

## بررسی امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنولیک و تاثیر باکتری‌های لاکتیکی در بهبود خواص بیولوژیک آب تمشک سیاه و جلوگیری از اکسیداسیون ماهی تیلایا

محمد مهدی کریمخانی<sup>۱</sup>، عبدالله جمشیدی<sup>۲\*</sup>، محمود نصرالله‌زاده<sup>۳</sup>، محمد آرمین<sup>۴</sup>، طیبه زینلی<sup>۵</sup>، سید مهدی جعفری<sup>۶</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی و آبریان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
  - ۲- استاد گروه بهداشت مواد غذایی و آبریان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
  - ۳- دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران
  - ۴- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران
  - ۵- استادیار بهداشت مواد غذایی، گروه تغذیه و بهداشت مواد غذایی، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات عوامل عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
  - ۶- استاد گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
- تاریخ ارسال: ۱۴۰۲/۰۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۸

### چکیده

هدف در این مطالعه بررسی تاثیر روش استخراج امواج فراصوت بر ترکیبات فنولیک و بهبود ویژگی‌های آب تمشک سیاه (*Rubus dolichocarpus*) با افزودن باکتری‌های لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازنی است. ابتدا نمونه‌های آب تمشک با استفاده از امواج فراصوت با فرکانس ثابت در توان‌های ۲۲۵، ۲۴۵، ۲۶۵ وات و زمان‌های متفاوت ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه در دماهای ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ درجه سلسیوس استخراج شد که بیشترین میزان ترکیبات فنولیک در توان ۲۶۵ وات و زمان ۹۰ دقیقه در دماهای ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سلسیوس به دست آمد. پس از آن، باکتری‌ها در آب تمشک سیاه تحت امواج فراصوت قرار داده شده تلقیح شدند و میزان تغییر ترکیبات فنولیک و فلاوونوئید، آنتوسیانین‌ها و قدرت آنتی اکسیدانی و مهار آنزیم آلفا آمیلاز و جلوگیری از تشکیل تیروزیناز در زمان‌های مختلف تخمیر به دست آمد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که با افزایش زمان تخمیر، قدرت بیولوژیک آب میوه و جلوگیری از تشکیل آنزیم‌های آلفا آمیلاز و تیروزیناز افزایش می‌یابد. میزان ترکیبات فنولیک و فلاوونوئید هم با افزایش زمان تخمیر افزایش ولی میزان آنتوسیانین‌ها کاهش یافت و ویژگی‌های بیولوژیک آب میوه تخمیر شده بیش از ۴۰ درصد بهبود پیدا کرده است. بررسی توان آنتی اکسیدانی نمونه‌های آب میوه تحت امواج فراصوت قرار داده شده به همراه فرایند تخمیر در ماهی تیلایا در مدت ۱۵ روز بررسی گردید. براساس نتایج به دست آمده، در بین نمونه‌های آب تمشک نمونه آب میوه تحت امواج فراصوت قرار داده شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازری قوی‌ترین نمونه در کاهش میزان TBARS<sup>۱</sup> بوده است.

واژه‌های کلیدی: آب تمشک سیاه، باکتری‌های اسید لاکتیکی، آنتی اکسیدان، مهار آلفا آمیلاز، مهار تیروزیناز

<sup>1</sup> Thiobarbituric acid reactive substances

## مقدمه

الاژیتانین‌ها، لیگنان‌ها و تانن‌های میوه تمشک هستند (Bensalem *et al.*, 2015). فنول‌های موجود در تمشک از اختلالاتی مانند آلزایمر، چاقی، پارکینسون و دیابت جلوگیری می‌کنند (Kallscheuer, 2016) (Tesuda *et al.*, 2016) (et al., 2019). توت‌های تیره یا سیاه، نسبت به توت قرمز، آنتی‌اکسیدان بیشتری دارند و این میزان بالای آنتی-اکسیدان‌ها رابطه مستقیمی با ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی این میوه‌ها دارند (Kostecka-Gugala *et al.*, 2015).

برای استخراج آب میوه‌ها و عصاره‌ها، کاربرد امواج فراصوت ساده و ارزان است و می‌تواند در تولیدات صنعتی و تجاری در مقیاس بزرگ اعمال شود و انتقال جرم بهبود بخشد (Kumar *et al.*, 2020)، در نتیجه زمان استخراج و مصرف حلال را کاهش دهد که نتیجه آن، نسبت به روش‌های مرسوم، کاهش مصرف انرژی و محافظت از محیط زیست است. این روش در دمای اتاق قابل اجراست و می‌تواند از اکسیدشدن و تجزیه محصولات طبیعی هدف جلوگیری کند. استخراج به کمک امواج فراصوت به طور گسترده در جداسازی محصولات طبیعی مختلف استفاده شده است (Medina-Torres *et al.* 2017).

عمده ترین اسیدی که توسط باکتری لاکتیکی تولید می‌شود اسید لاکتیک می‌باشد که برای اولین بار در سال ۱۷۸۰ در شیر یافت و توصیف شد (Sharma *et al.*, 2007; Kompanje *et al.*, 2020). از مزایای تخمیر لاکتیکی می‌توان به کنترل برخی سرطان‌ها، جلوگیری از ایجاد عفونت‌های روده‌ای، بهبود ارزش غذایی برخی غذاها و جلوگیری از افزایش سطح کلسترول در بدن اشاره کرد. علاوه بر این، تخمیر در محصولات لبنی باعث کاهش لاکتوز می‌شود که برای برخی از افراد نامتحمل به لاکتوز نیز مفید است (García-Burgos *et al.*, 2020).

خانواده Rosaceae شامل حدود ۳۰۰۰ گونه است که ۵۰۰ گونه از آن‌ها متعلق به جنس *Rubus* است. جنس *Rubus* به طور گسترده در مناطق معتدل جهان یافت می‌شود (Kasalkheh *et al.*, 2018) و از آن در تولید فرآورده‌های مغذی مانند بستنی، آب میوه، مربا، ژله و کیک استفاده شده است و از گذشته‌های دور کاربرد دارویی نیز داشته است (Schütz *et al.*, 2006). توت‌ها یا بری‌ها میوه‌های خوراکی و آبداری هستند که ویژگی‌های بیولوژیکی قابل توجهی مانند ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی دارند. ترکیبات موجود در توت‌ها نیز برای پوست بسیار مفید است. از ویژگی‌های قابل توجه این میوه‌ها این است که ویتامین C دارند و این ویتامین تا حد زیادی از آب مروارید و آرتريت، دژنراسیون ماکولا<sup>۲</sup> (شایع ترین علت کوری در جهان) جلوگیری می‌کند و گزارش شده است که خوردن توت سرشار از ویتامین C به مو و پوست کمک می‌کند (Mani 2016). در میان میوه‌های توت، تمشک از نظر ویتامین C بسیار غنی است و از سرماخوردگی جلوگیری می‌کند و نقش مهمی در سیستم ایمنی بدن انسان دارد (Bucher *et al.*, 2016; Ponder *et al.*, 2020). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که کاهش نسبت اسیدهای چرب n-6 به n-3 در رژیم غذایی ممکن است در کاهش خطر بیماری‌های قلبی و سرطان نقش داشته باشد. برای مثال، در روش پرس سرد از ۱۰۰ گرم دانه تمشک ۶۱ میلی‌گرم ویتامین E استخراج شده است که حاوی سه نوع از توکوفرول‌هاست و ۳۵ درصد آلفا لینولئیک اسید نیز از این دانه استخراج شده است (Parry *et al.*, 2005). ترکیباتی که از سلول‌ها در برابر اکسیداسیون محافظت می‌کنند، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی (رسوراترول، آپیجانین، روتین و غیره) و همچنین آنتوسیانین‌ها،

<sup>2</sup> AMD or ARMD

اکسیداسیون هستند که در همه موجودات هوای تولید می‌شوند. رادیکال‌های آزاد ROS بسیار واکنش‌پذیر هستند که باعث آسیب‌رساندن به مواد بیولوژیکی می‌شوند. ماهی سرشار از اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه است و از این رو بسیار مستعد پراکسیداسیون لیپیدی است. اکسیداسیون لیپید و پروتئین برای از دست دادن کیفیت در مدت نگهداری ماهی مهم هستند و تأثیر زیادی بر طعم و بافت دارند. تغییرات اکسیداتیو می‌تواند پیامدهای عملکردی متعدد ایجاد کند و باعث شود در بافت غذا، ظرفیت نگهداری آب (WHC<sup>4</sup>)، قابلیت هضم و آبداربودن در گوشت ماهی تغییر به‌وجود آید (Hematyar *et al.*, 2019)

علاوه بر تأثیرات نامطلوب اکسیداسیون در بدن که در بالا به آن اشاره شد، دیابت یکی دیگر از بیماری‌های متابولیکی است که در گذشت زمان، سطح بالای گلوکز خون می‌تواند به اندام‌های بدن آسیب برساند. اثر طولانی مدت احتمالی شامل آسیب به عروق خونی بزرگ (ماکرو عروقی) و کوچک (ریز عروقی) است که می‌تواند به حمله قلبی، سکته مغزی و مشکلات کلیه، چشم، لثه، پا و اعصاب بینجامد، با مهار آنزیم آلفا آمیلاز می‌توان سطح گلوکز خون را کنترل کرد (Cade 2008).

تولید بیش از حد ملانین نتیجه فعالیت آنزیم تیروزیناز، به عنوان یک آنزیم کلیدی، است که پلی فنل اکسیداز نیز نامیده می‌شود. این آنزیم دارای فلز مس است و باعث قهوه‌ای شدن آنزیمی میوه‌ها و سبزی‌ها و مواد غذایی با منشأ گیاهی می‌شود. این آنزیم همچنین باعث ایجاد اختلالات پوستی می‌شود که با اختلالات عصبی همراه است. بنابراین کنترل این آنزیم با آب تمشک سیاه می‌تواند بسیار مفید و موثر باشد (Xu *et al.*, 2012; Fawole *et al.*, 2021).

از بین باکتری‌های لاکتیک، لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی دارای نشانه‌های درمانی هستند. برای مثال، در مطالعه‌ای گزارش شد که لاکتوباسیلوس گازری استرس را در افراد سالم و در افراد بیمار مبتلا به مشکلات روده‌ای بهبود می‌بخشد (Nishida *et al.*, 2019). بررسی‌ها نشان می‌دهد لاکتوباسیلوس گازری، وارینه BNR17، در کاهش وزن موثر است (Mahboubi 2019) و لاکتوباسیلوس گازری G098 کولیت ناشی از سولفات سدیم دکستران را کاهش می‌دهد (Zhang. *et al.*, 2022) و از رشد باکتری‌ها و ویروس‌ها در محیط واژن جلوگیری می‌کند (Mei & Li 2022). گونه لاکتوباسیلوس کازئی وارینه رامنوسوس برای درمان یا پیشگیری از اسهال استفاده شده است (Lai *et al* 2019). گزارش شده است که اگر غذاهای حاوی لاکتوباسیلوس کازئی وارینه 01 به طور مداوم مصرف شود، از افزایش فشار خون و میزان قند خون جلوگیری می‌کند (Pimentel *et al.*, 2022).

