

## بررسی پایداری اکسیداسیون روغن زیتون بکر با استفاده از اسانس رزماری

ملیحه کرامت<sup>۱</sup>، محمد تقی گلماکانی<sup>۲\*</sup>، محمود امین لاری<sup>۳</sup>، نصیره علوی<sup>۱</sup>،  
مسعود نوروزی<sup>۴</sup>، شهرام شکر فروش<sup>۵</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز
  - ۲- دکتری، استادیار، بخش علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز
  - ۳- دکتری، استاد، بخش بیوشیمی گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
  - ۴- کارشناسی ارشد، مربی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت
  - ۵- دکتری، استاد، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
- (تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۳۱)

### چکیده

نگرانی رو به رشد در رابطه با امکان سرطان زایی آنتی اکسیدان های سنتزی منجر به افزایش تمایل نسبت به جایگزینی آنتی اکسیدان های طبیعی، موثر و مقرون به صرفه گردیده است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر اسانس رزماری بر پایداری اکسیداسیون روغن زیتون بکر تحت شرایط تسریع شده بود. ترکیب اسانس رزماری با استفاده از کروماتوگرافی گازی/ طیف سنج جرمی تعیین شد. اسانس رزماری و BHT به ترتیب در غلظت های ۱۰۰۰ و ۱۰۰ ppm به روغن زیتون بکر افزوده شدند و پایداری اکسیداسیون نمونه های روغن زیتون بکر با استفاده از روش اکسیژن فعال (AOM) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کروماتوگرافی گازی/ طیف سنج جرمی نشان داد که آلفا- پینن (۱۷/۰۷٪)، کامفور (۹/۶۲٪) و بورنیل استات (۹/۴۲٪) ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس رزماری می باشند. اسانس رزماری در به تاخیر انداختن اکسیداسیون روغن زیتون بکر اثر قابل توجهی داشت. اثر اسانس رزماری در به تاخیر انداختن تشکیل هیدروپراکسیدها مشابه BHT بود. اسانس رزماری به شکل معنی داری زمان القاء، فاکتور حفاظت و قدرت آنتی اکسیدانی روغن زیتون بکر را افزایش داد. زمان القاء، فاکتور حفاظت و قدرت آنتی اکسیدانی نمونه حاوی اسانس رزماری (به ترتیب ۴۰/۰۱±۰/۳۵ ساعت، ۱/۶۷±۰/۰۵ و ۳۹/۹۶±۱/۷۶) مشابه با نمونهی حاوی BHT (به ترتیب ۴۴/۴۴±۰/۲۳ ساعت، ۱/۸۵±۰/۰۱ و ۴۵/۹۶±۰/۰۵) بود. به شکل کلی، اسانس رزماری آنتی اکسیدان طبیعی مناسبی جهت افزایش زمان ماندگاری روغن زیتون بکر می باشد.

**کلید واژگان:** اسانس، پایداری اکسیداسیون، رزماری، روغن زیتون بکر، شرایط تسریع شده.

\* مسئول مکاتبات: golmakani@shirazu.ac.ir

## ۱- مقدمه

روغن زیتون از مزوکارپ میوه درخت زیتون (*Olea europaea*) به دست می‌آید [۱]. بر اساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO)، بیشترین میزان تولید زیتون در سال های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۲ مربوط به کشورهای اسپانیا، ایتالیا، یونان، ترکیه و سوریه بوده است. میانگین تولید سالانه‌ی روغن زیتون در جهان در سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۲ حدود ۲/۸۷ میلیون تن و در ایران ۷۹۲/۳۱ تن می‌باشد [۲].

ویژگی منحصر بفرد روغن زیتون، روش استخراج این روغن با پرس سرد است. روغن زیتون بکر بدون فرآیند تصفیه تهیه شده و در نتیجه بخش اعظمی از ترکیبات زیست فعال مهم میوه زیتون را در خود حفظ می‌کند. روغن زیتون عمدتاً از تری اسیل گلیسرول ها (۹۹٪) تشکیل شده است. ترکیبات فرعی آن اسیدهای چرب آزاد، مونو و دی اسیل گلیسرول ها، هیدروکربن ها، استرول ها، الکل های آلفاتیک، توکوفرول ها و رنگدانه ها می باشند. این روغن حاوی مقادیر فراوانی ترکیبات فنولی و فرار می‌باشد. روغن زیتون بکر به دلیل دارا بودن مقدار بالایی از اسید چرب تک غیر اشباع اولئیک و همچنین ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند پلی فنول ها و توکوفرول ها، پایداری بالایی نسبت به اکسیداسیون دارد. با این وجود، ترکیباتی مانند اسیدهای چرب آزاد و حساس کننده های نوری که در طول فرآیند تصفیه حذف می شوند، پراکسیدان بوده و باعث حساسیت روغن زیتون بکر نسبت به اکسیداسیون می شوند [۳-۵].

آنتی اکسیدان‌های سنتزی مانند BHT, BHA, PG و TBHQ در حفاظت از روغن‌های خوراکی بسیار موثر بوده و در نتیجه به عنوان بازدارنده‌های بالقوه‌ی واکنش‌های اکسیداسیون مورد استفاده قرار می‌گیرند. البته، با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت مصرف‌کنندگان، تمایل به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی افزایش یافته است. اگرچه به دلیل سمی بودن و سرطان زایی آنتی اکسیدان‌های سنتزی، برای آن‌ها حدود مجاز قانونی تعریف شده است اما ترکیبات طبیعی می‌توانند در غلظت‌های بالا و اثرگذاری بیشتر استفاده شوند [۶]. گزارش شده است که BHT در دوزهای بالا باعث خونریزی داخلی و خارجی و مرگ برخی از گونه های موش شده است. به علاوه، BHA باعث ایجاد زخم معده در موش ها شده است [۷].

گیاهان دارویی دارای ترکیبات فیتوشیمیایی فراوانی بوده که در نتیجه می‌توانند به عنوان منابع بالقوه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد استفاده قرار بگیرند. یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، ترکیبات موجود در اسانس‌های گیاهی می‌باشند. اسانس‌ها عمدتاً شامل هیدروکربن‌های مونوترپنی و سزکوئی‌ترین‌ها و همچنین ترین‌های اکسیژن‌دار می‌باشند. رزماری (*Rosmarinus officinalis*) گیاهی معطر از خانواده نعناعیان (*Labiatae*) است. رزماری گیاهی بومی مناطق آهکی نواحی مدیترانه ای است که به خوبی آب و هوای گرم مناطق خشک و نیمه خشک را تحمل می‌کند. مقدار اسانس در برگ‌های خشک رزماری بین ۰/۵ تا ۱/۵ درصد می‌باشد. فراوان‌ترین ترکیبات اسانس رزماری را آلفا-پینن، کامفور، ۱،۸-سینئول، کامفن و بتا-پینن تشکیل می‌دهند [۸-۱۱].

پایداری می‌تواند به عنوان مقاومت یک چربی به اکسیداسیون و کاهش کیفیت ناشی از آن به دلیل تولید طعم و بویی که منجر به تند شدن اکسیداتیو و کاهش کیفیت ماده‌ی غذایی می‌شود، تعریف شود. در آزمون‌های پایداری اکسیداسیون، فرآیند معمول اکسیداسیون برای به دست آوردن نتایجی که می‌تواند به پارامترهای کیفی روغن‌های مختلف نسبت داده شود، تسریع می‌شود. بنابراین، روش‌های تعیین پایداری یک ابزار مهم کنترل کیفیت برای پیش‌بینی زمان نگهداری مواد غذایی می‌باشد [۱۲]. پایداری روغن زیتون بکر در شرایط بهینه‌ی نگهداری معمولاً بین ۹ تا ۱۸ ماه می‌باشد. بنابراین جهت تعیین پایداری آن در یک مدت زمان کوتاه، فرآیند اکسیداسیون با افزایش دما و تزریق اکسیژن به درون محصول تسریع می‌شود [۱۳].

