JRIFST
مقالۀ کامل پژوهشی

www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال 1398، جلد 8، شماره 2، صفحات 164-151
DOI: 10.22101/JRIFST.2019.07.22.824

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

مصطفی شهیدی نوقابی[1*]، راضیه نیازمند[1]، مژده صراف[2]، مهناز شهیدی نوقابی[3]

1- دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
* نویسندۀ مسئول (m.shahidi@rifst.ac.ir)
2- دانشجوی دکترای شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
3- دانش‌آموختۀ کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

چکیده

گردو حاوی بسیاری از ترکیبات غذایی ازجمله اسیدهای چرب امگا-3، انواع ویتامین‌ها بخصوص ویتامین E و انواع مواد معدنی است. ازاین‌رو، گسترش محصولات غذایی بر پایۀ گردو و مطالعۀ روی آنها از جهات مختلف و ازجمله پایداری شیمیایی و میکروبی طی نگهداری بسیار حائز اهمیت است. در این تحقیق به بررسی اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) در سه سطح (100، 150 و 200 میلی‌گرم بر لیتر) بر تغییرات عدد پراکسید و عدد اسیدی کرۀ گردو و همچنین اثر دو نوع نگهدارندۀ اسید بنزوئیک و اسید سوربیک در دو سطح (400 و 800 میلی‌گرم در کیلوگرم) به‌صورت جداگانه و مخلوط بر شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و شمارش کپک و مخمر نمونه‌های کرۀ گردو، طی 75 روز نگهداری در دمای محیط پرداخته شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزودن BHT در غلظت 200 میلی‌گرم بر لیتر، عدد پراکسید به میزان قابل توجهی نسبت به نمونۀ شاهد کاهش یافت. عدد اسیدی کرۀ گردو پس از تولید 0/3 درصد بود که تا روز 75ام نگهداری در نمونه‌های مختلف به 0/4 تا 0/5 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 دورۀ نگهداری دارد.

تاریخ دریافت: 1396/10/18
تاریخ پذیرش: 1397/08/13

واژه‌های کلیدی
آنتی‌اکسیدان
زمان ماندگاری
کرۀ گردو
نگهدارنده

مقدمه

گردو[1] با نام علمی *Juglans regia* از خانوادۀ Juglandaceae است. نام علمی این جنس از کلمۀ لاتین Jovis-Glans به معنی فندق ژوپیتر گرفته شده است. منشأ درخت گردو را آسیای غربی و نواحی هیمالیا می‌دانند. در ایران نیز گردو در جنگل‌های شمال از آستارا تا گلی‌داغ در جلگه و ساحل تا ارتفاع 2200 متر از سطح دریا انتشار دارد و به‌طور پراکنده یا کم‌وبیش انبوه در جنگل‌ها ازجمله جنگل‌های غرب و در راه سنندج به مریوان به‌طور خودرو دیده می‌شوند (Sharafati Chaleshtori, Sharafati Chaleshtori, & Rafieian, 2011). از لحاظ تغذیه‌ای مصرف مغز گردو موجب افزایش اسید چرب ضروری امگا-3 در مصرف‌کننده می‌گردد. 15 درصد از چربی‌های گردو از نوع چربی‌های غیراشباع و

[1] Walnut

مفید برای سلامت قلب می‌باشد. این نوع چربی، پایین‌آورندهٔ کلسترول بد[1] و افزایندهٔ کلسترول خوب[2] است. همچنین لیپوپروتئین[3] (ترکیب لیپیدی دیگری که لخته‌شدن خون را افزایش می‌دهد، که در واقع عامل خطرناکی برای تصلب شرایین[4] است) را کاهش می‌دهد. اسید چرب امگا-3 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). علاوه‌بر 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 ارزشمندبودن آن و نشان‌دهندهٔ خواص و اثرات وسیع آن است. گردو نیز مانند سایر مغزها از کالری زیادی (حدود 654 کالری در هر 100 گرم) برخوردار است. کالری موجود در گردو به‌طور عمده به‌دلیل مقادیر بالای پروتئین و چربی موجود در گردو است.

کرهٔ 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 به‌دست‌می‌آید. 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 ذکرشده باید در حد بهینه باشد.

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 توسعهٔ عطروطعم نامطلوب در فراورده شده و ازطریق تولید ترکیبات سمی و فعال فیزیولوژیکی منجربه تخریب ویتامین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، کلروفیل‌ها، کاروتن‌ها، آمینواسیدها، پروتئین‌ها یا آنزیم‌ها می‌گردد. هیدروپراکسیدها و محصولات حاصل از تجزیهٔ آنها مواد فعال بالقوه‌ای هستند که می‌توانند باعث تجزیهٔ پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه شوند. ازجمله ترکیبات جانبی که درنتیجهٔ تجزیهٔ 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 10 تا 30 درجهٔ سانتی‌گراد عدد پراکسید که نشانهٔ پیشرفت اکسایش است افزایش می‌یابد (Maskan & Karataş, 1998).

