١٤٦٤٨٢

بررسی تاثیر یون های فلزی در کمپلکس رقابتی آنتوسیانین با اسیدهای آلی و کوپیگمانت‌ها روی پایداری آنتوسیانین در میوه توت فرنگی (*Fragaria ananassa*)

چنور محمدی

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

۱۳۸۹

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد

۱۳۸۹/۹/ ۸۰

اساتید راهنما:

پروفسوررضا حیدری

دکتر رشید جامعی

« حق طبع و نشر هر گونه مطالب ای‌ن پای‌ان نامه در انحصار دانشگاه اروم‌یه می باشد»

۱۴۶۴۸۲

پایان نامه : خانم منیژه محمدی به تاریخ : ۱۱/۰۶/۱۳۹۹ شماره : ۲-۱۰۴۴ دوره پذیرش هیات محترم داوران جلسه ۴۰۰ و نمره ۱۹ قرار گرفت.

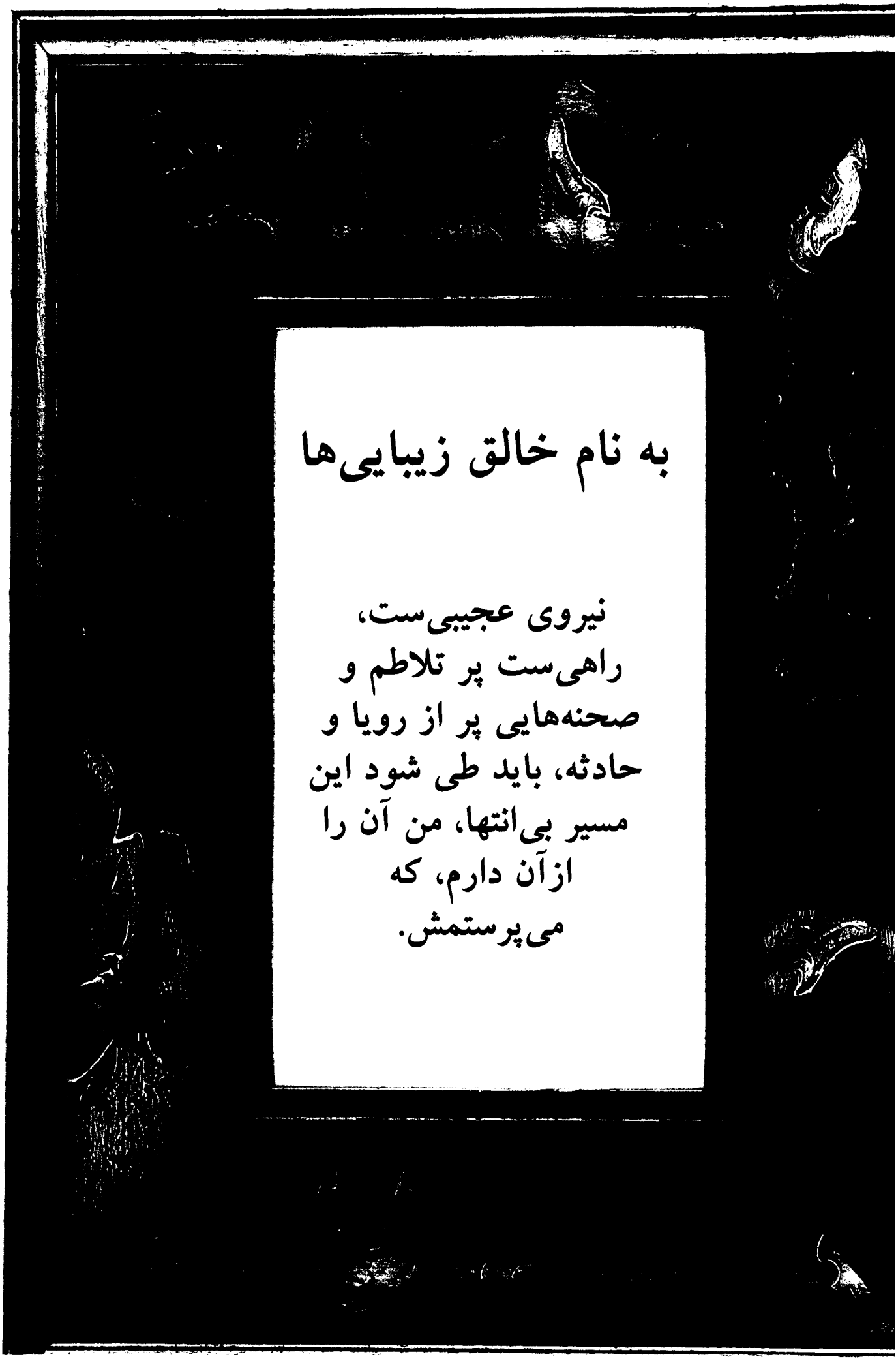
۱- استاد راهنما و رئیس هیئت داوران : دکتر رضا دیواری - دکتر رشید حاجی