اثر افزودن اسانس، عصاره و پودر گیاهان دارویی بر پایداری اکسیداسیون روغن‌های خوراکی در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. جعفریان و همکاران گزارش کردند که افزودن پودر رزماری و نعناع به روغن زیتون بکر باعث افزایش پایداری اکسیداسیون روغن زیتون بکر می‌شود [۱۴]. در مطالعه‌ی ارکان و همکاران نشان دادند که عصاره‌ی رزماری در به تاخیر انداختن اکسیداسیون روغن آفتابگردان نسبت به اسانس سیاه دانه عملکرد موثرتری دارد [۱۵]. اسانس پونه‌ی کوهی نیز باعث افزایش پایداری اکسیداسیون روغن زیتون فوق بکر شد [۱۶]. هاشمی و همکاران نیز گزارش

## ۲-۴- تعیین ترکیب اسانس

جهت تعیین ترکیبات اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent 7890A, USA) مجهز به طیف سنج جرمی (Agilent 5975C, USA) استفاده شد. از ستون BPX5 ساخت شرکت SGE استرالیا به طول ۳۰ متر، ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر استفاده شد. دمای ستون با سرعت ۳ درجه سلسیوس در دقیقه از دمای ۶۰ به ۲۱۰ درجه سلسیوس رسانده شد. سپس با سرعت ۲۰ درجه سلسیوس در دقیقه از دمای ۲۱۰ به ۲۴۰ درجه سلسیوس افزایش یافت. نهایتاً به مدت ۸ دقیقه و ۳۰ ثانیه در این دما نگه داشته شد. دمای محل تزریق و آشکارساز ۲۸۰ درجه سلسیوس بود. گاز حامل سیستم هلیوم و نسبت تقسیم ۱:۱۰۰ بود. طیف سنج جرمی با سیستم تله یونی و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت تنظیم شد. شاخص ماند با استفاده از زمان ماند نمونه‌ها و همچنین نرمال آلکان‌های تزریق شده به عنوان استاندارد در شرایط مشابه، تعیین شدند [۲۰].

## ۲-۵- تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اسانس

جهت تعیین توانایی مهارکنندگی رادیکال آزاد از روش مهار کنندگی فعالیت رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. توانایی احیاکنندگی اسانس نیز با استفاده از آزمون احیای یون مس مورد ارزیابی قرار گرفت.

## ۲-۵-۱- اندازه‌گیری خاصیت مهار کنندگی رادیکال آزاد

اسانس در غلظت‌های ۱۰، ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متانول و محلول متانولی DPPH نیز در غلظت  $10^{-4} \times 2$  مولار تهیه شدند. جهت تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر از هر غلظت اسانس با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول DPPH در لوله آزمایش مخلوط و با همزن به خوبی یکنواخت شد. نمونه‌های آماده شده به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و در محیط تاریک نگهداری شدند. پس از گذشت ۱ ساعت، جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل UV2100PC در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از معادله ۱، درصد بازدارندگی (I) محاسبه گردید [۲۱].

معادله (۱):

$$I (\%) = ((A_c - A_s) / A_c) \times 100$$

$A_c$ : جذب کنترل،  $A_s$ : جذب نمونه

کردند که اسانس زنیان باعث کاهش سرعت اکسیداسیون روغن آفتابگردان می‌شود [۱۷].

هدف از این مطالعه بررسی اثر اسانس رزماری بر پایداری اکسیداسیون روغن زیتون بکر در مقایسه با BHT تحت شرایط تسریع شده می‌باشد. جهت بررسی پایداری اکسیداسیون روغن زیتون بکر، نمونه در معرض دمای بالا و هوادهی قرار گرفت و زمان القاء، فاکتور حفاظت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ی حاوی اسانس رزماری با نمونه‌ی کنترل و BHT مقایسه شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد شیمیایی

هیدروکسید سدیم، کربنات سدیم، ایزواکتان، سیکلوهگزان، پارا-آنیزیدین، متانول، کلرید مس، استات آمونیوم، هگزان، کلروفرم، یدید پتاسیم، اتانول، هیدروکسید پتاسیم و اسید استیک از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. معرف فولین (Folin Ciocalteu), DPPH (2, 2-diphenyl-1-), BHT, (picrylhydrazyl), نئوکوپرین، فنول فتالین و سدیم تیوسولفات از شرکت سیگمای آلمان خریداری شدند.

### ۲-۲- گیاه رزماری

گیاه رزماری در اسفند ۱۳۹۲ از شهر شیراز جمع‌آوری و در دمای ۴۰-۳۰ درجه سلسیوس به مدت سه روز در سایه خشک شد. مقدار ماده خشک گیاه بر اساس روش AACC به شماره‌ی ۱۹-۴۴ در سه تکرار اندازه‌گیری شد [۱۸]. مقدار ماده خشک گیاه  $92/75 \pm 1/24$  درصد (وزنی / وزنی) به دست آمد.

### ۲-۳- استخراج اسانس

جهت استخراج اسانس ۵۰ گرم ماده خشک گیاه را با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط کرده و به مدت سه ساعت با استفاده از روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر، اسانس استخراج گردید. اسانس استخراج شده با سولفات سدیم بی‌آب، آبگیری شد [۱۹]. بازیافت اسانس  $1/40 \pm 0$  درصد (حجمی / وزنی) بود. اسانس استخراج شده تا زمان آزمایش در ظروف شیشه‌ای تیره و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شد.

استاندارد AOCS به شماره 25-Cc10a اندازه‌گیری شد [۲۴].

### ۲-۶-۳- اندازه‌گیری عدد اسیدی

به منظور بررسی عدد اسیدی روغن زیتون بکر از استاندارد AOCS به شماره Cd 3d-63 استفاده شد. درصد اسید چرب آزاد بر حسب اسید اولئیک محاسبه شد [۲۴].

### ۲-۶-۴- تعیین ترکیب اسیدهای چرب روغن زیتون بکر

به منظور تهیه متیل استر اسیدهای چرب، به ۲۰۰ میلی‌گرم از روغن زیتون بکر ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط متانول-استیل کلرید ۹۵ درصد اضافه شد. سپس نمونه به مدت ۱ ساعت در دمای ۸۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به روغن متیل استر شده اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه با استفاده از همزن به خوبی یکنواخت شد. سپس ۲ میلی‌لیتر حلال هگزان حاوی ۰/۰۱ درصد TBHQ (جهت جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع) به مخلوط یکنواخت شده اضافه شد. بعد از یکنواخت شدن با همزن، مخلوط به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس مایع فوقانی نمونه سانتریفیوژ شده (لایه هگزان) جداسازی و تا زمان تزریق در ظرف‌های مخصوص در یخچال نگهداری شد.

جهت بررسی اسید چرب روغن زیتون بکر از دستگاه کروماتوگرافی گازی (SP-3420A, Beifen, China) مجهز به شناساگر یونیزاسیون شعله‌ای استفاده شد. از ستون BPX70 ساخت شرکت SGE استرالیا با طول ۱۲۰ متر، ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر استفاده شد. گاز حامل سیستم نیتروژن بود. دمای ستون، آشکارساز و محل تزریق به ترتیب ۱۹۸ (ایزوترمال)، ۳۰۰ و ۲۵۰ درجه سلسیوس بود. نسبت جداسازی و تفکیک مواد ۱:۱۰ بود [۲۵].

### ۲-۶-۵- تعیین قابلیت اکسید شدن روغن زیتون بکر

قابلیت اکسید شدن (OX) روغن زیتون بکر بر اساس ترکیب اسیدهای چرب غیراشباع و با استفاده از معادله ۳ محاسبه شد [۲۶].

معادله (۳):

$$OX = ((0.12 \times \%O) + (\%L) + 2 \times (\%Ln)) / 100$$

O: اولئیک اسید، L: لینولئیک اسید، Ln: لینولنیک اسید

به منظور ارزیابی بهتر توانایی مهارکنندگی اسانس از شاخص IC50 استفاده شد. این شاخص بیانگر غلظتی از نمونه است که قادر به مهارکردن ۵۰ درصد رادیکال آزاد اولیه می‌باشد.

### ۲-۵-۲- ارزیابی احیای یون مس

جهت اندازه‌گیری احیای یون مس، یک میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۱ مولار کلرید مس و یک میلی‌لیتر معرف مس (تئوکوپرین)  $10^{-3} \times 7/5$  مولار و یک میلی‌لیتر استات آمونیوم یک مولار را با یکدیگر مخلوط کرده و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره و ۰/۶ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل UV2100PC در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد نیز با استفاده از غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک (۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد [۲۲].