در خلال تولید، ذخیره‌سازی، پردازش و آماده‌سازی غذا، آن دسته از محصولات که از اکسیداسیون لیپید و پروتئین تشکیل می‌شوند برای انسان زیان‌آور شناسایی شده است، به محض مصرف این ترکیبات که از اجزای مواد غذایی هستند، در مراحل هضم، بیشتر مورد تخریب و اکسیداسیون قرار می‌گیرند و مجموعه این ترکیبات زیان‌آور در لومن روده تجمع می‌یابد. مشخص شده است که برخی از این محصولات اکسیداسیون باعث ایجاد شرایط التهابی در روده (برای مثال، بیماری‌های روده) می‌شوند و به طور منطقی با شروع فرآیندهای سرطان‌زا مرتبط هستند. پس از جذب روده‌ای، برخی از گونه‌ها با جریان خون توزیع می‌شوند و به افزایش نشانگرهای استرس اکسیداتیو و اختلال در برخی فرآیندهای بیولوژیکی می‌انجامند (Estevez *et al.*, 2017). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS<sup>3</sup>) یکی از اجزای مهم در مکانیسم

<sup>4</sup> Water holding capacity

<sup>3</sup> Reactive oxygen species

و ۲۶۵ وات و در دمای ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ درجه سلسیوس مورد استخراج قرار گرفتند تا حداکثر مقدار ترکیبات فنولی به دست آید. نمونه‌ای که بالاترین میزان ترکیبات فنولیک را داشت با گازهای استریل فیلتر شد و pH آب میوه‌ها با  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  یک مولار در حدود ۴ تنظیم گردید و مقدار بریکس در آب میوه در درجه ۱۵ تنظیم و آب میوه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه شد (HTST). در مرحله بعد، تلقیح با باکتری های مختلف لاکتوباسیلوس گازری SM 05 و لاکتوباسیلوس کازئی واریته کازئی PTCC 1608 آغاز شد. باکتری‌ها در محیط آگار (MRS)<sup>۶</sup> مناسب قبل از تلقیح کشت داده شدند و میزان بار میکروبی اولیه تلقیح شده تقریباً 5/5 CFU/mL بود. نمونه‌های آب میوه تلقیح شده با باکتری به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند و آزمایش‌های بیولوژیکی بعدی در فاصله‌های زمانی صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت اجرا شد (Nguyen et al., 2018).

#### تعیین مقادیر pH

برای تعیین مقادیر pH، نمونه‌ها همگن و الکتروود pH متر درون نمونه‌های در حال تخمیر غوطه ور شد. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار اجرا شد.

#### تعیین سلول‌های زنده

تعداد سلول‌های زنده در آب تمشک سیاه تخمیر شده (log CFU/mL) بر اساس روش یانگ و همکاران (Yang et al., 2019) تعیین شد.

#### روش DPPH

این آزمایش به روش (Karimkhani et al., 2016) اجرا گردید. در ابتدا محلول ۵۰۰ میکرومولار رادیکال آزاد DPPH<sup>۸</sup> در اتانول تهیه شد. پس از آن ۴ میلی‌لیتر از آب تمشک سیاه تلقیح شده با باکتری‌های لاکتیکی در

برای استخراج ترکیبات فنولیک و فرایند تخمیر به منظور بهبود ویژگی‌های بیولوژیک آب تمشک سیاه تا کنون از امواج فراصوت استفاده نشده است. در این تحقیق از تاثیر امواج فراصوت در استخراج هر چه بیشتر ترکیبات موثر در عصاره و کاربرد دو باکتری لاکتیکی مهم و سازگار با محیط آب میوه (لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی) برای بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و تیروزیناز استفاده گردید. یادآوری می‌شود که این آنزیم‌ها اثرهای نامطلوب روی بدن و مواد غذایی دارند. تاثیر روش استخراج با امواج فراصوت در استخراج بیشتر ترکیبات فنولیک و فلاوونوئیدی و همچنین کاربرد فرایند تخمیر در افزایش این ترکیبات بررسی گردید. برای نخستین بار قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مختلف آب تمشک نیز از نظر روش استخراج و تخمیری یا غیر تخمیری بودن آنها در ماهی تیلاپیا بررسی شده است.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد

لاکتوباسیلوس گازری SM 05 و لاکتوباسیلوس کازئی واریته کازئی PTCC 1608 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شدند. حلال‌ها، رادیکال‌های آزاد، معرف‌ها و دیگر مواد شیمیایی از شرکت سیگما آلدریچ<sup>۵</sup> خریداری گردید و ماهی تیلاپیای تازه صید شده نیز از خلیج فارس تهیه گردید.

##### روش‌ها

تهیه آب تمشک سیاه به روش امواج فراصوت و تخمیر نمونه‌های تمشک سیاه (۲۵۰ گرم) به خوبی شسته و همگن شدند و آب آن‌ها با دستگاه آب میوه‌گیر به مانند پرس هیدرولیک استخراج شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها در یک بشر شیشه‌ای قرار داده شدند و با فرکانس ۳۵ کیلوهرتز به مدت ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه و توان ۲۲۵، ۲۴۵

<sup>6</sup> High temperature short time

<sup>7</sup> De man, rogosa and sharpe

<sup>8</sup> 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

<sup>5</sup> Sigma Aldrich

اکسیدانی بر حسب درصد در بی‌رنگ شدن بتاکاروتن با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$(\%) = [(An-Cn)/(CO-Cn)] \times 100$$

در این فرمول، An و Cn به ترتیب جذب نمونه و شاهد منفی پس از حرارت دادن و CO نیز مقدار جذب در نقطه شروع است.

#### تعیین میزان ترکیبات فنولیک

نمونه‌های ۰/۲ میلی‌لیتری (آب تمشک سیاه در طول تخمیر) با رقت مناسب با ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالتیو<sup>10</sup> ده برابر رقیق شده و ۱/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (w/v) مخلوط شدند. پس از نگهداری در دمای اتاق در تاریکی به مدت ۴۰ دقیقه، جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. مقدار فنول کل در برابر گالیک اسید استاندارد شد و به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در لیتر (میلی‌گرم گالیک اسید بر لیتر) بیان گردید (Li et al., 2021a).

#### تعیین میزان ترکیبات فلاونوئید

آب میوه در مراحل مختلف تخمیر به میزان یک میلی‌لیتر به بالن ژوژه منتقل و با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. در زمان صفر مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر نیتريت سدیم ۵ درصد (وزنی/حجمی) به بالن انتقال داده شد. بعد از ۵ دقیقه، ۰/۶ میلی‌لیتر از کلرور آهن ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) اضافه شد. در ششمین دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از سود ۱ مولار به مخلوط اضافه و به دنبال آن با ۲/۱ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جذب آن در طول موج ۵۱۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Karimkhani et al., 2019).

#### اندازه‌گیری آنتوسیانین‌ها

نمونه‌ها به طور جداگانه با مقدار مناسب بافر کلرید پتاسیم (pH = ۱) و بافر هیدروکلریک سدیم استات (۴/۵

ساعت‌های مختلف تخمیر و با یک میلی‌لیتر از این محلول مخلوط گردید و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت نیم ساعت در انکوباتور نگهداری شد. بلافاصله جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. درصد جذب رادیکال‌های آزاد طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$SC(\%) = \frac{A_0 - A_S}{A_0} \times 100$$

در این فرمول،  $A_0$  جذب کنترل (حاوی تمامی واکنشگرها به غیر از نمونه آزمایشی)،

$A_S$  جذب نمونه آزمایشی، و SC% بیانگر مقداری از عصاره است که می‌تواند درصدی از رادیکال آزاد را جذب کند.

#### روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن

مقداری از بتاکاروتن (۱۰ میلی‌گرم) در مقدار مشخصی از کلروفرم (۱۰ میلی‌لیتر) حل شد. از مخلوط حاصل به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر با اسید لینولئیک (۲۰ میلی‌گرم) و با توئین ۴۰<sup>۹</sup> (۲۰۰ میلی‌گرم) در دمای بالا مخلوط و پس از اختلاط به طور کامل، کلروفرم با تبخیر حذف گردید. برای اختلاط دمای بالا در نظر گرفته شد. با تبخیر کلروفرم، به باقیمانده حاصل ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آرامی افزوده شد. برای دستیابی به امولسیون پایدار، مخلوط با شدت زیاد هم زده شد و ۰/۲ میلی‌لیتر از آب تمشک سیاه در مراحل مختلف از تخمیر با پنج میلی‌لیتر از امولسیون تازه تهیه شده مخلوط و جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۷۰ نانومتر بلافاصله خوانده شد و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری آب گرم با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و دوباره جذب قرائت گردید و سپس به مدت پنج دقیقه در حمام آب ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و مجدد جذب قرائت شد. در شاهد منفی از آب به جای آب میوه استفاده شد (Cao et al., 2009). فعالیت آنتی-

<sup>10</sup> Folin-Ciocalteu

<sup>9</sup> Tween 40

(= مخلوط و به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. یک سوپسترا به نام ال-تیروزین (۱۱۰ میکرولیتر، ۲ میلی مولار در لیتر) به این مخلوط اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه مجدداً انکوبه شد. مقادیر جذب در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین و درصد مهار تیروزیناز به صورت زیر محاسبه شد:

$$\% \text{ بازداری} = (A \text{ control} - A \text{ sample} / A \text{ control}) \times 100$$

A control: جذب کنترل

A sample: جذب نمونه

#### تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی در نمونه ماهی تیلپیا

چهارصد گرم ماهی تیلپای خلیج فارس با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در شیشه‌های میسون مخلوط شد. تمام نمونه‌های آب میوه که با روش‌های مختلف به دست آمده بودند بلافاصله به این مخلوط اضافه شدند. بوتیل هیدروکسی آنیزول<sup>۱۱</sup> به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در حمام آب در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به آرامی هم‌زده شد و نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه پخته و خنک شدند و برای نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ روز به کیسه‌های پلاستیکی منتقل شدند. تست TBARS در فاصله‌های زمانی صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ روز اجرا شد. برای این آزمایش، ۱ گرم از نمونه ماهی با ۲/۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک مخلوط شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۲ دقیقه به شدت هم زده شد. پس از آن، ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف ۲-تیوباربیتوریک اسید (TBA<sup>۱۲</sup>، ۰/۰۲ مولار) به آن اضافه شد و مخلوط به دست آمده در ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ گردید و بعد از آن با کاغذ صافی شماره ۳ واتمن فیلتر شد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس در حمام آب پخته و تا رسیدن به دمای اتاق سرد شدند. یک منحنی استاندارد با استفاده از ۱،۰۳، ۳، ۱۰، ۳۰-تترامتوکسی پروپان، پیش ساز مالون دی

(pH = رقیق و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. جذب در اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر ثبت شد. میزان آنتوسیانین نیز با فرمول زیر محاسبه گردید (Chen *et al.*, 2019).

$$\text{مقدار آنتوسیانین کل} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\varepsilon \times l}$$

A = (A<sub>520 nm</sub> - A<sub>700 nm</sub>) pH 1.0 - (A<sub>520 nm</sub> - A<sub>700 nm</sub>) pH 4.5

MW (وزن مولکولی) = 449.2 g/mol for cyanidin-3-glucoside

DF = فاکتور رقت ایجاد شده

l = 1 cm

ε = 26,900

#### مهار آلفا آمیلاز

محلول α-آمیلاز با حل کردن ۰/۵ میلی‌لیتر α-آمیلاز در ۳/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین ۰/۰۲ مولار (pH ۶/۹) (= تهیه شد. یک میلی‌لیتر از نمونه‌های تمشک سیاه با محلول نشاسته (۳/۵ میلی‌لیتر، ۱ درصد)، محلول α-آمیلاز (۴ میلی‌لیتر)، اسید ۵،۳-دی نیتروسالیسیلیک و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. واکنش با کربنات سدیم (۲۰۰ میکرولیتر، ۰/۱ مولار) متوقف گردید و جذب در اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد (Ghauri *et al.*, 2021). فعالیت مهار آلفا آمیلاز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\% \text{ بازداری} = (A \text{ control} - A \text{ sample} / A \text{ control}) \times 100$$

A control: جذب کنترل

A sample: جذب نمونه

#### مهار تیروزیناز

فعالیت ضد تیروزیناز آب تمشک سیاه طی تخمیر بر اساس روش (Fawole *et al.*, 2012) تعیین شد. هر نمونه از آب میوه به حجم ۷۰ میکرولیتر با ۳۰ میکرولیتر تیروزیناز (۳۳۳) واحد در میلی‌لیتر در بافر فسفات pH ۶/۵

