

## بررسی اثر آنتی‌اکسیدان و نگهدارنده‌ها بر ویژگی‌های اکسایشی و میکروبی کره گردو طی زمان ماندگاری

مصطفی شهیدی نوقابی<sup>۱\*</sup>، راضیه نیازمند<sup>۱</sup>، مژده صراف<sup>۲</sup>، مهناز شهیدی نوقابی<sup>۳</sup>

۱- دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران  
\* نویسنده مسئول (m.shahidi@rifst.ac.ir)

۲- دانشجوی دکترای شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

### چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۱۳

### واژه‌های کلیدی

آنتی‌اکسیدان

زمان ماندگاری

کره گردو

نگهدارنده

گردو حاوی بسیاری از ترکیبات غذایی از جمله اسیدهای چرب امگا-۳، انواع ویتامین‌ها بخصوص ویتامین E و انواع مواد معدنی است. از این رو، گسترش محصولات غذایی بر پایه گردو و مطالعه روی آنها از جهات مختلف و از جمله پایداری شیمیایی و میکروبی طی نگهداری بسیار حائز اهمیت است. در این تحقیق به بررسی اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان بوتیل‌هیدروکسی‌تولون (BHT) در سه سطح (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر تغییرات عدد پراکسید و عدد اسیدی کره گردو و همچنین اثر دو نوع نگهدارنده اسید بنزوئیک و اسید سوربیک در دو سطح (۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) به صورت جداگانه و مخلوط بر شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و شمارش کپک و مخمر نمونه‌های کره گردو، طی ۷۵ روز نگهداری در دمای محیط پرداخته شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزودن BHT در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، عدد پراکسید به میزان قابل توجهی نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. عدد اسیدی کره گردو پس از تولید ۰/۳ درصد بود که تا روز ۷۵ام نگهداری در نمونه‌های مختلف به ۰/۴ تا ۰/۵ درصد رسید. همچنین نتایج نشان داد اسید بنزوئیک در مقایسه با اسید سوربیک کارایی بیشتری در کاهش شمارش کلی باکتری‌ها و شمارش کپک و مخمر طی دوره نگهداری دارد.

### مقدمه

تا گلی‌داغ در جلگه و ساحل تا ارتفاع ۲۲۰۰ متر از سطح دریا انتشار دارد و به‌طور پراکنده یا کم‌وبیش انبوه در جنگل‌ها از جمله جنگل‌های غرب و در راه سندانج به میروان به‌طور خودرو دیده می‌شوند (Sharafati Chaleshtori, Sharafati Chaleshtori, & Rafieian, 2011). از لحاظ تغذیه‌ای مصرف مغز گردو موجب افزایش اسید چرب ضروری امگا-۳ در مصرف‌کننده می‌گردد. ۱۵ درصد از چربی‌های گردو از نوع چربی‌های غیراشباع و

گردو<sup>۱</sup> با نام علمی *Juglans regia* از خانواده Juglandaceae است. نام علمی این جنس از کلمه لاتین *Jovis-Glans* به معنی فندق ژوپیتتر گرفته شده است. منشأ درخت گردو را آسیای غربی و نواحی هیمالیا می‌دانند. در ایران نیز گردو در جنگل‌های شمال از آستارا

<sup>۱</sup> Walnut

بنابراین بهینه‌سازی این ترکیبات نقش مهمی در بهبود کیفیت و ماندگاری آن خواهد داشت.

تندی اکسایشی مهم‌ترین نوع فساد چربی است. فساد اکسایشی چربی‌ها باعث توسعه عطر و طعم نامطلوب در فراورده شده و از طریق تولید ترکیبات سمی و فعال فیزیولوژیکی منجر به تخریب ویتامین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، کلروفیل‌ها، کاروتن‌ها، آمینواسیدها، پروتئین‌ها یا آنزیم‌ها می‌گردد. هیدروپراکسیدها و محصولات حاصل از تجزیه آنها مواد فعال بالقوه‌ای هستند که می‌توانند باعث تجزیه پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه شوند. از جمله ترکیبات جانبی که در نتیجه تجزیه هیدروپراکسیدهای حاصل از تندی اکسایشی لیپیدهای غیراشباع می‌توان به اسیدها، الکل‌ها، آلدئیدها و کتون‌ها اشاره کرد (Gardner, 1979; St. Angelo & Ory, 1975). بیشترین میزان اکسایش لیپیدهای مغزها در صورت نگهداری در شرایط محیط رخ می‌دهد و با افزایش دمای نگهداری از ۱۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد عدد پراکسید که نشانه پیشرفت اکسایش است افزایش می‌یابد (Maskan & Karataş, 1998).

آجیل‌ها ممکن است تا بیش از ۲/۵ سال در شرایط بهینه نگهداری شوند اما تحت شرایط نامطلوب در عرض یک ماه، در نتیجه تنفس، کپک‌زدن، جذب طعم‌های خارجی، بی‌رنگ شدن و تندی غیرقابل خوردن خواهند شد. محتوای چربی به تنهایی نشانگر خوبی برای بررسی پایداری در زمان نگهداری محصول نیست (Pershern, 1995; Breene, & Lulai, 1995). اما غیراشباعیت چند غیراشباعی‌ها (Löliger, 1971; Labuza & Dugan Jr, 1971; Pershern et al., 1995)، توکوفرول‌ها (Pershern et al., 1995)، کلروفیل و بتاکاروتن، محتوای رطوبت (Evranuz, 1993) و دما (Hasenhuettl & Wan, 1992; Reynhout, 1991) بر اکسایش اولیه لیپیدها و پایداری اکسایشی مواد غذایی با رطوبت متوسط در طی نگهداری تأثیر می‌گذارد (Bremner, Ford, Macfarlane, Ratcliff, & Russell, 1998; Maskan & Karataş, 1998). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌طور گسترده‌ای به‌وسیله چندین محقق مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (Abramovič & Abram, 2006; Nahm, Juliani, & Rossignol-Villeneuve, 2012; Simon, 2012). Le Guillou و Castera (۲۰۰۳) دریافتند که افزودن ۱۱

مفید برای سلامت قلب می‌باشد. این نوع چربی، پایین‌آورنده کلسترول بد<sup>۱</sup> و افزایش‌دهنده کلسترول خوب<sup>۲</sup> است. همچنین لیپوپروتئین<sup>۳</sup> (ترکیب لیپیدی دیگری که لخته‌شدن خون را افزایش می‌دهد، که در واقع عامل خطرناکی برای تصلب شرایین<sup>۴</sup> است) را کاهش می‌دهد. اسید چرب امگا-۳ از ضربان نامنظم قلب، لخته‌شدن خون در شریان‌ها (که تقریباً علت بیشتر حمله‌های قلبی است) جلوگیری کرده و برای سیستم قلب و عروق مفید است (Rajaram, Haddad, Mejia, & Sabaté, 2009). گردو بهترین منبع منگنز و مس می‌باشد. در گردو، منیزیم و فسفر نیز وجود دارد. مقداری روی، آهن، کلسیم و سلنیوم نیز پیدا شده است. گردو مقدار کمی سدیم یا نمک دارد. همچنین این محصول حاوی مقادیر قابل‌توجهی از ویتامین‌های B1، B5 و B6 می‌باشد. در گردو ویتامین‌هایی نظیر E، B2 و B3 نیز وجود دارند (Kris-Etherton et al., 1999). علاوه بر مواد مغذی که ذکر شد ریزمغذی‌هایی از قبیل رنگدانه‌ها و ترکیبات فنولی نیز در گردو وجود دارند که سبب بروز خواصی همچون خاصیت آنتی‌اکسیدانی، محرک سیستم ایمنی، ضدسرطان و ضدعفونی در گردو می‌شوند (Jenab et al., 2004). ترکیبات مهم و متعدد موجود در گردو حاکی از ارزشمند بودن آن و نشان‌دهنده خواص و اثرات وسیع آن است. گردو نیز مانند سایر مغزها از کالری زیادی (حدود ۶۵۴ کالری در هر ۱۰۰ گرم) برخوردار است. کالری موجود در گردو به‌طور عمده به‌دلیل مقادیر بالای پروتئین و چربی موجود در گردو است.