### ۲-۶-۲- روغن زیتون بکر

روغن زیتون بکر (محصول سال ۱۳۹۲) از کارخانه‌ی روغن نباتی گنجه‌ی رودبار خریداری شد. ویژگی‌های اولیه روغن زیتون بکر با اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن تعیین شد.

### ۲-۶-۱- ارزیابی رنگ روغن

جهت اندازه‌گیری رنگ نمونه‌ها با روش  $L^*a^*b^*$  نمونه‌های روغن را به مقدار مساوی در ظروف مسطح کوچک شیشه‌ای کاملاً مشابه از لحاظ جنس، قطر و ارتفاع ریخته و در محیط بسته‌ی سفید رنگ عکس‌برداری شدند [۲۳]. سپس پارامترهای رنگی نمونه (L\* (روشنایی)، a\* (قرمزی-سبزی) و b\* (زردی-آبی)) با استفاده از نرم افزار فتوشاپ CS5 اندازه‌گیری شدند. همچنین اختلاف رنگ نمونه‌های حاوی اسانس یا BHT با نمونه‌ی کنترل با استفاده از معادله ۲ به دست آمد.

معادله (۲):

$$\Delta E_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

### ۲-۶-۲- اندازه‌گیری ضریب شکست و وزن

#### مخصوص

جهت اندازه‌گیری ضریب شکست از استاندارد AOCS به شماره Cc 7-25 استفاده شد. وزن مخصوص با استفاده از

## ۲-۶-۶- اندازه گیری عدد یدی

عدد یدی با استفاده از اندازه گیری متیل استرهای اسیدهای چرب روغن زیتون بکر و بر اساس معادله ۴ تعیین شد [۲۷].  
معادله (۴):

$$\text{عدد یدی} = 0.93 \times C_1 + 1.35 \times C_2 + 2.62 \times C_3$$

$C_1$ : درصد اسیدهای چرب دارای یک پیوند دوگانه  $C_2$ : درصد اسیدهای چرب دارای دو پیوند دوگانه  $C_3$ : درصد اسیدهای چرب دارای سه پیوند دوگانه

## ۲-۶-۷- تعیین محتوای فنول کل

تعیین کمی فنول کل روغن زیتون بکر با استفاده از روش رنگ‌سنجی و بر اساس واکنش معرف فولین با گروه‌های هیدروکسی فعال موجود در ترکیبات فنولی انجام شد. برای استخراج ترکیبات فنولی، ۲/۵ گرم روغن زیتون بکر با ۲/۵ میلی لیتر هگزان رقیق شد. سپس یک میلی لیتر از محلول روغن در هگزان با ۳ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد ترکیب و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. این عمل سه مرتبه تکرار شد و در هر مرحله مایع رویی برداشته و حلال جدید به نمونه اضافه شد. در نهایت مایع فوقانی هر سه مرحله با هم مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و عصاره حاصل تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلسیوس و در محیط تاریک نگهداری شد جهت تعیین ترکیبات فنولی نمونه، ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده با ۷۵۰ میکرولیتر معرف فولین رقیق شده (۱۰ درصد آبی) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۷۵۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲ درصد وزنی/حجمی به مخلوط اضافه شد. بعد از یک ساعت جذب نمونه‌های حاصل در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد نیز با استفاده از غلظت‌های مختلف گالیک اسید (۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ میلی گرم در لیتر) به عنوان نمونه استاندارد تهیه و مقدار ترکیبات فنولی نمونه‌ها به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید به گرم نمونه تعیین شد [۲۸].

## ۲-۶-۸- اندازه‌گیری مقدار کلروفیل و کاروتنوئید

ابتدا ۷/۵ گرم روغن را در یک بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتری با سیکلو هگزان به حجم رساندیم. مقدار کلروفیل و کاروتنوئید با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۷۰ و ۴۷۰ نانومتر

اندازه‌گیری شدند. غلظت رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید برحسب میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب بر اساس معادله‌های ۵ و ۶ تعیین شدند [۲۹].

معادله (۵):

$$(A_{670} \times 10^4) / (D \times 113) = \text{کلروفیل (میلی گرم/کیلوگرم)}$$

معادله (۶):

$$(A_{470} \times 10^4) / (D \times 2000) = \text{کاروتنوئید (میلی گرم/کیلوگرم)}$$

$A_{670}$ : جذب در طول موج ۶۷۰ نانومتر

$D$ : دانسیته (گرم/لیتر)

$A_{470}$ : جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر

## ۲-۶-۹- بررسی شاخص‌های اکسیداسیون روغن

## زیتون بکر

جهت بررسی عدد پراکسید از استاندارد AOCS به شماره‌ی Cd 8-53 استفاده شد. عدد پارا-آنیزیدین براساس روش AOCS به شماره‌ی Cd 18-90 اندازه‌گیری شد [۲۴]. میزان کل اکسیداسیون از جمع عدد آنیزیدین به اضافه‌ی دو برابر عدد پراکسید به دست آمد [۱۲]. ضرایب خاموشی در طول موج‌های ۲۳۲ (K232) و ۲۶۸ (K268) نانومتر نیز بر اساس روش AOCS به شماره‌ی ch 5-91 اندازه‌گیری شدند [۲۴].

## ۲-۷- آماده سازی نمونه ها

جهت تعیین غلظت بهینه‌ی اسانس رزماری ارزیابی حسی انجام شد. به این منظور، سالاد ساده با استفاده از روغن زیتون بکر حاوی غلظت‌های مختلف اسانس رزماری (۵۰۰ و ۱۰۰۰) تهیه شد. ظاهر کلی، بو، طعم و پذیرش کلی نمونه‌های سالاد با روش هدونیک ۹ نقطه‌ای ( امتیاز ۱ = فوق العاده بد، ۵ = نه خوب نه بد، ۹ = بسیار عالی) و با استفاده از ۱۲ ارزیاب نیمه آموزش دیده (شامل ۶ نفر زن و ۶ نفر مرد از کارکنان و دانشجویان بخش علوم و صنایع غذایی دانشگاه شیراز) با نمونه کنترل (حاوی روغن زیتون بکر فاقد اسانس رزماری) مقایسه و نمونه بهینه انتخاب گردید. در ادامه، پایداری اکسیداسیون نمونه‌ی بهینه با روغن زیتون بکر حاوی ۱۰۰ppm BHT و نمونه‌ی کنترل (فاقد آنتی‌اکسیدان) به روش تسریع شده مقایسه شد.

میزان قدرت آنتی اکسیدانی (AOP) به صورت عددی بین ۰ تا ۱۰۰ بیان می‌شود. هرچه قدرت آنتی اکسیدانی بالاتر باشد، توانایی آنتی اکسیدان بیشتر می‌باشد. قدرت آنتی اکسیدانی با استفاده از معادله ۱۰ محاسبه شد [۳۳].

معادله (۱۰):

$$AOP = 100 - [(IP_s/IP_c) \times 100]$$

## ۲-۹- بررسی آماری داده ها

آزمون ها در حداقل سه تکرار انجام و سپس میانگین و انحراف معیار محاسبه گردید. به منظور تعیین اختلاف بین میانگین ها، پس از آنالیز واریانس از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 صورت پذیرفت.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- تعیین ترکیب اسانس

بیست و شش ترکیب اصلی اسانس رزماری توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی/طیف سنج جرمی شناسایی شدند. این ترکیبات در جدول ۱ گزارش شده‌اند. اسانس رزماری حاوی ۴۰/۴۳ درصد هیدروکربن‌های مونوترپنی، ۵۵/۹۵ درصد مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و ۳/۶۲ درصد سزکوئی‌ترین‌ها بود. مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده‌ی اسانس رزماری شامل ترکیبات مونوترپن‌های دو حلقه‌ای (آلفا- پینن (۱۷/۰۷٪)، بورنیل استات (۹/۴۲٪)، کامفن (۶/۶۷٪)، بورنئول (۶/۳۳٪)، مونوترپن‌های دو حلقه‌ای اپوکسی (۱۸- سینئول (۸/۸۱٪) و کتون‌های مونوترپن دو حلقه‌ای (کامفور (۹/۶۲٪) و وربنون (۷/۹۹٪)) بودند. سنتویو و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز گزارش کردند که آلفا- پینن، ۱۸- سینئول، کامفور، وربنون و بورنئول حدود ۸۰ درصد از کل ترکیبات اسانس رزماری را تشکیل می‌دهند [۳۴]. در نمونه مورد مطالعه در تحقیق حاضر، مجموع این ترکیبات حدود ۵۰ درصد است که می‌تواند متاثر از شرایط منطقه‌ای، آب و هوایی، فصلی، واریته و غیره باشد [۳۵].