<sup>11</sup> Butylated hydroxyanisole

<sup>12</sup> Thiobarbituric acid

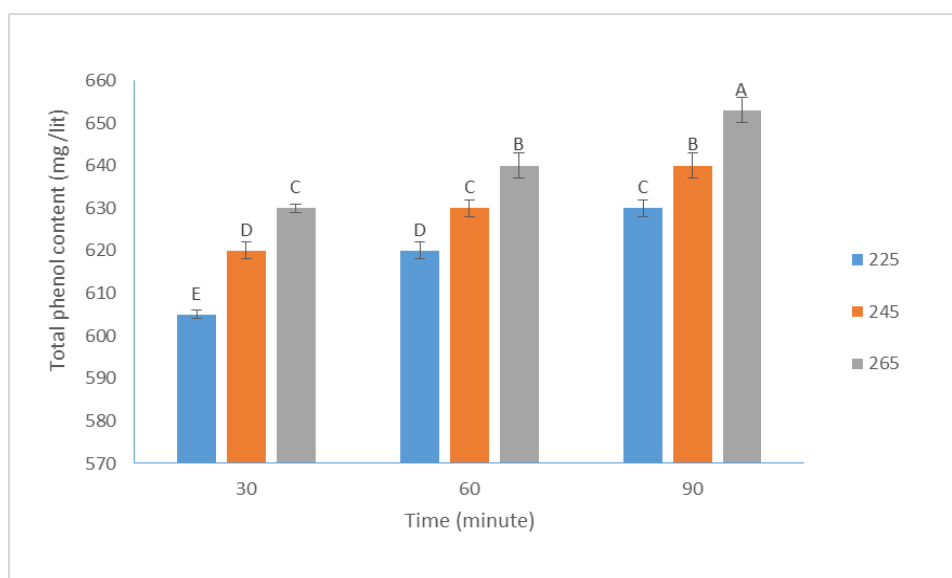
اختلاف معناداری (در سطح  $p < 0.05$ ) بین نمونه‌ها وجود دارد. نتایج در دماهای ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سلسیوس مشابه است ولی در دماهای ۵۵ و ۶۵ درجه سلسیوس کاهش میزان ترکیبات فنولیک را نشان می‌دهد و به دلیل اینکه بیشترین میزان ترکیبات فنولیک به عنوان هدف در نظر گرفته شده است، نتایج دماهای بالاتر گزارش نشده است. این نتیجه‌گیری با نتایج مطالعات گذشته همخوانی دارد. برای مثال در تحقیقی با استفاده از روش فراصوت روی پوست گردو، محققان به این نتیجه رسیدند که پیش تیمار فراصوت، راندمان استخراج ترکیبات فنولی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد، به طوری که این فرآیند استخراج ترکیبات فنولی از پوست سبز گردو را به میزان ۱/۲۲ میلی گرم اسید گالیک در گرم و خواص آنتی‌اکسیدانی مغز گردو را به میزان ۱۳/۵۱ درصد نسبت به آن افزایش داده است (Ziaolhagh and Zare., 2022).

آلدئید<sup>۱۳</sup> (MDA) ساخته شد. جذب ترکیب‌های افزایشی تیوباربیتوریک اسید-مالون دی‌آلدئید صورتی در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد و نتایج به عنوان معادل میلی‌گرم MDA به ازای هر کیلوگرم از نمونه‌ها ارائه گردید (Hossain *et al.*, 2023)

## نتایج و بحث

### تاثیر روش فراصوت در استخراج ترکیبات فنولیک

نتایج روش فراصوت در شکل ۱ نشان می‌دهد که با گذشت زمان و افزایش توان در فرکانس ثابت ۳۵ کیلو هرتز، میزان استخراج ترکیبات فنولیک افزایش می‌یابد و کمترین میزان ترکیبات فنولیک مربوط به توان ۲۲۵ وات و زمان ۳۰ دقیقه با مقدار ۶۰۷ میلی‌گرم بر لیتر و بیشترین میزان ترکیبات فنولیک مربوط به توان ۲۶۵ وات و زمان ۹۰ دقیقه با مقدار ۶۵۵ میلی‌گرم بر لیتر است و



شکل ۱ - تاثیر روش فراصوت بر استخراج ترکیبات فنولیک. حروف مختلف بزرگ اختلاف معنی‌دار آماری را نشان می‌دهند.

**Fig. 1- Effect of UAE in the extraction of phenolic compounds. Different capital letters show the significant difference ( $p < 0.05$ ).**

<sup>13</sup> Malondialdehyde

شدند. روز دوم تخمیر، فرآیند تخمیر به آرامی و پیوسته دنبال شد. اما در روز اول تخمیر، تولید باکتری نیز بسیار بیشتر بود تا در روز دوم تخمیر. برای لاکتوباسیلوس گازری مقدار آن به ۱۰ و برای لاکتوباسیلوس کازئی به  $8/8 \log \text{CFU/mL}$  در پایان ۴۸ ساعت تخمیر رسید. pH در ابتدای تخمیر برابر ۴ بود و طی تخمیر آب تمشک حاوی هر دو باکتری اسید لاکتیک، pH برای لاکتوباسیلوس گازری به ۳/۵ و برای لاکتوباسیلوس کازئی به ۳/۶ کاهش یافت. در زمینه تعیین سلول‌های زنده، به غیر از ساعت صفر و ساعت دوازده تخمیر، اختلاف معناداری (در سطح  $p < 0.05$ ) بین نمونه‌ها وجود داشت. در خصوص pH بین دو باکتری لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی فقط در ساعت‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ اختلاف معنادار وجود داشت. در مطالعات گذشته، تغییرات pH بر اثر تلقیح لاکتوباسیلوس کازئی در آب میوه گواوا<sup>۱۵</sup> (نوعی میوه گرمسیری بومی قاره آمریکا) و موز بررسی شده است و دلیل کاهش pH این گونه عنوان شد که اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک تولید شده توسط لاکتوباسیلوس‌ها طی تخمیر و در نتیجه متابولیسم از طریق مسیر گلیکولیتیک<sup>۱۶</sup> ایجاد می‌شوند. در این تحقیق نیز می‌توان گفت که در اثر فعالیت باکتری‌های لاکتیکی، اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک تولید می‌شود و اسیدیته را افزایش و pH را کاهش می‌دهند.

گزارش شده است که بازده استخراج فراصوت با افزایش توان یا فرکانس افزایش می‌یابد و پس از رسیدن به اوج کاهش خواهد یافت. در استخراج به روش فراصوت، مکانیسم عمل به این صورت است که امواج فراصوت از طریق نیروهای فیزیکی ایجاد شده در حین کاویتاسیون صوتی باعث اختلال در بافت گیاه یا میوه می‌شود و با افزایش انتقال جرم به آزاد شدن اجزای قابل استخراج در حلال در زمان بسیار کمتری کمک می‌کند (Kumar *et al.*, 2020). بر اساس یکی از تحقیقات اخیر، از روش فراصوت برای استخراج ترکیبات فنولیک بره بوم<sup>۱۴</sup> (ماده-ای رزین مانند که زنبور عسل آن را می‌سازد) استفاده و شرایط برای استخراج ترکیبات فنولیک و فلاونوئید بهینه گردید. تجزیه و تحلیل عکس الکترونی در این تحقیق نشان داد که تیمار فراصوت منجر به فرسایش در سطح بره موم و تجزیه ذرات آن می‌شود که مکانیسم‌های ممکن برای بهبود عملکرد استخراج است. نتایج بررسی‌ها نشان داد که استخراج خفیف با کمک فراصوت روشی امیدوارکننده برای استخراج بره موم با راندمان بالا و زمان استخراج کوتاه است (Peng *et al.*, 2023). بنابراین می‌توان این گونه تفسیر کرد که شرایط بهینه به کار گرفته شده برای استخراج ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در تحقیق حاضر از نظر توان و زمان و دما می‌تواند با فرسایش و تجزیه ترکیبات موجود در تمشک سیاه منجر به استخراج هر چه بیشتر ترکیبات فنولیک گردد و کاربرد دماهای بالاتر نیز می‌تواند منجر به آسیب‌دیدگی و تخریب ترکیبات فنولیک گردد.

#### اندازه گیری pH و تعیین سلول‌های زنده

شکل ۲ و ۳ روند رشد باکتری‌ها و تغییرات pH را در آب تمشک سیاه تخمیر شده نشان می‌دهند. ابتدا باکتری‌ها با  $5/5 \log \text{CFU/mL}$  در آب تمشک تلقیح

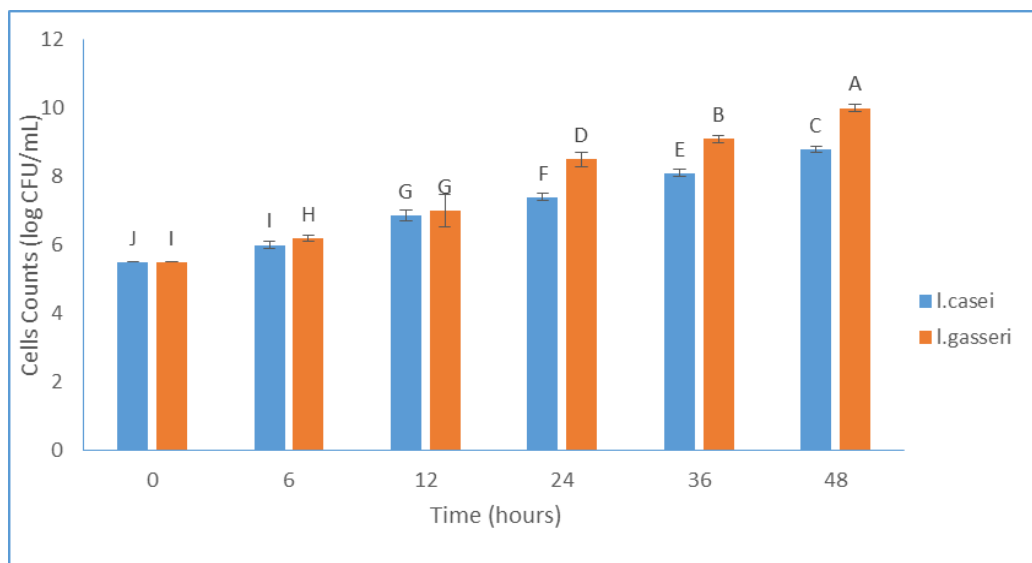
<sup>15</sup> Guava

<sup>16</sup> Embden-Meyerhof

<sup>14</sup> Propolis

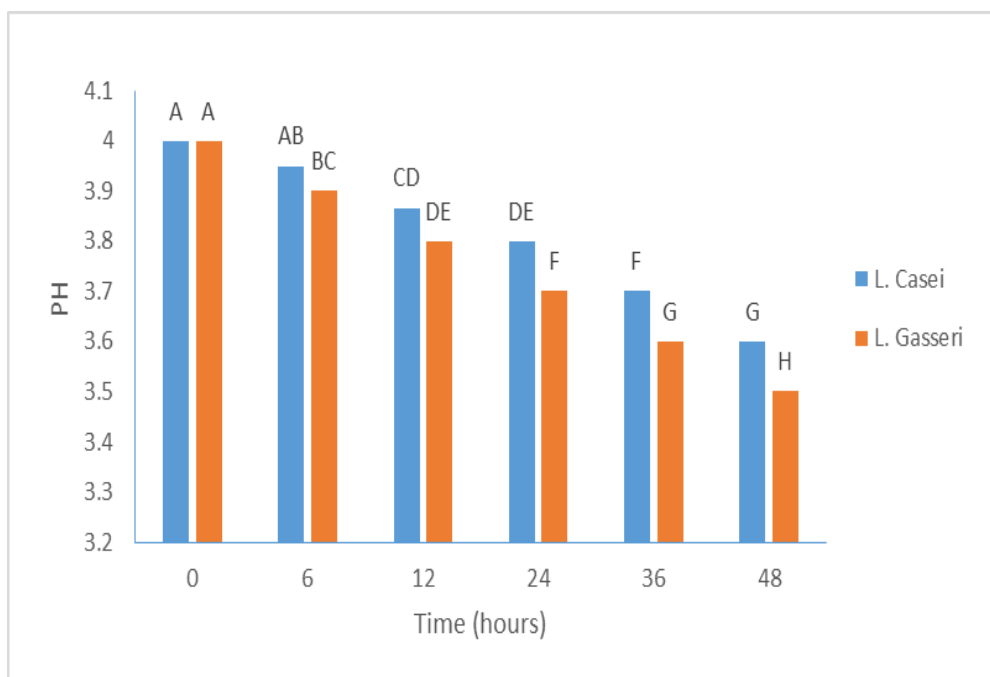


بررسی امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنولیک و تاثیر باکتری‌های لاکتیکی در بهبود خواص بیولوژیک ...



