	۱۶/۲۴±۰/۳۱ ^c
	۳۰	۳۷/۶۳±۰/۵۹ ^a	۹۳/۴۶±۰/۶۹ ^a	۱۸/۴۴±۰/۱۲ ^a
فلاورزایم	۱۰	۱۱/۹۵±۰/۶۶ ^c	۶۵/۱۵±۰/۹۰ ^c	۱۲/۸۶±۰/۱۵ ^e
	۲۰	۱۸/۸۶±۰/۷۰ ^d	۷۴/۴۰±۰/۸۰ ^c	۱۴/۶۸±۰/۱۵ ^d
	۳۰	۲۴/۱۸±۰/۶۵ ^c	۸۱/۳۸±۱/۲۲ ^b	۱۷/۳۶±۰/۲۹ ^b

(۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

(۲) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند سطح آماری هم ذکر شود. (a, b, c, ...)

که پروتئین های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز به دلیل وجود مقادیر بالاتر مقدار اسید آمینه هیدروفوب (^۱HAA) ممکن است اثرات مهاری بر روی چندین نوع رادیکال آزاد داشته باشند. به طور کلی، تفاوت در ماده خام، نوع آنزیم مورد استفاده و شرایط هیدرولیز می باشد در ترکیب اسید آمینه موثر است (۳۱). در مجموع بالاترین مقادیر اسید آمینه در مطالعه حاضر اسید آمینه ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، لوسین به ترتیب ۹/۲۵ و ۸/۰۱ درصد بوده است، بالاترین مقادیر اسید آمینه در مطالعه حاضر اسید آمینه غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم گلوتامیک اسید ۱۰/۸۴، ۱۰/۰۱ و ۱۰/۰۱ درصد بوده است. Jacob-Lopes و همکاران

۳-۴- ترکیب اسید آمینه

در سال های اخیر، ترکیب اسیدهای چرب در مقیاس وسیع تولید ریز جلبک ها از جمله جلبک های دریایی علاقه قابل توجهی را در بین محققان ایجاد کرده است. این امر عمدتاً به دلیل مزایای سلامت بخش اسیدهای چرب مونو و چند غیراشباع (MUFA و PUFA) که در گیاهان دریایی از جمله ریز جلبک ها یافت می شود (۹، ۲۶). نتایج مربوط به ترکیب اسید آمینه (جدول ۳) پروتئین های هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز و فلاورزایم در زمان ۳۰ دقیقه (با توجه به بالاتر بودن بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیز) نشان داد، مجموع اسیدهای آمینه آبگریز برابر با ۳۲/۰۱ و ۲۷/۲۹ برای آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب بوده است. بنابراین، می توان ادعا کرد

جهانی نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه‌ها نباید کمتر از ۴۰ درصد باشد و همچنین میزان اسید آمینه ضروری به غیر ضروری نباید کمتر از ۰/۶ باشد (۳۲). با توجه به نتایج پروتئین هیدرولیز شده از ترکیب اسید آمینه مناسبی برخوردار است. نسبت اسید آمینه ضروری به غیر ضروری آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب برابر با ۰/۹۷ و ۰/۹۹ است و میزان اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه موجود به ترتیب برابر با ۴۹/۲۷ و ۴۹/۸۸ است، که این نتایج نشان دهنده بالا بودن کیفیت پروتئین هیدرولیز شده جلبک کلرلا ولگاریس می باشد.

(۲۰۱۵) بالاترین مقدار اسید آمینه ضروری برای جلبک کلرلا ولگاریس را لوسین اعلام نمودند (۶/۸۴ درصد)، بالاترین مقدار اسید آمینه غیر ضروری را گلو تامیک اسید (۱۰/۷۴ درصد اعلام نمودند (۱۶). Irene و همکاران (۲۰۲۰a) بالاترین مقدار اسید آمینه ضروری برای جلبک کلرلا ولگاریس چند منطقه متفاوت را لوسین (اسید آمینه) اعلام نمودند (مابین ۶/۹۱ - ۱۰/۷۸ درصد)، بالاترین مقدار اسید آمینه غیر ضروری را گلو تامیک اسید مابین ۸/۳۷ - ۱۲/۶۶ درصد اعلام نمودند (۱۴). با توجه به با توجه به گزارش مشترک سازمان بهداشت

جدول ۳- ترکیب اسید آمینه هیدرولیز پروتئین کلرلا ولگاریس

FAO/ WHO, 1990	فلاورزایم	آلکالاز	اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)
	۴/۸۷	۵/۰۲	هیستدین ^۱
۲/۸۰	۴/۱۵	۴/۵۵	ایزو لوسین ^۱
۶/۶۰	۸/۰۱	۹/۲۵	لوسین ^۱
۵/۸۰	۷/۲۱	۵/۸۹	لایزین ^۱
	۱/۰۵	۱/۵۹	متیونین ^۱
۶/۳۰	۴/۰۵	۵/۲۵	فنیل آلانین ^۱
۳/۴	۶/۰۵	۴/۷۵	تروئین ^۱
۳/۵	۵/۰۵	۵/۹۹	والین ^۱
	۸/۲۰	۶/۵۸	آرژنین ^۱
	۹/۸۵	۱۰/۳۵	آسپارتیک اسید
	۵/۲۵	۵/۴۵	پرولین
	۵/۸۷	۵/۰۹	سرین
	۷/۳۵	۸/۴۴	آلانین
	۰/۹۹	۰/۱۸	سیستین
	۱۰/۰۱	۱۰/۸۴	گلو تامیک اسید
۱/۱	۳/۹۹	۵/۲۰	تیروزین
	۵/۵۵	۴/۷۵	گلیسین
	۴۹/۸۸	۴۹/۲۷	نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه
	۰/۹۹	۰/۹۷	نسبت اسید آمینه ضروری به اسید آمینه غیر ضروری
	۹۷/۵۰	۹۹/۱۷	میزان اسید آمینه کل
	۲۷/۲۹	۳۲/۰۱	HAA ^۱

^۱ اسید آمینه ضروری

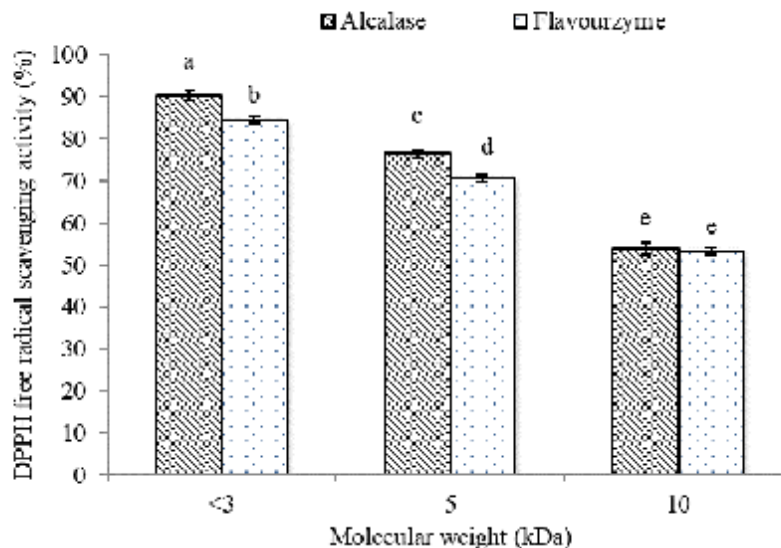
^۲ مجموع اسیدهای آمینه آبگریز (آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروزین، فنیل آلانین، تریپتوفان، پرولین، متیونین و سیستین)

۳-۵- خاصیت آنتی اکسیدانی

۳-۵-۱- فعالیت رادیکال آزاد DPPH

با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده توانایی بالایی برای حذف رادیکال آزاد DPPH (شکل ۱) دارا بودند. دارا بودن توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH توسط جلبک کلرلا ولگاریس توسط Abdel-Karim و همکاران (۲۰۲۰) و Taghavi و همکاران (۲۰۱۹) نیز، گزارش شد (۱، ۳۴). فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز به طور معنی داری بالاتر بود ($P < 0.05$). فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها ارتباط نزدیکی با ترکیب اسید آمینه، ساختار و وزن مولکولی دارد. برخی محققان معتقدند، آمینو اسیدهای هیدروفوب (HAA) دارای قدرت ضد اکسایش می باشند، که بر این اساس مقادیر اسید آمینه HAA در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر از فلاورزایم بوده است. همچنین پتانسیل بالاتر

مهار رادیکال آزاد ممکن است به دلیل کوچکتر بودن پپتیدهای حاصل از هیدرولیز و جداسازی یا غلظت بیشتر مواد دهنده الکترون در هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز باشد (۳۳، ۳۴). میزان فعالیت رادیکال آزاد DPPH در بین وزن مولکولی‌های مختلف اختلاف معنی داری با هم داشتند ($P < 0.05$). با افزایش وزن مولکولی مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH کاهش یافت. به طوری که پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود (۹۰/۳۵ درصد). علت این امر شاید به دلیل وزن مولکولی کم پپتیدهای آن باشد. پپتیدهای کم مولکولی بیشتر در معرض زنجیره جانبی باقی مانده قرار دارند و مسئول تسهیل واکنش بین پپتیدها و رادیکال‌های آزاد هستند بنابراین فعالیت مهار رادیکال DPPH را افزایش می دهند (۱۵).



شکل ۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH هیدرولیز پروتئین کلرلا ولگاریس

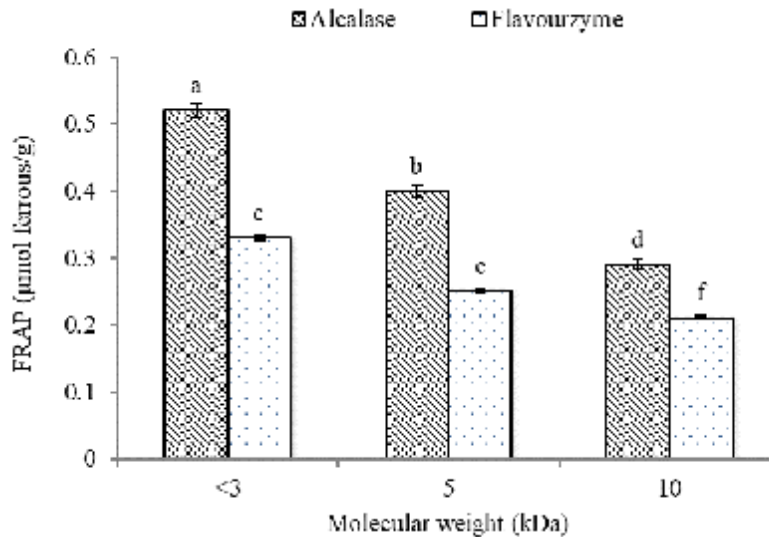
۳-۵-۲- قدرت احیا کنندگی فریک

نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده توانایی بالایی برای قدرت احیای آهن (شکل ۲) دارا بودند. دارا بودن توانایی قدرت احیای آهن در پروتئین هیدرولیز شده جلبک کلرلا ولگاریس توسط Abdel-Karim و همکاران (۲۰۲۰) و Taghavi و همکاران (۲۰۱۹)، Irene و همکاران (۲۰۲۰b) نیز، گزارش شد (۱، ۳۴، ۱۴). قدرت

احیا کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود. گروه‌های ایندول، فنولی و تیروزین نقش مهمی در احیای هیدروژن در یک سیستم اکسیداسیون دارند. به طور کلی، فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز پروتئین جلبک معمولاً با ترکیب، دنباله و آبگریزی اسیدهای آمینه همراه است که افزایش قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز ممکن است به دلیل مطالب بیان شده

کمتر می باشد که دارای مقادیر اسید آمینه آبگریز بالاتر در مقایسه با وزن مولکولی بالا است که با سهولت بیشتری می تواند یک الکترون و اتم هیدروژن برای ثبات Fe^{2+} اهدا کند (۱۵). افزایش قدرت احیای آهن با کاهش وزن مولکولی پپتیدها نشان می دهد که پتانسیل کاهش الکترون بیشتر ناشی از زنجیره های پپتیدی کوتاه می باشد است (۳۷).

باشد (۳۶). با افزایش وزن مولکولی مقادیر قدرت احیا کنندگی یون آهن کاهش یافت ($P < 0.05$). فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود (۴۳/۰ میکرومول فروس/گرم) ($P < 0.05$). قدرت احیای بیشتر به دست آمده توسط ۳ کیلو دالتون به دلیل وزن مولکولی



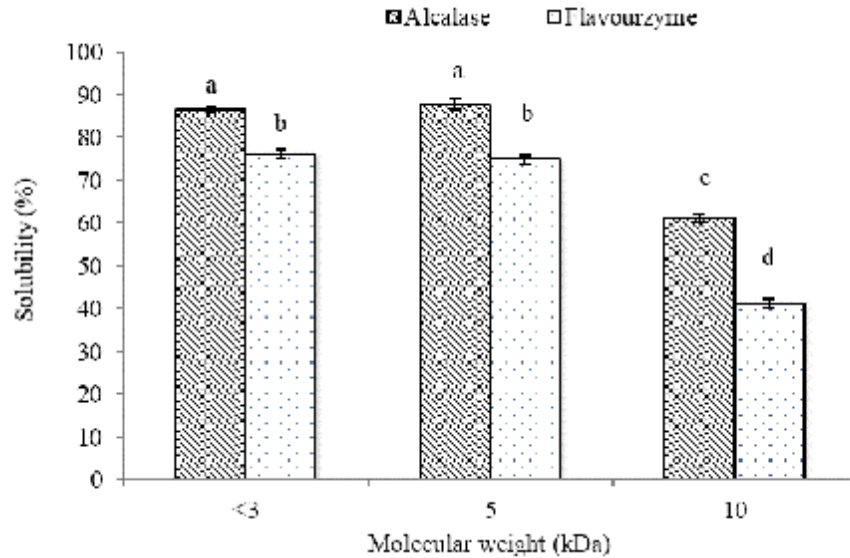
شکل ۲- قدرت کاهش آهن (FRAP) هیدرولیز پروتئین کلرلا و لگاریس

($P < 0.05$). پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی ۵ کیلو دالتون و کمتر از ۳ کیلو دالتون بالاترین حلالیت را دارا بود (۸۷/۸۳ و ۸۷/۶۰ درصد) ($P < 0.05$). این ممکن است به دلیل وجود اسید آمینه آب دوست بیشتر در معرض آب، منجر به تشکیل پیوندهای هیدروژن با آب و افزایش شاخص حلالیت آن باشد و همچنین به علت مقادیر بالاتر اسید آمینه HAA در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز باشد (۳۹). به گفته Wu و همکاران (۱۹۹۸) هنگامی که اسیدهای آمینه در معرض آن ها قرار می گیرند، از طریق پیوندهای هیدروژنی و برهم کنش الکترواستاتیک با مولکول های آب در تعامل خواهند بود و بنابراین هیدرولیزات را حل می کنند (۳۸، ۴۰).

۳-۶- خواص عملکردی

۳-۶-۱- حلالیت

از بین تمام خواص عملکردی پروتئین ها، حلالیت بیشترین تأثیر را در ارتباط با سودمندی پروتئین هیدرولیز شده در سیستم های غذایی را نشان می دهد. سایر خصوصیات خواص عملکردی مانند کف و امولسیون و ویژگی های ژل سازی معمولاً به محلول بودن پروتئین در محیط مربوطه نیاز دارند. بنابراین، به نظر می رسد، پروتئین های نامحلول پتانسیل کاربرد بسیار کمی در مواد غذایی دارند (۳۸). با توجه به نتایج تمامی پروتئین های هیدرولیز شده از حلالیت (شکل ۳) بالایی برخوردار بودند و حلالیت پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز در تمامی زمان های هیدرولیز بالاتر بود. میزان حلالیت در بین وزن مولکولی های مختلف اختلاف معنی داری با هم داشتند

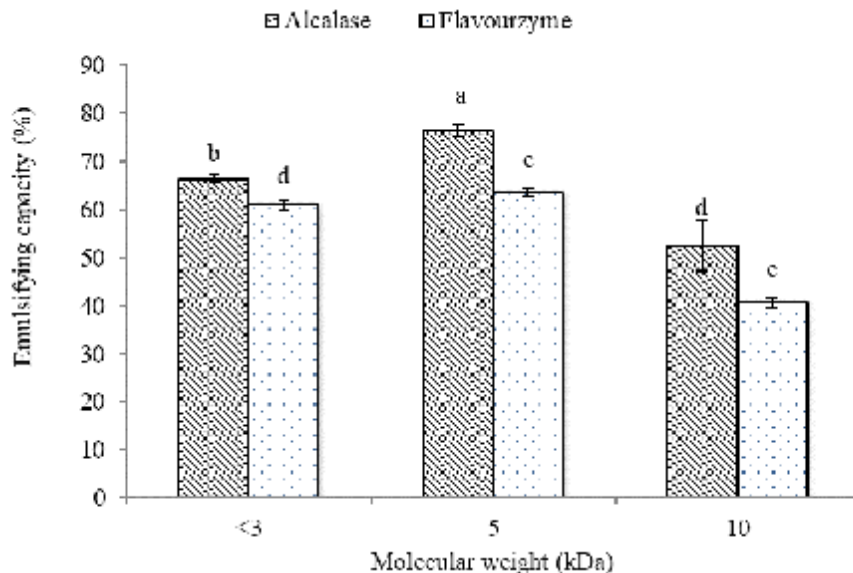


شکل ۳-حلالیت هیدرولیز پروتئین کلرلا و لگاریس

می تواند به نوبه خود سبب افزایش ویسکوزیته و پایداری امولسیون ها شود (۴۱). که ممکن است پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز این ویژگی مثبت را دارا باشد.

۳-۶-۲-خواص امولسیون کنندگی

ظرفیت امولسیون پروتئین هیدرولیز شده (شکل ۴) و پایداری امولسیون (شکل ۵) توسط آنزیم آلکالاز در تمامی زمان های هیدرولیز بالاتر بود در مجموع وجود برخی از پروتئین ها



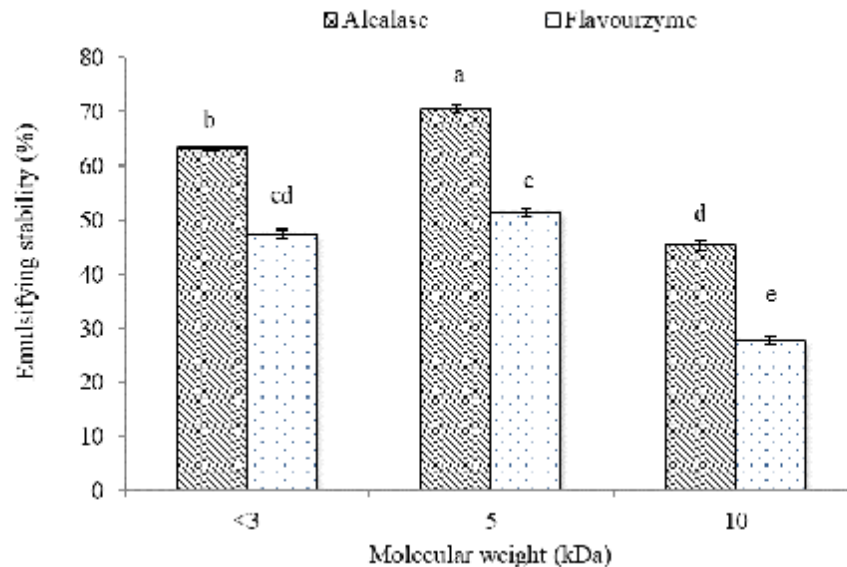
شکل ۴-ظرفیت امولسیون کنندگی هیدرولیز پروتئین کلرلا و لگاریس

کمتر از ۵ کیلو دالتون بود. پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر در مقایسه با پپتیدهای با وزن مولکولی بالاتر به دلیل پپتیدهای کوچک دارای زنجیره کوتاه اسید آمینه است که منجر به عدم باز شدن در رابط می شود و در مقایسه با پپتید بزرگ مولکولی

مقادیر ویژگی های امولسیون تحت تاثیر وزن مولکولی بود پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی ۵ کیلو دالتون بالاترین پایداری امولسیون را دارا بود (۷۰/۵۶ درصد). به طوری که خواص امولسیون در وزن مولکولی ۳ کیلو دالتون

ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده اسکلت ماهی ده باله هندی (*Decapterus macrosoma*) می‌باشد، آن‌ها نیز اعلام نمودند پروتئین هیدرولیز شده با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون خواص امولسیون کنندگی کمتری دارند (۲۰).

دارای راندمان پایین در کاهش کشش سطحی است. به منظور نمایش فعالیت‌های امولسیون بهتر، پروتئین‌ها و یا پپتیدها باید به سرعت به رابط آب/روغن مهاجرت کنند، جایی که آنها به سرعت باز می‌شوند و رابط را دوباره مرتب می‌کنند (۱۵)، (۳۷). این نتایج مشابه نتایج Nasir و Sarbon (۲۰۱۹) در

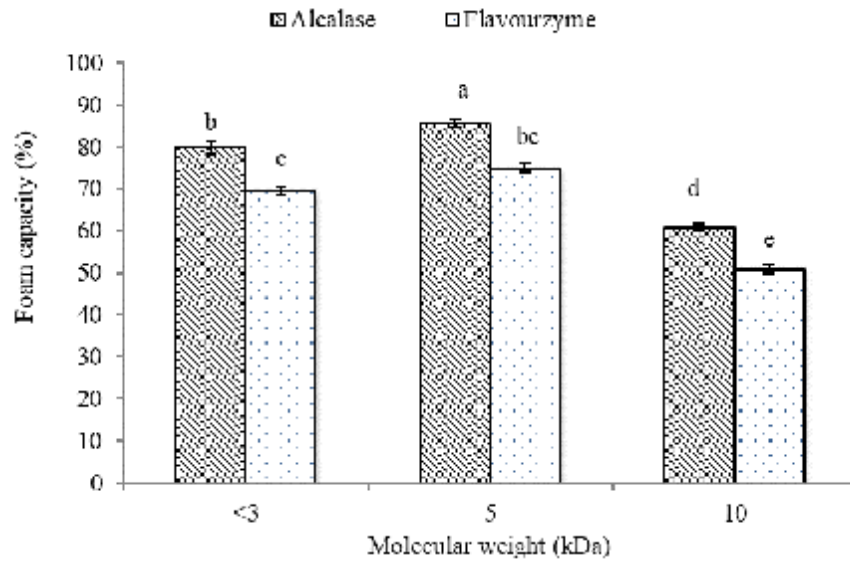


شکل ۵- پایداری امولسیون کننده هیدرولیز پروتئین کلرلا و لگاریس

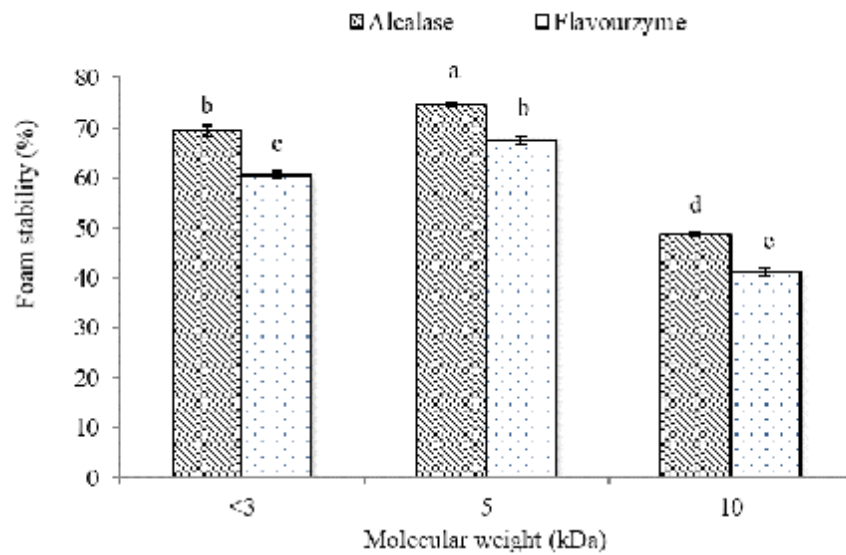
مولکولی پپتید منجر به کاهش ظرفیت کف سازی می‌شود زیرا پپتیدهای کوچک توانایی تثبیت سلول‌های کف را ندارند. علاوه بر این، پپتیدهای کوچکتر اجازه جذب سریع آب را می‌دهند بنابراین کشش سطحی را کاهش می‌دهند. مطالعه انجام شده توسط Razali و همکاران (۲۰۱۵) در مورد ژلاتین هیدرولیز شده پوست ماهی کویانیز نشان داد، بالاترین ظرفیت کف مربوط به هیدرولیز ژلاتین ۵ کیلو دالتون و به دنبال آن ۱۰ کیلو دالتون و ۳ کیلو دالتون بود. بنابراین بر ظرفیت کف پروتئین هیدرولیزات در وزن مولکولی مختلف تأثیر می‌گذارد (۲۷).