کره گردو محصول ترکیبی حاصل از گردو است که با استفاده از مغز گردوی بوداده‌شده و آسیاب‌شده همراه شیرین‌کننده (شکر یا دیگر شیرین‌کننده‌ها) و کمی نمک به‌دست می‌آید. امروزه در صنایع غذایی از افزودنی‌هایی مثل امولسیون‌کننده‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، قوام‌دهنده‌ها و غیره جهت بهبود کیفیت و افزایش عمر ماندگاری غذایی به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. البته باید توجه داشت تا مقادیر هریک از موارد ذکر شده باید در حد بهینه باشد.

<sup>1</sup> Low Density Lipoprotein (LDL)

<sup>2</sup> High Density Lipoprotein (HDL)

<sup>3</sup> Lipoprotein(a) (Lp a)

<sup>4</sup> Atherosclerosis

به‌طور معمول در غلظت ۰/۰۲۵ تا ۰/۱ درصد مورد استفاده قرار می‌گیرند و pH بهینه برای فعالیت آنها زیر ۶/۵ است. اثر نگهدارندگی اسید سوربیک به‌دلیل اثر بازدارندگی آن بر فعالیت آنزیم‌های مسئول رشد میکروارگانیسم‌هاست. این ترکیبات از طریق اثر بازدارندگی بر آنزیم‌های سولفیدریل رشد میکروارگانیسم‌ها را متوقف می‌کند. همچنین مشخص شده است که اسید سوربیک اثر بازدارندگی بر آنزیم‌های فوماراز<sup>۳</sup>، آسپارتاز<sup>۴</sup> و سوکسینیک دهیدروژناز<sup>۵</sup> میکروارگانیسم‌ها دارد (Shad, Zafar, Nawaz, & Anwar, 2012).

اسید بنزوئیک و نمک‌های آن (بنزوات‌ها) ممکن است به‌طور طبیعی در مواد غذایی یافت شوند اما استفاده از ویژگی‌های ضد میکروبی آنها به‌عنوان نگهدارنده تاریخچه طولانی دارد. استفاده از این ترکیبات توسط کمیته تخصصی FAO/WHO برای افزودنی‌های غذایی<sup>۶</sup> محدود شده است. طبق استانداردهای اعلام‌شده توسط کمیته تخصصی مواد غذایی (JECFA) در سازمان بین‌المللی فائو میزان جذب روزانه قابل‌قبول برای اسید بنزوئیک و بنزوات‌ها صفر تا ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن است. میزان سمیت اسید بنزوئیک به‌عنوان یک افزودنی پایین است اما به‌رحال در افراد با حساسیت بالا، جذب اسید بنزوئیک در مقادیر کمتر از ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز نیز می‌تواند به واکنش‌های تماسی غیرایمونولوژیک (آلرژی کاذب) منجر شود (Lazarevic, Stojanovic, & Rancic, 2011).

در این تحقیق سعی شده است با استفاده از تشابه ترکیبی گردو با بادام‌زمینی، پسته و کنجد محصول مشابهی بر پایه گردو تولید گردد و با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات نگهدارنده و بهینه‌یابی مقدار آنها کیفیت محصول در طی مدت زمان نگهداری در حد مطلوب نگهداشته شود.

## مواد و روش‌ها

### تهیه کره گردو

جهت تهیه کره، گردو وارسته تویسرکان خریداری شد.

درصد (وزنی/وزنی) لستین سویا، اکسایش روغن‌های حاصل از دانه‌های روغنی پالم، گندم و سویا را به تأخیر می‌اندازد. اکسایش روغن‌ها و چربی‌ها می‌تواند به‌وسیله افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها، استفاده از فناوری‌های فراوری که حداقل آفت توکوفرول و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را داشته باشد، کنترل شود (Allen & Hamilton, 1994; Kaitaranta, 1992).

بوتیل هیدروکسی تولوئن<sup>۱</sup> (BHT) آنتی‌اکسیدان سنتزی است که از دهه ۱۹۵۰ در روغن‌ها و چربی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. BHT پایداری حرارتی مناسبی دارد، به‌طور مثال در فرایندهای حرارتی بالای ۱۷۵ درجه سانتی‌گراد، تنها ۲۵ تا ۳۰ درصد BHT غیرفعال می‌شود. BHT ممکن است زمانی که در حرارت‌های بالا (حرارت‌های سرخ‌کردن) به مدت طولانی مورد استفاده قرار گیرد، در مواد غذایی بوی خاصی تولید کنند (Law, 1984). گزارش‌ها حاکی از این مطلب است که مصرف بالای BHT در حیوانات آزمایشگاهی منجر به صدمات بافتی به ریه، قلب، کبد، دستگاه تولیدمثل، غدد فوق کلیوی و کلیه‌ها می‌گردد. همچنین اختلالاتی در مکانیسم انعقاد خون به‌وجود می‌آورد (Williams, McQueen, & Tong, 1990).

علاوه بر تندی اکسایشی، فساد میکروبی نیز ماندگاری محصولاتی مانند کره گردو را تهدید می‌کند. بدین‌منظور از ترکیبات نگهدارنده جهت جلوگیری از واکنش‌های میکروبی استفاده می‌شود. با توسعه فناوری‌های تولید، استفاده از نگهدارنده‌ها در صنایع غذایی افزایش یافته است. اما استفاده غیرمجاز از این ترکیبات شیمیایی در مواد غذایی ممکن است اثر سمی بر سلامت انسان به همراه داشته باشد. اسید سوربیک (۲،۴ هگزادی‌انوئیک اسید) ترکیب آلی طبیعی است که به‌عنوان نگهدارنده استفاده می‌شود. اسید سوربیک و مشتقات آن (سوربات کلسیم، سوربات پتاسیم و سوربات سدیم) فعالیت ضد میکروبی دارند و به‌همین دلیل، به‌عنوان نگهدارنده در بسیاری از مواد غذایی و نوشیدنی‌ها مانند فراورده‌های پنیر، ماهی، نوشیدنی‌های کربناته، مارگارین و به‌ویژه فراورده‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرند. سوربات‌ها

<sup>3</sup> Foamarase

<sup>4</sup> Aspartase

<sup>5</sup> Succinic dehydrogenase

<sup>6</sup> Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)

<sup>1</sup> Butylated Hydroxytoluene (BHT)

<sup>2</sup> 2,4-hexadienoic acid

میکروارگانیسم‌ها و شمارش کپک و مخمر نمونه‌ها انجام شد.