شکل ۲ - تغییرات در تعداد سلول‌های سویه‌های لاکتوباسیلوس در آب تمشک سیاه تخمیر شده. حروف مختلف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است.

Fig. 2- Changes in cell counts of *Lactobacillus* strains in fermented black raspberry juice. Different capital letters show the significant difference ( $p < 0.05$ ).



شکل ۳ - تغییرات pH آب تمشک سیاه طی تخمیر به مدت ۴۸ ساعت. حروف مختلف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است.  
 Fig. 3- Changes in pH of black raspberry juice during fermentation for 48 h. Different capital letters show the significant difference ( $p < 0.05$ ).

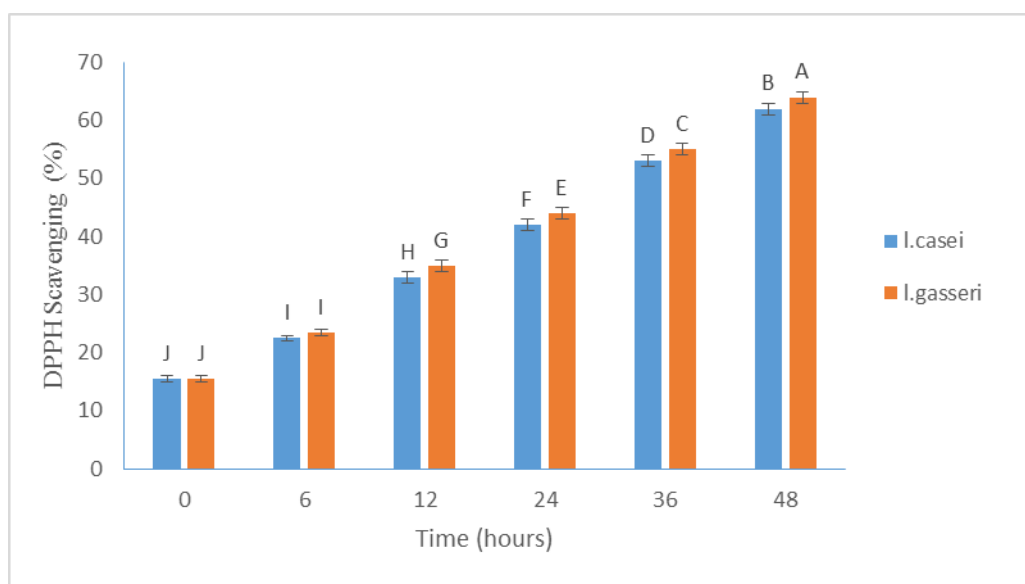
لی و همکاران (Li et al., 2021a) گزارش دادند که سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس فرمنتوم با  $7/5 \log$  CFU/mL در آب زغال اخته تلقیح شدند و در پایان ۴۸ ساعت تخمیر، تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک در همه

تخمیر، فعالیت کمی در برابر رادیکال‌های DPPH داشت. سرعت جذب رادیکال‌های آزاد توسط آب میوه در ۱۲ ساعت اول تخمیر افزایش یافت. برای لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی میزان جذب رادیکال‌های آزاد به ترتیب به ۳۵ و ۳۳ درصد رسید. بر اساس نتایج گزارش شده در شکل ۴، لاکتوباسیلوس گازری قدرت بیشتری نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی دارد و هر دو باکتری قدرت آنتی‌اکسیدانی آب میوه را در غلظت‌های پایین‌تر افزایش دادند.

زیرگونه‌ها بیش از ۳۵ درصد افزایش یافت و برخی از باکتری‌ها به بیش از ۱۰ log CFU/mL رسیدند. در این مطالعه افزایش بیش از ۸۱ درصد در جمعیت باکتری برای لاکتوباسیلوس گازری و ۶۰ درصد افزایش برای لاکتوباسیلوس کازئی مشاهده شده است.

#### روش DPPH

عوامل کاهنده مانند فنول‌ها می‌توانند الکترون‌ها یا هیدروژن را انتقال دهند و باعث تشکیل شکل‌های غیر رادیکالی و کاهش جذب DPPH در طول موج‌های خاص شوند (Nezafat et al., 2022). آب تمشک، در آغاز



شکل ۴ - حذف DPPH توسط آب تمشک سیاه در حال تخمیر تلقیح شده با سویه‌های لاکتوباسیلوس. حروف مختلف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است.

**Fig. 4- DPPH scavenging of black raspberry juice during fermentation by samples of *Lactobacillus* strains. Different capital letters show the significant difference ( $p < 0.05$ ).**

لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی اختلاف معناداری در سطح ( $p < 0.05$ ) بین نمونه‌ها وجود داشت. مکانیسم عمل این آزمایش این‌گونه است که DPPH می‌تواند یک الکترون یا رادیکال هیدروژن را بپذیرد تا به مولکول پایدار و دیامغناطیسی تبدیل شود، اما می‌توان آن را فقط به سختی و سپس به طور غیرقابل برگشت اکسید کرد. DPPH یک نوار جذب قوی را در ۵۱۷ نانومتر به

میزان حذف رادیکال DPPH در پایان ۴۸ ساعت تخمیر برای لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی به ترتیب ۶۴ و ۶۲ درصد بود و میزان حذف رادیکال‌های آزاد برای نمونه حاوی لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی ۴۸/۵ و ۴۶/۵ درصد نسبت به نمونه تخمیر نشده افزایش یافته بود. در خصوص این آزمایش، به غیر از ساعت صفر و ساعت شش تخمیر، بین

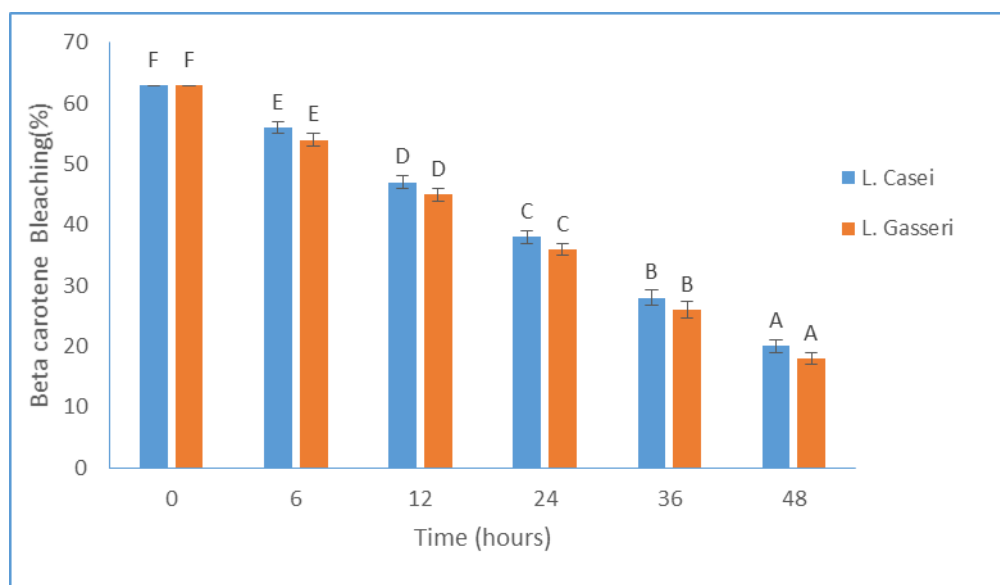
دست می‌دهد و رنگ آن از بین می‌رود. این تغییرات رنگی با اسپکتروفوتومتر قابل اندازه‌گیری است (Cao *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2014).

در این آزمون آنتی‌اکسیدانی نیز روند افزایش قدرت مشابه آزمون قبلی است و با افزایش زمان تخمیر برای هر دو باکتری لاکتیکی قدرت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت، اما تفاوت آن با روش قبلی این است که در این آزمون با افزایش زمان، درصد بی‌رنگ‌شدن بتا کاروتن کاهش می‌یابد ولی در آزمون قبلی با افزایش زمان، درصد جذب رادیکال آزاد افزایش می‌یافت. در این آزمون، پیش از آغاز تخمیر میزان بی‌رنگ‌شدن بتا کاروتن برای هر دو نمونه ۶۳ درصد بود ولی در پایان تخمیر این میزان برای لاکتوباسیلوس گازی به ۱۸ و برای لاکتوباسیلوس کازئی به ۲۰ درصد رسید. در این آزمایش، بین لاکتوباسیلوس گازی و لاکتوباسیلوس کازئی در تمام ساعات تخمیر اختلاف معناداری (در سطح  $p < 0.05$ ) وجود نداشت. بنابراین، می‌توان نتیجه به‌دست آمده را این‌گونه تفسیر کرد که در ساعت صفر یعنی در شروع فرایند تخمیر به دلیل فعالیت رادیکال‌های آزاد و واکنش آن با بتاکاروتن میزان بی‌رنگ‌شدن بتاکاروتن به میزان ۶۳ درصد بود و با افزایش فعالیت باکتری‌های لاکتیکی و تولید ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسید هیدروژن یا اسید لاکتیک و دیگر اسیدهای آلی و نیز افزایش ترکیبات فنولیک در اثر فعالیت تخمیری این میزان بی‌رنگ‌شدن بتاکاروتن با گذشت زمان و فعالیت هر چه بیشتر باکتری‌های لاکتیکی کاهش یافت. همانطور که در نمودار مشخص است، به دلیل تولید بیشتر ترکیبات موثر با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، لاکتوباسیلوس گازی نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی دارای قدرت تخمیر بیشتری است و در پایان عملیات تخمیر نیز میزان بی‌رنگ‌شدن بتاکاروتن بر اثر لاکتوباسیلوس گازی کمتر از میزان بی‌رنگ‌شدن بتاکاروتن بر اثر لاکتوباسیلوس کازئی است.

دلیل الکترون فرد نشان می‌دهد و محلول به رنگ بنفش پررنگ ظاهر می‌شود، با جفت شدن الکترون، جذب ناپدید می‌شود. رنگ‌زدایی حاصل با توجه به تعداد الکترون‌های گرفته شده است (Kedare *et al.*, 2011). ترکیبات فنولی با توجه به قابلیت آنها در جذب رادیکال‌های آزاد متفاوت هستند و این ترکیبات با انواع رادیکال‌های آزاد واکنش نشان می‌دهند و اکسید می‌شوند. مشخص شده است که مونوفنول‌ها نسبت به پلی‌فنول‌ها کارآمدتر هستند و تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و متوکسی در حلقه‌های فنولی پتانسیل مهار رادیکال را تعیین می‌کند (Kedare *et al.*, 2015). بنابراین، با فعالیت باکتری‌های لاکتیکی در آب تمشک سیاه، ترکیبات پلی‌فنولی تبدیل به ترکیبات فنولیک ساده و کارآمدتر می‌شوند و همین موضوع باعث افزایش ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق با نتایج تحقیقات لی و همکاران (Li *et al.*, 2021b) مطابقت دارد. در تحقیقات این محققان گفته شده است آب سیب با باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم به مدت ۱۶ ساعت تلقیح و میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی به روش DPPH اندازه‌گیری شد. در پایان تخمیر، مقدار جذب رادیکال‌های آزاد به ۷۷/۴۵ درصد رسید که نسبت به زمان شروع تخمیر (۳۶/۰۸ درصد) بیشتر شده بود.

