



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

میثم ملکیان<sup>۱</sup>، مهدی نیکو<sup>۲\*</sup>، کاوه رحمانی فرح<sup>۳</sup>، فرزانه نوری<sup>۴</sup>

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، ایران

۴- استادیار، گروه بیولوژی و تکثیر و پرورش، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۰۲

تاریخ ارسال: ۱۳۹۸/۰۸/۲۲

### 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، پوست خشک پرتقال) بر اکسایش چربی و پروتئین خمیر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ روز مورد بررسی 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 حسی 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 سرمدوست کمتری در بین تمامی نمونه‌ها بود. عصاره ادویه میکس دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مهار رادیکال‌های DPPH، ABTS و هیدروکسیل با IC<sub>50</sub> 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



## **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<sup>1</sup>, M. Nikoo<sup>2\*</sup>, K. Rahmanifarah<sup>3</sup>, F. Noori<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> MSc, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan 57179-44514, Iran

<sup>2</sup> Assistant professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan 57179-44514, Iran

<sup>3</sup> Assistant professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan 57179-44514, Iran

<sup>4</sup> 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 °C 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 IC<sub>50</sub> 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

## 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 گلیسرید، 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. تاثیر اکسیداسیون 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 اکسیداسیون چربی، از طریق یک واکنش زنجیره ای رادیکال آزاد پیش می‌رود. اگرچه مسیر پیچیده تر و محصولات متنوع تری 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 اکسیداسیون 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 شیلیاتی 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، ادویه‌ها (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 ما سالا (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 تیوباربتوریک اسید (TBARS) کمتری را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند.

میگوئی 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 فرآورده‌های حد واسط شیلیاتی تولید و در تهیه انواع فرآورده‌های آماده و نیمه آماده شیلیاتی 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 اسیده‌های چرب غیر اشباع و پروتئین‌های میوفیبریل (Medina et al., 2012)، خمیر در مقایسه با

اولتراسونیک (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  $g \times 4000$  سانتریفیوژ (Z 326 K, HERMLE, Labortechnik GmbH, Germany) گردیدند. عصاره‌های حاصل در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری گردیدند. جهت اندازه‌گیری 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 همانند خمیر ماهی می‌تواند در تولید فرآورده‌های آماده و نیمه آماده شیلاتی مورد استفاده قرار گیرد و یا به شکل خام جهت مصارف خانگی در فروشگاهها با مدت زمان ماندگاری چند روزه عرضه 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 آزمایشگاه فرآوری آبزیان پژوهشکده آرمیا و آبی پروری دانشگاه 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 از 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 قسمت‌های خمیر بطور یکنواخت پخش گردد. کلیه نمونه‌ها به مدت ۸ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و اکسایش چربی و پروتئین، تغییرات میکروبی و ویژگی‌های

میگوی کامل احتمالاً 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 و هوش‌های 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، پوست خشک پرتقال) بر اکسایش 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 ستاره‌ای، 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 داشته و معمولا عطر و طعم بسیار 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

اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

= فعالیت حذف کنندگی رادیکال های ABTS

$$\frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

### ۳.۳.۲. فعالیت مهار رادیکال های هیدروکسیل

تاثیر آنتی اکسیدانی عصاره ادویه در مهار رادیکال های هیدروکسیل به روش Wang و همکاران (۲۰۱۳) اندازه گیری شد. یک میلی لیتر محلول ۱/۸۶۵ میلی مول ۱،۱۰- فنانترویلین 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 سانتی گراد، جذب نمونه ها (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 آنتی اکسیدانی عصاره ادویه استفاده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره از طریق فرمول زیر بر حسب درصد محاسبه گردید:

$$\text{فعالیت حذف کنندگی رادیکال های هیدروکسیل} = \frac{A_n - A_s}{A_n - A_b} \times 100$$

### ۴.۲. سنجش ترکیبات واکنشی اسید

#### تیوباریتوریک

ترکیبات ثانویه اکسیداسیون چربی به روش Buege و Aust (۱۹۷۸) اندازه گیری شدند. یک گرم خمیر با ۵ میلی لیتر از محلول TBA (۱۵ گرم تری کلرو استیک اسید و ۳۷۵ میلی گرم تیوباریتوریک اسید در اسید کلریدریک