۳-۶-۳- خواص کف کنندگی

نتایج مربوط به ظرفیت کف کنندگی (نمودار ۶) و پایداری کف (نمودار ۷)، با هم هم خوانی داشت. تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده از کف کنندگی بالایی برخوردار بودند و کف کنندگی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود. میزان ظرفیت کف کنندگی در بین وزن مولکولی‌های مختلف اختلاف معنی داری با هم داشتند ($P < 0.05$). پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی ۵ کیلو دالتون بالاترین ظرفیت کف کنندگی را دارا بود. کاهش وزن



شکل ۶- ظرفیت کف کردن هیدرولیز پروتئین کلرلا و لگاریس



شکل ۷- پایداری کف هیدرولیز پروتئین کلرلا و لگاریس

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش خواص آنتی اکسیدانی و عملکردی پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی جلبک کلرلا و لگاریس تعیین شد. نتایج مربوط به ویژگی های پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که از میان آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، آنزیم آلکالاز می تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئین بالایی تولید کند و همچنین افزایش زمان هیدرولیز تأثیر مثبتی بر روی ویژگی های مذکور داشت. سپس خاصیت

آنتی اکسیدانی و عملکردی این پروتئین با وزن های مولکولی ۳، ۵ و ۱۰ کیلو دالتون سنجیده شد. نتایج نشان داد، پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی ۳ کیلو دالتون بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود و همچنین از خواص عملکردی مناسبی نیز برخوردار بود، اما خاصیت عملکردی پروتئین با وزن مولکولی ۵ کیلو دالتون بالاتر بود. بنابراین می توان از پروتئین هیدرولیز شده جلبک کلرلا و لگاریس توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی ۳ کیلو دالتون

- (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15, pp.301-313.
8. Chia, S.R., Chew, K.W., Zaid, H.F.M., Chu, D-T., Tao, Y. and Show, P.L., 2019. Microalgal Protein Extraction From *Chlorella vulgaris* FSP-E Using Triphasic Partitioning Technique With Sonication. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 7, p.396.
 9. Elavarasan, K., Naveen Kumar, V. and Shamasundar, B. A., 2014. Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (*Catla catla*) as Influenced by the Nature of Enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38 (3), pp. 1207-1214.
 10. FAO/WHO., 1990. Energy and protein requirements. Report of joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724
 11. Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F. and Varidi, M. J., 2015. Extraction Optimization of Fenugreek Seed Protein. *science of food and agriculture*, 15, pp. 3165-3176.
 12. Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M. and Raymundo, A., 2010. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), pp. 1656-1664.
 13. Hamzeh, A., Rezaei, M. and Khodabandeh, S., 2019. Antiproliferative and antioxidative activities of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein hydrolysates as affected by degree of hydrolysis. *Food Measure*, 12, pp.721-727.
 14. Irene Kai Ru, Tiong., Thilaghavani, Nagappan., Mohd Effendy, Abdul Wahid., Tengku Sifzizul Tengku, Muhammad., Toda, Tatsuki., Woro Hastuti, Satyantini., Gunanti, Mahasri., Patrick, Sorgeloos., Yeong Yik, Sung., 2020b. Antioxidant capacity of five microalgae species and their effect on heat shock protein 70 expression in the brine shrimp
- به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در صنعت غذا و دارو و با وزن مولکولی ۵ کیلودالتون به عنوان ترکیبات عملگرا در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده نمود.
- ۵- منابع**
1. Abdel-Karim, O., Gheda, S., Ahmed Ismail, G. and Abo-Shady, A., 2020. Phytochemical Screening and antioxidant activity of *Chlorella vulgaris*. *Delta Journal of Science*, 41, pp. 81- 91.
 2. Aderinola, T., Fagbemi, T., Enujiugha, V., Monisola Alashi, A. and Emmanuel Aluko, R., 2018. Amino acid composition and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Heliyon*, 4 (10), pp.870-887.
 3. AOAC., 2005. Official Method of Analysis (17th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical chemists.
 4. Bera, M.B. and Mukherjee, R.K., 1989. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *J. Food Sci*, 54(1), 142-145.
 5. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2009. Antioxidant & free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, pp.1198-1205.
 6. Camila Da Costa, D., Karina Oliveira, L., Caio Hendrix, L., Fabíola Helena, D., Da Rocha, M. and Prentice, P., 2019. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Protein Hydrolysates and Peptide Fractions Derived from *Colossomacropomum* and Their Effect on Ground Beef Lipid Oxidation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(6), pp. 677-688.
 7. Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T. and Ding, G. F., 2015. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam

- hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2), pp. 460-465.
23. Pezeshk, S., Ojagh, S., Rezaei, M. and Shabanpour, B., 2019. Antioxidant and Antibacterial Effect of Protein Hydrolysis of Yellowfin Tuna Waste on Flesh Quality Parameters of Minced Silver Carp. *Journal of Genetic Resources*, 3(2), pp.103-112.
 24. Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R. and O'Brien, N., 2009. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19(11), pp. 643-654.
 25. Prasad, K.N., Xie, H., Hao, J., Yang, B., Qiu, S., Wei, X., Chen, F. and Jiang, Y., 2010. Antioxidant and anticancer activities of 8-hydroxypsoralen isolated from wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] peel. *Food Chemistry*, 118, pp. 62-66.
 26. Rajabzadeh, M., Pourashouri, P., Shabanpour, B. and Alishahi, A., 2017. Amino acid composition, antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from the roe of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Food Science & Technology*, 53(2), pp.313-319.
 27. Razali, A.N., Amin, A.M. and Sarbon, N.M., 2015. Antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight. *International Food Research Journal*, 22(2), pp. 651-660.
 28. Saallah, S., Ishak, N.H. and Sarbon, N.M., 2020. Effect of different molecular weight on the antioxidant activity and physicochemical properties of golden apple snail (*Ampullariidae*) protein hydrolysates. *Food Research*, 4 (4), pp. 1363-1370.
 29. Safi, C., Zebib, B., Merah, O. and Pontalier, P., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, pp.265-278.
 30. Shahi, Z., Sayyed-Alangi, S. Z. and Najafian, L., 2020. Effects of enzyme *Artemia*, *Aquaculture Reports*, 18, pp.100433, ISSN 2352-5134,
 15. Irene Tiong, Kai Ru., Yeong, Yik Sung., Malinna, Jusoh., Mohd Effendy Abdul Wahid. and Thilaghavani, Nagappan., 2020a. *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts, *Applied Phycology*, pp. 2- 11.
 16. Jacob-Lopes, E., Ramírez Mérida, L. G., Queiroz, M. I., Zepka, L. Q., 2015. Microalgal biorefineries. In E. Jacob-Lopes & L. Q. Zepka (Eds.), *Biomass production and uses*. London: IntechOpen.
 17. Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W. and Luo, L., 2010. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119, pp. 336-42.
 18. Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E. and Espe, M., 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) frames by Protamex™ protease. *Process Biochemistry*, 37, pp.1263-1269.
 19. Mohamed, B. E., Abo-El-Khair, M., Samah, M. and Shalaby, G., 2013. Quality of Novel Healthy Processed Cheese Analogue Enhanced with Marine Microalgae *Chlorella vulgaris* Biomass. *World Applied Sciences Journal*, 23 (7), pp. 914-925
 20. Nasir, S.N.A.M. and Sarbon, N.M., 2019. Angiotensin converting enzyme (ACE), antioxidant activity and functional properties of shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) muscle protein hydrolysate at different molecular weight variations. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, pp.101254.
 21. Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M. and Keshavarz, M., 2012. A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*, 18 (7), pp. 950-956.
 22. Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B., 2012. Chemical and biochemical

36. Varedesara, M.S., Ariai, P. and Hesari, J., 2021. The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of *Lactobacillus casei* in it. *Food Sci Nutr*, 9, pp. 2180–2190.
37. Wouters, A. G. B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K. and Delcour, J.A., 2016. Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein Hydrolysates in food systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 15, pp.786– 800.
38. Wu, W.U., Hettiarachchy, N.S. and Qi, M., 1998. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 75(7), pp.845–850.
39. Yaghoubzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R. and Fattahi, E., 2020. Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Bioactive Peptides from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Skin Hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, pp.625–632.
40. Ye, N., Hu, P., Xu, S., Chen, M., Wang, S., Hong, J. and Cai, T., 2018. Preparation and characterization of antioxidant peptides from carrot seed protein. *Journal of Food Quality*, 15 (2), pp. 1–9.
41. Zielinska, E., Kara's, M. and Baraniak, B., 2018. Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *LWT*, 91, pp.168–174.
- type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted *Bunium persicum* Bioss. press cake. *Heliyon*, 6(2), pp. 256-270.
31. Shahidi, F. and Onodenalore, A., 1995. Water dispersions of Myofibrillar Proteins from Capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, pp.51-54.
32. Sheng, L., Olsen, S.A., Hu, J., Yue, W., Means, W.J. and Zhu, M.J., 2016. Inhibitory effects of grape seed extract on growth, quorum sensing, and virulence factors of CDC “top-six” non-O157 Shiga toxin producing *E. coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 229, pp. 24-32.
33. Slizyte, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M. and Rustad, T., 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*gadus morhua*) Backbones. *Process Biochemistry*, 44, pp. 668-677.
34. Taghavi Takyar, M.B., Khajavi, S. H. and Safari, R., 2019. Evaluation of antioxidant properties of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* and their application in order to extend the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigerated storage. *LWT*, 100, pp. 244- 249.
35. Taheri, A., Anvar, S., Ahari, H. and Fogliano, V., 2013. Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout . *IJFS*, 12(1), pp. 154-169

(Original Research Paper)
**Evaluation of Antioxidant and Functional Properties of
Hydrolyzed Protein from *Chlorella Vulgaris* by Enzymatic
Hydrolysis**

Shima Taghdiri¹, Mojgan Emteyazjoo^{2*}, Mohammad Hossein Azizi³, Peiman Ariayi⁴, Marjaneh Sedaghati⁵

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

2-Associate Professor, Faculty of Marine Science and Technology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

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

Received:05/03/2022

Accepted:23/05/2022

Abstract

Microalgae are one of the oldest inhabitants of the oceans and freshwaters. One of the most famous is the green seaweed *Chlorella vulgaris*. In this study, the antioxidant and functional properties of the hydrolyzed protein of *Chlorella vulgaris* were determined. For this purpose, the hydrolyzed protein of *Chlorella vulgaris* was produced by commercial enzymes alcalase and flavourzyme at intervals of 10, 20 and 30 minutes. The results related to the properties of hydrolyzed protein showed that the protein hydrolyzed by alcalase had a higher degree of hydrolysis than the enzyme flavourzyme. As well as, increasing the hydrolysis time had a positive effect on the mentioned parameters ($p < 0.05$). The highest values of degree of hydrolysis and protein recovery were observed by alcalase at 30 minutes (37.63% and 18.44%, respectively). *Chlorella vulgaris* was high in essential amino acids. Then, the antioxidant and functional properties of proteins (by both enzymes at 30 minutes) were measured with molecular weights of 3, 5 and 10 kDa. The results showed that the protein hydrolyzed by alcalase enzyme with a molecular weight of 3 kDa had the highest antioxidant activity ($p < 0.05$) and also had good functional properties. Therefore, the hydrolyzed protein derived from the alga *Chlorella vulgaris* (by the enzyme alcalase) can be used as a substitute for animal proteins in the diet as well as functional compounds in food formulations.

Keywords: Antioxidant, Alcalase and Flavourzyme Enzyme, Hydrolyzed Protein, *Chlorella Vulgaris*.

*Corresponding Author: moz_emtyazjoo@yahoo.com

(مقاله پژوهشی)

اثر درجه برستگی نان تافتون بر مقدار آکريل آميد و مقايسه دو روش آنزيم آسپاراژيناز و اسيد استيك بر کاهش آن

معصومه بارانی^۱، محمدشاهدی باغ خندان^{۲*}، میلاد فتحی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۷

DOI: [10.30495/jfst.2022.1957589.1792](https://doi.org/10.30495/jfst.2022.1957589.1792)

چکیده

غلظت به واسطه دارا بودن مقادیر بالای کربوهیدرات، حین حرارت دهی دستخوش تغییراتی می‌شوند که گاهی مطلوب و گاهی نامطلوب می‌باشد. از جمله این واکنش‌ها می‌توان به میلارد اشاره کرد. و از محصولات مضر این واکنش می‌توان آکريل آميد را نام برد. از این رو هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر درجه برستگی بر میزان آکريل آميد و اثر دو روش آنزيم آسپاراژيناز و اسيد استيك بر کاهش آن در نان تافتون می‌باشد. برای این منظور میزان آکريل آميد در نان تافتون در حالت بدون برستگی، برستگی سطح یک و دو، مورد ارزیابی قرار گرفت و همان‌طور که انتظار می‌رفت با افزایش میزان برستگی (افزایش زمان پخت)، آکريل آميد بیشتری در نان تولید می‌شود. سپس میزان آکريل آميد و خصوصیات حسی در نان‌هایی که خمیر آن‌ها تحت تیمار اسيد استيك در غلظت‌های ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد و آنزيم آسپاراژيناز در غلظت ۵۰۰ و ۲۵۰ ppm قرار گرفته بودند بررسی شد، استفاده از اسيد استيك و آنزيم آسپاراژيناز به صورت ترکیبی طبق برنامه‌ریزی با نرم‌افزار Design expert 2013 صورت گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر معنی‌دار بودن اثر برستگی بر رنگ، معنی‌دار نبودن اثر آنزيم آسپاراژيناز و اسيد استيك بر رنگ و معنی‌دار بودن اثر برستگی و آنزيم آسپاراژيناز بر محتوای آکريل آميد می‌باشد. نتایج بهینه‌سازی با نرم‌افزار Design expert 13 نشان داد پخت نان در برستگی سطح دو در حضور آنزيم آسپاراژيناز با غلظت ۵۰۰ ppm و اسيد استيك با غلظت ۰/۳ درصد، کمترین میزان آکريل آميد، با حفظ مطلوبیت خواص ارگانولپتیکی را به همراه دارد.

واژه های کلیدی: آنزيم آسپاراژيناز، اسيد استيك، فرایند پخت، غلات، واکنش میلارد.

۱-مقدمه

از سال‌های بسیار دور تا کنون، غلات و محصولات مشتق شده از آن (مانند نان) در تغذیه مردم دنیا جایگاه مهمی به خود اختصاص داده است. غلات به سبب دارا بودن مقادیر بالای کربوهیدرات و حضور اسیدهای آمینه در ساختارشان گاهی حین حرارت‌دهی دستخوش تغییراتی می‌شود که برای سلامت مصرف‌کننده مضر است. از جمله این تغییرات میتوان به واکنش میلارد اشاره کرد که صرف نظر از بافت، رنگ و طعم مطلوبی که به نان می‌دهد منجر به تولید ترکیباتی می‌شود که مشکوک به سرطانزایی هستند. میلارد یک واکنش شیمیایی بین قندهای احیاکننده و اسید آمینه است که منجر به تولید برخی ترکیبات عامل رنگ و عطر و طعم در محصول می‌شود و این امر به خصوص در محصولات نانویی اهمیت دارد (۲۳). اما با این حال برخی محصولات جانبی ناشی از واکنش میلارد خطرناک شناخته شده و مشکوک به سرطان‌زایی هستند که از جمله می‌توان به آکریل آمید اشاره کرد. البته آکریل آمید در شکل پلیمری مشکل‌ساز نیست و در صنایع شیمیایی مختلف کاربرد دارد و شکل مونومر آن دارای سمیت است (۱۳). تولید آکریل آمید در ماده غذایی از راه‌های مختلفی می‌تواند صورت گیرد اما مهم‌ترین آن واکنش میلارد در دماهای بالاتر از ۱۲۰ درجه سلسیوس بین اسیدهای آمینه و به ویژه اسید آمینه آسپاراژین و قندهای احیاکننده است (۱۱). با توجه به وزن مولکولی پایین و قطبی بودن آکریل آمید پس از ورود به بدن حیوانات و انسان به سرعت توزیع می‌شود. با این حال این احتمال وجود دارد که برهم کنش آکریل آمید با ماتریس غذایی نظیر پروتئین بر جذب آن تاثیر بگذارد (۶). دانشمندان به مقادیر بالای آکریل آمید در مواد غذایی پر نشاسته مانند نان و سیب‌زمینی و کم بودن مقدار آن در مواد غذایی پروتئینی مانند گوشت پی برده‌اند (۲۲). آکریل آمید ترکیبی بالقوه سرطان‌زاست که در بدن تجزیه می‌شود و متابولیتی به نام گلاسید آمید تولید می‌کند. دریافت آکریل آمید در غلظت‌های بالا منجر به بروز اختلالات عصبی می‌شود. همچنین ایجاد سرطان توسط آکریل آمید در موش‌ها و جانوران جوندگی تایید شده است. البته آثار سمی آکریل آمید در حضور مونومر آن بروزی کند.

بنابراین با توجه به سرطان‌زا و مخاطره‌آمیز بودن آکریل آمید حتی در مقادیر کم پیدا کردن راه‌هایی برای کاهش تولید و یا به دام انداختن این ترکیب ضروری است. راهکارهای مختلفی برای کاهش تولید آکریل آمید حین پخت یا سرخ کردن مواد غذایی نشاسته‌ای وجود دارد. مانند کاهش pH، کنترل دما و زمان حرارت دهی، کنترل میزان برشته‌گی، کنترل رطوبت و افزایش فعالیت آبی، افزودن یون‌های چند ظرفیتی، استفاده از آنتی‌اکسیدان و استفاده از آنزیم آسپاراژیناز^۱ می‌باشد. به نظر می‌رسد استفاده از آنزیم آسپاراژیناز به سبب هدف قرار دادن عامل اصلی تشکیل آکریل آمید یعنی همان اسید آمینه آسپاراژین و خارج کردن آن از واکنش‌روشی کارآمد برای کاهش تولید آکریل آمید می‌باشد. آنزیم آسپاراژیناز به عنوان کاتالیزور هیدرولیز آسپاراژین به آسپارتیک اسید و آمونیاک عمل می‌کند در مطالعه‌ای مشابه زیواک و همکاران (۲۰۰۳) اثر تیمار آسپاراژیناز را بر پوره سیب زمینی که در میکروویو پخته بود ارزیابی کردند و دریافتند که استفاده از آسپاراژیناز میزان آسپاراژین را تا ۸۸ درصد و میزان آکریل آمید را تا ۹۹ درصد نسبت به روش بدون آنزیم کاهش می‌دهد (۲۶). در پژوهشی دیگر تاثیر میزان برشته‌گی بر محتوای آکریل آمید آن بررسی شد. و نتایج حاصل نشان دادند که در نان‌هایی که برشته نشدند و یا از دمای ۱۴۰ درجه سلسیوس برای فرآیند پخت استفاده گردید، آکریل آمید دیده نشد. اما حضور این ترکیب در نان آرد گندم پخته شده در دمای ۱۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۶ دقیقه و در نان آرد چاودار پس از ۲۲ دقیقه در همان شرایط دمایی گزارش گردید (۲۱). همچنین دیگر مطالعات این موضوع را تایید کردند که در نان حجیم زمانی که بیشترین محتوای آکریل آمید در پوسته تشکیل شود مغز نان به طور تقریبی فاقد آکریل آمید می‌باشد. بر این اساس هیچ آکریل آمیدی در قسمت برشته نشده نان دیده نشد. علت این موضوع عدم ایجاد واکنش میلارد در قسمت‌های غیر برشته می‌باشد. در دماهای بالا و مدت زمان طولانی پخت محتوای آکریل آمید کاهش می‌یابد و علت این موضوع به تجزیه حرارتی آکریل آمید،

¹-Asparaginase

کشوردانمارک تهیه گردید. مواد مورد استفاده برای استخراج آکریل آمید شامل، آب دیونیزه، اسیداستیک خالص، محلول کارز ۱ و ۲، برومید پتاسیم، اسید هیدروبرومیک، تیوسولفات سدیم ۱ مولار، اتیل استات/هگزان و سولفات سدیم برند مرک ساخت کشور آلمان تهیه گردید.

۲-۲- تهیه نان تافتون

فرمولاسیون نان (نمونه شاهد) بر اساس درصد به ازای ۱۰۰ گرم آرد شامل ۶۰ تا ۶۵ درصد آب ولرم ۱ درصد نمک (طبق دستورالعمل مجاز نمک مصرفی از طرف سازمان غذا و دارو) و ۱/۵ درصد خمیر خشک (طبق دستورالعمل شرکت سازنده) می باشد. لازم به ذکر است پیش از تهیه خمیر مواد پودری در آب حل شده سپس آرد به سایر اجزا اضافه شد. در نمونه‌ها اسید استیک در غلظت ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد به ازای وزن خمیر (کل فرمولاسیون نان پس از تخمیر کامل) در برخی از نمونه‌ها آنزیم آسپاراژیناز در غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm به ازای وزن آرد به فرمول افزوده شد. ذکر این نکته ضروری است که آنزیم آسپاراژیناز به همراه سایر مواد پودری در آب حل می شود و دمای بهینه برای فعالیت آن بین ۴۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس است. لذا دمای آب مصرفی برای حل کردن مواد پودری مشکلی در فعالیت آنزیم ایجاد نمی کند. سپس خمیرهای آماده پس از چونه گیری به مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سلسیوس انتقال یافت و مرحله تخمیر انجام شد. از آن جا که pH مطلوب برای فعالیت آنزیم بین ۵ تا ۸ می باشد و عمده فعالیت آنزیم در مرحله تخمیر اتفاق می افتد لذا در نمونه های حاوی اسید و آنزیم به منظور جلوگیری از افت pH و مداخله در فعالیت آنزیم، اسید پس از پایان مرحله تخمیر و قبل از مرحله پخت به خمیر اضافه گردید و به وسیله دست جهت اختلاط با خمیر ورز داده شد. پس از اتمام فرآیند تخمیر و آماده شدن تیمارها، چونه های آماده به شکل دایره با قطر ۴۰ سانتی متر و ضخامت ۳ الی ۴ میلی متر درآمده و سپس وارد مرحله پخت نان در تنور سنتی با شعله مستقیم شدند. نمونه های نان با سه

واکنش با ترکیبات دیگر و یا پلیمریزاسیون نسبت داده شده است (۴). پارکر و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان کردند استفاده از تکنیک آنزیم آسپاراژیناز برای کاهش تولید آکریل آمید با حفظ ویژگی های حسی موثر می باشد، زیرا آسپاراژیناز تاثیر چندانی در تشکیل رنگ و طعم محصول ندارد (۱۸). پدرشی و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم آسپاراژیناز به ترتیب ۶۰ درجه سانتیگراد و ۷ می باشد. در این مطالعه کاهش ۶۷ درصدی محتوای آکریل آمید تولید شده در سیب زمینی سرخ شده تحت اثر تیمار آسپاراژیناز و دمای کنترل شده نسبت به روش معمول رویت شد (۱۹). آن چه از نتیجه مطالعات مشابه در این زمینه به دست آمد، بیانگر تاثیر بسزای آنزیم آسپاراژیناز بر کاهش محتوای آکریل آمید می باشد. بر این اساس هدف از این پژوهش بررسی تاثیر برشتگی طی فرآیند پخت نان تافتون و همچنین افزودن آنزیم آسپاراژیناز و اسید استیک به فرمولاسیون نان بر میزان آکریل آمید و مقایسه اثر دو روش برای کاهش این ترکیب و پیدا کردن شرایط بهینه برای تولید نان تافتون با استفاده از طرح سطح پاسخ (RSM) آزمون باکس بنکن^۱ بود.

۲-مواد و روش ها

۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده برای تولید نان شامل آرد مخصوص تافتون کارخانه آرد اطلس اصفهان (ویژگی های آرد تافتون طبق استاندارد ملی ۱۰۳: خاکستر ۱/۲۲۵-۰/۸۵۱ درصد، رطوبت حداکثر ۱۴/۲ درصد، پروتئین درصدوزنی بر مبنای ماده خشک حداقل ۱۱)، نمک خوراکی، مخمر خشک نانویی از شرکت فریمان تولید شده در استان خراسان رضوی (جهت حصول نتیجه بهتر، میزان مصرف خمیرمایه فریمان ۰۰۵ تا ۱۰۵ درصد وزن آرد مصرفی توصیه شده است، درجه حرارت مطلوب بین ۳۷ تا ۴۰ و pH بهینه بین ۴ تا ۶) می باشد. برای تیمارهای کاهش آکریل آمید اسید استیک و آنزیم آسپاراژیناز به ترتیب از شرکت مرک^۲ ساخت کشور آلمان و شرکت نووزیم^۳ ساخت

1- Box Behnken Design (BBD)

2-Merck

3-Novozymes

به حجم ۲۵۰ میلی لیتر ریخته شد و به آن ۱۵۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر شده اضافه گردید. مخلوط به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شد. یک میلی لیتر اسید استیک خالص به مخلوط اضافه گردید تا pH آن به ۴ تا ۵ برسد. به منظور رسوب پروتئین ها ۲ میلی لیتر محلول کارز ۱ (۳۵/۸) گرم فری سیانید پتاسیم با سه ملکول آب تبلور به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) و ۲ میلی لیتر محلول کارز ۲ (۲۲/۸) گرم سولفات روی با ۷ ملکول آب تبلور به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) به مخلوط آماده شده اضافه گردید. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ثقل ۱۶۰۰۰ g سانتریفوژ شد و مایع رویی آن با عبور از پشم شیشه در بالن ۲۵۰ میلی لیتری صاف گردید (۲۰). برای کاهش قطبیت آکریل آمید و افزایش تمایل آن برای استخراج با حلال آلی، مشتق سازی روی آن انجام میگیرد و آکریل آمید به ۲ و ۳ دی برومو پروپینامید تبدیل میشود. بدین منظور، ۷/۵ گرم برومید پتاسیم به محلول استخراج شده اضافه شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر اسید هیدروبرومیک به آن افزوده گردید تا pH آن به ۱ تا ۳ برسد. ضمن هم زدن، ۱۰ میلی لیتر محلول آب برم اشباع به آن اضافه گردید. درب ظرف با فویل آلومینیوم پوشانده و به مدت یک ساعت در حمام یخ قرار داده شد. پس از خروج از حمام یخ اجازه داده شد با محیط هم دما گردد. ضمن هم زدن بالن، قطره قطره محلول تیوسولفات سدیم یک مولار برای خنثی سازی برم اضافی به بالن اضافه شد تا رنگ محلول به حالت بیرنگ اولیه تبدیل شود (۲۰، ۲۵). محلول به دست آمده به قیف جداکننده انتقال داده شد و ۵۰ میلی لیتر اتیل استات / هگزان (۴ اتیل استات + ۱ هگزان) به آن اضافه گردید و یک دقیقه به آرامی هم زده شد. محلول حدود ۱۰ دقیقه به حال سکون نگه داشته شد تا دو فاز شود. فاز رویی از میان ۱۵ گرم سولفات سدیم و پشم شیشه روی کاغذ صافی (به منظور آبگیری) عبور داده شد و به بالن ته گرد منتقل گردید. قیف و پشم شیشه دو مرتبه با مخلوطی از ۱۰ میلی لیتر اتیل استات / هگزان شستشو داده شد و به همان بالن منتقل گردید. ۲ و ۳ دی برومو پروپینامید با اتیل استات از آب استخراج شد (۲۵).

سطح برشتگی متفاوت تهیه شد. برشتگی سطح اول که دارای کمترین سطح برشتگی بود، خمیر به مدت ۶۰ ثانیه حرارت دید. برشتگی سطح دوم که برشتگی بیشتری نسبت به قبلی بود به مدت ۹۰ ثانیه حرارت دید و در آخر نمونه هایی با برشتگی زیاد که به مدت ۱۲۰ ثانیه حرارت دهی شد و در هر سه تیمار دمای تور ۲۰۰ درجه سلسیوس بود. پس از آماده شدن نان های تازه برای انجام آنالیز رنگ به آزمایشگاه انتقال یافت و نمونه هایی نیز به منظور آنالیز آکریل آمید، در دمای ۲۵ درجه (در محیط) خشک شد (۱۷).

۳-۲- آنالیز رنگ

۳-۲-۱- رنگ سنجی به روش هانتربل

این آزمون با استفاده از دستگاه رنگ سنج ZE6000 انجام شد. در این سیستم رنگ بر مبنای سه پارامتر L^* : میزان روشنی با مقداری بین صفر تا صد، a^* : میزان سبز و قرمزی نمونه با مقدار مثبت و منفی و b^* : میزان آبی و زرد بودن نمونه با مقدار مثبت و منفی ارزیابی می شود. دستگاه از سه فیلتر و سه فتوسل که به یک گالوانومتر بسیار حساس متصل می باشد، تشکیل شده است. برای اندازه گیری رنگ نمونه قسمتی از نمونه را روی مسیر تابش نور دستگاه قرار داده و مقادیر L^* ، a^* و b^* نور انعکاس یافته از جسم بر روی دستگاه نمایش داده شد و تغییرات رنگی بر اساس رابطه ۱ محاسبه گردید (۱۶).

رابطه (۱)

$$E = \sqrt{(L - L_c)^2 + (a - a_c)^2 + (b - b_c)^2}$$

که در این رابطه L : شاخص بعد سفیدی و سیاهی برای نمونه، L_c : شاخص بعد سفیدی و سیاهی برای نمونه شاهد، a : شاخص بعد قرمزی و سبزی برای نمونه، a_c : شاخص بعد قرمزی و سبزی برای نمونه شاهد، b : شاخص زردی و آبی برای نمونه، b_c : شاخص زردی و آبی برای نمونه شاهد می باشد (۱).

۳-۲-۲- استخراج آکریل آمید

به منظور انجام این آزمون ۱۵ گرم پودر نمونه در لوله سانتریفوژ

(۸). آزمون حسی مطابق روش هدونیک هفت نقطه‌ای (از بسیار نامطلوب تا بسیار مطلوب) انجام گرفت و صفات عطر و طعم، رنگ، بافت و پذیرش کلی نان توسط داوران مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۶- بهینه سازی

هدف از بهینه سازی، به دست آوردن تیمار بهینه به منظور تولید محصولی با کیفیت ارگانولپتیکی مطلوب و همچنین کم‌ترین میزان آکریل آمید می‌باشد. در این مرحله داده‌های حاصل از انجام آزمایشات به نرم افزار Design 13 expert آزمون باکس بنکن داده شد. برای یافتن نقطه بهینه کم‌ترین سطح آکریل آمید، و بالاترین سطح برای رنگ نان تعریف شد.

۲-۷- تیمارها

با استفاده از نرم افزار Design expert 2013 تیمارهای زیر جهت انجام پژوهش داده شد و از این جا به بعد در نمودارها به جای آوردن ویژگی‌های هر تیمار از شماره تیمار استفاده می‌شود.

محلول‌های استاندارد آکریل آمید با غلظت‌های ۱، ۵، ۲۰، ۷۵ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام آماده و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. ستون ارزیابی آکریلامید ZBWAX با طول ۳۰متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر بود. حجم و دمای تزریق به ترتیب یک میکرولیتر و ۲۶۰ درجه سلسیوس بودند. گاز حامل هلیوم و سرعت خطی جریان گاز شناساگر ۶۲ سانتیمتر بر ثانیه و نوع تزریق آن غیر انشعابی تنظیم گردید. پس از تزریق استانداردهای تهیه شده با غلظت‌های ذکر شده به دستگاه، منحنی کالیبراسیون بین سطح زیرمنحنی و غلظت آکریل آمید (پی‌پی‌ام) محلول‌های استاندارد رسم گردید. سپس میزان آکریل آمید نمونه‌ها به کمک معادله خطی به دست آمده ($R^2 = 0/995$) بر اساس وزن خشک آنها محاسبه شد (۲).

