



## بهبود تولید ترکیبات فنولی و خاصیت مهارکنندگی رادیکال عصاره زرشک از راه پیش تخمیر حالت جامد

الهام رخش<sup>۱</sup>، سیدهادی رضوی<sup>۲\*</sup>، محمدتقی گلمکانی<sup>۳</sup>، زینب السادات ابراهیم زاده موسوی<sup>۴</sup>

۱. دانشجو کارشناسی ارشد، زیست فناوری مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

۲. استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

۳. دانشیار، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۴. استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۱، تاریخ بازنگری: ۹۶/۲/۹، تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲۳)

### چکیده

با تخمیر میوه زرشک توسط کپک ریزوپوس الیگوسپوروس به مدت ۱۰ روز، مقدار فنول کل در عصاره آبی گرفته شده از آن بیش از ۴ برابر افزایش پیدا کرد. هم‌چنین تخمیر توان مهارکنندگی رادیکال آزاد نیز زیاد شد. مقدار آنتوسیانین مونومری عصاره که در اثر حرارت دهی برای استریل کردن زرشک کاهش یافته بود، در اثر تخمیر با کپک افزایش پیدا کرد. عصاره به‌دست آمده از زرشک تخمیرشده دارای pH و اسیدیته بیش‌تر نسبت به عصاره تهیه شده از زرشک تخمیرنشده بود. افزایش pH به تجزیه اسیدهای آلی عصاره در اثر استریل کردن و به دنبال آن خروج محصولات فرار ناشی از تجزیه، هم‌چنین افزایش تعداد گروه‌های آمینی در اثر تخمیر و تولید آنزیم‌های برون سلولی توسط کپک ریزوپوس الیگوسپوروس نسبت داده شد؛ ولی افزایش اسیدیته با حرارت دهی برای استریل کردن ارتباطی نداشت و فقط به تولید اسیدهای فنولیک توسط کپک مربوط دانسته شد. افزون بر این، درحالی‌که حرارت دهی زرشک برای استریل کردن تاثیری روی مقدار فنندهای کاهنده عصاره نداشت، تخمیر موجب کاهش معنی‌دار قند کاهنده شد. رنگ عصاره تحت تاثیر فرایندهای استریل کردن و تخمیر زرشک قرار گرفت. با این‌که پارامتر روشنایی ( $L^*$ ) عصاره در اثر استریل کردن زرشک افزایش یافته، تخمیر این افزایش روشنایی را توانست تا حدی جبران کند و آن را کاهش دهد. هم‌چنین تخمیر توانست پارامترهای  $a^*$  (شاخص قرمزی) و  $b^*$  (شاخص زردی) را تا حدی افزایش دهد. در نهایت، به استثنای خصوصیت رنگ، تمامی پارامترهای حسی برای عصاره حاصل از زرشک تخمیرشده بیش‌تر از تخمیرنشده بودند.

واژه‌های کلیدی: تخمیر حالت جامد، زرشک، ترکیبات فنولی، آنتوسیانین مونومری، ریزوپوس الیگوسپوروس.

\* نویسنده مسئول: srazavi@ut.ac.ir

## 1- مقدمه

اصلی زرشک در جهان است، ضروری است که با فراوری این ماده به صورت محصولات غذایی جدید و تخمیری گامی عملیاتی در جهت بهبود سلامت، افزایش ارزش افزوده و حفظ و ارتقاء جایگاه ایران در تولید زرشک برداشت. تاکنون پژوهشی پیرامون ارزیابی کارایی تکنیک تخمیر در حالت جامد برای افزایش استخراج ترکیبات فنولی و به ویژه آنتوسیانین‌ها از میوه زرشک انجام نشده و از این رو در این مقاله، تاثیر این نوع تخمیر به عنوان یک پیش تیمار بر میزان فنول کل و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آبی به دست آمده از زرشک مورد بررسی قرار گرفت.

## 2- مواد و روش‌ها

## 2-1- مواد

مواد استفاده شده در این مقاله شامل اتانول (شرکت رازی، ایران)، متانول، هیدروکسید سدیم، شناساگر فنل فتالین، معرف فولین سیاکالتو، کربنات سدیم، اسید گالیک، پودر دی فنیل پیکریل هیدرازیل، دی سدیم مونو هیدروژن فسفات، مونوسدیم دی هیدروژن فسفات، محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار، پتاسیم کلراید، اسید کلریدریک، سولفات مس II با 5 مولکول آب، اسید سولفوریک، پتاسیم سدیم تارتارات با 4 مولکول آب، پتاسیم فروسیانید با 3 مولکول آب، اسید استیک، استات روی با 2 مولکول آب، متیلن بلو و سدیم استات از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. هم‌چنین کاغذ صافی واتمن شماره 1 از واتمن اینترنشنال ساخت بریتانیا و سرم فیزیولوژی از داروسازی ثامن، ساخت ایران تهیه شد.

## 2-2- آماده‌سازی نمونه

زرشک قرمز تازه در فصل پاییز سال 1394 هجری خورشیدی از بازار تهران تهیه و پاک شد. پس از آن توسط آب مقطر به منظور حذف گرد و خاک، مه پاشی شدند. پس از نگهداری به مدت 10 دقیقه روی صافی فلزی (توری) با هدف چکیدن و حذف قطرات آب، بسته‌بندی و در دمای منفی 17 درجه سلسیوس نگهداری شد.

## 2-3- آماده‌سازی میکروارگانیزم

میکروارگانیزم ریزوپوس الیگوسپوروس<sup>1</sup> به شماره PTCC5278

1. *Rhizopus oligosporous*

ترکیبات زیست فعال، از منابع طبیعی و به روش استخراج جامد-مایع با به کارگیری حلال‌های آلی حاصل می‌شوند [1,2]. با این حال، امروزه روش‌های دیگری مانند سیالات فوق بحرانی، فرایندهای فشار بالا، استخراج به کمک مایکروویو و فراصوت نیز برای استخراج این ترکیبات پیشنهاد شده است [2-4]. استخراج ترکیبات زیست فعال توسط تخمیر نیز به عنوان روشی جایگزین برای تهیه این ترکیبات در نظر گرفته شده است. زیرا امکان تولید عصاره‌هایی با زیست فعالیت بالا و کیفیت عالی را بدون هیچ گونه زهرآگینی مربوط به حلال‌های آلی، فراهم می‌کند [5, 6].