آجیل‌ها ممکن است تا بیش از 2/5 سال در شرایط بهینه نگهداری شوند اما تحت شرایط نامطلوب در عرض یک ماه، درنتیجهٔ تنفس، کپک‌زدن، جذب طعم‌های خارجی، بی‌رنگ‌شدن و تندی غیرقابل‌خوردن خواهندشد. محتوای چربی به تنهایی نشانگر خوبی برای بررسی پایداری در زمان نگهداری محصول نیست (Pershern, Breene, & Lulai, 1995)، اما غیراشباعیت چند غیراشباعی‌ها (Labuza & Dugan Jr, 1971; Löliger, 1990)، توکوفرول‌ها (Pershern *et al.*, 1995)، کلروفیل و بتاکاروتن، محتوای رطوبت (Evranuz, 1993) و دما (Hasenhuettl & Wan, 1992; Reynhout, 1991) بر اکسایش اولیهٔ لیپیدها و پایداری اکسایشی مواد غذایی با رطوبت متوسط در طی نگهداری تأثیر می‌گذارد (Bremner, Ford, Macfarlane, Ratcliff, & Russell, 1976; Maskan & Karataş, 1998). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌طور گسترده‌ای به‌وسیلهٔ چندین محقق موردمطالعه و بررسی قرار گرفته است (Abramovič & Abram, 2006; Nahm, Juliani, & Simon, 2012). Judde، Villeneuve، Rossignol-Castera و Le Guillou (2003) دریافتند که افزودن 11

[1] Low Density Lipoprotein (LDL)
[2] High Density Lipoprotein (HDL)
[3] Lipoprotein(a) (Lp a)
[4] Atherosclerosis

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

بوتیل هیدروکسی تولوئن[1] (BHT) آنتی‌اکسیدان سنتزی است که از دههٔ 1950 در روغن‌ها و چربی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. BHT پایداری حرارتی مناسبی دارد، به‌طور مثال در فرایندهای حرارتی بالای 175 درجهٔ سانتی‌گراد، تنها 25 تا 30 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 منجربه 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).

علاوه‌بر تندی اکسایشی، فساد میکروبی نیز ماندگاری محصولاتی مانند کرهٔ گردو را تهدید می‌کند. بدین‌منظور از ترکیبات نگهدارنده جهت جلوگیری از واکنش‌های میکروبی استفاده می‌شود. با توسعهٔ فناوری‌های تولید، استفاده از نگهدارنده‌ها در صنایع غذایی افزایش یافته است. اما استفادهٔ 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[2]) ترکیب آلی طبیعی است که به‌عنوان نگهدارنده استفاده می‌شود. اسید سوربیک و مشتقات آن (سوربات کلسیم، سوربات پتاسیم و سوربات سدیم) فعالیت ضدمیکروبی 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 به‌طور معمول در غلظت 0/025 تا 0/1 درصد مورد استفاده قرار می‌گیرند و pH بهینه برای فعالیت آنها زیر 6/5 است. اثر نگهدارندگی اسید سوربیک به‌دلیل اثر بازدارندگی آن بر فعالیت آنزیم‌های مسئول رشد میکروارگانیسم‌هاست. این ترکیبات ازطریق اثر بازدارندگی بر آنزیم‌های سولفیدریل رشد میکروارگانیسم‌ها را متوقف می‌کند. همچنین مشخص شده است که اسید سوربیک اثر بازدارندگی بر آنزیم‌های فوماراز[3]، آسپارتاز[4] و سوکسنیک دهیدروژناز[5] 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 ضدمیکروبی آنها به‌عنوان نگهدارنده تاریخچهٔ طولانی دارد. استفاده از این ترکیبات توسط کمیتهٔ تخصصی FAO/WHO برای افزودنی‌های غذایی[6] محدود شده است. طبق استانداردهای اعلام‌شده توسط کمیتهٔ تخصصی مواد غذایی (JECFA) در سازمان بین‌المللی فائو میزان جذب روزانهٔ قابل‌قبول برای اسید بنزوئیک و بنزولت‌ها صفر تا 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن است. میزان سمیت اسید بنزوئیک به‌عنوان یک افزودنی پایین است اما به‌هرحال در افراد با حساسیت بالا، جذب اسید بنزوئیک در مقادیر کمتر از 5 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 پایهٔ 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

تهیهٔ کرهٔ گردو

جهت تهیهٔ کره، گردو واریتهٔ تویسرکان خریداری شد.

[1] Butylated Hydroxytoluene (BHT)
[2] 2,4-hexadienoic acid

[3] Foamarase
[4] Aspartase
[5] Succinic dehydrogenase
[6] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)

گردوهای بوداده‌شده (بدین‌منظور گردوها در معرض دمای 120 درجهٔ سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه قرار داده شد) توسط یک آسیاب مکانیکی قوی (مدل آرمان خرد توس، ساخت ایران) خرد شد. شکر آسیاب‌شده به میزان 20 درصد، نمک به میزان 0/5 درصد و لستین به میزان 0/5 درصد به گردوی خردشده اضافه شد. عمل هم‌زدن با استفاده از آسیاب نیمه‌صنعتی (توس‌شکن خراسان، ساخت ایران) تا تهیهٔ 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 60 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 کرهٔ گردو طی 75 روز نگهداری در دمای 25 درجهٔ سانتی‌گراد بررسی شد. بدین‌منظور 5±50 گرم کرهٔ گردو توزین‌شده و در ظرف‌های درب‌دار از جنس پلاستیک و به قطر 5/5 سانتی‌متر و ارتفاع 5 سانتی‌متر ریخته شد. درب ظرف‌ها کاملاً بسته‌شده و در داخل گرم‌خانه با دمای 25 درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای هر نمونه 3 ظرف (3 تکرار) آماده شد و آزمون‌ها در فواصل زمانی 15 روزه روی نمونه‌ها انجام شد.

اثر آنتی‌اکسیدان

به فرمول پایهٔ کرهٔ گردو آنتی‌اکسیدان BHT در مقادیر صفر، 100، 150 و 200 میلی‌گرم بر کیلوگرم افزوده شد. جهت بررسی روند اکسایش کرهٔ گردو در طول مدت نگهداری، آزمون‌های عدد پراکسید و عدد اسیدی روی نمونه‌ها انجام شد.