#### اندازه‌گیری فعالیت آبی $a_w$

فعالیت آبی نمونه توسط دستگاه آبیمتر (مدل Lab Master.aw، Novasina، ساخت سوئیس) اندازه‌گیری شد. قبل از اندازه‌گیری باید نمونه به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برسد. اما باید توجه داشت که نمونه بدون تبادل رطوبت با محیط باشد. سپس مقداری از نمونه در ظرف پلاستیکی مخصوص ریخته و داخل دستگاه قرار داده شد و درب دستگاه بسته شد تا در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به فشار بخار ثابت برسد. پس از طی مدت زمانی (این زمان در هر نمونه متفاوت بود)، میزان فشار بخار آب ثابت‌شده بر فشار بخار آب خالص یا به عبارتی فعالیت آبی نمونه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نمایش‌داده‌شده روی صفحه دستگاه خوانده شد (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI]، ۱۳۸۵).

#### پایداری اکسایشی

جهت تعیین پایداری اکسایشی نمونه‌های کره گردو، عددهای اسیدی و پراکسید آنها طی مدت نگهداری اندازه‌گیری شد. بدین‌منظور ابتدا روغن نمونه‌ها استخراج شد. برای استخراج مقدار مشخص از کره گردو (۵۰ گرم) با حلال هگزان به نسبت ۱ به ۲ (وزنی-حجمی) مخلوط شده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای محیط هم‌زده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه به‌صورت ثابت قرار گرفت تا محیط کاملاً دو فاز گردد و در نهایت مخلوط صاف‌شده و حلال آن تحت‌خلأ و در دمای محیط تبخیر شد. آزمون‌های مربوطه روی روغن به‌دست‌آمده انجام شد.

#### اندازه‌گیری عدد پراکسید<sup>۱</sup>

۰/۱ تا ۰/۲ گرم نمونه روغن در لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی‌لیتر وزن شد و با ۹/۸ میلی‌لیتر حلال کلروفرم<sup>۲</sup> (به نسبت ۳ به ۷) مخلوط و به مدت ۲ تا ۴ ثانیه هم‌زده شد. محلول تیوسیونات آمونیوم<sup>۴</sup> (محلول

گردوهای بوداده‌شده (بدین‌منظور گردوها در معرض دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد) توسط یک آسیاب مکانیکی قوی (مدل آرمان خرد توس، ساخت ایران) خرد شد. شکر آسیاب‌شده به میزان ۲۰ درصد، نمک به میزان ۰/۵ درصد و لستین به میزان ۰/۵ درصد به گردوی خردشده اضافه شد. عمل هم‌زدن با استفاده از آسیاب نیمه‌صنعتی (توس‌شکن خراسان، ساخت ایران) تا تهیه مخلوط یکنواخت و همگن ادامه یافت. سپس مخلوط (که حالت خمیری داشت) وارد آسیاب شده و تا تبدیل‌شدن به یک کرم یک‌دست و یکنواخت آسیاب گردید (در دمای محیط به مدت ۶۰ دقیقه).

#### بررسی اثر نگهدارنده‌ها و آنتی‌اکسیدان بر ویژگی‌های

##### شیمیایی و میکروبی محصول طی زمان ماندگاری

در این مرحله اثر آنتی‌اکسیدان و نگهدارنده بر ویژگی‌های نمونه‌های کره گردو طی ۷۵ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. بدین‌منظور  $50 \pm 5$  گرم کره گردو توزین‌شده و در ظرف‌های درب‌دار از جنس پلاستیک و به قطر ۵/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۵ سانتی‌متر ریخته شد. درب ظرف‌ها کاملاً بسته‌شده و در داخل گرم‌خانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای هر نمونه ۳ ظرف (۳ تکرار) آماده شد و آزمون‌ها در فواصل زمانی ۱۵ روزه روی نمونه‌ها انجام شد.

#### اثر آنتی‌اکسیدان

به فرمول پایه کره گردو آنتی‌اکسیدان BHT در مقادیر صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزوده شد. جهت بررسی روند اکسایش کره گردو در طول مدت نگهداری، آزمون‌های عدد پراکسید و عدد اسیدی روی نمونه‌ها انجام شد.

#### اثر نگهدارنده

در این مرحله فرمول پایه کره گردو تهیه‌شد و نگهدارنده در غلظت‌های متفاوت به آن افزوده شد. از دو نگهدارنده اسیدبنزوئیک و اسیدسوربیک در مقادیر صفر، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و همچنین مخلوط اسیدبنزوئیک و اسیدسوربیک در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (به نسبت ۵۰:۵۰) استفاده شد. جهت بررسی روند پایداری میکروبی کره گردو در طول مدت نگهداری، شمارش کلی

<sup>۱</sup> Peroxide Value (PV)

<sup>۲</sup> Chloroform

<sup>۳</sup> Methanol

<sup>۴</sup> Ammonium Tiosianat

طول مدت نگهداری، شمارش کلی میکروارگانسیم‌ها و شمارش کپک و مخمر روی نمونه‌ها انجام شد.

### شمارش کلی

برای تهیه رقت‌های مختلف، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه کره گردو به ارلن حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده مناسب افزوده شد و کاملاً مخلوط گردید تا رقت ۰/۱ به دست آید. برای تهیه سایر رقت‌ها، به تعداد لازم لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده تهیه شد و سپس به کمک سمپلر، ۱ میلی‌لیتر از رقت اولیه برداشته و به اولین لوله حاوی رقیق‌کننده افزوده شد و این عمل تا رسیدن به آخرین رقت مورد نیاز ادامه یافت.

شمارش کلی پرگنه‌های میکروارگانسیم‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۹۸۹۹ (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI], ۱۳۹۴b) انجام شد. بدین‌منظور از محیط کشت نوترینت‌آگار<sup>۱</sup> استفاده شد. محیط کشت یادشده مطابق دستورالعمل شرکت سازنده آماده شد. پس از آن رقت‌های لازم برای آزمایش آماده شدند. سپس به هر پلیت ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت ذوب‌شده با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد افزوده شد (زمان تهیه سوسپانسیون تا افزودن به پلیت نباید از ۱۵ دقیقه تجاوز نماید). پس از بستن محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به صورت واژگون گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، برای شمارش پرگنه‌های هر پلیت از دستگاه پرگنه‌شمار<sup>۲</sup> (Biochemical Engineering ME 201، ساخت ایران) استفاده گردید.

### شمارش کپک و مخمر

این آزمون براساس استانداردهای ملی ایران به شماره ۱۰۸۹۹/۱ و ۹۸۹۹ (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI], ۱۳۸۷؛ ۱۳۹۴b) انجام شد. رقت‌های مورد نظر آماده شدند و از محیط کشت پوتیتودکستروز آگار<sup>۳</sup> استفاده شد. پلیت‌ها به صورت وارونه و به مدت ۳ الی ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از طی این مدت با استفاده از دستگاه پرگنه‌شمار، شمارش شدند.

آبی ۳۰ درصد) به مقدار ۵۰ میکرولیتر اضافه شد و به مدت ۲ تا ۴ ثانیه هم‌زده شد سپس ۵۰ میکرولیتر محلول آهن II نیز اضافه و به مدت ۲ تا ۴ ثانیه محلول هم‌زده شد. پس از ۵ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۰۰ نانومتر در برابر شاهد که حاوی همه معرف‌ها جزء نمونه بود با دستگاه اسپکتروفتومتر (Hach, DR5000، ساخت آمریکا) خوانده شد. تمامی مراحل انجام آزمایش در نور ملایم و به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در این روش از محلول آهن III (شامل ۱ تا ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد رسم و نتایج براساس میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم گزارش شد. عدد پراکسید از رابطه (۱) محاسبه شد.