۲-۵- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی به منظور بررسی میزان بازارپسندی محصول در نمونه شاهد و نمونه بهینه صورت گرفت. نمونه‌های نان پس از سرد شدن، به منظور ارزیابی بین ۱۲ داور انتخابی توزیع شد. محل داوران در طول آزمون حسی ثابت بود و زمان آزمون‌های حسی حدود ساعت ۱۱ صبح انتخاب شد

شماره تیمار	ویژگی‌ها	شماره تیمار	ویژگی‌ها
۱ (شاهد)	اسید ۰، آنزیم ۰، برشتگی سطح ۲	۸	اسید ۰/۱۵، آنزیم ۲۵۰، برشتگی سطح ۱
۲	اسید ۰، آنزیم ۰، برشتگی سطح ۱	۹	اسید ۰/۳، آنزیم ۲۵۰، برشتگی سطح ۰
۳	اسید ۰/۱۵، آنزیم ۰، برشتگی سطح ۰	۱۰	اسید ۰/۳، آنزیم ۲۵۰، برشتگی سطح ۲
۴	اسید ۰/۱۵، آنزیم ۰، برشتگی سطح ۲	۱۱	اسید ۰، آنزیم ۵۰۰، برشتگی سطح ۱
۵	اسید ۰/۳، آنزیم ۰، برشتگی سطح ۱	۱۲	اسید ۰/۱۵، آنزیم ۵۰۰، برشتگی سطح ۰
۶	اسید ۰، آنزیم ۲۵۰، برشتگی سطح ۰	۱۳	اسید ۰/۱۵، آنزیم ۵۰۰، برشتگی سطح ۲
۷	اسید ۰، آنزیم ۲۵۰، برشتگی سطح ۲	۱۴	اسید ۰/۳، آنزیم ۵۰۰، برشتگی سطح ۲

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج ارزیابی رنگ نان تافتون

با توجه به جدول ۱ آنالیز واریانس داده‌ها بیانگر معنی دار بودن اثر تیمار برشتگی بر رنگ نمونه می‌باشند ($p < 0/01$). آن چه از آنالیز واریانس داده‌ها بر رنگ به دست آمد نشان داد تاثیر افزودن اسید استیک و آنزیم آسپاراژیناز بر رنگ نان غیرمعنی دار بوده است ($p > 0/05$). در پژوهش‌های مشابه

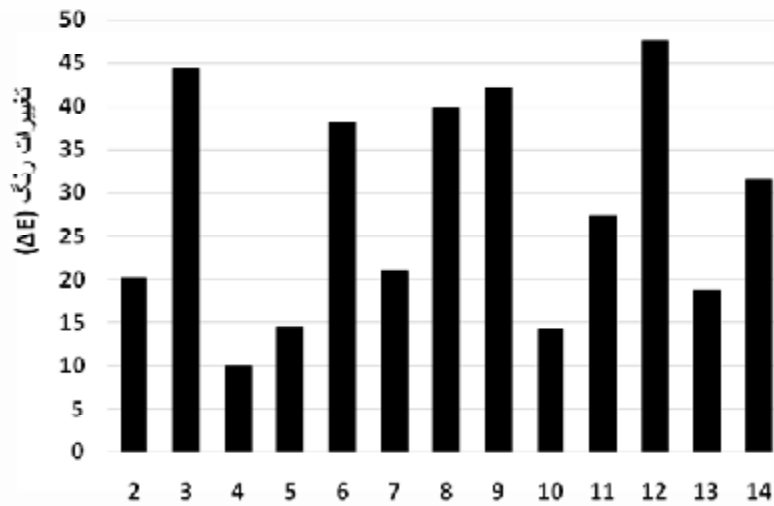
نیز اثر اسید حاصل از تخمیر و آنزیم آسپاراژیناز بر رنگ نان غیرمعنی دار بود (۵، ۱۰). هرچه میزان ΔE بیشتر باشد بیانگر روشن تر بودن رنگ و هرچه مقدار ΔE کمتر باشد بیانگر تیرگی رنگ نان می‌باشد (۱). همان‌گونه که در شکل ۱ ملاحظه می‌گردد، تیره‌ترین رنگ در تیمار حاوی ۰/۱۵ درصد اسید استیک و بیشترین میزان برشتگی با ΔE حدود ۱۰ مشاهده گردید. این در حالی بود که روشن‌ترین رنگ در تیمار

حاوی ۰/۱۵ درصد اسیداستیک، ۵۰۰ ppm آنزیم آسپاراژیناز در آردو بدون برشتگی با ΔE حدود ۴۷/۵۸ مشاهده گردید.

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف بر رنگ نان تافتون

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (رنگ)
مدل	۳	۵۴۲/۴۶**
نمونه شاهد با آنزیم	۱	۱۶۴/۵۶ ^{ns}
نمونه شاهد با اسید استیک	۱	۲/۵۰ ^{ns}
برشتگی	۱	۱۴۶۰/۲۴**
خطا	۹	۴۰/۱۰
کل	۱۲	-
ضریب تغییرات	-	۲۲/۲۷ درصد
R^2	-	۰/۸۱۸۵

** در سطح ۹۹ درصد اختلاف معنی دار است، ^{ns}: اختلاف معنی دار نمی باشد.



شکل ۱- تاثیر عوامل چندگانه آنزیم آسپاراژیناز و اسید استیک در غلظت های متفاوت و درجات مختلف برشتگی بر تغییرات رنگ نان تافتون

۳-۱-۱- اثر برشته‌گی بر رنگ

نتایج ارزیابی رنگ نشان داد که شاخص L^* با افزایش برشته‌گی و تیره‌تر شدن رنگ نان کاهش می‌یابد. شاخص‌های a^* و b^* با افزایش برشته‌گی و تیره‌تر شدن رنگ نان افزایش می‌یابد. به طوری که با ثابت در نظر گرفتن میزان اسید و آنزیم، در برشته‌گی زیاد نسبت به نمونه بدون برشته‌گی، شاخص L^* ، $25/9$ درصد کاهش، شاخص a^* ، $39/18$ درصد افزایش و شاخص b^* ، $21/46$ درصد افزایش یافت. همچنین با افزایش برشته‌گی و تیره‌تر شدن رنگ نان شاخص ΔE کاهش یافت. آن چه از تجزیه واریانس داده‌ها به دست آمد بیانگر تاثیر معنی‌دار برشته‌گی بر رنگ نمونه‌ها می‌باشد ($p < 0/01$). بدیهی است در برشته‌گی سطح صفر، فقط به پخت کامل نان اکتفا شد و فرصت تشکیل رنگدانه‌های قهوه‌ای ملانوئیدین حاصل از برشته‌گی به نان داده نشد. اما با افزایش زمان نگهداری در تنور و افزایش برشته‌گی تا سطح دورنگ نان به طور واضح تیره‌تر شد و همان طور که انتظار می‌رفت با افزایش برشته‌گی شاخص L^* کاهش، شاخص a^* و b^* افزایش و ΔE کاهش یافت. همچنین در نتایج مشابهی براتن و همکاران در سال ۲۰۰۵ افزایش تیرگی رنگ نان‌های مسطح در اثر دما و زمان پخت طولانی بیان کردند (۲). همچنین در پژوهش دیگر یگوکمن و همکاران در سال ۲۰۰۶ میزان تشکیل رنگ در قهوه، نان گندم و سیب زمینی را در محدوده دمایی ۱۵۰ تا ۲۲۵ درجه سلسیوس بررسی کردند. با افزایش دما تیره شدن رنگ قهوه و نان گندم و کاهش روشنی چیس سیب زمینی مشاهده شد (۸). افزایش زمان نگهداری نان در تنور پس از پخت کامل و افزایش برشته‌گی نان منجر به کاهش ΔE و تیره‌تر شدن رنگ نان می‌شود. تا حدی که ΔE در نمونه بدون برشته‌گی حدود ۴۵ و در نمونه

برشته حدود ۱۵ است که بیانگر کاهش $66/66$ درصدی ΔE با افزایش برشته‌گی می‌باشد.

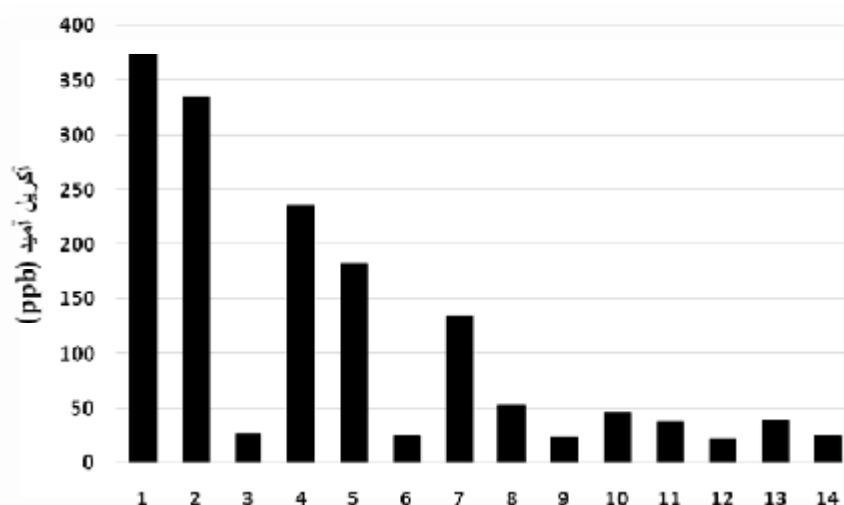
۳-۲- نتایج آنالیز آکریل آمید

با توجه به جدول ۲ آنچه از آنالیز واریانس داده‌ها به دست آمد بیانگر معنی‌دار بودن اثر آنزیم آسپاراژیناز و برشته‌گی بر میزان آکریل آمید و غیرمعنی‌دار بودن اثر اسید استیک بر میزان آکریل آمید در محدوده این آزمایش می‌باشد. مقدار حداکثر دوز مجاز توصیه شده 2^1 میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن به صورت روزانه می‌باشد به طور مثال یک فرد با وزن ۷۰ کیلوگرم مجاز است کمتر از ۱۴۰ میکروگرم آکریل آمید در روز از طریق مواد غذایی دریافت کند (۷). در شکل ۲ تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان آکریل آمید قابل مشاهده است. بیشترین میزان آکریل آمید تولید شده در نمونه شاهد (بدون اسید استیک، بدون آنزیم آسپاراژیناز و بیشترین برشته‌گی) بود که حاوی ۳۷۴ میکروگرم بر کیلوگرم آکریل آمید می‌باشد و کمترین میزان آکریل آمید تولید شده در نمونه حاوی ۰/۱۵ درصد اسید استیک، ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آنزیم آسپاراژیناز و بدون برشته‌گی می‌باشد که حاوی حدود ۲۱/۰۶ میکروگرم در کیلوگرم آکریل آمید بود. اما از آن جا که نان بدون برشته‌گی و خمیری مطلوبیت چندانی برای مصرف‌کننده ندارد می‌توان با تولید نان تافتونی حاوی ۰/۳ درصد اسید استیک، ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آنزیم آسپاراژیناز و بیشترین میزان برشته‌گی می‌توان به نانی با ۲۴/۲۷ میکروگرم در کیلوگرم نان، آکریل آمید رسید و این تیمار علاوه بر بافت مطلوب با حفظ برشته‌گی مطلوب از نظر مصرف‌کننده محتوای آکریل آمید را تا ۹۳/۵۱ درصد نسبت به نمونه شاهد کاهش داد.

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف بر آکریل آمید نان تافتون

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (آکریل آمید)
مدل	۳	۲۶۰۰۷/۵۸**
نمونه شاهد با آنزیم	۱	۵۳۹۱۰/۱۴**
نمونه شاهد با اسید استیک	۱	۸۱۲۴/۳۰ <i>ns</i>
برشتگی	۱	۱۵۹۸۸/۳۰**
خطا	۹	۴۸۴۶/۷۱
کل	۱۲	-
ضریب تغییرات	-	۷۶/۶۶ درصد
R^2	-	۰/۶۴۱۴

** در سطح ۹۵ درصد اختلاف معنی دار است، *ns*: اختلاف معنی دار نمی باشد.



شکل ۲- تاثیر عوامل چندگانه آنزیم اسپاراژیناز و اسید استیک در غلظت های متفاوت و درجات مختلف برشتگی بر محتوای آکریل آمید نان تافتون

۳-۲-۱- تاثیر آنزیم اسپاراژیناز بر آکریل آمید

آنالیز واریانس داده ها نشان داد که افزودن آنزیم اسپاراژیناز تاثیر معنی داری بر میزان آکریل آمید نمونه های نان تولیدی داشت ($p < 0/01$). به طوری که افزودن این ترکیب به آرد، محتوای آکریل آمید نان تافتون را تا حد چشمگیری کاهش داد. در واقع با افزودن ۵۰۰ میلی گرم در کیلو گرم آرد، محتوای آکریل آمید نان تافتون تا بیش از ۸۵ درصد نسبت به تیمار شاهد با حفظ همان برشتگی کاهش یافت. زیزاک و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه خود به بررسی تاثیر افزودن آنزیم اسپاراژیناز به پوره سیب و پخت آن در مایکروویو پرداختند و گزارش نمودند که میزان اسپاراژین و محتوای آکریل آمید به ترتیب

۸۸ و ۹۹ درصد کاهش نسبت به روش معمولی کاهش یافت (۲۶). کوکورا نشان داد زمانی که ۲۱۵ میلی گرم آنزیم اسپاراژیناز در هر کیلو گرم آرد برای تولید رول نان های سرخ شده استفاده شود و نان ها در دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۸ دقیقه سرخ شوند کاهش ۹۶ درصدی اسید آمینه اسپاراژین رویت می شود. مقدار کاهش آکریل آمید در حدی است که توسط دتکتور قابل اندازه گیری و تشخیص نیست (۱۴). هندریکسن و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر تیمار اسپاراژیناز را بر غلات و قهوه بررسی کردند آن چه از نتیجه این مطالعه به دست آمد شامل کاهش آکریل آمید در

سطوح ۹۰ درصد در چپس تورتیلا و ۸۰-۷۰ درصد کاهش برای قهوه بود (۹).

۳-۲-۲- اثر اسید استیک بر میزان آکریل آمید

افزودن اسید استیک منجر به کاهش غیرمعنی دار در میزان آکریل آمید نمونه‌ها گردید ($p > 0.05$). در همین راستا مصداق و همکاران (۲۰۰۸) عنوان داشتند که تاثیر اسید استیک و اسید لاکتیک در کاهش pH و کاهش تولید آکریل آمید در سیب زمینی نسبت به اسید سیتریک بیشتر است (۱۵).

۳-۲-۳- اثر برشتگی بر میزان آکریل آمید

آن چه از آنالیز واریانس داده‌ها به دست آمد نشان داد که تاثیر برشتگی بر میزان آکریل آمید معنی دار بود ($p < 0.01$) و با افزایش میزان برشتگی نان، مقدار آکریل آمید را در نمونه‌ها افزایش یافت. آن چه از مطالعه منابع مختلف به دست آمد بیانگر این مسئله است که افزایش دما و مدت زمان حرارت‌دهی، افزایش تولید آکریل آمید را به همراه خواهد داشت و در این پژوهش افزایش برشتگی با افزایش زمان پخت انجام شد. در نتایج مشابهی کلاوس و همکاران (۲۰۰۸) افزایش مقدار آکریل آمید را در نتیجه افزایش زمان و دمای پخت در نان گندم گزارش کردند (۶). همچنین

استدلر و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که میزان آکریل آمید تولید شده در سیستم‌های مدل شامل آسپاراژین و فروکتوز، گالاکتوز، لاکتوز و سوکروز در دمای ۱۸۰ درجه سلسیوس بیشتر از دماهای پایین تر می‌باشد (۲۴).

۳-۳- نتایج ارزیابی حسی

همان گونه که ملاحظه می‌گردد بین نمونه شاهد و نمونه بهینه تفاوت معنی داری به لحاظ ویژگی‌های ارگانولپتیکی محصول وجود ندارد (جدول ۳). این مسئله نشان می‌دهد افزودن اسید استیک و آنزیم آسپاراژیناز با وجود اثر کاهشی که بر میزان تشکیل آکریل آمید در نان، تأثیر معنی داری بر ویژگی‌های ارگانولپتیکی و مطلوبیت و بازار پسندی نان ندارند. در پژوهش مشابهی کیتا و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند پیش تیمار اسیدی برش های سیب زمینی با اسید استیک از لحاظ کنترل تولید آکریل آمید و عدم ایجاد طعم ترش نسبت به اسید سیتریک مطلوب تر است (۱۲). جهت شناسایی فرمولاسیون بهتر، به منظور خارج کردن واریانس حاصل از تفاوت داوران، هر داور به منزله یک بلوک در نظر گرفته شد و از آزمون فاکتوریل در طرح بلوک‌های کامل تصادفی استفاده گردید و نتایج حاصل توسط نرم افزار Mstac آنالیز گردید.

جدول ۴- تجزیه واریانس ارزیابی حسی نان توسط داوران

میانگین مربعات				درجه آزادی	منبع تغییرات
بافت	عطر و طعم	رنگ	پذیرش کلی		
۰/۳۷۵ ^{ns}	۰/۱۷۳ ^{ns}	۰/۳۷۵ ^{ns}	۰/۱۷۳ ^{ns}	۱	تیمار
۰/۳۶۹ ^{**}	۱/۱۲۱ ^{**}	۰/۴۶۵ ^{ns}	۰/۷۵۸ ^{**}	۱۱	داور (بلوک)
۰/۱۹۳	۰/۲۵۷	۰/۱۹۳	۰/۲۵۷	۱۱	خطا
-	-	-	-	۲۳	کل
%۱۱/۵۸	۱۳/۹۹	%۹/۰۳	%۱۱/۳۸	-	ضریب تغییرات

^{**} در سطح ۹۵ درصد اختلاف معنی دار است، ns: اختلاف معنی دار نمی‌باشد.

۳-۴- نتایج بهینه سازی

نتایج حاصل از بهینه سازی نشان داد چنانچه مقدار اسید حدود ۰/۳ درصد، آنزیم در سطح ۵۰۰ ppm و برشتهگی در بیشترین سطح انتخاب شود، می توان نانی با کمترین میزان آکریل آمید، بافتی نرم و رنگی طلایی تولید کرد.

۴- نتیجه گیری

آنچه این تحقیق را از سایر پژوهش های مشابه متمایز می کند بررسی سطح آکریل آمید در نان تافتون که نان سنتی ایرانی و بهره گیری هم زمان از عوامل تاثیر گذار بر کاهش آکریل آمید مانند تخمیر، کنترل مناسب میلارد با استفاده از اسید خوراکی، کنترل محتوای آسپاراژین با استفاده از آنزیم آسپاراژیناز، بررسی تاثیر سطوح مختلف برشتهگی بر محتوای آکریل آمید و کنترل دما و زمان پخت می باشد. نتایج نشان داد که محتوای آکریل آمید با افزایش برشتهگی (زمان حرارت دهی) افزایش چشمگیری داشت. همچنین افزودن آنزیم آسپاراژیناز در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم، بدون حضور اسید محتوای آکریل آمید را در برشتهگی سطح دو تا ۸۵ درصد نسبت به نمونه فاقد آنزیم کاهش داد. اما استفاده هم زمان آنزیم آسپاراژیناز در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم و اسید استیک در غلظت ۰/۳ درصد محتوای آکریل آمید را در برشتهگی سطح دو تا ۹۳/۵ درصد کاهش داد. نکته قابل توجه این است که کاهش آکریل آمید با توجه به حفظ خواص ارگانولپتیکی مطلوب انجام شد و در نتیجه تولید نانی با برشتهگی مطلوب مصرف کننده با پایین ترین محتوای آکریل آمید نسبت به نوع معمول بدون تغییر در خواص ارگانولپتیکی انجام شد. آنچه در نتیجه این تحقیق و تحقیقات پیشین به دست آمده این است که استفاده از آنزیم آسپاراژیناز از سایر روش ها کارآمدتر بوده و تا حدود زیادی محتوای آکریل آمید را بدون تغییر طعم و رنگ کاهش می دهد.

۵- منابع

۱. رضوی، م. ع. و اکبری، ر، ۱۳۹۳. خواص بیوفیزیکی محصولات کشاورزی و مواد غذایی. جلد اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، صص. ۳۰۱-۱۰۹.
۲. قائینی، ز، نیازمند، ر، شهیدی نوقابی، م، ۱۳۹۴. اثر مقدار مخمر، زمان تخمیر و دمای سرخ کردن بر میزان آکریل آمید و خصوصیات فیزیکوشیمیایی دونات. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۴(۴)، صص. ۲۹۸-۲۸۳.
3. Bråthen, E. and Knutsen, S.H., 2005. Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chemistry*, 92(4), pp.693-700.
4. Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Serpen, A., Açar, Ö. Ç., Gökmen, V. and Fogliano, V., 2009. Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Research International*, 42(9), pp. 1295-1302.
5. Ciesarová, Z. 2016. Impact of l-asparaginase on acrylamide content in fried potato and bakery products. *Acrylamide in Food [Internet]. Elsevier; [cited 2020 Mar 28]*, pp. 405-421.
6. Claus, A., Mongili, M., Weisz, G., Schieber, A. and Carle, R., 2008. Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *Journal of cereal science*, 47(3), pp.546-554.
7. Ghasemzadeh V, Atefi M, Homayoonfar R, Hejazi A. and Touderoosta, Z., 2012. Investigation of acrylamide formation conditions and pathways to reduce it in specific food sources. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Industry*, 7(5), pp. 957-968.
8. Gökmen, V. and Şenyuva, H. Z., 2006. Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating. *Food Chemistry*, 99(2), pp. 238-243.
9. Hendriksen, H. V., Budolfsen, G. and Baumann, M. J., 2013. Asparaginase for acrylamide mitigation in food. *Aspects of Applied Biology*, (116), pp. 41-50.
10. Katina, K., Heiniö, R. L., Autio, K. and Poutanen, K., 2006. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT-Food Science and Technology*, 39(10), pp.1189-1202.
11. Keramat, J., LeBail, A., Prost, C. and Jafari, M., 2011. Acrylamide in baking products: a review article. *Food and Bioprocess Technology*, 4(4), pp. 530-543.

- acrylamide formation in French fries. *Food chemistry*, 109(2), pp. 386-392.
20. pittet, A., Perisset, A. and Oberson, J.M., 2004. Trace level determination of acrylamide in cereal- based foods by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1035, pp.123-130.
21. Przygodzka, M., Piskula, M.K., Kukurová, K., Ciesarová, Z., Bednarikova, A. and Zieliński, H., 2015. Factors influencing acrylamide formation in rye, wheat and spelt Breads. *J. Cereal Sci.* 65, pp.96-102.
22. Rifai, L. and Saleh, F. A., 2020. A review on acrylamide in food: Occurrence, toxicity, and mitigation strategies. *International Journal of Toxicology*, 39(2), pp. 93-102.
23. Sarion, C., Codină, G. G. and Dabija, A., 2021. Acrylamide in bakery products: A review on health risks, legal regulations and strategies to reduce its formation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(8), pp.4332.
24. Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., ... and Riediker, S., 2002. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419(6906), pp. 449-450.
25. Zhang, Y., Ren, Y. and Zhao, H., 2007. Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate – rich foods using gas chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry. Acta*, 584, pp. 322-332.
26. Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., ... and Villagran, M. D., 2003. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), pp. 4782-4787.
12. Kita, A., Bråthen, E., Knutsen, S. H. and Wicklund, T., 2004. Effective ways of decreasing acrylamide content in potato crisps during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), pp.7011-7016.
13. Krishnakumar, T. and Visvanathan, R., 2014. Acrylamide in food products: a review. *J. Food Process Tech*, 5(7), p. 1.
14. Kukurová, K., Morales, F. J., Bednarikova, A. and Ciesarova, Z., 2009. Effect of l-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(12), pp. 1532-1539.
15. Mestdagh, F., Maertens, J., Cucu, T., Delporte, K., Van Peteghem, C. and De Meulenaer, B., 2008. Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. *Food Chemistry*, 107(1), pp. 26-31.
16. Mustafa, A., R, Andersson., J, Rosén., A, Kamal-Eldin. and P, Åman., 2005. Factors influencing acrylamide content and color in rye crisp bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), pp. 5985-5989.
17. Negoită, M. and Culețu, A., 2016. Application of an accurate and validated method for identification and quantification of acrylamide in bread, biscuits and other bakery products using GC-MS/MS system. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27, pp.1782-1791.
18. Parker, J.K., Balagiannis, D.P., Higley, J., Smith, G., Wedzicha, B.L. and Mottram, D.S., 2012. Kinetic model for the formation of acrylamide during the finish-frying of commercial French fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), pp.9321-9331.
19. Pedreschi, F., Kaack, K. and Granby, K., 2008. The effect of asparaginase on

(Original Research Paper)

Effect of Degree of Toasting of Taftoon Bread on Acrylamide Content and Comparison of Two Treatments Asparaginase Enzyme and Acetic Acid to Reduce it

Masomeh Barani¹, Mohammad Shahedi Bagh Khandan^{2*}, Milad Fathi³

1-MS.c Graduated of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

2-Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

3-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Received:27/04/2022

Accepted:02/06/2022

Abstract

Cereals, due to their high carbohydrate content, undergo changes that are sometimes desirable and sometimes undesirable during heating. One of these reactions is Millard. Including Harmful products of this reaction can be called acrylamide. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of degree of toasting on the amount of acrylamide and the effect of two methods of asparaginase enzyme and acetic acid on its reduction in Taftoonbread. For this purpose, the amount of acrylamide was evaluated in Taftoon bread in the level zero, one and two toasting, and as expected, with increasing the amount of toasting (increasing the baking time), more acrylamide was produced in the bread. Then the amount of acrylamide and sensory properties were investigated in breads whose dough was treated with acetic acid at concentrations of 0.15 and 0.3% and asparaginase at concentrations of 250 and 500 ppm. The use of acetic acid and asparaginase enzyme was done in combination according to the plan with Design expert 2013 software. Analysis of variance showed that the effect of toasting on the color was significant, the effect of asparaginase enzyme and acetic acid on the color was not significant and the effect of toasting and asparaginase enzyme on the acrylamide content was significant. The results of optimization with Design expert 2013 software showed that baking bread in level two toast in the presence of asparaginase enzyme with a concentration of 500 ppm and acetic acid with a concentration of 0.3%, the lowest amount of acrylamide, while maintaining the desirability of organoleptic properties.

Keywords: Asparaginase Enzyme, Acetic Acid, Toasting, Cereals, Millard Reaction.

*Corresponding Author: mohamadshahediiii55555@gmail.com

(مقاله پژوهشی)

بررسی کیفیت دو برند آب معدنی تولیدشده از چشمه بهرغان سپیدان، فارسمجتبی مقیمی^۱، هانیه نوذری^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه محیط زیست، واحد آباءه، دانشگاه آزاد اسلامی، آباءه، ایران.

۲- استادیار، گروه محیط زیست، واحد آباءه، دانشگاه آزاد اسلامی، آباءه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۴

چکیده

امروزه مصرف آب‌های معدنی بطری شده در میان جامعه گسترش زیادی یافته است، لذا آگاهی از کیفیت آن برای حفظ سلامت عمومی الزامی است. هدف از این پژوهش، بررسی کیفیت فیزیکوشیمیایی دو برند آب معدنی M و S با سرمنشأ یکسان و ۹ فاکتور نیتريت، نترات، منیزیم، کلسیم، کلر، کل جامدات محلول، فلوراید، سختی کل و اسیدیته بود. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون t تک نمونه‌ای، آزمون t غیرجفتی و آزمون همبستگی پیرسون استفاده گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که در هر دو برند میانگین میزان همه پارامترهای اندازه‌گیری شده (به جز منیزیم و فلوراید) در محدوده استاندارد بوده است. همچنین اختلاف معنی‌داری بین مقادیر اندازه‌گیری شده با مقادیر ذکر شده روی برچسب بطری‌ها (به جز pH در برند M و سختی کل در هر دو برند) وجود داشت. از طرف دیگر، وجود همبستگی مثبت قوی بین pH و Mg در برند S و همبستگی قوی منفی بین pH و F در برند M و با توجه به مقدار خارج از استاندارد این دو پارامتر، افزایش pH می‌تواند اثرات نامطلوبی در کیفیت آب این دو برند به همراه داشته باشد.