اگرچه هنوز بسیاری از ترکیبات زیست فعال توسط روش تخمیر غوطه‌وری تولید می‌شوند، تخمیر حالت جامد<sup>1</sup> (SSF)، توجه زیادی را به خود جلب کرده، زیرا تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که این فرایند دارای بازده و کیفیت محصول بالاتر در مقایسه با تخمیر به روش غوطه‌وری است [5-7]. علاوه بر این، با توجه به استفاده از باقی‌مانده‌ها و ضایعات ارزان کشاورزی و صنایع وابسته به عنوان سوستر، هزینه این روش کم‌تر از روش غوطه‌وری است. رابلدو و همکاران [8] ضایعات انار را به طور موفقیت آمیزی به عنوان منبع مواد مغذی و حمایتی برای تولید الاژیک اسید با SSF و اسپرژیلوس نیجر GH1 استفاده کردند. راندهیر و شتی [9] تفاله قره قاط، محصول جانبی صنایع تولیدی نوشیدنی قره قاط را، به عنوان یک منبع خوب برای تولید الاژیک اسید و دیگر ترکیبات فنولیک مطرح کردند. فراوری زیستی این ضایعات به روش SSF با لنتینوس ادودس<sup>2</sup> برای افزایش مقدار الاژیک اسید، مفید بود. حجم کم آب در روش تخمیر جامد نیز منجر به استفاده از فرمانتورهای با اندازه کوچک‌تر در مراحل پایین دستی، همزنی کم‌تر و کاهش هزینه استریلیزاسیون می‌شود که از لحاظ اقتصادی، با صرفه‌تر است [5, 10, 11]. علاوه بر راندهیر بالتر، زمان تولید متابولیت‌های ثانویه به روش SSF کم‌تر از تخمیر غوطه‌وری است، در حالی که به شرایط اسپتیک نیز نیاز نبوده و هزینه‌های آن کم‌تر می‌باشد [1].

با توجه به این که ایران یکی از تولیدکنندگان و صادرکنندگان

1. Solid State Fermentation

2. *Lentinus edodes*

محلول کربنات سدیم اشباع به مخلوط فوق افزوده شد. پس از 60 دقیقه نگهداری در تاریکی، جذب نمونه ها در طول موج 765 نانومتر خوانده شد.

مقادیر جذب خوانده شده در منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده از رقت‌های مختلف اسید گالیک قرار داده شده و غلظت‌های معادل به دست آمد. نتایج به صورت میلی گرم معادل اسید گالیک در لیتر گزارش می‌شوند.

به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی واقع در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. برای فعال‌سازی و وارد کردن کپک رشته‌ای به حالت رویشی، میکروارگانیسم در شرایط کاملاً استریل به محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (PDA) بر روی پلیت انتقال داده شد و به مدت 10 روز در دمای 25 درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد [12].

#### 4-2- تخمیر میوه زرشک و عصاره گیری

ابتدا میوه زرشک در یک همزن خانگی آسیاب شد و به نسبت 1 به 1 با آب مقطر برای رسیدن به فعالیت آبی مناسب برای رشد کپک، در دمای 121 درجه سلسیوس به مدت 20 دقیقه اتوکلاو شد. تلقیح (10<sup>6</sup> واحد سازنده پرگنه در میلی‌لیتر) در شرایط استریل با اضافه کردن 2 میلی‌لیتر سلول‌های رویشی از محیط کشت پروتیتو دکستروز آگار به ارلن مایر انجام و روی آن با پارافیلیم پوشانیده شد (بدون هوادهی و همزنی) و به مدت 10 روز در دمای 25 درجه سلسیوس گرم خانه‌گذاری شد [13]. پس از انجام تخمیر، استخراج آبی در دمای 20 درجه سلسیوس برای مدت زمان 15 دقیقه صورت گرفت و پس از سانتریفیوژ کردن در شتاب 1500 برابر ثقل زمین به مدت 20 دقیقه، عصاره به دست آمده در فریزر 15- درجه سلسیوس به منظور انجام آزمایشات نگهداری شد.

#### 5-2- عکس برداری از میسیلیوم کپک

از رشد کپک ریزوپوس الیگوسپوروس بر روی نمونه زرشک و محیط کشت PDA با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهر به دروبین دیجیتال عکس برداری شد.

#### 6-2- تعیین مقدار ترکیبات فنولی

مقدار ترکیبات فنولی کل به روش فولین-سیوکالتو بر اساس روش امونز و پترسون [14] اندازه‌گیری شد. برای این منظور 0/5 میلی‌لیتر عصاره زرشک با آب مقطر به حجم 25 میلی‌لیتر رسانده شد، سپس 0/5 میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتو به آن اضافه شده و پس از مدت 10 دقیقه، 1/0 میلی‌لیتر