## ۲-۸- بررسی پایداری اکسیداسیون روغن

### زیتون بکر با استفاده از آزمون AOM

آزمون AOM بر اساس روش AOCS به شماره ی Cd 12- 57 انجام شد. ۲۰ میلی لیتر از نمونه‌ی روغن را در لوله ریخته و لوله‌ی هواده‌ی را طوری به آن متصل کرده که انتهای لوله‌ی هواده‌ی ۵ سانتی‌متر پایین‌تر از سطح نمونه باشد. لوله حاوی نمونه به یک گرم‌کن که در دمای  $97/8 \pm 0/2$  درجه سلسیوس تنظیم شده بود، انتقال داده شد. هوا با جریان ثابت ۲/۳۳ میلی لیتر در ثانیه به درون نمونه‌ها دمیده شد. عدد پراکسید در بازه‌های زمانی مختلف اندازه‌گیری شد. زمان القاء بر اساس زمان رسیدن عدد پراکسید نمونه به ۱۰۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم روغن زیتون بکر اندازه‌گیری شد. طول این دوره‌ی زمانی به عنوان شاخص مقاومت در برابر تند شدن، در نظر گرفته شد [۲۴]. همچنین، پایداری اکسیداسیون بر حسب روز به ازای کیلوگرم روغن بر اساس معادله ۷ محاسبه شد [۳۰].

معادله (۷):

(گرم روغن  $\times 24$ ) / (۲۴  $\times 1000$ )  $\times$  زمان القاء = پایداری اکسیداسیون  
کارایی هر یک از آنتی اکسیدان‌ها بر اساس فاکتورحفاظت (PF) و مطابق معادله ۸ محاسبه شد [۳۱].

معادله (۸):

$$PF = IP_s / IP_c$$

$IP_s$ : زمان القاء نمونه حاوی آنتی اکسیدان

$IP_c$ : زمان القاء نمونه بدون آنتی اکسیدان

فعالیت آنتی اکسیدانی (AA) فاکتوری است که فعالیت را با در نظر گرفتن غلظت آنتی اکسیدان نشان می‌دهد. فعالیت آنتی اکسیدانی مطابق معادله ۹ محاسبه گردید [۳۲].

معادله (۹):

$$AA = (IP_s - IP_c) / [AH] IP_c$$

[AH]: غلظت آنتی اکسیدان

جدول ۱ ترکیبات شیمیایی اسانس رزماری حاصل از کروماتوگرافی گازی/طیف سنج جرمی

ردیف	نام ترکیب	زمان ماند	شاخص ماند	سطح زیر پیک (درصد)
۱	آلفا- پینن	۵/۷	۹۳۴	۱۷/۰۷
۲	کامفن	۶/۰	۹۴۷	۶/۶۷
۳	۲،۴(۱۰)- توجا دی ان	۶/۱	۹۵۱	۰/۹۱
۴	بتا- پینن	۶/۸	۹۷۵	۱/۶۴
۵	۳- اکتانن	۷/۰	۹۸۳	۲/۵۴
۶	میرسن	۷/۱	۹۸۹	۴/۱۳
۷	آلفا- ترپینن	۸/۰	۱۰۱۵	۰/۸۲
۸	پارا- سیمن	۸/۲	۱۰۲۲	۱/۴۱
۹	لیمونن	۸/۴	۱۰۲۸	۵/۳۶
۱۰	۱،۸- سینثول	۸/۵	۱۰۳۰	۸/۸۱
۱۱	گاما- ترپینن	۹/۴	۱۰۵۵	۱/۱۳
۱۲	ترپینولن	۱۰/۵	۱۰۸۶	۱/۲۹
۱۳	لینالول	۱۰/۹	۱۰۹۹	۲/۶۷
۱۴	کامفور	۱۲/۸	۱۱۴۳	۹/۶۲
۱۵	ترانس- پینوکامفن	۱۳/۳	۱۱۵۷	۰/۹۱
۱۶	پورنثول	۱۳/۶	۱۱۶۴	۶/۳۳
۱۷	سیس- پینوکامفن	۱۳/۹	۱۱۷۲	۱/۲۳
۱۸	ترپینن- ۴- ال	۱۴/۰	۱۱۷۵	۱/۲۳
۱۹	آلفا- ترپینثول	۱۴/۶	۱۱۸۹	۲/۰۵
۲۰	وربنون	۱۵/۴	۱۲۰۸	۷/۹۹
۲۱	نئو ایزو- دی هیدروکاروئول	۱۶/۵	۱۲۳۳	۱/۰۴
۲۲	ایزوبورنیل فرمات	۱۶/۷	۱۲۳۹	۱/۴۱
۲۳	بورنیل استات	۱۸/۶	۱۲۸۴	۹/۴۲
۲۴	نئو ایزو- دی هیدروکاروئول استات	۲۲/۱	۱۳۶۶	۰/۷۰
۲۵	(ای)- کاربوفیلن	۲۴/۱	۱۴۱۶	۲/۸۸
۲۶	آلفا- هومولن	۲۵/۵	۱۴۴۹	۰/۷۴

## ۳-۲- تعیین خصوصیات آنتی اکسیدانی

## اسانس

## ۳-۲-۱- اندازه گیری خاصیت مهار کنندگی رادیکال

## آزاد

مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط اسانس رزماری در جدول ۲ نشان داده شده است. اسانس رزماری به ویژه در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم/ میلی لیتر جذب محلول DPPH را به شکل قابل توجهی کاهش داد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط اسانس رزماری در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم/ میلی لیتر به ترتیب  $48 \pm 1/48$  و  $71/84 \pm 1/21$  درصد بود. مقدار  $IC_{50}$  برای اسانس رزماری  $3/67 \pm 0/33$  میلی‌گرم/ میلی لیتر بود. بوزین و همکاران در سال ۲۰۰۷

در آزمون مهارکنندگی رادیکال آزاد، توانایی اسانس برای دادن اتم‌های هیدروژن یا الکترون به رادیکال آزاد DPPH مورد بررسی قرار می‌گیرد [۱۱]. نتایج مربوط به توانایی

یا مساوی ۲). عدد پراکسید (شاخص محصولات اولیهی اکسیداسیون)،  $K_{232}$  (شاخص ترکیبات دارای دو باند دوگانهی مزدوج) و  $K_{268}$  (شاخص محصولات اولیه و ثانویه اکسیداسیون شامل ترکیبات دارای سه باند دوگانهی مزدوج و آلدئیدها و کتونهای غیراشباع) نیز کمتر از حد مجاز تعیین شده توسط استاندارد ملی ایران (۲۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم روغن برای عدد پراکسید،  $2/6$  برای  $K_{232}$  و  $0/25$  برای  $K_{268}$ ) بود [۳۶]. بنابراین، روغن زیتون مورد استفاده از نوع بکر بوده و سطح اکسیداسیون اولیهی پایینی داشت. عدد یدی شاخصی از میانگین مقدار غیراشباعیت روغن‌ها و چربی‌ها می‌باشد. یکی از مهمترین پارامترهایی که بر اکسیداسیون لیپیدها اثر می‌گذارد، درجهی غیراشباعیت اسیدهای چرب می‌باشد. عدد یدی روغن ذرت و سویا به ترتیب در محدودهی ۱۲۸-۱۰۳ و ۱۴۳-۱۲۰ می‌باشد [۳۷]. مقدار عدد یدی روغن زیتون بکر  $82/58 \pm 2/11$  بود. بنابراین، روغن زیتون بکر نسبت به روغن‌های حاوی مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع عدد یدی کمتری داشته و پایدارتر می‌باشد.