واژه های کلیدی: فاکتور فیزیکوشیمیایی، استاندارد، آب بطری شده، برچسب، چشمه بهرغان.* مسئول مکاتبات: hnowzari@iauabadeh.ac.ir

۱- مقدمه

مطابق تعریف سازمان جهانی بهداشت، آب آشامیدنی آبی است که برای مصارف انسانی و تمامی کاربری‌های خانگی مناسب باشد (۲۹) و آب آشامیدنی ایده‌آل باید شفاف، بدون بو و مزه، عاری از ارگانسیم‌های بیماری‌زا و دیگر ترکیبات مضر باشد (۲۴). اگر چه هر شخص در روز فقط ۲-۱/۵ لیتر آب نیاز دارد، ولی در صورت عدم تأمین آب فقط چند روز قادر به ادامه حیات خواهد بود (۱۰). با افزایش جمعیت و پیشرفت صنایع در ممالک مختلف منابع آبی بیش از پیش در معرض مصرف و آلودگی‌های مختلف قرار می‌گیرند (۷). این امر نه تنها کمیت منابع دردسترس را کاهش داده، بلکه به دلیل توسعه شهرنشینی و فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی، تغییر و تنزل کیفیت آب‌ها را نیز به دنبال داشته است (۳۰). در این راستا امروزه مردم به دلایل مختلف از جمله عدم کیفیت مطلوب آب آشامیدنی سیستم‌های توزیع، کمبود آب شرب، پاتوزن‌های موجود در آب و سهولت دسترسی و هزینه نسبتاً پایین آب‌های معدنی، از آب‌های معدنی بطری شده استفاده می‌کنند (۵). مصرف این آب‌ها در کنار آب شبکه‌های لوله‌کشی شهری با این تصور عمومی که آب‌های معدنی بطری شده نسبت به آب شرب شهری ارجحیت دارند و توصیه مصرف این نوع آب برای بیماران با ضعف سیستم ایمنی و تهیه غذای کودکان و حتی به دلیل کیفیت پایین آب‌های شهری، سبب توسعه صنایع مربوط به بسته‌بندی آب‌های معدنی گردیده است (۲۵). بر طبق آمار، مصرف آب‌های معدنی به طور متوسط در هر سال ۷٪ افزایش داشته است. گرچه در حال حاضر عمده‌ترین مصرف‌کنندگان این آب‌ها، کشورهای اروپایی هستند؛ اما روند افزایش مصرف در آسیا و اقیانوسیه سریع‌تر و حدود ۱۵٪ گزارش شده است (۱۹). کشور ایران نیز از این قاعده مستثنی نبوده و هرچند آمار دقیقی از مصرف آب‌های معدنی وجود ندارد، اما بررسی مستندات حاکی از افزایش مصرف آب‌های معدنی است (۱۱). در این راستا با توجه به اهمیت آب‌های معدنی و روند روبه افزایش مصرف آن‌ها، یکی از امور بسیار

مهم در تولید و مصرف این آب‌ها کنترل کیفیت آن‌ها است؛ چراکه احتمال وجود برخی از فلزات سنگین و یا عناصر و ترکیبات بیش از حد استاندارد در این آب‌ها می‌تواند برای مصرف‌کنندگان بسیار مخاطره‌آمیز باشد که سهم انسان‌ها در ایجاد این مخاطرات از طریق انتقال مواد محلول در آب در اثر عواملی چون معدن‌کاوی، فعالیت‌های صنایع و تخلیه فاضلاب‌های شهری می‌باشد (۴). به طور کلی موجودات زنده به مقادیر بسیار کمی از بعضی از عناصر موجود در آب‌ها برای رشد و بقا نیاز دارند که اصطلاحاً به آن‌ها عناصر جزئی گفته می‌شود (۲۲). آب معدنی یکی از راه‌های تأمین املاح ضروری بدن انسان است که در یک لیتر از آن باید حداقل یک گرم مواد معدنی به صورت کاتیون و آنیون محلول وجود داشته باشد (۸). بنابراین در صورتی که آب آلوده باشد یا این که غلظت بعضی از املاح در آن کم و یا زیاد باشد، میتواند باعث بروز عوارض و بیماری‌ها شود (۱۵). بنابراین با توجه به مصرف روزافزون آب‌های معدنی و تأثیر ترکیبات موجود در آن‌ها (۱۴)، بررسی کیفیت فیزیکی و شیمیایی آب‌های معدنی یکی از ضروریات مطالعاتی تولیدکنندگان آب‌های معدنی می‌باشد. لولویی و ذوالعلی (۱۳۹۰) با مطالعه کیفیت آب‌های معدنی بطری شده در شهر کرمان دریافتند میزان فلئوئور در همه نمونه‌ها پایین‌تر و نیز در برخی موارد مقدار نیترات، کلرور، پتاسیم و سدیم بیش از استاندارد بوده است (۱۱). ریاحی و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی کیفیت آب‌های بطری شده در استان همدان دریافتند مقادیر pH، قلیائیت، نیترات، سولفات، فسفات، سدیم و پتاسیم در تمامی نمونه‌ها در محدوده استاندارد بودند و در برخی نمونه‌های مورد بررسی سختی کل و فلوراید کمتر از استاندارد بودند (۶). آقاری و جعفریان (۱۳۹۶) با بررسی کیفیت آب‌های معدنی بطری شده شهرستان بابل اعلام کردند با توجه به عدم همخوانی پارامترهای نیتريت و نیترات با برجسب نمونه‌ها لازم است ارگان‌های تأییدکننده علامت استاندارد، نظارت مستمر بر فرایند تولید و پایش کیفی محصولات داشته باشند (۲). اشرفی یورقانلو (۱۳۹۷) با مطالعه کیفیت آب‌های معدنی موجود در بازار

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

رودخانه بهرغان واقع در روستای بهرغان بخش همایجان از توابع شهرستان سپیدان در استان فارس می‌باشد که از آن چشمه‌هایی با آب شیرین و طبعی‌عاز جمله چشمه بهرغان به وجود آمده است و آب آن بعد از طی مسیرهای پرپیچ و خم به خلیج فارس منتهی می‌گردد (۳). نمونه‌های آب‌های معدنی بطری شده دو برند S و M که دارای منبع برداشتی مشترک از چشمه بهرغان سپیدان هستند، از سطح بازار شهر شیراز خریداری شدند.

۲-۲- روش آزمایش

نمونه‌ها برای انجام آزمایشات به صورت تیترومتری جهت اندازه‌گیری سختی کل (TH)، کلسیم (Ca)، منیزیم (Mg)، کلرور (Cl) و pH که مطابق دستورالعمل مندرج در کتاب مرجع روش‌های استاندارد برای آزمایش آب و فاضلاب (۱۸) صورت گرفته است، به صورت دستگاهی جهت اندازه‌گیری فلوراید (F)، نیتريت (NO₂) و نیتريت (NO₃) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل DR2000، ساخت آمریکا) و جهت اندازه‌گیری میزان کل جامدات محلول (TDS) با صاف کردن نمونه از طریق کاغذ صافی فایبرگلاس (۱۲)، به آزمایشگاه‌های مرکز بهداشت شهرستان ابرکوه منتقل گردیدند.

۲-۳- روش‌های آماری

پژوهش در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی انجام شد. جامعه آماری مورد مطالعه در این پژوهش آب‌های معدنی بطری شده دو برند S و M در سطح بازار شهر شیراز در مردادماه سال ۱۳۹۸ بودند. نمونه برداری به صورت کاملاً تصادفی بوده که از هر برند ۱ نمونه و ۳ تکرار و در مجموع ۸ نمونه تهیه شد. قبل از انجام هر آزمون آماری، نرمال بودن توزیع فراوانی داده‌ها با آزمون نرمالیتی^۲ بررسی شد؛ نتایج نشان داد که در همه موارد داده‌ها نرمال بودند. سپس داده‌ها با

استان آذربایجان غربی اعلام کرد که غلظت نیتريت و نیتريت در آب‌های معدنی عرضه شده کمتر از حد مجاز بودند (۱). یاری و همکاران (۱۳۹۹) در بررسی کیفیت آب‌های بطری شده در شهر همدان دریافتند میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده تمام پارامترهای کلیات، سختی، کلسیم، منیزیم، فلوراید، فسفات، سولفات، نیتريت، سدیم، پتاسیم، کدورت و pH کمتر از حد استاندارد بوده است (۱۶). اسماعیل و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی کیفیت آب‌های بطری شده در عراق نشان دادند به جز کلسیم، منیزیم و pH سایر پارامترها در حد استاندارد بوده‌اند (۲۰). سنگلا و همکاران (۲۰۱۴) با ارزیابی کیفیت آب معدنی بسته‌بندی شده در دهلی نو دریافتند مقدار سرب و مس در نمونه‌های انتخاب شده بالاتر از حد استاندارد و سایر پارامترها در حد استاندارد بوده است (۲۷). مکونن و همکاران (۲۰۱۵) با ارزیابی کیفیت آب‌های بطری شده در شهر گندر اتیوپی اعلام کردند فلوراید در نمونه‌های مورد بررسی کمتر از حد استاندارد و کلسیم و منیزیم بیشتر از حد استاندارد بوده‌اند (۲۳). اکبری و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی آب‌های بطری‌شده در شهرستان تربت حیدریه نشان دادند که میانگین غلظت نیتريت در همه نمونه‌ها در حد استاندارد بود (۱۷). خدرا (۲۰۲۰) با مطالعه آب‌های بطری شده بازار لبنان نشان داد مقدار کلر و کل جامدات محلول با مقدار برچسب بطری در بیش از ۲۵٪ مارک‌های مورد مطالعه همخوانی ندارند؛ بنابراین خواستار مقررات دقیق تری در روند برچسب‌گذاری شد (۲۱). پژوهش حاضر با هدف بررسی عناصر و ترکیبات موجود و کیفیت فیزیکی و شیمیایی آب‌های معدنی دو برند S و M که دارای منبع برداشتی مشترک از چشمه بهرغان فارس هستند، انجام شده و این آب‌ها از نظر استانداردهای آب‌های آشامیدنی و بررسی مقادیر موجود بر برچسب‌هایشان مورد مطالعه قرار گرفتند.

آزمون تی تک نمونه ای^۱، آزمون تی غیر جفتی^۲ و آزمون همبستگی اسپیرمن^۳ توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ (۲۸) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج آزمون تی تک نمونه ای مقایسه پارامترها با حدود استاندارد

جدول ۱ نتایج آزمون تی تک نمونه ای مقایسه میانگین \pm انحراف معیار مقدار هر یک از پارامترهای فیزیکی و شیمیایی در نمونه های آب مورد مطالعه با حدود استاندارد مشخص شده توسط موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳) را نشان می دهد. نتایج مقایسه میانگین پارامترها با حد استاندارد در هر دو نمونه آب M و S نشان داد نیتريت، نیترات و کلسیم به طور معنی داری پایین تر از حد استاندارد ملی هستند که نتایج پژوهش عمومی و همکاران (۱۳۹۰) و اشرفی یورقانلو (۱۳۹۷) در مورد در حد استاندارد بودن نیتريت و نیترات آب های بطری شده مشابه نتایج این مطالعه است (۱،۹). همچنین نتایج این مقایسه نشان داد کلر، کل جامدات محلول و سختی کل به طور معنی داری از حداکثر مجاز و حتی استاندارد مطلوب نیز پایین تر هستند که نتایج پژوهش گودینی و همکاران (۱۳۹۱) در مورد در حد استاندارد بودن سختی کل، کل جامدات محلول، نیتريت و نیترات آب های بطری شده مشابه نتایج این مطالعه است (۱۰). نیز نتایج این مقایسه نشان داد میزان اسیدیته آب به طور معنی داری از حداقل مطلوب بالاتر و از حداکثر مجاز کمتر است که نتایج پژوهش ریاحی خرم و همکاران (۱۳۹۳) در مورد در حد استاندارد بودن pH و نیترات آب های بطری شده مشابه نتایج این مطالعه است (۶). از طرفی نتایج این

مقایسه نشان داد میزان فلوراید به طور معنی داری از حداکثر مطلوب کمتر است اما متاسفانه به طور معنی داری از حداقل مطلوب نیز کمتر است و کمبود فلوراید آب می تواند باعث کاهش مقاومت مینای دندان و در نتیجه پوسیدگی آن شود که نتایج پژوهش لولویی و ذوالعلی (۱۳۹۰) در مورد کمبود فلوراید آب های بطری شده مشابه نتایج این مطالعه است (۱۱). همچنین نتایج این مقایسه نشان داد میانگین منیزیم بیش از حد استاندارد ملی می باشد و منیزیم بیش از حد موجب آتروژنز و لخته شدن نامناسب، گشادی یا تنگی تنه عروق و عدم تعادل الکترولیتی سلولیمی شود. بنابراین نتایج پژوهش رضایی و همکاران در مورد در محدوده استاندارد بودن پارامترهای کلر، نیترات، کلسیم، سختی کل و کل جامدات محلول، نتایج مطالعه یاری و همکاران در مورد مطابقت با حدود استاندارد پارامترهای نیترات، کلسیم، سختی و pH، نتایج پژوهش سمرجیان (۲۰۱۱) در مورد در حد استاندارد بودن کلر و کلسیم در آب های بطری شده، نتایج پژوهش اسماعیل و همکاران (۲۰۱۳) در مورد در حد استاندارد بودن کلر و کل جامدات محلول و بیش از حد استاندارد بودن منیزیم در آب های بطری شده، نتایج مطالعه سینگلا و همکاران (۲۰۱۴) در مورد در حد استاندارد بودن نیتريت و نیترات و کل جامدات محلول در آب های بطری شده، نتایج پژوهش مکونن و همکاران (۲۰۱۵) در مورد کمبود فلوراید در نمونه های آب های بطری شده مورد بررسی و بیشتر از حد استاندارد بودن منیزیم و نتایج مطالعه اکبری و همکاران (۲۰۱۸) در مورد در حد استاندارد بودن نیترات آب های بطری شده با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۵،۱۶،۲۶،۲۳،۲۷،۲۰ و ۱۷).

جدول ۱- مقایسه میانگین \pm انحراف معیار مقادیر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی در نمونه های آب مورد مطالعه با حدود استاندارد

واحد	استاندارد		سطح اطمینان	P-value	میانگین \pm انحراف معیار	نمونه	پارامتر
	$\frac{mg}{l}$	$\frac{mg}{l}$					
mg/l	۳	---	۹۹٪	۰/۰۰۰	۰/۰۰۴ \pm ۰/۰۰۲	M	نیتريت
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۰/۰۰۸ \pm ۰/۰۰۲	S	
mg/l	۵۰	---	۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۹/۰۷۵ \pm ۱/۱۸۷	M	نیترات
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۷/۳۲۵ \pm ۱/۵۱۳	S	
mg/l	۳۰	---	۹۹٪	۰/۰۰۹	۴۱/۲۵۰ \pm ۳/۷۷۴	M	منيزيم
			۹۵٪	۰/۰۴۹	۳۶/۵۰۰ \pm ۴/۰۴۱	S	
mg/l	۳۰۰	---	۹۹٪	۰/۰۰۰	۹۷/۷۵۰ \pm ۸/۹۹۵	M	كلسيم
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۹۸/۷۵۰ \pm ۶/۲۹۱	S	
mg/l		۲۵۰	۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۸/۲۵۰ \pm ۸/۰۵۷	M	كلر
			۹۹٪	۰/۰۰۱	۶۰/۰۰۰ \pm ۳۳/۶۶۵	S	
mg/l	۴۰۰		۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۸/۲۵۰ \pm ۸/۰۵۷	M	كلر
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۶۰/۰۰۰ \pm ۳۳/۶۶۵	S	
mg/l		۱۰۰۰	۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۵۰/۷۵۰ \pm ۰/۵۰۰	M	كل جامدات محلول
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۵۲/۰۰۰ \pm ۳/۱۶۲	S	
mg/l	۱۵۰۰		۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۵۰/۷۵۰ \pm ۰/۵۰۰	M	كل جامدات محلول
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۵۲/۰۰۰ \pm ۳/۱۶۲	S	
mg/l		۰/۵	۹۹٪	۰/۰۰۲	۰/۱۲۷ \pm ۰/۰۷۴	M	فلورايد
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۰/۱۰۰ \pm ۰/۰۳۹	S	
mg/l	۱/۵		۹۹٪	۰/۰۰۰	۰/۱۲۷ \pm ۰/۰۷۴	M	فلورايد
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۰/۱۰۰ \pm ۰/۰۳۹	S	
mg/l		۲۰۰	۹۹٪	۰/۰۰۱	۱۳۷/۵۰۰ \pm ۸/۶۶۰	M	سختی كل
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۲۸/۷۵۰ \pm ۸/۵۳۹	S	
mg/l	۵۰۰		۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۳۷/۵۰۰ \pm ۸/۶۶۰	M	سختی كل
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۱۲۸/۷۵۰ \pm ۸/۵۳۹	S	
---		۶/۵	۹۹٪	۰/۰۰۰	۷/۵۲۵ \pm ۰/۰۹۵	M	اسيدیته آب
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۷/۵۵۰ \pm ۰/۰۵۷	S	
---	۸/۵		۹۹٪	۰/۰۰۰	۷/۵۲۵ \pm ۰/۰۹۵	M	اسيدیته آب
			۹۹٪	۰/۰۰۰	۷/۵۵۰ \pm ۰/۰۵۷	S	

۲-۳- نتایج آزمون تی تک نمونه ای مقایسه پارامترها با مقادیر

درج شده بر روی بطری ها

جدول ۲ نتایج آزمون تی تک نمونه ای مقایسه میانگین \pm انحراف معیار مقدار هر یک از پارامترهای فیزیکی و شیمیایی در نمونه های آب مورد مطالعه با مقدار درج شده بر روی برچسب بطری های آب را نشان می دهد. نتایج مقایسه میانگین پارامترها با مقادیر درج شده روی بطری آب برند S نشان داد شش متغیر نیتریت، کلر، نترات، منیزیم، کلسیم و اسیدپته آب به طور معنی داری بیشتر از مقدار اعلام شده بوده و مقدار فلوراید به طور معنی داری کمتر از مقدار اعلام شده روی برچسب بطری بوده است. همچنین مقایسه میانگین پارامترها با مقادیر درج شده روی بطری آب برند M نشان داد شش پارامتر نیتریت، نترات، منیزیم، کلسیم، کلر و کل جامدات محلول به طور

معنی داری بیشتر از مقادیر اعلام شده روی برچسب بطری بوده و مقدار فلوراید به طور معنی داری کمتر از مقدار اعلام شده روی برچسب بطری بوده است. این عدم همخوانی برای ۷ پارامتر از ۹ پارامتر مورد بررسی در هر دو برند مورد آزمایش بر روی اطمینان مصرف کننده، تایید صلاحیت شدن توسط آزمایشگاه های سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی در سطح ملی و بازاریابی و دریافت مجوز فروش در سطح بین المللی تاثیرات منفی دارد. نتایج این پژوهش با مطالعات رضایی و همکاران (۱۳۹۰) و آقالری و جعفریان (۱۳۹۶) و خدرا (۲۰۲۰) که اعلام کردند در اکثر موارد اختلاف معنی داری بین مقادیر اندازه گیری شده با مقادیر ذکر شده روی برچسب وجود داشته، همخوانی دارد (۵، ۲، ۲۱).

جدول ۲- مقایسه میانگین \pm انحراف معیار مقادیر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی در نمونه های آب مورد مطالعه با مقادیر درج شده بر روی

برچسب بطری های آب

پارامتر	نمونه	میانگین \pm انحراف معیار	P-value	سطح اطمینان	مقدار درج شده روی بطری	واحد
نیتریت	M	۰/۰۰۴ \pm ۰/۰۰۲	۰/۰۲۷	۹۵٪	۰/۰۰۱	mg/l
	S	۰/۰۰۸ \pm ۰/۰۰۲	۰/۰۱۹	۹۵٪	۰/۰۰۳	
نترات	M	۱۹/۰۷۵ \pm ۱/۱۸۷	۰/۰۰۰	۹۹٪	۳/۵	mg/l
	S	۱۷/۳۲۵ \pm ۱/۵۱۳	۰/۰۰۱	۹۹٪	۵	
منیزیم	M	۴۱/۳۵۰ \pm ۳/۷۷۴	۰/۰۰۰	۹۹٪	۳/۶	mg/l
	S	۳۷/۵۰۰ \pm ۴/۰۴۱	۰/۰۰۰	۹۹٪	۳	
کلسیم	M	۹۷/۷۵۰ \pm ۸/۹۹۵	۰/۰۰۲	۹۹٪	۴۸	mg/l
	S	۹۸/۷۵۰ \pm ۷/۲۹۱	۰/۰۰۱	۹۹٪	۵۰	
کلر	M	۱۸/۲۵۰ \pm ۸/۰۵۷	۰/۰۰۵	۹۵٪	۶	mg/l
	S	۶۰/۰۰۰ \pm ۳۳/۶۶۵	۰/۰۰۵	۹۵٪	۸	
کل جامدات محلول	M	۱۵۰/۷۵۰ \pm ۰/۵۰۰	۰/۰۰۰	۹۹٪	۱۴۵	mg/l
	S	۱۵۲/۰۰۰ \pm ۳/۱۶۲	۰/۰۰۰	۹۹٪	۲۲۰	
فلوراید	M	۰/۱۲۷ \pm ۰/۰۷۴	۰/۰۱۹	۹۵٪	۰/۳	mg/l
	S	۰/۱۰۰ \pm ۰/۰۳۹	۰/۰۱۵	۹۵٪	۰/۲	
سختی کل	M	۱۳۷/۵۰۰ \pm ۸/۶۶۰	۰/۶۰۴	معنی دار نیست	۱۳۵	mg/l
	S	۱۲۸/۷۵۰ \pm ۸/۵۳۹	۰/۲۳۹	معنی دار نیست	۱۳۵	
اسیدپته آب	M	۷/۵۲۵ \pm ۰/۰۹۵	۰/۶۳۸	معنی دار نیست	۷/۵	---
	S	۷/۵۵۰ \pm ۰/۰۵۷	۰/۰۰۳	۹۹٪	۷/۳	

۳-۳- نتایج آزمون تی غیر جفتی

این مسئله نشان‌دهنده مشابهت میزان ترکیبات آب های معدنی دو برند M و S است و دلیل آن احتمالاً منبع مشترک برداشت هر دو برند از چشمه بهرغان است. همچنین این نتیجه و نتایج قبل آشکار می‌سازد دو کارخانه تولیدکننده این دو برند در تولیدات آب‌های بطری شده خود تا چه حد خطا داشته و مشترک بودن منبع برداشت آب به هیچ عنوان توجیه کننده خطای آنها نیست.

جدول ۳ نتایج آزمونی غیر جفتی مقایسه میانگین \pm انحراف معیار مقدار هر یک از پارامترهای فیزیکیوشیمیایی بین دو نمونه آب S و M که دارای منبع برداشت مشترک از چشمه بهرغان سپیدان هستند، نشان می‌دهد. مقایسه میانگین پارامترهای هر دو برند M و S نشان داد که بین میزان هیچ کدام از ترکیبات موجود در آب در هر دو نمونه آب تفاوت معنی داری وجود ندارد.

جدول ۳- نتایج آزمون تی غیر جفتی مقایسه میانگین \pm انحراف معیار مقادیر پارامترهای فیزیکیوشیمیایی در دو نمونه آب مورد مطالعه

پارامتر	نمونه	میانگین \pm انحراف معیار	P-value	سطح اطمینان
NO ₂	M	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۴	۰/۰۵۲	تفاوت معنی دار ندارند
	S	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۸		
NO ₃	M	۱۹/۰۷۵ ± ۱/۱۸۷	۰/۱۱۹	تفاوت معنی دار ندارند
	S	۱۷/۳۲۵ ± ۱/۵۱۳		
Mg	M	۴۱/۲۵۰ ± ۳/۷۷۴	۰/۱۳۷	تفاوت معنی دار ندارند
	S	۳۶/۵۰۰ ± ۴/۰۴۱		
Ca	M	۹۷/۷۵۰ ± ۸/۹۹۵	۰/۸۶۱	تفاوت معنی دار ندارند
	S	۹۸/۷۵۰ ± ۶/۲۹۱		
Cl	M	۱۸/۲۵۰ ± ۸/۰۵۷	۰/۰۵۲	تفاوت معنی دار ندارند
	S	۶۰/۰۰۰ ± ۳۳/۶۶۵		
TDS	M	۱۵۰/۷۵۰ ± ۰/۵۰۰	۰/۴۸۹	تفاوت معنی دار ندارند
	S	۱۵۲/۰۰۰ ± ۳/۱۶۲		
F	M	۰/۱۲۷ ± ۰/۰۷۴	۰/۵۳۶	تفاوت معنی دار ندارند
	S	۰/۱۰۰ ± ۰/۰۳۹		
TH	M	۱۳۷/۵۰۰ ± ۸/۶۶۰	۰/۲۰۰	تفاوت معنی دار ندارند
	S	۱۲۸/۷۵۰ ± ۸/۵۳۹		
pH	M	۷/۵۲۵ ± ۰/۰۹۵	۰/۶۷۰	تفاوت معنی دار ندارند
	S	۷/۵۵۰ ± ۰/۰۵۷		

۳-۴- نتایج آزمون همبستگی پیرسون

۳-۴-۱- همبستگی پارامترهای فیزیکیوشیمیایی در نمونه آب M

نتایج حاصل از این آزمون نشان داد همبستگی مثبت معنی دار بین پارامترهای TH با Ca در سطح ۹۵٪ و همبستگی منفی معنی دار بین TH و Cl و بین pH با F هر دو در سطح ۹۵٪.

همچنین بین pH و F همبستگی منفی معنی دار وجود دارد و با افزایش pH میزان فلوراید کاهش می یابد و با توجه به اینکه میزان F از حداقل مطلوب نیز کمتر بوده با افزایش pH بطری های آب M، میزان F کاهش خواهد یافت و اثرات نامطلوب خواهد داشت.

وجود دارد (جدول ۴). نتایج همبستگی بین پارامترها در نمونه آب M نشان داد TH با Ca همبستگی مثبت معنی دار دارد به طوری که با افزایش یونهای عامل سختی کربناته مانند کلسیم، سختی کل هم افزایش پیدا می کند اما بین TH و Cl همبستگی منفی معنی داری وجود دارد، به گونه ای که با افزایش یونهای عامل سختی غیر کربناته مانند کلر، سختی کل کاهش می یابد.

جدول ۴- ماتریس همبستگی پیرسون بین پارامترهای فیزیکیوشیمیایی در نمونه آب M

پارامتر	NO ₂	NO ₃	Mg	Ca	Cl	TDS	F	TH	pH
NO ₂	۱								
NO ₃	۰/۷۰۵	۱							
Mg	۰/۸۴۱	۰/۹۲۴	۱						
Ca	-۰/۳۵۳	-۰/۶۴۷	-۰/۷۶۳	۱					
Cl	۰/۴۶۶	۰/۴۳۳	۰/۶۹۹	-۰/۹۰۰	۱				
TDS	۰/۵۷۷	۰/۹۴۱	۰/۷۵۱	-۰/۳۸۹	۰/۱۰۳	۱			
F	۰/۸۱۸	۰/۶۲۰	۰/۸۷۳	-۰/۷۵۱	۰/۸۸۹	۰/۳۳۷	۱		
TH	-۰/۳۳۳	۰/۴۹۴	-۰/۶۸۸	۰/۹۷۳*	-۰/۹۶۷*	-۰/۱۹۲	-۰/۷۹۲	۱	
pH	-۰/۹۰۵	-۰/۷۵۵	-۰/۹۴۵	۰/۷۰۶	-۰/۷۸۹	-۰/۵۲۲	-۰/۹۷۵*	۰/۷۰۴	۱

* همبستگی در سطح ۹۹٪ معنی دار است.

° همبستگی در سطح ۹۵٪ معنی دار است.

کربناته است و با افزایش آن نیتريت که عامل سختی غیر کربناته است کاهش می یابد و بالعکس. با تبدیل سختی کربناته به سختی غیر کربناته رسوب در بطری های آب معدنی ایجاد می شود که مطلوب نیست. بین پارامترهای Ca با NO₃ و بین TH و NO₃ نیز همبستگی مثبت معنی داری وجود داشت به گونه ای که با افزایش کلسیم و سختی کل، نیتريت نیز افزایش می یابد. همچنین بین pH و Mg همبستگی مثبت معنی دار وجود داشت که با افزایش pH میزان منیزیم هم افزایش می یابد که با توجه به بالاتر بودن میزان Mg از حد استاندارد در بطری های آب S، این مورد تبعات نامطلوب خواهد داشت.

۳-۴-۲- همبستگی پارامترهای فیزیکیوشیمیایی در نمونه آب S

نتایج حاصل از این آزمون نشان داد همبستگی منفی معنی دار بین Mg با NO₂ و نیز بین pH با NO₂ هر دو در سطح ۹۵٪ وجود دارد. همچنین یافته ها نشان داد بین Ca با NO₃ در سطح ۹۵٪ و بین TH و NO₃ در سطح ۹۵٪ و بین pH با Mg در سطح ۹۹٪ همبستگی مثبت معنی داری وجود دارد (جدول ۵). نتایج همبستگی بین پارامترها در نمونه آب S (جدول ۵) نشان داد بین Mg با NO₂ و pH با NO₂ همبستگی منفی معنی دار وجود دارد به طوری که با افزایش منیزیم و اسیدیته آب، مقدار نیتريت کاهش می یابد؛ چون منیزیم عامل سختی

جدول ۵- ماتریس همبستگی پیرسون بین پارامترهای فیزیکیوشیمیایی در نمونه آب S

پارامتر	NO ₂	NO ₃	Mg	Ca	Cl	TDS	F	TH	pH
NO ₂	۱								
NO ₃	۰/۶۳۳	۱							
Mg	-۰/۹۸۰*	-۰/۷۴۴	۱						
Ca	۰/۶۱۰	۰/۹۶۷*	-۰/۶۸۸	۱					
Cl	۰/۴۸۰	۰/۰۵۲	-۰/۵۱۴	-۰/۱۵۷	۱				
TDS	-۰/۲۵۶	-۰/۳۶۲	۰/۱۸۳	-۰/۵۸۶	۰/۷۲۰	۱			
F	۰/۷۸۶	۰/۷۶۵	-۰/۸۵۵	۰/۶۰۹	۰/۶۸۳	۰/۱۸۸	۱		
TH	۰/۷۳۴	۰/۹۷۱*	-۰/۸۴۵	۰/۸۹۲	۰/۲۹۰	-۰/۱۸۵	۰/۸۹۷	۱	
pH	-۰/۹۸۰*	-۰/۷۴۴	۱/۰۰۰**	-۰/۶۸۸	-۰/۵۱۴	۰/۱۸۳	-۰/۸۸۵	-۰/۸۴۵	۱

* همبستگی در سطح ۹۹٪ معنی دار است.

* همبستگی در سطح ۹۵٪ معنی دار است.

