شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸
صفحات ۳۲۷-۳۱۵

نقش عصاره آنتی‌اکسیدانی ادویه میکس چینی بر حفظ کیفیت خمیر میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) پرورشی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

میثم ملکیان[۱]، مهدی نیکو[۲]*، کاوه رحمانی فرح[۳]، فرزانه نوری[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ایران
۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ایران
۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، یران
۴- استادیار، گروه بیولوژی و تکثیر و پرورش، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ ارسال: ۱۳۹۸/۰۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۰۲

چکیده

میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) یکی از گونه‌های مهم اقتصادی صنعت آبزی پروری است. خمیر میگو می‌تواند در تولید فرآورده‌های آماده و نیمه آماده شیلاتی مورد استفاده قرار گیرد و یا به شکل خام جهت مصارف خانگی عرضه گردد. در این مطالعه، تاثیر عصاره آنتی‌اکسیدانی پودر ادویه میکس چینی و یا پودر هریک از ادویه‌های آن به شکل مجزا (دارچین، آنیسون ستاره ای، زنجبیل، رازیانه، جوز هندی، لیکوریس، زیره، پو ست خ شک پرتقال) بر اک سایش چربی و پروتئین خمیر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ روز مورد برر سی قرار گرفت. مقدار ترکیبات فنولیک کل بین ۶۶۹/۷ تا ۱۵۳۸/۴ میکروگرم معادل اسید گالیک بر میلی لیتر عصاره بود. خمیر حاوی لیکوریس، دارچین و ادویه میکس پس از ۸ روز نگهداری دارای بهترین ویژگی ح سی از لحاظ بو، رنگ و پذیرش کلی دارا بودند. این نمونه‌ها همچنین دارای مقدار بالاتر گروه‌های سولفیدریل کل و پروتئین کربونیلی کمتر بوده و اکسایش چربی در آنها در مقایسه با نمونه کنترل کاهش یافت. در خمیر حاوی زیره و رازیانه پس از ۸ روز نگهداری بوی فساد به همراه میزان بالاتر TBARS و پروتئین کربونیلی مشهود بود. با این وجود، خمیر حاوی عصاره زنجبیل دارای تعداد باکتری‌های سرمادوست کمتری در بین تمامی نمونه‌ها بود. عصاره ادویه میکس دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مهار رادیکال‌های DPPH، ABTS و هیدورکسیل با IC_{50} معادل ۱۵/۱۰، ۹۲/۱۳ و ۷۲/۴ پی پی ام بود. این نتایج نشان داد که عصاره ادویه میکس در ثبات اکسیداتیو خمیر میگوی وانامی در مدت ۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد موثر است.

واژگان کلیدی: میگوی وانامی، خمیر، نگهداری در یخچال، عصاره ادویه، اکسایش

* نویسنده مسئول: مهدی نیکو
Email: m.nikoo@urmia.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 72, No. 3, Autumn 2019
pp. 315-327

The antioxidative effect of a Chinese spice mix extract on the quality of mince from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during storage at 4°C

M. Malekian[1], M. Nikoo[2*], K. Rahmanifarah[3], F. Noori[4]

[1] *MSc, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan 57179-44514, Iran*
[2] *Assistant professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan 57179-44514, Iran*
[3] *Assistant professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan 57179-44514, Iran*
[4] *Assistant professor, Department of Biology and Aquaculture, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan 57179-44514, Iran*

Received: 21-Janu-2020 Accepted: 12-Nov-2019

Abstract
Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is an important economic species in aquaculture industry. Shrimp mince can be produced as an intermediate shrimp product for various minced-based products or be used at home. In this study, antioxidative effects a Chinese spice mix or its individual spices (cinnamon, star anise, ginger, fennel, nutmeg, licorice and dried apple peel) on lipid and protein oxidation of shrimp mince during refrigerated storage at 4 ºC for 8 days was evaluated. Total phenolic contents in all spices were between 669.7 - 1538.4 mg gallic acid equivalents /g dry matter. Licorice, cinnamon and spice mix at 100 µg gallic acid equivalent/ g mince led to the best odor and color in samples after 8 days of storage ($P < 0.05$). These minces showed lower protein carbonyls and higher total sulfhydryl groups with the coincidental lower lipid oxidation ($P < 0.05$). In minces incorporated with nutmeg or fennel extracts, rancid odor was noticeable with higher formation of protein carbonyls and TBARS. Ginger-treated mince showed the lowest bacterial count (4.16 log CFU/g) at day 8. Spice mix extract showed antioxidant activity in scavenging free radicals (DPPH, ABTS, and hydroxyl) with IC50 of 15.1, 92.1 and 72.4 ppm, respectively. Results indicated the effect of spice mix in oxidative stability of vannamei shrimp mince during 8 days of refrigerated storage.

Keywords: Pacific white shrimp, Mince, Refrigerated storage, Spice extract, Oxidation

Corresponding author: Mehdi Nikoo Email: m.nikoo@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

اکسایش چربی یکی از مهمترین دلایل فرایند افت کیفیت در فرآورده‌های غذایی است و منجر به ضرر و زیان اقتصادی به صنعت تولید مواد غذایی می‌شود. چربی در فضای داخل و خارج سلول به صورت تری گلیسیرید، فسفولیپید و استرول پراکنده است و از نظر شیمیایی ناپایدار است، بنابراین در فرآیند پس از صید، نقل و انتقال و نگهداری به آسانی در معرض اکسایش قرار می‌گیرد. تاثیراکسیداسیون چربی شامل بوی تند، توسعه طعم بد، خروج خونابه، بدرنگی، افت ارزش تغذیه‌ای، کاهش زمان نگهداری و تجمع ترکیبات سمی است و احتمال تاثیر منفی بر سلامت مصرف‌کننده را دارد (Medina and Pazos, 2010). اکسایش پروتئین نیز با سازوکار مشابه اکسیداسیو چربی، از طریق یک واکنش زنجیره ای رادیکال آزاد پیش می‌رود. اگرچه مسیر پیچیده تر و محصولات متنوع‌تری برای آن گزارش شده است. در بافت‌های پیچید مانند گوشت، ارتباط میان اکسیداسیون چربی و پروتئین، همچنان مبهم است، اما به علت تقدم زمانی اکسیداسیون چربی در بافت، تصور می‌شود که محصولات اکسیداسیونی چربی، در القاء اکسیداسیون پروتئین نقش دارند (Lund *et al.*, 2011).