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

### ۳.۲. سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی

#### ۱.۳.۲. فعالیت مهار رادیکال های DPPH

تاثیر مهار رادیکال های DPPH به روش Samaranyaka و Li-Chan (۲۰۰۸) اندازه گیری شد. عصاره در غلظت های 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. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۹ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

= فعالیت حذف کنندگی رادیکال های DPPH

$$\frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

#### ۲.۳.۲. فعالیت مهار رادیکال های ABTS

تاثیر مهار رادیکال های ABTS به روش Samaranyaka و Li-Chan (۲۰۰۸) اندازه گیری شد. رادیکال های 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 میکرو لیتر عصاره در غلظت های ۱۰ تا ۱۰۰۰ پی پی ام با ۲۸۵۰ میکرو لیتر 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 نمونه ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر با استفاده از

شده اضافه تا پروتئین رسوب نماید. پس از سانتریفیوژ و خارج نمودن محلول رویی، به رسوب‌های حاصل نیم میلی لیتر DNP-H تهیه شده در اسید کلریدریک ۲ مول اضافه شد و در نمونه بلانک نیم میلی لیتر اسید کلریدریک فاقد DNP-H اضافه شد. پس از نگهداری نمونه‌ها برای مدت ۱ ساعت در تاریکی، مجدداً 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/تانول (۱:۱) برای سه بار شستشو شده تا DNP-H آزاد از بین برود. رسوب‌های بدست آمده در محلول ۶ مول گوانیدین 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<sup>۱</sup> برابر  $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  محاسبه شد.

#### ۷.۲. ارزیابی میکروبی

تعداد باکتری‌های سرمادوست در خمیر میگو به روش Nirmal و Benjakul (۲۰۱۰) اندازه‌گیری 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.

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 جو شونده 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 درجه سانتی‌گراد انجام و جذب سوپرناتانت‌های حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. TBARS بر حسب میلی‌گرم مالون دی‌آلدهید 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 سانتی‌گراد 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 اندازه‌گیری 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

<sup>1</sup> Molar extinction coefficient

(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 ( $p < 0.05$ ).

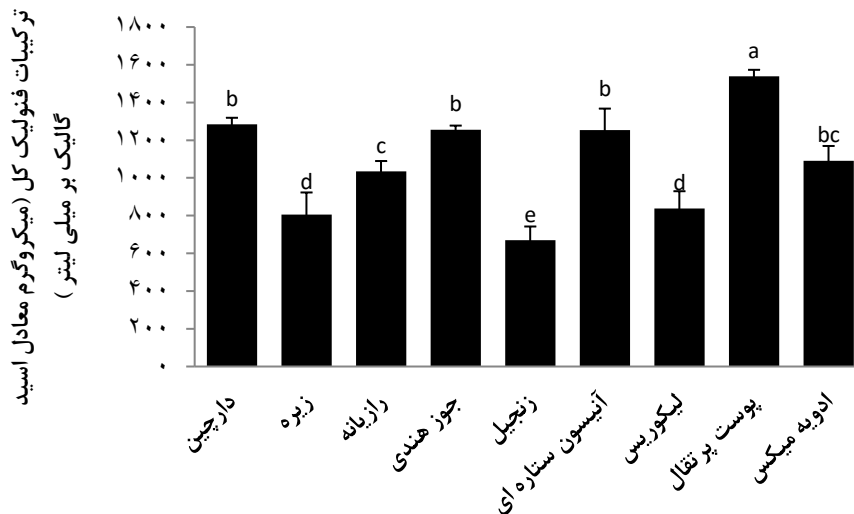
مقدار TBARS در مینس بین ۲/۱۷ تا ۲/۸۶ میلی گرم مالون در آلدئید در کیلوگرم و در نمونه کنترل بطور معنی دار بیشتر از سایر تیمارها بود ( $p < 0.05$ ). کمترین مقدار TBARS مربوط به مینس حاوی ۱۰۰ پی پی ام دارچین بود (۲/۱۷ میلی گرم مالون در آلدئید در کیلوگرم) و بعد از آن لیکوریس و ادویه میکس توانایی بهتری در مقایسه با سایر ادویه‌ها در کاهش TBARS داشته‌اند (شکل ۲).