#### 7-2- اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین مونومری

اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین مونومری با استفاده از روش افتراقی مطابق روش لی و همکاران [15] انجام شد. 10 میلی‌لیتر از هر کدام از نمونه‌های استخراج شده در بالن حجمی 50 ریخته شده و هر کدام از آن‌ها یک بار با تامپون با pH برابر با یک و یک بار با تامپون با pH برابر با 4/5 با دقت به حجم رسانده شد. برای به تعادل رسیدن فرم‌های آنتوسیانینی و تغییر شکل آن‌ها در تامپون‌های مختلف حدود 20 دقیقه زمان لازم است. زمان نگهداری محلول‌ها از یک ساعت نباید بیش‌تر تجاوز کند. سپس مقداری از محلول را در کووت یک سانتی‌متری ریخته و جذب آن در دو طول موج 510 نانومتر، طول موج بیشینه، و 700 نانومتر، برای حذف تاثیر عوامل کدورت‌زا که ممکن است در نمونه باشند و خطا ایجاد کنند، خوانده شد. هر کدام از جذب‌ها باید قبلاً با نمونه شاهد صفر شده باشند. برای محاسبه جذب و مقدار آنتوسیانین مونومری نمونه از معادله‌های 1 و 2 بهره گرفته شد:

$$A = (A_{\text{at}} - A_{\text{v...}})_{\text{pH}} - (A_{\text{at}} - A_{\text{v...}})_{\text{pH} \neq 0} \quad (1)$$

$$\text{Monomeric Anthocyanins (mg/L)} = \frac{A \times M_w \times DF \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (2)$$

که A جذب نمونه،  $M_w$  وزن مولکولی (بر حسب سیانیدین-3-گلیکوزید = 449/2)، DF فاکتور رقت، l قطر کووت (1 سانتی‌متر) و  $\epsilon$  جذب مولار می‌باشند.  $M_w$  و  $\epsilon$  به آنتوسیانین غالب در نمونه بستگی دارند. اگر ترکیبات نمونه ناشناخته باشند محاسبات رنگ بر اساس سیانیدین-3-گلیکوزید انجام می‌شود. که در مورد زرشک هم بر این اساس عمل شد.

**2-8- تعیین فعالیت مهار رادیکال آزاد**

خاصیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها با پیروی از روش ارائه شده توسط برند-ویلیامز و همکاران [16] با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. برای تهیه محلول 0/1 میلی مولار DPPH، پودر DPPH توزین و در بالن حجمی 50 میلی‌لیتر با متانول به حجم رسانده شد. به دلیل این که DPPH به نور حساس است، اطراف بالن ژوژه با فویل آلومینیومی پوشانده شد. برای اندازه‌گیری مهار DPPH، ابتدا عصاره‌ها با آب مقطر 10 برابر رقیق شدند سپس 0/5 میلی‌لیتر از آن‌ها با 3/0 میلی‌لیتر محلول DPPH متانولی مخلوط و به مدت 30 دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. پس از این، جذب نمونه‌ها در 515 نانومتر خوانده شد. نمونه کنترل (شاهد) حاوی 0/5 میلی‌لیتر آب مقطر به جای عصاره زرشک بود. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها با استفاده از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$\text{Inhibition of DPPH (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (3)$$

که  $A_{\text{control}}$  و  $A_{\text{sample}}$  به ترتیب جذب نمونه‌ها با DPPH و جذب محلول DPPH بدون عصاره (نمونه شاهد) می‌باشند.

**2-9- اندازه‌گیری pH و اسیدیته قابل تیتراسیون**

برای اندازه‌گیری pH از pH متر دیجیتالی (تروهم 744، آلمان) استفاده شد. برای اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیتراسیون (TA) ابتدا 10 میلی‌لیتر عصاره به یک بالن ژوژه 100 میلی‌لیتری انتقال داده شد و با آب مقطر به حجم رسانیده شد. سپس به وسیله پیپت، 0/3 میلی‌لیتر فنل فتالین به آن افزوده و به ارلن مایر منتقل کرده و در ادامه، با محلول هیدروکسید سدیم 0/1 مولار تا نقطه پایانی (صورتی کم‌رنگ) تیتر شد [17]. اسیدیته قابل تیتراسیون با معادله‌ی شماره (4) محاسبه شد:

$$TA = 10 \times T \quad (4)$$

که در آن T میانگین مقدار محلول هیدروکسید سدیم 0/1 مولار بر حسب میلی‌لیتر لازم برای خنثی کردن اسیدیته 1 میلی‌لیتر عصاره می‌باشد.

**2-10- اندازه‌گیری قند احیا**

برای اندازه‌گیری قندهای احیاکننده، ابتدا 20 میلی‌لیتر عصاره (حاصل از 5 گرم زرشک) در یک بشر وزن شد و به حجم 100 میلی‌لیتر رسانیده شد. سپس واکنشگرهای کارز 1 و 2 که شامل پتاسیم فروسیانید با 3 مولکول آب و استات روی با 2 مولکول آب و اسید استیک بودند به عصاره افزوده شدند. پس از 2 دقیقه، عصاره با استفاده از کاغذ صافی، صاف شد. برای تیترسنجی، ابتدا تیترسنجی اولیه انجام شد که در آن 20 میلی‌لیتر مخلوط فهلینگ به یک ارلن مایر 250 میلی‌لیتری منتقل شده، به آن 15 میلی‌لیتر آب مقطر و چند قطره متیلن بلو اضافه شد و تا دمای جوش در حال همزنی حرارت دهی شد. سپس این مخلوط در حالت جوش تا از بین رفتن کامل رنگ آبی توسط نمونه (عصاره) تیتر شد. در ادامه، برای انجام تیترسنجی دقیق، روند گفته شده در بالا با این تفاوت که ابتدا مقدار زیادی نمونه (فقط نیم میلی‌لیتر کم‌تر از مقدار تعیین شده در تیترسنجی اولیه) به مخلوط فهلینگ در حال جوش افزوده شد، تکرار و مدت کوتاهی فرصت داده شده و سپس تیترسنجی با سرعت بسیار کم‌تری ادامه پیدا کرد. برای محاسبه میزان قند احیا در عصاره از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{مقدار قند احیاکننده بر حسب قند اینورت} \quad (5)$$

$$1000F/(C \times T) = (\text{گرم در } 100 \text{ گرم نمونه})$$

که F ضریب تصحیح ساکاروز است که 1 لحاظ شد و C نشان دهنده غلظت نمونه در محلول تیتران (بر حسب گرم در 100 میلی‌لیتر)، و T عدد تیتر در تیتراسیون نهایی بر حسب میلی‌لیتر می‌باشند [17].