آنتی‌اکسیدانها بطور گسترده جهت جلوگیری یا تعویق اکسیداسیون، تاخیر فساد و ترشیدگی و حفظ ارزش غذایی فرآورده‌های غذایی و شیلاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Jacobsen *et al.*, 2008). ولی بدلیل اثرات احتمالی سمیت و سرطان زایی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مصنوعی، استفاده از ترکیبات طبیعی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی جهت حفاظت از فرآورده‌های دریایی یا سایر فرآورده‌های گوشتی مورد توجه خاصی قرار گرفته اند. در نتیجه کاربرد این ترکیبات طبیعی موجب خلق فرصتهای جدید در توسعه محصولات گوشتی با برچسب تمیز و صنعت غذاهای فراسودمند خواهد شد (Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

ترکیبات فنولیک مواد زیست فعالی هستند که بطور گسترده در گیاهان و ادویه‌جات وجود دارند و مورد مصرف انسان قرار می‌گیرند. بطور معمول ترکیبات فنولیک از طریق مکانیسم‌های مختلف نقش مهمی به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌نمایند. این مکانیسم‌ها شامل حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد، حذف گونه‌های واکنشگر اکسیژنی، توقف آنزیم‌های اکسایشی، شلاته نمودن یون‌های فلزی و یا برهم کنش با غشاهای زیستی‌اند (Medina *et al.*, 2007). از اینرو، ترکیبات فنولیک به عنوان ترکیبات مناسب جهت حفاظت فرآورده در برابر اکسیداسیون چربی می‌باشد مطرح می‌باشند. در این رابطه، ادویه ها (Spice) به عنوان یکی از منابع مهم ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی به منظور کنترل فرایندهای اکسایشی در مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال، پودر ادویه گرام ماسالا (حاوی فلفل سیاه، هل، پودر چیلی، میخک، دارچین، زیره، تخم گشنیز و آنیسون) در گوشت قرمز گاوی پخته شده در زمان نگهداری در یخچال برای مدت ۱۵ روز مورد بررسی قرار گرفت (Vasvada *et al.*, 2006). همچنین، Dwivedi و همکاران (۲۰۰۶) تاثیر آنتی‌اکسیدانی ادویه مخلوط (شامل ۵ نوع ادویه دارچین، رازیانه، فلفل، میخک و آنیسون ستاره‌ای) را در گوشت گاو چرخ شده پخته شده مورد بررسی قرار دادند. ادویه شامل دارچین، زیره، فلفل، آنیسون و رازیانه بود. این ادویه‌ها در سطح ۱ درصد در تمامی نمونه‌ها دارای ترکیبات واکنشی تیوباربیتوریک اسید (TBARS) کمتری را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند.

میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) یکی از گونه‌های آبزیان مهم تجاری با ارزش اقتصادی بالا است و به دلیل گوشت خوشمزه و ارزش غذایی بالا، در بسیاری از نقاط دنیا مصرف می‌گردد. خمیر میگو می‌تواند به عنوان یکی از فرآورده های حد واسط شیلاتی تولید و در تهیه انواع فرآورده‌های آماده و نیمه آماده شیلاتی مورد استفاده قرار گیرد و یا به شکل خام جهت مصارف خانگی عرضه گردد. با این وجود، به دلیل چرخ شدن و افزایش مساحت سطح و ترکیب با اکسیژن و امکان عملکرد بیشتر ترکیبات پرواکسیدانی با اسیدهای چرب غیر اشباع و پروتئین‌های میوفیبریل (Medina *et al.*, 2012)، خمیر در مقایسه با

میگوی کامل احتمالا اکسایش بیشتری خواهد یافت و نگهداری کوتاه مدت آن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با تغییرات کیفی همراه خواهد بود. بنا براین نیاز است که در ارتباط با تاثیر ادویه‌ها بر ماندگاری غذا وهش‌های بیشتری صورت پذیرد. لذا، در این پژوهش اثر آنتی‌اکسیدانی پودر ادویه میکس چینی و یا پودر هریک از ادویه‌های آن به شکل مجزا (دارچین، آنیسون ستاره‌ای، زنجبیل، رازیانه، جوز هندی، لیکوریس، زیره، پو ست خ شک پرتقال) بر اک سایش چربی و پروتئین خمیر میگو مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه ادویه میکس، استخراج عصاره و تعیین ترکیبات فنولیک کل

ادویه میکس چینی (حاوی دارچین، زیره، رازیانه، جوز هندی، زنجبیل، آنیسون ستاره ای، لیکوریس و پوست خشک پرتقال) به شکل بسته بندی ولی پودر نشده، شکلی از محصولات ادویه ای است که در تهیه غذا در چین کاربرد دا شته و معمولا عطر و طعم ب سیار خوبی در تهیه انواع غذاهایی گوشتی و سوپ ایجاد می‌نماید. در این مطالعه، ادویه میکس محصول یکی از شرکت‌های چینی (Chuanzhen Industry Co., Ltd., Sichuan, China) خریداری شد. جهت استفاده در خمیر میگو، این ادویه ابتدا طبق روش معمول استفاده از آن به شکل کامل و میکس خود ابتدا توسط مولینکس پودر شد و پس از غربال کردن به صورت پودر ریز آماده شد. همچنین جهت مطالعه اینکه کدام یک از ادویه‌های تشکیل دهنده این ادویه میکس سبب طعم بهتر و اثر آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مینس در زمان نگهداری خواهند داشت، از ۳ بسته ادویه میکس تمامی ادویه‌های آن (دارچین، زیره، رازیانه، جوز هندی، زنجبیل، آنیسون ستاره‌ای، لیکوریس و پوست خشک پرتقال) به دقت با دست جداسازی و به شکل پودر در آمد. جهت استخراج عصاره، پودر به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر مخلوط و عصاره به مدت ۱۰ دقیقه توسط حمام اولتراسوند (Precision Ultrasonic Cleaning, Ultrawave Limited Co., Cardiff, UK) با حداکثر توان ۵۰-۶۰ هرتز استخراج شد. سپس ۳۰ ثانیه ورتکس گردید تا محتویات بخوبی با یکدیگر مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه استراحت داده شد. عمل استخراج برای ۲ دقیقه دیگر نیز تکرار گردید. بعد از استخراج کلیه نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور g × ۴۰۰۰ سانتریفیوژ (Z 326 K, HERMLE Labortechnik GmbH, Germany) گردیدند. عصاره‌های حاصل در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری گردیدند. جهت اندازه گیری ترکیبات فنولیک کل عصاره ادویه‌های مختلف (به شکل مجزا یا میکس) از معرف فولین-سیوکالتو استفاده گردید (Przygodzka *et al*., 2014).