۲- استاد مشاور :

۳- داور خارجی : دکتر سیاوش حسینی

۴- داور داخلی : دکتر مسعود رضایی

۵- نماینده تحصیلات تکمیلی : دکتر حبیب اذان پیلر



به نام خالق زیبایی‌ها

نیروی عجیبی‌ست،
راهی‌ست پر تلاطم و
صحنه‌هایی پر از رویا و
حادثه، باید طی شود این
مسیر بی‌انتها، من آن را
ازآن دارم، که
می‌پرستمش.

به نام خداوندی که نعمت بزرگ پدر و مادر را
بر سرفرزندانش ارزانی داشت

این مجموعه را تقدیم می کنم :

به پدرم، او که اسوه صبر وتلاش است
به مادرم، که مهرش تا ابد در دلم جای دارد
به برادرانم، خواهرم، همسرش و مارتیای عزیز که
همواره یار و یاورم بودند
تقدیم به آنان که در این راه مشوقم بودند
تقدیم به آنان که دعای خیرشان بدرقه ی راهم بود

تقدیر وتشکر

حمد و سپاس؛ خداوند مهربانی را که در زیر سایه رحمت بی‌انتهایش ره پیموده‌ایم و علم ودانش را نعمتی قرار داده تا انسان در پرتو آن به شناخت حقیقت پرداخته و گامی در جهت تکامل و سعادت بردارد. خداوند منان را سپاسگزارم که در این مسیر به اینجانب توفیق موفقیت در این مرحله از زندگی را ارزانی داشت .

در ابتدا از زحمات بی‌دریغ و دلسوزانه پدر و مادرم که همواره پشتوانه واقعی من بودند صمیمانه سپاسگزارم و دست این بزرگواران را می‌بوسم.

از اساتید بزرگوارم جناب آقای دکتر حیدری و دکتر جامعی که در این رساله مرا راهنمایی نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم. از جناب آقای دکتر حسینی و و جناب آقای دکتر خیامی که ارزشیابی این پایان نامه را با نهایت دقت انجام دادند تشکر می کنم.

از دوستان عزیزم؛ هتاو احمدی، مینا بقایی، تروسکه پنهانی، شب‌بوخانی، سنور سلامی، مهری علیزاده، سهیلا مروتی و کلیه دوستان وعزیزانی که در این دوره تحصیلی یاریگر اینجانب بودند، تشکر می‌کنم و برای همه روزهای خوش همراه با کامیابی را آرزومندم.