**2-11- سنجش رنگ**

برای آزمون سنجش رنگ ابتدا عصاره‌های استخراج شده در ظرفی حاوی جایگاه‌های مختلف با قطرهای مساوی و ارتفاع یکسان ریخته شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری (چابک گستر) از نمونه‌ها عکس گرفته شد و از روش پردازش تصویر با نرم افزار ایمیج پروپلاس پارامترهای رنگی  $a^*$ ،  $b^*$  و  $L^*$  که به ترتیب شاخص‌هایی از شدت قرمزی، زردی و روشنایی نمونه

کرده، روی محیط کشت و نمونه زرشک مشاهده می‌شود. از آنجایی که زمان گرمخانه‌گذاری هر دو نمونه برابر بود، بر اساس تصاویر، نتیجه‌گیری می‌شود که کپک در زرشک رشد ملایم‌تری داشته و هنوز به مرحله هاگ‌زایی نرسیده است. هم‌چنین در زرشک، میسیلیوم قارچ درهم تنیده‌تر می‌باشد که می‌توان آن را به مقدار آب بیش‌تر در زرشک نسبت به محیط کشت نسبت داد.

### 3-2- ترکیبات فنولی کل

شکل (2) میزان ترکیبات فنولی کل در نمونه تخمیر نشده (تخمیر و اتوکلاو نشده) و نمونه کنترل (تخمیر نشده ولی اتوکلاو و گرمخانه‌گذاری شده) و نمونه تخمیر شده (اتوکلاو شده، تخمیر و گرمخانه‌گذاری شده) را نشان می‌دهد. در نمونه کنترل افزایش قابل توجهی در میزان فنول کل نسبت به نمونه تخمیر نشده مشاهده می‌شود. از دلایل آن می‌توان به اثر حرارتی اتوکلاو که موجب نرم شدن بافت میوه زرشک شده و به استخراج ترکیبات فنولی هنگام عصاره‌گیری بعدی کمک می‌کند اشاره کرد. هم‌چنین امکان دارد شکستن پیوندهای گلیکوزیدی در اثر گرما و آزاد شدن ترکیبات فنولی در زیاد بودن مقدار فنول کل نمونه کنترل نسبت به نمونه تخمیر و اتوکلاو نشده موثر باشند. نتایج نشان می‌دهد (شکل 2) که در اثر تخمیر، محتوای فنول کل افزایش پیدا کرد که ناشی از تولید اسیدهای فنولیک از پیش‌سازهای موجود در محیط توسط قارچ رشته‌ای ریزوپوس الیگوسپوروس می‌باشد. علاوه بر تولید مستقیم ترکیبات فنولی توسط کپک، ریزوپوس الیگوسپوروس دارای فعالیت بتا-گلوکوزیدازی بسیار بالا است

هستند به‌دست آمد. لازم به ذکر است که برای هر آزمون رنگ چهار نقطه از نمونه مورد نظر انتخاب شد و از آن‌ها میانگین گرفته شد. هم‌چنین از خود نمونه زرشک قبل از استخراج عصاره نیز عکسبرداری و با زرشک تخمیر شده مقایسه شد.

### 2-12- تعیین خصوصیات ارگانولپتیکی

برای ارزیابی حسی، نمونه‌های مختلف در ظروف یکبار مصرف قرار داده و کد گذاری شد. ارزیابی حسی نمونه‌ها توسط گروهی 10 نفره از دانشجویان و اساتید دانشگاه صورت گرفت. از یک لیوان آب برای تمایز طعم دو نمونه بین هر بار آزمون چشایی استفاده شد. شاخص‌های مورد سوال شامل خصوصیات حسی عطر و بو، طعم و مزه، رنگ و ملایم بودن مزه ترش بودند که بسته به شدت هر مورد، اعداد 1 تا 5 به آن‌ها تعلق گرفت. سطح 1 معرف پایین‌ترین سطح پذیرش و 5 بالاترین سطح پذیرش هر پارامتر حسی بود.

### 2-13- تحلیل آماری

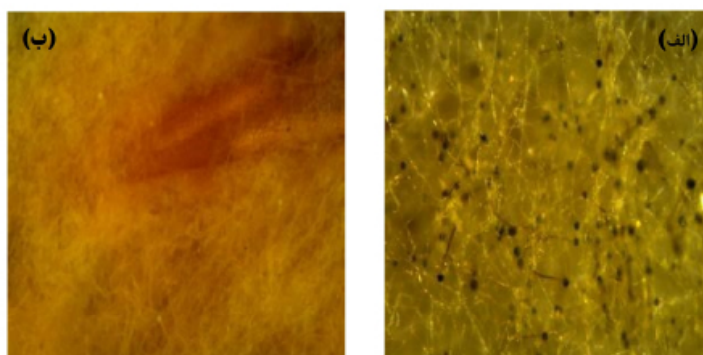
در این پژوهش از روش فاکتوریل کامل با 3 تکرار برای هر نمونه استفاده شد. آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح احتمال 5 درصد و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS انجام پذیرفت.

