

بررسی مواد آرومای مطلوب و ترکیبات پلی فنولی کل در فرایند تولید پودر کاکائو

فریبا محمدی الستی^۱، نارملا آصفی^{۲*}، رامین ملکی^۳، سیدصادق سیدلو هریس^۴

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
- ۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
- * نویسنده مسئول (n.asefi@iaut.ac.ir)
- ۳- استادیار، گروه کروماتوگرافی، پژوهشکده جهاد کشاورزی ارومیه، ارومیه، ایران
- ۴- دانشیار، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

پودر کاکائو و شکلات یکی از محبوبترین ترکیبات مورد استفاده در محصولات غذایی می‌باشند. عطر و طعم این محصولات در محبوبیت و مقبولیت مصرف‌کننده نقش مهمی دارد. پیرازین‌ها جزء ترکیبات اصلی گروه هتروسیکلیک، مواد فرار و اجزای کلیدی بو در عطر کاکائو می‌باشند. جهت ارزیابی اثر مراحل فرایند تولید پودر کاکائو در ایجاد ترکیبات با رایحه مطلوب، از تمام مراحل خط تولید پودر کاکائو حاصل از دانه کامرون، نمونه برداری شد و نمونه‌ها با روش کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی مورد تحلیل و آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان دادند مرحله آلکالیزاسیون جزء مراحل مهم و تأثیرگذار روی عطر و طعم پودر کاکائو می‌باشد؛ لذا در ادامه، اثر سه نوع قلیا (سود، کربنات پتاسیم و بی کربنات آمونیوم) در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها بیان کردند که میزان مقادیر پلی فنول کل و آلکیل پیرازین‌های مورد مطالعه، به‌طور معنی‌داری تغییر یافته است. پودر قلیایی‌نشده، مقادیر پلی فنول و نسبت تترامتیل پیرازین به تری متیل پیرازین (TMP/TrMP) بیشتری نسبت به پودر کاکائوی قلیایی‌شده، داشت. علاوه بر این، در نمونه‌های کاکائوی قلیایی، مقادیر پلی فنول و آلکیل پیرازین با افزایش غلظت قلیا کاهش یافتند. در غلظت یکسان، قلیاییت با محلول سود پلی فنول و نسبت TMP/TrMP بالاتر، اما آلکیل پیرازین پایین‌تری در مقایسه با قلیاییت با محلول کربنات پتاسیم تولید کرد. پودر کاکائو با قلیاییت سبک به وسیله محلول کربنات پتاسیم با pH معادل ۶/۸۹، بالاترین مقدار آلکیل پیرازین را تولید کرد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۸

واژه‌های کلیدی

آلکالیزاسیون

آلکیل پیرازین

برشته کردن

پلی فنول

پودر کاکائو

مقدمه

تحت فشار مکانیکی قرار گرفته و با خروج قسمتی از چربی آن، کیک کاکائو حاصل می‌شود. سپس در نتیجه پودر کردن باقی‌مانده کیک کاکائو به روش مکانیکی، پودر کاکائو به دست می‌آید (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI]، ۱۳۹۳). عطر و طعم در مقبولیت دانه کاکائو و محصولات کاکائو مانند شکلات به‌عنوان عامل اصلی محسوب می‌شود. عطر و طعم ترکیبات موجود در دانه‌های

پودر کاکائو در بسیاری از صنایع بخصوص در صنایع شکلات‌سازی اهمیت ویژه‌ای داشته و از مواد اصلی تشکیل‌دهنده آنها می‌باشد. بنابراین کیفیت پودر کاکائو در کیفیت محصول نهایی نقش مهمی خواهد داشت. برای تهیه پودر کاکائو، مغز دانه کاکائو را آسیاب کرده و خمیر کاکائو به دست می‌آید. خمیر کاکائو در مرحله بعد

و محصولات میلارد بیشتر می‌شود. آلدئیدها، کتون‌ها، استرها، آلکان‌ها، فوران‌ها و ترکیبات حاوی بنزن بعد از یک قلیابیت سبک افزایش می‌یابد (Bonvehí & Coll, 2000; Li *et al.*, 2014; Serra Bonvehí & Ventura Coll, 2002). آلکیل‌پیرازین‌ها^۸ جزء ترکیبات اصلی و کلیدی بو در عطر و طعم کاکائو می‌باشند. آنها عطر فندقی، خاکی، برشته و رایحه سبز نشان می‌دهند. در حدود ۸۰ پیرازین در طعم نهایی کاکائو شرکت می‌کنند. تترامتیل‌پیرازین^۹ و تری‌متیل‌پیرازین^{۱۰} جزء مهم‌ترین ترکیبات این گروه هستند (Aprotosoiae, Luca, & Miron, 2016). دما و مدت زمان فرایندهای حرارتی از عوامل مؤثر بر غلظت پیرازین‌ها می‌باشند (Ziegler, 2009). قلیابی کردن باعث می‌شود که مقدار بیشتری ترکیبات پیش‌ساز برای ایجاد آلکیل‌پیرازین تولید شود در نتیجه آلکیل‌پیرازین بیشتری نسبت به pH پایین تولید می‌شود. به عبارت دیگر شرایطی که باعث بهبود انجام واکنش میلارد می‌شود، مواد فرار را نیز افزایش می‌دهد (Huang & Barringer, 2010).

دانه کاکائو و همچنین محصولات مشتق شده از کاکائو، منبع غنی از پلی‌فنل‌ها را ارائه می‌دهند. مسئله مهم و قابل توجه در محصولات قلیابی شده کاکائو، تغییر و تجزیه پلی‌فنل‌ها و متیل‌گزانتین‌ها در اثر pH قلیابی می‌باشد. گزارش شده است که در طول تخمیر و بودادن دانه کاکائو پلی‌فنول‌ها، کاتچین و ایپی‌کاتچین به ترکیبات کینون‌ها اکسید می‌شود و کینون‌ها با اسیدهای آمینه، پپتیدها و پروتئین‌ها ترکیب و یا با سایر ترکیبات فلاونوئیدی پلیمریزه می‌شوند (Niemenak, Rohsius, Elwers, Ndoumou, & Lieberei, 2006). بدین ترتیب، پودر کاکائو دارای طعم گسی کمتر، مقدار پلی‌فنول پایین‌تر و رنگ تیره‌تر خواهد شد (Li *et al.*, 2014).

در طی فرایند تبدیل دانه کاکائو به پودر کاکائو، مشکل کاهش عطر و طعم مطلوب و ایجاد بوهای نامطلوب مانند دود سیگاری و همچنین بو و طعم قلیابی مطرح می‌باشد. گمان می‌رود فرایندهای حرارتی بالا در ایجاد بوهای نامطلوب در محصول و کاهش عطر و طعم مطلوب نقش داشته باشند. در این راستا در مطالعه حاضر سعی بر آن شد که پژوهشی در خصوص علل کاهش عطر و طعم پودر کاکائو انجام گردد. زیرا شرکت‌های تولیدکننده پودر کاکائو در ایران با مشکل مذکور مواجه بوده و برای ایجاد عطر و طعم، مجدداً ملزم به

کاکائو در نتیجه عواملی مانند نوع کاکائو (ژنوتیپ)، ترکیب دانه، نوع خاک، سن درخت کاکائو، تیمارهای پس‌از برداشت مانند مشروط کردن پالپ، تخمیر و خشک کردن و فرایندهای صنعتی مانند بودادن، قلیابی کردن و همچنین ذخیره‌سازی و حمل‌ونقل تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در حال حاضر، بیش از ۶۰۰ ترکیب فرار عطر و طعم از دانه‌های کاکائو و محصولات کاکائو شناسایی شده است. این مواد از ترکیبات هتروسیکلیک^۱ نیتروژن و اکسیژن، آلدئیدها و کتون‌ها، استرها، الکل‌ها، هیدروکربن‌ها، نیتریل‌ها و سولفیدها، پیرازین‌ها^۲، اترها، فوران‌ها^۳، تiazول‌ها^۴، پیرون‌ها^۵، اسیدها، فنل‌ها، ایمین‌ها، آمین‌ها، اکسازول‌ها^۶ و پیروول‌ها^۷ تشکیل می‌شود (Ziegler, 2009). بسیاری از این ترکیبات دارای ویژگی عطر و طعم خاصی می‌باشند. خیلی از استرها یک ویژگی خاص عطر میوه و گل مانند را می‌دهند (Kongor *et al.*, 2016).