#### اندازه‌گیری قدرت بی‌رنگ‌شدن بتاکاروتن

روش سفیدکردن یا بی‌رنگ کردن بتاکاروتن بر اساس از بین رفتن رنگ زرد بتاکاروتن به دلیل واکنش آن با رادیکال‌هایی است که در اثر اکسیداسیون اسید لینولئیک در امولسیون ایجاد می‌شود. سرعت بی‌رنگ شدن بتاکاروتن را می‌توان در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش داد. در این آزمایش، اسید لینولئیک موجود اکسید می‌شود و رادیکال آزاد تولید می‌کند. در این شرایط، بتاکاروتن اکسید و شکسته می‌شود و در نتیجه کروموفور خود را از



شکل ۵ - بی‌رنگ شدن بتاکاروتن توسط آب تمشک سیاه در حال تخمیر تلقیح شده با سویه‌های لاکتوباسیلوس. حروف مختلف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است.

**Fig. 5- Beta carotene bleaching of black raspberry juice during fermentation by samples of *Lactobacillus* strains. Different capital letters show the significant difference ( $p < 0.05$ ).**

که تخمیر می‌تواند ترکیباتی مانند کامفرول و کوئرستین و سایر ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی را افزایش دهد (Zhao *et al.*, 2004). در مطالعه‌ای دیگر به تأثیر زمان تخمیر بر افزایش ترکیبات فنولی در دانه بامیه اشاره شد که پس از ۲۴ ساعت تخمیر به بالاترین حد (۱۴۶۰ میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم) رسید، در حالی که در ابتدای تخمیر در کمترین حد خود (۱۸۵ میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم) بود (Adetuyi *et al.*, 2014). در تحقیق حاضر ترکیبات فنولیک به غیر از ساعت صفر در تخمیر، در تمام ساعات تخمیر اختلاف معناداری (در سطح  $p < 0.05$ ) بین لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی وجود داشت و در آزمایش فلاوونوئید بین لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی در تمام ساعات تخمیر اختلاف معناداری (در سطح  $p < 0.05$ ) وجود نداشت. در خصوص افزایش ترکیبات فلاوونوئید نیز محققان از نظر بلوغ فرایند تخمیر به وسیله لاکتوباسیلوس پلانتاروم طی ۳۶ ساعت

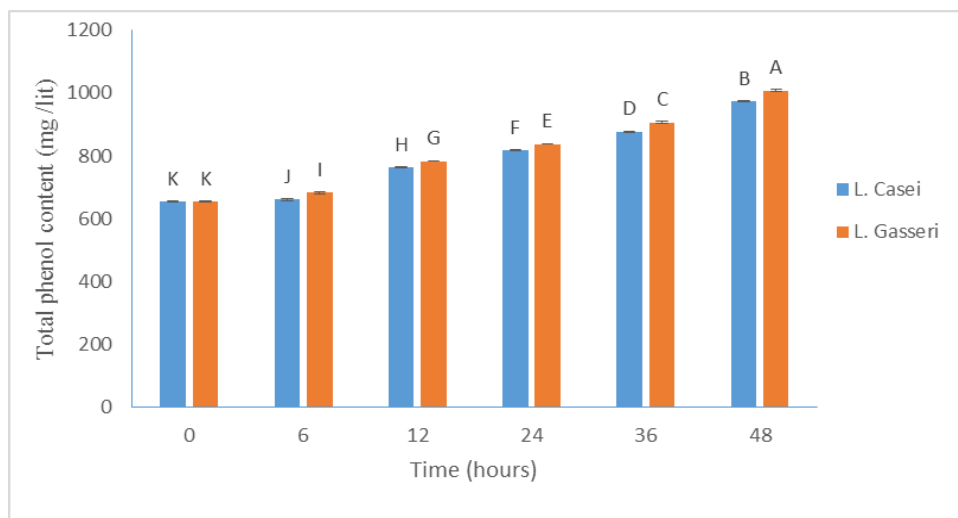
#### اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک و فلاوونوئید در حال تخمیر

در آب تمشک سیاه، مقدار کل فنول و فلاوونوئید ۶۵۵ میلی‌گرم در لیتر و ۱۵ میلی‌گرم کاتچین/لیتر بود (شکل - های ۶ و ۷) و هر دو باکتری اسید لاکتیک توانستند به طور قابل توجهی مقدار فنول و فلاوونوئید کل را افزایش دهند. برای مثال، مقدار ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی به ترتیب ۸۳۸ و ۱۰۰۸/۳۳ میلی‌گرم در لیتر و ۳۸/۵ و ۵۴/۵ میلی‌گرم در لیتر پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تخمیر برای لاکتوباسیلوس گازری به دست آمد. همان طور که در نمودار مشخص است، لاکتوباسیلوس گازری قوی‌تر از لاکتوباسیلوس کازئی بوده است. برای لاکتوباسیلوس کازئی مقدار ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی در پایان ۴۸ ساعت تخمیر به ۹۷۳/۶۶ میلی‌گرم در لیتر و ۵۳.۵ میلی‌گرم کاتچین در لیتر رسید. این نتایج با نتایج تحقیقات پیشین همخوانی دارد. بررسی‌های پیشین نشان داده‌اند

بررسی امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنولیک و تاثیر باکتری‌های لاکتیکی در بهبود خواص بیولوژیک ...

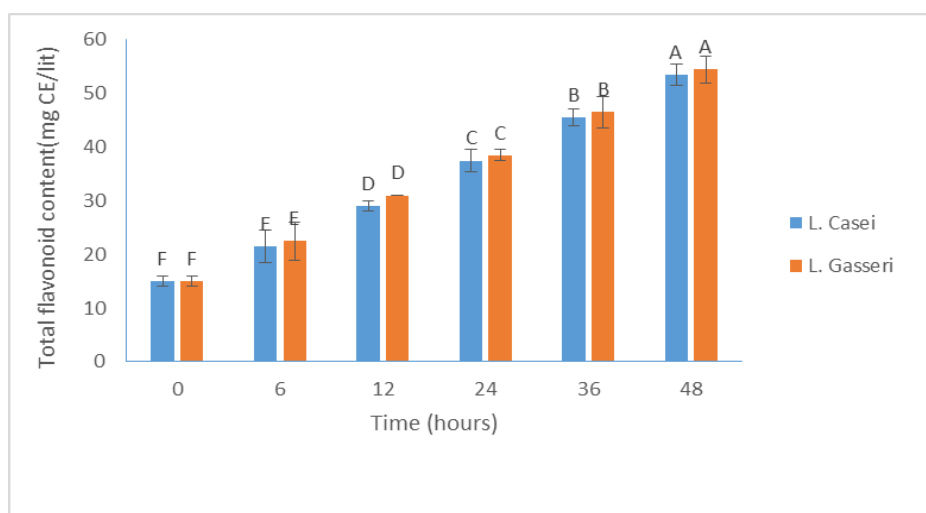
های هیدرولیک می‌توانند فیتوکمیکال‌های پیچیده را به آنزیم‌های ساده‌تر تجزیه کنند و همین موضوع باعث افزایش ترکیبات فنولیک و فلاونوئید کل می‌شود (Wang *et al.*, 2022)

گزارش کردند که در اثر تخمیر هر ۵ نوع توت افزایش ترکیبات فلاونوئیدی به میزان ۰/۱۲ تا ۰/۳۲ وجود دارد و افزایش ترکیبات فلاونوئیدی را این‌گونه توجیه کردند که لاکتوباسیلوس‌ها دارای توانایی و قابلیت بالا هستند که باعث تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌شوند و این آنزیم-



شکل ۶ - مقدار فنولیک کل آب تمشک سیاه طی تخمیر توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس. حروف مختلف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است.

**Fig. 6- Total phenolic content of black raspberry juice during fermentation *Lactobacillus* strains. Different capital letters show the significant difference ( $p < 0.05$ ).**



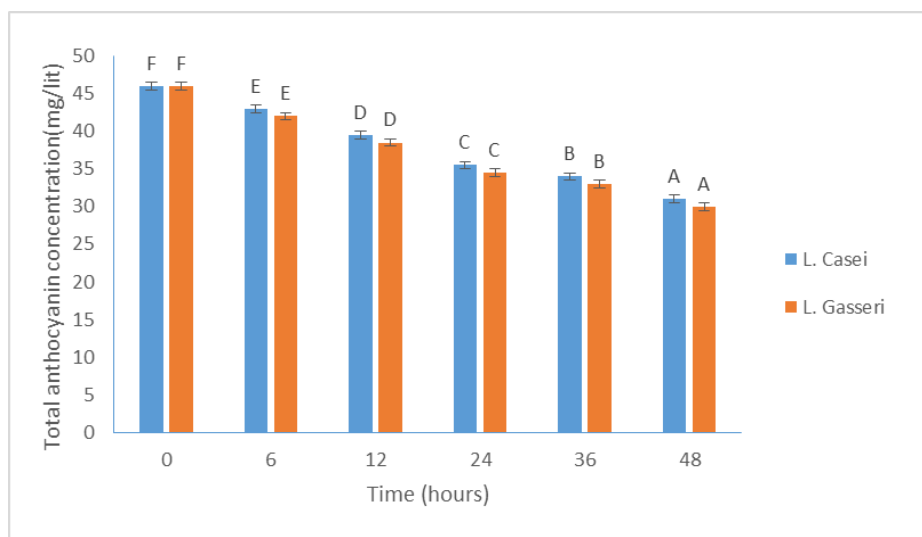
شکل ۷ - مقدار فلاونوئید کل آب تمشک سیاه طی تخمیر توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس. حروف مختلف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است.

**Fig. 7- Total flavonoid content of black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus* strains. Different capital letters show the significant difference.**

### تغییرات آنتوسیانین‌ها طی تخمیر

تغییرات آنتوسیانین‌ها طی مدت تخمیر کاملاً برعکس تغییرات فنولیک و فلاوونوئید در آب تمشک سیاه در حال تخمیر بود. همانطور که در شکل ۸ نمایش داده شده است، در آغاز تخمیر میزان آنتوسیانین ۴۶ میلی‌گرم در لیتر بود و با شروع فرایند تخمیر توسط باکتری‌های لاکتیکی میزان آنتوسیانین‌ها کاهش یافت. با توجه به اینکه قدرت تخمیر لاکتوباسیلوس گازری بیشتر از قدرت تخمیر لاکتوباسیلوس کازئی بود، میزان آنتوسیانین‌ها کاهش بیشتری نشان داد، به طوری که در پایان ۴۸ ساعت تخمیر این نمونه حاوی لاکتوباسیلوس گازری به

۳۰ و در نمونه حاوی لاکتوباسیلوس کازئی به ۳۱ میلی‌گرم بر لیتر رسید. نتایج این تحقیق با نتایج مطالعات گذشته همخوانی دارد. چن و همکاران (Chen *et al.*, 2022) گزارش داده‌اند که تلقیح آب توت فرنگی با باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتروم میزان آنتوسیانین‌ها را در پایان تخمیر به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. در تحقیق حاضر، تغییرات آنتوسیانین‌ها بین لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی در تمام ساعات تخمیر اختلاف معناداری (در سطح  $p < 0.05$ ) نشان نداده است.



شکل ۸ - مقدار آنتوسیانین کل آب تمشک سیاه طی تخمیر توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس. حروف مختلف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است.

