مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۴۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷ (ص ۱۲۸-۱۲۱) DOI: 10.22059/ijbse.2017.223439.664886

تولید نانوژل کیتوزان و گالیک اسید و اثر آن در پایداری اکسیداسیونی سس مایونز حاوی روغن آفتابگردان

سودا احمدزاده[1*]، صدیف آزادمرد دمیرچی[2]، هادی ولی زاده[3]، سید هادی پیغمبردوست[4]

۱. کارشناس ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳. استاد ،گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تبریز

۴. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۲۱/ ۱۰/ ۱۳۹۵- تاریخ بازنگری: ۱۸/ ۶/ ۱۳۹۶- تاریخ تصویب: ۹/ ۸/ ۱۳۹۶)

چکیده

در این پژوهش، گالیک اسید با کیتوزان به وسیله‌ی ماده اتصالی کربودی ایمید با روش تجمع خود به خود با هدف افزایش اثرآنتی‌اکسیدانی گالیک‌اسید، رهایش تدریجی و افزایش مدت اثرگذاری بصورت نانوژل تهیه شد. به این صورت که محلول ۰/۵ درصد کیتوزان با محلول ۱اتیل ۳دی متیل آمینو پروپیل کربودی ایمید و پودر گالیک اسید مخلوط می‌شود ۲۴ ساعت هم زده می‌شود سپس تحت عمل سانتریفیوژ قرار گرفته سپس تحت خلاء خشک شده و نهایتا در محلول ۱ درصد استیک اسید حل می‌شود. بعد از انجام آزمون اندازه‌گیری اندازه ذرات در سه غلظت صفر(نمونه کنترل)، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm به سس حاوی روغن آفتابگردان اضافه شده و نمونه‌ها به مدت ۶۰ روز در یخچال نگهداری شدند. آزمون‌های عدد اسیدی، عدد پراکسید، آزمون شال و اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید و آزمون طیف سنجی مادون قرمز(FTIR) انجام گرفت. با آنالیز طیف مادون قرمز پیوند بین کیتوزان وگالیک اسید ثابت شد. عدد اسیدی، عدد پراکسید و آزمون شال با گذشت زمان در هر سه تیمار افزایش یافت، اما میزان افزایش در نمونه کنترل بیشتر بود. مقدار کاروتنوئید با گذشت زمان کاهش یافت که این کاهش در نمونه کنترل بیشتر بود. در بین سه تیمار بهترین اثرآنتی‌اکسیدانی مربوط به نمونه ppm ۲۰۰ بود نتایج نشان داد که نانوژل کیتوزان گالیک‌اسید می‌تواند خاصیت آنتی اکسیدانی مناسبی از خود نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، اکسیداسیون، گالیک اسید، کیتوزان، نانوژل.

مقدمه

اکسیداسیون باعث تغییراتی در رنگ و بو و بافت و ویتامین‌ها و موجب تغییر در کیفیت و کاهش ارزش تغذیه‌ای می‌شود. رادیکال‌های آزاد که طی متابولیسم‌های سلولی بوجود می-آیند(Fransen *et al*., 2005) موجب بسیاری از بیماری‌ها مثل بیماری‌های وابسته به قلب و عروق، بیماری‌های عصبی، سرطان، دیابت می‌شوند (Aoki *et al*., 2001; ;Inoue *et al*., 1995 ;Tomaino *et al*., 2005).

یکی از راهکار های مهم مقابله با اکسیداسیون روغن‌ها استفاده از آنتی اکسیدان‌ها است. در مورد امنیت و تاییدیه و مقادیر مصرفی و کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی تردید وجود دارد (Shahidi., 2005;Akoh & Min., 2008). در سال‌های اخیر تمایل زیادی برای جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی وجود دارد. اسیدهای فنلی همانند مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید و مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسید آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی هیدروفیلی هستند. گالیک اسید که یکی از مشتقات هیدروکسی بنزوئیک اسید می‌باشد ترکیبات زیست فعال و ضد سرطان هستندکه در توت، مرکبات، غلات، نوشیدنی‌هایی همچون چای سبز وجود دارند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی این اسیدهای فنلی بر اساس خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و شکستن زنجیر و شلاته کردن فلزات بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات مربوط به گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار این اسیدهای فنلی است. توانایی آنتی‌اکسیدانی آنها بستگی به پارامترهایی همچون غلظت، ساختار سیستم مورد آزمایش و سوبسترایی که باید محافظت شود دارد. طبیعت هیدروفیل این ترکیبات اثرآنتی اکسیدانی این ترکیبات را در محیط لیپوفیل کاهش می‌دهد. اتصال این اسیدهای فنلی با ترکیباتی مثل کیتوزان و الیگوساکاریدها توانایی رهاسازی آهسته و قدرت آنتی اکسیدانی را افزایش می‌دهد (Eom *et al*., 2012). کیتوزان یک پلیمرزیست

* نویسنده مسئول: s.ahmadzadeh69@gmail.com

تخریب‌پذیراست که از داستیلاسیون بخشی ازکیتین بدست می‌آید و می‌تواند بعنوان ماتریکس برای انکپسولاسیون اسیدهای فنلی استفاده شود (Shahidi *et al*., 1999). دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بدلیل وجود گروه‌های قطبی همچون گروه آمین و هیدروکسیل است که می‌توانند بعنوان دهنده هیدروژن عمل کنند کیتوزان دارای توانایی شلاته کردن فلزات بخاطر داشتن اتم نیتروژن است (Burke Yil maz & Hasir Ci., 2000).