### 3- نتایج و بحث

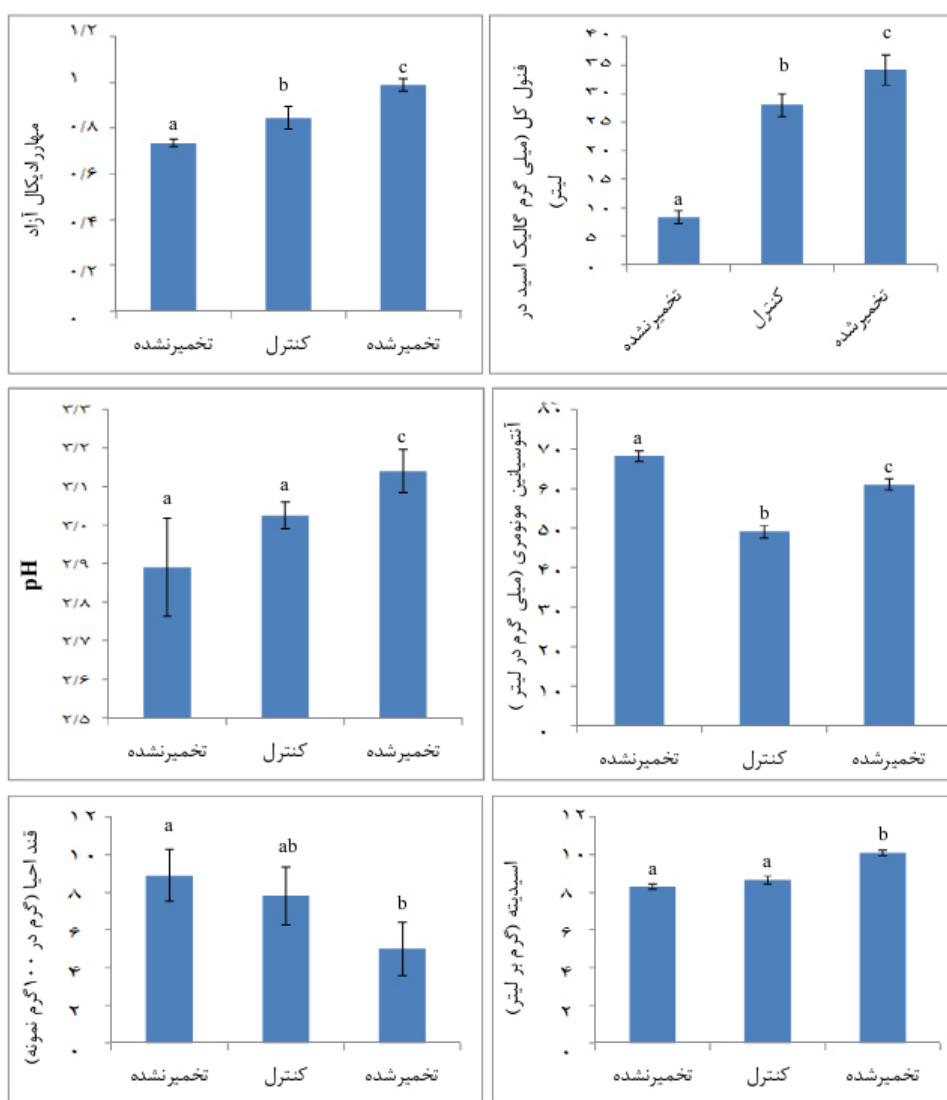
#### 3-1- بررسی تصویرهای برداشته شده توسط

#### میکروسکوپ نوری

در شکل (1) میسیلیوم قارچ ریزوپوس الیگوسپوروس رشد



شکل (1) تصاویر برداشته شده با بزرگنمایی 450 برابر از کپک ریزوپوس الیگوسپوروس رشد کرده (الف) بر روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار و (ب) میوه زرشک توسط میکروسکوپ نوری



شکل (2) خصوصیات شیمیایی عصاره زرشک. نمونه تخمیر نشده: تخمیر و اتوکلاو نشده، نمونه کنترل: تخمیر نشده ولی اتوکلاو و گرمخانه گذاری شده و نمونه تخمیر شده: اتوکلاو شده، تخمیر و گرمخانه گذاری شده.

### 3-3- مقدار آنتوسیانین مونومری و توان خنثی کنندگی رادیکال آزاد DPPH

شکل (2) نشان می‌دهد که در اثر تخمیر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد) عصاره زرشک به میزان قابل توجهی افزایش پیدا کرد، که احتمالاً ناشی از فعالیت بتاگلوکوزیداز قارچ ریزوپوس الیگوسپوروس باشد. این آنزیم برون سلولی می‌تواند پیوند گلوکوزیدی را شکسته و اسیدهای فنولیک را آزاد سازد [9]. چنین کارکردی منجر به افزایش قند احیا نیز می‌شود که خود توان مهار کنندگی رادیکال را افزایش می‌دهد. هم‌چنین آنزیم‌های اکسیداتیو دیگری توسط ریزوپوس الیگوسپوروس

که می‌تواند ترکیبات آنتوسیانینی را از فرم گلیکوزیدی درآورد [18]. آنزیم بتا گلوکوزیداز (بتا-دی-گلوکوزید گلوکوهیدرولاز) پیوندهای گلیکوزیدی را در آلکیل و آریل بتا-دی-گلوکوزیدها و باقی‌مانده‌های کربوهیدراتی حاوی گلوکوزیدها، آبکافت می‌کند [9]. بعضی از مطالعات پیشنهاد نموده‌اند که بتا-گلوکوزیداز خام تولید شده از کپک رشته‌ای ظرفیت بالاتری برای آزادسازی اسیدهای فنولیک در مقایسه با بتا-گلوکوزیداز تجاری دارا است. این ظرفیت را می‌توان به حضور احتمالی آنزیم‌های دیگر مانند استرازها در محلول خام بتا-گلوکوزیداز، مرتبط دانست [18].

از نمونه‌های زرشک نشان داده شده است. تخمیر موجب کاهش معنی‌دار قند کاهنده موجود در نمونه شد که دلیل این امر مصرف قند موجود در محیط توسط کپک و استفاده از آن در چرخه متابولیسم اسیدهای فنولی و رشد میسیلیوم است. در نمونه کنترل نیز شاهد کاهش اندک (غیرمعنی‌دار) قند احیا هستیم که می‌توان به ناپایدار بودن این قندها در حرارت اتوکلاو و دوره گرمخانه‌گذاری اشاره کرد. در دماهای بالا قندهای کاهنده در واکنش‌های مایلارد (با مشارکت ترکیبات آمینی) و یا کاراملیزاسیون (بدون حضور و مشارکت ترکیبات آمینی) شرکت کرده [19]، مقدار آن‌ها کاهش می‌یابد.

