(مقاله پژوهشی)

تاثیرعصارۀآزاد و ریزپوشانی‌شدۀ پونه بینالودی بر ویژگی‌های‌حسی و میکروبی‌دوغ

افسانه عظیمی‌محله[۱]، پروین شرایعی[۲*]، الهام آذرپژوه[۳]، اعظم عظیمی محله[۴]

۱- دانش آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد سلامی، سبزوار، ایران.

۲- دانشیار پژوهش، بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

۳- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

۴- دانش آموخته دکتری، گروه بهداشت و تکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه دولتی آنکارا، آنکارا، ترکیه.

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۰

DOI: 10.30495/jfst.2021.1935781.1737

چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی خواص ضدمیکروبی عصارۀ آزاد و ریزپوشانی شده گیاه *پونه‌سای بینالودی* (*Nepeta binaludensis*) در مدل غذایی (دوغ) انجام پذیرفت. بدین منظور، ابتدا عصارۀ گیاه با کمک فرآیند میدان پالس الکتریک (ولتاژ ۶۰۰۰ ولت و تعداد پالس۶۰)استخراج شد. سپس، تاثیر عصارۀ آزاد (۰/۲ و۰/۶درصد) و ریزپوشانی شده با ۴ نوع ترکیب مختلف دیواره (دیوارۀ حاوی ترکیب مالتودکسترین۷(۲۶/۹۷ درصد)باصمغ‌عربی (۲۹/۳۶ درصد) و مالتودکسترین ۲۰ (۴۳/۶۹ درصد) ، دیواره حاوی ترکیب ۱ درصد آلژینات-سدیم و ۱ درصد کیتوزان، دیوارۀ حاوی ترکیب ا درصد آلژینات‌سدیم و ا درصد اینولین و دیوارۀ حاوی ۲ درصد آلژینات‌سدیم) با دو غلظت (۱و۳ درصد) در مقایسه با نگهدارندۀ سنتزی سوربات‌پتاسیم (با غلظت ۰/۱ درصد) بر ویژگی‌های حسی و تغییرات میزان ترکیبات فنلی و میکروبی(تعداد کل کپک و مخمر) محصول غذایی دوغ طی ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج نشان داد عصارۀ آزاد و ریزپوشانی شده قادر به کنترل رشد کپک و مخمر با حفظ خصوصیات حسی و فنلی در دوغ بودند و کمترین میزان رشد کپک و مخمر بعد از ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال به ترتیب در نمونه‌های حاوی ترکیب دیوارۀ ادرصد آلژینات‌سدیم وا درصد اینولین (غلظت ۱ و۳ درصد) و دیواره حاوی ترکیب ۲ درصد آلژینات‌سدیم (غلظت۳ درصد) مشاهده شد که تفاوت آماری معنی‌داری با نمونۀ حاوی ۰/۱ درصد سوربات‌پتاسیم نداشتند(P>۰/۰۵). نتایج آزمون حسی نشان داد نمونه‌های دوغ حاوی عصاره ریزپوشانی شده با ۴ نوع ترکیب دیواره‌که ذکر شد از نظر خصوصیات حسی تفاوت آماری معنی‌داری با نمونه دوغ حاوی سوربات‌پتاسیم نداشتند(P> ۰/۰۵). همچنین نمونه‌های دوغ حاوی ریزکپسول‌های با ترکیب دیوارۀ (۱ درصد آلژینات‌سدیم و ۱درصد اینولین) و(۱درصد سدیم آلژینات با ۱ درصد کیتوزان) و ۲ درصدآلژینات‌سدیم با غلظت ۳ درصد بعد از ۲۸ روز نگهداری مقدار ترکیبات فنلی بیشتری داشتند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، خواص حسی، گیاه پونه‌سای بینالودی، دوغ.

* مسئول مکاتبات: parvin_sharayei@yahoo.com

۱- مقدمه

استفاده از مواد افزودنی برای کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها، یکی از مهم‌ترین جنبه‌های نگهداری مواد غذایی است. در بسیاری از محصولات‌مبتنی‌برآب، به‌ویژه‌نوشیدنی‌های ماست ازافزودنی‌های شیمیایی‌مانندنمک‌های‌بنزوات و سوربات استفاده می‌شود. هرچند استفاده‌ازاین‌نگهدارنده‌های‌شیمیایی سبب افزایش مدت نگهداری می‌شود، اما استفاده ازآن‌ها به علت مسمومیت، آسیب‌کبدی، سرطان‌زایی و به مخاطره انداختن سلامتی‌محدود گشته است. به همین دلیل صنعت تولید این مواد غذایی، به دنبال استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی و بی‌ضرر (همانند عصاره‌های‌گیاهی) می باشد، که ضمن حفظ‌کیفیت و خواص حسی، باعث افزایش زمان ماندگاری و بهبود سلامتی جامعه نیز شود (۷). یکی از منابع با ارزش‌برای‌تولید افزودنی‌های طبیعی، ترکیبات موثر عصاره های گیاهان دارویی هستند. از زمان‌های قدیم گیاهان در انواع غذاها و نوشیدنی‌ها برای بهبود عطر و طعم ومحافظت‌آن‌ها از فساد و همچنین برای درمان بسیاری از بیماری‌ها اضافه شده‌اند (۱۰). نپتا یک جنس بزرگ متعلق به خانواده *لامیاسه* می‌باشد و این جنس حدود ۲۸۰گونه داردکه در نواحی مرکزی و جنوبی اروپا و آسیایخاورمیانه‌پراکنده هستند.گونه‌های این جنس در طب سنتی به عنوان داروهای ضدالتهاب، ضداسپاسم، ضدآسم و آرام‌بخش استفاده می‌شوند. گونه‌های نپتا شامل ترکیبات زیست فعال همانند فنلها، فلاوونوئیدها و ترپن‌ها هستند (۳۰). پونه‌سای بینالودی یک گیاه نادر چندساله است که در کوه‌های بینالود در شمال شرقی ایران به صورت خودرو رشد میکند (۲۷). محمدپور و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند اسانس‌گیاه پونه‌سای بینالودی خواص مهارکنندگی‌برعلیه*باسیلوس‌سرئوس*(۳/۱۲۵میلی‌گرم برمیلی‌لیتر)، *اشرشیاکلی*(۳/۱۲۵میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر)،*استافیلوکوکوس اورئوس* (۶/۲۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و *کاندیدا آلبیکنس* (۱۲/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) دارد(۲۶). از آن‌جا که عصارهٔ گیاهان دارویی غنی از ترکیبات‌آنتی‌اکسیدانی‌وضدمیکروبی‌است‌و پایداری این ترکیبات درشرایط محیطی مختلف پایین است، استفاده از روشی که بتواند این‌ترکیبات‌رادربرابرعوامل‌محیطی‌حفظ‌کندو همچنین آزادسازی آن را درزمان معین و به صورت‌کامل محقق نماید، دارای اهمیت ویژه‌ای‌می‌باشد. ریزپوشانی، یکی از روش‌های محافظت ترکیبات شیمیایی‌بافعالیت‌بیولوژیکی‌است. ریزپوشانی، روش به دام اندازی ترکیبات‌فعال‌بامواد مواد دیواره می‌باشد (۱۷). روش‌های متعددی برای ریزپوشانی وجود دارد که انتخاب روش مناسب بستگی به کاربردهای خاص و عواملی مانند اندازه ذرات، خواص فیزیکوشیمیایی ترکیبات هسته و مواد پوشش‌دهنده، مکانیسم آزادسازی، هزینه وغیره‌بستگی‌دارد (۲۶). خشک کردن انجمادی روش مناسب چند مرحله‌ای برای خشک‌کردن و ریزپوشانی مواد حساس‌به‌گرما است (۱۵). انتخاب مواد دیواره یکی از مراحل حساس‌ریزپوشانی‌است‌که‌باید دارای معیارهایی مانند سازگاربودن با مواد غذایی، مقاومت مکانیکی، اندازه ذرات مناسب انتشار حرارتی، انحلال مناسب و غیره را داشته باشد. مالتودکسترین با معادل دکستروز مختلف (DE) و صمغ عربی از مواد دیواره رایج می‌باشند(۲۴). بالابودن‌کارایی‌ریزپوشانی توسط مالتودکسترین‌ها، پایین‌بودن‌گرانروی محلول آن¬ها حتی‌درغلظت‌های بالا، در دسترس‌بودن‌آن‌هادروزن‌های‌مولکولی‌مختلف و پایین بودن قیمت آن‌ها، از عوامل‌مهم دراستفاده از این‌ترکیبات در ریزپوشانی است (۲۹). صمغ‌ها، به علت خواص پایدارکنندگی و تشکیل فیلم در ریزپوشانی استفاده می‌شوند. صمغ عربی، ترشحات‌پلی‌ساکاریدی بی‌رنگ گیاه اقاقیا می‌باشد که سالهاست به عنوان مواددیواره شناخته شده است و به علت خواص امولسیون‌کنندگی بالا برجسته بوده و به طور وسیع استفاده می‌شود (۱۶). از آن جایی که‌استفاده‌ازیک دیواره به تنهایی نمی‌تواند همهٔ خصوصیات لازم را برای پوشش‌دهی ترکیبات حساس فراهم کند، بنابراین به منظور بهبود خصوصیات ریزپوشانی از مخلوط کربوهیدرات‌ها با پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها با خصوصیات مختلف استفاده می شود. استفاده از آلژینات‌ها به عنوان مواد پوشش‌دهنده نیز توسط اداره غذا و دارو آمریکا و اداره ایمنی مواد غذایی تایید شده‌است. علاوه بر این آلژینات خصوصیات مطلوبی مانند عدم سمیت، در دسترس بودن، پایداری حرارتی و شیمیایی نیز دارد (۱۶). اما آلژینات‌ها مقاومت مکانیکی‌کمی مخصوصا طی خشک کردن با روش انجمادی دارند. اضافه کردن پلی‌ساکاریدها باعث بهبودمقاومت‌مکانیکی‌آن‌هامی‌شود(۳۹).اینولین مقاومت مکانیکی آلژینات سدیم را بهبود می‌بخشد (۱۲). هم‌چنین، انتظار می‌رود که اینولین با طعم کمی شیرین، تلخی ترکیبات زیست فعال را از بین ببرد و سبب پذیرش بیشتر مصرف کنندگان شود. در سال‌های اخیر نشان داده شده است ریزکپسول‌های بر پایه آلژینات برای