کمپلکس کیتوزان وگالیک‌اسید بخوبی در آب حل می‌شود. داری ساختارخطی متشکل از ان‌استیل‌دی گلوگزآمین باگروه‌های قطبی همچون گروه آمین و هیدروکسیل که می‌توانند بعنوان دهنده هیدروژن عمل کنند (Shahidi *et al*., 1999). کمپلکس کیتوزان گالیک‌اسید دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی تقویت شده در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و در مواقعی که یون‌های فلزی موجودند می‌باشد (Pasanphan *et al*., 2007). اتصال گالیک‌اسید به کیتوزان باعث می‌شود کیتوزان داری ویژگی‌های منحصر به فردی باشد ۱) فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس غیرفعالسازی اتم آهن ۲) بعنوان شکننده زنجیر اکسیدانی با دادن اتم هیدروژن از گروه تری هیدروکسیل گالیک‌اسید۳) بهبود حلالیت آبی کیتوزان بخاطر وجود گروه‌های هیدروفیل گالیک‌اسید. (Pasanphan *et al*., 2007).

گالیک اسید و کافئیک اسید خاصیت آنتی‌اکسیدانی تری متیل کیتوزان را بطور موثری افزایش می‌دهند ترکیب کیتوزان با هیدروکسی سینامیک و کافئیک و فرولیک منجر به تولید کمپلکس‌هایی می‌شود که خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات کمپلکس در مقایسه با کیتوزان معمولی بیشتر است (Ren *et al*., 2013).

گالیک‌اسید با روش های مختلفی به داخل کیتوزان پیوند می‌یابد: ۱) ۱اتیل ۳ دی متیل آمینوپروپیل کربو دی ایمید ۲) Nهیدروکسی سوکسنیمید ۳) پلیمریزاسیون کاتالیز شده بالاکاز ۳) سیستم آسکوربیک اسید هیدروپروکسید. کربو دی ایمید ماده‌ی اتصال دهنده است که خاصیت سمی ندارد در صنعت داروسازی کاربرد دارد و باعث اتصال گروه آمین کیتوزان به گروه کربوکسیل گالیک اسید می‌شود.

در بین حامل‌ها نانوژل بخاطر ظرفیت بارگیری و حلالیت و پایداری بالا و ویژگی‌های رهایش بهتر نسبت به سایر حامل‌ها برتر است. علاوه برآن براساس نانو بودن سایزذرات به اثرات فاکتورهای محیطی مثل نور، قدرت یونی، pH، دما بر روی مواد زیست فعال مثل عصاره روغنی گیاهی واکنش نشان می‌دهد (Rasoli *et al*., 2008). شبکه اتصالی زنجیره پلیمری نانوژل پدیده تجمع خود به خودی تشکیل می‌شود. روش‌های مختلف اتصالی مثل: پیوند یونی، پدیده تجمع خود به خود، کریستالیزاسیون، پلیمریزاسیون، پیوند تشعشعی، پیوند گروه‌های عاملی در تشکیل نانوژل استفاده شده است (Yallapu *et al*., 2007).

با توجه به نیاز به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در سیستم-های روغنی برای حفاظت و جلوگیری از اکسیداسیون و با توجه به ویژگی‌های یاد شده در مورد نانوژل و همچنین ویژگی‌های گالیک‌اسید و کیتوزان در این پژوهش اثرات نانوژل کیتوزان و گالیک‌اسید بعنوان سیستم آنتی اکسیدانی طبیعی بررسی شد.

مواد و روش ها

مواد

شامل روغن آفتابگردان درنیکا (ایرانی)، سرکه مهرام (ایرانی)، ۱اتیل ۳ دی متیل آمینو پروپیل کربو دی ایمید مرک (آلمان) با وزن مولکولی ۷۰ /۱۹۱ گرم بر مول، کیتوزان با وزن مولکولی پایین سیگما (آلمان)، گالیک اسید سیگما (آلمان(ایرانی)، صمغ گزانتان (ایرانی).

روش ها

تولید سس مایونز

برای تولید سس از روغن آفتابگردان بدون آنتی‌اکسیدان و سرکه و صمغ گزانتان استفاده شد. ۴۰۰ میلی لیتر روغن آفتابگردان با ۴۰۰میلی لیتر سرکه مخلوط شد به این گونه که ابتدا نانو ژل-های کیتوزان و گالیک اسید در سرکه حل شد سپس سرکه و روغن در مخلوط کن مخلوط شد و ۰/۶ درصد صمغ گزانتان به آن اضافه گردید (به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر ۰/۱۵ گرم صمغ گزانتان) تا نمونه‌ای یکنواخت و هموژن و پایدار بدست آید.