۲.۲. تهیه خمیر از میگوی وانامی پرورشی

خمیر میگو ه مان ند خمیر ماهی می‌توا ند در تولید فرآورده‌های آماده و نیمه آماده شیلاتی مورد استفاده قرار گیرد و یا به شکل خام جهت مصارف خانگی در فرو شگاهها با مدت زمان ماندگاری چند روزه عر ضه گردد و در منازل به دلخواه مورد استفاده قرار گیرد. میگوی سفید وانامی (با سایز ۴۰-۵۰ قطعه در یک کیلوگرم) از یک از فروشگاه ماهی (ارومیه) خریداری و در جعبه یونولیت حاوی یخ طی زمان ۱۵ دقیقه به آزمای شگاه فرآوری آبزیان پژوه شکده آرتمیا و آبزی پروری دان شگاه ارومیه منتقل گردید. جهت تهیه خمیر از چرخ گوشت (پارس خزر) با قطر شبکه ۳ میلی متر استفاده شد. ملحقات چرخ گوشت نیز به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر (۱۸- درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد تا از افزایش دمای فیله‌ها در حین تهیه خمیر جلوگیری گردد. ابتدا به منظور بررسی اثر هر یک ار ادویه‌ها بر ویژگی‌های حسی، میکروبی و شیمیایی تمامی عصاره در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (بر حسب ترکیبات فنولیک کل) به خمیر اضافه و برای ۲ دقیقه به خوبی با یکدیگر مخلوط شدند تا عصاره در تمام ق سمت‌های خمیر بطور یکنواخت پخش گردد. کلیه نمونه‌ها به مدت ۸ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و اک سایش چربی و پروتئین، تغییرات میکروبی و ویژگی‌های

حسی آنها سنجش گردید. قبل از تجزیه، نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه و در کنار یخ توسط قاشق کوچک بخوبی مخلوط و به شکل یکنواخت آماده گردید.

۳.۲. سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۱.۳.۲. فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH

تاثیر مهار رادیکال‌های DPPH به روش Samaranayaka و Li-Chan (۲۰۰۸) اندازه گیری شد. عصاره در غلظت‌های مختلف با آب مقطر مخلوط و سپس ۱ میلی لیتر عصاره با ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ ثانیه هم زده شدند. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۹ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

فعالیت حذف کنندگی رادیکال‌های DPPH =

$$\frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

۲.۳.۲. فعالیت مهار رادیکال‌های ABTS

تاثیر مهار رادیکال‌های ABTS به روش Samaranayaka و Li-Chan (۲۰۰۸) اندازه گیری شد. رادیکال‌های ABTS از طریق مخلوط نمودن محلول ۷/۴ میلی مول ABTS با محلول ۲/۶ میلی مول پرسولفات پتاسیم به نسبت ۱ به ۱ تهیه گردید. مخلوط حاصل سپس برای مدت ۱۲ ساعت در تاریکی در دمای اتاق انکوباسیون گردید. قبل از انجام آزمایش، محلول ABTS با مقدار مورد نیاز متانول مخلوط گردید تا جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر به ۱/۱ برسد. بعد از رسیدن جذب به این عدد، ۱۵۰ میکرولیتر عصاره در غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰۰ پی پی ام با ۲۸۵۰ میکرولیتر محلول رادیکالی در لوله آزمایش مخلوط و پس از ورتکس به مدت ۱۰ ثانیه، به مدت ۲ ساعت در تاریکی انکوبه گردیدند. برای تهیه نمونه بلانک از آب مقطر به جای عصاره استفاده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

فعالیت حذف کنندگی رادیکال‌های ABTS =

$$\frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

۳.۳.۲. فعالیت مهار رادیکال‌های هیدروکسیل

تاثیر آنتی‌اکسیدانی عصاره ادویه در مهار رادیکال‌های هیدروکسیل به روش Wang و همکاران (۲۰۱۳) اندازه‌گیری شد. یک میلی لیتر محلول ۱/۸۶۵ میلی مول ۱،۱۰-فنانترولین با ۲ میلی لیتر عصاره (۵ تا ۴۰۰ پی پی ام) در لوله آزمایش با یکدیگر مخلوط گردیدند. به مخلوط فوق ۱ میلی لیتر محلول ۱/۸۶۵ میلی مول سولفات آهن اضافه و بهم زده شد. با افزودن ۱ میلی لیتر محلول ۰/۰۳ درصد پراکسید هیدروژن واکنش اکسیداسیونی شروع گردید. پس از انکوباسیون برای مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نمونه‌ها (As) در طول موج ۵۳۶ نانومتر خوانده شد. مخلوط واکنشی بدون عصاره پوست سیب به عنوان کنترل منفی (An) و مخلوط فاقد پراکسید هیدروژن به عنوان بلانک (Ab) نیز تهیه گردیدند. از اسید آسکوربیک (۱۰۰ پی پی ام) جهت مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ادویه استفاده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره از طریق فرمول زیر بر حسب در صد محاسبه گردید:

فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال‌های هیدروکسیل =

$$\frac{An - As}{An - Ab} \times ۱۰۰$$

۴.۲. سنجش ترکیبات واکنشی اسید تیوباربیتوریک

ترکیبات ثانویه اکسیداسیون چربی به روش Buege و Aust (۱۹۷۸) اندازه‌گیری شدند. یک گرم خمیر با ۵ میلی‌لیتر از محلول TBA (۱۵ گرم تری‌کلرواستیک اسید و ۳۷۵ میلی‌گرم تیوباربیوتوریک اسید در اسیدکلریدریک

۰/۲۵ مول) مخلوط و نمونه‌ها با دستگاه هموژنایزر به مدت ۳۰ ثانیه هموژن شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته جوشانده شدند و پس از این مدت توسط آب و یخ سرد گردیدند. سانتریفیوژ کلیه نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۷۰۰۰g در دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد انجام و جذب سوپرناتانت‌های حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. TBARS بر حسب میلی‌گرم مالون دی آلدهید در کیلوگرم محاسبه گردید.