عطر و طعم ترکیبات موجود در دانه‌های کاکائو، در طول عمل بودادن از عطر و طعم پیش‌سازهای تولید شده در طی فرایند تخمیر و خشک کردن تشکیل می‌شود (Crafaek *et al.*, 2014). فرایند قلیابی کردن شامل قلیابی کردن توده کاکائو، عصاره یا پودر می‌باشد. همچنین این عمل را می‌توان قبل از بودادن انجام داد (Nair, 2010). قلیابی کردن اسیدیته طبیعی کاکائو را خنثی می‌کند، pH را تا حدود ۷-۸ افزایش داده، رنگ آن را تیره کرده و اسیدیته و طعم گسی آن را کاهش می‌دهد. امروزه، قلیابی کردن را به منظور بهبود رنگ، عطر و طعم کاکائو و افزایش توانایی دیسپرسیون (پراکندگی) ذرات پودر کاکائو در نوشابه انجام می‌دهند (Giacometti, Jolić, & Josić, 2015; Kothe, Zimmermann, & Galensa, 2013; Mazor Jolić, Radojčić Redovniković, Marković, Ivanec Šipušić, & Delonga, 2011).

با قلیابی کردن دانه کاکائو و تغییر pH، شرایط بیشتری برای انجام واکنش میلارد در طی بودادن ایجاد شده و با دخالت قندهای احیاکننده (گلوکز)، عطر و طعم بهتری برای ترکیبات آمادوری در واکنش میلارد به دست می‌آید، همچنین واکنش بین پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، پلی‌فنل‌ها

¹ Heterocyclic

² Pyrazines

³ Furans

⁴ Thiazoles

⁵ Pyrones

⁶ Oxazoles

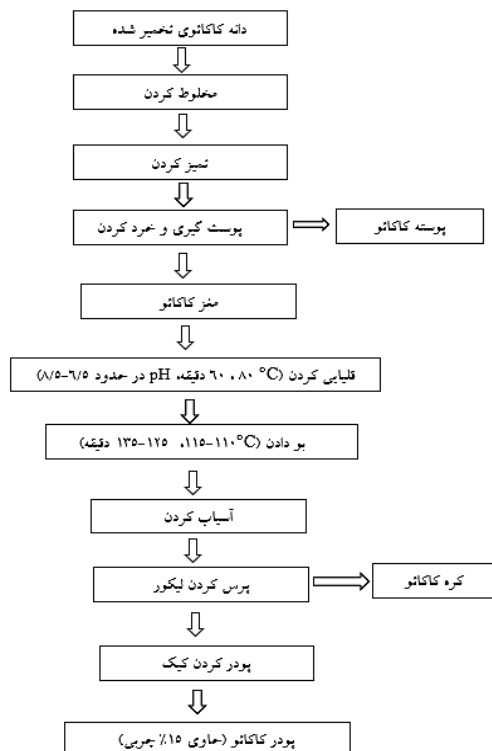
⁷ Pyrroles

⁸ Alkylpyrazines

⁹ Tetramethylpyrazine

¹⁰ Trimethylpyrazine

۲۵۰-۲۰۰ میکرون می‌رسد. ب) مرحله سنگی: اندازه ذرات به ۴۵-۳۵ میکرون می‌رسد. ماده ای که از مخازن آسیاب خارج می‌شود، عصاره می‌باشد. مرحله پرس: عصاره خروجی حداقل تا ۹۰ درجه سانتی گراد گرم می‌شود و سپس تحت عمل پرس (فشار هیدرولیکی) قرار می‌گیرد، بدین ترتیب کره کاکائو و کیک کاکائو به دست می‌آید. کیک کاکائو با ضربات چکشی دستگاه به ذرات ۲-۳ سانتی متری خرد می‌شود. کیک کاکائو تحت عمل آسیاب کردن به شکل پودر درآمده و توسط سیستم استابلیزر (نقاله حلزونی) عمل تمپرینگ انجام می‌شود تا کیفیت مناسب و رنگ مناسب پودر کاکائو حفظ شود. عمل بسته بندی محصول نهایی انجام می‌گیرد. پروسه تبدیل دانه کاکائو به پودر شرکت شیرین عسل، طبق شکل (۱) نشان داده شده است. نمونه‌های ۲۵ گرمی از مراحل مختلف تهیه پودر کاکائو (دانه خام، آلكالیزاسیون، بودادن، آسیاب کردن، پرس و پودر) تهیه شد. نمونه‌ها در یک آسیاب آزمایشگاهی (مدل Ika ساخت آلمان) به پودر تبدیل شده و تا زمان انجام آزمون‌ها در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.



شکل ۱- مراحل تهیه پودر کاکائو (شرکت شیرین عسل)

افزودن مواد معطر می‌باشند. بنابراین ترکیبات فرار عطروطعم در طی فرایند تولید پودر کاکائو در شرکت شیرین عسل مورد بررسی واقع شد، باتوجه به اینکه فرایند قلیایی کردن یکی از مهم ترین فرایندهای مؤثر بر خواص کیفی از جمله عطروطعم محصول نهایی می‌باشد، بنابراین ترکیبات آلکیل پیرازینی در شرایط مختلف فرایند قلیایی کردن مورد بررسی قرار گرفته و نحوه دقیق فرایند و مشخصه‌های مورد نظر که روی عطروطعم محصول نهایی، در فرایند قلیایی کردن تاثیرگذار می‌باشند، مشخص گردید.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از دانه کاکائوی کامرون (ارقام فارستو^۱) استفاده شد. دانه‌های کاکائو (تخمیر شده، خشک و بوجاری شده) از شرکت صنعتی شیرین عسل (تبریز، ساخت ایران) تهیه شد. کربنات پتاسیم (K_2CO_3)، هیدروکسید سدیم ($NaOH$)، بی کربنات آمونیوم (NH_4HCO_3)، n-هگزان، اسید استیک، اسید گالیک، متانول، اسید فرمیک، استون، کربنات سدیم (Na_2CO_3)، معرف فولین سیوکالتو^۲ و سایر معرف‌های تجزیه‌ای از شرکت شیمیایی سیگما (شرکت سیگما-آلد ریچ، ساخت آمریکا) خریداری شد.

روش تولید

پژوهش حاضر طی دو فاز انجام گرفت؛ فاز اول: بررسی خط تولید پودر کاکائوی شرکت شیرین عسل: در شرکت شیرین عسل دانه کاکائو از مزارع کشور کامرون تهیه می‌شود، عملیات تخمیر در مزارع کشور مبدأ انجام می‌گیرد. مراحل تولید پودر کاکائو به شرح زیر می‌باشد؛ مرحله تمیز کردن: پس از تمیز کردن و ذخیره سازی دانه‌ها، خشک کردن اولیه (با جریان هوای داغ ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۲۰ ثانیه) صورت می‌گیرد. فرایند بوجاری، شکستن دانه‌ها و طبقه بندی: جهت جدا شدن پوسته که به این ترتیب مغز حاصل می‌شود. فرایند آلكالیزاسیون: عمل قلیایی شدن با محلول کربنات پتاسیم (نسبت دانه به محلول ۱۰۰:۳۰۰) تحت بخار با فشار ۳ بار و به مدت ۸۰ دقیقه انجام می‌شود. فرایند بودادن: (رطوبت دانه از ۱۸ درصد (بعد آلكالیزاسیون) به ۱/۵-۲ درصد می‌رسد)، (دما ۱۱۰-۱۱۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۲۵-۱۳۵ دقیقه). آسیاب کردن تحت فرایند دو مرحله‌ای: الف) مرحله آسیاب: اندازه ذرات به

فاز دوم: دانه‌های کاکائو کامرون تحت تمیز کردن، خشک کردن در ۱۰۰ درجه سانتی گراد، پوست کنی و

¹ Forastero

² Folin-Ciocalteu

Teranishi و Egging, Mon, Flath, Schultz (۱۹۷۷) حرارت داده شد. ترکیبات عطروطعم فرار در هگزان (۲ میلی‌لیتر) به‌دام‌افتاد. ۱ میکرولیتر از آنها روی کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی (مارک Agilent، ساخت آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت، درمورد نمونه‌های فاز اول، ارزیابی ترکیبات فرار عطروطعم انجام گرفت و درمورد تیمارهای فاز دوم، اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات آلکیل‌پیرازین (۲-متیل‌پیرازین، ۳،۲-دی‌متیل‌پیرازین، ۵،۲-دی‌متیل‌پیرازین، ۵،۳،۲-تری‌متیل‌پیرازین و ۶،۵،۳،۲-تترامتیل‌پیرازین) به‌عمل آمد، قبلاً استاندارد ۵ ترکیب پیرازینی موردنظر به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شده بود.