تولید نانوژل کیتوزان و گالیک اسید

۰/۵ گرم کیتوزان با وزن مولکولی پایین در محلول آبی استیک اسید۱درصد تا غلظت نهایی ۰/۵ درصد حل شد. محلول کیتوزان با افزودن متانول رقیق گردید سپس در دمای اتاق هم-زده شد این محلول که pH آن ۳/۵- ۴ است سپس تحت سونیکاسیون (Elma) ساخت کشور آلمان قرار گرفت۷۰۰ میکرولیتر محلول ۱اتیل ۳دی متیل آمینو پروپیل کربودی ایمید به پودر گالیک اسید افزوده شده، سپس این مخلوط به محلول کیتوزان افزوده و عملیات هم زدن بمدت ۲۴ ساعت ادامه یافت. سپس به منظور رسوب کردن کمپلکس کیتوزان و گالیک اسید pH باافزودن سود ۰/۱ نرمال به ۸/۵ -۹ افزایش یافت. نانوژل‌ها با پیوندهای کوالانسی بین گروه‌های آمینی کیتوزان و گروه کربوکسیل زنجیرهای گالیک‌اسید تشکیل شد. نهایتا عمل سانتریفیوژ (ollmann and co) ساخت کشور آلمان

برای جداسازی نانوژل‌های رسوب شده انجام گرفت. برای حذف ناخالصی‌ها نانوژل‌ها ۳ مرتبه با آب و اتانول شست و شو داده شد. رسوب بدست آمده در دمای اتاق تحت خلا توسط خشک کن انجمادی (Christ) ساخت کشور آلمان بمدت ۲۴ ساعت خشک شد و سپس در استیک اسید ۱ درصد دوباره بحالت محلول درآمد سپس فیلتراسیون با فیلتر۰/۲ نانومتر انجام گرفت تا نانوژل‌های کیتوزان وگالیک اسید یکنواخت شوند (Beyki *et al*., 2014).

افزودن نانوژل به سس

نانوژل حاصله در غلظت های صفر (نمونه کنترل)، ppm ۱۰۰، ppm ۲۰۰ در هنگام تولید سس به سرکه اضافه شده و در مخلوط‌کن همزده شد. و در روز یک ، روز ۲۰، روز۴۰ ، روز۶۰ آزمون‌های کیفی اندازه‌گیری شد. طی ۶۰ روز نگه‌داری هر ۲۰ روز یکبار از تمامی تیمارها نمونه برداری صورت گرفته و نمونه‌ها از لحاظ ویژگی‌های اکسیداسیونی مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج روغن

مخلوطی از حلال های کلروفرم و متانول به نسبت ۱ به ۱ به نمونه سس اضافه شد مخلوط حاصله بمدت ۱ دقیقه در سرعت rpm ۵۰۰ روی شیکر قرار گرفت سپس بمدت ۱ دقیقه در سرعت ۲۰۰۰سانتریفیوژ شد حلال در بالا و روغن در قسمت پایین قرار گرفت سپس حلال از قسمت فوقانی حذف شده و فاز روغنی پایین جمع‌آوری شد مقدار حلال ناچیز باقی مانده در روغن توسط اواپراتور تحت خلاء بخار شد تا روغن خالص بدست آید (Asnaashari *et al* ., 2014).

آزمون‌ها

اندازه گیری اندازه ذرات

اندازه نانوژل‌ها با استفاده از دستگاه DLS اندازه گیری شد. (Malvern instrument Ltd.,UK)

آنالیز طیف مادون قرمز

طیف نانوژل‌های کیتوزان و گالیک اسید توسط دستگاه طیف سنج مادون قرمز (FTIR) ثبت شد فرنکاسی که دستگاه کار می‌کند در رنج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} می‌باشد نمونه و پتاسیم بروميد به نسبت ۱ به ۱۰ با هم مخلوط شده بصورت قرص‌هایی تهیه می‌شوند.(Tensor 27, Bruker)

اندازه‌گیری عدد اسیدی

از طریق روش تیتراسیون مطابق روش AOAC (2005) انجام شد.

اندازه گیری عدد پروکسید

از طریق روش تیتراسیون و یدومتری مطابق روش AOAC شماره ۹۶۵,۳۳ انجام شد.

آزمایش شال

نمونه‌های سس در آون در درمای ۶۵ درجه بمدت ۵ روز قرار داده شد و هر روز نمونه سس برداشته و روغن آن استخراج شده و آزمایش‌های عدد پراکسید و عدد اسیدی انجام گرفت (Azadmard., 2009).

اندازه گیری‌کاروتنوئید

روغن از نمونه سس استخراج شده و حلال سیکلوهگزان به روغن افزوده شد و جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Azadmard., 2009).

آنالیز آماری

آزمون‌های فیزیکی وشیمیایی براساس طرح کاملا تصادفی سه تیماردرسه تکرار انجام می‌گیرد برای تحلیل داده‌ها از آنایز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه‌ی میانگین های دانکن درسطح ۵ درصد استفاده شده و نرم افزارspss در تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

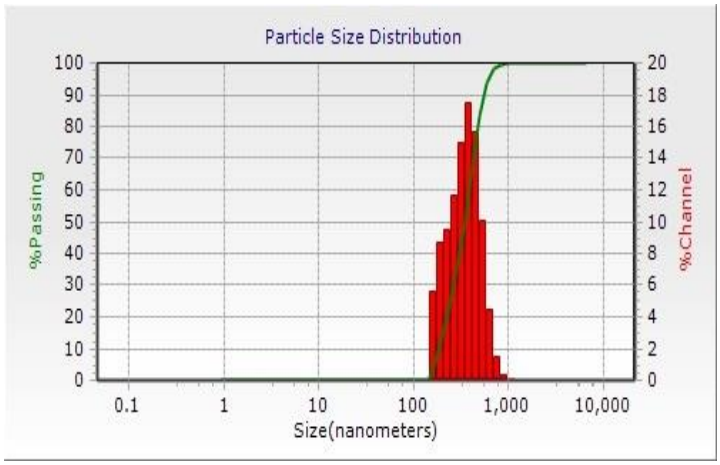
اثر افزودن نانوژل کیتوزان و گالیک اسید بر ویژگی‌های شیمیایی روغن آفتابگردان