۵.۲. سنجش گروه‌های سولفیدریل کل

سولفیدریل کل به روش Ellman و همکاران (۱۹۵۹) سنجش شد. مقدار ۰/۵ گرم خمیر با ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات (پی اچ ۷/۲) (بافر A) به مدت ۳۰ ثانیه توسط هموژنایزر هموژن گردید. یک میلی‌لیتر از محلول هموژن شده با میلی لیتر ۹ از محلول بافر فسفات (شامل ۸ مول اوره، ۰/۶ مول سدیم کلرید و ۶ میلی مول EDTA) (بافر B) مخلوط شد و پس از ورتکس (۱۰ ثانیه) برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه). سه میلی‌لیتر از مایع رویی با ۴۰ میکرولیتر از محلول DTNB (۰/۰۱ مول در ۰/۰۵ مول استات سدیم) مخلوط شده و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۲ نانومتر قرائت شد. برای تهیه نمونه بلانک از یک میلی لیتر بافر B استفاده شد. مقدار گروه‌های سولفیدریل کل بر حسب میکرومول در گرم مینس بیان گردید.

۶.۲. سنجش پروتئین کربونیلی

برای اندازه گیری پروتئین کربونیلی از روش Levine و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم خمیر در ۱۰ میلی لیتر بافر Tris-EDTA (۵۰ میلی مول، pH ۷/۴) برای مدت ۳۰ ثانیه هموژن و ۵۰۰ میکرولیتر تری کلریک اسید (۳۰ درصد) به ۳۰۰ میکرولیتر نمونه هموژن شده اضافه تا پروتئین رسوب نماید. پس از سانتریفیوژ و خارج نمودن محلول رویی، به رسوب‌های حاصل نیم میلی لیتر DNPH تهیه شده در اسید کلریدریک ۲ مول اضافه شد و در نمونه بلانک نیم میلی لیتر اسید کلریدریک فاقد DNPH اضافه شد. پس از نگهداری نمونه‌ها برای مدت ۱ ساعت در تاریکی، مجددا ۵۰۰ میکرولیتر محلول تری کلریک اسید اضافه و نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب‌های بدست آمده با اتیل استات/اتانول (۱:۱) برای سه بار شستشو شده تا DNPH آزاد از بین برود. رسوب‌های بدست آمده در محلول ۶ مول گوآنیدین کلراید طی مدت ۱۲ ساعت حل شده و پس از سانتریفیوژ، مقدار پروتئین و کربونیل به ترتیب در طول موج‌های ۲۸۰ و ۳۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. مقدار کربونیل بر حسب نانومول در میلی‌گرم پروتئین با در نظر گرفتن ضریب خاموشی مولی[1] برابر $22,000\ M^{-1}cm^{-1}$ محاسبه شد.

۷.۲. ارزیابی میکروبی

تعداد باکتری‌های سرمادوست در خمیر میگو به روش Nirmal و Benjakul (۲۰۱۰) اندازه گیری شد. مقدار ۲۵ گرم نمونه به همراه ۲۲۵ میلی لیتر محلول نمکی ۰/۸۵ درصد در کیسه استامکر بخوبی بهم زده شد. پس از ۱ دقیقه بهم زدن رقت‌های مورد نیاز تهیه گردید. تعداد باکتری‌های سرمادوست به روش plate count agar حاوی ۰/۵ درصد کلرید سدیم با تهیه اسمیر تعیین شد. نمونه رقیق شده (۱۰۰ میکرولیتر) در روی محیط کشت قرار داده شد و برای مدت ۷ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

۸.۲. ارزیابی حسی

نمونه‌های خمیر در انتهای زمان نگهداری در روز ۸ مورد ارزیابی حسی به لحاظ بوی فساد توسط ۲۰ نفر شامل دانشجویان تحصیلات تکمیلی، کارشناسان و متخصصین شیلاتی ارزیابی گردیدند.

[1] Molar extinction coefficient

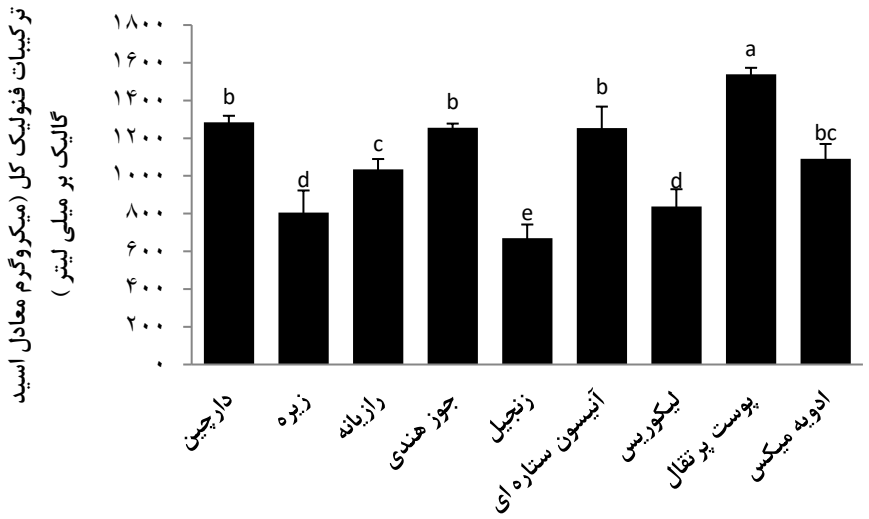
۹.۲. روش تجزیه تحلیل اطلاعات

معنی‌داری داده‌ها با انجام آزمون آماری واریانس یکطرفه تعیین شد. مقایسه بین میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن صورت پذیرفت. برای تجزیه تحلیل اطلاعات از نرم افزار SPSS شماره ۱۶ استفاده شد. معنی‌داری داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0.05$) بررسی گردید.

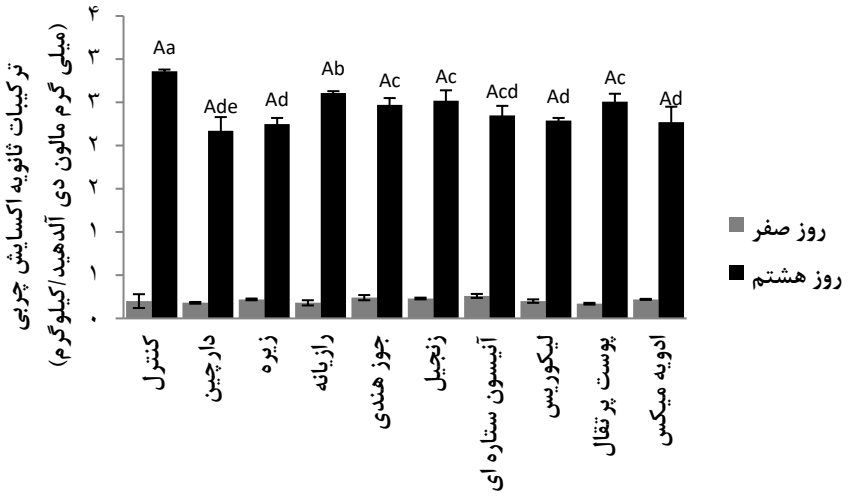
۳. نتایج

مقدار ترکیبات فنولیک کل بین ۶۶۹/۷ تا ۱۵۳۸/۴ میکروگرم معادل اسید گالیک بر میلی لیتر عصاره‌ها بود (شکل ۱). عصاره پوست پرتقال دارای بیشترین ترکیب فنولیک بود و بعد از آن عصاره‌های دارچین، آنیسون و جوز هندی قرار داشتند. عصاره آبی زنجبیل دارای کمترین میزان ترکیبات فنلی بود ($p < ۰/۰۵$).