### 3-6- مطالعه تغییرات رنگ میوه و عصاره زرشک

در شکل (3) تغییرات نمایه  $L^*$  در عصاره زرشک تخمیر شده، تخمیر نشده و کنترل نمایش داده شده است. پارامتر  $L^*$  یا روشنایی که عددی بین 0 تا 100 می‌باشد، بستگی به نور عبوری دارد که توسط دستگاه مشاهده می‌شود و بنابراین به غلظت محلول بستگی دارد. بین  $L^*$  و شدت رنگ رابطه معکوس وجود دارد (در سیستم‌های سیاه مطلق  $L^*$  برابر صفر و در سیستم‌های سفید مطلق  $L^*$  برابر 100 می‌باشد). از مقایسه نتایج مربوط به عصاره‌های به‌دست آمده از نمونه‌های قبل از تخمیر و کنترل (تخمیر نشده ولی اتوکلاو و گرمخانه‌گذاری شده) نتیجه‌گیری می‌شود که در نمونه کنترل پارامتر روشنایی ( $L^*$ ) بیش‌تر است که می‌تواند ناشی از تخریب رنگدانه‌ها در اتوکلاو به‌منظور استریل کردن نمونه‌های زرشک [20] و از بین رفتن آن‌ها در دوره نگه‌داری در گرمخانه باشد. بنابراین غلظت آنتوسیانین بعد از اتوکلاو کاهش پیدا کرده است. از سوی دیگر مشاهده می‌شود که تخمیر موجب کاهش معنی‌دار نمایه روشنایی عصاره در مقایسه با نمونه کنترل شده است که ممکن است ناشی از تولید ترکیبات فنولی توسط میکروارگانیسم و یا شکستن ساختار زرشک و خارج شدن مواد جامد محلول از آن در اثر تخمیر باشد. از دلایل دیگر می‌توان به رها شدن قند از ترکیبات فنولی و پروتئولیز اشاره کرد که به این ترتیب میزان مواد جامد محلول و در پی آن شدت پراش نور افزایش پیدا کرده، گذر نور از داخل نمونه و نمایه  $L^*$  کاهش یافته‌اند. نمایه روشنایی میوه زرشک (قبل از استخراج عصاره) نیز تحت تاثیر فرایند تخمیر قرار گرفت (شکل 4).

تولید می‌شوند که موجب تجزیه تانن و باز شدن حلقه فنیل شده، باعث افزایش اسیدهای فنولی آزاد می‌شوند [18]. در نهایت این‌که، این قارچ رشته‌ای توان پروتئولیزی بسیار بالایی دارد و می‌تواند پروتئین‌های موجود را به پپتیدهای کوچک دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی تبدیل کند. در نمونه کنترل (تخمیر نشده ولی اتوکلاو و گرمخانه‌گذاری شده) نیز افزایش خاصیت مهارکنندگی رادیکال مشاهده می‌شود که می‌توان آن را ناشی از استریلیزاسیون در اتوکلاو دانست. دمای بالا در اتوکلاو ممکن است منجر به افزایش استخراج ترکیبات فنولی از نمونه، واکنش مایلارد و باز شدن ساختار پروتئین‌ها شود.

مقدار آنتوسیانین مونومری در نمونه تخمیر شده (اتوکلاو شده، تخمیر و گرمخانه‌گذاری شده) و نمونه کنترل (تخمیر نشده ولی اتوکلاو و گرمخانه‌گذاری شده) کم‌تر از نمونه تخمیر نشده (تخمیر و اتوکلاو نشده) بود (شکل 2) که به احتمال زیاد به دلیل تخریب مقداری از آنتوسیانین‌ها در اثر حرارت دهی در اتوکلاو می‌باشد. در شکل (2) با مقایسه نمونه کنترل و تخمیر شده مشاهده می‌شود که در اثر تخمیر میزان آنتوسیانین مونومری به شکل معنی‌داری افزایش پیدا کرد که می‌تواند ناشی از فعالیت بتا-گلوکوزیدازی کپک باشد.

### 3-4- درجه‌ی pH و اسیدیته قابل تیتراسیون

عصاره‌های زرشک صرف نظر از انجام تخمیر، همگی دارای pH اسیدی بودند (شکل 2) که به دلیل ماهیت اسیدی میوه زرشک و مقادیر بالای اسیدتارتاریک و اسید مالیک می‌باشد. نمونه تخمیر شده دارای اسیدیته بیش‌تر نسبت به نمونه‌های کنترل و تخمیر نشده بود که ناشی از تولید اسیدهای آلی در اثر تخمیر می‌باشد. کپک ریزوپوس الیگوسپوروس اسیدهای فنولی سنتز می‌کند [9]. با وجود داشتن اسیدیته بیش‌تر، نمونه تخمیر شده دارای pH بالاتری نسبت به دو نمونه دیگر نیز بود. افزایش تعداد گروه‌های آمینی در اثر تخمیر و تولید آنزیم‌های برون سلولی توسط کپک ریزوپوس الیگوسپوروس می‌تواند در pH بیش‌تر نمونه تخمیر شده موثر باشد.