مشخصات دستگاه GC-MS

یک دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent 7890A، ساخت آمریکا) مجهز به آشکارساز جرمی (مدل Agilent 5975 C، نرم‌افزار HP Chemstation در محیط ویندوز و اینجکتور با مد split/splitless و ستون موبین HP-5 MS با طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر از شرکت Agilent، ساخت آمریکا). دمای اولیه آن در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه نگه‌داشته شده و بعد با سرعت ۸ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد و ۳ دقیقه در همان دما می‌ماند. از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل استفاده گردید. جریان گاز حامل ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. دریچه تزریق در مد Split با نسبت ۱:۵۰۰ و گستره رنج جرمی از ۴۰ تا ۵۰۰ جرم بر بار می‌باشد. به‌منظور شناسایی ترکیبات از کتابخانه جرمی (Wily ۲۰۰۷ و NIST ۲۰۰۵) موجود در دستگاه استفاده شد. دمای دریچه تزریق در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود. پردازش داده‌های دستگاه با استفاده از نرم‌افزار Chemstation در محیط ویندوز انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های کیفی در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD^۱) انجام شدند. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA^۲) با استفاده از نرم‌افزار آماری Mstatc نسخه ۱.۱.۰ انجام شد. از آزمون دانکن برای مقایسه تفاوت بین

خردکنی برای تبدیل شدن به مغز کاکائو (nib) قرار گرفتند، این عملیات در شرکت شیرین عسل انجام گرفت، سپس مطابق جدول (۱) در غلظت‌ها و ترکیب‌های مختلف با محلول‌های NaOH، K₂CO₃ و NH₄HCO₃ قلیایی شدند. مغزهای کاکائوی قلیایی شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد بوداده شدند. نمونه‌ها در یک آسیاب آزمایشگاهی به پودر تبدیل شده و تا زمان انجام آزمون‌ها در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱- معرفی تیمارهای تهیه شده در شرایط قلیایی مختلف

نمونه	درجه آلکالیزاسیون
A ₀	پودر کاکائوی بدون قلیا (pH: ۵/۲-۵/۶)
A ₁	پودر کاکائو با قلیابیت سبک یا متوسط (۶/۵ < pH < ۷/۶)
A ₁	قلیابیت با محلول NaOH ۱ درصد
A ₂	قلیابیت با محلول K ₂ CO ₃ ۱ درصد
A ₃	قلیابیت با محلول NaOH ۱/۵ درصد و K ₂ CO ₃ ۰/۵ درصد
A ₄	قلیابیت با محلول NaOH ۱ درصد و K ₂ CO ₃ ۱ درصد
A ₅	قلیابیت با محلول NaOH ۰/۵ درصد و K ₂ CO ₃ ۱/۵ درصد
A ₆	قلیابیت با محلول NaOH ۱/۵ درصد و NH ₄ HCO ₃ ۰/۵ درصد
A ₇	قلیابیت با محلول K ₂ CO ₃ ۱/۵ درصد و NH ₄ HCO ₃ ۰/۵ درصد
A ₈	پودر کاکائو با قلیابیت سنگین (pH ≥ ۷/۶)
A ₈	قلیابیت با محلول NaOH ۳ درصد
A ₉	قلیابیت با محلول K ₂ CO ₃ ۳ درصد

اندازه‌گیری ترکیبات پلی‌فنول کل

مقدار ترکیبات پلی‌فنول کل تیمارهای تهیه شده در شرایط قلیایی مختلف با معرف سیوکالتو طبق روش Li و همکاران (۲۰۱۴) اندازه‌گیری شد. مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر (مدل HACH، ساخت آمریکا) اندازه‌گیری شد. مقدار پلی‌فنول برحسب اکی‌والان اسیدگالیک به‌صورت میلی‌گرم بر گرم بیان شد.

اندازه‌گیری ترکیبات پیرازینی

استخراج ترکیبات عطروطعم فرار

۲۵ گرم از نمونه‌های فاز اول (نمونه‌های برداشت شده از مراحل مختلف فرایند تولید پودر کاکائوی شیرین عسل) و تیمارهای پودر شده فاز دوم (نمونه‌های تهیه شده در شرایط قلیایی مختلف) به آب مقطر (۲۰۰ میلی‌لیتر) اضافه شد، ۲ میلی‌لیتر هگزان نرمال به بالن حاوی نمونه محلول اضافه شد و با استفاده از روش استخراج کلونجر طبق روش

¹ Completely randomized design

² Analysis of variance

می‌باشند. بسیاری از ترکیبات معطر فرار بعد از فرایند بودادن در اثر واکنش میلارد ایجاد شده و این ترکیبات همچنان در مراحل بعدی حفظ و در پودر کاکائو آشکار گردید. آلکالیزاسیون دانه کاکائو با تغییر pH در واکنش میلارد مؤثر می‌باشد، همچنین فرایند بودادن با ایجاد دمای بالا، واکنش بین پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، پلی‌فنول‌ها و محصولات میلارد را بهبود می‌بخشد (Afoakwa, Paterson, Fowler, & Ryan, 2008; Farah & Zaibunnisa, 2012).

میانگین مقادیر در سطح معنی‌داری ($P \leq 0.01$) استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی نتایج ارزیابی ترکیبات عطروطعم فرار از مراحل مختلف خط تولید پودر کاکائو باتوجه به جدول (۲) فرایند بودادن و آلکالیزاسیون جزء مراحل مهم در توسعه عطروطعم محصولات کاکائویی

جدول ۲- برخی ترکیبات فرار مطلوب موجود در عطروطعم در مراحل مختلف خط تولید پودر کاکائوی شیرین عسل (درصد وزنی)*