مقدار TBARS در مینس بین ۲/۱۷ تا ۲/۸۶ میلی‌گرم مالون در آلدهید در کیلوگرم و در نمونه کنترل بطور معنی دار بیشتر از سایر تیمارها بود ($p < ۰/۰۵$). کمترین مقدار TBARS مربوط به مینس حاوی ۱۰۰ پی پی ام دارچین بود (۲/۱۷ میلی‌گرم مالون در آلدهید در کیلوگرم) و بعد از آن لیکوریس و ادویه میکس توانایی بهتری در مقایسه با سایر ادویه‌ها در کاهش TBARS داشته‌اند (شکل ۲).



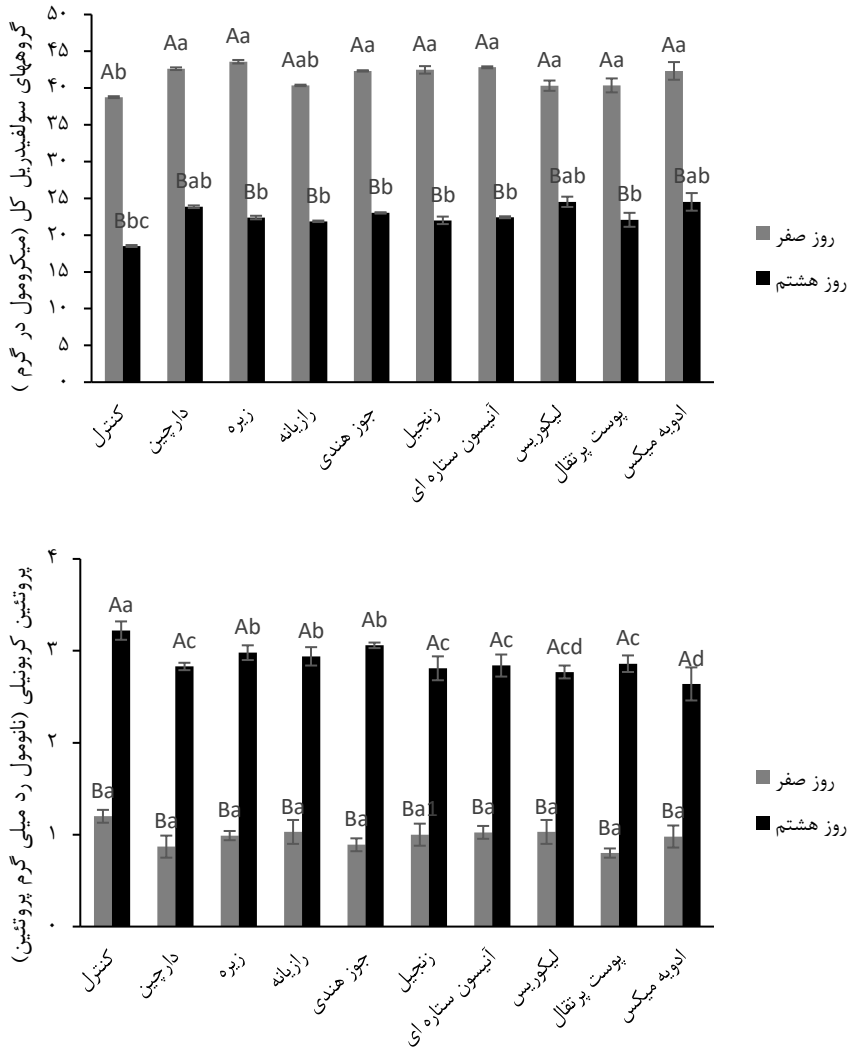
شکل ۱- نمودارمیانگین میزان ترکیبات فنولیک کل در عصاره ادویه‌های مختلف به شکل مجزا و میکس



شکل ۲ – نمودارهای میانگین تغییر میزان TBARS در خمیر میگو حاوی عصاره ادویه‌های مختلف طی مدت ۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه

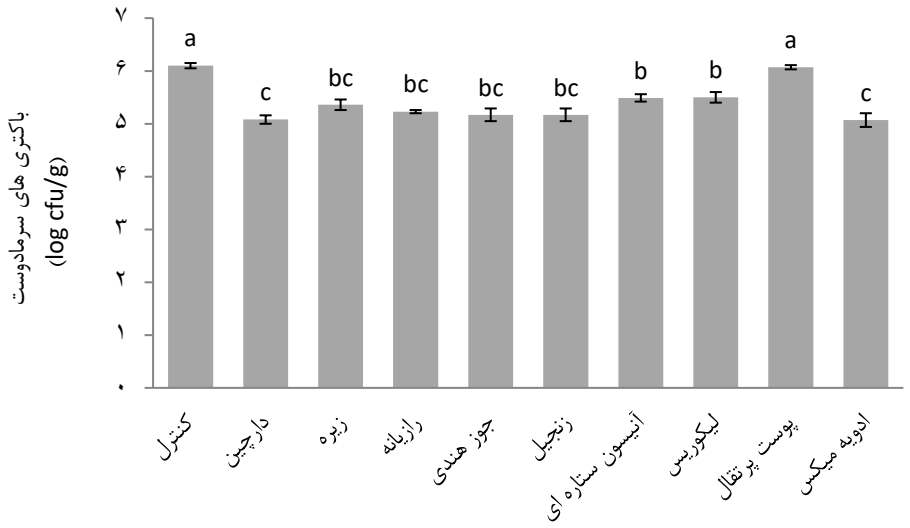
سانتی‌گراد

کاهش گروه‌های سولفیدریل کل با گذشت زمان مشاهده شد. بیشترین کاهش مربوط به تیمار کنترل بود ($p < ۰/۰۵$). در روز هشتم مقدار گروه‌های سولفیدریل کل بین ۱۸/۵۲ میکرومول در گرم تا ۲۴/۵۳ میکرومول در گرم متغیر بود (شکل ۳). مقدار پروتئین کربونیلی در مینس میگو بین ۲/۶۴ نانومول در میلی‌گرم پروتئین (مینس حاوی ادویه میکس) تا ۳/۲۲ نانومول در میلی‌گرم پروتئین در مینس بدون افزودنی در روز هشتم متغیر بود. در مینس‌های افزوده شده با عصاره لیکوریس و دارچین مقدار پروتئین کربونیلی به ترتیب ۲/۸۶ و ۲/۷۷ نانومول در میلی‌گرم پروتئین بود که بطور معنی‌داری پایین‌تر از نمونه کنترل بود (شکل ۳) ($p < ۰/۰۵$).