فهرست مطالب، شکل ها و نمودار ها

عنوان **صفحه**

صفحه

فهرست مطالب

چکیده فارسی ۱

فصل .۱. کلیات

۱. مقدمه ۲

۲. آنتوسیانین ها ٤

۲,۱. ساختار آنتوسیانین ها ٥

۲,۲. مهمترین فاکتور هایی که روی پایداری آنتوسیانین ها موثرند ۹

۲,۲,۱. غلظت آنتوسیانین ها ۱۰

۲,۲,۲. ساختار آنتوسیانین ها ۱۰

۲,۲,۳. pH ۱۲

۲,۲,٤. حرارت ۱٤

۲,۲,٥. کمپلکس های فلزی ۱٥

۲,۲,٦. کوپیگمنتاسیون ۱٦

۲,۲,٦,۱. کوپیگمنتاسیون درون ملکولی ۱۸

۲,۲,٦,۲. کوپیگمنتاسیون بین ملکولی ۱۹

۲,۲,٦,۳. تاثیر ساختار و غلظت روی کوپیگمنتاسیون ۲۰

۲,۲,٦,٤. تاثیر pH روی کوپیگمنتاسیون ۲۱

۲,۲,٦,٥. تاثیر حرارت روی کوپیگمنتاسیون ۲۱

۲,۳. بیو سنتز آنتوسیانین ها ۲۲

۲,٤. اهمیت آنتوسیانین ها ۲٦

۲,٤,۱. نقش ضد اکسایندگی وخواص دارویی آنتوسیانین ها ۲٦

۲,٤,۲. نقش آنتوسیانین ها در تابش اشعه ماوراء بنفش ۲۹

۳. توت فرنگی ۳۲

۳,۱. مشخصات گیاه شناسی و ارقام موجود توت فرنگی ۳۲

۳,۲. خواص دارویی تـوت فرنگی ۳۳

۳,۳. آنتوسیانین های اصلی توت فرنگی ۳٥

فصل. ۲. مواد و روشها

۱. جمع آوری نمونه ها ۳٦

۲. مراحل استخراج آنتوسیانین ۳٦

۳. تهیه بافر ها ۳۷

٤. تعیین غلظت آنتوسیانین ۳۹

٥.قرار دادن آنتوسیانین ها در تیمار های مختلف ٤۰

٥,۱. تیمار با غلظت های مختلف آهن($FeCl_2$) ٤۰

٥,۲. تیمار با آهن ومس ٤۰

٥,۳. تیمار با سه نوع اسید مختلف ٤۰

٥,٤. تیمار با سه نوع اسید مختلف همراه با یون آهن ($FeCl_2$) ٤۱

۵,۵. تیمار با یون آهن ($FeCl_2$) و اسید کافئیک با دو نسبت مختلف (۱:۱ و ۰/۵:۱) ٤١

۵,٦ تیمار با یون های آهن($FeCl_2$ و $FeCl_3$)و اسید کافئیک ٤١

۵,۷. تیمار با اسید آسکوربیک و یون کلسیم ٤٢

٦. اندازه گیری ها ٤٣

٦,١. آنا لیز HPLC تیمارها ٤٣

٦,٢. اندازه گیری اندیکس تخریب آنتوسیانین ٤٤

٦,٣. اندازه گیری شدت رنگ آنتوسیانین ٤٤

٦,٤. طرح شماتیک مراحل انجام آزمایشات ٤٥

فصل. ۳. نتایج

۱. مقدار آنتوسیانین های منومری ٤٩

۲. بررسی نتایج حاصل از تیمار آنتوسیانین با غلظت های مختلف آهن($FeCl_2$) ٥٠

۳. بررسی نتایج حاصل از تیمار آنتوسیانین با یون های آهن و مس ٥١

٤. بررسی نتایج حاصل از تیمار آنتوسیانین با سه نوع اسید مختلف ٥٢

٥. بررسی نتایج حاصل از تیمار آنتوسیانین با سه نوع اسید مختلف همراه با یون آهن ($FeCl_2$) ٥٣

٦. بررسی نتایج حاصل از تیمار آنتوسیانین با یون آهن ($FeCl_2$) و اسید کافئیک با دو نسبت مختلف ٥٤
(۱:۱)و(۰/۵:۱)

۷. بررسی نتایج حاصل از تیمار آنتوسیانین با یون های آهن($FeCl_2$, $FeCl_3$) و اسید کافئیک ٥٥

۸ . بررسی نتایج حاصل از تیمار آنتوسیانین با اسید آسکوربیک به تنهایی و همراه با یون کلسیم ٥٧

۸.۱ .بررسی نتایج حاصل از آنالیز HPLC ٥٧

۸.۲ .بررسی نتایج حاصل از اندیکس تخریب آنتوسیانین ٥٩

فصل. ٤. بحث

١. تیمار آنتوسیانین با غلظت های مختلف آهن ٦٠

٢. تیمار آنتوسیانین با یون های آهن و مس ٦٣

٣. تیمار آنتوسیانین با سه نوع اسید مختلف ٦٤

٤. تیمار آنتوسیانین با سه نوع اسید مختلف همراه با یون آهن ($FeCl_2$) ٦٦

٥. تیمار آنتوسیانین با یون های آهن($FeCl_2$, $FeCl_3$) و اسید کافئیک ٦٧

٦. تیمار آنتوسیانین با اسید آسکوربیک به تنهایی و همراه با یون کلسیم ٦٨

پیوست ها ٧١

منابع ٨٠

چکیده انگلیسی ٩٣

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱: ساختار گروه های اصلی فلاوونوئید ها ۵