پودر کاکائو	پرس کردن	آسیاب کردن	بودادن	آلکالیزاسیون	دانه کاکائو	R.T**	ترکیبات
Alcohols							
۱/۳۸±۰/۱۱ ^a	۱/۱۳±۰/۱۳ ^{ac}	۱/۰۹±۰/۱۰ ^a	۱/۰۵±۰/۰۲ ^a	۰/۰۵±۰/۱۵ ^b	۰/۰۵±۰/۰۱ ^c	۹/۴۹	Linalool
۰/۰۵±۰/۰۱ ^a	۰/۰۶±۰/۰۴ ^c	۰/۰۵±۰/۰۴ ^a	۰/۰۵±۰/۰۴ ^a	۰/۰۳±۰/۰۶ ^a	۰/۰۳±۰/۰۳ ^a	۴/۶۱	2- Hexanol
۰/۰۴±۰/۰۲ ^a	۰/۰۶±۰/۰۴ ^c	۰/۰۶±۰/۰۴ ^a	۰/۰۵±۰/۰۴ ^a	۰/۰۳±۰/۰۲ ^a	۰/۰۲±۰/۰۱ ^a	۴/۵۵	1-Hexanol
Aldehydes							
۴/۶۷±۰/۳۳ ^a	۱/۷۰±۰/۰۲ ^c	۱/۴۰±۰/۰۲ ^{bc}	۰/۸۰±۰/۳۲ ^{cd}	۰/۵۶±۰/۰۲ ^d	۰/۳۸±۰/۱۶ ^d	۶/۰۴	Benzaldehyde
۴/۲۱±۰/۳۰ ^a	۳/۹۷±۰/۴۰ ^c	۲/۱۷±۰/۱۷ ^b	۲/۰۲±۰/۰۲ ^b	۱/۱۰±۰/۰۱ ^c	۰/۱۰±۰/۰۲ ^d	۸/۰۵	Phenylacetaldehyde
۲/۱۶±۰/۳۰ ^a	۲/۶۸±۰/۱۰ ^c	۰/۹۶±۰/۰۳ ^b	۰/۴۲±۰/۰۳ ^b	-	-	۱۹/۸۱	5-methyl -2-Phenyl -2-hexenal
۰/۹۲±۰/۳۵ ^{ab}	۰/۷۰±۰/۰۳ ^c	۱/۳۰±۰/۰۲ ^a	۰/۴۰±۰/۰۲۵ ^{bg}	-	۰/۱۶±۰/۰۵ ^c	۳۶/۰۶	2-hexenal
Esters							
۱/۵۳±۰/۲۳ ^a	۱/۲۳±۰/۰۲ ^{ab}	۱/۶۰±۰/۰۲ ^a	۱/۶۶±۰/۰۱ ^a	-	۰/۲۳±۰/۰۱ ^b	۴/۲۹	Isoamyl acetate
۲/۶۸±۰/۰۲ ^a	۲/۵۰±۰/۱۵ ^a	۱/۷۰±۰/۰۲ ^b	۰/۵۵±۰/۰۶ ^c	۰/۱۸±۰/۰۱ ^c	۰/۱۷±۰/۰۱ ^c	۱۳/۷۸	2-Phenethyl acetate
۳/۲۲±۰/۲۲ ^a	۳/۶۰±۰/۰۲ ^a	۳/۵۰±۰/۰۲۵ ^a	۳/۳۰±۰/۰۳ ^a	-	۰/۳۸±۰/۰۷ ^b	۱۷/۴۰	Isobutyl benzoate
۱/۶۲±۰/۰۲ ^a	۱/۰۶±۰/۰۶ ^b	۱/۲۸±۰/۰۲۸ ^{ab}	۱/۱۰±۰/۰۱ ^b	-	۰/۰۷±۰/۰۲ ^c	۲۲/۲۱	Ethyl laurate
Ketones							
۰/۲۶±۰/۰۲ ^a	۰/۲۷±۰/۰۱ ^a	۰/۲۸±۰/۰۱۵ ^a	۰/۳۸±۰/۰۱ ^a	-	-	۴/۵۹	2-Heptanone
۰/۷۷±۰/۰۲ ^a	۰/۷۸±۰/۰۲ ^a	۰/۵۰±۰/۰۱۵ ^a	۰/۵۳±۰/۰۲۱ ^a	-	-	۸/۶۴	Acetophenon
۰/۹۰±۰/۰۳ ^a	۱/۰۰±۰/۰۱ ^a	۰/۹۵±۰/۰۵ ^a	۰/۹۷±۰/۰۴ ^a	-	۰/۱۴±۰/۰۷ ^b	۹/۲۸	Methyl heptyl ketone
۱/۵۲±۰/۰۲ ^a	۱/۰۴±۰/۰۲ ^b	۰/۹۸±۰/۰۲ ^b	۱/۱۳±۰/۰۱۵ ^b	-	-	۲۹/۳۰	2-Pentadecanone
Pyrazines							
۰/۲۶±۰/۰۲ ^a	۰/۳۱±۰/۰۱ ^a	۰/۲۵±۰/۰۲ ^a	۰/۲۳±۰/۰۱ ^b	۰/۲۱±۰/۰۲ ^b	-	۶/۹۰	2-Ethyl-3-methylpyrazine
۲/۶۹±۰/۰۲ ^a	۳/۰۰±۰/۰۱ ^a	۲/۹۰±۰/۰۲ ^a	۱/۹۶±۰/۰۲ ^b	۰/۳۰±۰/۰۲ ^c	۰/۵۰±۰/۰۱ ^c	۹/۱۵	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine
۰/۲۳±۰/۰۱۳ ^a	۰/۳۷±۰/۰۱۷ ^a	۰/۳۱±۰/۰۱ ^a	۰/۳۰±۰/۰۲ ^a	-	-	۱۳/۴۶	2,5-Dimethylpyrazine
۰/۶۶±۰/۰۳۳ ^a	۰/۷۴±۰/۰۲ ^a	۰/۷۳±۰/۰۲ ^a	۰/۰۹±۰/۰۴ ^b	-	۰/۰۵±۰/۰۴ ^b	۱۴/۳۲	2,3,5-Trimethylpyrazine
Pyrrole							
-	-	-	-	۰/۶۲±۰/۰۲۰	-	۸/۳۱	1H-Pyrrole, 1-pentyl
-	۰/۲۹±۰/۰۲ ^a	-	-	۰/۵۲±۰/۰۲ ^a	-	۱۴/۷۷	Indole (1H-Indole)

* اعداد، میانگین ± انحراف معیار از سه تکرار می‌باشد.

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.01$).

** زمان بازداری در دستگاه GC-MS (دقیقه)

لینالول و ۲-فنیل اتانول مهم‌ترین الکل‌های موجود در دانه‌های کاکائوی بوداده شده، می‌باشند (Jinap, Rosli, & Russly, 1998). در این تحقیق، ترکیب ۲-فنیل اتانول در نمونه‌های مورد آزمایش، مشاهده نشد. نسبت مقدار ترکیب لینالول به ترکیب بنزالدئید می‌تواند به‌عنوان شاخص عطر و طعم استفاده شود. اگر مقدار عددی این نسبت بیشتر از ۰/۳ باشد نشان‌دهنده کیفیت مطلوب دانه‌های کاکائو می‌باشد (Ziegler, 2009)، که در این مطالعه، مقدار عددی شاخص عطر و طعم حدود ۰/۳ بود.

محققین گزارش کردند که در فرایند بودادن میزان ترکیبات الکی، در اثر افزایش دما کاهش می‌یابد که علت آن، فرار یا از بین رفتن الکل‌ها در هنگام بودادن می‌باشد (Jinap et al., 1998). ولی در این مطالعه، باتوجه به داده‌های جدول (۲) و همچنین به دلیل دمای نسبتاً پایین طی فرایند بودادن، کاهش ترکیبات الکی مشاهده نشد. در بین ترکیبات الکی، مقدار لینالول در سطح معنی‌داری بیشتر از سایر ترکیبات الکی بود ($P \leq 0.01$). در جدول (۲) تعدادی از ترکیبات پیرولی موجود در نمونه‌ها نیز نشان داده شده است. ترکیبات پیرولی در مراحل خشک کردن و بودادن، از طریق تجزیه استرک و واکنش میلارد با استفاده از اسید آمینه پرولین تشکیل می‌شوند. این ترکیبات عطر و طعم مطلوب کاراملی، شکلاتی و برشته‌ای ایجاد می‌کنند (Rodriguez-Campos et al., 2011).

در جدول (۳) ترکیبات فراری که به‌عنوان ترکیبات دارای عطر و طعم نامطلوب برای دانه‌های کاکائو محسوب می‌شوند، گزارش شده است، به‌عنوان مثال ترکیبات آلکانی از این گروه می‌باشند. ترکیبات آلکانی در برخی از ارقام دانه کاکائو دیده می‌شوند. وجود این ترکیبات در مقادیر بالا، باعث می‌شود تا بوی ترکیبات آرومای فرار مطلوب، نامحسوس باشد.

بسیاری از مواد معطر بی‌نظیر شامل الکل‌ها، اسیدها، آلدئیدها، استرها، کتون‌ها، پیرازین‌ها و ترکیبات پیرولی در جدول (۲) نشان داده شده است که طبق مطالعه‌های قبلی، مؤثرترین ترکیبات ایجادکننده عطر و طعم در محصولات کاکائو می‌باشند. باتوجه به داده‌های جدول (۲)، از بین ترکیبات معطر فرار، پیرازین‌ها و استرها دو گروه عمده می‌باشند که در عطر و طعم کاکائو نقش بسزایی دارند (Rodriguez-Campos, Escalona-Buendía, Orozco-Avila, Lugo-Cervantes, & Jaramillo-Flores, 2011). ترکیبات پیرازینی بخصوص ترکیب تترامتیل پیرازین به‌عنوان شاخص ترکیبات عطر و طعم در دانه کاکائو بوداده شده شناخته شده است (Zyzelewicz et al., 2018). در این تحقیق، درصد وزنی تترامتیل پیرازین در دانه کاکائو در حدود ۰/۵ درصد بود، در حالی که مقدار آن در پودر کاکائو به ۲/۶۹ درصد رسید. در بین مراحل مختلف فرایند، بیشترین درصد افزایش تترامتیل پیرازین در مرحله بودادن مشاهده شد. همان‌طور که در جدول (۲) مشاهده شد، در مرحله آلکالیزاسیون، بعضی از ترکیبات استری موجود در دانه کاکائو مانند ایزوآمیل استات، ایزوبوتیل بنزوات و اتیل لورات ناپدید شدند، در حالی که در مرحله بودادن دوباره این ترکیبات ظاهر شدند، این امر نشان می‌دهد که مقدار زیادی از ترکیبات استری در اثر واکنش میلارد در مرحله بودادن تشکیل و در فرایندهای بعدی حفظ شده و در نهایت در ترکیبات پودر کاکائو نیز مشاهده شدند. در مقایسه با سایر استرها، ایزوبوتیل بنزوات در پودر کاکائو بیشترین مقدار (۳/۲۲ درصد) را نشان داد.

باتوجه به جدول (۳) ترکیباتی از قبیل بنزالدئید، فنیل استالدئید و ۲-هگزنال در دانه کاکائو مشاهده شد، اما ۵-متیل-۲-فنیل-۲-هگزنال در دانه کاکائو یافت نشد، این ترکیب بعد از فرایند بودادن از طریق واکنش میلارد تشکیل شد. ترکیبات آلدئیدی و کتونی برای توسعه عطر و طعم مطلوب کاکائو نقش مؤثری دارند، این ترکیبات معمولاً در هنگام بودادن از تجزیه استرک اسیدهای آمینه آزاد مشتق می‌شوند (Rodriguez-Campos et al., 2011). همان‌طور که در جدول (۲) مشاهده می‌شود بسیاری از ترکیبات کتونی بعد از مرحله بودادن تشکیل شده است.