اندازه گیری سایز ذرات

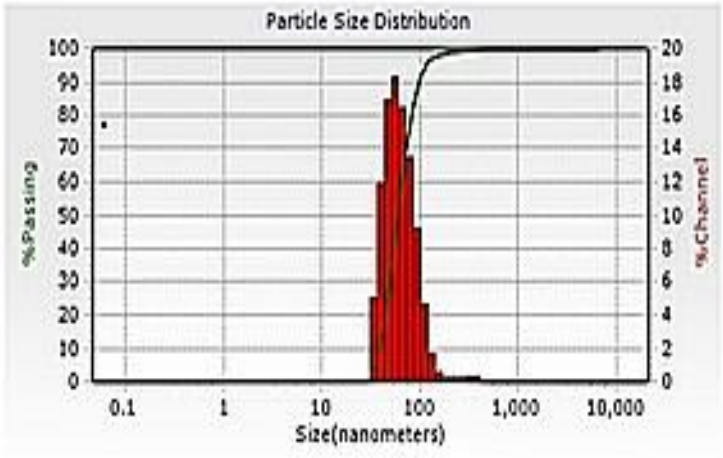
بااستفاده از دستگاه DLS، اندازه ذرات اندازه‌گیری شد. اندازه بیش از ۵۰ درصد ذرات زیر ۳۴۴ نانومتر بود (شکل ۱) بعد از عمل فیلتراسیون محلول نانوژل کیتوزان و گالیک اسید با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر اندازه ذرات به زیر۲۰۰ نانومتر کاهش یافت (شکل۲). در مطالعه دیگر که از دکسترین برای ساخت نانوژل استفاده شد بود اندازه ذرات با دستگاه DLS اندازه گیری شده و رنج اندازه ذرات ۲۵ الی ۱۵۰ نانومتر بود (Carvalho *et al*., 2010). همچنین در مطالعه ای که نانوژل کیتوزان و سینامیک اسید بعنوان حامل عصاره ای نعنا تولید شده بود رنج اندازه ذرات۴۰ نانومتر الی ۳۵۰ نانومتر بود (Beyki *et al*., 2014).

آنالیز طیف مادون قرمز

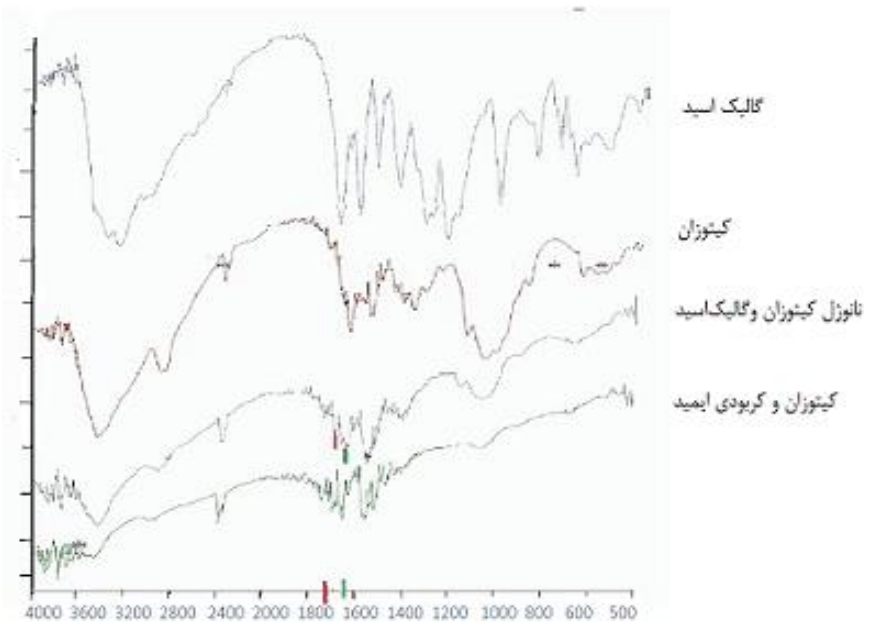
آنالیز طیف مادون قرمز برای بررسی انجام پیوند بین گالیک-اسید و کیتوزان انجام گرفت بررسی‌ها نشان داد که وجود پیک-های مربوط به طول موج ۱۷۳۰بیانگر وجود پیوند استری حاصل از پیوند عامل کربوکسیل و عامل هیدروکسیل است. وجود پیک در طول موج ۱۶۴۰ نیز بیانگر وجود پیوند آمیدی حاصل از پیوند عامل کربوکسیل و عامل NH_2 است که این دو پیوند نشانگر اتصال موفقیت‌آمیز کیتوزان باگالیک اسید می‌باشد.