روغن زیتون بکر حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی بوده که به عنوان آنتی‌اکسیدان اولیه، از اکسیداسیون روغن زیتون جلوگیری می‌کنند. همچنین، روغن زیتون بکر حاوی مقادیر کمی کلروفیل و کاروتنوئید بود. علاوه بر ترکیبات فنولی، کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها نیز در پایداری اکسیداسیون روغن زیتون نقش مهمی دارند. رنگدانه‌های کلروفیلی روغن زیتون در نور به عنوان پراکسیدان و در تاریکی به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند. میزان رنگدانه‌ها در روغن زیتون به عواملی مانند واریته میوه زیتون، میزان رسیدگی میوه زیتون، شرایط آب و هوایی منطقه، نوع فرآیند استخراج روغن و شرایط انبارداری وابسته است. میزان کلروفیل واریته‌های اسپانیایی و یونانی روغن زیتون در محدودهی

$6/9 - 1/9$  و میزان کاروتنوئید آن‌ها در محدودهی  $2/9 - 1/0$  میلی‌گرم/کیلوگرم می‌باشد [۳۸]. میزان کلروفیل و کاروتنوئید روغن زیتون بکر مورد استفاده نیز در همین محدوده قرار دارد.

گزارش کردند که ترکیبات اصلی مسئول مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در اسانس رزماری و مریم‌گلی، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار (آلفا و بتا- توجن، بورنیل استات و کامفور) و مخلوط هیدروکربن‌های مونوترپنی و سزکوئی‌ترپنی می‌باشند [۱۱].

جدول ۲ توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH اسانس رزماری

غلظت اسانس رزماری (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	درصد بازدارندگی
۱۰	$76/84 \pm 1/21^{a*}$
۱	$48/22 \pm 1/49^b$
۰/۱	$32/63 \pm 1/48^c$
۰/۰۱	$26/68 \pm 0/67^d$

\*حروف یکسان در یک ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. اعداد میانگین سه تکرار بوده که به صورت میانگین  $\pm$  انحراف از استاندارد، گزارش شده‌اند.

### ۳-۲-۲- ارزیابی احیای یون مس

قدرت احیاکنندگی یک ترکیب شاخص مهمی جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن ترکیب می‌باشد. روش احیای یون مس قادر به سنجش قدرت آنتی‌اکسیدان‌های آب‌دوست و چربی‌دوست می‌باشد [۲۲]. توانایی احیاکنندگی اسانس رزماری  $449/89 \pm 2/67$  میلی‌گرم معادل اسیدآسکوربیک به ازای هر گرم نمونه بود. بنابراین، اسانس رزماری حاوی ترکیبات احیاکنندهی نسبتاً خوبی بوده که می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و واکنش‌های زنجیره‌ای را خاتمه دهند.

### ۳-۳- تعیین ویژگی‌های اولیهی روغن زیتون

#### بکر

ویژگی‌های اولیهی روغن زیتون بکر مورد استفاده در جدول ۳ نشان داده شده است. مقدار اسیدهای چرب آزاد روغن (برحسب درصد وزنی اسیداولئیک) در ابتدای آزمایش (ساعت صفر)  $1/71$  بود که کمتر از حد مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران برای روغن زیتون بکر می‌باشد (اسیدیته آزاد کمتر



جدول ۳ ویژگی های اولیه روغن زیتون بکر

ویژگی	مقدار
اسید چرب آزاد (بر حسب درصد وزنی اسید اولئیک)	۱/۷۱±۰/۲۲*
عدد پراکسید (میلی اکی والان اکسیژن/ کیلوگرم روغن)	۱/۵۳±۰/۱۰
عدد پارا-آنیزیدین	۳/۶۲±۰/۱۲
عدد توتوکس	۶/۶۸±۰/۳۷
**K <sub>232</sub>	۱/۸۴ ± ۰/۴۸
***K <sub>268</sub>	۰/۱۸ ± ۰/۰۶
عدد یدی	۸۲/۵۸ ± ۲/۱۱
کلروفیل (میلی گرم/ کیلوگرم)	۴/۷۰ ± ۰/۰۷
کاروتنوئید (میلی گرم/ کیلوگرم)	۲/۰۵ ± ۰/۰۶
فنول (میکروگرم معادل گالیک اسید/ گرم روغن)	۲۹۴/۵۰ ± ۱/۱۳
وزن مخصوص	۰/۹۰۹ ± ۰/۰۰۱
ضریب شکست	۱/۴۷۴ ± ۰/۰۰۳

\* اعداد میانگین سه تکرار بوده که به صورت میانگین ± انحراف از استاندارد، گزارش شده اند.

\*\* شاخص ترکیبات دارای دو باند دوگانه‌ی مزدوج

\*\*\* شاخص ترکیبات دارای سه باند دوگانه‌ی مزدوج، آلدئیدها و کتون‌های غیراشباع

بالایی از اسیدهای چرب چند غیراشباع مانند لینولئیک و آلفا-لینولئیک اسید مانند روغن سویا، پایداری اکسیداسیون بالاتری دارد.

جدول ۴ ترکیب اسیدهای چرب روغن زیتون بکر

اسید چرب	مقدار (درصد)
اسید چرب	±۰/۳۵*
پالمیتیک اسید	۱۴/۰۵
پالمیتولئیک اسید	۰/۸۷ ± ۰/۰۴
استئاریک اسید	۳/۴۱ ± ۰/۴۱
اولئیک اسید	۶۹/۵۸ ± ۰/۷۴
لینولئیک اسید	۱۱/۱۲ ± ۰/۵۴
آلفا-لینولئیک اسید	۰/۹۷ ± ۰/۰۳
اسیدهای چرب اشباع	۱۷/۴۶ ± ۰/۰۶
اسیدهای چرب غیراشباع	۸۲/۵۴ ± ۰/۲۳
اسیدهای چرب تک غیراشباع	۷۰/۴۵ ± ۰/۳۵
اسیدهای چرب چند غیراشباع	۱۲/۰۹ ± ۰/۰۱
اسیدهای چرب تک غیراشباع/ اسیدهای چرب چند غیراشباع	۵/۸۳ ± ۰/۳۰
قابلیت اکسید شدن	۰/۱۴ ± ۰/۰۵

\* اعداد میانگین سه تکرار بوده که به صورت میانگین ± انحراف از استاندارد، گزارش شده اند.

ترکیب اسیدهای چرب روغن زیتون بکر در جدول ۴ گزارش شده است. این روغن حاوی درصد بالایی از اسیدهای چرب تک غیراشباع و مقادیر کمی اسیدهای چرب چند غیراشباع (لینولئیک و آلفا-لینولئیک اسید) بود. آهنگر بنادکوکوی و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که بین دمای هوا و ترکیب برخی اسیدهای چرب روغن زیتون ارتباط نزدیکی وجود داشته است. اگر چه دمای بیشتر موجب افزایش اسید لینولئیک می شود، اما میزان اسید اولئیک کاهش می یابد [۳۹]. مقدار اسید اولئیک روغن زیتون بکر مورد استفاده ۶۹/۵۸ درصد بود. در مطالعه‌ی آهنگر بنادکوکوی و همکاران میزان اسید اولئیک روغن زیتون شهر شیراز و استان زنجان به ترتیب ۶۱/۲۸ و ۷۲/۵۸ درصد گزارش گردید [۳۹]. اسیدهای چرب تک غیراشباع روغن زیتون بکر ۵/۸۳ برابر بیشتر از اسیدهای چرب چند غیراشباع آن بود. سرعت نسبی اکسیداسیون خود به خودی لینولئیک و آلفا-لینولئیک اسید به ترتیب ۵۰-۴۰ و ۱۰۰ برابر اولئیک اسید می باشد. میزان قابلیت اکسید شدن روغن زیتون بکر ۰/۱۴ بود. قابلیت اکسید شدن واریته‌های مختلف روغن دانه سویا در محدوده‌ی ۰/۵۴-۰/۸۱ می باشد. قابلیت اکسید شدن وابسته به مقدار اسیدهای چرب غیراشباع روغن و تعداد باندهای دوگانه می باشد [۲۶]. بنابراین، روغن زیتون بکر نسبت به سایر روغن‌های گیاهی حاوی مقادیر

## ۳-۴- ارزیابی حسی

و ۱۰۰۰ppm اسانس رزماری با نمونه‌ی کنترل دیده نشد. امتیاز پذیرش کلی تمام نمونه‌های روغن زیتون بکر بیشتر از کمترین حد قابل پذیرش (۵) بود. اگرچه نمونه‌ی کنترل به شکل جزئی پذیرش کلی بهتری نسبت به نمونه‌های حاوی اسانس داشت، اما تفاوت معنی داری در پذیرش کلی نمونه‌های حاوی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ppm اسانس مشاهده نگردید ( $p < 0.05$ ). بنابراین، از غلظت ۱۰۰۰ppm اسانس رزماری برای آزمون پایداری به روش تسریع شده استفاده شد.