اثر نگهدارنده

در این مرحله فرمول پایهٔ کرهٔ گردو تهیه‌شد و نگهدارنده در غلظت‌های متفاوت به آن افزوده شد. از دو نگهدارندهٔ اسیدبنزوئیک و اسیدسوربیک در مقادیر صفر، 400 و 800 میلی‌گرم در کیلوگرم و همچنین مخلوط اسیدبنزوئیک و اسیدسوربیک در غلظت 800 میلی‌گرم در کیلوگرم (به نسبت 50:50) استفاده شد. جهت بررسی روند پایداری میکروبی کرهٔ گردو در طول مدت نگهداری، شمارش کلی 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 25 درجهٔ 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 25 درجهٔ 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 به‌عبارتی فعالیت آبی نمونه در دمای 25 درجهٔ سانتی‌گراد نمایش‌داده‌شده روی صفحهٔ دستگاه خوانده شد (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI]، 1385).

پایداری اکسایشی

جهت تعیین پایداری اکسایشی نمونه‌های کرهٔ گردو، عددهای اسیدی و پراکسید آنها طی مدت نگهداری اندازه‌گیری شد. بدین‌منظور ابتدا روغن نمونه‌ها استخراج شد. برای استخراج مقدار مشخص از کرهٔ گردو (50 گرم) با حلال هگزان به نسبت 1 به 2 (وزنی-حجمی) مخلوط شده و به مدت 45 دقیقه در دمای محیط هم‌زده شد. سپس به مدت 30 دقیقه به‌صورت ثابت قرار گرفت تا محیط کاملاً دو فاز گردد و درنهایت مخلوط صاف‌شده و حلال آن تحت‌خلأ و در دمای محیط تبخیر شد. آزمون‌های مربوطه روی روغن به‌دست‌آمده انجام شد.

اندازه‌گیری عدد پراکسید[1]

0/1 تا 0/2 گرم نمونهٔ روغن در لوله‌های آزمایش 15 میلی‌لیتر وزن شد و با 9/8 میلی‌لیتر حلال کلروفرم[2]متانول[3] (به نسبت 3 به 7) مخلوط و به مدت 2 تا 4 ثانیه هم‌زده شد. محلول تیوسیونات آمونیوم[4] (محلول

[1] Peroxide Value (PV)
[2] Chloroform
[3] Methanol
[4] Ammonium Tiosianat

آبی 30 درصد) به مقدار 50 میکرولیتر اضافه شد و به مدت 2 تا 4 ثانیه هم‌زده شد سپس 50 میکرولیتر محلول آهن II نیز اضافه و به مدت 2 تا 4 ثانیه محلول هم‌زده شد. پس از 5 دقیقه گرم‌خانه‌گذاری در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج 500 نانومتر در برابر شاهد که حاوی همهٔ معرف‌ها جزء نمونه بود با دستگاه اسپکتروفتومتر (Hach، DR5000، ساخت آمریکا) خوانده شد. تمامی مراحل انجام آزمایش در نور ملایم و به مدت 10 دقیقه صورت گرفت. در این روش از محلول آهن III (شامل 1 تا 40 میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌عنوان استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد رسم و نتایج براساس میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم گزارش شد. عدد پراکسید از رابطهٔ (1) محاسبه شد.

رابطهٔ (1)

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

در رابطهٔ (1)، As میزان جذب نمونه، Ab میزان جذب شاهد در طول موج 500 نانومتر، m شیب به‌دست‌آمده از منحنی کالیبراسیون (18/76 با ضریب تبیین 0/91) و W وزن نمونهٔ روغن می‌باشند (Shantha & Decker, 1994).

اندازه‌گیری عدد اسیدی

10 گرم نمونهٔ روغن داخل ارلن توزین شد و به آن 50 میلی‌لیتر حلال اتانول‌کلروفرم به نسبت مساوی اضافه گردید (حلال باید خنثی باشد، درغیراین‌صورت باعث افزایش و یا کاهش خاصیت اسیدی می‌گردد). نمونه در مجاورت معرف فنل‌فتالئین با پتاس 0/1 نرمال، تیتر شد. عدد اسیدی از رابطهٔ (2) محاسبه شد.

رابطهٔ (2)

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

در رابطهٔ (2)؛ N نرمالیتهٔ پتاس، V حجم پتاس مصرفی و W وزن نمونه می‌باشند. عدد اسیدی برحسب میلی‌گرم پتاس مصرف‌شده به‌دست می‌آید (AOCS, 1993).

ارزیابی میکروبی

به‌منظور بررسی پایداری میکروبی نمونه‌های کرهٔ گردو در طول مدت نگهداری، شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و شمارش کپک و مخمر روی نمونه‌ها انجام شد.

شمارش کلی

برای تهیهٔ رقت‌های مختلف، ابتدا 10 گرم از نمونهٔ کرهٔ گردو به ارلن حاوی 90 میلی‌لیتر محلول رقیق‌کنندهٔ مناسب افزوده شد و کاملاً مخلوط گردید تا رقت 0/1 به‌دست آید. برای تهیهٔ سایر رقت‌ها، به تعداد لازم لوله‌های حاوی 9 میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده تهیه شد و سپس به کمک سمپلر، 1 میلی‌لیتر از رقت اولیه برداشته و به اولین لولهٔ حاوی رقیق‌کننده افزوده شد و این عمل تا رسیدن به آخرین رقت موردنیاز ادامه یافت.