**Fig. 8- Total anthocyanin content of black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus* strains. Different capital letters show the significant difference ( $p < 0.05$ ).**

(Kazeem *et al.*, 2013). مهارکننده‌های آمیلاز از جذب نشاسته از مواد غذایی در بدن جلوگیری می‌کنند و به همین دلیل به آن مسدودکننده نشاسته می‌گویند. نشاسته کربوهیدراتی با ساختار پیچیده است، به راحتی جذب بدن نمی‌شود مگر اینکه بر اثر آمیلاز یا سایر آنزیم‌های مرتبط تجزیه شود (Oboh *et al.*, 2012).

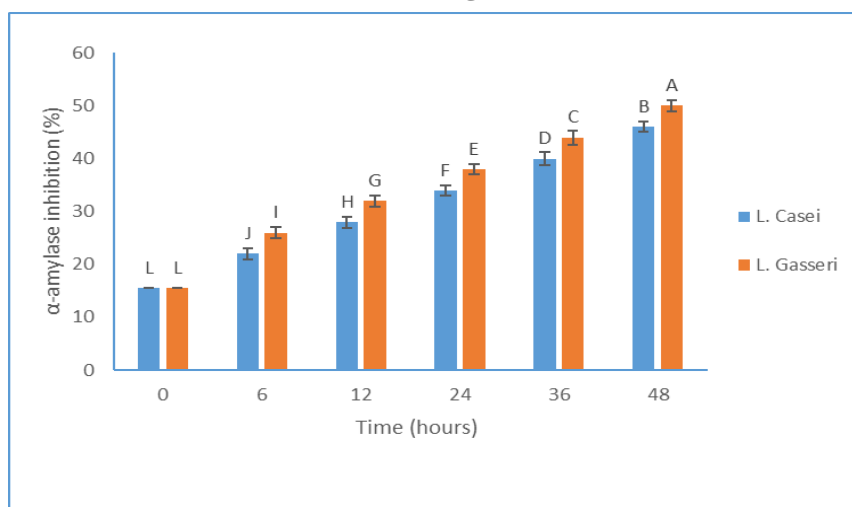
### مهار آنزیم آلفا آمیلاز

ترکیبات مهارکننده آنزیم آلفا آمیلاز از افزایش گلوکز خون هم جلوگیری می‌کنند و حتی بعد از خوردن غذا آن را کاهش می‌دهند. در واقع، آنها این کار را با کاهش سرعت تجزیه کربوهیدرات‌ها در روده کوچک و کاهش هایپر گلاسمیا<sup>۱۷</sup> پس از غذا به‌انجام می‌رسانند

<sup>17</sup> hyperglycemia

و مشخص شد که از دسته فلاونولها، میریستین ۶۴ درصد و کوئرستین ۵۰ درصد و کامفرول ۱۸ درصد و سیانیدینها از دسته آنتوسیانینها آلفا آمیلاز را بیش از ۵۰ درصد مهار می‌کنند (Tadera et al., 2006). بنابراین، با توجه به اینکه در بخش فلاونوئیدها ذکر شده است که با افزایش فعالیت‌های باکتری‌های لاکتیکی میزان فلاونوئیدها افزایش می‌یابد و با توجه به اینکه فلاونوئیدها مسئول مهار آنزیم آلفا آمیلاز هستند می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش فعالیت باکتری‌های تخمیر و سیری شدن ساعات تخمیر میزان فلاونوئیدها افزایش می‌یابد و به دنبال آن مهار آنزیم آلفا آمیلاز نیز افزایش می‌یابد و فلاونوئیدها در مهار آنزیم آلفا آمیلاز بسیار موثر هستند.

همانطور که در شکل ۹ در ابتدای تخمیر مشاهده می‌شود، میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز ۱۵/۵ درصد بوده است و با شروع فرآیند تخمیر توسط دو باکتری لاکتیک، مهار به میزان بیشتری افزایش یافته است. در پایان ۴۸ ساعت تخمیر، میزان مهار برای باکتری لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی به ترتیب به ۴۹ و ۴۶/۵ درصد رسید که نشان‌دهنده این است که قدرت تخمیر بالاتر لاکتوباسیلوس گازری قدرت مهار بالاتری در مقایسه با نمونه آب تمشک حاوی لاکتوباسیلوس کازئی دارد و در آزمایش مهار آنزیم آلفا آمیلاز به غیر از ساعت صفر در تخمیر، در تمام ساعات تخمیر اختلاف معناداری (در سطح  $p < 0.05$ ) بین لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی وجود دارد. در مطالعه‌ای دیگر، فعالیت مهاری آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز شش گروه از فلاونوئیدها بررسی



شکل ۹- مهار آلفا آمیلاز توسط نمونه‌های آب تمشک سیاه در حال تخمیر توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس. حروف مختلف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است.

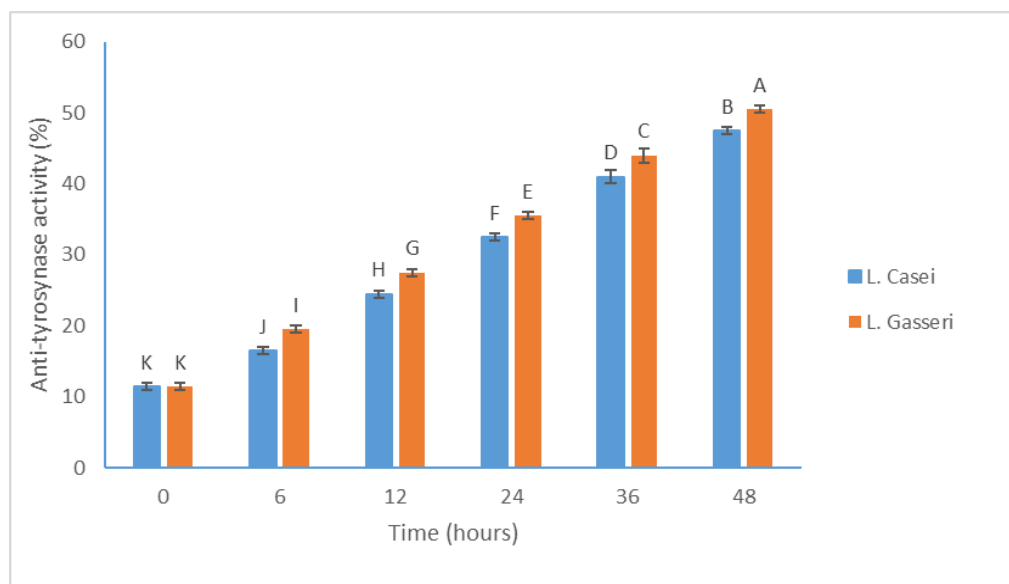
**Fig. 9-  $\alpha$ -Amylase inhibition by black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus* strains. Different capital letters show the significant difference ( $p < 0.05$ ).**

### مه‌ار تیروزیناز

شکل ۱۰ نشان داده شده است. اطلاعاتی در مورد فعالیت ضد تیروزیناز تمشک موجود است. برای مثال، یائو و همکاران (Yao *et al.*, 2020) گزارش دادند که بین ترکیبات فنولی این میوه و فعالیت ضد تیروزیناز در میوه تمشک رابطه وجود دارد. از آنجا که تفاله تمشک حاوی ترکیبات فنولی قابل توجهی است، می‌تواند تیروزیناز را مه‌ار کند. در این تحقیق، همان‌طور که گفته شد، با افزایش فعالیت باکتری‌های لاکتیک مقدار ترکیبات فنولی افزایش یافته است که می‌تواند از فعالیت این آنزیم جلوگیری کند. در آزمایش مه‌ار آنزیم تیروزیناز به غیر از ساعت صفر در تخمیر، در زمان‌های دیگر تخمیر اختلاف معناداری ( $p < 0.05$ ) بین لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی وجود دارد.

مه‌ارکننده‌های آنزیم تیروزیناز برای درمان بیماری پارکینسون مفید هستند (Abirami *et al.*, 2014). علاوه بر این، کینون‌های DOPA<sup>18</sup> یا ۱-۳-۴-دی‌هیدروکسی فنیل‌آلانین باعث مرگ سلولی و آسیب در داخل سلول می‌شوند و متأسفانه تیروزیناز در تولید این ترکیب بسیار واکنش‌پذیر نقش دارد (Thitimuta *et al.*, 2017).

در این مطالعه، خاصیت بازدارندگی آب تمشک سیاه در حال تخمیر بر علیه تیروزیناز بررسی شد. در ابتدای تخمیر، میزان مه‌ار این آنزیم برای همه نمونه‌ها ۱۱/۵ درصد گزارش شد. فعالیت تخمیر توسط باکتری‌های اسید لاکتیک با گذشت زمان افزایش یافت. میزان بازداری در پایان ۴۸ ساعت نسبت به شروع به ۳۶ و ۳۹ درصد به ترتیب برای لاکتوباسیلوس گازری و لاکتوباسیلوس کازئی افزایش یافت. روند مه‌ار آنزیم تیروزیناز با گذشت زمان در



شکل ۱۰ - مه‌ار تیروزیناز توسط نمونه‌های آب تمشک سیاه در حال تخمیر توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس. حروف مختلف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است.

**Fig. 10- Tyrosinase inhibition by black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus* strains. Different capital letters show the significant difference ( $p < 0.05$ )**

<sup>18</sup> Dihydroxyphenylalanine



### تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی در نمونه ماهی تیلاپیا

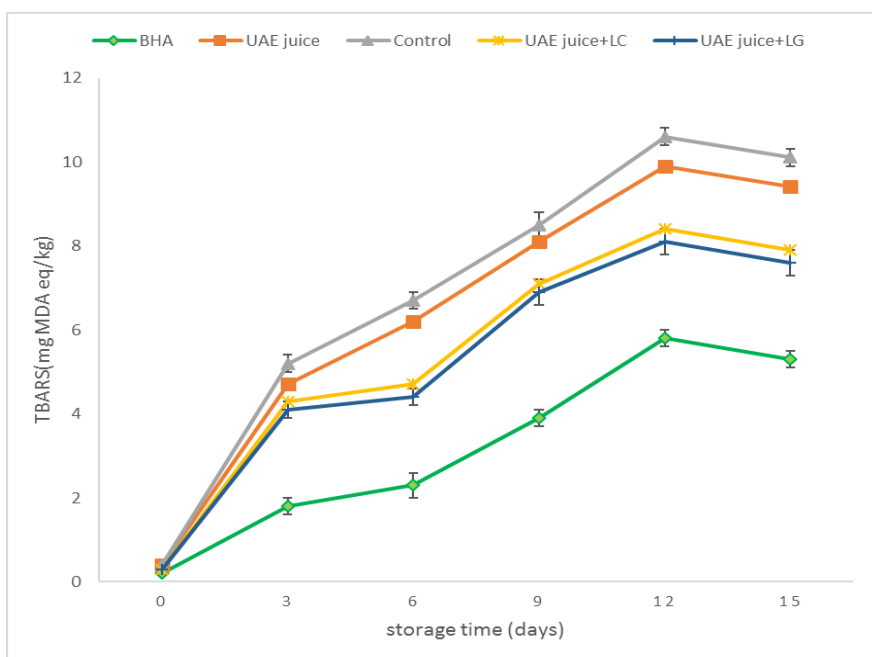
از آنجا که ماهی غنی از اسیدهای چرب چندگانه غیر اشباع است، در معرض اکسیداسیون قرار دارد. این اسیدهای چرب به دلیل پیوندهای دوگانه بیشتری که دارند بیشتر در معرض خطر اکسیداسیون هستند. علاوه بر این، پیشرفت اکسیداسیون لیپید در ماهیچه ماهی منجر به کاهش قابلیت استخراج پروتئین‌های هم در بافت ماهیچه می‌شود (Hematyar et al., 2019).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های آب تمشک استخراج‌شده با فراصوت یا نمونه‌های فراصوت شده که با باکتری‌های لاکتیکی تخمیر شده بودند در مدل ماهی به مدت ۱۵ روز بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱۱ مشاهده می‌شود، نمونه‌های آب تمشک سیاه با بوتیل هیدروکسی آنیزول روند افزایشی *TBARS* را طی ۱۵ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس نشان دادند. در بین تمامی نمونه‌ها، بوتیل هیدروکسی آنیزول و نمونه آب تمشک استخراج‌شده با فراصوت شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازری و نمونه آب تمشک فراصوت شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازری و نمونه آب تمشک فراصوت شده به ترتیب قوی‌ترین تا ضعیف‌ترین نمونه‌ها بودند. نتیجه مطالعات گذشته نشان می‌دهد مقادیر *TBARS* کمتر از ۸ کیفیت مناسب و کمتر از ۵ کیفیت خوب و کمتر از ۳ کیفیت عالی را برای ماهی دارد. طبق نتایج به‌دست آمده در روز سوم، تمامی نمونه‌ها دارای کیفیت خوب بودند و در روز ششم نمونه کنترل با مقدار ۶/۷ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید اکی‌والان در هر کیلوگرم<sup>۱۹</sup>، نمونه آب تمشک فراصوت شده با مقدار ۶/۲ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید اکی‌والان در هر کیلوگرم دارای کیفیت مناسب و نمونه آب تمشک فراصوت شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازری با مقدار ۴/۷ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید اکی‌والان در هر کیلوگرم و نمونه آب تمشک