جدول ۳- برخی ترکیبات فرار نامطلوب موجود در عطر و طعم در مراحل مختلف خط تولید پودر کاکائوی شیرین عسل (درصد وزنی)**

ترکیبات	R.T**	دانه کاکائو	آلکالیزاسیون	بودادن	آسیاب کردن	پرس کردن	پودر کاکائو
Alcohols							
1-Hexanol	۲۴/۵۶	۰/۰۵±۰/۰۳ ^b	۰/۰۷±۰/۰۱ ^b	۰/۸۹±۰/۰۱ ^a	۰/۰۹±۰/۰۱ ^b	۱/۰۰±۰/۰۳ ^a	۰/۰۹±۰/۰۱ ^b
Esters							
Ethyl myristate	۲۶/۷۹	۰/۰۸±۰/۰۳ ^b	-	۱/۳۰ ± ۰/۲۰ ^a	۱/۴۰±۰/۲۰ ^a	۱/۲۳±۰/۲۰ ^a	۱/۴۳±۰/۲۰ ^a
Methyl palmitate	۳۰/۷۳	۰/۵۲±۰/۲۰ ^d	۰/۵۷±۰/۳۰ ^d	۱/۲۰±۰/۱۵ ^a	۳/۳۰±۰/۱۰ ^c	۴/۰۶±۰/۳۵ ^b	۴/۲۰±۰/۱۰ ^a
Methyl stearate	۳۲/۴۷	۰/۳۸±۰/۰۱ ^b	-	۳/۳۰±۰/۱۰ ^a	۳/۵۰±۰/۲۰ ^a	۳/۶۰±۰/۲۰ ^a	۳/۲۲±۰/۲۲ ^a
Ethyl Oleate	۳۲/۹۶	-	۰/۴۳±۰/۱۰ ^d	۱/۵۰±۰/۲۰ ^c	۴/۷۰±۰/۲۰ ^b	۴/۸۰±۰/۲۰ ^b	۵/۲۰±۰/۱۰ ^a
Acids							
Oleic acid	۳۲/۶۶	۱۳/۲۳±۱/۰۰ ^a	۰/۶۶±۰/۱۰ ^d	۳/۸۳±۰/۱۰ ^b	۳/۴۵±۰/۴۵ ^{bc}	۲/۳۸±۰/۲۰ ^c	۰/۶۶±۰/۲۰ ^d
Palmitic acid	۲۹/۶۴	۱۵/۸۹±۱/۰۰ ^a	۱/۹۳±۰/۲۰ ^c	۷/۲۰±۱/۰۰ ^b	۶/۸۰±۱/۰۰ ^b	۶/۷۰±۰/۲۰ ^b	۷/۱۰±۰/۱۰ ^b
Stearic acid	۳۲/۸۹	۵/۰۱±۰/۲۰ ^a	۰/۶۶±۰/۲۰ ^d	۴/۰۴±۰/۲۰ ^b	۳/۵۰±۰/۲۰ ^c	۳/۶۰±۰/۲۰ ^{bc}	۳/۸۰±۰/۲۰ ^{bc}
Alkanes							
Nonane	۴/۷۱	۰/۰۷±۰/۰۱ ^{bc}	۰/۰۳±۰/۰۲ ^c	۰/۳۰±۰/۲۰ ^{ab}	۰/۳۵±۰/۲۰ ^a	۰/۳۳±۰/۲۱ ^a	۰/۴۰±۰/۲۰ ^a
Nonadecane	۲۹/۱۵	۷/۵۴±۰/۲۰ ^b	۱۰/۴۶±۱/۰۰ ^a	۶/۴۷±۰/۲۰ ^b	۴/۵۲±۰/۲۰ ^c	۰/۹۷±۰/۲۲ ^d	۰/۶۱±۰/۲۰ ^d
Tricosane	۳۴/۳۲	-	-	۰/۳۰±۰/۲۰ ^a	۰/۳۴±۰/۱۵ ^a	۰/۳۷±۰/۰۲ ^a	۰/۳۶±۰/۰۲ ^a
Heptacosane	۳۶/۳۱	۲/۸۴±۰/۲۲ ^a	۰/۹۱±۰/۲۰ ^{bc}	۰/۹۵±۰/۲۰ ^{bc}	۱/۴۰±۰/۲۰ ^b	۰/۶۳±۰/۰۲ ^c	۰/۹۴±۰/۲۰ ^{bc}
Pentacosane	۳۶/۲۷	۹/۳۷±۰/۵۳ ^b	۱۳/۱۲±۰/۳۷ ^a	۷/۶۰±۰/۴۷ ^b	۴/۲۰±۰/۵۱ ^c	۱/۴۰±۰/۲۰ ^{cd}	۰/۵۴±۰/۲۰ ^d

* اعداد، میانگین ± انحراف معیار از سه تکرار می باشد.

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد ($P \leq 0.01$).

** زمان بازداری در دستگاه GC-MS (دقیقه)

بررسی تأثیر نوع و غلظت محلول قلیایی روی مقدار پلی فنول کل در پودر کاکائو براساس نتایج آماری **جدول (۱)** مقدار پلی فنول کل نمونه ها در تیمارهای مختلف، اختلاف آماری معنی دار دارند ($P \leq 0.01$). دانه کاکائو از نظر پلی فنول ها غنی می باشد و این مواد ۱۲ تا ۱۸ درصد وزن خشک کل دانه را تشکیل می دهد (Kim & Keeney, 1984). پلی فنول موجود در محصولات حاوی کاکائو با خصوصیات سلامت بخشی برای بدن انسان همراه است، همچنین در تولید رنگ قهوه ای خاص کاکائو و طعم گسی نقش دارد. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) نشان داد که مقدار پلی فنول کل در پودرهای کاکائو با تغییر نوع و غلظت محلول قلیایی به طور قابل توجهی ($P \leq 0.01$) تغییر کرده است. کمترین مقدار پلی فنول کل در پودرهای قلیایی در نمونه A₀ (قلیاییت با محلول K_2CO_3 ۳ درصد) مشاهده شد. در یک غلظت ثابت و مشخص، قلیاییت با محلول K_2CO_3 باعث شد، مقدار پلی فنول کمتری نسبت به قلیاییت با محلول NaOH تولید شود (**جدول ۴**). به همین روال، قلیاییت با ترکیبی از محلول های K_2CO_3 و

NH_4HCO_3 نسبت به ترکیبی از محلول های NaOH و NH_4HCO_3 محتوای پلی فنول پایین تری را به نمایش گذاشت. نتایج مشابه در مورد قلیاییت با سود و کربنات پتاسیم، توسط محققان گزارش شده است (Li et al., 2014; Rodríguez, Pérez, & Guzmán, 2009). همان طور که اشاره شد، پودر کاکائو یکی از غنی ترین منابع غذایی حاوی پلی فنول (براساس وزن) می باشد که تاکنون شناخته شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که قلیاییت باعث شد، در مقایسه با پودر کاکائوی طبیعی، سطح پلی فنول در پودرهای کاکائوی قلیایی، کاهش یابد. پودر کاکائوی قلیایی نشده، بالاترین مقدار پلی فنول کل را دارا می باشد (۱۶/۷۵ میلی گرم بر گرم، **جدول ۱**). نتایج مشابه توسط محققان گزارش شده است (Gültekin-Özğüven, 2016; Berктаş, & Özçelik, 2016; Miller et al., 2008).

تأثیر نوع و غلظت محلول قلیایی بر میزان آلکیل پیرازین‌ها و نسبت TMP/TrMP در پودر کاکائو براساس نتایج آماری جدول (۴) میزان آلکیل پیرازین‌ها و نسبت TMP/TrMP نمونه‌ها در تیمارهای مختلف، اختلاف آماری بسیار معنی‌دار دارند ($P \leq 0.01$). همچنین میان میانگین میزان آلکیل پیرازین و نسبت TMP/TrMP نمونه‌ها اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد ($P \leq 0.01$). تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) نشان داد که میزان آلکیل پیرازین‌های پودر کاکائو (۲- متیل پیرازین، ۳،۲- دی‌متیل پیرازین، ۵،۲- دی‌متیل پیرازین، تری‌متیل پیرازین و ۶،۵،۳،۲- تترامتیل پیرازین) با تغییر نوع و غلظت محلول قلیایی به‌طور قابل توجهی تغییر کردند ($P \leq 0.01$). یک کروماتوگرام از نمونه پودر A5، قلیاییت با محلول NaOH ۰/۵ درصد و K_2CO_3 ۱/۵ درصد در شکل (۲) نشان داده شده است. پودر کاکائوی A2 که به‌وسیله محلول K_2CO_3 ۱ درصد قلیایی شد، بیشترین مقدار آلکیل پیرازین کل و تترامتیل پیرازین را داشت (جدول ۴)، به‌ترتیب آلکیل پیرازین ۴۰/۴۷۰۴۰ و ۱۰/۱۶۷۶۷ (پودر کاکائویی که به‌وسیله محلول NaOH ۳ درصد قلیایی شد، کمترین مقدار آلکیل پیرازین کل و تترامتیل پیرازین را داشت (جدول ۴)).