شکل شماره ۱. اندازه ذرات قبل از فیلتر کردن با فیلتر ۰/۲



شکل ۲- اندازه ذرات بعد از فیلتر کردن با فیلتر ۰/۲



شکل ۳. مربوط به طیف مادون قرمز گالیک اسید، کیتوزان، نانوژل کیتوزان وگالیک‌اسید، کیتوزان و ااتیل ۳ دی متیل کربو دی ایمید

عدد اسیدی

عدد اسیدی در نمونه‌های سس روغن آفتابگردان محتوی نانوژل نسبت به سس روغن آفتابگردان کنترل (بدون نانوژل) کمتر است در روز اول نگه‌داری اختلاف معنی‌دار در عدد اسیدی بین نمونه‌ها مشاهده نمی‌شود اما از روز ۴۰ام اختلاف بین نمونه‌ها معنی‌دار است (p<۰/۰۵) در تمامی نمونه‌ها با گذشت زمان عدد اسیدی افزایش می‌یابد اما افزایش عدد اسیدی در نمونه کنترل بیشتر از نمونه‌هایppm ۱۰۰ و ۲۰۰ است درنمونه ppm ۲۰۰روند افزایش عدد اسیدی کمتر از نمونه ۱۰۰ppm است. در نمونه کنترل بین روزهای نگه‌داری اول و ۲۰ ام اختلاف معنی دار است (p<۰/۰۵) در نمونه ۱۰۰ppm اختلاف بین روز اول با۲۰ ام و بین روزهای۴۰ ام با ۶۰ ام معنی دار نیست (p<۰/۰۵) اما اختلاف بین روزهای ۱ و ۲۰ با روزهای۴۰ و ۶۰ معنی‌دار است درنمونه ppm ۲۰۰ اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۱ و ۲۰ و ۴۰ وجود ندارد (p<۰/۰۵). نتایج بدست آمده بخاطرخاصیت آنتی‌اکسیدانی گالیک‌اسید است که اتصال این اسیدهای فنلی با ترکیباتی مثل: کیتوزان و الیگوساکاریدها توانایی رهایش آهسته و قدرت آنتی اکسیدانی را افزایش می‌دهد (جدول ۱).

جدول ۱. تغییرات عدد اسیدی در طی ۶۰ روز زمان نگه داری در نمونه‌های حاوی نانوژل و بدون نانوژل

نمونه	روزهای نگهداری ۱	۲۰	۴۰	۶۰
T_1	۰/۱۵^{Ca}±۰/۰۴۰۴	۰/۱۸^{Ba}±۰/۰۱۰۴	۰/۴ ^{Aa}±۰/۱	۰/۴^{Aa}± ۰/۰۷۶
T_2	۰/۱۵^{Ba}۰±/۰۴۰۴	۰/۱۶^{Ba}±۰/۰۱۲۵	۰/۲۵^{Ab}±۰/۰۵۰۳	۰/۳ ^{Ab}±۰/۰۲
T_3	۰/۱۳^{Ba}±۰/۰۲۸	۰/۱۷^{Ba}±۰/۰۰۷۶	۰/۱۸ ^{Bc}±۰/۰۲	۰/۲۵^{Ac}±۰/۰۱۰۴

در هر ردیف میانگین‌هایی که هیچ حرف مشترکی ندارند در سطح احتمال ۵ درصد با هم اختلاف معنی دار دارند. (p<۰/۰۵)

حروف انگلیسی کوچک متفاوت بیانگر اختلاف بین تیمارها (ردیف‌ها) و حروف انگلیسی بزرگ متفاوت بیانگر اختلاف بین روزهای نگه‌داری (ستون‌ها) است.

T_1:نمونه کنترل، T_2: نمونه حاوی ppm ۱۰۰، T3: نمونه حاوی ppm ۲۰۰

در مطالعه ای اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره سیب زمینی را در به تاخیر انداختن اکسیداسیون روغن آفتابگردان بررسی شد. مقدار عدد اسیدی برای هر دو نوع نمونه با گذشت زمان حرارت دهی افزایش پیدا می‌کند. بالاترین و کمترین مقدار عدد اسیدی در پایان دوره مربوط به نمونه حاوی TBHQ و نمونه حاوی ppm ۸۰۰ عصاره می‌باشد (Soltan *et al*,2013).

درمطالعه ای تغییرات عدد اسیدی روغن آفتابگردان حاوی عصاره خرمالو را بررسی شد. که در طی نگه‌داری در دمای$^{\circ}$c ۳۰ نمونه‌های روغن حاوی ppm ۴۰۰ عصاره خرمالو و آنتی اکسیدان سنتزی دارای کمترین مقدار عدد اسیدی و نمونه‌های حاوی ppm ۸۰۰ عصاره خرمالو دارای بیشترین مقدار عدد اسیدی بودند در نمونه های روغن حاوی ppm ۴۰۰ عصاره خرمالو و حاوی TBHQ با افزایش زمان نگه‌داری عدد اسیدی در تمامی زمان‌های نگه‌داری روند افزایشی داشت بطوری که بالاترین مقدار برای عدد اسیدی مربوط به نمونه‌های روز۶۰ام و پایین‌ترین مقدار عدد اسیدی مربوط به نمونه‌های روز صفر است در حالی که در نمونه‌های حاوی ppm ۸۰۰ عصاره خرمالو تا روز ۴۵ام عدد اسیدی روند صعودی دارد و از روز ۴۵ام به بعد روند نزولی پیدا می‌کند (Ali negad *et al*.,2013).