رابطه (۱)

$$PV = \frac{(As - Ab) \times m}{55.84 \times W \times 2}$$

در رابطه (۱)، As میزان جذب نمونه، Ab میزان جذب شاهد در طول موج ۵۰۰ نانومتر، m شیب به دست آمده از منحنی کالیبراسیون (۱۸/۷۶ با ضریب تبیین ۰/۹۱) و W وزن نمونه روغن می‌باشند (Shantha & Decker, 1994).

### اندازه‌گیری عدد اسیدی

۱۰ گرم نمونه روغن داخل ارلن توزین شد و به آن ۵۰ میلی‌لیتر حلال اتانول کلروفرم به نسبت مساوی اضافه گردید (حلال باید خنثی باشد، درغیراین صورت باعث افزایش و یا کاهش خاصیت اسیدی می‌گردد). نمونه در مجاورت معرف فنل‌فتالین با پتاس ۰/۱ نرمال، تیترا شد. عدد اسیدی از رابطه (۲) محاسبه شد.

رابطه (۲)

$$\text{عدد اسیدی} = \frac{N \times V \times 56/1}{W}$$

در رابطه (۲)، N نرمالیت پتاس، V حجم پتاس مصرفی و W وزن نمونه می‌باشند. عدد اسیدی برحسب میلی‌گرم پتاس مصرف شده به دست می‌آید (AOCS, 1993).

### ارزیابی میکروبی

به منظور بررسی پایداری میکروبی نمونه‌های کره گردو در

<sup>1</sup> Nutrient Agar (NA)

<sup>2</sup> Colony counter

<sup>3</sup> Potato Dextrose Agar (PDA)

### تجزیه و تحلیل آماری

از طرح کاملاً تصادفی برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها براساس آنالیز واریانس در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار Mini Tab نسخه ۱۶ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۰ استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### عدد پراکسید (PV)<sup>۱</sup>

به‌طور کلی کره دانه‌های روغنی به‌طور متوسط حاوی ۴۰ تا ۴۵ درصد روغن است که ۷۵ تا ۸۰ درصد آن از اسیدهای چرب غیراشباع تشکیل شده است. اما براساس نتایج چرب‌غیراشباع تشکیل شده است. اما براساس نتایج Savage, Dutta و McNeil (۱۹۹۹) کل روغن موجود در ۱۳ واریته مختلف گردوی پرورش‌یافته در باغ تحقیقاتی دانشگاه لینکلن آمریکا بین ۶۴/۲ تا ۶۸/۹ درصد بود که میزان اسید اولئیک آن ۱۲/۷ تا ۲۰/۴ درصد، اسید لینولئیک ۵۷ تا ۶۲/۵ درصد و اسید لینولنیک ۱۰/۷ تا ۱۶/۲ درصد بود.

درمورد گردوی ایران نیز گلزاری و همکاران در سال ۱۳۹۲ پروتئین، روغن و اسیدهای چرب ارقام برتر گردو شامل: چندلر، هارتلی، پدرو، Z60، Z30 و Z63 را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققین نشان داد که اسیدهای چرب غیراشباع در روغن گردو غالب می‌باشد که شامل اسید لینولئیک (۴۴/۴۴-۴۴/۸۴ درصد) و سایر اسیدهای چرب موجود لینولنیک (۲۳/۹۲-۱۵/۳۱ درصد)، اسید اولئیک (۳۱/۶۲-۸/۰۲ درصد)، اسید پالمیتیک (۴۴/۴۴-۲/۴۲ درصد) و اسید استئاریک (۲/۴۸-۱/۶۵ درصد) بود. همچنین آنها اظهار داشتند که مقدار روغن گردو در ارقام مختلف ۶۰-۷۵ درصد و میزان پروتئین مغز در این ارقام ۲۰/۳۸-۱۴/۶۷ درصد بود (گلزاری، راحمی، حسنی، وحدتی و محمدی، ۱۳۹۲).

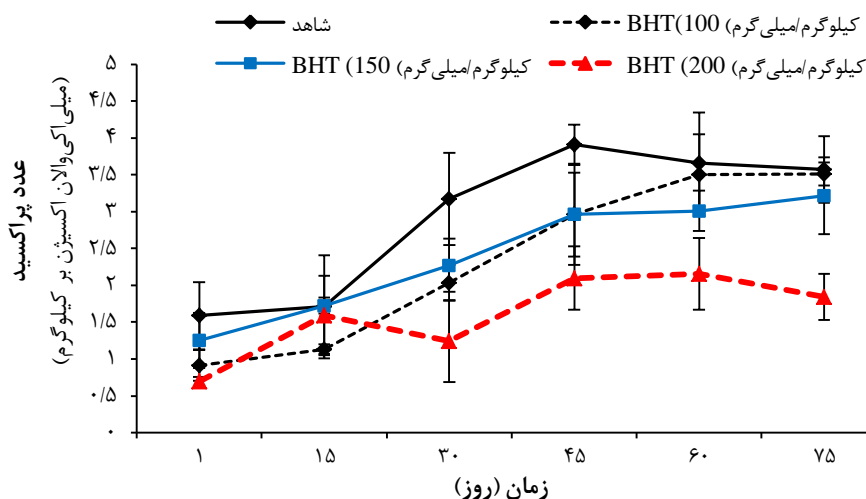
پایین‌بودن اسیدهای چرب اشباع و بالا بودن اسیدهای چرب چندغیراشباع در روغن گردو منجر به افزایش اکسایش‌پذیری و تند شدن آنها شده و نیاز به نگهداری در شرایط کنترل‌شده و افزودن آنتی‌اکسیدان را تشدید می‌کند.

نتایج تجزیه واریانس حاکی از تأثیر معنی‌دار افزودن BHT بر PV نمونه‌های کره گردو بود ( $P < 0.05$ ). تغییرات PV نمونه‌های کره گردو حاوی غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان BHT در مقایسه با شاهد (بدون آنتی‌اکسیدان) طی ۷۵ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شکل (۱) نشان داده شده است. نتایج گویای این مطلب است که با افزایش زمان، PV نمونه‌های کره گردو به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ( $P < 0.05$ ) در حالی که در نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف BHT و همچنین نمونه شاهد، شتاب افزایش PV متفاوت بود. بیشترین شتاب افزایش PV به نمونه کره گردوی شاهد مربوط بود، به‌طوری‌که در فاصله روز ۱۵ام تا ۴۵ام، PV آن از ۱/۷۱ به ۳/۹۱ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم رسید. پس از روز ۴۵ام، PV در نمونه شاهد روند نزولی را طی کرد که می‌تواند گواه شکستن فرآورده‌های اولیه اکسایش (هیدروپراکسیدها) و تبدیل آنها به فرآورده‌های ثانویه باشد.

Chien (۲۰۱۵) از آلفاتوکوفرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در فرمولاسیون کره دانه‌های گیاهی (دانه‌های آفتاب‌گردان، کدو و کنجد) استفاده کردند که نتایج آنها بیانگر عدم کارایی آلفاتوکوفرول در جلوگیری از اکسایش در دمای ۳۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود و میزان اکسایش طی نگهداری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

PV در نمونه‌های کره گردو حاوی ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم از آنتی‌اکسیدان BHT، تا پایان روز ۷۵ام روند افزایشی داشت اما شتاب افزایش در نمونه حاوی ۱۰۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم BHT بیشتر از نمونه حاوی ۱۵۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم BHT بود. شیب سرعت افزایش PV در نمونه‌های کره گردو حاوی ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم از BHT به‌ترتیب از روزهای ۶۰ام و ۴۵ام بسیار کند بود که آن را می‌توان به تعادل بین شکست هیدروپراکسیدها و تشکیل آنها در این بازه زمانی نسبت داد.