شمارش کلی پرگنه‌های میکروارگانیسم‌ها در دمای 30 درجهٔ سانتی‌گراد مطابق استاندارد ملی ایران به شمارهٔ 9899 (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI]، 1394b) انجام شد. بدین‌منظور از محیط کشت نوترینت‌آگار[1] استفاده شد. محیط کشت یادشده مطابق دستورالعمل شرکت سازنده آماده شد. پس از آن رقت‌های لازم برای آزمایش آماده شدند. سپس به هر پلیت 10 میلی‌لیتر محیط کشت ذوب‌شده با دمای 45 درجهٔ سانتی‌گراد افزوده شد (زمان تهیهٔ سوسپانسیون تا افزودن به پلیت نباید از 15 دقیقه تجاوز نماید). پس از بستن محیط کشت، پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 30 درجهٔ سانتی‌گراد به‌صورت واژگون گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از 24 ساعت گرم‌خانه‌گذاری، برای شمارش پرگنه‌های هر پلیت از دستگاه پرگنه‌شمار[2] (Biochemical Engineering ME 201، ساخت ایران) استفاده گردید.

شمارش کپک و مخمر

این آزمون براساس استانداردهای ملی ایران به شمارهٔ 10899/1 و 9899 (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI]، 1387؛ 1394b) انجام شد. رقت‌های موردنظر آماده شدند و از محیط کشت پوتیتودکستروزآگار[3] استفاده شد. پلیت‌ها به‌صورت وارونه و به مدت 3 الی 7 روز در دمای 25 درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری و پس از طی این مدت با استفاده از دستگاه پرگنه‌شمار، شمارش شدند.

[1] Nutrient Agar (NA)
[2] Colony counter
[3] Potato Dextrose Agar (PDA)

تجزیه‌وتحلیل آماری

از طرح کاملاً تصادفی برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد. مقایسهٔ میانگین‌ها براساس آنالیز واریانس در سطح اطمینان 95 درصد استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار Mini Tab نسخهٔ 16 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel نسخهٔ 2010 استفاده شد.

نتایج و بحث

عدد پراکسید (PV[1])

به‌طورکلی کرهٔ دانه‌های روغنی به‌طور متوسط حاوی 40 تا 45 درصد روغن است که 75 تا 80 درصد آن از اسیدهای چرب غیراشباع تشکیل شده است. اما براساس نتایج Savage، Dutta و McNeil (1999) کل روغن موجود در 13 واریتهٔ مختلف گردوی پرورش‌یافته در باغ تحقیقاتی دانشگاه لینکلن آمریکا بین 64/2 تا 68/9 درصد بود که میزان اسید اولئیک آن 12/7 تا 20/4 درصد، اسید لینولئیک 57 تا 62/5 درصد و اسید لینولنیک 10/7 تا 16/2 درصد بود.

درمورد گردوی ایران نیز گلزاری و همکاران در سال 1392 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 (44/84-68/44 درصد) و سایر اسیدهای چرب موجود لینولنیک (15/31-23/92 درصد)، اسید اولئیک (8/02-31/62 درصد)، اسید پالمیتیک (2/42-6/44 درصد) و اسید استئاریک (1/65-2/48 درصد) بود. همچنین آنها اظهار داشتند که مقدار روغن گردو در ارقام مختلف 60-75 درصد و میزان پروتئین مغز در این ارقام 14/67-20/38 درصد بود (گلزاری، راحمی، حسنی، وحدتی و محمدی، 1392).

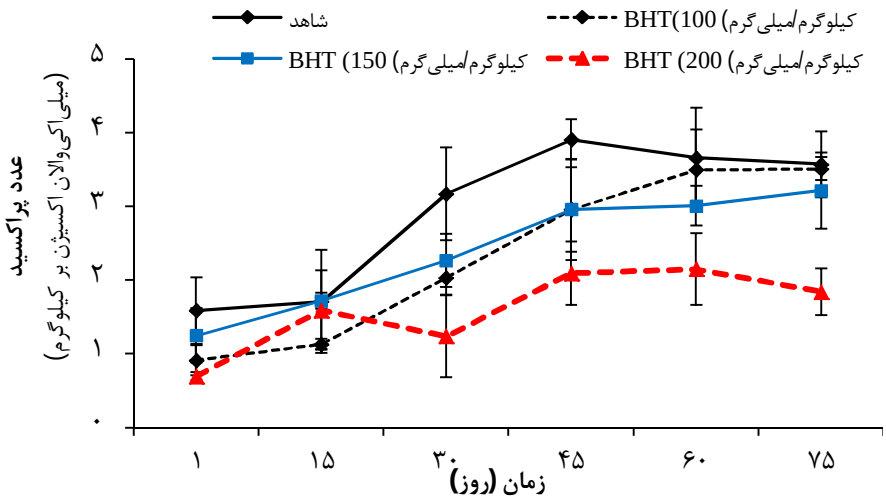
پایین‌بودن اسیدهای چرب اشباع و بالابودن اسیدهای چرب چندغیراشباع در روغن گردو منجربه‌افزایش اکسایش‌پذیری و تندشدن آنها شده و نیاز به نگهداری در شرایط کنترل‌شده و افزودن آنتی‌اکسیدان را تشدید می‌کند.