عدد پروکسید

جدول ۲ اثرافزودن نانوکمپلکس کیتوزان وگالیک اسید بر عدد پروکسید سس حاوی روغن آفتابگردان و روند تغییرات عدد پروکسید طی ۶۰ روز را نشان می‌دهد. در روز اول اختلاف معنی‌دار درعدد پروکسید بین تیمارها دیده نمی‌شود (p<۰/۰۵) اما از روز ۴۰ام به بعد عدد پروکسید در تمام نمونه‌ها افزایش می‌یابد در روز ۴۰ام و ۶۰ام اختلاف بین تیمارها معنی‌دار است (p<۰/۰۵). تاثیر گالیک اسید در برابر اکسیداسیون درروز ۴۰ام و۶۰ام مشخص می‌شود زیرا که عدد پروکسید در نمونه‌های حاوی ۱۰۰ppmو ppm ۲۰۰ نانوژل کیتوزان گالیک‌اسید کمتر از نمونه کنترل است میزان افزایش عدد پروکسید در نمونه کنترل بیشتر از نمونه‌های حاوی ۱۰۰ppmو ppm ۲۰۰ نانوژل کیتوزان گالیک اسید است بیشترین مقدار مربوط به نمونه کنترل در روز ۶۰ام می‌باشد. در تمامی نمونه‌ها اختلاف بین روزهای ۱ و ۲۰ معنی‌دار است (p<۰/۰۵) اما اختلاف بین روزهای ۴۰ و ۶۰ معنی‌دار نیست (p<۰/۰۵). وجود نانوژل وجود گالیک اسید بعنوان یک ترکیب فنلی زیست فعال و از طرفی اتصال آن با کیتوزان که موجب افزایش اثر آنتی‌اکسیدانی و افزایش اثر بخشی این ترکیب فنلی می‌شود باعث شده در ترکیبات حاوی نانوژل سرعت اکسیداسیون کمتر باشد.

جدول ۲- تغییرات عدد پروکسید در طی ۶۰ روز زمان نگه‌داری در نمونه‌های حاوی نانوژل و بدون نانوژل

دنمونه	روزهای نگهداری			
	۱	۲۰	۴۰	۶۰
T_1	۰/۵^{Ca}±۰/۰۷۶	۲/۵^{Ba}±۰/۶۵۵	۴^{Aa}±۰/۷۶۳	۵^{Aa}±۰/۷۶۳
T_2	۰/۵^{Ca}±۰/۰۲۸۸	۲^{Bb}±۰/۷۵۰۵	۳^{Ab}±۰/۲۸۸	۳^{Ab}±۰/۵
T_3	۰/۵^{Ca}±۰/۰۷۶	۲^{Bb}±۰/۶۰۲	۳^{Ab}±۰/۹۲۹	۳^{Ab}±۰/۲۸۸

)pدر هر ردیف میانگین‌هایی که هیچ حرف مشترکی ندارند در سطح احتمال ۵ درصد با هم اختلاف معنی دار دارند. (۰/۰۵>
حروف انگلیسی کوچک متفاوت بیانگر اختلاف بین تیمارها و حروف انگلیسی بزرگ متفاوت اختلاف بیانگر بین روزهای نگه‌داری است.
T_1: نمونه کنترل، T_2: نمونه حاوی ppm ۱۰۰، T3: نمونه حاوی ppm ۲۰۰

درمطالعه ای فرولیک اسید متصل به کیتوزان تولید و پایداری دمایی و استفاده از آن بعنوان آنتی‌اکسیدان برای فیلم-های بسته بندی تخریب‌پذیر بیولوژیک بررسی شد. چیپس‌های نگه‌داری شد در فیلم حاوی مواد بیولوژیک دارای عددپروکسید = ۳/۷۶ به ازای کیلوگرم محصول و چیپس‌های نگه‌داری شده در فیلم حاوی مواد بیولوژیک و کیتوزان و فرولیک اسید دارای عدد پروکسید= ۲/۵۶ به ازای کیلوگرم محصول است پایین ترین عدد پروکسید در نمونه فیلم حاوی مواد بیولوژیک و کیتوزان و فرولیک اسید نشان‌دهنده اثرمثبت وجود مقادیر پایین فرولیک اسید است (Woranuch *et al*, 2013).

درمطالعه ای نانوکمپلکس‌های بتالاکتوگلوبولین حاوی پلی فنل‌های چای سبز را تولید کردند و رفتار بین سطحی و پایداری اکسیداسیونی روغن ماهی را مورد بررسی قرار دادند. غلظت هیدروپروکسید امولسیون روغن ماهی از ۲۰ به ۲۱۴ میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم روغن در امولسیون تثبیت شده با بتالاکتوگلوبولین رسید و در امولسیون حاوی نانوکمپلکس بتالاکتوگلوبولین حاوی پلی فنل‌های چای سبز در مدت انبارداری از ۴۰ میلی اکی‌والان تجاوز نکرد همین نتیجه توسط آلماجانو ۲۰۰۷زمانی که کاتچین را با آلبومین مخلوط کرد که در مورد امولسیون روغن آفتابگردان استفاده کردند بدست آمد (von Staszewski *et al*, 2014).

آزمایش شال

آزمایش شال برای مطالعه پایداری اکسیداسیونی روغنی و محصولات روغنی انجام می‌گیرد که به دلیل دمای بالا می‌تواند نحوه اکسیداسیون را سریعتر نشان دهد. در این آزمایش اثر افزودن نانوکمپلکس کیتوزان وگالیک اسید بر سس مایونز در طول ۵ روز در دمای ۶۵ درجه ارزیابی شد. در روز اول و دوم تفاوت محسوسی بین تیمارها در عدد پروکسید وجود ندارد از روز سوم تا پنجم تفاوت در عدد پروکسید بین نمونه ها قابل توجه است بیشترین عدد پروکسید مربوط به نمونه کنترلی در روز پنجم‌ام است در روز چهارم و پنجم عدد پروکسید نمونه ppm ۱۰۰کمتر از نمونهppm ۲۰۰ است که احتمالا بخاطر خاصیت پراکسیدانی گالیک اسید است. در هرسه تیمار اختلاف بین روزهای نگه‌داری معنی‌دار است (جدول ۳).