شکل ۳ – نمودارهای اکسایش پروتئین در خمیر میگو حاوی عصاره ادویه‌های مختلف در روز ۸ نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

در انتهای زمان نگهداری (روز هشتم)، مقدار باکتری‌های سرمادوست در نمونه کنترل و نمونه‌های حاوی عصاره ادویه‌های مختلف بین ۵/۰۷ تا ۶/۱۰ لوگ واحد تشکیل دهنده کلنی در گرم بود (شکل ۴). زنجبیل دارای بالاترین تاثیر در کاهش رشد میکروبی بود. مینس‌های مربوط به تیمار کنترل و حاوی عصاره فنولیک پوست پرتقال دارای بیشترین رشد میکروبی بودند ($p < ۰/۰۵$).



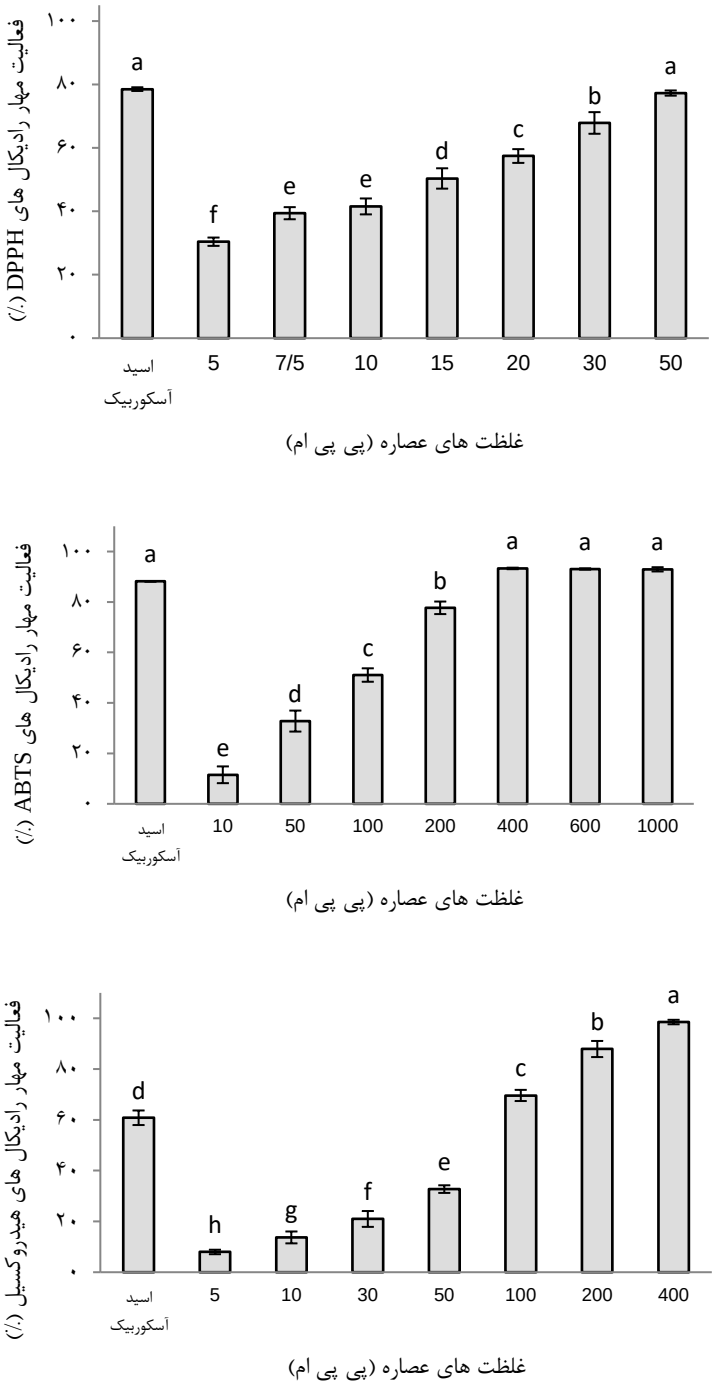
شکل ۴ – نمودار توسعه باکتری‌های سرمادوست در خمیر میگو حاوی عصاره ادویه‌های مختلف در روز ۸ نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

در رابطه با بو، خمیر افزوده شـــده با عصـــاره دارچین، زنجبیل و ادو یه میکس دارای بالاترین امیتاز بوده ا ند. مینس مربوط بـه گروه کنترل، خمیر حـاوی رازیـانـه، آنیســـون و عصـــاره پوســـت پرتقال کمترین امتیاز را داشـــتند($p < ۰/۰۵$). نتایج مربوط به رنگ تا حدی در مقایســـه با ویژگی بو متفاوت بود. بطوریکه نمونه حاوی دارچین دارای بـالاترین امتیـار بود و پس از آن مینس کنترل قرار داشـت ($p < ۰/۰۵$). کمترین امتیاز مربوط به خمیرهای حاوی جوز هندی، عصاره پوست پرتقال، رازیانه و آنیســـون بود. به لحاظ پذیرش کلی، بهترین نمونه‌ها به ترتیب نمونه‌های حاوی عصـــاره دارچین، زنجبیل و ادویه میکس بود و خمیر کنترل و حاوی ع صاره پو ست پرتقال کمترین امتیاز را داشتند ($p < ۰/۰۵$) (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگی‌های حسی خمیر میگو حاوی عصاره ادویه‌های مختلف در روز ۸ نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