۴- نتیجه گیری

بطری را به طور فاحش نشان داد. بنابراین مقایسه پارامترهای اندازه گیری شده نمونه های آب با مقدار مندرج روی برچسب ها نشان داد که به جز اسیدیته آب در برند M و سختی کل در هر دو برند، اختلاف معنی دار بین این دو وجود دارد. در مقایسه میانگین پارامترها در دو برند M و S نیز به واسطه مشترک بودن منبع برداشت هر دو از چشمه بهرغان، تفاوت معنی داری بین میزان ترکیبات و عناصر وجود نداشت. با توجه به همبستگی منفی قوی بین pH با فلوراید در برند M و همبستگی مثبت قوی pH با منیزیم در برند S، افزایش pH اثرات نامطلوب در کیفیت این دو برند آب معدنی دارد. بنابراین با توجه به این که این دو برند آب بطری شده دارای علامت استاندارد هستند، کارخانجات تولیدکننده ملزم به رعایت استانداردهای برچسب گذاری و ثبت مشخصات منطبق با نمونه واقعی آب هستند. با توجه به تاثیر کلر آزاد باقیمانده در کنترل آلودگی میکروبی آب و با استناد به نتایج این پژوهش که میزان کلر آب های بطری شده از حد استاندارد مطلوب نیز کمتر بودند، پیشنهاد می شود بررسی آلودگی میکروبی آب های بطری شده در آینده صورت گیرد. اعمال روش های پیشرفته و دقیق تر در واحدهای

نتایج این پژوهش در هر دو نمونه آب نشان داد که به جز عنصر منیزیم و فلوراید، سایر عناصر و ترکیبات مطابق با استانداردهای موسسه تحقیقات صنعتی ایران بوده اند. نتایج مقایسه میانگین پارامترها با حدود استاندارد نشان داد نیتريت و نیترات و کلسیم پایین تر و منیزیم بالاتر از حد استاندارد است. همچنین کلر و کل جامدات محلول و سختی کل پایین تر از حداکثر مجاز و استاندارد مطلوب قرار دارند. اسیدیته آب نیز پایین تر از حداکثر مجاز (۸/۵) و بالاتر از حداقل مطلوب (۶/۵) و فلوراید پایین تر از حداقل مطلوب (۰/۵) است. بنابراین مصرف این دو نوع آب باعث عوارض ناشی از کمبود فلوراید و افزون بودن منیزیم خواهد شد. نتایج مقایسه میانگین پارامترها با مقادیر درج شده روی برچسب بطری آب برند S نشان داد متغیرهای نیتريت، کلر، نیترات، منیزیم، کلسیم و اسیدیته به طور فاحش بالاتر و فلوراید پایین تر از مقدار درج شده روی برچسب بطری است. این مقایسه در برند M نیز بالاتر بودن نیتريت، نیترات، منیزیم، کلسیم، کلر و کل جامدات محلول و پایین تر بودن فلوراید از مقدار مندرج روی برچسب

۹. عمویی، ع، محمدی، عا، کوشکی، ز، اصغرینیا، ح، فلاح، سح، و طبری نیا، ه. ۱۳۹۰. مقادیر نیتریت و نیترات در آب های بطری شده موجود در سطح شهر بابل در تابستان ۸۹. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره ۱۴، ویژه نامه ۱، صص. ۷۰-۶۴.

۱۰. گودینی، ک، سایه میری، ک، علیان، گ، علوی، ص، و رستمی، ر. ۱۳۹۱. بررسی کیفیت میکروبی و شیمیایی آب های بطری شده موجود در شهر ایلام در سال ۸۹-۱۳۸۸. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ۲۰(۲)، صص. ۳۷-۳۳.

۱۱. لولویی، م، و ذوالعلی، ف، ۱۳۹۰. بررسی کیفیت آب های معدنی بطری شده در سطح شهر کرمان در سال ۱۳۸۸. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، ۱۰(۳)، صص. ۱۹۲-۱۸۳.

۱۲. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۸. آب آشامیدنی بسته بندی شده- ویژگی ها. انتشارات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۲۶ صفحه.

۱۳. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۸. آب آشامیدنی- ویژگی های فیزیکی و شیمیایی. انتشارات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۲۶ صفحه.

۱۴. میرانزاده، م، حسنی، ا، ایران شاهی، ل، احسانی فر، م، و حیدری، م. ۱۳۹۰. بررسی کیفیت میکروبی و غلظت فلزات سنگین در ۱۵ مارک آب بطری شده تولیدی در ایران بین سال های ۸۹-۸۸. سلامت و بهداشت اردبیل، ۲(۱)، صص. ۴۸-۴۰.

۱۵. میرانزاده، م، و ربانی، د. ۱۳۸۹. بررسی کیفیت شیمیایی آب ورودی و خروجی دستگاه های آب شیرین کن شهر کاشان طی سال های ۸۷-۱۳۸۶. فصلنامه علمی-پژوهشی فیض، ۱۴(۲)، صص. ۱۲۵-۱۲۰.

۱۶. یاری، خ، لیلی، م، ذوالقدرنسب، ح، محمدی بلبان، ش، و رحمانی، ش، ۱۳۹۹. بررسی کیفیت فیزیکی، شیمیایی و میکروبی آب های بطری شده در شهر همدان در سال ۱۳۹۵. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، ۲۷(۱)، ۱۰۱-۹۳.

17. Akbari, H., Soleimani, H., Radfard, M., Abasnia, A., Hashemzadeh, B. and Adibzadeh, A., 2018. Data on investigating the nitrate concentration levels and quality of bottled water in Torbat-e Heydarieh, Khorasan razavi province, Iran. *Data in brief*, 20, pp. 463-467.

کنترل کیفیت در شرکت های تولیدکننده این آب های معدنی و نظارت دقیق سازمان غذا و دارو و تطبیق غلظت پارامترها با حدود استاندارد موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی جهت تشخیص اثرات آن ها بر سلامتی انسان ها، از دیگر پیشنهادهای است که می تواند در بهبود کیفیت آنها موثر واقع شود.

۵- منابع

۱. اشرفی یورقانلو، ر، ۱۳۹۷. مطالعه و تعیین میزان آلاینده های فلزات سنگین و ترکیبات شیمیایی (نیتریت و نیترات) در آب های معدنی موجود در بازار استان آذربایجان غربی. مجله علوم و صنایع غذایی، ۱۵(۸۲)، صص. ۴۷۵-۴۸۵.

۲. آقارلی، ز، و جعفریان، س، ۱۳۹۶. بررسی مقادیر نیتریت و نیترات آب های معدنی بطری شده مورد عرضه در سطح شهرستان بابل در سال ۱۳۹۴. مهندسی بهداشت محیط، ۱۵(۱)، صص. ۷۲-۶۵.

۳. خرمایی، م، ۱۳۸۶. راهنمای گردشگری فارس، چاپ اول، نشر فرهنگ پارس، شیراز.

۴. دیندارلوک، علیپور، و، و فرشیدفر، غ، ۱۳۸۵. کیفیت شیمیایی آب شرب بندرعباس. مجله پزشکی هرمزگان، ۱۰(۱)، صص. ۸۵-۵۷.

۵. رضایی، س، رایگان شیرازی، ع، فرارویی، م، جمشیدی، ا، و سادات، ع. ۱۳۹۰. ارزیابی کیفیت میکروبی و شیمیایی آب های معدنی عرضه شده در سطح شهر یاسوج در سال ۱۳۸۷. ارمغان دانش، ۱۶(۳)، صص. ۲۹۹-۲۹۱.

۶. ریاحی خرم، م، خوش شعار، م، و هاشمی، م، ۱۳۹۳. مطالعه ویژگی های میکروبی و شیمیایی آب های بطری شده در استان همدان. بهداشت مواد غذایی، ۴(۱۳)، صص. ۸۰-۶۹.

۷. شاهوی، ش، و ترابیان، ع، ۱۳۹۶. بررسی و مقایسه استانداردهای کیفی آب شرب ایران و استانداردهای معتبر جهانی، نشریه علوم و مهندسی آب و فاضلاب، ۲(۲)، صص. ۱۳-۳.

۸. عاصم اصل، ر. ۱۳۸۷. چشمه های آب گرم و معدنی استان آذربایجان شرقی. مجله رشد و آموزش زمین شناسی، ۵۴، صص. ۲۵-۲۱.

25. Sahl, J.W., Schmidt, R., Swanner, E.D., Mandernack, K.W., Templeton, A.S., Kieft, T.L., Smith, R.L., Sanford, W.E., Callaghan, R.L., Mitton, J.B. and Spear, J.R., 2008. Subsurface microbial diversity in deep-granitic-fracture water in Colorado. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), pp.143-52.
26. Semerjian, L., 2011. Quality assessment of various bottled waters marketed in Lebanon. *Environmental Monitoring and Assessment*, 172, pp.275-285.
27. Singla, A., Hansa, K., Basavaraj, P., Singh, S., Singh, K. and Jain, S., 2014. Physico-chemical and bacterial evaluation of packaged drinking water marketed in Delhi-potential public health implications. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(3), pp.246-250.
28. SPSS Inc. Released 2008. SPSS Statistics for windows. 17.0 ed. Chicago. IL, USA.
29. WHO., 2008. Guideline values for drinking water quality. 3rd ed. Geneva, Switzerland.
30. Zietz, B.P. and Suchenwirth, R., 2007. Assessment and management of tap water lead contamination in Lower Saxony, Germany. *International Journal of Environmental Health Research*, 17(6), pp.407-418.
18. American Public Health Association., 1999. Standard methods for examination of water and wastewater. 20th ed. p.321-328.
19. Ferrier, C., 2002. Bottled water understanding a social phenomenon. Publisher: Royal Swedish Academy of Sciences. 34, pp.18-22.
20. Ismail, A. H., Zowain, A. and Sufar, E., 2013. Quality assessment of various local bottled waters in different Iraqi markets. *Engineering and Technology Journal*, 31(5), pp.660-677.
21. Khadra, W. M., 2020. Authenticity of bottled water chemical composition inferred from brand labels: example of the Lebanese market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 93, pp.103609.
22. Massaro, E. J., 1997. Handbook of toxicology National health and environment effects research laboratory. CRC press Boca Raton New York. pp.144-152.
23. Mekonnen, Y. T., Shemsu, S., Rajasekhar, K. and Rafi, M. M., 2015. Assessment of chemical quality of major brands of bottled water marketed in Gondar Town, Ethiopia. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Research*, 6, pp.497-501.
24. Ngari, M. S., Wangui, W.T. and Ngoci, N.S., 2013. Physico-chemical properties of spring water in kabare and baragwi locations, Gichugu Division Kirinyaga County of Kenya. *International Journal of Science and Research*, 2, pp.280-285.

(Original Research Paper)

Quality Assessment of Two Brands of Mineral Waters Bottled from Bahrehgan Spring, Sepidan, Fars

Mojtaba Moghimi¹, Haniyeh Nowzari^{2*}

1-MS.c Graduated of Environment, Abadeh Branch, Islamic Azad University, Abadeh, Iran.

2-Assistant Professor, Department of Environment, Abadeh Branch, Islamic Azad University, Abadeh, Iran.

Received:08/03/2022

Accepted:25/06/2022

Abstract

Nowadays, the consumption of bottled mineral waters is widespread in society, so awareness of its quality is essential to maintain public health. The aim of this study was to investigate the physicochemical quality of two brands of mineral water M and S bottled from the same origin and 9 factors of nitrite, nitrate, magnesium, calcium, chlorine, total dissolved solids, fluoride, total hardness and pH. One sample t-test, Independent sample t-test and Pearson correlation matrix were used to analyze the data. The results of this study showed that in both brands the mean amount of all measured factors (exception of magnesium and fluoride) were within the standard range. There were also significant differences between the measured values and the values inferred from the bottle labels (exception of pH of M brand and TH of both brands). On the other hand, with a strong positive correlation between pH and Mg of S brand and a strong negative correlation between pH and F of M brand and according to the out of standard amount of these two parameters, increasing the pH can have adverse effects on water quality of both brands.

Keywords: Physicochemical Factor, Standard, Bottled Water, Label, Bahrehgan Spring.

*Corresponding Author: hnowzari@iauabadeh.ac.ir

(مقاله پژوهشی)

بررسی امکان ریزپوشانی بتالائین حاصل از ریشه چغندر قرمز و ارزیابی خصوصیات کاربردی و عملکردی آن

غزل حنیفه زاده^۱، مسعود هنرور^{۲*}

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

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۷

چکیده

امروزه استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و نگهدارنده های طبیعی به جای نگهدارنده‌های سنتزی با توجه به مضرات و بیماری‌های شناخته شده آن‌ها، جایگاه ویژه و اساسی در صنعت غذا دارند. یکی از این ترکیبات با اثرات آنتی‌اکسیدانی شناخته شده بتالائین های حاصل از چغندر قند می باشد که با استفاده از تکنولوژی کپسوله شدن در این تحقیق به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان مورد استفاده و بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق ریزکپسول های بتالائین با روش ژلاسیون یونی با استفاده از آلژینات سدیم و صمغ گوار با مقادیر ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم انجام شد. آزمون‌های بررسی خصوصیات ریزکپسول های بتالائین شامل؛ ارزیابی خصوصیات اندازه ریزکپسول ها، میزان به دام اندازی بتالائین، میزان رهائش تجمعی و همچنین خصوصیات ساختاری آن‌ها بررسی شدند. همچنین خصوصیات حداقل میزان کشندگی، مهارکنندگی و درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد برای ریزکپسول‌ها محاسبه و ارزیابی شد نتایج آزمون‌ها با استفاده روش آنالیز واریانس ANOVA یک طرفه و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی نتایج آزمون نشان داد که با افزایش استفاده از بتالائین در فرمولاسیون ریزکپسول‌ها تا مقادیر ۱/۵ میلی‌گرم بتالائین درصد به دام اندازی و رهائش ابتدا افزایش یافت، سپس با افزایش استفاده تا میزان ۲/۵ میلی‌گرم کاهش معنی داری را تجربه نمود. ریزکپسول‌ها دارای شکل کروی، هموزن و یکنواخت بودند و همچنین در تیمارهای با مقادیر بالاتر از ۱/۵ میلی‌گرم بتالائین، حالت آگلومراسیون بین ذرات همزمان با افزایش اندازه ذرات نیز وجود داشت و با در نظر گرفتن خصوصیات حداکثر میزان به دام اندازی و رهائش و هموزن بودن مورفولوژیکی و همچنین حداقل میزان کشندگی و مهارکنندگی و بالاترین درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد، نهایتاً ریزکپسول‌ها با میزان ۱/۵ میلی‌گرم بتالائین به عنوان تیمار بهینه انتخاب و معرفی گردید.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بتالائین، ریزکپسول، چغندر قرمز

۱- مقدمه

امروزه تولید محصولات غنی شده با آنتی اکسیدان ها و رنگهای طبیعی بسیار گسترش پیدا کرده است. این اجزاء که بیشتر در گیاهان یافت می شوند، با وارد شدن در فرمولاسیون مواد غذایی سبب افزایش مشتری پسندی می شوند. فرآیند استخراج و خالص سازی اجزای طبیعی با منشا گیاهی به منظور دستیابی به این ترکیبات زیست فعال بسیار مهم می باشد. به طوری که این ترکیبات نسبت به دماهای بسیار بالا و همچنین نور حساس می باشند. فرآیند استخراج و متعاقباً خالص سازی آن ها نیازمند این می باشد که از شرایط ملایم تری استفاده شود. روش معمول استخراج ترکیبات زیست فعال گیاهی با استفاده از غوطه وری در حلال و همزنی می باشد. طی این روش، ماده گیاهی با یک نسبتی با حلال (عمدتاً مخلوط آب و اتانول) مخلوط می شود و با تنظیم کردن شرایطی از قبیل دما و pH، در یک مدت زمان مشخص فرآیند استخراج به حداکثر مقدار خود می رسد (۱). طبق تعریف بسیار کلی، آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که قادرند از فرآیند های اکسیداسیون جلوگیری نموده، آن ها را به تأخیر انداخته و یا طولانی نمایند. طبق تعریف^۱ USDA آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که به منظور به تأخیر انداختن فساد، تندی یا تغییر رنگ ناشی از اکسیداسیون مورد استفاده قرار می گیرند، آنتی اکسیدان ها می توانند اکسیداسیون را مهار کرده یا به تأخیر می اندازند، ولی کیفیت یک محصول اکسید شده را بهبود نمی بخشند و واکنش های فساد، برگشت ناپذیر می باشند. در برخی بررسی ها نشان داده شده است که مخلوط دویچند آنتی اکسیدان بهتر از هر یک از آن ها در مقدار مساوی عمل می کنند. و آن را اثر تقویت کنندگی معرفی می نمایند. سینرژیست ها ترکیباتی هستند که فعالیت آنتی اکسیدان ها را بدون این که خودشان آنتی اکسیدان باشند، افزایش می دهند (۳). لیبویا چغندر قرمز منبع خوبی از بتالائین می باشد. ساقه چغندر به عنوان یک باقی مانده در بخش کشاورزی و همچنین صنعت

بوده که پتانسیل بالایی به منظور استفاده به عنوان منبع بتالائین دارد. در واقع می توان این گونه مطرح کرد که تجاری ترین گیاهی که دارای بتالائین می باشد چغندر قرمز است. بتالائین ها از جمله ترکیبات رنگی (رنگ قرمز تابنفش) بوده که در گیاهان کلروفیل دار یافت می شوند (۴). بتالائین ها رنگدانه های نیتروژن دار محلول در آب هستند که در غلظت های بالا در چغندر قرمز یافت می شوند. رنگدانه بتالائین از دو زیر واحد بتاسیانین (رنگدانه قرمز) و بتاگزانتین (رنگدانه زرد) تشکیل شده است. این رنگدانه اثرات ضد میکروبی و ضد ویروسی دارد و هم چنین می تواند رشد سلول های سرطانی را مهار کند. بتالائین می تواند به عنوان افزودنی به منظور ایجاد رنگ و غنی سازی مواد غذایی استفاده شود (۵). استفاده از بتالائین به عنوان رنگ در مواد غذایی توسط اتحادیه اروپا با عنوان E ۱۶۲ تصویب شده است. بتالائین نسبت به سایر رنگدانه های قرمز مانند آنتوسیانین ها در برابر pH و دما پایدارتر است و در گستره وسیعی از pH پایدار است و بیش تر برای مواد غذایی اسیدیته پایین استفاده می شود در حالی که استفاده از آنتوسیانین برای این مواد غذایی غیر ممکن است. مخلوط رنگدانه بتالائین می تواند به عنوان یک افزودنی طبیعی برای مواد غذایی، داروها و محصولات آرایشی و بهداشتی به صورت عصاره غلیظ یا پودر استفاده شود (۹). عصاره بتالائین که از چغندر به دست می آید به عنوان مواد رنگی طبیعی می تواند در محصولات لبنی، نوشیدنی ها و شیرینی جات به صورت گسترده ای استفاده شوند. حضور بتالائین ها در محصولات غذایی علاوه بر این که باعث ایجاد رنگ شده، خصوصیات دیگری از جمله خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهاب، محافظت از کبد و همچنین اثرات ضد میکروبی ارائه می کنند (۶). سنگین ترین بتالائینی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته، بتانین موجود در چغندر قرمز می باشد. این ترکیب گلیکوزیدی بوده که دارای یک بخش قندی (گلوکز) و یک بخش غیر قندی (بتانیدین) به عنوان قسمت رنگی می باشد. قدرت رنگ دهنده گی بتالائین ها بستگی زیادی به سیستم حلال داشته که در آن یافت می شوند. به علاوه، بتالائین ها، برای مواد غذایی با اسیدیته پایین و خنثی مناسب می باشند که

معنی داری روی بتالائین و رنگ عصاره بود. نقطه بهینه به دست آمده برای استخراج بتالائین، دمای ۴۲ درجه سلسیوس، زمان ۱۱۵ دقیقه و ۱/۲ گرم وزن و $\text{pH}=6/9$ تعیین گردید. در این تحقیق نیز ریزکپسول‌های بتالائین تهیه و ارزیابی خصوصیات گردید (۱۵). Li و همکاران در سال ۲۰۲۲ نیز در یک بررسی به ریزکپسوله کردن بتالائین حاصل از استخراج از میوه کاکتوس قرمز پرداختند و دریافتند که تیمار فراصوت می‌تواند برای بهبود ریزکپسول‌سیون و افزایش پایداری بتالائین‌ها در صنعت غذا مورد استفاده قرار گیرد (۳۳). با توجه به این که تحقیقات کمی در مورد به دام اندازی رنگدانه‌های چغندر قرمز و بهینه‌سازی آن‌ها صورت گرفته‌است. این تحقیق می‌تواند علاوه بر کاهش خلاءهای تحقیقاتی موجود به استفاده از روش‌های ایمن جهت تولید ریزکپسول‌ها با حداکثر کارایی افزوده و همچنین به ارائه فرمولاسیون بهینه با استفاده از روش ژلاسیون یونی جهت ریزپوشانی بتالائین‌ها نیز جهت استفاده در کلیه زمینه‌های صنعت غذا به عنوان یک ریزکپسول با خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالا کمک نماید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد مورد استفاده در تحقیق

چغندر قرمز گونه بتا و ولگاریس^۲ واریته بتا و ولگاریس از تهیه از بازار محلی تهران توسط وسیله نقلیه و در جعبه‌های خشک و عاری از رطوبت به آزمایشگاه منتقل شد و شستشو و پوست‌گیری به صورت خلال درآمده، در محل تاریک و در دمای اتاق به مدت یک هفته تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. سپس با آسیاب به صورت پودر در آمد سایر مواد مورد استفاده شامل آلزینات سدیم، صمغ گوار بودند.

۲-۲- تهیه و استخراج بتالائین چغندر قند

برای استخراج بتالائین پس از تهیه و آماده سازی اولیه چغندر، پودر چغندر قرمز تهیه شده به نسبت ۱۰ به ۱ با آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه با همزن مغناطیسی مخلوط گردید و سپس به مدت

این به دلیل پایداری آن‌ها در pH معادل ۳ تا ۷ می‌باشد (۱۱). از جمله مهم‌ترین منابع معمول بتالائین‌ها می‌توان به چغندر قرمز و زرد، برگ چغندر سوئیسی، برگ و دانه گیاه آمارانت و همچنین برخی از گونه‌های کاکتوس اشاره داشت (۹ و ۱۲). همانند آنتوسیانین‌ها، فعالیت بتالائین‌ها نیز به شرایط محیطی بستگی داشته که در آن حضور دارند. همچنین از سوی دیگر خصوصیات ذاتی و شیمیایی آن‌ها نیز در شرایط محیطی باید در نظر گرفته شود. برای مثال، بررسی‌ها نشان داده است که فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد توسط بتالائین‌ها تحت تاثیر pH و ساختار مولکولی می‌باشد. بر اساس تحقیقات انجام گرفته افزایش فعالیت این رنگدانه در pH بالاتر از ۵/۵ مشاهده شده است (۱۳). بتالائین‌ها بعد از استخراج نسبت به تجزیه شدن حساس می‌باشند. پایداری بتالائین‌ها به فاکتورهای درونی از جمله فعالیت آنزیمی و همچنین فاکتورهای دیگر از جمله شرایط استخراج، مانند دما و حضور اکسیژن و pH مربوط می‌شود. برای این منظور ضروری است که فاکتورهایی که باعث تجزیه آن‌ها می‌شوند، به کم‌ترین مقدار خود برسند. به عنوان مثال بر اساس تحقیقات صورت گرفته استفاده از غشاها به عنوان ابزارهای جداسازی ترکیبات، می‌تواند از تجزیه این مواد حساس جلوگیری نماید. لازم به ذکر است در این روش با کاهش مقدار شار عبوری در طول فرآیند، رسوب در غشا اتفاق می‌افتد و باعث تجزیه بتالائین‌ها در جریان عبوری می‌شود. فرآیندهای جداسازی و خلص سازی در شفاف سازی عصاره‌ها موثر می‌باشند (۱۴). در بررسی‌های مشابه‌ای در این زمینه، امجدی و همکاران (۱۳۹۷) فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری بتالائین ریزپوشانی شده به روش خشک کن پاششی را در پاستیل بررسی نمودند. آن‌ها ریزپوشانی را روش مناسبی برای به دام اندازی بتالائین ارزیابی نمودند. Prakash Mara و همکاران (۲۰۱۳) استخراج بتالائین را از میوه کاکتوس قرمز^۱ با استفاده از طرح باکس بنکن به روش بهینه‌سازی سطح پاسخ، مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصله نشان داد که دما، جرم و زمان دارای اثر

۲۰ دقیقه بدون اعمال حرارت در حمام فراصوت با فرکانس ۲۸ کیلوهرتز قرار گرفت. عصاره بتالائین به دست آمده با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ و پمپ خلأ صاف گردیده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با ۷۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد (۲۰).

۲-۳-۲- تهیه ریز کپسول ها

۲-۳-۱- آماده سازی محلول بتالائین

در این تحقیق بتالائین استخراج شده در روش فراصوت، برای فرمولاسیون ریز کپسول هامورد استفاده قرار گرفت. ۵۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر استریل را با ۸۰ میکرو لیتر اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل کرده و در ظرف درب داری که از قبل استریل شده بود مخلوط کرده (اسید به آب اضافه شد. سپس ۵۰۰ میلی گرم بتالائین استخراج شده را در ۵۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر آماده شده به خوبی حل کرده که تمامی موارد در زیر هود بیولوژیکی انجام شد به طوری که در ظرف استریل دیگری این محلول از فیلتر ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد و با استفاده از رابطه $N2V2 = N1V1$ مقدار مورد نظر از آن را برداشته و به ظروف درب دار افزوده و پس از پخش شدن آن در آب در فرمولاسیون ریز کپسول بتالائین مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

۲-۳-۲- تهیه ریز کپسول های بتالائین

ریز کپسول های بتالائین با استفاده از روش ژلاسیون یونی^۱ تولید شد. برای این منظور محلول آلژینات سدیم و صمغ گوار به همراه بتالائین با مخلوط کردن پودر خشک آلژینات با ویسکوزیته بالاتر از ۲۰۰۰ سانتی پواز در محلول ۲ درصد صمغ گوار و حل کردن پلیمرها در آب مقطر به طور شبانه با استفاده از همزن مغناطیسی با حرارت ملایم ۳۰ درجه سلسیوس تهیه شد. محلول بتالائین (۰/۱ در ۰/۰۲ نرمال هیدروکلریک اسید) مطابق با جدول کد بندی تیمارهای تحقیق (جدول ۱) در محلول پلیمری ۱۰ درصد اضافه شد. محلول یون های کلسیم جهت افزایش اتصالات شبکه تخم مرغ آلژینات و صمغ گوار، در ۱۰۰۰ دور با محلول پلیمری مخلوط شده و به صورت قطره قطره با فیلتر سرسرنگی با اندازه ۲۲ میکرومتر اضافه شد. پس از آن به مدت یک ساعت هم خورده و بعد از سانتریفوژ ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه برای جداسازی ریز کپسول ها از ترکیبات غیر کپسوله و به فرم آزاد در محلول استفاده شد (۲۰).

جدول ۱- کد بندی تیمارهای تحقیق

غلظت بتالائین (mg)	کد تیمار
۰/۲۵	B1
۰/۵	B2
۱	B3
۱/۵	B4
۲	B5
۲/۵	B6

۲-۴-۱- ارزیابی خصوصیات ریزکپسول های تولید شده**۲-۴-۱-۱- ارزیابی میزان به دام اندازی بتالائین**

میزان بتالائین اولیه پس از استخراج با روش فراصوت توسط HPLC معکوس با ستون C-18 در طول موج ۲۲۰ نانومتر و حلال آب و دمای ۸۰ درجه سلسیوس تعیین مقدار شده و میزان بتالائین به دام افتاده توسط ریزکپسول ها با پخش کردن ۵۰ میلی گرم

رابطه (۱)

درصد به دام اندازی بتالائین = درصد بتالائین مورد شناسایی شده در ریزکپسول ها بر حسب میلی گرم / میزان بتالائین مورد استفاده در فرمولاسیون ریزکپسول ها

۲-۴-۲- ارزیابی میزان آزاد سازی تجمعی بتالائین

میزان بتالائین آزاد شده از ریزکپسول ها با روش لوری ۱ اندازه گیری شد. ریزکپسول ها در بافر فسفات (۰/۲ مولار، pH=۷/۴) و در ۱۰۰۰ دور برای مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان بتالائین در مایع رویی تخمین زده شد. برای این منظور از کیسه دیالیز ساخت شرکت سیگما-آلدریچ کشور آلمان، با اندازه ۱۰۰۰ کیلو دالتن استفاده شده و ریزکپسول ها در داخل این ساختار در محیط بافر سالین فسفات در یک بشر ۵۰۰ میلی لیتری هم خورده

رابطه (۲)

$100 \times$ میزان بتالائین در محلول ریزکپسول ها / میزان بتالائین در ریزکپسول = میزان آزاد سازی بتالائین

و در بازه های زمانی صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه از محیط بافر سالین فسفات در خارج کیسه دیالیز برداشته شده و تعیین مقدار کمی گردید، پس از هر بار برداشتن از محیط بافر سالین فسفات خارج کیسه دیالیز حجم برداشته شده با بافر سالین فسفات جایگزین گردید و نهایتاً میزان بتالائین تجمعی آزاد شده از ریزکپسول ها در بازه های زمانی مختلف از رابطه ۲ به دست آمد و برای هر فرمولاسیون میزان درصد رهایش به صورت درصد تجمعی رهایش در کلیه زمان های ارزیابی محاسبه گردید (۵).

۲-۴-۳- ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی و اندازه ریز کپسول ها برای ارزیابی مورفولوژیکی ریز کپسول ها از میکروسکوپ الکترونی SEM پس از پوشش دهی ریز کپسول ها با طلا استفاده شد و ارزیابی اندازه ریز کپسول ها با دستگاه (DMLB, Germany) Leica DLS بررسی شد (۶).