واکنش میلارد را می‌توان به سه مرحله تقسیم کرد: مرحله اول با تراکم قند-آمین و بازآرایی آمادوری شروع می‌شود. مرحله میانی با ازدست‌دادن آب ترکیب قندی و تکه‌تکه‌شدن آن و شکستن اسیدآمین شروع می‌شود و مرحله آخر منجر به تشکیل ترکیبات هتروسیلیک نیتروژنی می‌شود (Davies & Labuza, 1997). قندهای احیاکننده در فرم زنجیره باز و گروه‌های آمینه به فرم $-NH_2$ واکنش‌دهنده‌های فعال برای اولین مرحله از واکنش میلارد می‌باشند. شرایط خنثی و قلیایی بیشتر از شرایط اسیدی، به تشکیل حلقه باز قندهای احیاکننده کمک می‌کند (Van Boekel, 2006; Yaylayan, Ismail, & Mandeville, 1993).

جدول ۴- تأثیر شرایط مختلف آلکالیزاسیون روی مقدار آلکیل پیرازین‌ها (ppb) و پلی فنول کل (میلی گرم بر گرم) در نمونه‌های پودر کاکائو*

نمونه	آلکیل پیرازین‌ها**						pH	پلی فنول کل (میلی گرم بر گرم)
	2-MP	2,3-DMP	2,5-DMP	2,3,5-TrMP	2,3,5,6-TMP	TMP/TrMP		
A ₀	۱۹۶۷/۸۰±۴۰/۰ ^{ab}	۱۳۵۳۲±۲۵۲۰ ^c	۱۹۶۷/۸۰±۴۰/۰ ^c	۱۰۴۷۵/۰±۲۰/۰ ^f	۱۲۸۷۱/۹۰±۲۰/۰ ^c	۱/۲۰±۰/۰ ^{ab}	۳۰۶۱۱/۸۰ ^d	۵/۳۵±۰/۱۰ ^d
A ₁	۱۷۵۵/۰±۵۰/۰ ^{efg}	۱۳۷۲/۵±۲۰/۰ ^d	۱۷۵۵/۰±۲۰/۰ ^e	۹۵۲۶/۰±۲۰/۰ ^g	۱۱۶۷۱/۹۰±۳۰/۰ ^f	۱/۱۰±۰/۰ ^{bc}	۲۷۸۰۱/۹۰ ^h	۷/۰۲±۰/۰ ^{bc}
A ₂	۲۷۹۷/۵±۶۰/۰ ^a	۲۳۲۷/۰±۲۰/۰ ^a	۲۷۹۷/۵±۱۰/۰ ^a	۱۶۳۳۱/۴۰±۲۰/۰ ^a	۱۶۶۶۷/۱۰±۳۰/۰ ^a	۱/۰±۰/۰ ^{de}	۴۴۰۴۷/۴۰ ^a	۶/۸۹±۰/۰ ^c
A ₃	۱۸۴۹/۱۰±۷۲/۰ ^{def}	۱۲۹۲/۷±۲۰/۰ ^d	۱۸۴۹/۱۰±۲۰/۰ ^e	۱۰۴۴۳/۴۰±۲۰/۰ ^e	۱۱۷۶۷/۸۰±۳۰/۰ ^e	۱/۰±۰/۰ ^{cd}	۲۹۲۴۰/۰ ^f	۶/۸۳±۰/۰ ^c
A ₄	۱۸۷۶/۳±۱۵/۰ ^{de}	۱۳۸۷/۴±۳۰/۰ ^c	۱۸۷۶/۳±۴۰/۰ ^d	۱۶۶۰۳/۷±۲۶/۰ ^c	۱۳۲۷۹/۲±۲۰/۰ ^b	۱/۰±۰/۰ ^d	۳۲۹۱۴/۹۰ ^d	۷/۰۴±۰/۱۰ ^{bc}
A ₅	۲۱۱۵/۵±۸۳/۳ ^c	۱۶۶۸/۰±۲۰/۰ ^b	۲۱۱۵/۵±۲۹/۷ ^{cd}	۱۶۴۹۷/۵±۱۹/۹ ^b	۱۳۳۳۷/۸۰±۲۰/۰ ^b	۰/۸۰±۰/۰ ^g	۳۷۴۴۲/۵ ^e	۷/۰±۰/۱۰ ^{bc}
A ₆	۱۶۸۱/۰±۲۰/۰ ^g	۱۱۲۳/۳±۲۰/۰ ^f	۱۶۸۱/۰±۲۰/۰ ^f	۹۰۲۱/۷±۲۰/۰ ^h	۱۰۱۳۳/۸۰±۳۰/۰ ^h	۱/۱۰±۰/۰ ^{bc}	۲۴۴۹۱/۸۰ ⁱ	۷/۳۳±۰/۱۹ ^b
A ₇	۲۲۷۴/۶±۲۰/۰ ^b	۱۶۹۹/۴±۲۰/۰ ^b	۲۲۷۴/۶±۳۰/۰ ^b	۱۳۴۸۸/۱±۲۰/۰ ^d	۱۲۳۵۵/۶±۳۰/۰ ^d	۰/۹۳±۰/۰ ^{ef}	۳۴۱۴۱/۷۰ ^c	۶/۹۴±۰/۰ ^{bc}
A ₈	۱۳۰۳/۴±۴۵/۸ ^b	۱۱۵۵/۱۰±۲۰/۰ ^{ef}	۱۳۰۳/۴±۲۰/۰ ^g	۷۳۳۹/۰±۳۰/۰ ⁱ	۷۶۳۷/۹۰±۲۰/۰ ⁱ	۱/۰±۰/۰ ^{de}	۱۹۶۶۴/۶۰ ^j	۸/۲۸±۰/۱۰ ^a
A ₉	۱۷۲۲/۰±۱۰/۰ ^{fg}	۱۱۸۸۷/۰±۲۰/۰ ^e	۱۷۲۲/۰±۲۰/۰ ^{cd}	۱۰۷۲۱/۲±۲۰/۰ ^g	۱۰۶۶۵/۵±۳۰/۰ ^g	۰/۹۰±۰/۰ ^f	۲۸۱۳۴/۳۰ ^g	۸/۳۸±۰/۰ ^{cd}

* اعداد، میانگین ± انحراف معیار از سه تکرار می‌باشد.
 ** ترکیبات MP: متیل پیرازین، DMP: دی‌متیل پیرازین، TrMP: تری‌متیل پیرازین، TtMP: تترامتیل پیرازین و نسبت تترامتیل پیرازین به تری متیل پیرازین می‌باشد.

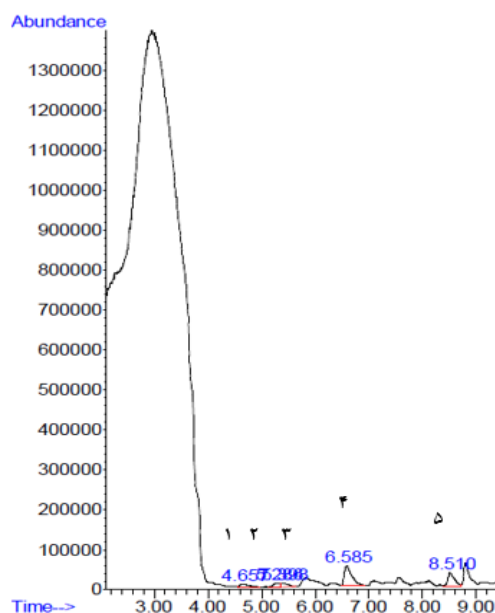
نسبت به شرایط pH پایین، ساخته می شود (Huang & Barringer, 2010).

نسبت بین ۵،۳،۲-تری متیل پیرازین و ۶،۵،۳،۲-تترامتیل پیرازین (TMP/TrMP) در نمونه های پودر کاکائو، پس از آلکالیزاسیون در شرایط مختلف، در جدول (۳) نشان داده شده است. در پودرهای کاکائو، نسبت TMP به TrMP با تغییر نوع محلول قلیایی به طور قابل توجهی تغییر کرد ($P \leq 0.01$). پودر کاکائوی قلیایی نشده، بالاترین مقدار نسبت TMP/TrMP را داشت.