فراصوت شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازری با مقدار ۴/۴ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید اکی‌والان در هر کیلوگرم دارای کیفیت خوب و نمونه بوتیل هیدروکسی آنیزول با مقدار ۲/۳ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید اکی‌والان در هر کیلوگرم دارای کیفیت عالی بودند. در روز نهم، نمونه آب تمشک فراصوت شده با ۸/۱ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید اکی‌والان در هر کیلوگرم از نظر کیفی مقدار مناسبی نداشت ولی نمونه‌هایی که همزمان تحت فرایند فراصوت و تخمیر قرار گرفته بودند نمونه آب تمشک فراصوت شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازری و نمونه آب تمشک فراصوت شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازری به ترتیب با مقادیر ۶/۹ و ۷/۱ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید اکی‌والان در هر کیلوگرم دارای کیفیتی مناسب بودند و بوتیل هیدروکسی آنیزول با مقدار ۳/۹ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید اکی‌والان در هر کیلوگرم دارای کیفیت عالی بود. می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد همزمان فراصوت و تخمیر می‌تواند کیفیت ماهی تیلاپیا را از لحاظ اکسیداسیون به مدت سه روز بیشتر حفظ کند. در روز دوازدهم و پانزدهم نیز هیچ یک از نمونه‌ها به غیر از نمونه ماهی حاوی بوتیل هیدروکسی آنیزول قابل مصرف نبود. بیشترین مقدار *TBARS* مربوط به نمونه کنترل در روز دوازدهم با مقدار ۱۰/۶ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید اکی‌والان در هر کیلوگرم بود. در روز پانزدهم نیز مقدار *TBARS* کمی کاهش یافت. کاهش مقادیر *TBARS* ممکن است به دلیل واکنش محصولات اکسیداسیون ثانویه با دیگر ترکیبات (برای مثال، آمین‌ها) یا اکسیداسیون بیشتر آنها باشد، در نتیجه باعث کاهش مقادیر *TBARS* می‌شود. علاوه بر این، حمله میکروبی با زمان ذخیره‌سازی افزایش می‌یابد که باعث کاهش میزان بسترهایی می‌شود که می‌توانند با معرف تیوباربتوریک اسید واکنش دهند. در نتیجه، مقادیر *TBARS* پس از دوره‌های خاصی با تشکیل کمپلکس رنگی کمتر با معرف تیوباربتوریک اسید شروع به کاهش

<sup>19</sup> mg MDA eq/kg

می‌کند (Hossain *et al.*, 2023). به غیر از نمونه آب تمشک فراصوت شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازی و نمونه آب تمشک فراصوت شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازی که با یکدیگر اختلاف معناداری نداشتند، کلیه نمونه‌ها با هم در سطح ۵ درصد (p < 0.05) اختلاف معنادار داشتند.



شکل ۱۱ - تاثیر نمونه‌های مختلف آب تمشک و بوتیل هیدروکسی آنیزول بر TBARS در سیستم مدل ماهی

Fig. 11- Effect of different samples of raspberry juice and BHA on TBARS in a fish model system

UAE: نمونه آب تمشک فراصوت شده

UAE juice+LG: نمونه آب تمشک فراصوت شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازی

UAE juice+LC: نمونه آب تمشک فراصوت شده و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس گازی

Control: نمونه ماهی بدون آب تمشک

BHA: بوتیل هیدروکسی آنیزول

## نتیجه‌گیری

نمونه‌های آب تمشک به دلیل داشتن ترکیبات و اسیدهای فنولیک، خاصیت بیولوژیک دارند و از این رو می‌توان با روش استخراج مناسب، مانند روش امواج فراصوت با فرکانس و توان و دمای مناسب، ترکیبات فنولیک را از این میوه استخراج کرد. با استفاده از باکتری‌های لاکتیکی و فرایند تخمیر می‌توان ترکیبات فنولیک را از حالت کمپلکس به حالت قابل جذب تبدیل کرد و به واسطه تخمیر و افزایش تولید ترکیبات فنولیک ساده مانند اسیدهای فنولیک، خواص بیولوژیک مانند ترکیبات فنولیک و فلاوونوئید تام را بهبود داد که در اثر تخمیر کاهش pH در نمونه آب میوه کاملاً مشهود است و هرچه این فعالیت تخمیری بیشتر باشد میزان کاهش pH نیز بیشتر است. بر خلاف افزایش میزان ترکیبات فنولیک و

فلاوونوئید، میزان آنتوسیانین‌ها در اثر فعالیت تخمیری دچار کاهش می‌شوند که این کاهش در مقدار کل و تبدیل آنها به دیگر ترکیبات ساده‌تر به همراه ترکیبات فنولیک باعث افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی می‌شوند. انتخاب نوع باکتری سازگار با نوشیدنی و زنده ماندن باکتری در محیط آب میوه یکی از پارامترهای مهم است و با افزایش فعالیت بیشتر در محیط آب میوه می‌تواند باعث بهبود خواص بیولوژیک آب تمشک سیاه شود. افزایش میزان ترکیبات فلاوونوئیدی نسبت مستقیمی با مهار آنزیم آلفا آمیلاز دارد. و ترکیبات مهارکننده آنزیم آلفا آمیلاز از افزایش گلوکز خون جلوگیری می‌کنند و حتی بعد از خوردن غذا آن را کاهش می‌دهند. بنابراین، مهار آنزیم آلفا آمیلاز نوعی مهار دیابت محسوب می‌شود و افزایش میزان ترکیبات فنولیک نیز نسبت مستقیمی با مهار آنزیم تیروزیناز دارد. در زمینه تاثیر این نوشیدنی تخمیری در محیط غذایی و به خصوص ماهی که به روش فراصوت استخراج شده است می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد همزمان امواج فراصوت و تخمیر می‌تواند کیفیت ماهی تیلاپیا را از لحاظ اکسیداسیون به مدت سه روز بیشتر نسبت به نمونه کنترل و یا روش فراصوت بدون فرایند تخمیر حفظ کند. نمونه‌های آب تمشک استخراج شده تحت امواج فراصوت و تخمیر شده با باکتری‌های لاکتیکی به دلیل اینکه دارای مقادیر بالایی از ترکیبات فنولیک و فلاوونوئید هستند، می‌توانند نسبت به بقیه نمونه‌ها (به غیر از بوتیل هیدروکسی آنیزول) از اکسیداسیون ماهی جلوگیری کنند. ماهی، نسبت به دیگر مواد غذایی، به دلیل اینکه اسیدهای چرب غیر اشباع بیشتری دارد، معیار خوبی برای سنجش قدرت اکسیداسیون نمونه‌های آب تمشک سیاه است. استفاده همزمان روش فراصوت و تخمیر روی آب تمشک سیاه می‌تواند این محصول را به عنوان یک افزودنی با خواص بالا برای سایر محصولات مانند محصولات لبنی تبدیل کند.

## قدردانی

از جناب آقای دکتر محمد حسین حداد خداپرست و دکتر داوود سالار باشی که در این تحقیق همکاری کرده‌اند قدردانی می‌شود. این تحقیق در قالب پایان‌نامه دکتری با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شده است.

## منابع

- Abirami, A., Nagarani, G., & Siddhuraju, P. (2014). In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from Citrus hystrix and C. maxima fruits. *Food Science and Human Wellness*, 3(1), 16-25. doi:https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.02.001.
- Adetuyi, F., & Ibrahim, T. (2014). Effect of Fermentation Time on the Phenolic, Flavonoid and Vitamin C Contents and Antioxidant Activities of Okra (*Abelmoschus esculentus*) Seeds. *Nigerian Food Journal*, 32, 128-137. doi:10.1016/S0189-7241(15)30128-4.
- Bensalem, J., Dal-pan, A., Gillard, E., Calon, F., & Pallet, V. (2015). Protective effects of berry polyphenols against age-related cognitive impairment. *journal of nutrition, health & aging, Preprint*, pp. 1-18. doi:10.3233/NUA-150051.
- Bucher, A., & White, N. (2016). Vitamin C in the Prevention and Treatment of the Common Cold. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 10(3), 181-183. doi:10.1177/1559827616629092.
- Cade, W. T. (2008). Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Physical Therapy*, 88(11), 1322-1335. doi:10.2522/ptj.20080008.
- Cao, L., Si, J. Y., Liu, Y., Sun, H., Jin, W., Li, Z., Zhao, X-H., & Pan, R. L. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food Chemistry*, 115(3), 801-805. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.064.