۲-۴-۴- بررسی خاصیت ضد میکروبی

۲-۴-۴-۱- تعیین حداقل مهار کنندگی (MIC)

آزمایش MIC در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش برات میکرو دایلوژن (روش MIC) انجام شد. ابتدا از محیط کشت مولر هیتون برات (مرک آلمان) ۱۰۰ میکرو لیتر داخل ۹۶ چاهک میکرو پلیت ریخته شده و سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره اضافه شد و از خانه دوم به سوم و به همین ترتیب تا خانه نهم رقیق شد. در آخر به همه چاهک ها ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون میکروبی میکرو کوس لوتوس (باکتری شاخص) رقیق شده معادله لوله نیم مک فارلند اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به وسیله پایه پلیت tray-reading stand که به همین منظور ساخته شده، کف پلیت زیر نور آینه در آینه مشاهده شد. وجود کدورت که نشان دهنده رشد یا عدم رشد باکتری بود را در جدول مخصوص یادداشت نموده و طبق تعریف غلظت (رقیق ترین) چاهکی که هیچ کدورتی در آن ایجاد نشده بود، معادل MIC قرارداد شد. خانه کنترل اسانس، محیط کشت و میکروب نیز جداگانه منظور شد (۷).

۲-۴-۴-۲- تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای آزمایش MBC همه چاهک های فاقد کدورت جداگانه بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت کمترین غلظتی از اسانس که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان غلظت کشندگی MBC گزارش شد (۸).

۲-۴-۳- ارزیابی میزان مهار کنندگی رادیکال های آزاد یکی از روش های اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد DPPH ۲ است. در این مرحله ۴ میلی لیتر از محلول DPPH ۱ mM به ۰/۲ میلی لیتر از بتالائین اضافه شد و سپس جذب آن ها در ۵۱۷ نانومتر تعیین شد و فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب درصد مهار DPPH از طریق رابطه ۳ زیر به دست آمد (۹).

رابطه (۳)

$$A(\%) = \frac{AC - As}{Ac} \times 100$$

که در این رابطه A درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH، AC جذب نوری شاهد و As جذب نوری نمونه بر حسب نانومتر می باشند.

۲-۵- روش آماری

داده های مربوط به نتایج با استفاده از نرم افزار Minitab 16 مورد تجزیه و تحلیل توصیفی قرار گرفت. از تجزیه واریانس یک طرفه جهت مقایسه میانگین ها استفاده شد. میانگین ها در سطح اعتماد ۹۵ درصد از نظر آماری متفاوت قلمداد شد. طرح مورد استفاده در این بررسی طرح کاملاً تصادفی متعادل بود. نتایج آزمایشات شیمیایی و فیزیکی از طریق ANOVA One-way and $P < 0/05$ به معنی وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج ارزیابی میزان درصد به دام اندازی و رهایش

تجمعی بتالائین در ریز کپسول ها

جدول ۲ میزان درصد به دام اندازی و رهایش بتالائین ها در ریز کپسول های مختلف را نشان می دهد. به طور کلی در بین تیمارهای ریز کپسول ها بالاترین درصد به دام اندازی و رهایش به ریز کپسول های دارای ۱/۵ میلی گرم بتالائین (B4) به ترتیب به میزان ۵۹ و ۵۲ درصد تعلق داشت. همان گونه که در نتایج مشاهده می شود با افزایش میزان درصد بتالائین از سطح ۰/۲۵

تا ۱/۵ میلی گرم میزان درصد به دام اندازی به طور معنی داری افزایش معنی داری را تجربه نمود ($p \leq 0/05$) و پس از آن با افزایش میزان درصد به دام اندازی از ۱/۵ میلی گرم تا ۲/۵ میلی گرم میزان درصد به دام اندازی کاهش معنی داری نشان داد ($p \leq 0/05$).

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد به دام اندازی و رهائش بتالائین در تیمارهای ریزکپسول‌های بتالائین

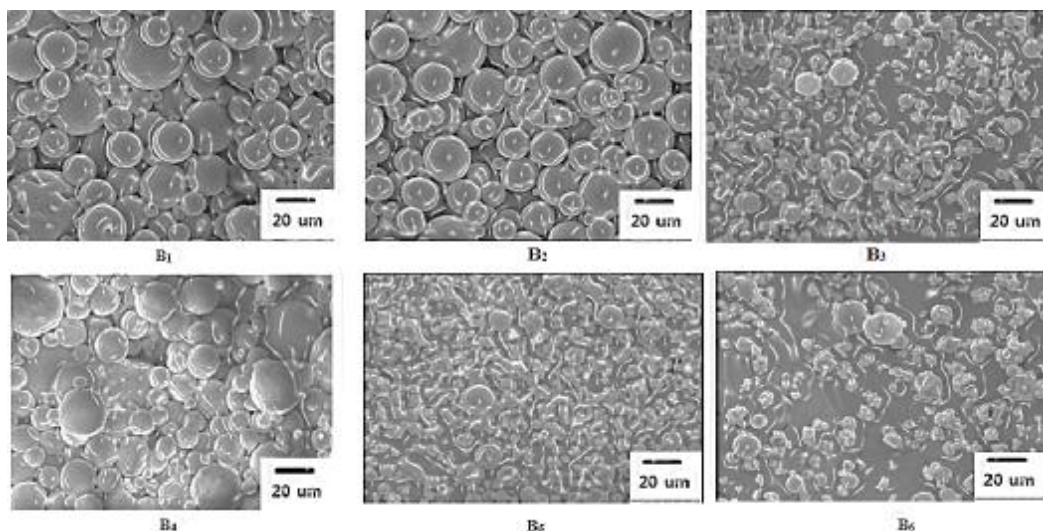
کدبندی تیمارها	میزان درصد به دام اندازی بتالائین	درصد رهائش بتالائین
B1	۴۵ ± ۰/۰۱a	۳۸ ± ۰/۰۲a
B2	۴۹ ± ۰/۰۳ab	۴۵ ± ۰/۰۱b
B3	۵۴ ± ۰/۰۲b	۵۱ ± ۰/۰۱c
B4	۵۹ ± ۰/۰۵bc	۵۲ ± ۰/۰۳c
B5	۵۶ ± ۰/۰۲c	۵۰ ± ۰/۰۱cd
B6	۵۲ ± ۰/۰۳d	۴۵ ± ۰/۰۱d

با روش‌هایی مانند حل شدن، محبوس شدن، جذب شدن یا اتصال در درون ماتریس انتقال داده شود. هدف اولیه تعیین شرایطی بود که در آن ریزکپسول‌ها با ویژگی‌های بهینه تولید شوند که اندازه مناسب را داشته باشند و بدون به هم چسبیدگی و آگلومراسیون و با توزیع مناسب ذرات باشند. این مسئله بر روی کارایی انکپسوله شدن، پایداری کلوتیدی و میانکنش نانومولسیون‌ها با انکپسولانت و محیط اطراف تأثیرگذار است. اندازه ریزکپسول‌ها روی توانایی سیستم انتقال ترکیبات برای انتقال و رهائش مؤثر ترکیبات کپسوله شده حائز اهمیت است. بنابراین پایداری ریزکپسول‌ها می‌تواند با توزیع مناسب اندازه ذرات افزایش یابد. ریزکپسول‌های بتالائین دارای ساختار مورفولوژی هموزن بوده و دارای شکل کروی و بدون آگلومراسیون می‌باشد. شکل کروی ریزکپسول‌های بتالائین نیز به دلیل تعادل الکتروستاتیکی ریزکپسول و بتالائین می‌باشد که قابلیت تشکیل شبکه تخم‌مرغی آلژینات سدیم و گوار به کار رفته در ساختار پوشش را نیز دارد. و با عملکرد به عنوان هسته می‌تواند برای به دام اندازی بتالائین مورد استفاده قرار گرفته و باعث به دام اندازی بتالائین شود.

همچنین روند مشابهی در مورد میزان بتالائین در تیمارهای ریزکپسول وجود داشت و در تیمارهای ریزکپسول دارای مقادیر بالای بتالائین میزان درصد رهائش تجمعی بالاتر از تیمارهای ریزکپسول دارای مقادیر پائین تر بتالائین بوده و با افزایش میزان درصد به دام اندازی میزان درصد رهائش تجمعی افزایش و در تیمارهای ریزکپسول با مقادیر بالاتر از ۱/۵ درصد بتالائین میزان درصد رهائش تجمعی به طور معنی داری کاهش یافت ($p \leq 0/05$).

۳-۲- نتایج ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی و سایز ریزکپسول‌های بتالائین

شکل ۱ نتایج ارزیابی مورفولوژیکی ریزکپسول‌های بتالائین را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۱ مشاهده شد که ریزکپسول‌های بتالائین به صورت فرم کروی بوده و از سطح نرم برخوردار می‌باشند. با افزایش میزان درصد بتالائین در فرمولاسیون تیمارهای ریزکپسول در مقادیر B₄ تا B₆ به تدریج ریزکپسول‌های بتالائین به صورت ظاهر غیر کروی و آگلومره و غیریکنواخت در آمده و پلیمرهای آزاد در محیط نیز مشاهده شد. به دام اندازی ترکیبات با ارزش و بیوفعال در یک حامل مناسب روشی برای پایداری و ذخیره سازی نانوذرات می‌باشد. ترکیب به دام افتاده در داخل کپسول می‌تواند



شکل ۱- نتایج ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی ریزکپسول‌های بتالائین

جدول ۳- میانگین اندازه ذرات ریزکپسول‌های حاوی بتالائین

اندازه ریزکپسول ها (میکرومتر)	کدبندی تیمارها
$a314 \pm 0.1$	B ₁
$b365 \pm 0.3$	B ₂
$c379 \pm 0.2$	B ₃
$d390 \pm 0.1$	B ₄
$e320 \pm 0.1$	B ₅
$e311 \pm 0.3$	B ₆

استوکیومتری بین ترکیبات حامل و انکپسولانت باید برقرار باشد از این رو با افزایش میزان بتالائین در فرمولاسیون تیمارهای ریزکپسول میزان شاخص به دام اندازی افزایش می یابد و به تبع هر چه میزان درصد به دام اندازی بتالائین در فرمولاسیون ریزکپسول ها افزایش می یابد، میزان شاخص رهايش تجمعی نیز به طور معنی داری افزایش می یابد. در مقادیر ۲ و ۲/۵ درصد با برهم خوردن تعادل استوکیومتری حامل، ذرات تشکیل شده یکدست و هموزن نبوده و نهایتاً میزان به دام اندازی و رهايش کاهش یافته و ضمن این که مقداری از ترکیبات آلژینات سدیم و صمغ گوار به صورت آگلومره نیز در تصاویر میکروسکوپ

همان گونه که در نتایج جدول ۳ نیز قابل مشاهده می باشد با افزایش میزان استفاده از بتالائین در فرمولاسیون ریزکپسول ها میزان اندازه ریزکپسول ها به طور معنی داری افزایش یافت که با جرم مولکولی ریزکپسول ها ارتباط دارد به عبارتی افزایش جرم مولی ترکیبات باعث افزایش اندازه ریزکپسول ها حاصله گردید. وزن مولی مربوط به مولکول بتالائین ۵۵۱/۴۸ مول بر گرم بوده که با افزایش میزان استفاده از آن در فرمولاسیون نانوذرات جرم مولی کل ریزکپسول ها به طور معنی داری افزایش می یابد که منجر به تولید اندازه ذرات بزرگتری می شود. برای تشکیل ریزکپسول هموزن و یکنواخت نیاز می باشد که نسبت

الکترونی نیز مشاهده گردید که با نتایج اندازه گیری‌های به دام اندازی و رهایش در توافق می‌باشد. Janiszewska در سال ۲۰۱۴ نیز ریزکپسول‌هایی بر پایه آب چغندر تهیه نمودند و به نتایج مشابهی با تحقیقات حاضر رسیدند. آن‌ها دریافتند که افزایش میزان بتالائین بر میزان اندازه ذرات و خصوصیات مورفولوژیکی ریزکپسول‌ها موثر می‌باشد که با یافته‌های تحقیق حاضر نیز در توافق بود (Ersus & Yurdagel, ۲۰۰۷). طی تحقیق به ریزکپسوله کردن آنتوسیانین‌های هویچ سیاه توسط دستگاه خشک‌کن پاششی پرداختند و دریافتند که افزایش میزان آنتوسیانین‌ها بر میزان اندازه ذرات خصوصیات مورفولوژیکی ریزکپسول‌ها موثر می‌باشد که با یافته‌های تحقیق حاضر نیز در توافق بود (۲۸). کنتیک رهایش بتالائین‌ها از ریزکپسول‌ها در دو مرحله فرایند دوفازی توصیف می‌شود؛ مرحله اولیه شامل ترکیدن اولیه است که رهایش کند را در ریزکپسول‌ها موجب می‌گردد. در غلظت‌های بتالائین (بالای ۲ میلی گرم) حدود یک ساعت زمان لازم است تا این رهایش اولیه صورت پذیرد و در ریزکپسول‌های با مقادیر پایین تر و حضور بتالائین آزاد در محیط فرایند به صورت یک مرحله‌ای درآمده است با افزایش میزان به دام اندازی بتالائین‌ها میزان به دام اندازی و نهایتاً میزان رهایش افزایش می‌یابد. یکی از عوامل موثر بر میزان رهایش بتالائین، اندازه ریزکپسول‌ها می‌باشد که با افزایش اندازه ریزکپسول‌ها سطح تماس ریزکپسول‌ها به طور موثری کاهش می‌یابد که می‌تواند باعث کاهش میزان آزادسازی ترکیبات به دام افتاده در درون ریزکپسول شود. بنابراین با توجه به نتایج اندازه ذرات ریزکپسول‌ها میزان شاخص به دام اندازی به طور موثری تحت تاثیر قرار می‌گیرد به طوری که در دو تیمار T_5 و T_6 میزان سایز ریزکپسول‌ها به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای دیگر می‌باشد. از طرفی میزان بتالائین به دام افتاده در داخل ترکیبات نانو ذرات تعیین کننده میزان درصد رهایش ریزکپسول‌ها می‌باشد. هر چه میزان کارایی کپسولاسیون بالاتر باشد میزان بتالائین‌های بیشتری در درون

ریزکپسول‌ها برای رهایش وجود دارد. در این راستا نیز برآیند این دو ترکیب و همچنین تداخل آن با بار سطحی ریزکپسول بر روی کنتیک رهایش ریزکپسول‌ها تاثیر می‌گذارد. نتایج تحقیقات لوو^۱ و همکاران (۲۰۱۱) نیز با یافته‌های تحقیق مطابقت داشت؛ بررسی‌های آن‌ها نشان دادند که رهایش آلفاتوکوفرول از نانو ذرات زئین با سایز کوچکتر سریعتر صورت می‌گیرد. مرحله دوم فرایند دوفازی رهایش به مرحله ثابت معروف است که طی آن رهایش به صورت تجمعی ادامه می‌یابد تا فرایند رهایش به طور کامل تکمیل شود.

۳-۳- نتایج ارزیابی میزان حداقل کشندگی و مهارکنندگی
بررسی نتایج میزان حداقل کشندگی و مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد (جدول ۴) نشان داد که میزان غلظت ریزکپسول‌ها برای میزان حداقل کشندگی و مهارکنندگی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و میزان غلظت ریزکپسول‌ها تا ۱/۵ درصد بتالائین به صورت کاهشی و از ۱/۵ درصد به بالاتر به طور معنی‌داری روند افزایشی داشت که به کاهش غلظت بتالائین در فرمولاسیون تیمارهای ریزکپسول‌ها مرتبط می‌باشد. از عوامل مهم در خصوصیات ضد میکروبی تیمارهای ریزکپسول‌ها، خصوصیات به دام اندازی و همچنین رهایش ریزکپسول‌ها می‌باشد. با توجه به این که میزان به دام اندازی نقش تعیین کننده در کنترل خواص ضد میکروبی تیمارهای بتالائین دارد، بنابراین همان گونه که در بخش به دام اندازی و رهایش نیز تحلیل شد، تیمارهای ریزکپسول تا ۱/۵ درصد دارای بالاترین درصد به دام اندازی و همچنین رهایش تجمعی بوده و همان گونه که انتظار می‌رفت در کلیه سویه‌های مورد بررسی تیمار دارای بالاترین میزان خصوصیات ضد میکروبی و تیمارهای بالاتر از ۱/۵ درصد با افزایش میزان غلظت بتالائین و کاهش درصد به دام اندازی نیز دارای کمترین میزان خصوصیات ضد میکروبی بین تیمارهای ریزکپسول بود. در این راستا نیز ضیایی هزار جریبی و همکاران (۱۳۹۶) در بررسی اثرات ضد تریکومونایی

اسانس و نانوامولسیون گیاه رزماری بر ترکیب مومناس واژینالیس در شرایط آزمایشگاهی دریافتند که افزایش میزان درصد به دام اندازی و رهایش اسانس گیاه رزماری نقش تعیین کننده در خصوصیات ضد میکروبی آن دارد (۳۱) که با یافته های تحقیق حاضر در توافق بود. در مورد نحوه عمل آنتی اکسیدان ها در مرگ باکتری های بیماری زا چنین اظهار نظر شده است که یکی از ویژگی های مهم این مواد و ترکیب های آن خاصیت آبگریزی است که سبب می شود در بخش های لیپیدی دیواره سلولی و میتوکندریایی باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذپذیری بیشتر آن ها گردد. به دنبال آن بخش زیادی از یون ها و دیگر محتویات حیاتی سلول به بیرون تراوش می نماید که در نهایت به مرگ باکتری منجر می شود (۲۳).

همچنین این ترکیب آنتی اکسیدانی قادر به ایجاد اختلال در عملکرد آنزیم های متصل به غشاء سلولی بوده که نهایتاً منجر به ایجاد نقص در سنتز بسیاری از ترکیب های پلی ساکاریدی دیواره سلولی و ممانعت از رشد سلول و مورفوژن آن خواهد شد (۲۱). در این راستا تحقیقات مشابهی نیز وجود دارد. تحقیقات شهنا و خاکسار (۱۳۹۱) نیز در بررسی اثرات ضد میکروبی و روش های تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس های گیاهی بر باکتری های پاتوژن نشان داد که مقادیر مورد استفاده در ترکیبات مواد غذایی در مقایسه با مقادیر تعیین شده در MIC و MBC نیز نشان داد که جهت مورد استفاده برای اسانس ها در ترکیبات مواد غذایی مقادیر مورد استفاده باید بالاتر از حدود MIC و MBC باشد که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت. به طور کلی هرچه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص آنتی باکتریال آن ها علیه پاتوژن های غذایی بیشتر خواهد بود. این ترکیبات شامل سیترال، سیترونال و ژرانیل استات می باشند. احتمالاً مکانیسم اثر این ترکیبات هم مانند سایر ترکیبات فنولی شامل موارد زیر می باشد: اختلال در غشاء سیتوپلاسمی، بر هم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی، انعقاد محتویات سلولی، ساختار شیمیایی یک اسانس هم بر مکانیسم آن اثر می گذارد. اهمیت

حضور گروه هیدروکسیل در ترکیب فنولی مانند سیترال، سیترونال و ژرانیل استات تأیید شده است (۲۰). موقعیت نسبی گروه هیدروکسیل در حلقه فنولیک چندان تأثیری در میزان اثر آنتی باکتریال آن ندارد. اغلب مطالعات انجام شده در خصوص اثر اسانس های روغنی بر روی ارگاناسم های عامل فساد و پاتوژن های غذا از دانشان می دهند که اثر اسانس های گیاهی بر روی باکتری های گرم مثبت قدری بیشتر از تاثیر آن ها بر روی باکتری های گرم منفی است. به عبارت دیگر گرم مثبت ها نسبت به اثر آنتی باکتریال اسانس ها حساس ترند. علت حساسیت کمتر گرم منفی ها شاید به علت وجود غشاء خارجی در باکتری های گرم منفی باشد که سبب محدود شدن انتشار اجزاء هیدروفوبیک اسانس به لایه لیپوبلی ساکارید می شود (۱۵). با این حال همه مطالعات انجام شده بر روی فعالیت آنتی باکتریال اسانس های روغنی نشانگر حساسیت بیشتر در گرم مثبت ها نمی باشد. برای مثال آئروموناس هیدروفیلا که یک باکتری گرم منفی است یکی از حساس ترین گونه های باکتریایی نسبت به اثرات اسانس ها می باشد. در بین گرم منفی ها، سودوموناس ها به ویژه سودوموناس آئرو جنس کمترین حساسیت را نسبت به اثر اسانس ها دارا می باشند (۲۱). اغلب مطالعات انجام شده در خصوص اثر اسانس های گیاهان بر باکتری های عامل فساد و عوامل بیماری زای منتقله از راه غذا نشان می دهد که اثر اسانس های گیاهی بر باکتری های گرم مثبت قدری بیشتر از تاثیر آن ها بر باکتری های گرم منفی است. در این تحقیق اثر کشندگی بر روی *استافیلوکوس اورئوس* و *سالمونلا* به طور معنی داری بالاتر از اثرات کشندگی بر روی *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیا کلی*: O157 H7 مشاهده شد. بلادی و همکاران در سال ۱۳۹۹ در مطالعه نقش ضد میکروبی نانو کپسول های حاوی عصاره زغال اخته سنتز شده به روش امولسیون بر باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک دریافتند که با افزایش میزان به دام اندازی عصاره زغال اخته، میزان حداقل غلظت کشندگی و مهار کنندگی به طور معنی داری کاهش می یابد که با یافته های تحقیق حاضر در توافق بود.

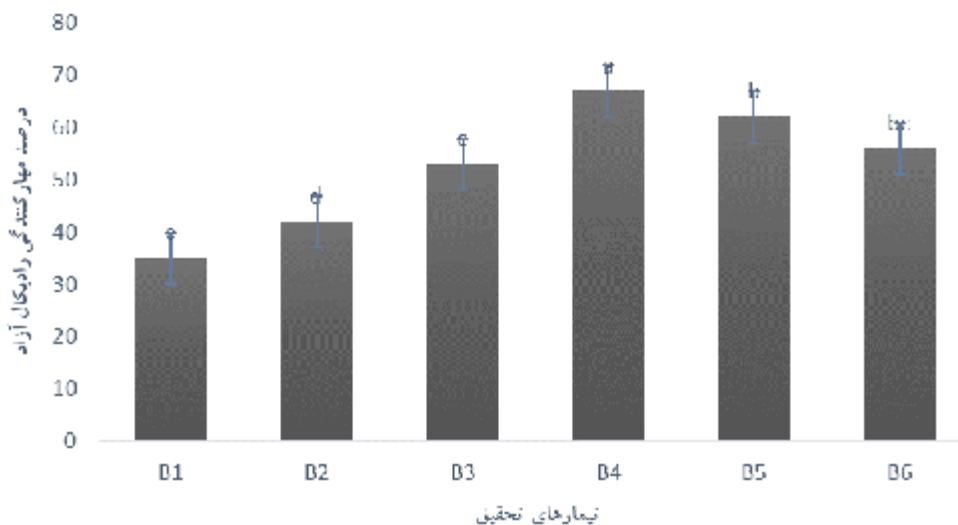
جدول ۴- مقایسه میانگین میزان حداقل کشندگی و مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد

کد تیمار	میزان حداقل کشندگی	میزان حداقل مهارکنندگی
B1	$a \ 356 \pm 0/01$	$a \ 341 \pm 0/01$
B2	$b \ 345 \pm 0/01$	$b \ 309 \pm 0/01$
B3	$c \ 323 \pm 0/03$	$c \ 289 \pm 0/03$
B4	$d \ 309 \pm 0/01$	$d \ 267 \pm 0/01$
B5	$e \ 334 \pm 0/02$	$e \ 288 \pm 0/02$
B6	$f \ 365 \pm 0/04$	$f \ 298 \pm 0/04$

۳-۴- میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد

با توجه به نتایج به دست آمده از میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد (شکل ۲) مشاهده شد که میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد به طور معنی‌داری با افزایش میزان بتالائین تا میزان ۱/۵ درصد افزایش می‌یابد اما از ۱/۵ درصد به بالاتر این روند بر عکس شده و به صورت کاهشی ادامه می‌یابد. یکی از دلایل مشاهده این تغییرات، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی بتالائین می‌باشد که با افزایش میزان غلظت آن در فرمولاسیون ریزکپسول میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p \leq 0/05$). در مقادیر بالاتر از ۱/۵ درصد بتالائین، به دلیل کاهش میزان درصد به دام‌اندازی و رهایش بتالائین میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشد که غلظت بتالائین‌ها را به طور معنی‌داری در فرمولاسیون ریزکپسول‌ها کاهش داده و همچنین بر میزان درصد رهایش آن‌ها نیز تاثیرات معنی‌داری دارد که این مساله در میزان درصد مهارکنندگی

رادیکال‌های آزاد موثر می‌باشد. در این راستا نیز تحقیقات مشابهی نیز وجود داشت. ضیایی هزارجریبی و همکاران (۱۳۹۶) اثرات ضد تریکومونایی اسانس و نانوامولسیون گیاه رزماری بر تریکوموناس واژینالیس ادر شرایط آزمایشگاهی را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند که درصدهای بالای استفاده از اسانس در فرمولاسیون نانوامولسیون نشان داد که درصد بالای اسانس رزماری میزان درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد به طور معنی‌داری کاهش یافت (۳۲) که با یافته‌های تحقیق حاضر در توافق بود. جوانشیر و همکاران (۱۳۹۹) خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی نانوامولسیون سنتز شده روغن کرچک را بررسی نمودند (۳۱). نتایج نشان داد که خصوصیات آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون‌ها به طور معنی‌داری با افزایش میزان درصد روغن کرچک به میزان بالاتر از دو درصد کاهش می‌یابد که با یافته‌های تحقیق حاضر در توافق بود.



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ریزکپسول‌های بتالائین

آن ارزیابی گردید و نهایتاً نسبت ۱/۵ درصد از آن به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب و معرفی گردید که می‌تواند در تحقیقات صنایع غذایی و به جای نگهدارنده‌های سنتزی مورد استفاده قرار گیرد.