رهاسازی‌ترکیبات‌عصاره‌گیاهان‌دارویی *paraguariensis* (۱۳)، *Piper sarmentosum* (۱۱)، *Thymus serpyllum L.* (۳۳) مناسب‌می‌باشد. بالانس و همکاران (۲۰۱۶) گزارش‌کردند که وجود اینولین به همراه آلژینات در ساختمان کپسول‌های ریزپوشانی شده ساختار ریزکپسول‌ها را طی فرایند خشک‌کردن انجمادی حفظ می‌کند (۷). کیتوزان از اگزوزیل‌های خرچنگ به دست می‌آید که دارای گروه‌های AOH و ANH_2 است که به‌عنوان‌بارمنفی‌عمل می‌کنند. پوشش کیتوزان اطراف‌کپسول های آلژینات سبب افزایش پایداری فیزیکی و شیمیایی‌کپسول‌ها و کاهش‌اثرتخریبی‌عوامل‌ضدژل‌ودرگیرکننده‌یون‌کلسیم در ساختار کپسول‌می‌شود(۳۸,۱۸).آزوپیرولا–اولازولا(۲۰۱۶)در ریزپوشانی تفاله‌انگوربادیواره‌آلژینات وکیتوزان مشاهده‌کردندکه‌دیواره های حاوی‌کیتوزان، راندمان ریزپوشانی بیشتری داشتند (۳). یکی از روش‌های ارزیابی پایداری ترکیبات ریزپوشانی شده و آزادسازی آن‌ها درزمان معین‌وبه‌صورت‌کامل، بررسی پایداری این ترکیبات در سامانه‌های غذایی می‌باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد استفاده از عصاره ریزپوشانی شده در فرمولاسیون ماده غذایی مانند دوغ به جای نگهدارنده سنتزی سوربات‌پتاسیم، علاوه بر کنترل و یا مهار رشد میکروب‌ها باعث افزایش زمان ماندگاری نیزشود. بر طبق بررسی‌های به عمل آمده، مشخص شده‌است که تاکنون تحقیقی درخصوص ارزیابی خصوصیات ضدمیکروبی عصاره گیاه پونه بینالودی (آزاد و ریزپوشانی شده) در مدل غذایی (دوغ) انجام نشده‌است و یا در دسترس نیست. بنابراین، با توجه به اهمیت استفاده از افزودنی‌های طبیعی، پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف عصارهٔ آزاد و ریزپوشانی شده با ترکیب دیواره‌های مختلف بر خواص حسی و تغییرات ترکیبات فنلی و جمعیت میکروبی (تعداد کل کپک و مخمر) بر محصول غذایی دوغ در مقایسه با نگهدارندهٔ شیمیایی سوربات‌پتاسیم انجام پذیرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

گیاه‌پونه‌سای‌بینالودی‌درمرحله‌گل‌دهی‌ازکوه‌های بینالود (خراسان رضوی، ایران)جمع‌آوری‌شد. قسمت‌هوایی‌گیاه‌پونه‌سای بینالودی بعد از یک شستشوی کلی برای حذف گرد و خاک سطحی، در محلی خشک و بدور از نور آفتاب خشک شد. نمونه‌های خشک شده در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و تا زمان آزمایش در دمای اتاق نگهداری شدند. معرف فولین‌سیوکالچو، TPTZ[1]، DPPH[2]، متانول، کربنات‌سدیم، سولفات‌آهن II، کلریدآهن III شش‌آبه، استات‌سدیم‌سه‌آبه، پتاسیم‌کلراید، اسیدکلریدریک غلیظ، صمغ‌عربی،مالتودکسترین‌بادرجه‌هیدرولیز۷و ۲۰، آلژینات سدیم، اینولین، کیتوزان و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت‌های مرک، سیگما- آلدریچ، شارلو و کالدون خریداری شدند.

۲-۲- فرآیند استخراج عصارهٔ گیاه *پونه‌سای بینالودی*

استخراج عصاره با استفاده از حلال اتانول و با کمک فرآیند میدان پالس الکتریک انجام شد (۶). بدین منظور، ابتداگیاه پونه‌سای بینالودی به نسبت ۱ به ۱۰ وزنی حجمی با اتانول مخلوط و در ولتاژ۶۰کیلوولت بر سانتی‌متر و با تعداد پالس۶۰ پالس دهی گردید.برای‌اعمال‌میدان‌پالس‌الکتریک‌از دستگاه میدان الکتریکی پالسی‌قوی‌ساخت آزمایشگاه فن‌آوری‌های نوین پژوهشکده علوم وصنایع‌غذایی(خراسان‌رضوی،ایران)، در فرکانس ۱ هرتز استفاده گردید. سپس عملیات استخراج عصاره با هم زدن شدید به مدت ۴۸ساعت در محیط تاریک ادامه یافت. محلول تحت خلاء صاف گردید و با تبخیر کنندهٔ دوار تحت خلاء (مدل Laborota 4000 efficient، ساخت‌کشورآلمان) تحت دمای ۴۵ درجهٔ سلسیوس‌تا حد آبگیری کامل تغلیظ گردید. سپس نمونه به خشک‌کن انجمادی (مدل Operon FDB- 550، ساخت کشورکره) منتقل شد. نمونه‌ها در خشک‌کن انجمادی در دمای ۵۵- درجهٔ سلسیوس با فشار ۰/۱۵ میلی‌متر جیوه طی۲۰ ساعت خشک شدند. نمونه‌های خشک شده تا زمان انجام آزمایشات بعدی، در تاریکی و دمای ۱۸- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. میزان ترکیبات فنلی، قدرت‌گیرندگی رادیکال آزاد و میزان احیاءکنندگی‌آهن‌سه ظرفیتی عصاره حاصل به ترتیب۴۲۵/۹۳ میلی‌گرم‌برگرم وزن‌خشک، ۷۵/۰۶ درصد و۱۶۹۷/۰۶ میکرومول آهن برگرم بود.