طی ارزیابی حسی در تحقیق های مختلف گذشته، تعیین شده است که درجه بودادن کاکائو زمانی طبیعی است که نسبت TMP/TrMP برابر یا در حدود عدد ۱ باشد، در این صورت محصولات کاکائو کیفیت عطر و طعم مطلوبی را نشان می دهند. اگر این نسبت بزرگ تر از عدد ۱ باشد، کیفیت عطر و طعم پودر کاکائو ضعیف است زیرا هنوز به اندازه کافی مقدار TrMP افزایش نیافته است. نسبت پایین تر از عدد ۱، نشان دهنده توسعه بیش از اندازه تری متیل پیرازین، بیشتر بودن دمای فرایند بودادن کاکائو و حضور بوی سوختگی می باشد (Hashim & Chaveron, 1994; Huang & Barringer, 2010; Serra Bonvehí & Ventura Coll, 2002).

تاکنون هیچ مطالعه ای، نسبت TMP/TrMP برای شرایط آلکالیزاسیون کاکائو ارزیابی نکرده است، اما اگر این بررسی صورت بگیرد، باید شرایط بودادن نه تنها با تغییر pH بلکه با تغییر نوع قلیا نیز تنظیم شود. برای مثال در نمونه هایی با pH پایین (با درجه قلیائیت سبک)، زمان طولانی تر و یا درجه حرارت بالاتری در مرحله بودادن برای افزایش محتوای TrMP لازم است. در نمونه هایی که pH بالایی دارند (با درجه قلیائیت بالا)، زمان بودادن باید کوتاه تر باشد یا دمای بودادن پایین تر باشد (Huang & Barringer, 2010). برای نمونه های با نوع قلیاهای مختلف، شرایط بودادن (زمان و دما) باید متفاوت باشد. به عنوان مثال، تیمار A₅، نسبت TMP/TrMP پایینی دارد (۰/۸)، جدول (۴)، بنابراین زمان بودادن باید کوتاه تر باشد یا دما پایین تر باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که پودرهای کاکائو در مقادیر مختلف غلظت محلول قلیایی حاوی مقادیر مختلف آلکیل پیرازین می باشند جدول (۴). مقادیر آلکیل پیرازین ها و مقادیر نسبت TMP/TrMP برای نمونه های با درجه آلکالیزاسیون سبک، نسبت به نمونه قلیایی نشده، بیشتر بود.



شکل ۲- کروماتوگرافی پودر کاکائوی قلیایی شده با محلول NaOH ۰/۵ درصد و K₂CO₃ ۱/۵ درصد (نمونه A₅)، با روش کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی

- (۱) زمان بازداری (۴/۶۴ دقیقه): ۲-متیل پیرازین
- (۲) زمان بازداری (۵/۲۷ دقیقه): ۲،۵-دی متیل پیرازین
- (۳) زمان بازداری (۵/۳۷ دقیقه): ۲،۳-دی متیل پیرازین
- (۴) زمان بازداری (۶/۵۸ دقیقه): ۲،۳،۵-تری متیل پیرازین
- (۵) زمان بازداری (۸/۵ دقیقه): ۲،۳،۵،۶-تترامتیل پیرازین

علاوه بر این، شرط خنثی و قلیایی به دفع گروه آمینه به شکل واکنش پذیر -NH₂ از پروتئین ها، کمک می کند (Davies & Labuza, 1997). بنابراین، تحت شرایط قلیایی با افزایش واکنش گر ها (فند احیا کننده زنجیره باز و آمین با فرم NN₂-، واکنش مرحله اول میلارد پیشرفت می کند. pH قلیایی همچنین باعث تغییر ترکیبات واسطه ای می شود که در مرحله میانی ساخته شدند. pH خنثی و قلیایی به تشکیل واسطه های دهیدروردیکتون^۱ (۱-دزاکسی هگزولوز^۲) و محصولات فسیونی مانند پیرووالدئید، دی استیل و استول کمک می کند. این دی کربونیل ها با اسیدهای آمینه واکنش می دهند تا آمینوکتون ها و آلدئیدهای استرکری را تولید کنند که از طریق دیمری شدن به آلکیل پیرازین ها تبدیل می شوند (Davies & Labuza, 1997). بنابراین، در pH بالا، مرحله اول پیشرفت بیشتری می کند و پیش سازهای آلکیل پیرازینی بیشتری در مرحله میانی ساخته می شود، در نتیجه آلکیل پیرازین های بیشتری

¹ Dehydroreductone

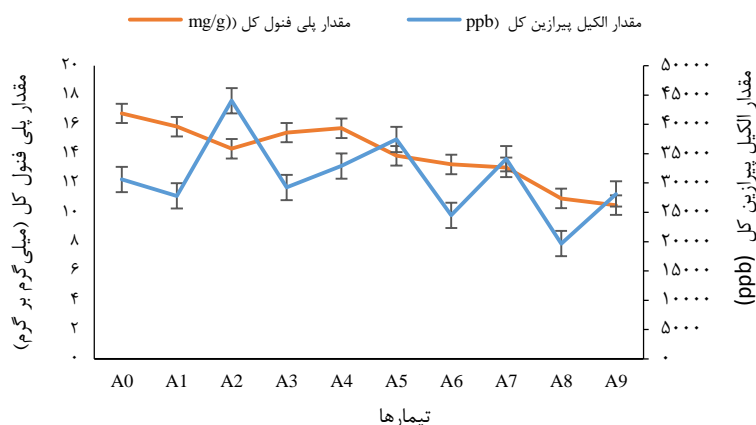
² 1-deoxyhexuloses

نسبت TMP/TrMP افزایش یافت. مطالعه آنها در مورد شرایط مختلف فرایند بودادن دانۀ کاکائو بود.

رابطه بین آلکیل پیرازین کل و محتوای پلی فنول پودر کاکائو در شرایط مختلف قلیابیت، در شکل (۳) نشان داده شده است. این احتمال وجود دارد که ترکیبات پیرازینی به پلی فنولها متصل شوند. همانطور که قبلاً گفته شد، پلی فنولها گرایش قوی برای ترکیب شدن با مواد دیگر در فرم اکسیدی و غیراکسیدی را دارند. Jinap, Jamilah و Nazamid (۲۰۰۴b) فرضیه احتمالی اتصال پیرازین پلی فنول را مطرح کردند. افزایش مقدار پلی فنول باعث می شود که قندهای احیاکننده و اسیدهای آمینه آزاد به دلیل اتصال پلی فنولها با این ترکیبات، برای تشکیل پیرازینها، کمتر در دسترس باشند. همچنین وجود پلی فنولها در دانه ممکن است بخشی از پیرازین را به خود متصل کند، بنابراین محتوای پیرازین را کاهش می دهد (Jinap, Jamilah, & Nazamid, 2004a).

شاید به این دلیل که تشکیل اکثر آلکیل پیرازینهای ایجاد شده در طی واکنش میلارد، در pH قلیایی سریع تر می باشد (Koehler & Odell, 1970). pH قلیایی، مرحله اول واکنش میلارد را تسریع و به تشکیل آلکیل پیرازینها در مرحله دوم کمک کرد. هنگامی که pH در حدود ۷ (قلیابیت سبک) بود، افزایش قابل توجهی در غلظت آلکیل پیرازینها وجود داشت. نتایج مشابه توسط Huang و Barringer (۲۰۱۰) گزارش شده است. قلیابیت سنگین ($pH \geq 8$) به ویژه به وسیله محلول NaOH مقدار آلکیل پیرازین کل و نسبت مقادیر TMP/TrMP را کاهش داد. با افزایش غلظت محلول قلیایی و دامنه pH به بالاتر از ۸، میزان آلکیل پیرازین پودرهای کاکائو به طور معنی داری کاهش یافت ($P \leq 0.01$). نتایج مشابه در مطالعه آلکیل پیرازینها و سایر ترکیبات فرار موجود در مشروبات کاکائو با pH ۵ تا ۸ گزارش شد (Liu, Cao, & Huang, Cai, & Yao, 2010).