ارزیابی حسی روغن زیتون بکر حاوی اسانس رزماری جهت وارد کردن این محصول به بازار از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. قابلیت پذیرش این محصول می‌تواند با ارزیابی عواملی مانند رنگ، طعم و پذیرش کلی مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج مربوط به ارزیابی حسی نمونه‌های روغن زیتون بکر در جدول ۵ نشان داده شده است. اختلاف آماری معنی داری در ظاهر کلی، بو و طعم نمونه‌های سالاد حاوی ۵۰۰

جدول ۵ ارزیابی حسی نمونه‌های روغن زیتون بکر

ویژگی	نمونه		
	کنترل	اسانس رزماری (۵۰۰ppm)	اسانس رزماری (۱۰۰۰ppm)
ظاهر کلی	۷/۶۰±۰/۵۵ <sup>a*</sup>	۷/۴۰±۰/۵۵ <sup>a</sup>	۷/۲۰±۱/۳۰ <sup>a</sup>
بو	۶/۰۰±۰/۷۰ <sup>a</sup>	۶/۲۰±۰/۸۳ <sup>a</sup>	۵/۶۰±۱/۳۴ <sup>a</sup>
طعم	۵/۲۰±۱/۴۸ <sup>a</sup>	۵/۶۰±۰/۹۰ <sup>a</sup>	۶/۸۰±۱/۳۰ <sup>a</sup>
پذیرش کلی	۶/۲۵±۰/۶۲ <sup>a</sup>	۵/۸۳±۰/۷۲ <sup>ab</sup>	۵/۵۸±۰/۹۰ <sup>b</sup>

\*حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال ۰.۰۵ می‌باشند. اعداد میانگین سه تکرار بوده که به صورت میانگین ± انحراف از استاندارد، گزارش شده‌اند.

## ۳-۵- بررسی رنگ نمونه‌های روغن زیتون

## بکر

حاوی BHT یا اسانس رزماری با نمونه‌ی کنترل از نظر آماری اختلاف معنی داری دیده نشد. ناچیز بودن فاکتور اختلاف رنگ ( $\Delta E_{ab}$ ) نیز تایید کننده‌ی این مطلب بود که اختلاف رنگی میان نمونه‌های حاوی اسانس رزماری یا BHT با نمونه‌ی کنترل وجود ندارد.

نتایج مربوط به رنگ روغن بر اساس آزمون  $L^* a^* b^*$  در جدول ۶ گزارش شده است. افزودن اسانس رزماری اثر معنی داری روی  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  روغن زیتون بکر نداشت. بین نمونه‌های

جدول ۶ اثر افزودن اسانس بر رنگ روغن زیتون بکر

شاخص رنگ	نمونه		
	کنترل	BHT (۱۰۰ppm)	اسانس رزماری (۱۰۰۰ppm)
$L^*$	۵۸/۰۰±۱/۰۰ <sup>a*</sup>	۵۷/۰۰±۱/۰۰ <sup>a</sup>	۵۶/۶۷±۱/۲۳ <sup>a</sup>
$a^*$	-۶/۰۰±۱/۰۰ <sup>a</sup>	-۵/۳۳±۰/۵۸ <sup>a</sup>	-۵/۶۷±۰/۵۸ <sup>a</sup>
$b^*$	۵۳/۳۳±۰/۵۸ <sup>a</sup>	-۵/۶۷±۰/۵۸ <sup>a</sup>	۵۳/۰۰±۱/۰۰ <sup>a</sup>
$\Delta E_{ab}$	-	۱/۵۵±۰/۶۳ <sup>a</sup>	۱/۵۵±۰/۶۳ <sup>a</sup>

\*حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال ۰.۰۵ می‌باشند. اعداد میانگین سه تکرار بوده که به صورت میانگین ± انحراف از استاندارد، گزارش شده‌اند.

## ۳-۶- بررسی پایداری اکسیداسیون روغن

## زیتون بکر در شرایط تسریع شده

۳-۶-۱- اندازه گیری عدد پراکسید و زمان القاء نمونه

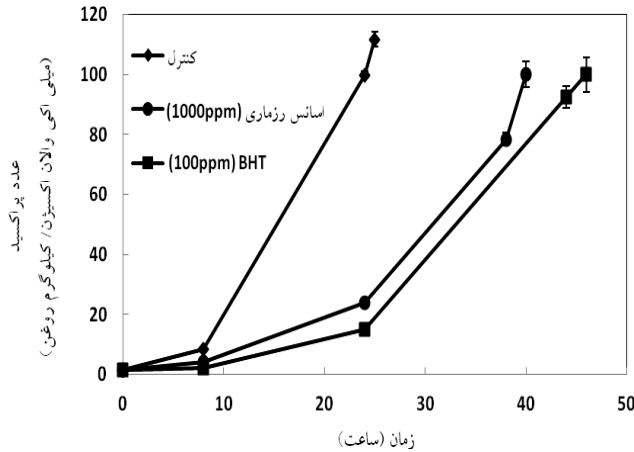
## های روغن زیتون بکر

از آنجایی که روغن زیتون بکر در شرایط معمول نگهداری تا یک سال پایدار می‌باشد، جهت تعیین پایداری آن در مدت زمانی کوتاه (تسریع شده)، فرآیند اکسیداسیون با افزایش دما و تزریق اکسیژن به درون محصول، بررسی شد. نتایج تغییرات عدد پراکسید در طول حرارت دهی در دمای  $97/8 \pm 0/2$  درجه سلسیوس و هوادهی با جریان ثابت  $2/33$  میلی‌لیتر در ثانیه در شکل ۱ نشان داده شده است. عدد پراکسید نمونهی کنترل نسبت به نمونهی حاوی اسانس رزماری با سرعت بیشتری افزایش یافت. بعد از ۲۴ ساعت حرارت دهی، عدد پراکسید نمونهی کنترل و اسانس رزماری به ترتیب  $99/88 \pm 1/24$  و  $42/00 \pm 24/00$  میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم روغن بودند. آيادی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. آن‌ها گزارش کردند که عدد پراکسید نمونه‌های روغن زیتون فوق بکر حاوی رزماری و آویشن طی ۶۶ روز نگهداری در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به شکل معنی‌داری کمتر از نمونهی کنترل بود [۴۰].

کامفور، بورنیل استات، ۱۸- سینتول، وربنون و بورنتول از ترکیبات اصلی تشکیل دهندهی اسانس رزماری می‌باشند. روبرتو و باراتا در سال ۲۰۰۰ گزارش کردند که ۱۸- سینتول، بورنیل استات و وربنون در جلوگیری از اکسیداسیون لیپید نسبت به کامفور و بورنتول عملکرد موثرتری دارند [۸]. بنابراین، توانایی توقف مراحل ابتدایی و پیشرفت واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون توسط اسانس رزماری عمدتاً به دلیل وجود این ترکیبات می‌باشد.