1- 2, 4, 6-tris (2-pyridyl)-*s*-triazine
2 -2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

۲-۳- ریزپوشانی عصاره

ریزکپسول‌های حاوی ترکیبات دیواره آلژینات‌سدیم، اینولین و کیتوزات با روش کیم و همکاران (۲۰۰۸) با کمی تغییرات تهیه شدند (۲۱). بدین منظور، ابتدا ترکیب‌های دیواره‌های شامل ۲ گرم‌آلژینات‌سدیم(I)، ۱ گرم آلژینات‌سدیم و ۱ گرم اینولین (II) و ۱گرم آلژینات‌سدیم و۱ گرم کیتوزان (III) در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه حل و به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای اتاق با همزن‌مغناطیسی(مدلRCT Basic, IKA، ساخت کشور آلمان) با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه همزده شدند. سپس، عصارهٔ استخراج شده به کمک فرآیند پالس الکتریک (۴۰۰ میلی‌گرم) با نسبت ۱ به ۵ هسته به مواد دیواره به محلول دیواره‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه با همزن مغناطیسی با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه همزده شد. محلول حاوی دیواره و هسته در محلول کلریدکلسیم خنک با غلظت ۰/۵ مول بر لیتر اسپری شد. میکروکپسول‌های تشکیل شده،برای‌سخت شدن ۴-۳ ساعت در محلول کلریدکلسیم خنک باقی‌ماندند. ریزکپسول‌ها با صاف کردن محلول کلریدکلسیم با کاغذ صافی واتمن شماره یک و تحت خلاء جداسازی شدند. ریزکپسول‌هادرخشک‌کن‌انجمادی در دمای ۵۵- درجهٔ سلسیوس با فشار ۰/۱۵ میلی‌متر جیوه طی۲۰ دقیقه خشک شدند. نمونه‌های خشک شده تا زمان انجام آزمایشات بعدی، در تاریکی و دمای ۱۸- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. برای تهیه ریزکپسول‌های حاوی مخلوط دیواره‌های مالتودکسترین با درجه هیدرولیز۷ و ۲۰ و صمغ عربی از روش عظیمی و همکاران (۲۰۲۱) استفاده شد (۵). بدین منظور ابتدا ترکیب دیواره‌های مالتودکسترین با درجه هیدرولیز۷(۲۶/۹۵ درصد)، صمغ عربی(۲۹/۳۶ درصد) و مالتود کسترین با درجه هیدرولیز ۲۰ (۴۳/۶۸ درصد)، (ترکیب شماره IV) درآب مقطرباغلظت۱۰ به ۱۰۰ (وزنی/وزنی) تهیه شد. سپس محلول‌ها با همزن مغناطیسی (مدلRCT Basic, IKA، ساخت کشور آلمان) با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه همزده شدند و به مدت ۲۴ساعت‌دریخچال‌برای‌کامل‌شدن فرآیند هیدراتاسیون نگهداری شدند. عصاره استخراج شده با نسبت ۱ به ۵ (هسته به مواد دیواره) به ترکیب دیواره اضافه و به منظور یکنواخت‌شدن به مدت ۳۰ دقیقه با همزن مغناطیسی همزده شد. محلول حاوی مواد دیواره و هسته (حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر) در خشک‌کن انجمادی در دمای ۵۵- درجهٔ سلسیوس با فشار ۰/۱۵ میلی‌متر جیوه طی۲۰ ساعت خشک شد. نمونهٔ خشک شده تا زمان انجام آزمایشات بعدی، در تاریکی و دمای ۱۸- درجهٔ سلسیوس نگهداری شد (۵).

۲-٤- اندازه گیری‌خصوصیات شیمیایی ریزکپسول‌ها

۲-٤-۱- تعیین میزان رطوبت و تعیین دانسیته‌ی توده

مقدار رطوبت نمونه‌ها با استفاده از دستگاه سنجش رطوبت به روش مادون‌قرمز(Moisture Analyzer & MX-50, Japan) در دمای ۱ ± ۱۰۵ درجهٔ سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت به‌دست آمد. برای اندازه‌گیری دانسیته توده حدود ۱۰ گرم نمونه به داخل استوانه مدرج منتقل شد و حجم مربوطه از استوانه مدرج قرائت شد. دانسیته توده‌ای به عنوان نسبت بین جرم موجود در استوانه مدرج و حجم اشغال شده محاسبه شد (۳۷).

۲-٤-۲- تعیین ترکیبات فنلی

محتوای فنل‌کل عصاره استخراج‌شده، ریزکپسول‌ها با معرف فولین‌سیوکالچو اندازه‌گیری شد. محتوای فنل کل به عنوان معادل اسید گالیک در میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن تازه گیاه بیان شد. به ۱۰۰میکرولیتر عصاره‌نمونه (با متانول۱۰:۱حجمی/ حجمی رقیق شده) ۶ میلی لیترآب دو بار تقطیر و ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو اضافه‌گردید، بعد از نگهداری به مدت ۸ دقیقه و ۸ثانیه‌دردمای اتاق،۵ ۱/۵ میلی لیترکربنات‌سدیم (۲۰درصد وزنی /حجمی) اضافه شد. عصاره مخلوط‌و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴۰ درجه‌سلسیوس‌باقی‌ماند و سپس جذب آن در ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. میزان ترکیبات فنولی کل موجود در نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین شد. منحنی استاندارد با ترسیم داده‌های جذب اسیدگالیک در طول موج۷۶۵ نانومتردر غلظت‌های ۱۰۰ تا ۹۵۰ پی‌پی‌ام بدست آمد. نتایج بر اساس میلی‌گرم اسیدگالیک برگرم نمونه خشک با استفاده از معادله برازش داده شده بر منحنی استاندارد گزارش شد (۳۲).

۲-٤-۳- تعیین قدرت احیاءکنندگی آهن III (FRAP[1])

ابتدا محلولی‌شامل ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه در ۲میلی‌لیتر متانول تهیه شد و۳۰ میکرولیترآن با ۹۰۰ میکرولیتر محلول FRAP و۹۰ میکرولیترآب مقطر در لوله آزمایش مخلوط شد. لوله آزمایش بعد از ورتکس در بن‌ماری قرار گرفت و پس از رسیدن دمای آن به ۳۷درجهٔ سلسیوس، مقدار جذب در مقابل شاهد و در طول

[1] Ferric reducing activity of plasma

موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. مقدارآهن II با استفاده از معادله استاندارد سولفات آهن II با غلظت‌های ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرومول در لیتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر) به دست آمد (۸).

۲-٤-٤-تعیین‌قدرت‌مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

ابتدا محلول ۰/۰۰۶درصد رادیکال آزاد DPPH در متانول تهیه شد. سپس به لوله‌های‌آزمایش‌دارای یک میلی‌لیتر محلول متانولی نمونه با غلظت‌های‌مختلف (بسته به قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد)، یک میلی‌لیتر از محلول فوق اضافه شد. لوله‌های آزمایش بعد از همزدن به مدت یک ساعت در جای تاریک نگهداری شدند و سپس جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۲ نانومتر در برابر شاهد قرائت گردید (۳۰). درصد مهارکنندگی‌رادیکال آزاد طبق رابطهٔ ۱ محاسبه شد.

رابطه(۱)

$$A\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

که درآن: A% درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، A_C جذب شاهد و A_S جذب نمونه است. پس از ترسیم نمودار درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد در برابر غلظت نمونه، منحنی مناسب روی داده‌ها برازش داده شد و سپس غلظتی را که در آن، نمونه قادر به مهار کردن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد است تحت عنوان IC_{50} محاسبه گردید.