نتایج تجزیهٔ واریانس حاکی از تأثیر معنی‌دار افزودن BHT بر PV نمونه‌های کرهٔ گردو بود ($P<0/05$). تغییرات PV نمونه‌های کرهٔ گردو حاوی غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان BHT در مقایسه با شاهد (بدون آنتی‌اکسیدان) طی 75 روز نگهداری در دمای 25 درجهٔ سانتی‌گراد در شکل (1) نشان داده شده است. نتایج گویای این مطلب است که با افزایش زمان، PV نمونه‌های کرهٔ گردو به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($P<0/05$) درحالی‌که در نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف BHT و همچنین نمونهٔ شاهد، شتاب افزایش PV متفاوت بود. بیشترین شتاب افزایش PV به نمونهٔ کرهٔ گردوی شاهد مربوط بود، به‌طوری‌که در فاصلهٔ روز 15ام تا 45ام، PV آن از 1/71 به 3/91 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم رسید. پس از روز 45ام، PV در نمونهٔ شاهد روند نزولی را طی کرد که می‌تواند گواه شکستن فراورده‌های اولیهٔ اکسایش (هیدروپراکسیدها) و تبدیل آنها به فراورده‌های ثانویه باشد.

Chien (2015) از آلفاتوکوفرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در فرمولاسیون کرهٔ دانه‌های گیاهی (دانه‌های آفتاب‌گردان، کدو و کنجد) استفاده کردند که نتایج آنها بیانگر عدم کارایی آلفاتوکوفرول در جلوگیری از اکسایش در دمای 30 و 50 درجهٔ سانتی‌گراد بود و میزان اکسایش طی نگهداری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

PV در نمونه‌های کرهٔ گردو حاوی 100 و 150 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم از آنتی‌اکسیدان BHT، تا پایان روز 75ام روند افزایشی داشت اما شتاب افزایش در نمونهٔ حاوی 100 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم از BHT بیشتر از نمونهٔ حاوی 150 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم BHT بود. شیب سرعت افزایش PV در نمونه‌های کرهٔ گردو حاوی 100 و 150 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم از BHT به‌ترتیب از روزهای 60ام و 45ام بسیار کند بود که آن را می‌توان به تعادل بین شکست هیدروپراکسیدها و تشکیل آنها در این بازهٔ زمانی نسبت داد.

[1] Peroxide value



شکل 1- تغییرات PV نمونه‌های کرهٔ گردو حاوی غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم در کیلوگرم) آنتی‌اکسیدان BHT در مقایسه با شاهد طی 75 روز نگهداری در دمای 25 درجهٔ سانتی‌گراد

PV نمونه‌های کرهٔ گردوی حاوی 200 میلی‌گرم بر کیلوگرم از BHT به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر نمونه‌ها طی دورهٔ ماندگاری بود به‌طوری‌که در پایان روز 75ام تفاوت معنی‌داری بین کرهٔ گردوی شاهد و نمونه‌های حاوی 100 و 150 میلی‌گرم بر کیلوگرم از BHT وجود نداشت اما PV نمونه‌های کرهٔ گردوی حاوی 200 میلی‌گرم بر کیلوگرم از BHT به‌طور معنی‌دار و چشمگیری پایین‌تر (48 درصد) از سایر نمونه‌ها بود ($P<0/05$).

Abu-Jdayil، Al-Malah و Asoud (2002) PV نمونه‌های کرهٔ سویا (کرهٔ آرد سویا، کرهٔ سویای پخته‌شده، کرهٔ سویای جوانه‌زده و کرهٔ سویای سرخ‌شده) را طی 5 ماه نگهداری در دمای 25 درجهٔ سانتی‌گراد اندازه‌گیری نموده و با کرهٔ بادام‌زمینی تجاری مقایسه کردند. نتایج آنها بیانگر پایین‌بودن PV کرهٔ بادام‌زمینی نسبت به همهٔ نمونه‌های کرهٔ سویا در کل مدت نگهداری بود به‌طوری‌که در پایان مدت 5 ماه PV کرهٔ بادام‌زمینی 10/4 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم بود. درحالی‌که PV کره‌های آرد، سرخ‌شده، پخته و جوانه‌زدهٔ سویا به‌ترتیب 3، 2، 1/3 و 1/1 برابر بیشتر از کرهٔ بادام‌زمینی بود.

Shakerardekani، Karim، Ghazali و Chin (2015) PV خمیر و اسپرد پسته را طی 25 روز در دمای 60 درجهٔ سانتی‌گراد مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها حاکی از PV پایین‌تر خمیر پسته نسبت به اسپرد آن پس از 25 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 کمتر از اسپرد آن بود. به‌طورکلی نتایج این محققین گواه قابل‌قبول‌بودن PV همهٔ نمونه‌ها پس از 25 روز نگهداری در دمای 25 درجهٔ 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 (2015)، PV اردهٔ آفتاب‌گردان را طی نگهداری در دمای 4، 40 درجهٔ سانتی‌گراد و دمای اتاق به مدت 3 ماه بررسی کردند. نتایج آنها حاکی از افزایش معنی‌دار PV در همهٔ نمونه‌های روغن بود به‌طوری‌که PV آن از 25/17 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم در زمان تولید به 36/29، 50/18 و 10/12 به‌ترتیب در دمای 4 درجهٔ سانتی‌گراد، دمای اتاق و دمای 40 درجهٔ سانتی‌گراد رسید.

حقانی حقیقی، آذر، مظلومی و کمیلی فنود (1387) ماندگاری کرهٔ پسته را در دو دمای 25 و 45 درجهٔ سانتی‌گراد طی 120 روز مورد پایش قرار دادند. نتایج آنها گویای پایداری خوب روغن کرهٔ پسته طی ماندگاری بود به‌طوری‌که در پایان 120 روز نگهداری، PV کرهٔ پسته در دمای 25 و 45 درجهٔ سانتی‌گراد از 0/11 به‌ترتیب به 2 و 2/5 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم رسید. درصد بالاتر روغن چندغیراشباع در سویا می‌تواند علت حساسیت بالاتر آن به اکسایش نسبت به کرهٔ بادام‌زمینی باشد.