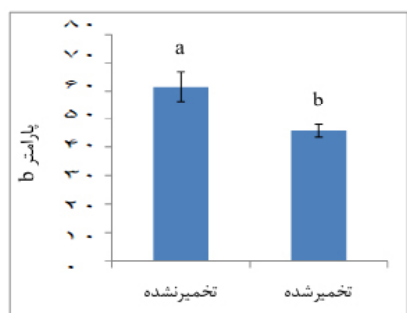
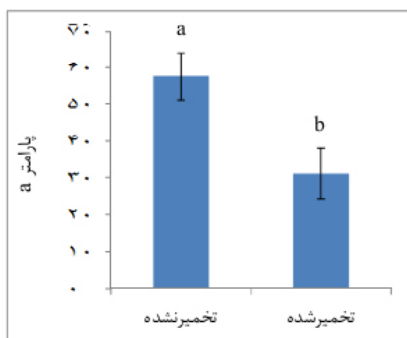
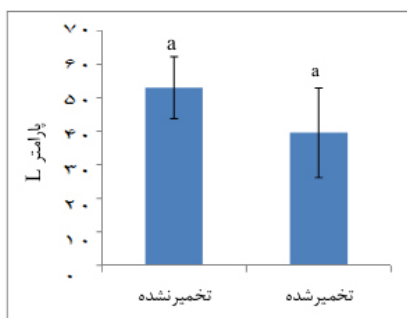
### 3-5- بررسی تغییرات میزان قند احیاکننده (کاهنده)

در شکل (2) مقدار قند کاهنده در عصاره‌های به‌دست آمده

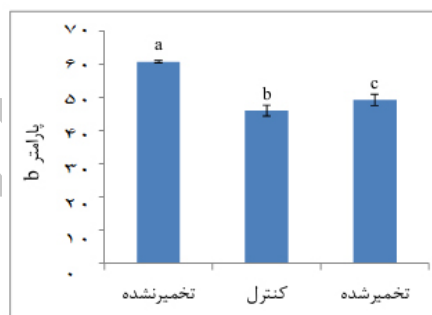
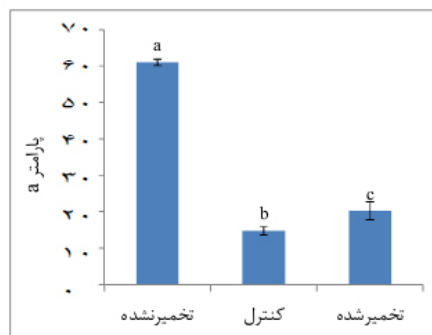
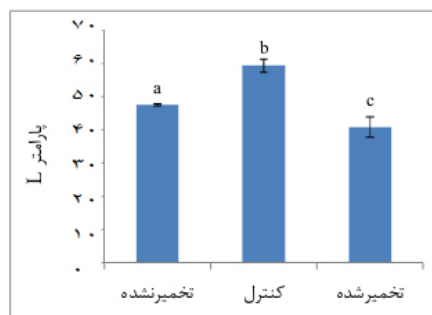
شدت رنگ قرمز و تولید ترکیبات فنولی است. هم‌چنین یکی دیگر از دلایل افزایش قرمزی می‌تواند واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی باشد [22]. شدت زردی (پارامتر  $b^*$ ) در نمونه کنترل نسبت به تخمیر نشده به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود که از دلایل آن می‌توان به تخریب چالکون‌ها و رنگدانه‌های پلیمری زرد رنگ در اثر استریلیزاسیون در اتوکلاو اشاره کرد. هم‌چنین شاهد افزایش نمایه زردی در اثر تخمیر هستیم که آن را می‌توان به تشکیل ترکیبات فنولی زرد رنگ توسط میکروارگانیسم و افزایش قندهای احیا و واکنش آن‌ها با پروتئین‌ها و ترکیبات فنولی نسبت داد [23].

### 3-7- بررسی خصوصیات ارگانولپتیکی

شکل (5) نتایج حاصل از ارزیابی خصوصیات حسی عصاره‌ها از جمله عطر، طعم و مزه، ملایم بودن ترشی و رنگ را نشان می‌دهد.



شکل (4) نمایه‌های رنگ خود میوه زرشک قبل و بعد از تخمیر

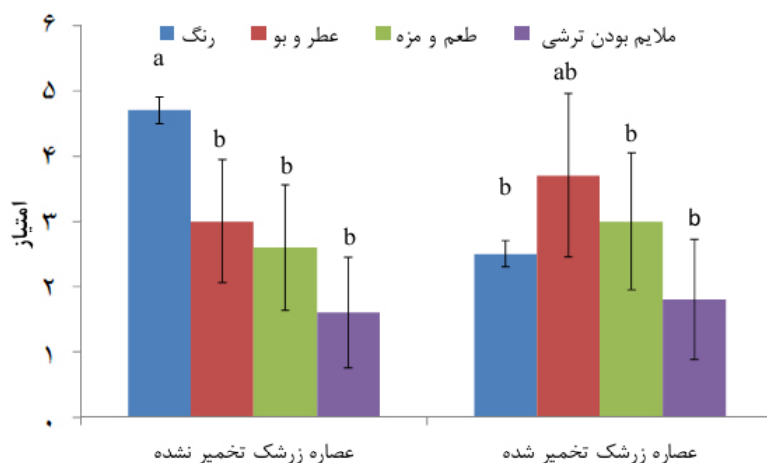


شکل (3) نمایه‌های رنگ عصاره زرشک. نمونه تخمیر نشده: تخمیر و اتوکلاو نشده، نمونه کنترل: تخمیر نشده ولی اتوکلاو و گرمخانه گذاری شده و نمونه تخمیر شده: اتوکلاو شده، تخمیر و گرمخانه گذاری شده.

تخمیر موجب کاهش غیرمعنی دار شاخص  $L^*$  شد که ناشی از تولید ترکیبات فنولی توسط میکروارگانیسم می‌باشد. به این ترتیب تخمیر تا حدی از بین رفتن مواد فنولی در اثر حرارت‌دهی زرشک در اتوکلاو را جبران کرد.