۲-٤-۵- تعیین راندمان ریزپوشانی ترکیبات فنلی

تمامی ریزکپسول‌های تولید شده به صورت جداگانه وزن شدند و راندمان ریزپوشانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۶).

رابطه(۲)

$$\text{راندمان تولیدریزکپسول} = \frac{\text{جرم کل کپسول های به دست آمده بعد از ریزپوشانی}}{\text{جرم کل مواد جامد قبل از ریزپوشانی}} \times 100$$

۲-۵- تهیه دوغ

ابتدا دوغ مطابق آیین‌کار تهیه و تولید دوغ گرمادیده بدون گاز به شماره استاندارد ۱۰۵۲۸تهیه شد. در مرحله نهایی تهیه دوغ سورباتپتاسیم به عنوان نگهدارنده شیمیایی ضدمیکروبی در سطح ۰/۱ درصد و همچنین عصاره استخراجی *پونه‌سای بینالودی* به برازش داده شده بر منحنی استاندارد (مقدار جذب محلول‌های شکل‌آزاد دردوسطح ۰/۲درصد(V) و۰/۶ درصد (VI) و عصاره ریزپوشانی‌شده با ۴نوع‌ترکیب دیواره (۲درصدآلژینات‌سدیم(I)، ۱ درصد آلژینات سدیم، ۱ درصد اینولین (II)، ۱ درصد آلژینات-سدیم، ۱ درصد کیتوزان (III) ، ۲۶/۹۷ درصد مالتودکسترین۷، ۲۹/۳۶درصدصمغ عربی و ۴۳/۶۹ درصد مالتودکسترین۲۰ (IV) دردوسطح ۱و ۳ درصد به عنوان جایگزین سوربات‌پتاسیم به دوغ در شرایط استریل اضافه شدند ودر بطری‌های پلی‌اتیلنی با دانسیته بالا بسته‌بندی ودر یخچال (دمای ۵ درجه سلسیوس) به مدت ۲۸ روز نگهداری شدند. بلافاصله پس از تولید، ۷، ۱۴، ۲۱و۲۸ روز پس از تولید آزمون‌های شمارش کلی کپک و مخمر، میزان ترکیبات فنلی‌کل و ارزیابی حسی (تست هدونیک ۵ امتیازی) بر روی نمونه‌ها انجام شد (۱).

۲-۵-۱-کشت و شمارش‌کپک ومخمردر محصول دوغ

آزمون‌میکروبی شامل شمارش‌کلی‌کپک و مخمر طبق استاندارد ۲-۱۰۸۹۹ و با استفاده از محیط کشت یست گلوکز کلرامفنیکل آگار[1] وآماده‌سازی نمونه‌ها مطابق با استاندارد ۴-۸۹۲۳ انجام شد (۲). پلیت‌های کشت داده شده در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ روزگرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت تعدادکلنی‌های تشکیل شده مورد بررسی و شمارش قرارگرفت.

۲-۵-۲-آزمون حسی دوغ

مقایسه تیمارهای مختلف بر ویژگی‌های حسی مورد نظر(رنگ، عطر و طعم و پذیرش کلی) توسط ده نفر ارزیاب آموزش دیده به روش تدرو و همکاران (۳۶) انجام شد. به این منظور، از روش ارزیابی هدونیک ۵ نقطه‌ای (۱= غیر قابل قبول (خیلی بد)، ۵ = خیلی‌خوب) برای‌بررسی این ویژگی‌ها استفاده شد. ارزیابی حسی تمام نمونه های دوغ یک روز پس از پخت و در دمای اتاق انجام شد.

۲-٦- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات‌در قالب طرح‌کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شدند. میانگین‌های حاصل از انجام آزمون‌ها با نرم‌افزار MStatC و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد ($p<0/05$) مقایسه شدند.

1- Yeast Glucose Chloramphenicol Agar

۳- نتایج و بحث

۳-۱- خصوصیات فیزیکی ریزکپسول‌ها

خصوصیات فیزیکی ریزکپسول‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. راندمان ریزپوشانی در محدوده۹۰/۹۴ تا ۸۹/۲۹ بود. نتایج نشان داد راندمان ریزپوشانی ریزکپسول‌های تهیه شده با ۱ درصد آلژینات‌سدیم و ۱ درصد اینولین (II) و ۱ درصد سدیم آلژینات با ۱ درصد کیتوزان (III) بیشتر از ریزکپسول‌های تشکیل شده با ۲درصدآلژینات‌سدیم(I)می‌باشد.آزوپیرولا –اولازولا و همکاران (۳) و بالانس و همکاران (۷) مشاهده کردند افزودن کیتوزان و اینولین به‌آلژینات‌سدیم راندمان ریزپوشانی‌را بهبود می‌بخشد. گزارش‌شده است‌که غشایی که از طریق واکنش‌های یونی ما بین آلژینات و کیتوزان و یا اینولین تشکیل می‌شود، از دست دادن ترکیبات فعال را طی ریزپوشانی و تخریب آنها را طی نگهداری کاهش می‌دهد(۳۵).مقداردرصدرطوبت‌ودانسیته‌توده‌ریزکپسولها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند (p‹۰/۰۵) و به ترتیب در محدوده۱۱/۸۵-۳۹/۹۹درصد و ۲۱۵- ۲۳۵ کیلوگرم بر متر مکعب بود. بیشترین دانسیته توده مربوط به ریزکپسول‌های تهیه شده با دیواره‌های ا درصد آلژینات‌سدیم و ا درصد اینولین بودکه دارای بیشترین درصد رطوبت نیز بودند. اندازه ذرات، خصوصیات شکنندگی و جریان‌پذیری‌بردانسیته‌توده‌ریزکپسول‌هااثرمی‌گذارد. دانسیته‌توده‌ریزکپسول‌ها مربوط به وزن مواد دیواره است و اشغال فضای‌کمتر و افزایش‌رطوبت توده مقدار دانسیته توده را افزایش می‌دهد (۲۳، ۲۵). این نتایج با نتایج جیمز و همکاران (۲۰۱۶) بر روی عصاره ریزپوشانی‌شده‌چای‌سبزدرنوشیدنی انبه‌مطابقت دارد (۲۰).

جدول۱- خصوصیات فیزیکی ریزکپسوله شده

ترکیب دیواره	راندمان ریزپوشانی(درصد)	دانسیته(کیلوگرم برمترمکعب)	رطوبت (درصد)
(I)	۸۹/۲۹ ± ۰/۵۷b	۲۳۰ ± ۲ab	۲۹/۲۵ ± ۰/۰۵b
(II)	۹۰/۹٤ ± ۰/٦۱a	۲۳۵± ۵a	۳۹/۹۹ ± ۰/۰۱a
(III)	۹۰/۳۸ ± ۰/۵۷a	۲۲۵ ± ۲b	۲۵/٤۹ ± ۰/۰۱c
(IV)	۹۰/۹ ± ۰/۲۱a	۲۱۵ ± ۵c	۱۱/۸۵ ± ۰/۰۵d

* ارقام دارای حروف مشترک در هر ستون (میانگین± انحراف معیار) از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن۰/۰۵ >P).