باتوجه‌به نتایج محققین فوق یکی از علل سرعت پایین اکسایش در نمونه‌های کرهٔ گردوی موردمطالعه در این پژوهش می‌تواند نگهداری آنها در دمای نسبتاً پایین یعنی دمای 25 درجهٔ سانتی‌گراد باشد.

براساس استاندارد ملی ایران به شمارهٔ 5690 و 5691 (سازمان ملی استاندارد ایران [ISIRI]، 1379؛ 1394a) بیشینهٔ مجاز PV برای کرهٔ بادام‌زمینی، کرهٔ پسته به‌ترتیب 12 و 5 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم است. همچنین براساس استاندارد Codex Alimentarius Commission (1993) بیشینهٔ مجاز PV در کره‌های گیاهی 10 میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم است که نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر گویای کمتربودن PV تمام نمونه‌های موردمطالعه زیر حدمجاز تعیین‌شده براساس هریک از استانداردهای یادشده در طول 75 روز نگهداری در دمای 25 درجهٔ سانتی‌گراد می‌باشد. اما براساس نتایج به‌دست‌آمده، باتوجه‌به پیشرفت اکسایش، درصورتی‌که هدف نگهداری طولانی مدت کرهٔ گردو در شرایط دمایی 2±25 درجهٔ سانتی‌گراد باشد، نیاز به استفاده از آنتی‌اکسیدان در فرمولاسیون آن می‌باشد.

عدد اسیدی

نتایج تجزیه‌وتحلیل آماری حاکی از عدم وجود تغییرات معنی‌دار عدد اسیدی نمونه‌های کرهٔ گردو حاوی غلظت‌های مختلف BHT در مقایسه با شاهد در طول مدت نگهداری بود ($P>0/05$). عدد اسیدی کرهٔ گردو پس از تولید 0/3 درصد بود که تا روز 75ام نگهداری در نمونه‌های مختلف به 0/4 تا 0/5 درصد رسید. براساس استاندارد ملی ایران به شمارهٔ 5690 و 5691 (ISIRI، 1379؛ 1394a) بیشینهٔ مجاز اسیدیته برای کرهٔ بادام‌زمینی و کرهٔ پسته 2/5 درصد برای حلوای گردویی 0/1 درصد است.

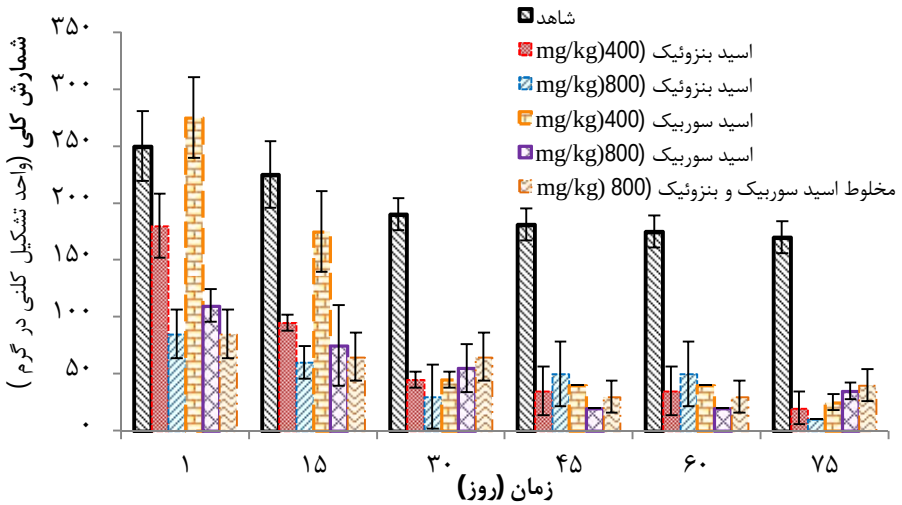
بارمیکروبی

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. دراین‌رابطه اسیدسوربیک (CH3-CH=CH-CH=CH-COOH) نقش برجسته‌ای دارد. به‌طورکلی اثر ضدمیکروبی اسیدسوربیک بیشتر روی کپک‌ها و مخمرها بوده و درمورد باکتری‌ها کمتر است. اثر ضدقارچی این اسید ناشی از عدم متابولیزه‌شدن سیستم پیوند دوگانهٔ مزدوج (در موقعیت آلفا) موجود در زنجیرهٔ آن توسط قارچ‌هاست.