نمونه‌ها	ویژگیهای حسی		
	پذیرش کلی	رنگ	بو
کنترل	۶/۱±۳۰/۴۹^{b}	۷/۱±۶۰/۰۷^{ab}	۵/۹ ۱±/۷۹^{c}
دارچین	۸/۱±۰۰/۰۵^{a}	۷/۰±۹۰/۹۹^{a}	۸/۰ ۱±/۰^{a}
زیره	۷/۱۰±۰/۷۳^{ab}	۷/۱±۱۰/۴۴^{ab}	۷/۰±۰/۸۲^{abc}
رازیانه	۶/۱±۷۰/۵۶^{ab}	۶/۱±۷۰/۴۱^{ab}	۶/۱±۶۰/۷۷^{abc}
جوز هندی	۶/۱±۹۰/۷۲^{ab}	۶/۱±۴۰/۵۰^{b}	۷/۱±۰/۸۸^{abc}
زنجبیل	۷/۱±۷۰/۰۵^{ab}	۷/۲۰±۱/۲۲^{ab}	۷/۹۰ ۰±/۹۹^{ab}
آنیسون ستاره ای	۶/۱±۸۰/۳۹^{ab}	۶/۱±۷۰/۶۳^{ab}	۶/۱±۷۰/۵۶^{abc}
لیکوریس	۷/۱±۱۰/۱۹^{ab}	۷/۰۰±۱/۲۴^{ab}	۷/۰ ۱±/۳۳^{abc}
پوست پرتغال	۶/۳۰±۱/۹۴^{b}	۶/۱±۳/۷۶^{b}	۶/۱±۴۰/۹^{bc}
ادویه مخلوط	۷/۱±۴۰/۳۴^{ab}	۷/۱±۲۰/۰۵^{ab}	۷/۹۰ ۱±/۰۵^{ab}

فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH عصاره ادویه میکس از غلظت ۵ تا ۱۰۰ پی پی ام روند افزایشی داشت و در غلظت ۱۰۰ پی پی ام به حدود ۸۰ در صد ر سید و از این جهت قعالیت مشابهی با اسید آسکوربیک نشان داد. فعالیت مهار رادیکال ABTS نیز از غلظت ۱۰ تا ۴۰۰ پی پی ام افزایش معنی دار و سپس تا ۱۰۰۰ پی پی ام تغییر نیافت. عصاره در سطح ۵ پی پی ام توانست حدود ۸ در صد رادیکال‌های هیدروکیسیل را مهار نماید. در غلظت ۱۰۰ پی پی ام توانایی مهار رادیکال ها بالاتر از اسید آسکوربیک بود ($p < ۰/۰۵$). IC_{50} عصاره ادویه میکس در مهار رادیکال های DPPH، ABTS و هیدورکسیل به ترتیب ۱۵/۱۰، ۹۲/۱۳ و ۷۲/۴ پی پی ام بود (شکل ۵).



شکل ۵ – نمودارهای میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ادویه میکس در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و هیدروکسیل

۴. بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ادویه‌های مختلف (دارچین، زیره، راز یا نه، جوز ه ندی، زنجب یل، آنیسون ستاره ای، لیکوریس، پوست خشک پرتقال و ادویه میکس) در خمیر میگوی وانامی نگهداری شده در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۸ روز مورد بررسی قرار گرفت. میزان ترکیبات فنلی کل عصاره‌های مختلف تعیین شد. عصاره آبی پوست پرتقال و سپس عصاره‌های دارچین، آنیسون و جوز هندی بیشترین ترکیبات فنلی کل را نشان دادند. مطالعه Przygodzka و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان داد که دارچین و آنیسون ستاره ای در بین ادویه‌های بررسی شده دارای بالاترین مقدار ترکیبات فنولیک کل (TPC) بود ولی ادویه میکس دارای مقدار کمتر فنل کل بود که با نتیجه این مطالعه مطابقت دارد بطوریکه مقدار ترکیبات فنولیک کل ادویه میکس (۱۰۹۱ میکروگرم در میلی لیتر عصاره) کمتر از میزان آن در عصاره‌های دارچین و آنیسون ستاره ای بود. همچنین در این م طال عه عصاره آبی زنجب یل دارای کمترین میزان ترکی بات فنولیک کل بود که با نتیجه گزارش شده توسط Przygodzka و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد.

تغییرات کیفیت چربی خمیر طی ز مان نگ هداری از طریق سنجش ترکیبات ثانویه اکسایش چربی (TBARS) بررسی شد. روش TBARS مستلزم واکنش بین مالون دی آلدهید (MDA) تشکیل شده در عضله تحت اثر اکسیداسیون یا تجزیه هیدروپراکسیدها به ترکیبات ثانویه با TBA و تشکیل کمپلکس MDA-TBA است که به رنگ صورتی م شخص می‌گردد. ت شکیل این کمپلکس به دمای بالا (۹۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) و محیط اسیدی نیاز دارد (Namal Senanayake, 2013). اگرچه عصاره رازیانه تا حدی سبب کنترل اک سیدا سیون در مقای سه با نمونه کنترل شد. با این وجود توانایی آنتی‌اکسیدانی کمتری در مقای سه با سایر ع صاره‌ها دا شت. Dwivedi و همکاران (۲۰۰۶) نیز تاثیر ادویه چینی و ادویه‌های موجود در آن را در کاهش TBARS در گوشت قرمز گاوی پخته شده نشان دادند. نتایج مشابه نیز توسط Vasavada و هم‌کاران (۲۰۰۶) در کاربرد پودر ادو یه های موجود در گرام ماسالا در کنترل اکسایش چربی گزارش گردید. ترکیبات فنولیک معمولا از طریق مکانی‌سم‌های مختلف از فساد و اکسایش چربی و پروتئین جلوگیری نموده یا آن کاهش می‌دهند. این مکانی‌سم‌ها شامل مهار رادیکال‌های آزاد، حذف گونه‌های واکن شگر اک سیژنی، توقف آنزیم‌های اکسایشی و شلاته کردن یون‌های فلزی‌اند (Medina *et al.*, 2007). نتایج حاکی از تاثیر آنتی‌اکسیدانی عصاره ادویه‌های مورد بررسی چه به شکل مجزا و چه میکس در کنترل اکسایش چربی در خمیر میگوی وانامی در طی زمان نگهداری در یخچال بود.