۳-۲- خصوصیات شیمیایی ریزکپسول‌ها

جدول۲ ویژگی‌های شیمیایی ریزکپسول‌های تولید شده را نشان می‌دهد.مقدارترکیبات‌فنلی‌درمحدوده ۱۹۳/۶۵-۲۱۷/۱ (میلی‌گرم برگرم) و قدرت گیرندگی رادیکال آزاد (DPPH) وق درت احیاءکنندگی‌آهن‌سه‌ظرفیتی(FRAP) به‌ترتیب در محدوده ۵۶/۶ - ۵۳/۴ (درصد) و۸۶۷/۸۴- ۷۵۴/۳۲ (میکرومول‌آهن دو ظرفیتی بر لیتر) بود. با توجه به نوع مواد دیواره، ترکیب مواد دیوارۀ(IV) و(I) به ترتیب بیشترین و کمترین میزان ترکیبات فنلی، قدرت گیرندگی رادیکال آزاد و قدرت احیاءکنندگی آهن سه ظرفیتی را داشتند. این نتایج بیانگر این موضوع است که یک نوع مادۀ دیواره در ریزپوشانی نمی‌تواند همه خصوصیات نیازمند را فراهم نماید و مخلوط دیواره‌ها (مخلوط دیواره‌های کربوهیدراتی با پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و صمغ‌ها) باعث حفظ ترکیبات زیست فعال‌می‌شود.جیمزوهمکاران(۲۰۱۶)برروی‌عصاره ریزپوشانی‌شده عصاره‌گیاه‌چای سبز در نوشیدنی انبه‌گزارش کردند که تیمارهای حاوی ترکیب پوشش کیتوزان و مالتودکسترین و صمغ عربی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنلی بیشتری از سایر تیمارها داشتند (۲۰). همچنین دلیل افزایش میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی‌ترکیب‌دیواره (II) و (III) در مقابل ترکیب دیوارۀ (I) احتمالاً به دلیل اثر آنتی‌اکسیدانی‌کیتوزان و اینولین به همراه عصاره‌پونه‌سای‌بینالودی می‌باشد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان و اینولین توسط برخی محققین گزارش شده است (۱۴، ۲۲).

جدول۲- خصوصیات شیمیایی پودرهای ریزکپسوله شده

ترکیب دیواره	ترکیبات فنلی‌کل (میلی‌گرم بر گرم)	قدرت احیاء کنندگی‌آهن سه‌ظرفیتی (میکرومول‌آهن II بر لیتر)	قدرت گیرندگی رادیکال آزاد (درصد)
(I)	۱۷۳/۹۱ ± ۰/٦۷d	۷۵٤/۳۲ ± ۹/۵۱ d	۵۳/٤ ± ۰/۰۲ d
(II)	۲۰۵/۷٦ ± ۲/۲b	۸۱٦/۸ ۰± ۱/۳۷ b	۵۵/۵ ± ۰/۰٦ b
(III)	۱۹۳/٦۵ ± ۱/٤c	۷۹۵/٤۹ ± ۹/۵۱c	۵٤/۳ ± ۰/۰۷ c
(IV)	۲۱۷/۱ ± ۲/۵۹a	۸٦۷/۸٤ ± ۳/٦۳a	۵٦/٦ ± ۰/۲٤a

* ارقام دارای حروف مشترک در هر ستون (میانگین± انحراف معیار) از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن۰/۰۵ >P).

۳-۳- بررسی‌خواص‌حسی، ضدمیکروبی وفنلی عصاره آزاد و ریزپوشانی شده در محصول دوغ در مقایسه با ضدکپک سنتزی سوربات‌پتاسیم

نتایج ارزیابی حسی دوغ (عطر و طعم، بو و پذیرش کلی) تحت تاثیر افزودن عصارهٔ ریزپوشانی شده با ۴ نوع ترکیب دیواره (۲ درصد آلژینات‌سدیم(I)، ۱ درصد آلژینات‌سدیم، ۱ درصد اینولین (II)، ۱درصدآلژینات‌سدیم، ۱درصدکیتوزان(III) ،۲۶/۹۷ درصد مالتودکسترین۷ ،۲۹/۳۶ درصد صمغ عربی و ۴۳/۶۹ درصد مالتودکسترین۲۰ (IV)) در دو سطح ۱و ۳ درصد و عصارهٔ آزاد خشک‌شدهٔ انجمادی(۰/۲درصد (V)و ۰/۶ درصد (VI)) و نمونه شاهد (فاقد هر نوع مادهٔ افزودنی) در جدول۳ نشان داده شده است. نتایج‌آزمون حسی نشان داد نمونهٔ دوغ حاوی عصاره ریزپوشانی شده با ترکیبات دیواره(I)، (II)، (III) و(IV) با غلظت ۱ درصد با کسب امتیاز خوب، بیشترین امتیاز را برای خصوصیات‌عطروطعم، بووظاهرکلی داشتند و از نظر خصوصیات حسی تفاوت‌آماری معنی‌داری با نمونه دوغ حاوی‌سوربات‌پتاسیم (شاهدمثبت) و نمونه فاقد هر نوع ماده افزودنی (شاهد منفی) نداشتند($P>۰/۰۵$). هم‌چنین از جدول مشاهده می‌شود که نمونه دوغ‌های‌حاوی درصدبالاتر عصاره ریزپوشانی‌شده وعصاره آزاد، ویژگی‌های حسی‌کمتری نسبت به نمونه دوغ شاهد (بدون هیچ مادهٔ افزودنی) و نمونه حاوی سوربات‌پتاسیم داشتند. این موضوع نشان‌دهنده آن است که بیشتر مصرف‌کنندگان خصوصیات حسی دوغی را ترجیح می‌دهند که دارای مقدار کمتری عصاره باشد. گوپتا و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده کردند که خواص حسی ریزکپسول‌های حاوی دیواره آلژینات در شیر از لحاظ حسی تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۱۹).میزان رشد کپک مخمر و ترکیبات فنلی دوغ تحت تاثیر افزودن عصارهٔ ریزپوشانی شده و عصارهٔ خشک شدهٔ انجمادی (آزاد) طی۲۸روز نگهداری در دمای یخچال (دمای ۴ درجهٔ سلسیوس) در مقایسه با افزودن نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم و نمونه شاهد (فاقد هر نوع مادهٔ افزودنی) به ترتیب در جدول‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است.

جدول۳- میانگین امتیاز داورن به شاخص عطر و طعم ، بو و ظاهر کلی دوغ یک روز پس از تولید تحت تاثیر افزودن عصارهٔ ریزپوشانی شده (با غلظت ۱و ۳ درصد) و عصارهٔ خشک شدهٔ انجمادی (با غلظت ۰/۲ و۰/۶ درصد) در مقایسه با افزودن نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (۰/۱ درصد) و نمونه شاهد (فاقد هر نوع مادهٔ افزودنی)

تیمار	عطر و طعم	بو	ظاهرکلی
شاهد	٤ ± ۰/۸۲a	۱/۹ ± ۰/۸۲ab	٤ ± ۰/۸۲ a
سوربات پتاسیم ۰/۱ درصد	۳/٤ ± ۰/۵۲b	۱/٦ ± ۰/۵۱a	٤/٤ ± ۰/۵۲a
(I) در سطح ۱ درصد	٤/۱ ± ۰/۳۲a	۱/۸ ± ۰/٤۲a	٤/۲ ± ۰/٤۲a
(I)در سطح ۳ درصد	۲/۸ ± ۰/٤۲cd	۳/۲ ± ۰/٤۲c	۲/٦ ± ۰/۵۲c
(II)در سطح ۱ درصد	٤/۱ ± ۰/۳۲a	۱/۸ ± ۰/٤۲a	٤/٤ ± ۰/۵۲a
(II)در سطح ۳ درصد	۲/۸ ± ۰/٤۲cd	۳/۲ ± ۰/٤۲c	۲/۸ ± ۰/٤۲c
(III)در سطح ۱ درصد	٤/۲ ± ۰/٤۲a	۱/۸ ± ۰/٤۲a	٤/۲ ± ۰/٤۲a
(III)در سطح ۳ درصد	۲/٦ ± ۰/۵۲d	۳/۲ ± ۰/٤۲c	۲/٦ ± ۰/۵۲c
(IV) در سطح ۱ درصد	۳/۹ ± ۰/٤۲a	۱/۸ ± ۰/٤۲a	٤/٤ ± ۰/۵۲a
(IV) در سطح ۳ درصد	۲/۸ ± ۰/٤۲d	۳/۲ ± ۰/٤۲c	۲/۸ ± ۰/٤۲c
(V)	٤/۲ ± ۰/٤۲bc	۲/٤ ± ۰/۵۱b	۳/٤ ۰/۵۲± b
(VI)	۲/٦ ± ۰/۵۲d	۳/٤ ± ۰/۵۲c	۲/۸ ± ۰/٤۲c

*ارقام دارای حروف مشترک در هر ستون (حروف کوچک) (میانگین± انحراف معیار) از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن۰/۰۵ >P).