<sup>۱</sup> Peroxide value



شکل ۱- تغییرات PV نمونه‌های کره گردو حاوی غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم در کیلوگرم) آنتیاکسیدان BHT در مقایسه با شاهد طی ۷۵ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

کمتر از اسپرد آن بود. به‌طور کلی نتایج این محققین گواه قابل قبول بودن PV همه نمونه‌ها پس از ۲۵ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود که نشانگر این مهم بود که فراورده‌های پسته دچار اکسایش شدید نشدند.

یکی از عوامل مهم در پیشرفت اکسایش، دما می‌باشد. Mureşan و همکاران (۲۰۱۵)، PV ارده آفتاب‌گردان را طی نگهداری در دمای ۴، ۴۰ درجه سانتی‌گراد و دمای اتاق به مدت ۳ ماه بررسی کردند. نتایج آنها حاکی از افزایش معنی‌دار PV در همه نمونه‌های روغن بود به‌طوری‌که PV آن از ۲۵/۱۷ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم در زمان تولید به ۳۶/۲۹، ۵۰/۱۸ و ۱۰/۱۲ به ترتیب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، دمای اتاق و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد رسید.

حقانی حقیقی، آذر، مظلومی و کیمیایی فنود (۱۳۸۷) ماندگاری کره پسته را در دو دمای ۲۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد طی ۱۲۰ روز مورد پایش قرار دادند. نتایج آنها گویای پایداری خوب روغن کره پسته طی ماندگاری بود به‌طوری‌که در پایان ۱۲۰ روز نگهداری، PV کره پسته در دمای ۲۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد از ۰/۱۱ به ترتیب به ۲ و ۲/۵ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم رسید. درصد بالاتر روغن چندغیراشباع در سویا می‌تواند علت حساسیت بالاتر آن به اکسایش نسبت به کره بادام‌زمینی باشد.

باتوجه به نتایج محققین فوق یکی از علل سرعت پایین اکسایش در نمونه‌های کره گردوی مورد مطالعه در این پژوهش می‌تواند نگهداری آنها در دمای نسبتاً پایین یعنی دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد باشد.

PV نمونه‌های کره گردوی حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از BHT به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر نمونه‌ها طی دوره ماندگاری بود به‌طوری‌که در پایان روز ۷۵ تفاوت معنی‌داری بین کره گردوی شاهد و نمونه‌های حاوی ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از BHT وجود نداشت اما PV نمونه‌های کره گردوی حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از BHT به‌طور معنی‌دار و چشمگیری پایین‌تر (۴۸ درصد) از سایر نمونه‌ها بود ( $P < 0.05$ ).

Al-Malah, Abu-Jdayil و Asoud (۲۰۰۲) PV نمونه‌های کره سویا (کره آرد سویا، کره سویای پخته‌شده، کره سویای جوانه‌زده و کره سویای سرخ‌شده) را طی ۵ ماه نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری نموده و با کره بادام‌زمینی تجاری مقایسه کردند. نتایج آنها بیانگر پایین بودن PV کره بادام‌زمینی نسبت به همه نمونه‌های کره سویا در کل مدت نگهداری بود به‌طوری‌که در پایان مدت ۵ ماه PV کره بادام‌زمینی ۱۰/۴ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم بود. در حالی‌که PV کره‌های آرد، سرخ‌شده، پخته و جوانه‌زده سویا به ترتیب ۳، ۲، ۱/۳ و ۱/۱ برابر بیشتر از کره بادام‌زمینی بود.

Chin و Ghazali, Karim, Shakerardekani (۲۰۱۵) PV خمیر و اسپرد پسته را طی ۲۵ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها حاکی از PV پایین‌تر خمیر پسته نسبت به اسپرد آن پس از ۲۵ روز نگهداری بود که علت آن را به پایداری بیشتر روغن در خمیر پسته نسبت به مخلوط روغن پالم، پسته و شکر در اسپرد نسبت دادند. همچنین مقدار روغن در خمیر پسته

برای حلوای گردویی ۰/۱ درصد است.

### بارمیکروبی

#### شمارش کلی باکتری‌ها

اسیدهای چرب غیراشباع که دارای یک پیوند دوگانه در موقعیت آلفا هستند به‌عنوان عامل ضدقارچ در مواد غذایی و مواد بسته‌بندی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این رابطه اسیدسوربیک ( $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$ ) نقش برجسته‌ای دارد. به‌طور کلی اثر ضد میکروبی اسیدسوربیک بیشتر روی کپک‌ها و مخمرها بوده و در مورد باکتری‌ها کمتر است. اثر ضدقارچی این اسید ناشی از عدم متابولیسم سیستم پیوند دوگانه مزدوج (در موقعیت آلفا) موجود در زنجیره آن توسط قارچ‌هاست.

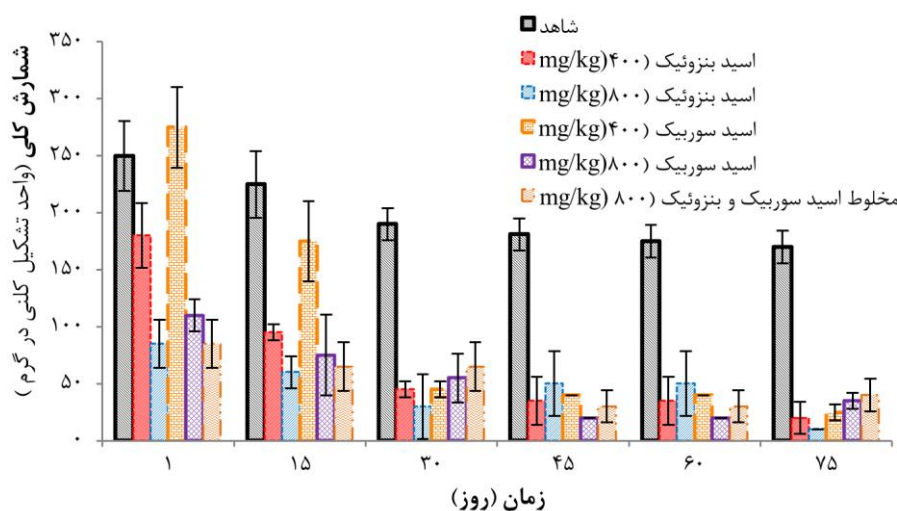
اسیدبنزوئیک به‌عنوان یک ماده ضد میکروبی در حد وسیعی جهت حفاظت مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اثر ضد میکروبی آن روی دیواره سلولی، آنزیم‌های سیکل کربس و همچنین روی آنزیم‌هایی که در فسفوریلاسیون اکسیداتیو<sup>۱</sup> دخالت دارند ظاهر می‌شود و با آزاد کردن پروتون منجر به اختلال در کار تبادل مواد از دیواره سلولی می‌گردد. اثر نابودکنندگی اسیدبنزوئیک بیشتر روی مخمرها و باکتری‌هاست و در مورد کپک‌ها بسیار کمتر است (فاطمی، ۱۳۹۵).