## ۹.۲. روش تجزیه تحلیل اطلاعات

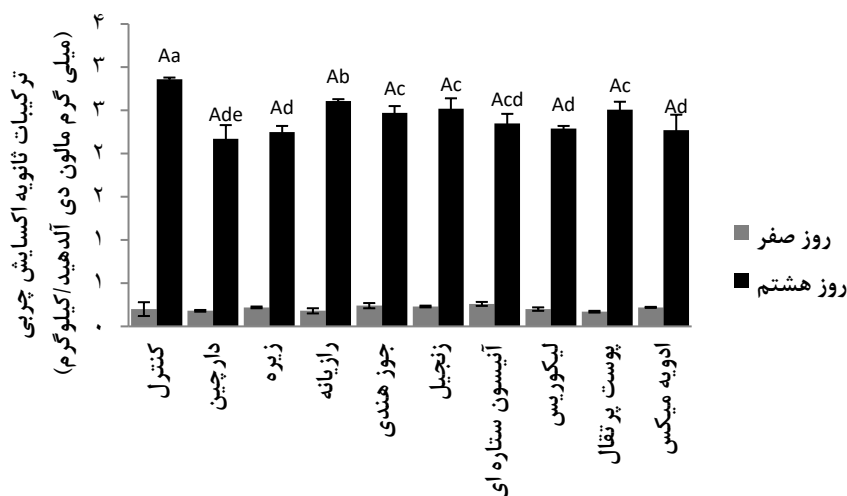
معنی‌داری داده‌ها با انجام آزمون آماری واریانس یکطرفه تعیین شد. مقایسه بین میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن صورت پذیرفت. برای تجزیه تحلیل اطلاعات از نرم افزار SPSS شماره ۱۶ استفاده شد. معنی‌داری داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $p < 0.05$ ) بررسی گردید.

## ۳. نتایج

مقدار ترکیبات فنولیک کل بین ۶۶۹/۷ تا ۱۵۳۸/۴ میکروگرم معادل ۱ سید گالیک بر میلی لیتر عصاره‌ها بود



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

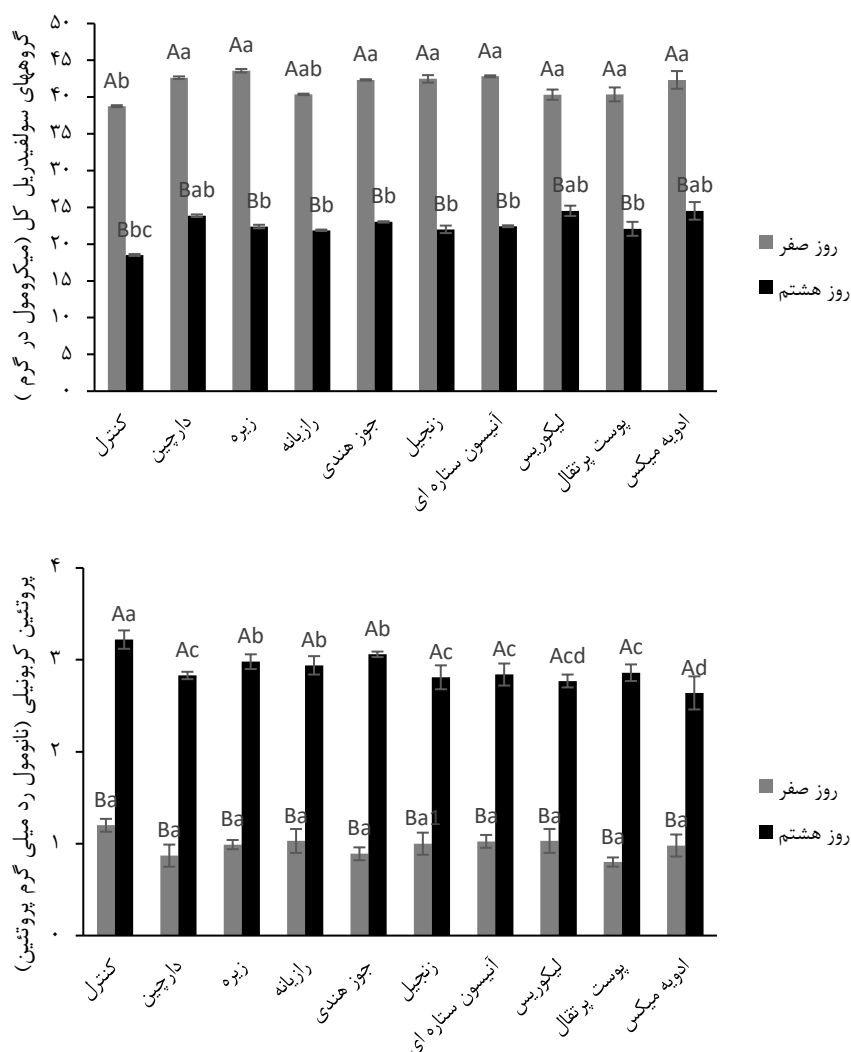


شکل ۲- نمودارهای میانگین تغییر میزان TBARS در خمیر میگو حاوی عصاره ادویه‌های مختلف طی مدت ۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه

## سانتی‌گراد

کاهش گروه‌های سولفیدریل کل با گذشت زمان مشاهده شد. بیشترین کاهش مربوط به تیمار کنترل بود ( $p < 0/05$ ). 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) ( $p < 0/05$ ).

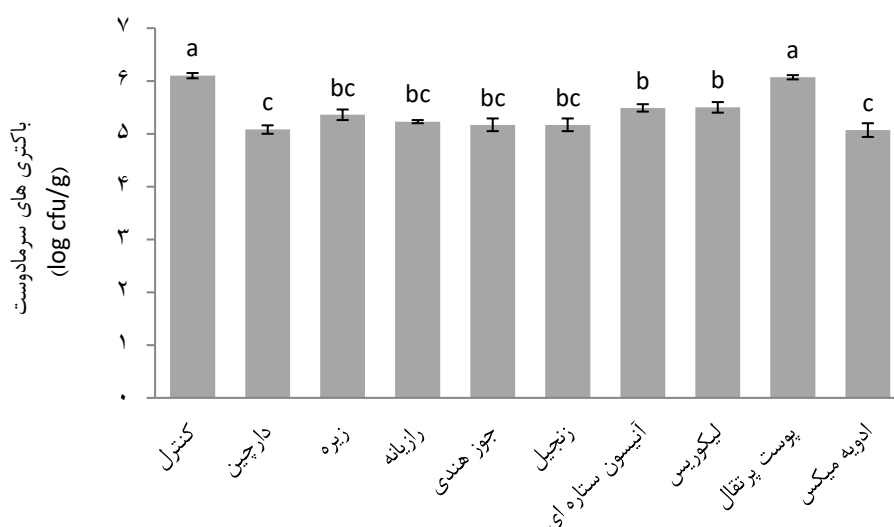


شکل ۳ - نمودارهای اکسایش پروتئین در خمیر میگو حاوی عصاره ادویه‌های مختلف در روز ۸ نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

بالاترین تاثیر در کاهش رشد میکروبی بود. مینس‌های مربوط به تیمار کنترل و حاوی عصاره فنولیک پوست پرتقال دارای بیشترین رشد میکروبی بودند ( $p < 0/05$ ).

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).





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

کنترل قرار داشت ( $p < 0.05$ ). کمترین امتیاز مربوط به خمیرهای حاوی جوز هندی، عصاره پوست پرتقال، رازیانه و آنیسون بود. به لحاظ پذیرش کلی، بهترین نمونه‌ها به ترتیب نمونه‌های حاوی عصاره دارچین، زنجبیل و ادویه میکس بود و خمیر کنترل و حاوی عصاره پوست پرتقال کمترین امتیاز را داشتند ( $p < 0.05$ ) (جدول ۱).

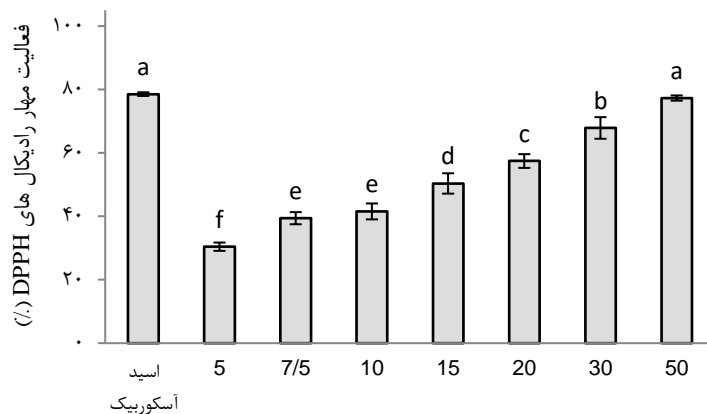
در رابطه با بو، خمیر افزوده شده با عصاره دارچین، زنجبیل و ادویه میکس دارای بالاترین امتیاز بوده‌اند. مینس مربوط به گروه کنترل، خمیر حاوی رازیانه، آنیسون و عصاره پوست پرتقال کمترین امتیاز را داشتند ( $p < 0.05$ ). نتایج مربوط به رنگ تا حدی در مقایسه با ویژگی بو متفاوت بود. بطوریکه نمونه حاوی دارچین دارای بالاترین امتیاز بود و پس از آن مینس