جدول٤- نتایج ارزیابی میکروبی دوغ (تعداد کل کپک و مخمر) در دوغ طی۲۸روز نگهداری در دمای یخچال (دمای ٤ درجهٔ سلسیوس) تحت تاثیر افزودن عصارهٔ ریزپوشانی شده (با غلظت ۱و ۳ درصد) و عصارهٔ خشک شدهٔ انجمادی (با غلظت ۰/۲ و۰/٦ درصد) در مقایسه با افزودن نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (۰/۱ درصد) و نمونه شاهد (فاقد هر نوع مادهٔ افزودنی)

تیمار	روز ۱	روز ۷	روز ١٤	روز۲۱	روز۲۸
شاهد	–	–	۰/۳۳ ± ۰/۵۸a	۱/۵۲ ± ۰/۰۷ab	۲/۹ ± ۰/۱۷a
سوربات پتاسیم ۰/۱ درصد	–	–	–	–	–
(I) در سطح ۱ درصد	–	–	۰/۳۳ ±۰/۵۸a	۰/۳۳ ± ۰/۵۸c	۰/٤۹ ± ۰/۸۵c
(I)در سطح ۳ درصد	–	–	۰/۳۳ ± ۰/۵۸a	۰/۳۳ ± ۰/۵۸c	۰/٤۳ ± ۰/۷۵c
(II)در سطح ۱ درصد	–	–	–	–	–
(II)در سطح ۳ درصد	–	–	–	–	–
(III)در سطح ۱ درصد	–	–	–	–	۰/٤٦ ± ۰/٤۵c
(III)در سطح ۳ درصد	–	–	–	۰/۳۳ ± ۰/۵۸c	۰/۳۳ ± ۰/۵۸c
(IV) در سطح ۱ درصد	–	–	۰/۳۳ ±۰/۵۸a	۰/٦۷ ± ۰/۵۸bc	۱/۲ ± ۰/۱۷bc
(IV) در سطح ۳ درصد	–	–			۱/۱ ± ۰/۱۷bc
(V)	–	–	۰/۳۳ ±۰/۵۸a	۲/۲٦ ± ۰/۲٤a	۲/۹ ±/۱۷a
(VI)	–	–	۰/۳۳ ± ۰/۵۸a	۳/۳۳ ± ۵/۷۷c	۲/۹ ± ۰/۱۵b

*ارقام دارای حروف مشترک در هر ستون (حروف کوچک) (میانگین± انحراف معیار) از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن۰/۰۵ >P).

همان‌طورکه‌ازجدول۴مشاهده می‌شود، با افزایش زمان نگهداری، میزان رشدکپک و مخمر افزایش یافت؛ اما، هر دو نوع افزودنی طبیعی‌وسنتزی سبب‌کاهش‌میزان رشدکپک ومخمر درنمونه‌های تولیدی نسبت به نمونهٔ شاهد (فاقدهرنوع مادهٔ افزودنی- شاهد منفی) شدند. کمترین میزان رشدکپک و مخمر بعد از ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال در نمونهٔ حاوی سوربات پتاسیم ۰/۱ درصد و نمونه‌های حاوی ریزکپسولها با ترکیب دیواره (II) در سطح ۱ و۳ درصد و ترکیب دیواره (I) و (III) در سطح ۳ درصد مشاهده شد. سوربات‌پتاسیم از جمله موادی است که در طبقه مواد نگهدارنده قرار داشته و سبب جلوگیری از فساد میکروبی در مواد غذایی و افزایش عمر انبارداری می‌شود. اثر بازدارندگی از رشد کپک و مخمر توسط سوربات پتاسیم، احتمالاً به دلیل مهار آنزیم‌های دهیدروژناز، سولفیدریل اکسیداز و کاتالاز در سلول میکروبی می‌باشد (۹). محافظت از رشد کپک و مخمر توسط عصارهٔ ریزپوشانی شده و آزاد عصاره پونه سای بینالودی، احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فنلی می‌باشد. مشخص شده‌است ترکیبات فنلی با دارابودن خواص ضدمیکروبی به لیپیدهای غشاء سلولی و میتوکندری وارد می‌شوند و ضمن تغییر شکل سلولی و ایجاد نفوذپذیری بیشتر آن‌ها، باعث خروج یون و دیگر محتویات سلولی می‌گردند. اگرچه خروج مقادیر مشخصی از مواد داخل باکتری، می تواند برای سلول قابل تحمل باشد، ولی خروج مقادیرزیاد محتویات سلولی با خروج مولکول‌ها و یون‌های حیاتی سبب‌مرگ سلول می شود (۲۸). همچنین مهار بهتر عصارهٔ ریزپوشانی‌شده نسبت به عصارهٔ آزاد، احتمالا به دلیل حفاظت ترکیبات فنلی طی فرآیند حرارتی تهیه دوغ و خروج تدریجی آن‌ها طی مدت زمان نگهداری می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از آزمون حسی و میکروبی، می‌توان عصارهٔ آزاد و ریزپوشانی شده عصاره پونه‌سای بینالودی را به عنوان جایگزینی برای نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم معرفی نمود.

جدول۵- نتایج ارزیابی ترکیبات فنلی دوغ طی۲۸روز نگهداری در دمای یخچال (دمای ٤ درجهٔ سلسیوس) تحت تاثیر افزودن عصارهٔ ریزپوشانی شده (با غلظت ۱و ۳ درصد) و عصارهٔ خشک شدهٔ انجمادی (با غلظت ۰/۲ و۰/٦ درصد) در مقایسه با افزودن نگهدارنده سنتزی سوربات پتاسیم (۰/۱ درصد) و نمونه شاهد (فاقد هر نوع مادهٔ افزودنی)

تیمار	روز۱	روز۷	روز۱٤	روز۲۱	روز۲۸
شاهد	۳۷/۵۸ ± ۰/۹۱f A	۳٦/۵۲ ± ۱fA	۳٦/۰۸ ± ۰/۳۷Ac	۳۳/۱ ± ۰/٦۳ Be	۲۹/۰۲ ± ۱/۲٤ Cf
سوربات پتاسیم ۰/۱ درصد	٤۰/٦۷ ± ۱/۱۱affA	۳۹/٦ ± ۱/۱۷veA	۳۷/۳۹ ± ۰/۳۸bc B	۳۵/۲۲ ± ۰/۷٤cdeC	۳٤/۵۸ ± ۰/۳۷cdeC
(I) در سطح ۱ درصد	۳۹/۲۹ ± ۱efA	۳۷/۳۹ ± ۱f B	۳٦/۷۳ ± ۰/۳۸bc BC	۳۵/٤۳ ± ۰/۳۷adeC	۳۳/۳۲ ± ۰/۹٦e D
(I)در سطح ۳ درصد	٤۱/۷۳ ± ۱/۸۱cdeA	۳۹/۸۳ ± ۱/۹۳e AB	٦۳/۷۳ ± ۲/۳۲bcBC	۳٦/۹٦ ± ۱/۹٦bcdBC	۳۵/۰۱ ± ۱/۱۱cde C
(II)در سطح ۱ درصد	٤٤/٤٤ ± ۱/۰٦bcA	٤۳/۲٤ ± ۱/۰٦bcAB	۳٦/۵۲ ± ۱/۵۱ab BC	۳٦/۱ ± ۲/٤۷ab C	۳۵/۸۸ ± ۱/۱۱c D
(II)در سطح ۳ درصد	٤۸/٦۹ ± ۱/٤۹aAA	٤۷/٤۹ ± ۱/٤۹a A	٤۰/۷۲ ± ۰/۷۸a B	٤۰/۰۷ ± ۲/۵۷vaBC	۳۹/۱٦ ±۱/٦۸a C
(III)در سطح ۱ درصد	٤٤/۰٤ ± ۰/۲۸cdeA	٤۲/۷۸ ± ۰/٤bcdeB	٤۰/۷۳ ± ۱/٤۲c B	٤۰/۰٦ ± ۱/۹٦cde B	۳٦/۳ ± ۱/۱۲cd B
(III)در سطح ۳ درصد	٤/٤ ± ۰/۰۳ bcdA	٤/۲۸ ± ۰/۰٤bcdAB	٤۱/۸٦ ± ۰/٤abBC	٤۰/۵ ± ۰/۳۹ab C	۳۹/۸۲ ± ۰/۳۷ab C
(IV) در سطح ۱ درصد	٤۲/۲٤ ± ۰/۳۸cdeA	٤۰/۷٤ ± ۲/۳۸cdeA	۳۸/۷۵ ± ۳/۸۱abcAB	۳۸/۵ ± ۲/۱۵abcAB	۳۵/٤٤ ± ۰/۹۸Bcde
(IV) در سطح ۳ درصد	٤۵/۵٤ ± ۱/٦۲abA	٤۳/۹٤ ± ۱/٦۲b AB	٤۰/۵٤ ± ۳/۸۲abBC	٤۰/۲۹ ± ۲/۷abBC	۳۸/۰۵ ± ۱/۳۸b C
(V)	٤۱/۱٦ ± ۲/۰٤cdfA	٤۰/۰٦ ± ۲/۰۷deAB	۳۷/۸۲ ± ۰/۳۸bc B	۳٤/۵۸ ± ۰/۳۷de C	۳۳/۹٤ ± ۰/۳۷de C
(VI)	٤۳/۱٦ ± ۰/٦۳bcdA	٤۱/٦۳ ± ۰/٦۸bcdeB	٤۰/۰۵ ± ۰/۳۹abcC	۳۷/۸۲ ± ۰/۳۸abcdD	۳۵/٤۳ ± ۰/۳۷cde E