BHT در به تاخیر انداختن تشکیل محصولات اولیهی اکسیداسیون نسبت به اسانس رزماری، به شکل جزئی موثرتر عمل کرده است. بعد از ۲۴ ساعت حرارت دهی عدد پراکسید روغن زیتون بکر حاوی اسانس رزماری و BHT به ترتیب  $24/00 \pm 0/42$  و  $15/00 \pm 0/42$  میلی‌اکی‌والان اکسیژن در هر کیلوگرم روغن بود. آزکان و ارسلان در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که نمونه‌های روغن فندق حاوی اسانس میخک، دارچین و رزماری در سطح ۰/۵۰ و ۰/۲۵ درصد در به تاخیر

انداختن تشکیل محصولات اولیهی اکسیداسیون نسبت به نمونهی کنترل به شکل موثرتری عمل می‌کنند. البته، عملکرد اسانس‌ها در مقایسه با ۰/۰۲ درصد BHA ضعیف تر بود [۴۱].



شکل ۱ تغییرات عدد پراکسید روغن زیتون بکر طی حرارت دهی در شرایط تسریع شده.

نتایج مربوط به زمان القاء نمونه‌های روغن زیتون بکر در جدول ۷ گزارش شده است. مدت زمان لازم برای رسیدن عدد پراکسید نمونه به ۱۰۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم روغن به عنوان پایان دورهی القاء در نظر گرفته شده است. دورهی القاء نمونهی کنترل  $24/01 \pm 0/11$  ساعت و نمونه حاوی اسانس رزماری  $40/01 \pm 1/35$  ساعت می‌باشد. بنابراین، اسانس رزماری به طور قابل توجهی باعث افزایش زمان القاء روغن زیتون بکر نسبت به نمونهی کنترل می‌گردد.

عدد پراکسید نمونهی حاوی اسانس رزماری در مدت زمان کوتاه‌تری نسبت به نمونهی حاوی BHT به ۱۰۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن/کیلوگرم روغن رسیده است. زمان القاء نمونه‌های حاوی اسانس رزماری و BHT به ترتیب  $40/01 \pm 1/35$  و  $44/44 \pm 0/23$  ساعت بود. یاگسی و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که زمان القاء روغن ذرت و پالم در حضور گیاه زوفا و BHT به طور قابل توجهی افزایش یافت. البته، BHT در افزایش پایداری اکسیداسیون روغن پالم و ذرت نسبت به گیاه زوفا موثرتر عمل کرده بود [۴۲].

نتایج مربوط به پایداری اکسیداسیون نمونه‌های روغن زیتون بکر بر حسب روز/کیلوگرم روغن در جدول ۷ گزارش شده است. پایداری اکسیداسیون نمونهی کنترل  $0/59 \pm 0/24$

رزماری و BHT به شکل معنی‌داری نسبت به نمونه‌ی کنترل قادر به افزایش زمان ماندگاری روغن زیتون بکر می‌باشند.

۵۵ روز/کیلوگرم روغن بود در صورتی که پایداری اکسیداسیون اسانس رزماری و BHT به ترتیب  $92/63 \pm 3/12$  و  $102/88 \pm 0/54$  روز/کیلوگرم روغن بود. بنابراین، اسانس

جدول ۷ پایداری اکسیداسیون نمونه های روغن زیتون بکر

نمونه			شاخص اکسیداسیون
رزماری (۱۰۰۰ppm)	BHT (۱۰۰ppm)	کنترل	
$40/01 \pm 1/35^b$	$44/44 \pm 0/23^a$	$24/01 \pm 0/11^{c*}$	زمان القاء (ساعت)
$92/63 \pm 3/12^b$	$102/88 \pm 0/54^a$	$55/59 \pm 0/24^c$	شاخص پایداری اکسیداسیون (روز/کیلوگرم روغن)
$1/67 \pm 0/05^b$	$1/85 \pm 0/01^a$	$1/00 \pm 0/00^c$	فاکتور حفاظت
$6/67 \pm 0/49^b$	$85/07 \pm 0/16^a$	-	فعالیت آنتی اکسیدانی
$39/96 \pm 1/76^a$	$45/96 \pm 0/05^a$	-	قدرت آنتی اکسیدانی

\*حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال ۵٪ می باشند. اعداد میانگین سه تکرار بوده که به صورت میانگین  $\pm$  انحراف از استاندارد، گزارش شده اند.

آنتی اکسیدانی اسانس رزماری به طور قابل توجهی کمتر از BHT می‌باشد زیرا اسانس رزماری تنها در غلظت‌های بالا می‌تواند اکسیداسیون روغن زیتون بکر را نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به تاخیر بیندازد. البته، از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به دلیل نداشتن اثرات نامطلوب بر مصرف‌کننده می‌توان در غلظت‌های بالاتر استفاده کرد تا میزان اثرگذاری آنتی اکسیدان افزایش یابد.

میزان قدرت آنتی اکسیدانی BHT و اسانس رزماری به ترتیب  $45/96$  و  $39/96$  بود. میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ی اسانس رزماری به شکل جزئی کمتر از نمونه‌ی BHT بود. در نتیجه از اسانس رزماری می‌توان جهت افزایش پایداری اکسیداسیون روغن زیتون بکر بدون ایجاد تغییر نامطلوب در طعم استفاده کرد. هاشمی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که در روغن آفتابگردان فاکتور حفاظت و قدرت آنتی اکسیدانی  $0/05$  درصد اسانس زنیان مشابه  $0/02$  درصد BHT بود [۱۷].

#### ۴- نتیجه گیری کلی

نگرانی رو به رشد در رابطه با اثرات نامطلوب آنتی اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت انسان‌ها منجر به افزایش تمایل نسبت به جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، موثر و مقرون به صرفه گردیده است. در این مطالعه اثر اسانس رزماری بر بهبود

#### ۳-۶-۲- تعیین عوامل اکسیداسیون نمونه های روغن زیتون بکر

ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدان‌ها بر زمان القاء معمولاً به صورت فاکتور حفاظت بیان می‌شود [۳۱]. نتایج مربوط به فاکتور حفاظت نمونه‌های روغن زیتون بکر در جدول ۷ گزارش شده است. اسانس رزماری  $1/67$  برابر نمونه‌ی کنترل تغییرات اکسیداسیون را در روغن زیتون بکر به تاخیر انداخته است. بنابراین، اسانس رزماری نسبت به نمونه‌ی کنترل در کاهش سرعت اکسیداسیون روغن زیتون بکر عملکرد موثرتری داشته است. زمان القاء BHT،  $1/85$  برابر نمونه‌ی کنترل بود. بنابراین، اثر BHT در کاهش سرعت اکسیداسیون روغن زیتون بکر به طور جزئی بیشتر از اسانس رزماری بود

فعالیت آنتی‌اکسیدانی تابعی از غلظت آنتی‌اکسیدان می‌باشد. در صورتی که زمان القاء نمونه‌ی کنترل با نمونه‌ی حاوی آنتی‌اکسیدان برابر باشد، مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدان صفر بوده و با افزایش زمان القاء، این شاخص افزایش می‌یابد. همچنین، در صورتی که فعالیت آنتی اکسیدان مستقیماً متناسب با غلظت آن باشد، با افزایش غلظت آنتی‌اکسیدان، مقدار این شاخص ثابت می‌ماند. علاوه بر این، در صورتی که فعالیت پراکسیدانی وجود داشته باشد مقدار این شاخص منفی می‌شود. این تعریف از فعالیت آنتی اکسیدانی، بیشتر مفهوم میزان تاثیرگذاری را در برمی‌گیرد [۳۲]. مقادیر مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس رزماری و BHT در جدول ۷ نشان داده شده است. فعالیت