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

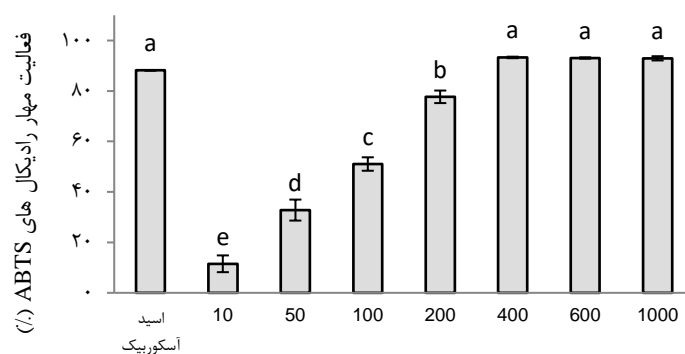
نمونه‌ها	ویژگی‌های حسی	
	پذیرش کلی	رنگ
کنترل	۶/۱±۳۰/۴۹ <sup>b</sup>	۷/۱±۶۰/۰۷ <sup>ab</sup>
دارچین	۸/۱±۰۰/۰۵ <sup>a</sup>	۷/۰±۹۰/۹۹ <sup>a</sup>
زیره	۷/۱±۰۰/۷۳ <sup>ab</sup>	۷/۱±۱۰/۴۴ <sup>ab</sup>
رازیانه	۶/۱±۷۰/۵۶ <sup>ab</sup>	۶/۱±۷۰/۴۱ <sup>ab</sup>
جوز هندی	۶/۱±۹۰/۷۲ <sup>ab</sup>	۶/۱±۴۰/۵۰ <sup>b</sup>
زنجبیل	۷/۱±۷۰/۰۵ <sup>ab</sup>	۷/۲±۱۱/۲۲ <sup>ab</sup>
آنیسون ستاره ای	۶/۱±۸۰/۳۹ <sup>ab</sup>	۶/۱±۷۰/۶۳ <sup>ab</sup>
لیکوریس	۷/۱±۱۰/۱۹ <sup>ab</sup>	۷/۰±۱۱/۲۴ <sup>ab</sup>
پوست پرتقال	۶/۳±۱۱/۹۴ <sup>b</sup>	۶/۱±۳۱/۷۶ <sup>b</sup>
ادویه مخلوط	۷/۱±۴۰/۳۴ <sup>ab</sup>	۷/۱±۲۰/۰۵ <sup>ab</sup>
بو		
کنترل	۵/۹ ± ۱/۷۹ <sup>c</sup>	
دارچین	۸/۰ ± ۱/۰ <sup>a</sup>	
زیره	۷/۰ ± ۰/۸۲ <sup>abc</sup>	
رازیانه	۶/۱ ± ۶۰/۷۷ <sup>abc</sup>	
جوز هندی	۷/۱ ± ۰/۸۸ <sup>abc</sup>	
زنجبیل	۷/۹۰ ± ۰/۹۹ <sup>ab</sup>	
آنیسون ستاره ای	۶/۱ ± ۷۰/۵۶ <sup>abc</sup>	
لیکوریس	۷/۰ ± ۱/۳۳ <sup>abc</sup>	
پوست پرتقال	۶/۱ ± ۴۰/۹ <sup>bc</sup>	
ادویه مخلوط	۷/۹۰ ± ۱/۰۵ <sup>ab</sup>	

نیافت. عصاره در سطح ۵ پی پی ام توانست حدود ۸ درصد رادیکال‌های هیدروکسیسیل را مهار نماید. در غلظت ۱۰۰ پی پی ام توانایی مهار رادیکال‌ها بالاتر از اسید آسکوربیک بود ( $p < 0.05$ ).  $IC_{50}$  عصاره ادویه میکس در مهار رادیکال‌های DPPH، ABTS و هیدروکسیسیل به ترتیب ۱۵/۱۰، ۹۲/۱۳ و ۷۲/۴ پی پی ام بود (شکل ۵).