برخلاف نتایج پژوهش حاضر، Serra Bonvehí و Ventura Coll (۲۰۰۲) اظهار داشتند که با افزایش pH



شکل ۳- ارتباط بین مقدار آلکیل پیرازین کل و مقدار پلی فنول کل در نمونه‌ها

انواع قلیاها و همچنین غلظت‌های مختلف قلیا، پارامترهای مختلف مورد آزمایش را تحت تأثیر قرار داد. نمونه A₂ (قلیابیت با K₂CO₃ ۱ درصد) دارای محتوای بالایی از آلکیل پیرازین کل و تترامتیل پیرازین بود. از نتایج چنین حاصل شد که استفاده از درصد قلیای پایین (۱ درصد) و از نوع کربنات پتاسیم عطروطعم بهتری ایجاد می کند. در مقایسه نقش انواع قلیاها در ایجاد عطروطعم، استفاده از قلیاهای ترکیبی اثر بهتری نسبت به محلول سود داشت. کمترین عطروطعم ایجاد شده مربوط به تیمار قلیایی شده با سود با غلظت بالا (۳ درصد) می باشد.

نتیجه گیری

تشکیل ترکیبات عطروطعم در طی واکنش میلارد علاوه بر زمان و درجه حرارت مرحله بودادن به pH مرحله قلیایی نیز بستگی دارد. بنابراین، با بهبود پارامترهای قلیایی، می توان خاصیت عطروطعم پودر کاکائو را تغییر داد. پودر کاکائو با انواع مختلف محلول قلیایی و با غلظت‌های مختلف، تحت عمل قلیابیت قرار گرفت و محتوای پلی فنول و محتوای آلکیل پیرازین آن مورد بررسی قرار گرفت. فرایند آلکالیزاسیون محتوای پلی فنول کل، آلکیل پیرازین و pH را تحت تأثیر قرار داد. همچنین مشاهده شد که ترکیبی از

منابع

- سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI]. (۱۳۹۳). پودر کاکائو-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. (استاندارد ملی ایران، شماره ۳۸۳، تجدیدنظر چهارم)، برگرفته از <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=41133>
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(9), 840-857. doi:<https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Aprotosoaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 73-91. doi:<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>
- Bonvehí, J. S., & Coll, F. V. (2000). Evaluation of purine alkaloids and diketopiperazines contents in processed cocoa powder. *European Food Research and Technology*, 210(3), 189-195. doi:<https://doi.org/10.1007/PL00005510>
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., . . . Heimdal, H. (2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63, 306-316. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.032>
- Davies, C. G. A., & Labuza, T. P. (1997). The Maillard reaction: application to confectionery products. *Confectionery science*, 33, 35-66.
- Farah, D. M. H., & Zaibunnisa, A. H. (2012). Optimization of cocoa beans roasting process using response surface methodology based on concentration of pyrazine and acrylamide.
- Giacometti, J., Jolić, S. M., & Josić, D. (2015). Cocoa processing and impact on composition. In *Processing and impact on active components in food* (pp. 605-612): Elsevier.
- Gültekin-Özgülven, M., Berktaş, I., & Özçelik, B. (2016). Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 559-565. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.065>
- Hashim, L., & Chaveron, H. (1994). Extraction and determination of methylpyrazines in cocoa beans using coupled steam distillation-microdistillator. *Food Research International*, 27(6), 537-544. doi:[https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90139-2](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90139-2)
- Huang, Y., & Barringer, S. A. (2010). Alkylpyrazines and other volatiles in cocoa liquors at pH 5 to 8, by selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS). *Journal of food science*, 75(1), C121-C127. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01455.x>
- Iranian National Standardization Organization. (2014). Cocoa powder - Specifications and test methods. (ISIRI Standard No. 383, 4th Revision). Retrieved from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=41133> (in Persian)
- Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. (2004a). Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food chemistry*, 85(1), 73-80. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.005>
- Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. (2004b). Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. *Food Quality and Preference*, 15(5), 403-409. doi:[https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00097-1)
- Jinap, S., Rosli, W. W., Russly, A., & Nordin, L. (1998). Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(4), 441-448. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199808\)77:4<441::AID-JSFA46>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199808)77:4<441::AID-JSFA46>3.0.CO;2-%23)

- Kim, H., & Keeney, P. G. (1984). (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of food science*, 49(4), 1090-1092. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb10400.x>
- Koehler, P. E., & Odell, G. V. (1970). Factors affecting the formation of pyrazine compounds in sugar-amine reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(5), 895-898. doi:<https://doi.org/10.1021/jf60171a041>
- Kongor, J. E., Hinneh, M., Van de Walle, D., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. *Food Research International*, 82, 44-52. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Kothe, L., Zimmermann, B. F., & Galensa, R. (2013). Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. *Food chemistry*, 141(4), 3656-3663. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.049>
- Li, Y., Zhu, S., Feng, Y., Xu, F., Ma, J., & Zhong, F. (2014). Influence of alkalization treatment on the color quality and the total phenolic and anthocyanin contents in cocoa powder. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 59-63. doi:<https://doi.org/10.1007/s10068-014-0008-5>
- Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y., & Yao, J. (2010). Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. *Bioresource technology*, 101(9), 3268-3273. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.062>
- Mazor Jolić, S., Radojčić Redovniković, I., Marković, K., Ivanec Šipušić, Đ., & Delonga, K. (2011). Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International journal of food science & technology*, 46(9), 1793-1800. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02670.x>
- Miller, K. B., Hurst, W. J., Payne, M. J., Stuart, D. A., Apgar, J., Sweigart, D. S., & Ou, B. (2008). Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of commercial cocoa powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8527-8533. doi:<https://doi.org/10.1021/jf801670p>
- Nair, K. P. (2010). *The agronomy and economy of important tree crops of the developing world*: Elsevier.
- Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Ndoumou, D. O., & Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 612-619. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.02.006>
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, M. E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44(1), 250-258. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>
- Rodríguez, P., Pérez, E., & Guzmán, R. (2009). Effect of the types and concentrations of alkali on the color of cocoa liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(7), 1186-1194. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.3573>
- Schultz, T. H., Flath, R. A., Mon, T. R., Eggling, S. B., & Teranishi, R. (1977). Isolation of volatile components from a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(3), 446-449. doi:<https://doi.org/10.1021/jf60211a038>
- Serra Bonvehí, J., & Ventura Coll, F. (2002). Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalized cocoa powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3743-3750. doi:<https://doi.org/10.1021/jf011597k>
- Van Boekel, M. (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology advances*, 24(2), 230-233. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.004>

- Yaylayan, V. A., Ismail, A. A., & Mandeville, S. (1993). Quantitative determination of the effect of pH and temperature on the keto form of D-fructose by FT IR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 248, 355-360. doi:[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)84141-R](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)84141-R)
- Ziegleder, G. (2009). Flavour development in cocoa and chocolate. *Industrial chocolate manufacture and use*, 4, 169-191. doi:<https://doi.org/10.1002/9781444301588.ch8>
- Zyzelewicz, D., Budryn, G., Oracz, J., Antolak, H., Kregiel, D., & Kaczmarska, M. (2018). The effect on bioactive components and characteristics of chocolate by functionalization with raw cocoa beans. *Food Res Int*, 113, 234-244. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.017>

The Evaluation of Desirable Aromatic Components and Polyphenolic Compounds in the Process of Cocoa Powder Production

Fariba Mohamadi Alasti¹, Narmela Asefi^{2*}, Ramin Maleki³,
Seiied Sadegh Seiiedlou Heris⁴

- 1- PhD. Student, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
- * Corresponding author (n.asefi@iaut.ac.ir)
- 3- Assistant Professor, Research Department of Chromatography, Iranian Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Urmia Branch, Urmia, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Biosystems Engineering, Tabriz University, Tabriz, Iran

Abstract

Cocoa powder and chocolate are one of the most popular ingredients used in food products. The flavor of these products plays an important role in the consumer's popularity and acceptance. Pyrazines are one of the main constituents of the heterocyclic group of volatiles and key components of odor in cocoa flavor. In order to evaluate the effect of the process of cocoa powder production on the composition of desirable fragrances, the stages of cocoa powder production line were sampled from Cameroon seeds and the samples were analyzed and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. The results showed that the alkalization stage is one of the important and effective steps on the flavor of cocoa powder. Therefore, the effect of three types of alkali (NaOH, K₂CO₃ and NH₄HCO₃) was investigated at different concentrations. The data indicated that the polyphenolac and alkylpyrazines amounts significantly changed. Non-alkaline powder had higher polyphenol and tetramethylpyrazine to trimethylpyrazine (TMP/TrMP) ratios than alkaline cocoa powder. In addition, in alkaline cocoa samples, the amounts of polyphenol and alkylpyrazine decreased with increasing alkali concentration. At the same concentration, alkalization with a NaOH solution produced a higher polyphenol content and TMP/TrMP ratio, but lower alkylpyrazine value than that with a K₂CO₃ solution. Light alkalization cocoa powder with K₂CO₃ solution (pH 6.89) produced the highest amount of alkylpyrazine

Keywords: Alkalization, Alkyl pyrazine, Cacao powder, Polyphenol, Roasting