نتایج شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های کره گردوی حاوی نگهدارنده‌های مختلف در مقایسه با شاهد (بدون نگهدارنده) در شکل (۲) و (۳) آورده شده است.

بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۵۶۹۰ و ۵۶۹۱ (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI]، ۱۳۷۹؛ ۱۳۹۴a) بیشینه مجاز PV برای کره بادام‌زمینی، کره پسته به ترتیب ۱۲ و ۵ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم است. همچنین بر اساس استاندارد Codex Alimentarius Commission (۱۹۹۳) بیشینه مجاز PV در کره‌های گیاهی ۱۰ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم است که نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر گویای کمتر بودن PV تمام نمونه‌های مورد مطالعه زیر حد مجاز تعیین‌شده بر اساس هریک از استانداردهای یادشده در طول ۷۵ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. اما بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، با توجه به پیشرفت اکسایش، در صورتی که هدف نگهداری طولانی مدت کره گردو در شرایط دمایی  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد باشد، نیاز به استفاده از آنتی‌اکسیدان فرمولاسیون آن می‌باشد.

#### عدد اسیدی

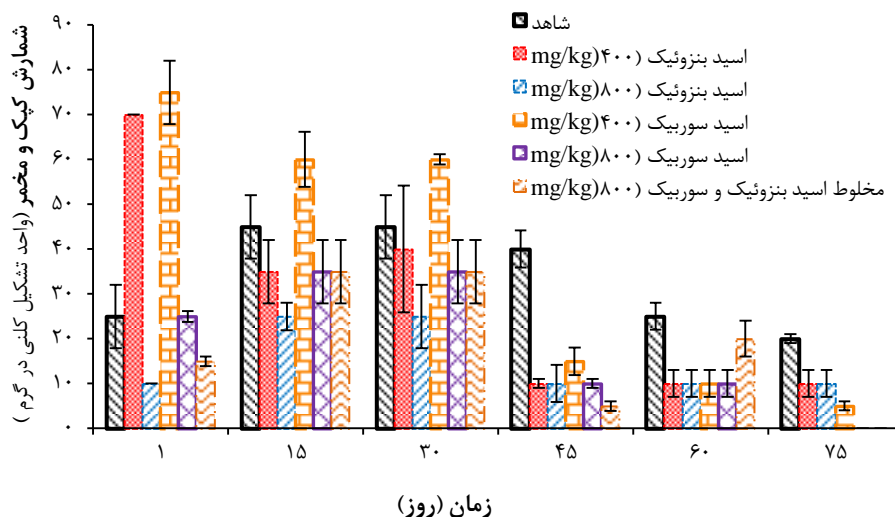
نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاکی از عدم وجود تغییرات معنی‌دار عدد اسیدی نمونه‌های کره گردو حاوی غلظت‌های مختلف BHT در مقایسه با شاهد در طول مدت نگهداری بود ( $P > 0.05$ ). عدد اسیدی کره گردو پس از تولید ۰/۳ درصد بود که تا روز ۷۵ام نگهداری در نمونه‌های مختلف به ۰/۴ تا ۰/۵ درصد رسید. بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۵۶۹۰ و ۵۶۹۱ (ISIRI، ۱۳۷۹؛ ۱۳۹۴a) بیشینه مجاز اسیدیته برای کره بادام‌زمینی و کره پسته ۲/۵ درصد



شکل ۲- نتایج شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های کره گردوی حاوی نگهدارنده‌های مختلف در مقایسه با شاهد (بدون نگهدارنده) طی ۷۵ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

<sup>1</sup> Oxidative phosphorylation





شکل ۳- نتایج شمارش کپک و مخمرها در نمونه‌های کره گردوی حاوی نگهدارنده‌های مختلف در مقایسه با شاهد (بدون نگهدارنده) طی روز ۷۵ نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

به‌طور کلی به نظر می‌رسد بنزوات در جلوگیری از رشد باکتری‌ها در کره گردو بهتر از سوربات عمل می‌کند. باتوجه به ماهیت روغنی و فعالیت آبی پایین نمونه‌های کره گردو، نتایج به‌دست‌آمده دور از انتظار نبود. شایان ذکر است حداقل فعالیت آبی موردنیاز برای رشد باکتری‌ها ۰/۶ می‌باشد.

نتایج Chien (۲۰۱۵) نشان داد که استفاده از غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد عصاره دانه انگور در کره دانه‌های گیاهی منجر به کاهش رشد *سالمونلا انتریکا*<sup>۱</sup> و *لیستریا اینوکوا*<sup>۲</sup> طی ۹ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شد. نتایج این محققین نیز نشان داد که بیشترین شیب کاهش پس از گذشت یک روز از تولید مشاهده شد و پس از آن روند تقریباً ثابت بود. این نتیجه در مورد نمونه شاهد نیز صادق بود. غلظت ۱۵ درصد عصاره انگور بیشترین اثر را در جلوگیری از رشد هر دو باکتری مورد مطالعه این محققین داشت. آنها همچنین گزارش کردند که رشد *لیستریا اینوکوا* در نمونه شاهد نسبت به نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف سینامالدئید<sup>۳</sup> (۱/۱، ۱ و ۱/۵ درصد) کمتر بود.

بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۵۶۹۰ (ISIRI، ۱۳۹۴a) بیشینه مجاز شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در کره بادام‌زمینی ۱۰۰۰۰ واحد تشکیل کلنی در گرم است.

به‌طور کلی نتایج مقایسه میانگین نشان داد که اختلاف بین شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های کره گردوی حاوی انواع نگهدارنده تنها تا روز ۱۵ام معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). پس از گذشت این مدت تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های کره گردو تا پایان مدت نگهداری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند ( $P > 0/05$ ).

اختلاف معنی‌دار مشاهده شده در تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های کره گردو در روز اول تولید، می‌تواند به آلودگی اولیه مواد مورد استفاده یا شرایط تولید مربوط باشد. نمونه‌های کره گردوی حاوی اسیدهای سوربیک و بنزوئیک در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و مخلوط آنها در همان روز اول نگهداری، کمترین میزان شمارش کلی باکتری‌ها را به نمایش گذاشتند و این روند با تغییرات جزئی به‌طور تقریبی تا انتهای زمان نگهداری ادامه داشت.

نتایج نشان داد که شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه کره گردوی نمونه شاهد (بدون نگهدارنده) در روز اول بالا بود که طی نگهداری میزان آن کاهش یافت. روند کاهشی از روز ۳۰ام تا پایان مدت نگهداری با شیب کندتر و غیرمعنی‌دار ادامه داشت. احتمالاً ترکیبات فنلی موجود در پوسته روی مغز گردو اثر ضد میکروبی داشته و مخلوط شدن آن با مغز گردو سبب کاهش بار میکروبی در طی مدت زمان نگهداری شده است. البته این کاهش چندان زیاد نیست و به‌همین دلیل نیاز به استفاده از نگهدارنده وجود دارد.

<sup>1</sup> *S. enterica*

<sup>2</sup> *L. innocua*

<sup>3</sup> Cinnamaldehyde

سانتی‌گرا، Abu-Jdayil و همکاران (۲۰۰۲) بیان کردند که بیشترین میزان میکروارگانیسم‌ها در کره آرد سویا مشاهده شد که علت آن را به محتوای بالاتر آب در آن نسبت دادند که با فعالیت آبی همبستگی داشته و به رشد میکروارگانیسم‌ها کمک کرده و زمان ماندگاری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در کره سویای پخته‌شده به دلیل تیمار حرارتی و غیرفعال‌شدن میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌ها، زمان ماندگاری بهبود یافت.

براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۵۶۹۰ (ISIRI، ۱۳۹۴a) بیشینه مجاز کپک و مخمر در کره بادام‌زمینی به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰۰۰۰ واحد تشکیل کلنی در گرم است. از این رو، شایان ذکر است که در همه نمونه‌ها از روز اول تا پایان دوره نگهداری، میزان کپک و مخمر و باکتری‌ها کمتر از محدوده مجاز در استاندارد ملی ایران بود.

#### نتیجه‌گیری

نتایج پایش اکسایشی کره گردو طی ۷۵ روز نگهداری نشانگر افزایش عدد پراکسید از روز اول تا روز ۱۷۵ام با شیب تند در نمونه شاهد بود. حضور آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سرعت افزایش عدد پراکسید را به میزان قابل توجهی کاهش داد درحالی‌که روی عدد اسیدی نمونه‌های کره گردو تأثیر معنی‌داری نداشت. اسیدبنزوئیک در مقایسه با اسیدسوربیک کارایی بیشتری را در کاهش شمارش کلی باکتری‌ها و شمارش کپک و مخمر طی دوره نگهداری به نمایش گذاشت.

#### تقدیر و تشکر

مؤلفین از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور بابت حمایت مالی برای انجام این طرح کمال تشکر را دارند.

براساس این استاندارد شمارش کلی تمام نمونه‌های کره گردو در طول ۷۵ روز نگهداری زیر حد مجاز بود.

#### شمارش کپک و مخمر

نتایج شمارش کپک و مخمر نمونه‌های کره گردو، طی دوره نگهداری در شکل (۳) نشان داده شده است. نتایج مقایسه میانگین حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در تعداد کپک و مخمر نمونه‌های کره گردوی تولیدی در روز اول بود ( $P < 0.05$ ) که به نظر می‌رسد این اختلاف ناشی از بار میکروبی اولیه مواد مصرفی و شرایط ضمن تولید باشد. در همه نمونه‌ها به استثنای نمونه‌های حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدسوربیک و اسیدبنزوئیک از روز اول تا روز ۱۵ام، تعداد کپک و مخمر افزایش یافت اما پس از آن روند ثابت یا نزولی را طی نمود.

نتایج حاکی از این مطلب است که عامل نگهدارنده بنزوات در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در جلوگیری از رشد کپک‌ها و مخمرها در کره گردو نسبت به سوربات کارآمدتر عمل کرد.

به‌طورکلی در اکثر نمونه‌ها بعد از روز ۳۰ام تا ۱۷۵ام نگهداری، تعداد کپک و مخمرها در کره گردو بسیار کاهش نشان داد. این روند کاهش در نمونه شاهد از روز ۱۴۵ام آغاز شد.

براساس نتایج فوق، بار میکروبی کره گردو طی دوره نگهداری ارتباط مستقیم با بار میکروبی اولیه آن دارد اما طی نگهداری به دلیل فعالیت آبی پایین و دمای مناسب، امکان رشد کپک و مخمرها کاهش می‌یابد شتاب این کاهش در نمونه‌های حاوی نگهدارنده بیش از نمونه شاهد بود.

در بررسی بار میکروبی نمونه‌های کره سویا (کره آرد سویا، کره سویای پخته‌شده، کره سویای جوانه‌زده و کره سویای سرخ‌شده) طی ۵ ماه نگهداری در دمای ۲۵ درجه

#### منابع

حقانی حقیقی، ح، آذر، م، مظلومی، م، و کمیلی فنود، ر. (۱۳۸۷). بررسی فرمولاسیون، تولید و ارزیابی حسی کره پسته. مجله علوم و صنایع غذایی، ۵(۳)، ۱۹-۲۶.

سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۷۹). کره پسته-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. (استاندارد ملی ایران، شماره ۵۶۹۱). برگرفته از <http://standard.isiri.gov.ir/StandardFiles/5691.htm>

- سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۵). کیک-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. (استاندارد ملی ایران، شماره ۲۵۵۳، تجدیدنظر سوم). برگرفته از <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=11869>
- سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۷). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها-قسمت اول: روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی ( $a_w$ ) بیشتر از ۰/۹۵. (استاندارد ملی ایران، شماره ۱-۱۰۸۹۹). برگرفته از <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=12277>
- سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۹۴a). کره بادام زمینی-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. (استاندارد ملی ایران، شماره ۵۶۹۰، تجدیدنظر اول). برگرفته از <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=46509>
- سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۹۴b). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی. (استاندارد ملی ایران، شماره ۹۸۹۹، تجدیدنظر اول). برگرفته از <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=43546>
- فاطمی، ح. (۱۳۹۵). شیمی مواد غذایی: (صفحات: ۴۸۰): شرکت سهامی انتشار.
- گلزاری، م.، راحمی، م.، حسنی، د.، وحدتی، ک. و محمدی، ن. (۱۳۹۲). بررسی میزان پروتئین، روغن و اسیدهای چرب برخی ارقام گردو (*Juglans regia* L.) و تاثیر دانه‌گرده بر برخی خصوصیات آن. *مجله علوم و صنایع غذایی*، ۱۰(۳۸)، ۲۱-۳۰.
- Abramovič, H., & Abram, V. (2006). Effect of added rosemary extract on oxidative stability of Camelina sativa oil. *Acta Agriculturae Slovenica*, 87(2), 255-261.
- Abu-Jdayil, B., Al-Malah, K., & Asoud, H. (2002). Rheological characterization of milled sesame (teheh). *Food Hydrocolloids*, 16(1), 55-61. doi:[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00040-6)
- Allen, J., & Hamilton, R. (1994). *Rancidity in foods* Blackie Academic & Professional Publ. Co. Inc., New York.
- AOCS. (1993). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 4th ed. Method Aa 6-38. The Society: Champaign, IL.
- Bremner, H., Ford, A., Macfarlane, J., Ratcliff, D., & Russell, N. (1976). Meat with high linoleic acid content: Oxidative changes during frozen storage. *Journal of Food Science*, 41(4), 757-761. doi:[https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb00718\\_41\\_4.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb00718_41_4.x)
- Chien, Y.-h. (2015). *Shelf life extension of seed butter made with sesame, sunflower and pumpkin seeds*. (Electronic thesis), The Ohio State University. Retrieved from <https://etd.ohiolink.edu/>
- Codex Alimentarius Commission. (1993). Proposed draft standard for named vegetable oils. *CX 1993/16, issued by the Joint FAO/WHO Food Standards Program, via delle Terme di Caracalla 00100*.
- Evranuz, E. Ö. (1993). The effects of temperature and moisture content on lipid peroxidation during storage of unblanched salted roasted peanuts: shelf life studies for unblanched salted roasted peanuts. *International journal of food science & technology*, 28(2), 193-199. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb01264.x>
- Fatemi, H. (2016). *Food Chemistry*: (pp.480): Enteshar Publication Company. (in Persian)
- Gardner, H. (1979). Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(2), 220-229. doi:<https://doi.org/10.1021/jf60222a034>
- Golzari, M., Rahemi, M., Hassani, D., Vahdati, K., & Mohammadi, N. (2013). Protein content, fat and fatty acids of kernel in some persian walnut (*Juglans Regia* L.) Cultivars Affected By Kind Of Pollen. *Iranian Journal of Food Science And Technology*, 10(38), 21-31 (in Persian).
- Haghani Haghghi, H., Azar, M., Mazloomi, M., & Komeili, F. (2008). Survey of Formulation, Production and Sensory Evaluation of Pistachio Butter. *Food Science and Technology*, 5(18), 19-26. (in Persian).
- Hasenhuettl, G. L., & Wan, P. J. (1992). Temperature effects on the determination of oxidative stability with the Metrohm Rancimat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(6), 525-527. doi:<https://doi.org/10.1007/BF02636102>
- Iranian National Standardization Organization. (2001). Pistachio butter - Specification and test methods. (ISIRI Standard No. 5691). Retrieved from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardFiles/5691.htm> (in Persian)