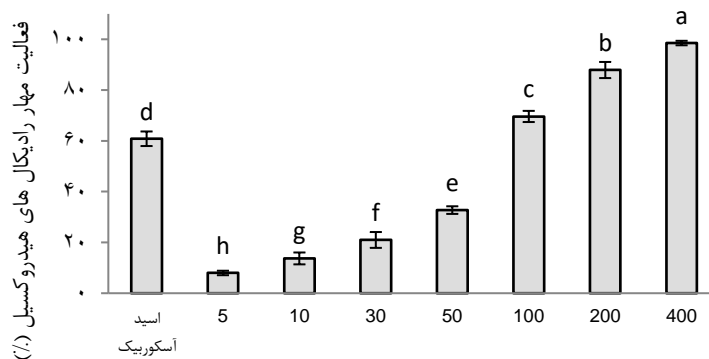
فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH عصاره ادویه میکس از غلظت ۵ تا ۱۰۰ پی پی ام روند افزایشی داشت و در غلظت ۱۰۰ پی پی ام به حدود ۸۰ درصد رسید و از این جهت فعالیت مشابهی با اسید آسکوربیک نشان داد. فعالیت مهار رادیکال ABTS نیز از غلظت ۱۰ تا ۴۰ پی پی ام افزایش معنی دار و سپس تا ۱۰۰۰ پی پی ام تغییر



غلظت‌های عصاره (پی پی ام)



غلظت‌های عصاره (پی پی ام)



غلظت‌های عصاره (پی پی ام)

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

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ادویه‌های مختلف (دارچین، زیره، راز یا نه، جوز هندی، زنجبیل، آنیسون ستاره‌ای، 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 ستاره‌ای 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 میلی‌لیتر عصاره) کمتر از میزان آن در عصاره‌های دارچین و آنیسون ستاره‌ای بود. همچنین در این مطالعه عصاره آبی زنجبیل دارای کمترین میزان ترکیبات فنولیک کل بود که با نتیجه گزارش شده توسط Przygodzka و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد.

تغییرات کیفیت چربی خمیر طی زمان نگهداری از طریق سنجش ترکیبات ثانویه اکسایش چربی (TBARS) بررسی شد. روش TBARS مستلزم واکنش بین مالون دی‌آلدئید (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 مشخص می‌گردد. تشکیل 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 اکسیداسیون در مقایسه با نمونه کنترل شد. با این وجود توانایی آنتی‌اکسیدانی کمتری در مقایسه با سایر عصاره‌ها داشت. 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 ادویه‌های موجود در گرام ماسالا در کنترل اکسایش چربی گزارش گردید. ترکیبات فنولیک معمولاً 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 واکنشگر اکسیژنی، 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 نمونه‌های مختلف خمیر طی زمان نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، گروه‌های سولفیدریل با گذشت زمان کاهش یافت. کاهش گروه‌های سولفیدریل کل به تشکیل پیوندهای دی‌سولفید حاصل از اکسایش گروه‌های سولفیدریل و تشکیل پیوندهای عرضی (کراس‌لینک) 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 در نتیجه اکسیداسیون پروتئین در مقایسه با گروه کنترل جلوگیری نمایند. از سویی دیگر، تشکیل پروتئین کربونیلی در خمیر نیز تا حدی کنترل گردید 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 چربی رخ می‌دهد اتفاق می‌افتد (Lund et al., 2010). زنجیره‌های جانبی برخی اسیدهای آمینه مانند لیزین، آرژنین و پرولین طی واکنش‌های اکسیداسیونی با واسطه یون‌های فلزی تولید کربونیل می‌نماید (Estevez et al., 2011).

تعداد باکتری‌های سرمادوست خمیر میگوی وانامی

می‌توان به وجود ترکیبات فنولیکی مختلف در ادویه میکس که ترکیبی از ادویه جات دارچین، زیره، رازیانه، جوز هندی، زنجبیل، آنیسون ستاره‌ای، لیکوریس، پوست خشک پرتقال بوده نسبت داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها در مطالعات پیشین گزارش گردید (Embucado, 2015; Przygodzka *et al.*, 2015; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013). در مجموع نتایج این پژوهش حاکی از آن است که خمیرهای 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 و 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.

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 فنولیکی ممکن است با پروتئین‌های دیواره سلول میکروارگانیسم‌ها 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 فساد 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

## 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 lanceotatum* 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.
- Embucado, 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.