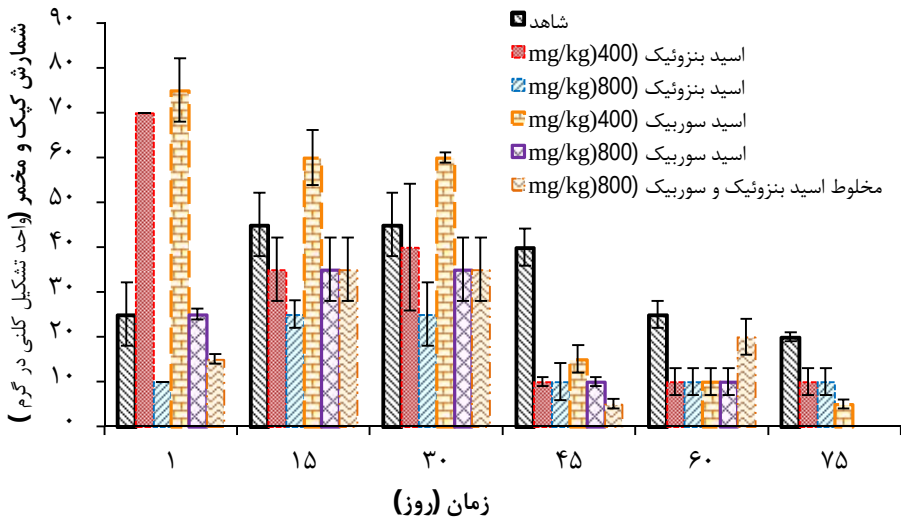
اسیدبنزوئیک به‌عنوان یک مادهٔ ضدمیکروبی در حد وسیعی جهت حفاظت مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اثر ضدمیکروبی آن روی دیوارهٔ سلولی، آنزیم‌های سیکل کربس و همچنین روی آنزیم‌هایی که در فسفوریلاسیون اکسیداتیو[1] دخالت دارند ظاهر می‌شود و با آزادکردن پروتون منجربه اختلال در کار تبادل مواد از دیوارهٔ سلولی می‌گردد. اثر نابودکنندگی اسیدبنزوئیک بیشتر روی مخمرها و باکتری‌هاست و درمورد کپک‌ها بسیار کمتر است (فاطمی، 1395).

نتایج شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های کرهٔ گردوی حاوی نگهدارنده‌های مختلف در مقایسه با شاهد (بدون نگهدارنده) در شکل (2) و (3) آورده شده است.



شکل 2- نتایج شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های کرهٔ گردوی حاوی نگهدارنده‌های مختلف در مقایسه با شاهد (بدون نگهدارنده) طی 75 روز نگهداری در دمای 25 درجهٔ سانتی‌گراد

[1] Oxidative phosphorylation



شکل 3- نتایج شمارش کپک و مخمرها در نمونه‌های کرۀ گردوی حاوی نگهدارنده‌های مختلف در مقایسه با شاهد (بدون نگهدارنده) طی 75 روز نگهداری در دمای 25 درجۀ سانتی‌گراد

به‌طورکلی نتایج مقایسۀ میانگین نشان داد که اختلاف بین شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های کرۀ گردوی حاوی انواع نگهدارنده تنها تا روز 15ام معنی‌دار بود ($P<0/05$). پس از گذشت این مدت تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های کرۀ گردو تا پایان مدت نگهداری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند ($P>0/05$).

اختلاف معنی‌دار مشاهده‌شده در تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های کرۀ گردو در روز اول تولید، می‌تواند به آلودگی اولیۀ مواد مورد استفاده یا شرایط تولید مربوط باشد. نمونه‌های کرۀ گردوی حاوی اسیدهای سوربیک و بنزوئیک در غلظت 800 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 نمونۀ کرۀ گردوی نمونۀ شاهد (بدون نگهدارنده) در روز اول بالا بود که طی نگهداری میزان آن کاهش یافت. روند کاهشی از روز 30ام تا پایان مدت نگهداری با شیب کندتر و غیرمعنی‌دار ادامه داشت. احتمالاً ترکیبات فنلی موجود در پوستۀ رویی مغز گردو اثر ضدمیکروبی داشته و مخلوط‌شدن آن با مغز گردو سبب کاهش بار میکروبی در طی مدت زمان نگهداری شده است. البته این کاهش چندان زیاد نیست و به‌همین‌دلیل نیاز به استفاده از نگهدارنده وجود دارد.

به‌طورکلی به نظر می‌رسد بنزوات در جلوگیری از رشد باکتری‌ها در کرۀ گردو بهتر از سوربات عمل می‌کند.

باتوجه‌به ماهیت روغنی و فعالیت آبی پایین نمونه‌های کرۀ گردو، نتایج به‌دست‌آمده دور از انتظار نبود. شایان ذکر است حداقل فعالیت آبی موردنیاز برای رشد باکتری‌ها 0/6 می‌باشد.

نتایج Chien (2015) نشان داد که استفاده از غلظت‌های 5، 10 و 15 درصد عصارۀ دانۀ انگور در کرۀ دانه‌های گیاهی منجربه‌کاهش رشد *سالمونلا انتریکا*[1] و *لیستریا اینوکوا*[2] طی 9 روز نگهداری در دمای 25 درجۀ 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 درمورد نمونۀ شاهد نیز صادق بود. غلظت 15 درصد عصارۀ انگور بیشترین اثر را در جلوگیری از رشد هر دو باکتری موردمطالعۀ این محققین داشت. آنها همچنین گزارش کردند که رشد *لیستریا اینوکوا* در نمونۀ شاهد نسبت به نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف سینامالدئید[3] (0/1، 1 و 1/5 درصد) کمتر بود.

براساس استاندارد ملی ایران به شمارۀ 5690 (ISIRI، 1394a) بیشینۀ مجاز شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در کرۀ بادام‌زمینی 10000 واحد تشکیل کلنی در گرم است.

[1] *S. enterica*
[2] *L.innocua*
[3] Cinnamaldehyde

براساس این استاندارد شمارش کلی تمام نمونه‌های کرۀ گردو در طول 75 روز نگهداری زیر حدّمجاز بود.