- Iranian National Standardization Organization. (2006). Cake –Specification and test methods. (ISIRI Standard No. 2553, 3<sup>th</sup> Revision). Retrieved from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=11869> (in Persian)
- Iranian National Standardization Organization. (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0.95. (ISIRI Standard No. 10899.1). Retrieved from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=12277>
- Iranian National Standardization Organization. (2016a). Microbiology of food and animal feed stuffs-General requirements and guidance for microbiological examinations. (ISIRI Standard No. 9899, 1<sup>st</sup> Edition). Retrieved from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=43546> (in Persian)
- Iranian National Standardization Organization. (2016b). Peanut butter-Specifications and test methods. (ISIRI Standard No. 5690). Retrieved from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=46509> (in Persian)
- Jenab, M., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Casagrande, C., Overad, K., . . . Boutron-Ruault, M.-C. (2004). Association of nut and seed intake with colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 13(10), 1595-1603.
- Judde, A., Villeneuve, P., Rossignol-Castera, A., & Le Guillou, A. (2003). Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(12), 1209-1215. doi:<https://doi.org/10.1007/s11746-003-0844-4>
- Kaitaranta, J. K. (1992). Control of lipid oxidation in fish oil with various antioxidative compounds. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(8), 810-813. doi:<https://doi.org/10.1007/BF02635921>
- Kris-Etherton, P. M., Yu-Poth, S., Sabaté, J., Ratcliffe, H. E., Zhao, G., & Etherton, T. D. (1999). Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 504s-511s. doi:<https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.504s>
- Labuza, T. P., & Dugan Jr, L. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2(3), 355-405. doi:<https://doi.org/10.1080/10408397109527127>
- Law, K. S. (1984). A review on the use of citric acid in the processing of oils and fats. *Oleagineux*, 39(2), 89-98.
- Lazarevic, K., Stojanovic, D., & Rancic, N. (2011). Estimated daily intake of benzoic acid through food additives in adult population of south east Serbia. *Central European Journal of Public Health*, 19(4), 228. doi:<https://doi.org/10.21101/cejph.a3655>
- Löliger, J. (1990). Headspace gas analysis of volatile hydrocarbons as a tool for the determination of the state of oxidation of foods stored in sealed containers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 52(1), 119-128. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740520113>
- Maskan, M., & Karataş, Ş. (1998). Fatty acid oxidation of pistachio nuts stored under various atmospheric conditions and different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(3), 334-340. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199807\)77:3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199807)77:3)
- Mureşan, V., Danthine, S., Bolboacă, S. D., Racolţa, E., Muste, S., Socaciu, C., & Blecker, C. (2015). Roasted sunflower kernel paste (tahini) stability: Storage conditions and particle size influence. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(5), 669-683. doi:<https://doi.org/10.1007/s11746-015-2622-7>
- Nahm, H. S., Juliani, H. R., & Simon, J. E. (2012). Effects of selected synthetic and natural antioxidants on the oxidative stability of shea butter (*Vitellaria paradoxa* subsp. *paradoxa*). *Journal of Medicinally Active Plants*, 1(2), 69-75. doi:<https://doi.org/10.7275/R5BR8Q4R>
- Pershern, A. S., Breene, W. M., & Lulai, E. C. (1995). Analysis of factors influencing lipid oxidation in hazelnuts (*corylus* spp. 1). *Journal of Food Processing and Preservation*, 19(1), 9-26. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1995.tb00274.x>
- Rajaram, S., Haddad, E. H., Mejia, A., & Sabaté, J. (2009). Walnuts and fatty fish influence different serum lipid fractions in normal to mildly hyperlipidemic individuals: a randomized controlled study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(5), 1657S-1663S. doi:<https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.26736S>
- Reynhout, G. (1991). The effect of temperature on the induction time of a stabilized oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(12), 983-984. doi:<https://doi.org/10.1007/BF02657549>

- Savage, G., Dutta, P., & McNeil, D. (1999). Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(9), 1059-1063. doi:<https://doi.org/10.1007/s11746-999-0204-2>
- Shad, M. A., Zafar, Z. I., Nawaz, H., & Anwar, F. (2012). Effect of sorbic acid and some other food preservatives on human serum cholinesterase activity. *African Journal of Biotechnology*, 11(51), 11280-11286. doi:<http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.4037>
- Shakerardekani, A., Karim, R., Ghazali, H. M., & Chin, N. L. (2015). Oxidative Stability of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Paste and Spreads. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(7), 1015-1021. doi:<https://doi.org/10.1007/s11746-015-2668-6>
- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421-424.
- Sharafati Chaleshtori, R., Sharafati Chaleshtori, F., & Rafieian, M. (2011). Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) leaves. *Turkish Journal of Biology*, 35(5), 635-639. doi:<https://doi.org/10.3906/biy-1005-1>
- St. Angelo, A. J., & Ory, R. L. (1975). Effects of lipoperoxides on proteins in raw and processed peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(2), 141-146. doi:<https://doi.org/10.1021/jf60198a028>
- Williams, G. M., McQueen, C. A., & Tong, C. (1990). Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. I. Genetic and cellular effects. *Food and Chemical Toxicology*, 28(12), 793-798. doi:[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(90\)90051-N](https://doi.org/10.1016/0278-6915(90)90051-N)

## Investigating the Effect of Preservatives and Antioxidant on the Oxidative and Microbial Properties of Walnut Butter during the Shelf-life

Mostafa Shahidi Noghabi<sup>1\*</sup>, Razieh Niazmand<sup>1</sup>, Mozhdeh Sarraf<sup>2</sup>,  
Mahnaz Shahidi Noghabi<sup>3</sup>

1- Associate Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

\* Corresponding author (m.shahidi@rifst.ac.ir)

2- Ph.D. Student, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

3- M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Quechan Branch, Islamic Azad University, Quechan, Iran

### Abstract

Walnuts contain many nutritional compounds, including omega-3, various vitamins, especially vitamin E and types of minerals. Therefore, the development of foods based on walnut and studies on chemical and microbial stability during storage, is very important. In this research, the effects of various concentrations of BHT (three levels 100, 150 and 200 mg/L) on changes in peroxide value and acid value of walnut butter, as well as the effect of two types of preservatives of benzoic acid and sorbic acid, each in two levels (400 and 800 mg/kg) were separately and mixed, on the total count of microorganisms and the count of mold and yeast of walnut samples during 75 days of storage at ambient temperature is investigated. The results of this study showed that by adding BHT at 200 mg/L, the peroxide value decreased significantly compared to the control sample. After production, acidic value was 0.3% and it rose to 0.4-0.5% after 75 days of storage. Also, benzoic acid was more effective in reducing total bacterial count and counting mold as well as yeast during storage in comparison with sulfuric acid.

**Keywords:** Antioxidants, Preservatives, Shelf life, Walnut Butter