- Chen, W., Xie, C., He, Q., Sun, J., & Bai, W. (2023). Improvement in color expression and antioxidant activity of strawberry juice fermented with lactic acid bacteria: A phenolic-based research. *Food Chemistry: X*, 17, 100535. doi:https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100535.
- Dalu, K., Nurhayati, N., & Jayus, J. (2019). In Vitro Modulation of Fecal Microflora Growth Using Fermented "Pisang Mas" Banana and Red Guava Juices. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 7, 449-456. doi:10.12944/CRNFSJ.7.2.14.
- Estévez, M., Li, Z., Soladoye, O. P., & Van-Hecke, T. (2017). Health Risks of Food Oxidation. *Advances in food and nutrition research*, 82, 45-81. https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.12.005.
- Fawole, O., Makunga, N., & Opara, U. (2012). Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 200. doi:10.1186/1472-6882-12-200.
- García-Burgos, M., Moreno-Fernandez, J., Alférez, M., Díaz-Castro, J., & López-Aliaga, I. (2020). New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. *Journal of Functional Foods*, 72(2) 104059. doi:10.1016/j.jff.2020.104059.
- Ghauri, S., Raza, S. Q., Imran, M., Saeed, S., Rashid, M., & Naseer, R. (2021). Assessment of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potential of Citrus reticulata peel extracts in hyperglycemic/hypoglycemic rats. *3 Biotech*, 11(4), 167. doi:10.1007/s13205-021-02717-8.
- Hematyar, N., Rustad, T., Sampels, S., & Dalsgaard, T. (2019). Relationship between lipid and protein oxidation in fish. A Review. *Aquaculture Research*, 50(5), 1393-1403. doi:10.1111/are.14012.
- Hossain, A., Senadheera, T., Dave, D., & Shahidi, F. (2023). Phenolic profiles of Atlantic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) tentacles and their biological properties. *Food Research International*, 163(2) 112262. doi:10.1016/j.foodres.2022.112262.
- Kallscheuer, N., Menezes, R., Foito, A., da Silva, MH., Braga A, Dekker, W., Sevillano, DM., Rosado-Ramos, R., Jardim, C., Oliveira, J., Ferreira, P., Rocha, I., Silva, AR., Sousa, M., Allwood, JW., Bott, M., Faria, N., Stewart, D., Ottens, M., Naesby, M., Nunes Dos Santos, C., & Marienhagen, J. (2019). Identification and microbial production of the raspberry phenol salidroside that is active against huntington's disease. *Plant Physiology*, 179(3), 969-985. doi: 10.1104/pp.18.01074.
- Karimkhani, M. M., Shaddel, R., Khodaparast, M., Vazirian, M., & Piri-Gheshlaghi, S. (2016). Antioxidant and antibacterial activity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) extract from four different cultivars. *Quality assurance and safety of crops & foods*, 8(4) 1-10. doi:10.3920/QAS2015.0676.
- Karimkhani, M. M., Salarbashi, D., Sanjari Sefidy, S., & Mohammadzadeh, A. (2019). Effect of extraction solvents on lipid peroxidation, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of *Berberis orthobotrys* Bienerat ex C.K. Schneider. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(1), 357-367. doi:10.1007/s11694-018-9951-9.
- Kasalkheh, R., Jorjani, E., Sabouri, H., Habibi, M., & Sattarian, A. (2018). Micro-morphology of *Rubus* L. Sub-genus *Rubus* L. in north of Iran. *Applied Biology*, 31(3), 115-125. doi:10.22051/jab.2017.10161.1067.
- Kazeem, M., Adamson, J., & Ogunwande, I. (2013). Modes of inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by aqueous extract of morinda lucida benth leaf. *BioMed research international*, 3, 527570. doi:10.1155/2013/527570.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1.
- Kompanje, E. J., Jansen, T. C., Van der Hoven, B., & Bakker, J. (2007). The first demonstration of lactic acid in human blood in shock by Johann Joseph Scherer (1814-1869) in January 1843. *Intensive Care Medicine*, 33(11), 1967-1971. doi:10.1007/s00134-007-0788-7.

- Kostecka-Gugala, A., Ledwożyw-Smoleń, I., Augustynowicz, J., Wyzgolik, G., Kruczek, M., & Kaszycki, P. (2015). Antioxidant properties of fruits of raspberry and blackberry grown in central Europe. *Open Chemistry*, *13*(1), 1313-1325. doi:10.1515/chem-2015-0143.
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *70*, 105325. doi:https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325.
- Lai, H. H., Chiu, C. H., Kong, M. S., Chang, C. J., & Chen, C. C. (2019). Probiotic *Lactobacillus casei*: Effective for managing childhood diarrhea by altering gut microbiota and attenuating fecal inflammatory markers. *Nutrients*, *11*(5), 1150. doi:10.3390/nu11051150.
- Li, S., Tao, Y., Li, D., Wen, G., Zhou, J., Manickam, S., Han, Y., & Chai, W. S. (2021a). Fermentation of blueberry juices using autochthonous lactic acid bacteria isolated from fruit environment: Fermentation characteristics and evolution of phenolic profiles. *Chemosphere*, *276*, 130090. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130090.
- Li, H., Huang, J., Wang, Y., Wang, X., Ren, Y., Yue, T., Wang, Z., Gao, Z. (2021b). Study on the nutritional characteristics and antioxidant activity of dealcoholized sequentially fermented apple juice with *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* fermentation. *Food Chemistry*, *363*, 130351. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130351.
- Lu, Y., Khoo, T.-J., & Wiart, C. (2014). Phytochemical analysis and antioxidant activity determination on crude extracts of *Melodinus eugeniifolus* barks and leaves from Malaysia. *Pharmacology & Pharmacy*, *05*(08), 773-780. doi:10.4236/pp.2014.58087.
- Mani, S. (2016). Types and importance of berries - A review. *American Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, *1*, 46. doi:
- Mahboubi, M. (2019). *Lactobacillus gasseri* as a functional food and its role in obesity. *International Journal of Medical Reviews*, *6*(2) 59-64. doi:10.29252/IJMR-060206.
- Mathew, S., Abraham, T. E., & Zakaria, Z. A. (2015). Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(9), 5790-5798. doi:10.1007/s13197-014-1704-0.
- Medina-Torres, N., Ayora, T., Andrews, H., Sanchez, A., & Pacheco López, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, *7*(3), 47. doi:10.3390/agronomy7030047.
- Mei, Z., & Li, D. (2022). The role of probiotics in vaginal health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 963868. doi:10.3389/fcimb.2022.963868.
- Nezafat, Z., Karimkhani, M. M., Nasrollahzadeh, M., Javanshir, S., Jamshidi, A., Orooji, Y., Jang, H., & Shokouhimehr, M. (2022). Facile synthesis of Cu NPs@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lignosulfonate: Study of catalytic and antibacterial/antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, *168*, 113310. doi:https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113310.
- Nguyen, Chi & Nguyen, Ha. (2018). Ultrasonic effects on the quality of mulberry juice. *Beverages*, *4*(3), 56. doi:10.3390/beverages4030056.
- Nishida, K., Sawada, D., Kuwano, Y., Tanaka, H., & Rokutan, K. (2019). Health benefits of *Lactobacillus gasseri* CP2305 tablets in young adults exposed to chronic stress: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrients*, *11*(8), 1859. doi:10.3390/nu11081859
- Oboh, G., Akinyemi, A. J., & Ademiluyi, A. O. (2012). Inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities by ethanolic extract of *Telfairia occidentalis* (fluted pumpkin) leaf. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*(9), 733-738. doi:10.1016/S2221-1691(12)60219-6.

- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., & Yu, L. (2005). Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3), 566-573. doi:10.1021/jf048615t.
- Peng, S., Zhu, M., Li, S., Ma, X., & Hu, F. (2023). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from Chinese propolis. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7. doi:10.3389/fsufs.2023.1131959.
- Pimentel, T. C., Brandão, L. R., de Oliveira, M. P., da Costa, W. K. A., & Magnani, M. (2021). Health benefits and technological effects of *Lactocaseibacillus casei*-01: An overview of the scientific literature. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 722-737. doi:10.1016/j.tifs.2021.06.030.
- Ponder, A., & Hallmann, E. (2020). The nutritional value and vitamin C content of different raspberry cultivars from organic and conventional production. *Journal of Food Composition and Analysis*, 87, 103429. doi:10.1016/j.jfca.2020.103429.
- Schütz, Katrin & Carle, Reinhold & Schieber, Andreas. (2006). Taraxacum—A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of ethnopharmacology*. 107. 313-23.. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.021>
- Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S., & Kulshrestha, S. (2020). Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. *Fermentation*, 6. doi:10.3390/fermentation6040106.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, 52(2), 149-153. doi:10.3177/jnsv.52.149.
- Thitimuta, S., Pithayanukul, P., Nithitanakool, S., Bavovada, R., Leanpolchareanchai, J., & Saparpakorn, P. (2017). *Camellia sinensis* L. extract and its potential beneficial effects in antioxidant, anti-inflammatory, anti-hepatotoxic, and anti-tyrosinase activities. *Molecules*, 22(3), 401. doi:10.3390/molecules22030401.
- Tsuda, T. (2016). Recent progress in anti-obesity and anti-diabetes effect of berries. *Antioxidants (Basel)*, 5. doi:10.3390/antiox5020013.
- Wang, K., Qi, J., Jin, Y., Li, F., Wang, J., & Xu, H. (2022). Influence of fruit maturity and lactic fermentation on physicochemical properties, phenolics, volatiles, and sensory of mulberry juice. *Food Bioscience*, 48, 101782. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101782.
- Xu, H., Li, X.-F., Xin, X., Mo, L., Zou, Y., Zhao, G., Yu., & Chen, K. (2021). Antityrosinase mechanism and antimelanogenic effect of arbutin esters synthesis catalyzed by whole-cell biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69. doi:10.1021/acs.jafc.0c07379.
- Yang, F., Wang, Y.-p., & Zhao, H. (2019). Quality enhancement of fermented vegetable juice by probiotic through fermented yam juice using *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Science and Technology*, 40(6). doi:10.1590/fst.29918.
- Yao, J., Chen, J., Yang, J., Hao, Y., Fan, Y., Wang, C., & Li, N. (2020). Free, soluble-bound and insoluble-bound phenolics and their bioactivity in raspberry pomace. *LWT*, 135(49), 109995. doi:10.1016/j.lwt.2020.109995.
- Zhang, W. Q., Quan, K. Y., Feng, C. J., Zhang, T., He, Q. W., Kwok, L. Y., & Chen, Y. F. (2022). The *Lactobacillus gasseri* G098 strain mitigates symptoms of DSS-induced inflammatory bowel disease in mice. *Nutrients*, 14(18). doi:10.3390/nu14183745.
- Zhao, Y. S., Eweys, A. S., Zhang, J. Y., Zhu, Y., Bai, J., Darwesh, O. M., Zhang, HB., & Xiao, X. (2021). Fermentation affects the antioxidant activity of plant-based food material through the release and production of bioactive components. *Antioxidants (Basel)*, 10(12). doi:10.3390/antiox10122004.

بررسی امواج فراصوت در استخراج ترکیبات فنولیک و تاثیر باکتری‌های لاکتیکی در بهبود خواص بیولوژیک ...

Ziaolhagh, S., & Zare, S. (2022). Effect of ultrasound on the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity of different parts of walnut fruit. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 18(3), 85-98. doi:10.22067/ifstrj.2021.72602.1114.

Original Research

## Investigating the effect of ultrasound process in the extraction of phenolic compounds and effect of lactic acid bacteria in the improvement of biological properties of black raspberry juice and prevention of tilapia fish oxidation

M. M. Karimkhani, A. Jamshidi\*, M. Nasrollahzadeh, M. Armin,  
T. Zeinalid, S.M. Jafarie

\* **Corresponding Author:** Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

**Email:** [ajamshid@um.ac.ir](mailto:ajamshid@um.ac.ir)

**Received:** 11 June 2023 **Accepted:** 19 September 2023

**http://doi:** [10.22092/FOODER.2023.362564.1367](https://doi.org/10.22092/FOODER.2023.362564.1367)

### Abstract

The purpose of this study is to investigate the effects of the ultrasound extraction method on phenolic compounds and improve the properties of black raspberry juice (*Rubus dolichocarpus*) by adding *Lactobacillus gasei* and *L. casei* bacteria. First, raspberry juice was extracted by ultrasonic method with constant frequency at 225, 245, 265 and 285 watts and different times of 30, 60, and 90 minutes at temperatures of 25, 35, 45, 55, and 65 degrees Celsius. The highest amount of phenolic compounds was obtained at the power of 285 watts and time of 90 minutes at temperatures of 25, 35, and 45 degrees Celsius. Then, the bacteria were inoculated in ultrasonicated black raspberry juice, and the amount of change in phenolic and flavonoid compounds, anthocyanins, and antioxidant power and inhibition of alpha-amylase enzyme and tyrosinase formation at different hours of fermentation was determined and observed that with increasing fermentation hours, the biological power of fruit juice and inhibition of alpha-amylase and tyrosinase enzymes increased. The amount of phenolic and flavonoid compounds also increased with increasing fermentation time, but the amount of anthocyanins decreased and the biological properties of fermented fruit juice were improved by more than 40%. The ultrasounded fruit juice samples' antioxidant power and the fermentation process in tilapia fish were also investigated for 15 days. According to the obtained results, among the raspberry juice samples, the fruit juice sample extracted with ultrasound and fermented with *Lactobacillus gasei* was the strongest sample in reducing the amount of TBARS.

**Keywords:** Black raspberry juice, Lactic acid bacteria, Antioxidant, Inhibition of alpha-amylase, Tyrosinase inhibition