در نمو نه های مختلف خمیر طی ز مان نگ هداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، گروه‌های سولفیدریل با گذشت زمان کاهش یافت. کاهش گروه‌های سولفیدریل کل به تشکیل پیوندهای دی سولفید حاصل از اکسایش گروه‌های سولفیدریل و ت شکیل پیوندهای عر ضی (کراس لینک) بین و داخل سلولی نسبت داده شد (Lund *et al.*, 2010). خمیر حاوی عصاره لیکوریس و ادویه میکس دارای بالاترین مقدار گروه‌های سولفیدریل پس از ۸ روز بودند. همچنین عصاره دارچین و جوز هندی نیز توانستند به نحو موثری از کاهش گروه‌های سولفیدریل و درنتیجه اکسیداسیون پروتئین در مقایسه با گروه کنترل جلوگیری نمایند. از سویی دیگر، ت شکیل پروتئین کربونیلی در خمیر نیز تا حدی کنترل گرد ید و بهترین نتیجه از عصاره لیکوریس و دارچین بدست آمد. بطور کلی اکسیداسیون پروتئین یا زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه از طریق واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد مشابه آنچه در اکسایش چر بی رخ می‌دهد ا تفاق می‌افتد (Lund *et al.*, 2010). زنجیره‌های جانبی برخی ا سیدهای آمی نه مان ند لیزین، آرژینین و پرولین طی واکنش های اکسیداسیونی با واسطه یون‌های فلزی تولید کربونیل می‌نماید (Estevez *et al.*, 2011).

تعداد باکتری‌های سرمادوست خمیر میگوی وانامی

حاوی عصاره ادویه‌های مختلف پس از ۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نشان داد که در روز صفر، هیچ باکتری سرمادوستی مشاهده نشد و عصاره‌ها توانستند رشد میکروبی را در زمان نگهداری کنترل نمایند و از این جهت عصاره زنجبیل دارای بهترین اثر بود. Nirmal و Benjakul (۲۰۱۰) نیز کاهش باکتری‌های سرمادوست در میگو وانامی با کاربرد کاتچین و اسید فرولیک را گزارش نمودند. ترکیبات فنولیک ممکن است با پروتئین‌های دیواره سلول میکروارگانیزم‌ها تشکیل کمپلکس دهند و موجب لیز شدن دیواره سلولی گردند (Chanthachum and Beuchat, 1997). همچنین ارزیابی حسی خمیر حاوی عصاره ادویه‌های مختلف نشان داد که پس از ۸ روز نمونه کنترل دارای بوی فسادی بود، در حالیکه خمیر حاوی عصاره ویژگی حسی را حفظ نمود. بطوریکه لیکوریس، دارچین و ادویه میکس بهترین نتایج حسی را داشتند.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ادویه میکس در مهار رادیکال‌های آزاد نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره در مقایسه با اسید آسکوربیک بود. این امر را می‌توان به وجود ترکیبات فنولیکی مختلف در ادویه میکس که ترکیبی از ادویه جات دارچین، زیره، رازیانه، جوز هندی، زنجبیل، آنیسون ستاره ای، لیکوریس، پوست خشک پرتقال بوده نسبت داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها در مطالعات پیشین گزارش گردید (Embuscado, 2015; Przygodzka *et al.*, 2015; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013).

در مجموع نتایج این پژوهش حاکی از آن است که خمیر های افزوده شده با لیکوریس، دارچین و ادویه میکس پس از ۸ روز نگهداری در یخچال دارای بهترین ویژگی حسی از لحاظ بو، رنگ و پذیرش کلی را دارند. اکسایش چربی و پروتئین در این نمونه‌ها کاهش یافت عصاره‌ها توانستند از رشد باکتری‌های سرمادوست در زمان نگهداری بکاهند و از این جهت عصاره زنجبیل دارای بهترین اثر بود. از اینرو، عصاره ادویه میکس با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی و بهبود و ویژگی‌های حسی می‌تواند جهت نگهداری کوتاه مدت خمیر میگو در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بدون نیاز به افزودنی‌های سنتتیک مورد استفاده قرار گیرد.

References

Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology, 52*, 302-310.

Chanthachum, S., Beuchat, L. R., 1997. Inhibitory effect of kiam (*Cotylelobium Ianceotatum* craih) wood extract on gram positive food-born pathogens and spoilage micro-organisms. *Food Microbiology 14*, 603-608.

Dwivedi, S., Vasavada, M. N., Cornforth, D., 2006. Evaluation of antioxidant effects and sensory attributes of Chinese 5-Spice ingredients in cooked ground beef. *Journal of Food Science 73*, C12–C17.

Ellman, G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics 82*, 70-77.

Embuscado, M. E., 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants–a mini review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 811-819.

Estévez, M., 2011. Protein carbonyls in meat systems: a review. *Meat Science 89*, 259-279.

Jacobsen, C, Undeland, I., Storrø, I., Rustad, T., Hedges, N., Medina, I., 2008. Preventing lipid oxidation in seafood. In T. Børresen (Ed.), Improving seafood products for the consumer (pp. 426–460). Cambridge: Wood head Publishing.

Jiang, J., Zhang, X., true, A.D., Zhou, L., Xiong, Y.L., 2013. Inhibition of lipid oxidation and rancidity in precooked pork patties by radical-scavenging licorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract. *Journal of Food Science 78*, C1686-1694.

Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology 233*, 346-357.

Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., Estévez, M, 2011. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular and Nutritional Food Research 55*, 83–95.

Medina, I., Gallardo, J. M., Gonzalez, M. J., Lois, S., Hedges, N., 2007. Effect of molecular of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 55*(10), 3889–3895.

Medina, I., Pazos, M., 2010. Oxidation and protection of fish. In E. Decker, R. Elias, & D. J. McClements (Eds.), Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Cambridge: *Woodhead Publishing Limited* 91–120.

Medina, I., Undeland, I., Larsson, K., Storrø, I., Rustad, T., Jacobsen, C., ... & Gallardo, J. M. (2012). Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: A review. *Food Chemistry 131*(3), 730-740.

Namal Senanayake, S.P.J., 2014. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *Journal of Functional Foods 5*, 1529-1541.

Nirmal, N.P., Benjakul, S., 2011. Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. *LWT - Food Science and Technology 44*, 924-932.

Przygodzka, M., Zielińska, D., Ciesarová, Z., Kukurová, K., Zieliński, H., 2014. Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. *LWT - Food Science and Technology* 58, 321-326.

Samaranayaka, A. G., & Li-Chan, E. C., 2008. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). *Food Chemistry 107*(2), 768-776.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects–A review. *Journal of Functional Foods 18*, 820-897.

Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martínez-Huélamo, M., Alvarenga, J. F. R., Leal, L. N., Lamuela-Raventos, R. M., 2014. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry 154*, 299-307.

Vasavada, M. N., Dwevedi, S., Cornforth, D., 2006. Evaluation of garam masala spices and phosphates as antioxidants in cooked ground beef. *Journal of Food Science 71*, 292–297.