شمارش کپک و مخمر

نتایج شمارش کپک و مخمر نمونه‌های کرۀ گردو، طی دورۀ نگهداری در شکل (3) نشان داده شده است. نتایج مقایسۀ میانگین حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در تعداد کپک و مخمر نمونه‌های کرۀ گردوی تولیدی در روز اول بود ($P<0/05$) که به نظر می‌رسد این اختلاف ناشی از بار میکروبی اولیۀ مواد مصرفی و شرایط ضمن تولید باشد. در همۀ نمونه‌ها به استثنای نمونه‌های حاوی 400 میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدسوربیک و اسیدبنزوئیک از روز اول تا روز 15ام، 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 نگهدارندۀ بنزوات در غلظت 800 میلی‌گرم بر کیلوگرم در جلوگیری از رشد کپک‌ها و مخمرها در کرۀ گردو نسبت به سوربات کارآمدتر عمل کرد.

به‌طورکلی در اکثر نمونه‌ها بعد از روز 30ام تا 75ام نگهداری، تعداد کپک و مخمرها در کرۀ گردو بسیار کاهش نشان داد. این روند کاهشی در نمونۀ شاهد از روز 45ام آغاز شد.

براساس نتایج فوق، بار میکروبی کرۀ گردو طی دورۀ نگهداری ارتباط مستقیم با بار میکروبی اولیۀ آن دارد اما طی نگهداری به‌دلیل فعالیت آبی پایین و دمای مناسب، امکان رشد کپک و مخمرها کاهش می‌یابد شتاب این کاهش در نمونه‌های حاوی نگهدارندۀ بیش از نمونۀ شاهد بود.

در بررسی بار میکروبی نمونه‌های کرۀ سویا (کرۀ آرد سویا، کرۀ سویای پخته‌شده، کرۀ سویای جوانه‌زده و کرۀ سویای سرخ‌شده) طی 5 ماه نگهداری در دمای 25 درجۀ سانتی‌گراد، Abu-Jdayil و همکاران (2002) بیان کردند که بیشترین میزان میکروارگانیسم‌ها در کرۀ 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 تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. در کرۀ سویای پخته‌شده به‌دلیل تیمار حرارتی و غیرفعال‌شدن میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌ها، زمان ماندگاری بهبود یافت.

براساس استاندارد ملی ایران به شمارۀ 5690 (ISIRI، 1394a) بیشینۀ مجاز کپک و مخمر در کرۀ بادام‌زمینی به‌ترتیب 100 و 10000 واحد تشکیل کلنی در گرم است. ازاین‌رو، شایان ذکر است که در همۀ نمونه‌ها از روز اول تا پایان دورۀ نگهداری، میزان کپک و مخمر و باکتری‌ها کمتر از محدودۀ مجاز در استاندارد ملی ایران بود.

نتیجه‌گیری

نتایج پایش اکسایشی کرۀ گردو طی 75 روز نگهداری نشانگر افزایش عدد پراکسید از روز اول تا روز 75ام با شیب تند در نمونۀ شاهد بود. حضور آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در غلظت 200 میلی‌گرم بر لیتر سرعت افزایش عدد پراکسید را به میزان قابل‌توجهی کاهش داد درحالی‌که روی عدد اسیدی نمونه‌های کرۀ گردو تأثیر معنی‌داری نداشت. اسیدبنزوئیک در مقایسه با اسیدسوربیک کارایی بیشتری را در کاهش شمارش کلی باکتری‌ها و شمارش کپک و مخمر طی دورۀ 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.

منابع

حقانی حقیقی، ح.، آذر، م.، مظلومی، م. و کمیلی فنود، ر. (1387). بررسی فرمولاسیون، تولید و ارزیابی حسی کره پسته. *مجله علوم و صنایع غذایی*، 5(3)، 19-26 .

سازمان ملی استاندارد ایران. (1379). کره پسته-ویژگی ها و روش های آزمون. (استاندارد ملی ایران، شمارۀ 5691). برگرفته از http://standard.isiri.gov.ir/StandardFiles/5691.htm

سازمان ملی استاندارد ایران. (1385). کیک-ویژگی ها و روش های آزمون. (استاندارد ملی ایران، شمارهٔ 2553، تجدیدنظر سوم). برگرفته از http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=11869

سازمان ملی استاندارد ایران. (1387). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای شمارش کپک ها و مخمرها-قسمت اول : روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی (a_w) بیشتر از 0/95. (استاندارد ملی ایران، شمارهٔ 1-10899). برگرفته از http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=12277

سازمان ملی استاندارد ایران. (1394a). کره بادام زمینی -ویژگی ها و روش های آزمون. (استاندارد ملی ایران، شمارهٔ 5690، تجدیدنظر اول). برگرفته از http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=46509

سازمان ملی استاندارد ایران. (1394b). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-الزامات کلی و راهنما برای آزمون های میکروبیولوژی. (استاندارد ملی ایران، شمارهٔ 9899، تجدیدنظر اول). برگرفته ازhttp://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=43546

فاطمی، ح. (1395). شیمی مواد غذایی: (صفحات: 480): شرکت سهامی انتشار.

گلزاری، م.، راحمی، م.، حسنی، د.، وحدتی، ک. و محمدی، ن. (1392). بررسی میزان پروتئین، روغن و اسیدهای چرب برخی ارقام گردو (*Juglans regia* L.) و تاثیر دانه گرده بر برخی خصوصیات آن. *مجله علوم و صنایع غذایی*، 10(38)، 21-30 .

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 (tehineh). *Food Hydrocolloids, 16*(1), 55-61. doi: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

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 Haghighi, 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, 3th 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, 1st 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

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 perorlride 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

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

Mostafa Shahidi Noghabi[1*], Razieh Niazmand[1], Mozhdeh Sarraf[2], Mahnaz Shahidi Noghabi [3]

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