*ارقام دارای حروف مشترک در هر ردیف (حروف بزرگ) و ستون (حروف کوچک) (میانگین± انحراف معیار) از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن۰/۰۵ >P).

مقدار ترکیبات فنلی دوغ طی۴ هفته نگهداری در جدول ۵ نشان داده شده‌است. همانطور که از جدول ۵ مشاهده می‌شود مقدار ترکیبات‌فنلی‌نمونه‌شاهد(فاقد هر نوع مادهٔ افزودنی- شاهد منفی)، نمونه‌حاوی‌سوربات پتاسیم (شاهد مثبت) و نمونه‌های ریزپوشانی شده در طول نگهداری‌کاهش یافت. معمولاً، رهاسازی مواد فعال ریزپوشانی‌شده در سیستم‌های غذایی به نوع، ابعاد ذرات، مواد حامل مورد استفاده برای تشکیل میکروکپسول‌ها و درجه حرارت نگهداری بستگی دارد. زمانی که ماتریکس دیواره در محیط مایع قرار می‌گیرد، با جذب آب متورم می‌شود و سپس مواد فعال موجود در قسمت متورم ماتریکس منتشر می‌شوند (۳۳). سرعت رهایش ترکیبات موثر با افزایش دمای نگهداری افزایش می‌یابد (۴). همان‌طور که از جدول ۵ آشکار است، تفاوت معنی‌داری بین‌ترکیبات‌فنلی نمونه های مختلف دوغ وجود داشت (p‹۰/۰۵). نمونه‌های دوغ حاوی ریزکپسول‌های با ترکیب دیوارهٔ (I) ، (II) و(III) باغلظت ۳ درصد بعد از ۲۸ روز نگهداری مقدار ترکیبات فنلی بیشتری داشتند. حضور اینولین و کیتوزان سرعت آزادسازی ترکیبات فنلی را کاهش دادند. این موضوع احتمالاً مربوط به اثر سینرژیست بین کیتوزان و اینولین با ماتریکس دوغ، اجزا و دیگر فاکتورهای موجود در دوغ می باشد. هم‌چنین، ترکیبات فنلی تمایل بیشتری به چسبیدن با گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل ماتریکس‌آلژینات – اینولین، آلژینات و کیتوزان دارند (۳). نتایج مشابهی‌توسط‌جیمزو همکاران (۲۰۱۶) بر روی عصاره ریزپوشانی شده چای سبز با ترکیب دیواره کیتوزان، مالتودکسترین و صمغ عربی در نوشیدنی انبه گزارش شده‌است (۲۰). همچنین بالانس و همکاران (۲۰۱۶) بر روی‌عصاره‌ریزپوشانی‌شده گیاه Carqueja (*Pterospartum tridentatum*)گزارش کردندکه‌حضور اینولین‌قادراست‌که‌سرعت‌آزادسازی‌ترکیبات‌موثره را به خصوص در چند هفته اول نگهداری کاهش دهد (۷).

٤- نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد عصارهٔ آزاد و ریزپوشانی شده پونه‌سای بینالودی قادر به کنترل رشد کپک و مخمر با حفظ خصوصیات حسی و فنلی در محصول غذایی دوغ بود. کمترین میزان رشد کپک و مخمر بعد از ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال در نمونهٔ‌های حاوی ترکیب دیوارهٔ ادرصد آلژینات سدیم و ا درصد اینولین با غلظت ۱ و ۳ درصد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با نمونه حاوی۰/۱ درصد نگهدارنده شیمیایی‌سوربات پتاسیم (با غلظت ۰/۱ درصد) نداشتند. ریزکپسول‌های حاوی ترکیب دیواره۲ درصدآلژینات‌سدیم‌و۱درصد آلژینات سدیم با ۱ درصد کیتوزان با غلظت۳درصددر مقام‌های بعدی از لحاظ کنترل رشد میکروبی

قرار داشتند. مقایسه بین تیمارها نشان داد که ریزپوشانی می‌تواند ثبات و عمر مفید ماندگاری ترکیبات فنلی را به طور معنی‌داری در دوغ افزایش دهد، بطوری که نمونه دوغ‌های حاوی ترکیبات ریزپوشانی‌شده‌باغلظت۳ درصد پس از۲۸ روز نگهداری، بیشترین میزان ترکیبات فنلی را دارا بودند. اما از آن‌جایی‌که ارزیابان حسی، خصوصیات حسی دوغی را ترجیح دادند که دارای مقدار ۱ درصد عصاره ریزپوشانی بود؛ بنابراین، عصارهٔ ریزپوشانی شده پونه‌سای بینالودی با ترکیب دیوارهٔ ۱ درصد آلژینات سدیم و ۱ درصداینولین با غلظت۱، جایگزین‌مناسب‌تری به جای نگهدارنده شیمیایی سوربات پتاسیم می‌باشد.

۵-منابع

۱. بی نام. ۱۳۸٦. دوغ- آیین کار تهیه و تولید، استاندارد شماره ۱۰۵۲۸. اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۲. بی نام. ۱۳۸۷. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها، قسمت دوم: روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی (a_w) مساوی یا کم‌تر از ۰/۹۵. استاندارد ملی ایران، شماره ۲ -۱۰۸۹۹. اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

3. Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria, N., Usobiag, A. 2016. Microencapsulation and storage stability of polyphenols from Vitis vinifera grape wastes. *Food chemistry*, 190: 619-621.
4. Akhavan Mahdavia, S., Jafarib, S. M., Assadpoora, E. Ghorbani, M. 2016. Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation. *Journal of Food Engineering*, 181: 59 -66.
5. Azimi Mahalleh, A., Sharayei, P., Azarpazhooh, E. 2021. Investigating the Characteristics of the Nepeta binaludensis Encapsulated Extract and Its Release Kinetics in Laboratory Conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 14:164–176.
6. Azimi Mahalleh, A., Sharayei, P., Mortazavi, S. A., Azarpazhooh, E., Niazmand, R. 2019. Optimization of the pulsed electric field-assisted extraction of functional compounds from Nepeta binaludensis. *AgricEngInt: CIGR Journal*, 21(4): 184-194.
7. Balanˇc, B., Kaluˇsevi´c, A., Drvenica, I., Teresa Coelho, M., Djordjevi´c, V., Alves, V. D., Sousa, I., Moldˇao-Martins, M., Raki´c, V., Nedovi´c, V. and Bugarski, B. 2016. Calcium–Alginate–Inulin Microbeads as Carriers for Aqueous Carqueja Extract. *Journal of Food Science*, 81(1): E65-75.
8. Benzie, I. F. F., Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
9. Buazzi, M. M., Marth, E. H. 1991. Mechanism in the inhibition of Listeria monocytogenes by potassium sorbate. *Food Microbioly*, 8(3): 249-256.
10. Cao, Y., Cao, R. H. 1999. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature*, 398(67): 381.
11. Chan, E. S., Yim, Z. H., Phan, S. H., Mansa, R. F., Ravindra, P. 2010. Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. *Food Bioprod Process*, 88:195-201.
12. Coussement, P. A. A. 1999. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *Journal of Nutrition*, 129(7): 1412S-7S.
13. Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., Martino, M. N. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71:126—34.
14. Dudhani, A. R., Kosaraju, S. L. 2010. Bio adhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 81(2): 243-251.
15. Ezhilarasi, P. N., Indrani, D., Jena, B. S. and Anandharamakrishnan, C. 2013. Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality. *Journal of Food Engineering*, 117(4): 513-520.
16. Fang, Z., Bhandari, B. 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129(3):1139-1147.
17. Faridi, A., Jafari, S. M., Assadpoor, E., Mohammadi, A. 2015. Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate.

binaludensis Jamzad- an example of domestication of a highly endangered medicinal plant of Iran. *Zeitschrift für Arznei-und Gewurzpflanzen*, 17(2): 64-71.
28. Pauli, A. 2006. α- Bisabolol from chamomile-A specific ergostrol biosynthesis inhibitor. *Journal of Aromatherapy*, 16(1): 5-21.
29. Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C. 2010. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(7):1386-1394.
30. Shakeri, A., Khakdan, F., Soheili, V., Sahebkar, A., Rassam, G., Asilia, J. 2014. Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. kopetdaghensis. *Industrial Crops and Products*, 58: 315-321.
31. Siger, A., Nogala-kalucka, M., Lampart-Szczapa, E. 2008. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15(2): 137-149.
32. Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total polyphenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299: 152-178.
33. Soottitantawat, A., Furuta, T., Shiga, H., Yoshii, H., Aishima, S.,Ohagawara, M., Linko, P. 1661. Flavor Encapsulation by Spray Drying and Release Charateristics from the Powder. 1St Nordic Drying Conference. *Trondheim, Norway*. 13-19.
34. Stojanovi´c, R., Bel˘s˘cak-Cvitanovi´c, A., Manojlovi´c, V., Komes, D., Nedovi´c, V., Bugarski, B. 2012. Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3): 685-96.
35. Tan, L. H., Chan, L. W., Heng, P. W. S. 2009. Alginate/starch composites as wall material to achieve microencapsulation with high oil loading. *Journal of Microencapsulation*, 26(3): 263–271.
36. Teodoro, R. A. R., Fernandes, R. V., Botrel, D. A., Borges, S. V., de Souza, A. U. 2014. Characterization of microencapsulated rosemary essential oil and its antimicrobial effect on fresh dough, *Journal of Food Engineering*, 165:149-155.
18. George, M., Abraham, E. 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – A review. *Journal of Controlled Release*, 114(1):1-14.
19. Gupta, C., Chawla, P., Arora, S. 2015. Development and evaluation of iron microencapsules for milk fortification. *CyTA - Journal of Food*, 13(1):116-123.
20. James, Z. A., Sham Baharin, B., Abdulkarim S. M., Abas, F. 2016. Microencapsulation of Green tea Extracts and its effects on the physico-chemical and functional properties of mango drinks. *International Journal of Basic & Applied Sciences*,16 (2): 16-32.
21. Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. S., Cha, D. S. and Park, H. J. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. LWT – *Food Science and Technology*, 41(3): 493-500.
22. Kosaraju, S. L., D'ath, L., Lawrence, A. 2006. Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers*, 64(2): 163-167.
23. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1): 3-13.
24. Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor, E., Dehnad, D. 2016. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85: 379-385.
25. Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., Assadpoor, E. 2014. Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: a review. *Drying Technology*, 32(5): 509-518.
26. Mohammadpour, N., Emami, S. A., Asili, J. 2013. Identification of Volatile Oil Components of *Nepeta binaludensis* Jamzad by GC-MS and 13C-NMR Methods and Evaluation of its Antimicrobial Activity. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(1):102-107.
27. Nadjafi, F., Koocheki, A., Rezvani Moghaddam, P., Honermeier, B. 2012. First experiments on cultivation of *Nepeta*

Food and Bioprocess Technology, 7(9): 2560-2569.
37. Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M. D. 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43(3): 907-914.
38. Xu, Y., Zhan, C., Fan, L., Wang, L., Zheng, H. 2007. Preparation of dual crosslinked alginate–chitosan blend gel beads and in vitro controlled release in oral sitespecific drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 336(2): 329-337.
39. Zohar-Perez, C., Nussinovitch, C. A. 2004. Irregular textural features of dried alginate–filler beads. *Food Hydrocolloid*, 18(2): 249-258.

(Original Research Paper)

The Effect of Free and Microencapsulated Extract of Nepeta Binaludensis on Sensory and Microbial Properties of Doogh

Afsaneh Azimi Mahalleh[1], Parvin Sharayeei [2*], Elham Azarpazhooh [3],Azam Azimi Mahalleh[4]

1- Ph.D. Graduated of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.
2- Associate Professor, Department of Technical Researches and Agricultural Engineering, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extention Organization, Mashhad, Iran.
3-Assistant Professor, Department of Technical Researches and Agricultural Engineering, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extention Organization, Mashhad, Iran.
4- Ph.D. Graduated of Food Hygiene and Technology, Ankara University, Ankara, Turkey.

Received: 17/07/2021 Accepted:02/10/2021

Abstract

The current study was carried out with the purpose of investigating the antimicrobial properties of free and microencapsulated extract of *Nepeta Binaludensis*. For this purpose, the Nepeta extract was extracted by assisting pulse electric field process (6000 v and pulse number 60). Then the effect of free extract (0.2 and 0.6 %) and encapsulated extract with 4 different types of wall material (wall contain mixture of maltodextrin 7 (26.97%) with Arabic gum (29.36%) and maltodextrin 20 (43.69%), wall contain mixture of 1% sodium alginate and 1% chitosan, wall contain mixture of 1% sodium alginate and 1% Inulin and wall contain mixture of 2% sodium alginate) at two concentrates (1 and 3 %) in comparison with synthetic potassium sorbate preservative (0.1%) on sensory, total phenolic content and microbial properties of doogh during 28 days storage at refrigerator temperature was evaluated. Results demonstrated that free and microencapsulated extract was able to control the growth of mold and yeast with preservation of sensory and phenolic properties in the doogh. The lowest growth rate of mold and yeast after 28 days of refrigeration was respectively observed in the sample containing 1% sodium alginate, 1% inulin at 1 and 3% concentration and 2% sodium alginate at 3% concentration and there was no statistically significant difference with the the sample containing 0.1% potassium sorbate ($P>0.0.5$). The results of sensory analyze showed that doogh samples containing encapsulated extract with 4 types of wall compositions mentioned were not statistically significant in terms of sensory characteristics with doogh samples containing potassium sorbate ($P>0.0.5$). Also, doogh samples containing microcapsules with wall composition (1% Sodium alginate and 1% inulin) and (1% sodium alginate with 1% chitosan) and 2% sodium alginate with a concentration of 3% after 28 days of storage had more phenolic compounds.

Keywords: Phenolic Compounds, Sensory Characterizations, *Nepeta Binaludensis* Plant, Doogh.

* Corresponding Author: parvin_sharayei@yahoo.com