۵- منابع

1. Adeli Milani, M., Mizani, M. and Ghavami M., 2011. Effect of yellow mustard powder on pH, living microbial population and sensory properties of mayonnaise, *Iranian Journal of Food Industry and Nutrition Science*, 5(2), pp.24-35.
2. Albertini, B., Passerini, N., Di Sabatino, M., Vitali, B., Brigidi, P. and Rodriguez, L., 2008. Polymer-lipid based mucoadhesive microspheres are prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2;36(4-5), pp.591-601.
3. Ames, J. M. and Hofman, T., 2001. Chemistry and physiology of selected food colorants. *An American Chemical Society Publication*, pp. 23-27
4. Baghipour, S. and Fallahi, S. Betaline extraction from red beet and its use in dairy industry, *1st National Conference on Snacks*, Mashhad - Research Institute

۴- نتیجه گیری

در سال‌های اخیر با توجه به افزایش روز افزون استفاده از ترکیبات نگهدارنده طبیعی در صنعت غذا تمایل به استفاده از این ترکیبات افزایش یافته است که تحقیق حاضر نیز در راستای این تحقیقات می‌باشد. با توجه به استفاده روزافزون از نگهدارنده‌های طبیعی به جای نگهدارنده‌های سنتزی و همچنین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات چغندر قرمز، همچنین بررسی روش‌های حفظ ترکیبات آنتی‌اکسیدان نیز با استفاده از ریزکپسول‌ها می‌تواند به استفاده طولانی مدت از این ترکیبات کمک کند. به طور کلی نتایج آزمون نشان داد که میزان درصد به دام اندازی و رهایش تا میزان ۱/۵ میلی گرم بتالائین افزایش و سپس تا ۲/۵ میلی گرم کاهش معنی داری را تجربه نمود. همچنین ریزکپسول‌ها دارای شکل کروی و هموزن و یکنواخت بوده و در تیمارهای با مقادیر بالاتر از ۱/۵ میلی گرم، حالت آگلومراسیون بین ذرات هم زمان با افزایش اندازه ذرات نیز وجود داشت، همچنین خصوصیات حداقل میزان کشندگی و مهارکنندگی و درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد برای ریزکپسول‌ها محاسبه و ارزیابی گردید و بر اساس خصوصیات ریزکپسول‌ها نهایتاً ۱/۵ میلی گرم بتالائین به عنوان تیمار بهینه انتخاب و معرفی گردید. در این تحقیق ریزکپسول‌های بتالائین فرموله شده و خصوصیات

14. López, M., Dorotea, María. D., Rojas, M., Alexander, N. P. H., Soledad, C. and José, N., 2005. Molecular properties and prebiotic A of phenolic compounds from Mentha cattle using ultrasound device. *Journal of Herbal Drugs*, 3(1), pp.7-13.
15. Malek Ghasemi, A., Sadeghi Mahonak, A. R., Ghorbani, M. and Alamy, M. M. M., 2014. The effect of cooking method on antioxidant properties and betalaine pigment in beets, *Journal of Food Science and Technology*, 4, pp.36-29.
16. Nussinovitch, A., 2003. Hydrocolloids in flavor encapsulation. In *Water Soluble Polymer Application in Food*, edited by Blakwell Science Publishing. 93-113.
17. Poshadri, A. and Aparna, Kuna., 2010. Microencapsulation Technology: A Review. *Journal of Research Angrau*, 38(1), pp. 86-102.
18. Potakamory, U. R. and Barbosa-Canovas, G.V., 1995. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 1(6), pp.397-406.
19. Prakash Maran, J., Mekala, V. and Manikandan, S., 2013. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from Cucurbita moschata. *Carbohydr Polym.* Feb 15;92(2), pp.2018-26.
20. Prombutaraa, P., Kulwatthanasal, Y., Supaka, N., Sramala, I. and Chareonpornwattanaa, S., 2012. Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity, *Food Control*, 24, pp.184-190.
21. Rein, M. J., 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry antocyanins. EKTseries1331. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology.
22. Ritota, M., Mattera, M., Gabriella, Di., Costanzo, M. and Manzi, P., 2018. Evaluation of Crocins in Cheeses Made with Saffron by UHPLC, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(2), pp. 248-257.
5. Barbosa-Canovas, G. V., Ortega- Rivas, E., Juliano, P. and Yan, H., 2005. *Food Powders: Physical properties, processing and functionality*, New York, pp. 199-218.
6. Cai, Y. z., 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 51, pp. 2288-2294.
7. Ersus, S. and Yurdagel, U., 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus cartota L.*) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, pp.805-812.
8. Fakhari A. R. and Baghipour, S., 2010. Extraction of a food colorant from red beet and evaluation of its stability. *Journal of Color Science and Technology*, 3, pp. 243-250.
9. Faridneia M., Mohammadi Sani, A. and Najaf Najafi, M., 2020. Encapsulation red beet extract by maltodextrin and whey protein isolate carriers using spray dryers and freezing. *Researches in Food Science and Technology of Iran*, 16(2), pp.322-313.
10. Fossen, T. and Cabrita, L., 2013. Andersen. Colour and stability of pure anthocyanin influenced by pH including the alkaline region. *Food chemistry*, 63, pp. 435-440
11. Fu, Y., Shi, J., Xie, SY., Zhang, TY., Soladoye, OP. and Aluko, RE., 2020. Red Beetroot Betalains: Perspectives on Extraction, Processing, and Potential Health Benefits. *J Agric Food Chem.* 21, 68(42), pp.11595-11611. doi: 10.1021/acs.jafc.0c04241. Epub 2020 Oct 11. PMID: 33040529.
12. Janiszewska, E., 2014. Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain, 264, pp. 190-196.
13. Javanshir, A., Karimi, A. and Homayouni Tabrizi, M., 2020. Investigation of antioxidant and antibacterial properties of castor oil synthesized nanoemulsions, *Jondi Shapour Medical Journal*, 19(1), pp. 9

26. Sotillo, K.J., Hadley, R. D., Holm M. E. T., 1994. Phenolics in aqueous potato peel extract: Extraction, identification and degradation. *Journal of Food Science*, 59(2), pp. 649-651.
27. Strack, D., Vogt, T. and Schliemann, W., 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, pp.247-69.
28. Ziaei Hezarjaribi, E., Nadali, N., Saeedi, M., Momeni, Z., Susanai, M., Fakhar, M. and Jorjani, A., 2017. Anti-trichomonas effects of rosemary essential oil and nanoemulsions on trichomonas vaginalis in vitro, *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 27(153), pp.118-122.
23. Roy, K., Gullapalli, S., Chaudhuri, U.R. and Chakraborty, R., 2004. The use of a natural colorant based on betalain in the manufacture of sweet products in India. *International Journal of Food Science Technology*, 39(10), pp.1087-1091.
24. Satpute, D., Padghan, P., Patil, Y. and Suryawanshi, D., 2018. Effect of menthol (*Mentha arvensis*) and beet root extract on physico-chemical properties of paneer whey based beverage, *International Journal of Food Science and Nutrition*, 3(1), pp. 99-105.
25. Shahi, S., 2014. Pharmaceuticals, L. Micro particles: An approach for betterment of drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 1, pp. 99-115.

(Original Research Paper)

Possibility of Production and Formulation of Antioxidant Microcapsules Based on Betalain Root of Red Beet and Evaluation of Its Practical and Functional Features

Ghazal Hanifeh zadeh¹, Masoud Honarvar^{2*}

1-MSc Student of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

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

Received:17/05/2022

Accepted:10/07/2022

Abstract

Nowadays, the use of antioxidant compounds and natural preservatives instead of synthetic preservatives has a unique and fundamental role in the food industry due to their known harms and diseases. One of these compounds with known antioxidant effects is red sugar beet betalains, which have been investigated for microencapsulation. In this study, betalain microcapsules were prepared by the "ionic gelation" method using sodium alginate and guar gum with amounts of 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, and 2 mg. Betalain microcapsules were characterized for size, loading efficacy, cumulative release, and morphological characteristics. Also, the characteristics of minimum inhibition concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and the inhibitory percentage of free radicals (DPPH) for microcapsules were calculated. All data were analyzed using Duncan's one-way variance analysis method. In general, the results show that the percentage of loading efficacy and cumulative release increased up to 1.5 mg betalain, and then up to 2.5 mg experienced a significant decrease. Also, microcapsules had spherical, homogeneous, and uniform forms. In treatments with amounts higher than 1.5 mg, agglomeration between particles coincided with increasing particle size and was based on microcapsules characteristics. Finally, microcapsules including 1.5 mg betalain were selected as the optimum treatment based on the characteristics of the maximum loading efficacy and release, homogenous appearance, lowest MIC and MBC, and the maximum DPPH.

Keywords: Antioxidant, Betalain, Microcapsules, Red Sugar Beet.

*Corresponding Author: m-honarvar@hotmail.com

(مقاله پژوهشی)

اثر پوشش ترکیبی کیتوزان- صمغ چیا به همراه اسانس برگ بو بر ماندگاری فیله بلدرچین طی مدت زمان نگهداری در یخچال

مطهره اسلامیان امیری^۱، محمد احمدی^{۲*}، پیمان آریایی^۳، لیلا گلستان^۴، آزاده قربانی حسن سرایی^۲

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۳

چکیده

در این پژوهش تاثیر پوشش مرکب کیتوزان- دانه چیا به همراه اسانس برگ بو بر ماندگاری فیله بلدرچین طی دوره نگهداری ۱۶ روزه در یخچال مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا مقادیر ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و خاصیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد ABTS) اسانس برگ بو اندازه گیری شد. سپس به منظور بررسی تاثیر پوشش مرکب کیتوزان- دانه چیا و اسانس برگ بو بر عمر ماندگاری فیله بلدرچین، ۴ تیمار شامل ۱: شاهد، ۲: پوشش کیتوزان- صمغ دانه چیا، ۳: پوشش + اسانس با غلظت ۸۰۰ ppm، ۴: پوشش + اسانس با غلظت ۱۶۰۰ ppm، تولید و عدد پراکسید، تیوباریوتیک اسید، pH، مقادیر کلی باکتری و باکتری سرمدوست بررسی شد. میزان ترکیبات فنلی اسانس برگ بو برابر با $388/57 \pm 9/85$ میلی گرم/گرم گالیک اسید و ترکیبات فلاونوئیدی $210/18 \pm 4/98$ میلی گرم/گرم بود. بالاترین میزان فعالیت رادیکال آزاد ABTS در غلظت ۱۶۰۰ ppm مشاهده شد (۸۳/۴۷ درصد). مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی در این غلظت اختلافی با آنتی اکسیدان سنتزی BHA (غلظت ۱۰۰ ppm) نداشت ($P > 0/05$). نتایج مربوط به ماندگاری بلدرچین نشان داد، به طور کلی پوشش مرکب به همراه اسانس سبب کند شدن روند افزایشی شاخص های اکسیداسیونی و میکروبی نسبت به تیمار شاهد شد و این تغییرات در تیمار ۴ کمتر از سایر تیمارها بود و تا پایان دوره نگهداری از محدوده مجاز شیمیایی و میکروبی برخوردار بودند. بنابراین به نظر می رسد پوشش مرکب کیتوزان- دانه چیا و اسانس برگ بو می تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در گوشت و فرآورده های ماکیان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: برگ بو، پوشش مرکب کیتوزان- دانه چیا، اسانس گیاهی، عمر ماندگاری، بلدرچین.

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، صنعت گوشت به دلیل تقاضای محصولات گوشتی با خواص تغذیه‌ای بسیار بالا و همچنین توسعه محصولات گوشتی با استفاده از روش‌های جدید فرآوری، به طور چشمگیری رشد یافته است. تمام گروه‌های گوشتی به عنوان یکی از منابع ارزشمند پروتئین بوده و به دلیل وجود اسیدآمین‌ها ضروری و ویتامین‌ها، کامل‌ترین غذا محسوب می‌شوند (۶). در بین محصولات گوشتی، گوشت بلدرچین؛ که کوچک‌ترین پرنده گوشتی حلال می‌باشد، به دلیل داشتن ویتامین‌های مختلف از نظر تغذیه‌ای ارزشمندتر از گوشت مرغ است. سطوح کلسترول و چربی کم در گوشت بلدرچین باعث شده تا ویتامین‌ها در این پرنده ارزشمند باشد. گوشت بلدرچین منبع خوبی از پروتئین و مواد معدنی مانند سدیم، پتاسیم و آهن و ویتامین‌های قابل دسترس مانند ویتامین B₆، نیاسین، تیامین، پانتوتیک اسید و ریبوفلاوین و همچنین حاوی اسیدهای چرب ضروری مانند اسید لینولینیک می‌باشد (۱۹). در مراحل مختلف کشتار، حمل و نقل، ذخیره‌سازی و فرآوری، گوشت ممکن است با انواع میکروارگانیسم‌ها آلوده شود. گوشت بلدرچین را می‌توان در مدت زمان محدود (۴-۵ روز) در یخچال نگهداری کرد، با توجه به اینکه الیاف عضلانی آن نازک است نگهداری طولانی آن منجر به فساد می‌شود، اما عمر مفید آن را می‌توان با استفاده از روش‌های ذخیره‌سازی دیگر در ترکیب با خنک‌کننده‌ها گسترش داد (۶). بنابراین استفاده از موادی مناسب با فعالیت آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی به منظور بهبود کیفیت، افزایش عمر ماندگاری گوشت و در عین حال جلوگیری از ضررهای اقتصادی ضروری و مفید می‌باشد. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و نگهدارنده‌های میکروبی یکی از مهم‌ترین روش‌های جلوگیری از فساد اکسیداتیو و باکتریایی گوشت و محصولات گوشتی می‌باشد. در این ارتباط آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات نگهدارنده سنتزی سال‌هاست که برای کنترل فساد مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. امروزه مصرف‌کنندگان خواهان مصرف فرآورده‌هایی با منشاء طبیعی و با حداقل فرآوری هستند، یک رویکرد ایمن و قابل قبول برای افزایش ایمنی و ماندگاری مواد غذایی،

استفاده از اسانس‌های گیاهی می‌باشد (۲۸). برگ بو با نام علمی *Laurus nobilis* L درخت یا درختچه‌ای همیشه سبز به ارتفاع ۱۵-۲۰ متر و دو پایه است. از نظر ترکیبات شیمیایی طبق تحقیقات انجام شده مشخص شده است که آلفا توکوفرول ایزومر عمده در اندام‌های رویشی گیاه برگ بو می‌باشد و در برگ‌ها فلاونوئیدها، لاکتون سسکوئی ترپنوئید، آلکالوئیدهای ایزو کوئینولین و اسیدهای فنولی وجود دارد. همچنین مقدار آلفا توکوفرول در برگ‌های گیاه برگ بو به شدت بالا بوده و ریشه‌های آن حاوی مقدار بالایی فلاونوئید می‌باشد (۲۹). با وجود پتانسیل بالای اسانس‌های گیاهی، استفاده از آن‌ها در حفظ کیفیت مواد غذایی عمدتاً به دلیل عطر و مشکلات شدید سمی آن‌ها محدود می‌باشد. برای به حداقل رساندن دوزهای مورد نیاز، یکی از گزینه‌های جالب استفاده از روکش و فیلم‌های خوراکی به عنوان حامل این ترکیبات طبیعی می‌باشد. پوشش‌های خوراکی اخیراً به دلیل نتایج امیدوارکننده، مورد توجه بیشتری در زمینه حفظ مواد غذایی قرار گرفته‌اند (۳۰). کیتوزان، بعد از سلولز بیشترین پلی ساکارید طبیعی است که به دلیل ویژگی‌های مختلفی مثل زیست سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، عدم سمیت، دارای مزایا و کاربردهای زیادی در صنایع مختلف است شاید از مهمترین خصوصیات کیتوزان بتوان به خصوصیت جلوگیری از فساد، به عنوان نگهدارنده ضد قارچی جهت طولانی کردن قابلیت ذخیره‌سازی، نگهداری محصولات تازه و همین‌طور جلوگیری از رشد باکتری‌ها، اشاره کرد (۱۸، ۳۰). هر چند پوشش‌های خالص کیتوزان به تنهایی خواص مکانیکی، بازدارندگی نسبت به رطوبت، و ویژگی‌های ظاهری مناسبی نشان نمی‌دهد. همچنین قیمت بالای کیتوزان در مقایسه با سایر پلیمرهای زیستی، باعث یافتن راه حل مناسب برای این پوشش‌ها شده است. اختلاط کیتوزان با سایر پلیمرها یا صمغ‌ها می‌تواند روش مناسبی به منظور بهبود ویژگی‌های آن به شمار رود (۲۹). به همین ترتیب در این پژوهش کیتوزان با صمغ دانه چیا ترکیب می‌شود. دانه چیا با نام علمی (*Salvia hispanica* L) گیاهی متعلق به خانواده نعنائیان، منبعی غنی از آنتی‌اکسیدان‌های سینرژیک و اصلی نظیر فلاونول‌ها، کلروژنیک اسید، کافئیک

پلی اتیلنی برای فیله گیری به آزمایشگاه انتقال داده شد. فیله ها به طور کامل با آب سرد تمیز شسته تا کاملاً تمیز و خونابه ها و سایر ضایعات از آن ها جدا شد. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص تجزیه ای از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

۲-۲- تهیه و تجزیه اسانس

۱۰۰ گرم از پودر گیاه برگ بو با یک لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۳/۵ ساعت به وسیله دستگاه کلونجر، اسانس گیری انجام شد و اسانس حاصل با استفاده از سولفات سدیم آب گیری و اسانس تا زمان انجام آزمایش در ظروف تیره رنگ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف طیف نگار جرمی (HP-5973 (MS /GC، Hewlett Packard، آمریکا)، نوع ستون، HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت فاز ساکن ۰/۳۲ میکرون صورت گرفت. برای این منظور ابتدا اسانس گیاه با سولفات سدیم بدون آب، آب گیری و پس از تریق به دستگاه MS /GC استفاده از ضرابب بازداری هریک از اجزای تفکیک شده و طیف جرمی آن ها و مقایسه با استاندارد، ترکیبات تشکیل دهنده اسانس شناسایی شد. دمای آون از ۴۰ درجه سانتی گراد تا ۲۵۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۲/۵ درجه بر دقیقه افزایش یافت. از گاز هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی لیتر در دقیقه و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد (۱۸).

۲-۳- اندازه گیری ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدی

محتوی تام فنولیک با استفاده از معرف فولین - سیوکالتیو اندازه گیری شد. به ۰/۵ میلی لیتر از هر اسانس، ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین - سیوکالتیو ۰/۲ نرمال اضافه شد، پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی لیتر از محلول ۷۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم به آن اضافه و جذب مخلوط ۲ ساعت بعد در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار می رود. میزان تام فنولیک بر اساس میزان معادل میلی گرم اسید گالیک در گرم اسانس گزارش گردید (۲۱).

اسید، میرستین، کوئرستین، کامفرول و نیز آنتی اکسیدان های طبیعی نظیر توکوفرول ها، فیتواسترول ها، کاروتنوئیدها بوده که وجود این ترکیبات نقش مهمی در پایین نگهداشتن سطح اتو اکسیداسیون و افزایش زمان ماندگاری می شود (V). Mahdavi و همکاران (۱۸) به بررسی تاثیر فیلم خوراکی کیتوزان به همراه غلظت های مختلف اسانس اینسون بر روی کیفیت مرغ برگر نگهداری شده در یخچال طی مدت زمان ۱۲ روز پرداختند. نتایج نشان داد، فیلم کیتوزان به همراه اسانس اینسون اکسیداسیون لیپید را در مرغ برگرها به تعویق می اندازد و سبب بهبود ویژگی های شیمیایی و میکروبی مرغ برگر شد. Tometri و همکاران (۲۹) به بررسی تاثیر عصاره برگ بو (*Laurus nobilis*) در افزایش عمر ماندگاری گوشت چرخ شده گاو طی دوره نگهداری ۱۶ روزه در یخچال مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه آن ها نشان داد که عصاره برگ بو دارای خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی می باشد به طوری که فیله حاوی ۱۵۰۰ ppm عصاره برگ بو روند فساد میکروبی و اکسیداسیونی در فیله های گوشت را به طور معنی داری به تعویق انداخت. با توجه به مطالب بیان شده، هدف از این پژوهش بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی پوشش ترکیبی کیتوزان - صمغ دانه چیا و اسانس برگ بو جهت افزایش عمر نگهداری گوشت فیله بلدرچین طی دوره نگهداری است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد اولیه

برگ های گیاه برگ بو (*Laurus nobilis*) از درختان شهرستان چابکسر از توابع استان گیلان تهیه، بعد از تأیید نام علمی از سوی گروه کشت و توسعه انستیتو گیاهان دارویی (گروه زارعت آقای دکتر محمودی) قسمت های زائد آن جدا و بلافاصله پس از شستشو خشک شد. سپس در آون تحت خلأ با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه خشک و توسط خردکن کاملاً پودر و تا زمان انجام آزمایش در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. بلدرچین از کشتارگاه در ظروف عایق در مجاورت یخ نگهداری و در کیسه های

برای تهیه محلول ۲ درصد وزنی- حجمی پوشش کیتوزان ابتدا ۲۰ گرم بودر کیتوزان به یک لیتر آب مقطر اضافه گردید و عمل هم زدن با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه انجام شد و در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد حرارت دهی شد. محلول صمغ دانه چیا در سطح ۱/۵ وزنی- وزنی از طریق انحلال صمغ در آب مقطر و هم زدن شدید با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه با همزن مغناطیسی به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط تهیه گردید. در مرحله بعد ۲۰۰ میلی لیتر از محلول کیتوزان به آرامی به محلول صمغ اضافه شده و به مدت ۴ ساعت عمل هم زدن ادامه یافت. پس از گذشت این مدت ابتدا میزان ۰/۲ درصد حجمی- حجمی نسبت به میزان اسانس، توئین ۸۰ به عنوان امولسیفایر با اسانس گیاهی برگ بودر دو سطح ۸۰۰ ppm و ۱۶۰۰ به صورت حجمی- حجمی محلول کیتوزان به صورت مکانیکی مخلوط گشته و بعد از یکنواخت شدن به محلول های پوشش ترکیبی اضافه گردید و به مدت دو دقیقه عمل هم زدن به کمک دستگاه هموژنایزر و با دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه صورت گرفت تا اسانس ها به طور یکنواخت در ماتریس پوشش پخش شدند (۲۲).

۲-۶- آماده سازی نمونه ها

فیله های بلدرچین (۸۰-۱۰۰ گرم) به مدت ۱ دقیقه در پوشش ترکیبی (کیتوزان+ صمغ دانه چیا (۱/۵ درصد)) و همچنین پوشش ترکیبی (کیتوزان+ صمغ دانه چیا (۱/۵ درصد)) غنی شده با اسانس برگ بو در غلظت ۸۰۰ ppm و پوشش ترکیبی (کیتوزان+ صمغ دانه چیا (۱/۵ درصد)) غنی شده با اسانس برگ بو در غلظت ۱۶۰۰ ppm غوطه ور شدند، سپس آن ها را از محلول خارج نموده و به مدت ۳۰ ثانیه اجازه داده شد تا آب چک انجام شد و بعد از آن به مدت ۳۰ ثانیه در محلول ۲ درصد کلرید کلسیم غوطه ور شدند تا پیوند متقاطع در پوشش القا شد. بعد از ایجاد پوشش، نمونه ها در یخچال نگهداری (C° ۱±۴) و نمونه برداری به صورت کاملاً تصادفی (۳ نمونه از هر بخش) طی فواصل زمانی ۴ روز یک بار (صفر، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶) از آن ها صورت گرفته و جهت آزمون های شیمیایی، میکروبی نمونه برداری گردید

فلاونوئیدهای کل با روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم انجام شد. ۵/۰ میلی لیتر از اسانس، ۱۰۰ میکرو لیتر استات پتاسیم ۱ مولار اضافه نموده، بعد از ۵ دقیقه به ۱۰۰ میکرو لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد به محلول اضافه شد. سپس ۱/۵ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد و ۲/۸ میلی لیتر آب دیونایز به محلول اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه شدت جذب محلول در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئید کل با استفاده از روتین منحنی استاندارد با محلول های کوئرستین رسم گردید و غلظت فلاونوئیدها بر حسب میلی گرم روتین در گرم وزن خشک ارائه شد (۲۱).

۲-۴- اندازه گیری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش ABTS

محلول رادیکال ABTS با مخلوط کردن ۵ میلی لیتر از ۷ ABTS میلی مولار و ۸۸ میکرو مولار پتاسیم پروسولفات ۱۴۰ میلی مولار مهیا شد و ۱۶ ساعت در دمای محیط در تاریکی نگهداری شد، ۵/۰ میلی لیتر از محلول موجود با ۴۰ میلی لیتر (بافر فسفات ۵ میلی مولار، ۷/۴ pH، حاوی NaCl ۰/۲ مولار) تا جذب محلول رادیکال ABTS بتواند در ۷۳۴ نانومتر عدد ۰/۰۲ ± ۰/۷۰ به دست آید، ترکیب شد. ۶۵ میکرو مولار نمونه محلول با ۶۵ میکرو مولار بافر فسفات ترکیب شد ۶۶/۶۷ میکرو مولار از این مخلوط با ۹۱۰ میکرو مولار محلول ABTS ترکیب شد و ۶۶/۶۷ میکرو مولار بافر فسفات به عنوان شاهد با ۹۱۰ میکرو مولار محلول ABTS ترکیب شد و پس از ۱۰ دقیقه در دمای محیط در تاریکی قرار گرفت و جذب در ۷۳۴ نانومتر قرائت شد (۲۷).

تعیین فعالیت پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times (\text{میزان جذب کنترل} / \text{میزان جذب نمونه}) - 1 = \text{درصد پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS}$$

۲-۵- تهیه پوشش

روش تهیه پوشش ترکیبی (کیتوزان+ صمغ دانه چیا) غنی شده با اسانس برگ بو، با حل کردن ۲ درصد وزنی / حجمی کیتوزان در اسید استیک ۱ درصد حجمی / حجمی بدست می آید. برای حل شدن بهتر کیتوزان، محلول به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق با همزن مغناطیسی همزده شد.

در مجموع این مطالعه شامل ۴ تیمار بود:

- ۱: تیمار شاهد
- ۲: تیمار پوششی (کیتوزان + صمغ دانه چیا)
- ۳: پوشش + اسانس برگ بؤ ۸۰۰ ppm
- ۴: پوشش + اسانس برگ بؤ ۱۶۰۰ ppm

۲-۷-آزمایشات

۲-۷-۱-عدد پراکسید

آزمون پراکسید میزان محصولات اولیه اکسیداسیون (هیدروپراکسیدها) را اندازه گیری می کند. روند تغییرات عدد پراکسید نمونه ها مطابق روش AOAC (۲) تعیین شد.

۲-۷-۲-عدد تیوباریتوریک اسید

آزمون تیوباریتوریک اسید محصولات ثانویه اکسیداسیون (مالون دی آلدئید) را اندازه گیری می کند. این آزمون بر اساس روش AOAC (۲) انجام شد.

۲-۷-۳-اندازه گیری pH

۵ گرم از هر نمونه به ۴۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه در یک مخلوط کن قرار داده شد سپس pH نمونه ها با pH متر دیجیتالی که با استانداردهایی در pH ۴ و ۷ کالیبره (تنظیم) گردیده بود، اندازه گیری شد (۳۰).

۲-۷-۴-اندازه گیری شاخص های میکروبی

برای شمارش باکتریایی نمونه ها، ۱۰ گرم از نمونه فیله بلدرچین در شرایط استریل با ۹۰ میلی لیتر محلول کلرید سدیم ۰/۸۵ مخلوط و هموژن شد و متعاقب آن رقت های متوالی (10^{-2} تا 10^{-10}) تهیه گردید. یک میلی لیتر از هر رقت برای کشت باکتری ها به روش پورپلیت^۱ مورد استفاده قرار گرفت. شمارش تعداد باکتری های کل و باکتری های سرمادوست در محیط پلیت کانت آگار^۲ به ترتیب در دماهای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ روز و ۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ روز با شمارش کلنی های موجود بر روی پلیت انجام گرفت. تمامی شمارش ها به صورت log CFU/g گزارش گردید (۱۴).

۲-۸-تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش ها در طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و نتیجه به صورت میانگین با انحراف معیار گزارش گردید. آنالیز آماری تیمارها توسط جدول آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار (SPSS version 18) صورت گرفت. برای بیان تفاوت معنی داری میانگین ها از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد و نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel ترسیم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس برگ بؤ

با توجه به نتایج (جدول ۱)، در مجموع ۱۵ ترکیب با مجموع ۹۹/۵۳ درصد شناسایی شد. بیشترین ترکیبات عصاره شامل α -terpinyl، Sabinene (۵۶/۴۵)، 1,8-Cineole (۱۳/۵۵)، acetate (۹/۳۵) و α -Pinene (۵/۷۵) بوده است. Fatima همکاران (۲۰۱۶) نیز اعلام نمودند اصلی ترین ترکیبات برای اسانس برگ بؤ شامل 1,8-cineole (به ۳۰/۹۰ درصد)، sabinene (۹/۶ درصد)، α -terpinyl acetate (۷/۸ درصد)، linalool (۴/۹-۹/۵ درصد) بود. در مطالعه بیان شده عمده ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس برگ بؤ، 1,8-Cineole بود. تفاوت جزئی در مقادیر ترکیبات در مطالعات متنوع به منطقه جغرافیایی رویش، زمان برداشت گیاه، شرایط محیطی و فصلی، روش خشک کردن و اسانس گیری از اندام های مختلف و در نهایت تفاوت ژنتیکی گیاه بستگی دارد (۹،۱۸).

۳-۲- مقادیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

میزان ترکیبات فنلی در مطالعه حاضر برابر با $388/57 \pm 9/85$ میلی گرم/گرم گالیک اسید، ترکیبات فلاونوئیدی $210/18 \pm 4/98$ میلی گرم/گرم بوده است. Khodja و همکاران (۱۶) مقادیر ترکیبات فنلی عصاره برگ بؤ استخراجی با حلال های مختلف را مابین ۳۸۰ تا ۵۱۰ میلی گرم/گرم گالیک اسید گزارش نمودند. Kivrak و همکاران (۱۷) مقادیر ترکیبات فنلی عصاره برگ بؤ استخراجی با حلال های مختلف را مابین ۱۱۰ تا ۵۴۰ میلی گرم/گرم گالیک اسید و همچنین مقادیر ترکیبات فلاونوئیدی را مابین ۱۰-۸۰ میلی گرم/گرم

اعلام نمودند. همان طور که مشاهده می شود در مقدار ترکیبات اسانس در مطالعات متنوع تفاوت هایی وجود دارد، به طور کلی مقادیر ترکیبات فنلی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش، رقم گیاه، سن گیاه در هنگام تهیه اسانس یا عصاره، شرایط محیطی و فصلی، نوع کشت، زمان برداشت و در نهایت تفاوت ژنتیکی گیاه می تواند تغییر کند (۵).