در شکل (3) تغییرات نمایه  $a^*$  و  $b^*$  در عصاره به‌دست آمده از نمونه‌های تخمیر نشده، کنترل و تخمیر شده مشاهده می‌شود. نمونه کنترل دارای میزان  $a^*$  (نمایه قرمزی) کم‌تری نسبت به نمونه تخمیر نشده بود که احتمالاً ناشی از تخریب رنگدانه‌های آنتوسیانینی در اثر استریل کردن (اتوکلاو کردن) زرشک است [21]. در اثر تخمیر، مقدار نمایه  $a^*$  در مقایسه با نمونه کنترل افزایش پیدا کرد که نشان دهنده بیش‌تر شدن





شکل (5) میزان پذیرش پارامترهای حسی برای عصاره زرشک تخمیر نشده و تخمیر شده

#### 4- نتیجه گیری

تخمیر زرشک با کپک ریزوپوس الیگوسپوروس به عنوان پیش تیماری قبل از استخراج آبی عصاره موجب افزایش مقدار فنول کل و فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد شد. این نتایج علاوه بر آزاد شدن فنولها در اثر حرارت دهی در اتوکلاو، به فعالیت بتاگلوگوزیدازی کپک نسبت داده شد. تخمیر موجب افزایش اسیدیته قابل تیتراسیون و pH عصاره حاصل شد. اتوکلاو کردن منجر به کاهش رنگ عصاره شد. با این حال، تخمیر با ریزوپوس الیگوسپوروس به دلیل تولید ترکیبات فنولی و افزایش آنتوسیانین مونومری، پارامتر L عصاره را کاهش و پارامترهای  $a^*$  و  $b^*$  را افزایش داد. عصاره حاصل از زرشک تخمیر شده به استثنای خصوصیت رنگ، از دید عطر و طعم سایر بر عصاره حاصل از زرشک تخمیر نشده ترجیح داده شد.

به جز خصوصیت رنگ، تمامی شاخص‌های حسی برای عصاره حاصل از زرشک تخمیر شده بیش‌تر از تخمیر نشده می‌باشند. خصوصیات بو و عطر و طعم در نمونه تخمیر شده پذیرش بالاتری داشتند و ترشی عصاره تخمیر شده نیز با وجود دارا بودن اسیدیته قابل تیتراسیون بیش‌تر (شکل 2) ملایم‌تر بود. از این مشاهده می‌توان نتیجه گرفت که مزه ترشی عصاره بیش‌تر با درجه pH آن همبستگی دارد تا میزان اسیدیته قابل تیتراسیون. مجموع نتایج ارزیابی حسی نشان می‌دهند که تخمیر موجب افزایش پذیرش کلی شده است. از راه افزودن عصاره میوه‌های قرمز رنگ و یا عصاره به دست آمده از زرشک تخمیر نشده می‌توان میزان پذیرش رنگ عصاره را که به دلیل اتوکلاو کردن و گرمخانه‌گذاری کاهش پیدا کرد تا حدی جبران نمود.

#### منابع

- ria, N., Fernández, L. A., Usobiaga, A., et al. (2005). Optimisation of microwave-assisted extraction for the determination of nonylphenols and phthalate esters in sediment samples and comparison with pressurised solvent extraction. *J. Chromatogr. A*. 534, 247–254.
- [4] Martins, E. S., Silva, D., Da Silva, R., Gomes, E. (2002). Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem.* 37, 949–954.
- [1] Martins, S., Aguilar, C. N., de la Garza-Rodriguez, I., Mussatto, S. I., Teixeira, J. A. (2010). Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larrea tridentata* by microwave-assisted extraction. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 1142–1147.
- [2] Wang, L., Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 300–312.
- [3] Cortazar, E., Bartolomé, L., Delgado, A., Etxebar-

- dant activity and phenolic content of oat as affected by cultivar and location. *Crop Sci.* 41, 1676–1681.
- [15] Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E. (2005) Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 88, 1269–1278.
- [16] Brand-Williams, W., Cuvelier, Mem Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* 28, 25–30.
- [17] James, C. S. (1995). Analytical Chemistry of Foods; Springer; United States: 165-167.
- [18] Vatter, D. A., Shetty, K. (2003). Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochem.* 39, 367–379.
- [19] de Man, J. M. (1999). Principals of Food Chemistry, Maryland, USA: Aspen Publishers, Inc. 250-251.
- [20] Rodriguez-Saona, L., Giusti, M., Wrolstad, R. (1999). Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *J. Food Sci.* 64, 451–456.
- [21] Hubbermann, E. M. (2005) Functional properties of anthocyanin concentrates and the influence of physicochemical parameters and food additives on the color and stability of isolated anthocyanins in food matrices, Uelvesbull, Germany: Der Sndre Verlage. 132-139.
- [22] Rein, M. (2005) Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology. 34-88.
- [23] García-Viguera, C., Zafrilla, P., Artés, F., Romero, F., Abellán, P., Tomás-Barberán, F. A. (1998) Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *J. Sci. Food Agric.* 78, 565–573.
- [5] Nigam, P. S. (2009) Production of bioactive secondary metabolites, in: Nigam, P. S., Pandey, A. (Eds.), *Biotechnology for agro-industrial residues utilization*, 1<sup>st</sup> ed. Springer, Netherlands, 129–145.
- [6] Mohamed, S. A., Saleh, R. M., Kabli, S. A., Al-Garni, S. M. (2016) Influence of solid state fermentation by *Trichoderma* spp. on solubility, phenolic content, antioxidant, and antimicrobial activities of commercial turmeric. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 920–928.
- [7] Couto, S. R., Sanromán, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *J. Food Eng.* 76, 291–302
- [8] Robledo, A., Aguilera-Carbó, A., Rodríguez, R., Martínez, J. L., Garza, Y., Aguilar, C. N. (2008). Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 507–513.
- [9] Randhir, R., Shetty, K. (2007). Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8, 197–204.
- [10] Pandey, A. (2003). Solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 81–84.
- [11] Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, T. V., Karanth, N. G. (2003). Some engineering aspects of solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 127–135.
- [12] Vatter, D. A., Shetty, K. (2003). Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochem.* 39, 367–379.
- [13] Dey, T. B., Kuhad, R. C. (2014). Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. *Biotechnol. Rep.* 4, 120–127.
- [14] Emmons, C. L., Peterson, D. M. (2001). Antioxi-