جدول ۳. داده های مربوط به آزمون شال در طی ۵ روز نگه داری در بین تیمارهای مختلف

نمونه	روزهای نگهداری				
	۱	۲	۳	۴	۵
T_1	۰/۵^{aE}±۰/۳۶	۸/۵^{aD}±۰/۵۷۷	۲۰^{aC}±۱/۰۴	۳۸^{aB}±۱/۰۴	۴۴^{aA}±۱/۰۴
T_2	۰/۵^{aE}±۰	۸/۵^{aD}±۰/۲۹۱	۱۶^{bC}±۰/۷۶۳	۱۶^{cB}±۰/۵	۲۰^{cA}± ۱/۰۴
T_3	۰/۵^{aE}±۰	۸/۲۵^{aD}±۰/۲۸۸	۱۶^{bC}±۰/۵	۱۹^{bB}±۱/۰۴	۲۵^{b} ^{A}±۱

در هر ردیف میانگین‌هایی که هیچ حرف مشترکی ندارند در سطح احتمال ۵ درصد با هم اختلاف معنی دار دارند.
حروف انگلیسی کوچک بیانگر اختلاف بین تیمارها و حروف انگلیسی بزرگ بیانگر اختلاف بین روزهای نگه‌داری است
T_1 ، نمونه کنترلی :T_2نمونه ppm۱۰۰،T3 نمونه ppm۲۰۰

طبق مطالعه ای برای هر آنتی‌اکسیدان یک غلظت بحرانی در ماتریکس مواد غذایی برای ایجاد ماکزیموم کیفیت وجود دارد زیر این غلظت بحرانی اثر آنتی‌اکسیدانی زیر اپتیمم است و بالای غلظت بحرانی اثر پراکسیدانی دارد در این مطالعه آنتی-اکسیدان موثر در جلوگیری از اکسیداسیون لیپید در امولسیون های بر پایه لیپید آسکوربیل پالمیتات در غلظت ۰/۰۰۵ درصد

است که با اندازه‌گیری عدد آنیزیدین و عدد پروکسید معلوم شد (Staszewski *et al*, 2014 von).

اندازه‌گیری کاروتنوئید

در طی ۶۰ روز نگه‌داری میزان کاروتنوئید در تمامی نمونه‌ها کاهش می‌یابد (جدول ۴). نمونه‌ها در روز اول اختلاف معنی-داری (p<۰/۰۵) با هم ندارند و در روز ۶۰ام اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها وجود دارد. در تمامی روزهای نگه‌داری بیشترین کاروتنوئید مربوط به ppm ۲۰۰ و کمترین میزان کاروتنوئید مربوط به نمونه کنترل است. نمونه حاوی ۲۰۰ppm داری مقدار کاروتنوئید بیشتری نسبت به بقیه تیمارها است زیرا دارای گالیک اسید بیشتری است و وجود گالیک‌اسید از اکسیداسیون کاروتنوئیدها تا حدودی جلوگیری می‌کند در نمونه کنترل بین تمامی روزهای نگه‌داری اختلاف معنی‌دار وجود دارد. (p<۰/۰۵) در نمونه ppm ۲۰۰و ۱۰۰ppm بین روزهای ۲۰ و ۴۰ و۶۰ اختلاف معنی‌دار وجود ندارد. (p<۰/۰۵). کاروتنوئید ها بدلیل داشتن پیوندهای دوگانه ترکیباتی حساس به اکسیداسیون هستند نمونه‌هایی ک دارای نانوژل کیتوزان و گالیک‌اسید هستند میزان کاروتنوئید بیشتری دارند که به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوژل کیتوزان و گالیک اسید کاروتنوئید تا حدودی از اکسیداسیون حفظ شده است.

جدول ۴. تغییرات مربوط به اندازه گیری کاروتنوئید در طی ۶۰ روز نگه داری در نمونه‌های حاوی نانوژل و بدون نانوژل

نمونه	روزهای نگهداری				
	۱	۲۰	۴۰	۶۰
T_1	$۲/۹^{Aa}$±۰/۱۵۲	$۲/۱^{Ba}$±۰/۳۵۴	$۱/۸^{Ca}$±۰/۱۵	$۱/۵^{Cc}$±۰/۲۰۸
T_2	$۲/۹^{Aa}$±۰/۳۵۱	$۲/۱^{Ba}$±۰/۳۵۴	$۲/۱^{Bb}$±۰/۲۵۱	$۱/۹^{Bb}$±۰/۲۵۱
T_3	۳^{Aa}±۰/۱۰۶	$۲/۴^{Ba}$±۰/۱	$۲/۹^{Bb}$±۰/۱۱۵	$۲/۶^{Ba}$±۰/۱۵۲

)pدر هر ردیف میانگین‌هایی که هیچ حرف مشترکی ندارند در سطح احتمال ۵ درصد با هم اختلاف معنی دار دارند. (۰/۰۵>