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه برگ بو

ردیف	ترکیبات	درصد
۱	1,8-Cineole	۵۶/۴۵
۲	Sabinene	۱۳/۵۵
۳	α -terpinyl acetate	۹/۳۵
۴	α -Pinene	۵/۷۵
۵	eugenol	۴/۳۳
۶	p-cymene	۲/۹۵
۷	myrcene	۲/۲۲
۸	β -Pinene	۱/۸۵
۹	eugenol eugenol	۱/۳۳
۱۰	β -Myrcene	۰/۷۸
۱۱	γ -terpinene	۰/۳۳
۱۲	α -terpineol	۰/۲۵
۱۳	carvacrol	۰/۱۵
۱۴	E-caryophyllene	۰/۱۲
۱۵	α -ylangene	۰/۱۲
مجموع		۹۹/۵۳

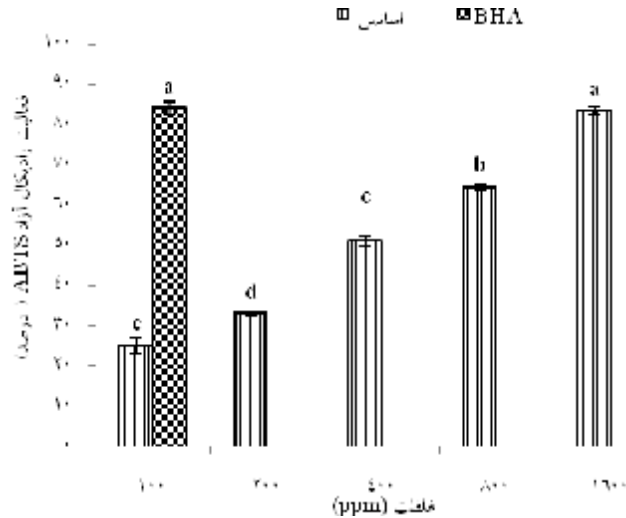
۳-۳- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی

در این آزمون، رادیکال کاتیون های ABTS با آنتی اکسیدانها یا دیگر گونه های رادیکالی که دهنده ی هیدروژن می باشند، واکنش داده و به شکل کاهش یافته درمی آید در نتیجه از طریق تعیین میزان این کاهش جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر، می توان به درصد بازدارندگی آنتی اکسیدان مورد نظری برد. با توجه به نتایج میزان فعالیت رادیکال آزاد ABTS (نمودار ۱) تحت تاثیر غلظت اسانس بود و با افزایش غلظت میزان فعالیت رادیکال آزاد ABTS افزایش یافت. بالاترین میزان فعالیت رادیکال آزاد ABTS در غلظت ۱۶۰۰ ppm مشاهده شد (۸۳/۴۷ درصد). مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی در این غلظت اختلافی با آنتی اکسیدان سنتزی BHA نداشت. همانطور که مشخص است با افزایش غلظت اسانس، میزان فعالیت

آنتی اکسیدانی آن افزایش می یابد که علت این امر، به دلیل بالاتر بودن ترکیبات فنلی در این روش می باشد. ویژگی های آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی عمدتاً ناشی از قدرت احیاء-کنندگی و ساختار شیمیائی آنهاست که آنها را قادر به خنثی کردن رادیکال های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون های فلزی و خاموش کردن مولکول های اکسیژن یگانه و سه گانه می سازد. ترکیبات فنولی از طریق اهداء الکترون به رادیکال های آزاد واکنش های اکسیداسیون چربی را مهار می کنند. فلاونوئیدهای موجود در رژیم غذایی که دارای یک گروه کاتکول (۱،۲-دی هیدروکسی بنزن) هستند از طریق مکانیسمهای مختلفی از جمله: (۱) عمل کردن به عنوان بازدارنده رادیکال آزاد از طریق دادن اتم هیدروژن یا الکترون (۲) پیوند پپروتین ها و آنزیم های شرکت کننده در تولید گونه های فعال اکسیژن

مانند آلفا توکوفرول، قادر به مهار اکسیداسیون مولکول های زیستی هستند (۱۵).

(۳) تشکیل کمپلکس با یون های فلزات انتقالی که قادرند تولید گونه های فعال اکسیژن از طریق چرخه های ردوکس را کاتالیز کنند (۴) باز تولید آنتی اکسیدان های خارجی قوی

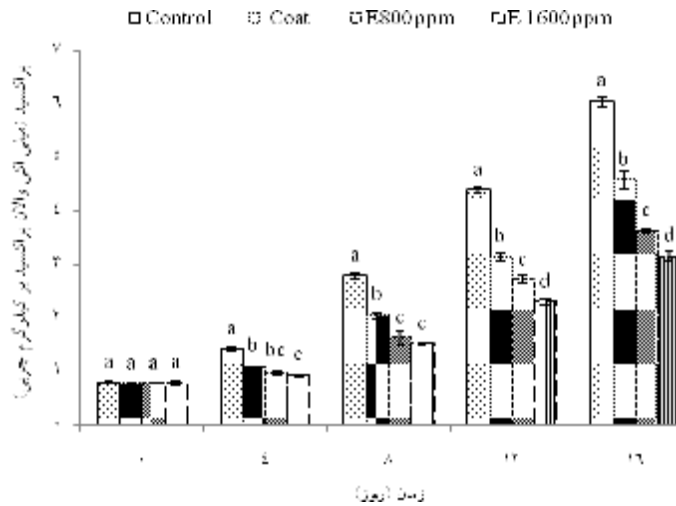


نمودار ۱- فعالیت رادیکال آزاد ABTS

۳-۴- بررسی مقادیر عدد پراکسید

نتایج مربوط به عدد پراکسید (نمودار ۲)، نشان داد که در طول زمان در همه تیمارها افزایش یافت و مقایسه میزان عدد پراکسید نمونه شاهد نسبت به مابقی تیمارها در دوره های مختلف نگهداری حاکی از آن بود که تیمارهای حاوی نگهدارنده، روند افزایش عدد پراکسید را نسبت به تیمار شاهد کند کرد ($P < 0.05$). روند افزایش سبب کند شدن روند افزایشی عدد پراکسید در تیمارهای حاوی پوشش کیتوزان- صمغ دانه چیا کندتر از تیمار شاهد بود، Bingöl و همکاران (۴) اعلام کردند که کیتوزان دارای قدرت آنتی اکسیدانی برای نگهداری چربی های درون مواد غذایی است. Valipour و همکاران (۳۰) نیز اعلام نمودند پوشش دهی فیله فیتوفاگ با کیتوزان سبب کند شدن روند افزایشی عدد پراکسید نسبت به تیمار شاهد می شود. همچنین دانه چیا منبعی غنی از آنتی اکسیدان های سینرژیک و اصلی نظیر فلاونولها، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، میرستین، کوئرستین، کامفرول و نیز آنتی اکسیدان های طبیعی نظیر توکوفرولها، فیتواسترولها، کاروتنوئیدها بوده

که وجود این ترکیبات نقش مهمی در پایین نگهداشتن سطح اتواکسیداسیون و افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی می شود (۷). همچنین مقادیر عدد پراکسید در تیمارهای حاوی اسانس کمتر بود، کمتر بودن مقادیر عدد پراکسید به علت ترکیبات فنلی موجود در اسانس می باشد، زیرا ترکیبات فنولیک با غیرفعال کردن رادیکال های آزاد چربی و رادیکال های پراکسی از اکسیداسیون جلوگیری می کنند بعضی از گونه های گیاهان دارویی دارای ترکیبات متفاوتی هستند ولی به طور عمده حاوی پلی فنول های باشند، که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند و به همین دلیل می توانند زمان نگهداری گوشت را بالا ببرند (۲۴، ۲۶). با افزایش درصد اسانس این خاصیت افزایش یافت. مطالعات متعددی گزارش شده است که اثر آنتی اکسیدانی اسانس های گیاهی وابسته به میزان دوزشان است (۱۳، ۲۵). میزان مجاز پراکسید در گوشت برای مصرف انسانی ۵ است (۳۱). در روز دوازدهم دوره نگهداری میزان پراکسید در تیمار شاهد بیشتر از حد قابل قبول پیشنهادی بود و در سایر تیمارها تا انتهای دوره نگهداری از محدوده مجازی برخوردار بود.



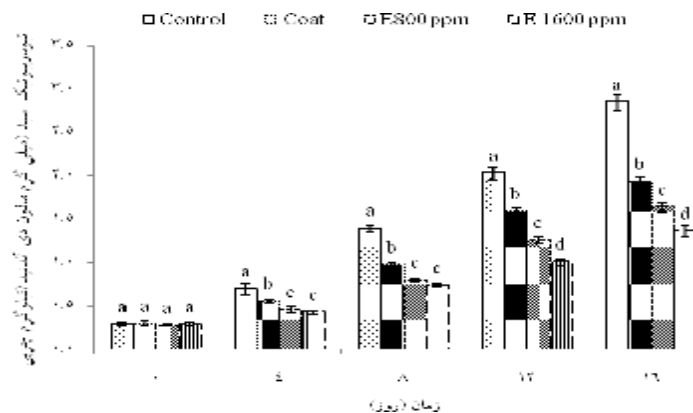
نمودار ۲- تغییرات پراکسید در تیمارهای مختلف طی فرآیند نگهداری

*حروف متفاوت در یک روز نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در بین تیمارهای مختلف می باشد ($P < 0.05$).

دارند. بنابراین پوشش تشکیل شده روی سطح فیله های بلدرچین به طور قابل ملاحظه ای نرخ تماس محصول را با اکسیژن کاهش داده که از سرعت اکسیداسیون اولیه چربی ها و متعاقب آن تشکیل هیدروپرواکسیدها کاسته می شود (۱۸). اساس های گیاهی توانایی شکستن رادیکال های آزاد، به وسیله دادن یک اتم هیدروژن را دارا می باشد و به علت دارا بودن مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد که فساد اکسیداتیو در بلدرچین ها را به تاخیر می اندازد (۱۳).

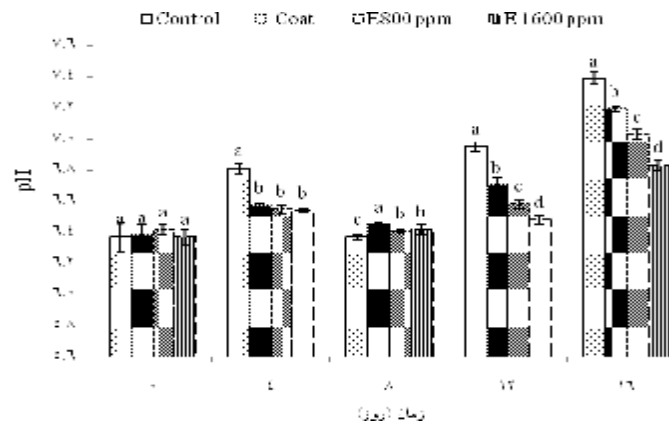
۳-۵- بررسی مقادیر عدد تیوباریوتیک اسید

با افزایش زمان مقادیر تیوباریوتیک اسید (نمودار ۳) در تمامی تیمارها افزایش یافت. روند افزایشی این شاخص به دلیل افزایش آهن آزاد و دیگر پراکسیدان ها در ماهیچه و همچنین تولید آلدئیدها از محصولات ثانویه حاصل از شکست هیدروپرواکسیدها است (۱۰). با توجه به نتایج آنالیز آماری در اکثر روزها بیشترین مقادیر در تیمار شاهد، مشاهده شد ($P < 0.05$). به طور کلی پوشش های زیست تخریب پذیر نفوذپذیری بسیار کمی نسبت به اکسیژن و دی اکسید کربن



نمودار ۳- تغییرات عدد تیوباریوتیک اسید در تیمار های مختلف طی فرآیند نگهداری

میتل آمین) حاصل از فعالیت باکتری‌های فاسدکننده گوشت فیله بلدرچین نیز نسبت داد (۱). با توجه به نتایج آنالیز آماری در اکثر روزها بیشترین مقادیر در تیمار شاهد، مشاهده شد. افزودن کیتوزان-صمغ دانه چیا طی زمان‌های نگهداری سبب کند شدن روند افزایشی pH شد و با افزودن اسانس نتایج بهتری مشاهده شد و همچنین با افزایش غلظت نیز تاثیر مثبتی در این رابطه داشت علت این امر ممکن است بدلیل اثرات مهاري اسانس در برابر رشد باکتری‌ها، گلیکوژنولیز و انحلال دی اکسید کربن تبدیل آن به اسید کربنیک طی دوره نگهداری نسبت داده شود (۲۶).



نمودار ۴- تغییرات pH در تیمارهای مختلف طی فرآیند نگهداری

غشای سلول باکتری، نشست مواد درون سلولی و در نهایت مرگ آن می شود (۲۰). همچنین دانه چیا منبعی به علت دارد بودن ترکیباتی نظیر فلاونولها، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، میرستین، کوئرستین، کامفرول دارای خاصیت ضد میکروبی می باشد (۷). همچنین افزودن اسانس سبب کند شدن روند افزایش باکتری کل و باکتری سرمادوست شد کمتر بودن بار کل باکتری در تیمارهای حاوی اسانس می تواند ناشی از ترکیبات فنولی نظیر سینول می باشد. ترکیبات فنولی موجود در اسانس‌های گیاهی غشای خارجی میکروارگانیسم‌ها را تخریب کرده و سبب خروج لیپوساکاریدها و افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی به ATP می شود. خروج ATP منجر به تمام شدن ذخیره انرژی سلول و مرگ سلول می شود (۱۲). خاصیت ضد میکروبی نگهدارنده های طبیعی به غلظت مورد استفاده آن‌ها بستگی دارد و با افزایش غلظت

۳-۶- بررسی مقادیر pH

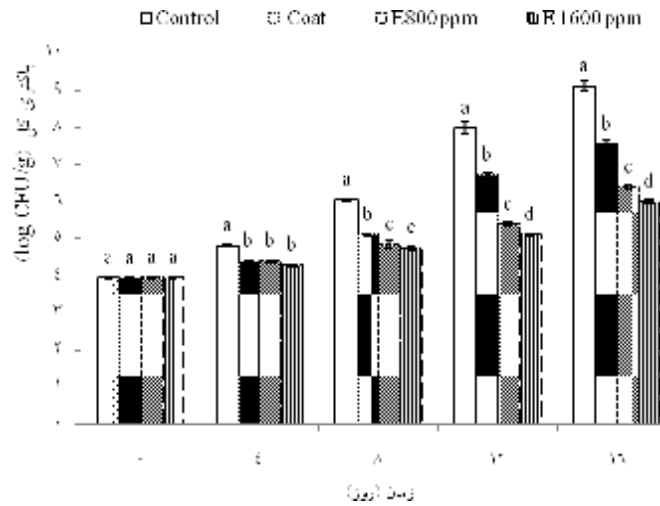
از جمله فاکتورهای تغییر پذیر در مدت زمان نگهداری فرآورده‌های گوشتی pH می باشد که می توان آن را به عنوان شاخص از تازگی فرآورده‌های گوشتی در نظر گرفت. در مطالعه حاضر نیز با افزایش زمان (نمودار ۴) مقادیر pH در تمامی تیمارها در ابتدای دوره نگهداری کاهش و سپس افزایش یافت ($P < 0.05$). کاهش ابتدایی در میزان pH ممکن است به علت فعالیت باکتری های اسید لاکتیک و اسیدی کردن محیط باشد. افزایش pH در طی دوره نگهداری را می توان به دلیل افزایش تولید بازهای از ته فرار (مانند آمونیاک، تری

۳-۷- مقادیر باکتری کل و باکتری سرما دوست طی مدت نگهداری

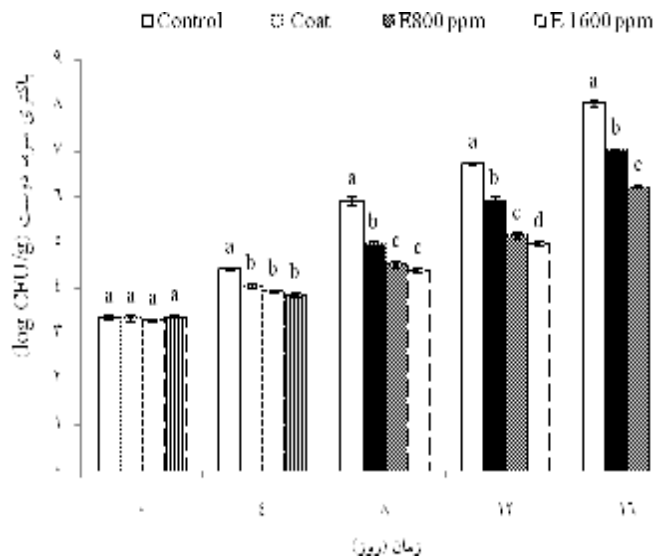
در مطالعه حاضر نتایج مربوط به باکتری کل (نمودار ۵) و باکتری سرمادوست (نمودار ۶) با هم، هم خوانی داشت، به طوری که با توجه به نتایج در اکثر روزها بیشترین مقادیر باکتری سرما دوست و باکتری کل در تیمار شاهد، مشاهده شد پوشش دهی با کیتوزان-صمغ دانه چیا سبب کند شدن روند افزایشی مقادیر باکتری شد ($P < 0.05$). فاکتورهای متعددی بر فعالیت ضد باکتریایی کیتوزان اثر گذار است. گرچه مکانیسم دقیق آن هنوز به روشنی مشخص نشده اما نظرات متفاوتی برای آن ارائه شده است. نظریه ای این اثر کیتوزان را به وجود گروه‌های آمینوی با بار مثبت نسبت داده است که با درشت ملکول‌های دارای بار منفی در سطح سلول میکروبی پیوند ایجاد نموده و منجر به گسیختگی

نگهداری میزان باکتری‌های مذکور در تیمارهای حاوی اسانس حد قابل قبول پیشنهادی برخوردار بود.

خاصیت ضد میکروبی آن‌ها افزایش می‌یابد (۳، ۱۴، ۲۳). میزان مجاز باکتری کل و باکتری سرمدوست برای گوشت ماکیان $7 \log \text{CFU/g}$ پیشنهاد شده است (۱۱). در انتهای دوره



نمودار ۵- تغییرات مقادیر باکتری کل در تیمارهای مختلف طی فرآیند نگهداری



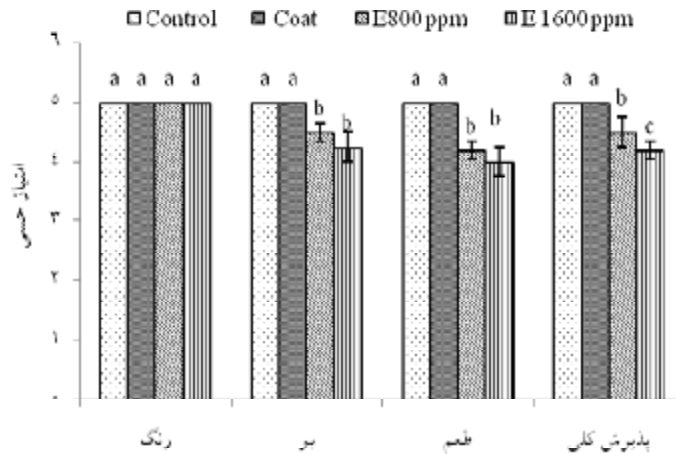
نمودار ۶- تغییرات مقادیر باکتری سرمدوست در تیمارهای مختلف طی فرآیند نگهداری

محصول تولیدی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به نتایج با افزودن نگهدارنده‌ها امتیاز حسی (نمودار ۷) به طور معنی داری کاهش یافت. اما تمامی تیمارها از امتیاز حسی مورد تایید ارزیاب‌ها برخوردار بودند. Tometri و همکاران (۲۹)

۳-۸ بررسی ویژگی‌های حسی در ابتدای دوره نگهداری بی‌شک ویژگی‌های حسی نظیر طعم و بافت از مهمترین فاکتورهای پذیرش محصول از دیدگاه مصرف‌کننده می‌باشند. لذا بررسی ویژگی‌های حسی با در نظر گرفتن بازار پسندی

می‌دهد. اما در مجموع تمامی تیمارها در مطالعه آن‌ها از امتیاز حسی مورد تایید ارزیاب‌ها برخوردار بودند.

نیز اعلام نمودند استفاده از عصاره ریزپوشانی شده با نانو لیپوزوم عصاره آزاد برگ بؤ رانست به تیمار شاهد کاهش



نمودار ۷- ارزیابی حسی در تیمارهای مختلف در ابتدای دوره نگهداری

3. Bagheri, R., Izadi Amoli, R., Tabari Shahndash, N. and Shahosseini, S. R., 2016. Comparing the effect of encapsulated and unencapsulated fennel extracts on the shelf life of minced common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in the mince. *food science and nutrition*, 4(2), pp. 216-222.
4. Bingöl, B., Bostan, K., Varlık, C., Uran, H., Üçok Alakavuk, D. and Sivri, N., 2015. Effects of Chitosan Treatment on the Quality Parameters of Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) during Chilled Storage. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, pp. 821-831.
5. Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *International Food Microbiology*, 94(3), pp. 223-253.
6. Derakhshan, Z., Oliveri, G., Heydari, A., Hosseini, M. S., Akrami, F., Gheisari, H., Kargar, S., Karimi, E. and Ferrante, M., 2018. Survey on the effects of electron beam irradiation on chemical quality and sensory properties on quail meat, *Food and Chemical Toxicology*, 112, pp. 416-420.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد که اسانس برگ بؤ دارای ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد و همچنین نتایج مربوط به کیفیت فیله بلدرچین نشان داد که پوشش مرکب کیتوزان-صمغ دانه چیا به همراه اسانس سبب کند شدن روند افزایشی شاخص‌های فساد اکسیداسیونی و میکروبی در طول زمان شد و با افزایش غلظت نتایج بهتری مشاهده شد. در مجموع، پوشش مرکب کیتوزان صمغ دانه چیا به همراه اسانس برگ بؤ که می‌تواند سبب افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت فیله بلدرچین شود. مطالعات بیشتر با سایر ماکیان و پوشش‌های دیگر کامپوزیت با اسانس‌های بومی ممکن است نتایج امیدوارکننده‌ای در این زمینه ارائه دهد.

۵- منابع

1. Afsharmanesh, Z., 2017. The effect of Citrus limonum essential oil, onion (*Allium cepa*) extract and nisin solution on quail meat storage at 8 °C. Masters thesis, university of zabol.
2. AOAC., 2005. Official Method of Analysis (17th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical chemists.

- liposomal encapsulated thyme extract on the quality of fish mince and *Escherichia coli* O157: H7 inhibition during refrigerated storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26 (1), pp.115-123.
15. Khalili, M. and Ebrahimzadeh, M. A., 2015. A Review on Antioxidants and Some of their Common Evaluation Methods. *J Mazandaran Univ Med Sci*24, (120), pp. 188-208.
 16. Khodja, Y., Dahmoune, F., Bachir bey, M., Madani, K. and Khetta, B., 2020. Conventional method and microwave drying kinetics of *Laurus nobilis* leaves: effects on phenolic compounds and antioxidant activity. *Braz. J. Food Technol*, Campinas, v. 23, e2019214,
 17. Kivrak, Ş., Göktürk, T. and Kivrak, İ., 2017. Assessment of Volatile Oil Composition, Phenolics and Antioxidant Activity of Bay (*Laurus nobilis*) Leaf and Usage in Cosmetic Application. *Int. J. Sec. Metabolite*, 4(2), pp. 148–148.
 18. Mahdavi, V., Hosseini, E. and Sharifian, A., 2018. Effect of edible chitosan film enriched with anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger. *Food science and nutrition*, 6 (2), pp. 269- 279
 19. Moawad, R., Abdelmonem El-Banna, H., Saleh Mohamed, O. and Aboelsood Ibrahim, V., 2018. Improving the Quality and Shelf-life of Refrigerated Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Carcasses by Oregano/Citrate Dipping. *Journal of Biological Sciences*, 18, pp. 389-398.
 20. No, H. K., Meyers, S. P. and Prinyawiwatkul, W. Xu Z., 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *Journal of Food Science*, 72, pp. R87-R.100.
 21. Ordoñez, A. AL., Gomez, J. D., Vattuone, M. A. and Isla, M. I., 2006. Antioxidant activities of sechiumedule(Jacq) Swartz extracts. *Food Chem*, 97, pp. 452-458.
 22. Ojagh, S., Rezaei, M., Razavi, S. and Hosseini, S., 2010. Effect of chitosan
 7. Dick, M., Costa, T. M. H., Gomaa, A., Subirade, M., Rios, A. D. and Flores, S. H., 2015. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 130, pp. 198–205.
 8. Fatima, Z., Bendjersi, Fairouz Tazerouti, Radia Belkhelfa-Slimani, Bahia Djerdjouri. and Brahim, Y., 2016. Phytochemical composition of the Algerian *Laurus nobilis* L. leaves extracts obtained by solvent-free microwave extraction and investigation of their antioxidant activity, *Journal of Essential Oil Research*.
 9. Fidan, H., Stefanova, G., Kostova, L., Stankov, S., Damyanova, S., Stoyanova, A. and Zheljzkov, V., 2019. Chemical Composition and Antimicrobial Activityof *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria. *Molecules*, 24, p. 804.
 10. Gomez Estaca, j., lopez de Lacy, A., Lopez caballero, M. E., Gamez. Guillen, M.C. and Montero, p., 2010. Biodegradable gelatin- chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food microbiology*, 27, 889-896.
 11. ICMSF., 2005. Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities, 2nd edn (1st edn published 1998). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
 12. Jan Khan, N., Khan, Z. and Sukhcharn, S., 2017. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional. *J J. Of Food Measurement*, 11, pp.423–433.
 13. Jalali, M., Ariiai, P. and Fattahi, E., 2016. Effect of alginate/carboxyl methyl cellulose composite coating incorporated with clove essential oil on the quality of silver carp fillet and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition during refrigerated storage. *J Food Sci Technol*, 53 (7), pp. 757-765.
 14. Javadian, S. R., Shahoseini, S. R. and Ariiai, P., 2017. The effects of

- assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J Geo-Marine Sci*, 42(5), pp. 556-64.
28. Shakour, N., Khoshkhoo, Z., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A. and Mahasti Shotorbani, P., 2021. Investigating the properties of PLA-nanochitosan composite films containing *Ziziphora Clinopodioides* essential oil and their impacts on oxidative spoilage of *Oncorhynchus mykiss* fillets. *Food Sci Nutr*, 2021, pp.00:1-13.
 29. Tometri, S.S., Ahmady, M. and Ariaii, P., 2020. Extraction and encapsulation of *Laurus nobilis* leaf extract with nano-liposome and its effect on oxidative, microbial, bacterial and sensory properties of minced beef. *Food Measure*.
 30. Valipour, F., Ariaii, P., Khademi, D. and Nemati, M., 2017. Effect of chitosan edible coating enriched with eucalyptus essential oil and α -tocopherol on silver carp fillets quality during refrigerated storage, 37(1), p. e12295.
 31. Yanar, Y., 2007. Quality Changes of Hot Smoked Catfish (*Clarias Gariepinus*) During Refrigerated storage. *Journal of Muscle Foods*, 18, pp.391-400.
 - coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 1, pp.193-198.
 23. Rashidaie Abandansarie, S. S., Ariaii, P. and Charmchian Langerodi, M., 2019. Effects of encapsulated rosemary extract on oxidative and microbiological stability of beef meat during refrigerated storage. *Food Sci Nutr*, 7, pp. 3969- 3978.
 24. Safari, R., Shahosseini, S. R. and Javadian, S. R., 2018. Antibacterial and antioxidant effects of the *Echinophora cinerea* extract on Bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillet during two storage conditions. *J. Aquat. Caspian Sea*, 3(2), pp. 13-24.
 25. Shahoseini, S. R., Safari, R. and Javadian, S., 2019. Evaluation effect of Carboxymethyl cellulose coating with *Anethum graveolens* extract on quality of fried fillet fried fish (*Anethum graveolens*). *J. Aquat. Caspian Sea*, 4(2), pp. 37-46 .
 26. Shahosseini, S. R., Safari, R. and Javadian, S. R., 2021a. Evaluation antioxidant effects of Pullulan edible coating with watercress extract (*Nasturtium officinale*) on the chemical corruption of fresh beluga sturgeon fillet during storage in a refrigerator. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 30(2), pp.123-146. (DOI): 10.22092/ISFJ.2021.124553
 27. Shalaby, E. A. and Shanab, S. M., 2013. Comparison of DPPH and ABTS

(Original Research Paper)

Evaluation of the Effect of Chitosan-chia Gumwith Bay Leaf Essential Oil on the Fillet Quail Shelf Life During Refrigerated Storage

Motahhreh Eslamian Amiri¹, Mohammad Ahmady^{2*}, Peiman Ariayi³, Leila Golestan², Azadeh Ghorbani Hasan Sarayi²

1-PhD Student, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

3 -Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Received:03/06/2021

Accepted:01/09/2021

Abstract

In this study, the effect of chitosan-chia seed coating with bay leaf essential oil on the shelf life of quail fillet during a 16-day refrigeration period was investigated. First, the amounts of phenolic and flavonoid compounds, antioxidant properties (ABTS free radical inhibition) of different concentrations of fragrant leaf essential oil were measured. Then, in order to investigate the effect of chitosan-chia seed composition and bay leaf essential oil on the shelf life of fillet quail 4 treatments including 1: control, 2: chitosan-chia seed gum coating, 3: coating + essential oil with 8000 ppm concentration, 4: coating + essential oil At a concentration of 1600 ppm were prepared and number of peroxide, thiobarbitic acid, pH, total amounts of bacteria and psychrotrophic counts bacteria were investigated. The phenolic compounds of bay leaf essential oil were equal to 388.57 ± 9.85 mg / g gallic acid, flavonoid compounds were 210.18 ± 4.98 mg / g. The highest free radical scavenging activity was observed at 1600 ppm (83.47%). The levels of antioxidant activity at this concentration did not significantly different with synthetic antioxidant BHA (concentration 100 ppm) ($P < 0.05$). The results of shelf life of quail showed that, the combined coating with essential oil slowed down the upward trend of oxidation and microbial indices compared to the control treatment, and these changes in treatment 4 were less than other treatments and until the end of the storage period of the range of chemical and microbial index were acceptable. Therefore, it seems that the combined coating of chitosan-chia seeds and essential oil of bay leaves can be used as a natural preservative in meat and poultry products.

Keywords: Bay Leaf, Composite Coating Chitosan-Chia Seed, Plant Essential Oil, Shelf Life, Quail.

*Corresponding Author: Drahmady@gmail.com