- (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(1): 63-68.
- [10] El-Rajoub, A.O., Massadeh, A.M., & Omari, M.N. (2008). Evaluation of Pb, Cu, Zn, Cd, Ni and Fe levels in *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) medicinal plant and soils in selected zones in Jordan. *Environment Monitor Assessment*, 140: 61-68.
- [11] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., & Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19): 7879-7885
- [12] Frankel, E. N. (2012). Lipid oxidation, 2<sup>nd</sup> ed, Cambridge, UK, Woodhead Publishing Limited. pp: 107,165, 168.
- [13] Cañizares-Macias, M. P., Garcia-Mesa, J. A., & De Castro, M. L. (2004). Determination of the oxidative stability of olive oil, using focused-microwave energy to accelerate the oxidation process. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(2): 479-483.
- [14] Jafarian, P., Narmela, A., Azadmard-Damirchi, S., Emami, S.H. (2013). Effect of rosemary, oregano and mint powders on oxidative stability and fatty acid profile of olive oil. *Journal of Food Science & Technology*, 10(39): 85- 92.
- [15] Erkan, N., Ayranci, G., & Ayranci, E. (2012). Lipid oxidation inhibiting capacities of blackseed essential oil and rosemary extract. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(2): 175-184.
- [16] Asensio, C. M., Nepote, V., & Grosso, N. R. (2011). Chemical stability of extra virgin olive oil added with oregano essential oil. *Journal of Food Science*, 76(7): S445-S450.
- [17] Hashemi, M. B., Niakousari, M., Saharkhiz, M. J., & Eskandari, M. H. (2014). Stabilization of sunflower oil with *Carum copticum* Benth & Hook essential oil. *Journal of Food Science and Technology*, 51(1): 142-147.
- [18] AACC. (1983). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 8<sup>th</sup> ed, Salem, MA, Library of Congress.
- پایداری اکسیداسیون روغن زیتون بکر به شکل تسریع شده بررسی شده است. اسانس رزماری به شکل معنی‌داری منجر به افزایش پایداری اکسیداسیون روغن زیتون بکر نسبت به نمونه‌ی کنترل شد. اگرچه آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در کاهش سرعت اکسیداسیون روغن زیتون بکر به شکل جزئی موثرتر از اسانس رزماری عمل کرده بود، اما با در نظر گرفتن این نکته که افزودن آنتی‌اکسیدان سنتزی به روغن‌های بکر مجاز نمی‌باشد، می‌توان از اسانس رزماری به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در دسترس جهت افزایش پایداری روغن زیتون بکر استفاده کرد.

## ۵- منابع

- [1] Gunstone, F. D. (1999). What else besides commodity oils and fats?. *Lipid/ Fett*, 101(4): 124-130.
- [2] FAO. (2012). FAOSTAT crops processed data for olives and olive oil. Rome, Italy. [Online]. <<http://faostat3.fao.org>>. [Accessed 31 Jan 2015].
- [3] Casal, S., Malheiro, R., Sendas, A., Oliveira, B. P. P., & Pereira, J. A. (2010). Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (10): 2972-2979.
- [4] Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M. (2006). Olive Oil Composition. In: Boskou, D (ed.). Olive oil: chemistry and technology, 2nd ed, Champaign, Illinois, AOCS press. pp 41.
- [5] Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 661-676.
- [6] Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 66(2): 209-215.
- [7] Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 32(1): 67-103.
- [8] Ruberto, G., & Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69(2):167-174.
- [9] Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y. J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C. J., Zu, Y. G., & Liu, X. L.

- [29] Mínguez-Mosquera, M. I., Gandul-Rojas, B., Garrido-Fernandez, J., & Gallardo-Guerrero, L. (1990). Pigments present in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(3): 192-196.
- [30] Tura, D., Gigliotti, C., Pedo, S., Failla, O., Bassi, D., & Serraiocco, A. (2007). Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europea* L.) and correlations with oxidative stability. *Scientia Horticulturae*, 112(1): 108-119.
- [31] Yanishlieva, N. V., & Marinova, E. M. (1996). Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 203(3): 220-223.
- [32] Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1): 183-198.
- [33] Silva, F. A., Borges, F., & Ferreira, M. A. (2001). Effects of phenolic propyl esters on the oxidative stability of refined sunflower oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8): 3936-3941.
- [34] Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, 68(4): 790-795.
- [35] Daferera, D. J., Ziozas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6): 2576-2581.
- [36] Iranian National Standard 1446. (2011). Olive oil- Specifications and test methods. 3<sup>rd</sup> revision.
- [37] Knothe, G. (2002). Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value?. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(9): 847-854.
- [38] Allalout, A., Krichène, D., Methenni, K., Taamalli, A., Oueslati, I., Daoud, D., & Zarrouk, M. (2009). Characterization of virgin olive oil from super intensive Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia. *Scientia Horticulturae*, 120(1): 77-83.
- [19] British pharmacopoeia (1998). 1988 British pharmacopoeia, London, HMSO. pp137- 138.
- [20] Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4<sup>th</sup> ed, Carol Stream, Illinois, Allured publishing corporation. pp 456.
- [21] Ozen, T., Demirtas, I., & Aksit, H. (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chemistry*, 124(1):58-64.
- [22] Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7): 1496-1547.
- [23] Afshari-Jouybari, H., & Farahnaky, A. (2011). Evaluation of Photoshop software potential for food colorimetry. *Journal of Food Engineering*, 106(2): 170-175.
- [24] AOCS. (2006). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 5<sup>th</sup> ed, Champaign, Illinois, AOCS Press.
- [25] Golmakani, M. T., Mendiola, J. A., Rezaei, K., & Ibáñez, E. (2012). Expanded ethanol with CO<sub>2</sub> and pressurized ethyl lactate to obtain fractions enriched in  $\gamma$ -Linolenic Acid from *Arthrospira platensis* (Spirulina). *The Journal of Supercritical Fluids*, 62: 109-115.
- [26] Neff, W. E., Selke, E., Mounts, T. L., Rinsch, W., Frankel, E. N., & Zeitoun, M. A. M. (1992). Effect of triacylglycerol composition and structures on oxidative stability of oils from selected soybean germplasm. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(2): 111-118.
- [27] Kyriakidis, N. B., & Katsiloulis, T. (2000). Calculation of iodine value from measurements of fatty acid methyl esters of some oils: comparison with the relevant American oil chemists society method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(12): 1235-1238.
- [28] Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., & Parenti, A. (2000). Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry*, 71(4): 553-562.

- [41] Özcan, M. M., & Arslan, D. (2011). Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chemistry*, 129(1): 171-174.
- [42] Yagcı, S., Yagcı, E., & Gogus, F. (2012). Antioxidative effect of *Thymbra spicata* on oxidative stability of palm and corn oils. *International Journal of Food Properties*, 15(3): 656-664.
- [39] Ahangar Benadkoki, S., Peyravy Vank, Z., Hadad Khodaparast, M.H., Hasani Baferani, A., Safafar, H. (2013). Comparison of fatty acid composition of olive oil in different parts of Iran. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 5(2): 39-49.
- [40] Ayadi, M. A., Grati-Kamoun, N., & Attia, H. (2009). Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10): 2613-2619.

Archive of SID

## Investigation the oxidative stability of virgin olive oil by using rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil

Keramat, M. <sup>1</sup>, Golmakani, M. T. <sup>2\*</sup>, Aminlari, M. <sup>3</sup>, Alavi, N. <sup>1</sup>, Nowroozi, M. <sup>4</sup>, Shekarforoush, Sh. <sup>5</sup>

1. MSc student of Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University
2. PhD, Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University
3. PhD, Professor of Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University
4. M.Sc, Lecturer, Islamic Azad University of Marvdasht
5. PhD, Professor of Department of Hygiene and Food Quality Control, School of Veterinary Medicine, Shiraz University

(Received: 93/11/12 Accepted: 94/1/31)

synthetic antioxidants has led to an increased interest in exploration of effective and economical natural antioxidants. The objective of this study was to evaluate the effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil (REO) on oxidative stability of virgin olive oil under accelerated conditions. The REO composition was analyzed by gas chromatography/mass spectrometry. REO and BHT were added to virgin olive oil at 1000 and 100ppm, respectively and their oxidative stability was investigated by using active oxygen method (AOM). Gas chromatography/mass spectrometry analyses of the REO revealed that  $\alpha$ -pinene (17.07%), camphor (9.62%), and bornyl acetate (9.42%) were the major components of REO. REO was significantly effective on oxidation retarding of virgin olive oil. Effect of REO on delaying hydroperoxides formation of virgin olive oil was similar to that of BHT. REO significantly increased induction period, protection factor, and antioxidant power of virgin olive oil. The induction period, protection factor, and antioxidant power of virgin olive oil containing REO (40.01±1.35 h, 1.67±0.05, and 39.96±1.76, respectively) was similar to those of sample containing BHT (44.44± 0.23 h, 1.85±0.01, and 45.96±0.05, respectively). Generally, REO is a good natural antioxidant for extending the shelf-life of virgin olive oil.

**Keywords:** Accelerated condition, Essential oil, Oxidative stability, *Rosmarinus officinalis*, Virgin olive oil

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: golmakani@shirazu.ac.ir