حروف انگلیسی کوچک بیانگر اختلاف بین تیمارها و حروف انگلیسی بزرگ بیانگر اختلاف بین روزهای نگه‌داری است

T_1: نمونه کنترل، T_2: نمونه حاوی ppm ۱۰۰، T3: نمونه حاوی ppm ۲۰۰

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در طی ۶۰ روز نگهداری تیمار ppm ۲۰۰ نانوژل کیتوزان گالیک اسید موثرتر از تیمار ppm ۱۰۰ است بهترین نتایج مربوط به نمونه ppm ۲۰۰ است بنابراین استفاده از نانوژل کیتوزان گالیک اسید موجب افزایش مدت پایداری روغن‌ها می شود. گالیک اسید خاصیت آنتی-اکسیدانی کیتوزان را بطور موثری افزایش می‌دهند ترکیب کیتوزان با گالیک اسید منجر به تولید کمپلکس‌هایی می‌شود که خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات کمپلکس در مقایسه با کیتوزان معمولی و گالیک اسید بیشتر است. میزان فعالیت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد نانوکمپلکس گالیک‌اسید و کیتوزان با افزایش غلظت نانوکمپلکس افزایش می‌یابد.

REFERENCES

Akoh, C. C., & Min, D. B. (2008). Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology (3th ed).London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton

Alinejad, S., esmailzadeh kenari, K., Bolandi, M. (1392) Antioxidant effect of Persimmon peel extract in stabilization of sun flower oil. *Journal of Food Science and Technology Innovation*, 143-148(In farsi).

Aoki, K., Ishiwata, S., Sakagami, H., Kusama, K., Katayama,T. (2001) Modification of *apoptosisinducing activity of gallic acid by saliva, Anticancer Res*, 21, 1879–1883.

Asnaashari, M., Farhoosh, R and Sharif, A.(2014) Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. Food Chemistry, 159, 439-444.

Azadmard Damirchi, S.(1389) Chemistry and Analysis of Edible Oils and Fats. 1st Ed.Tabriz: Amidi Publication.vol. 1. 241-245.(In Farsi)

Beyki, M., Zhaveh, S., Khalili , S.T., Rahmani-Cherati, T., Bayat, M., Tabatabaei, M and Mohsenifar,A. (2014) Encapsulation of Mentha piperita essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with *enhanced antimicrobial activity against Aspergillus flavus. Industrial Crops and Products*, 54, 310-319.

Burke, A., Yilmaz, E., & Hasirci, N. (2000) Evaluation of chitosan as apotential medical iron (III) ion adsorbent. Turk *Journal of MedicalSciences*, 30, 623–624.

Eom, T., Senevirathne, M., Kim, S-K.(2012) Synthesis of phenolic acid conjugated chitooligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity. *environmental toxicology and pharmacology*, 34, 519–527.

Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, A. (2010) Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implication *for human disease. Biochim. Biophys*. Acta, 1822 (9), 1363–1373.

Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogihara, Y., Jiang, B.Y., Chen, Y. (1995) Selective induction of *cell death in cancer cells by gallic acid, Biol. Pharm. Bull*, 18, 1526–1530

Pasanphan, W and Chirachanchai , S.(2008) Conjugation of gallic acid onto chitosan: *An approach for green and water-based antioxidant*. Carbohydrate Polymers, 72(1), 169-177.

Pasanphan, W., Buettner, G. R., Chirachanchai, S. (2010) Chitosan gallate as a *novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study*. Carbohydrate Research, 345(1), 132-140.

Ren, J., Li, Q., Dong,F.,Feng,Y., Guo,z. (2013) Phenolic antioxidants-functionalized quaternized chitosan synthesis and antioxidant properties. International *Journal of Biological Macromolecules*, 53, 77-81.

Salcedo, C- L., Frias, M-A ., Cutro , A-C., Nazareno , M-A and Disalvo , E-A. (2014) Antiradical activity of *gallic acid included in lipid interphases.* Biochimica et Biophysica Acta, 1838(10), 2656-2661.

Shahidi, F. (2005) Bailey's industrial oil and *fat products (6th Ed). New Jersey: John Wiley & Sons*.vol 6.

Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J. (1999) Food application of chitin and *chitosans.J. Trends Food Sci. Technol*, 10, 37–51.

Soltan، S-T.، Esmaelzadeh، R.، Nahidi، F.(1392) Evaluation of Antioxidant Effect of Potato peel extract to postponement sunflower oil oxidation during Thermal Condition. *Journal of Food Science and Technology Innovation*, 111-118. (In Farsi)

Staszewski V, M., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Pilosof ,A.(2014) Green tea polyphenols-β-lactoglobulin nanocomplexes: *Interfacial behavior, emulsification and oxidation stability of fish oil. Food Hydrocolloids*, 35, 505-511.

Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A. (2005) Influence of heating on antioxidant activity and the *chemical composition of some spice essential oils. Food Chemistery*, 89, 549-554.

Woranuch, S. and Yoksan, R. (2013) Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. Carbohydrate Polymers, 96(2), 495-502.

Yu, S-H., Mi, F-L., Pang, J-Ch., Jiang, Sh-Ch., Kuo,T-H., Wu,Sh-J and Shyu Sh-Sh. (2011) Preparation and characterization of radical and pH-*responsive chitosan–gallic acid conjugate drug carriers. Carbohydrate Polymers*, 84(2), 794-802.