شکل ۲-۱: شش گروه اصلی فلاوونوئید ها ٦

شکل ۳-۱: کاتیون فلاویلیوم ٦

شکل ٤-۱: مهمترین آنتوسیانیدین های طبیعی ۷

شکل ۵-۱: رایج ترین ساکارید های یافت شده در آنتوسیانین ها ۸

شکل ٦-۱: ساختار یک آنتوسیانین آسیله شده ۹

شکل ۷-۱: ساختار سیانیدین در محلول آبی تحت تاثیر pH های مختلف ۱۲

شکل ۸-۱: تخریب سیانیدین در محلول قلیایی قوی ۱۳

شکل ۹-۱: تخریب آنتوسیانین مونو گلوکوزید در pH=۳/۷ تحت تاثیر حرارت ۱۵

شکل ۱۰-۱: بر هم کنش آنتوسیانین ها ۱۷

شکل۱۱-۱: کوپیگمنتاسیون درون ملکولی ۱۸

شکل۱۲-۱: دو حالت از کوپیگمنتاسیون بین ملکولی ۲۰

شکل ۱۳-۱: بیوسنتز آنتوسیانین ها ۲٤

شکل۱٤-۱: ژن عامل بیوسنتز آنتوسیانین ها ۲۵

شکل۱۵-۱: مواد مغذی در توت فرنگی ۳٤

شکل ۱٦-۱: آنتوسیانین های اصلی توت فرنگی ۳۵

شکل۱-۲: دستگاه سانتریفوژ ٤٦

شکل ۲-۲: دستگاه pH متر ٤٦

شکل ۳-۲: دستگاه اسپکتروفتومتر ٤۷

شکل٤-۲: دستگاه HPLC ٤۸

شکل۵-۲: عصاره توت فرنگی ..... ٤۹.

شکل۱-۳ : کروماتوگرام هایHPLC ۵۷

شکل ۱-٤: تشکیل کمپلکس بین آهن و فلاوونوئید ها (کورسیتین) ٦۱

شکل ۲-٤: جایگاه های کمپلکس شدن کورستین با آلومینیوم ٦۲

شکل ۳-٤: نمونه ای از پایداری آنتوسیانین ها از طریق تشکیل کمپلکس و انتقال بار الکتریکی ٦۵

شکل٤-٤: مسیر واکنش های تخریب اسید آسکوربیک ٦۹

شکل ۵-٤: کمپلکس آنتوسیانین-یون فلزی-کوپیگمانت ۷۰

فهرست نمودارها

نمودار۱-۳ : اثر غلظت های مختلف آهن برمیزان آنتوسیانین ها ۵۰

نمودار ۲-۳ : اثر آهن و مس بر میزان آنتوسیانین ها ۵۱

نمودار۳-۳ : اثر سه نوع اسید مختلف بر میزان آنتوسیانین ها ۵۲

نمودار٤-۳ : اثر سه نوع اسید مختلف همراه با یون آهن، بر میزان آنتوسیانین ها ۵۳

نمودار ۵-۳ : اثر آهن و اسید کافئیک با دو نسبت مختلف بر میزان آنتوسیانین ها ۵٤

نمودار٦-۳: اثر یون های آهن و اسید کافئیک بر میزان آنتوسیانین ها ۵۵

نمودار ۷-۳ : شدت رنگ درعصاره های تیمار شده با اسید کافئیک و یون های آهن ۵٦

نمودار ۸-۳ : غلظت فورفورال در تیمار های اسید آسکوربیک، اسید آسکوربیک- کلسیم ۵۸

نمودار ۹-۳ : اندیکس تخریب آنتوسیانین در تیمار های اسید آسکوربیک، اسید آسکوربیک- کلسیم ۵۹

فهرست جدول ها

جدول ۱. تجزیه واریانس آزمایش اثر غلظت های مختلف آهن ۷۱

جدول ۲. مقایسه میانگین انواع تیمار ها ۷۱

جدول۳. مقایسه میانگین زمان ها ۷۱

جدول ٤. تجزیه واریانس آزمایش اثر یون های آهن و مس ۷۲

جدول ٥. مقایسه میانگین انواع تیمار ها ۷۲

جدول٦. مقایسه میانگین زمان ها ۷۲

جدول ۷. تجزیه واریانس آزمایش اثر یون آهن ($FeCl_2$) و اسید کافئیک با دو نسبت مختلف ۷۳

(۱:۱) و(۱: ۰/٥)

جدول ۸. مقایسه میانگین انواع تیمار ها ۷۳

جدول۹. تجزیه واریانس آزمایش اثر یون های آهن ($FeCl_2$, $FeCl_3$) و اسید کافئیک (محاسبه A_{520})..... ۷٤

جدول ۱۰. مقایسه میانگین انواع تیمار ها ۷٤

جدول ۱۱. مقایسه میانگین زمان ها ۷٤

جدول ۱۲. تجزیه واریانس آزمایش اثر یون های آهن($FeCl_2$, $FeCl_3$) و اسید کافئیک (محاسبه شدت رنگ) ۷٥

جدول ۱۳. مقایسه میانگین انواع تیمار ها ۷٥

جدول ۱٤. تجزیه واریانس آزمایش اثر سه نوع اسید مختلف (اسید کافئیک، اسید سیتریک، اسید مالیک) ۷٦

جدول ۱٥. مقایسه میانگین انواع تیمار ها..... ۷٦

جدول ۱۶. مقایسه میانگین زمان ها ۷۶

جدول ۱۷. تجزیه واریانس آزمایش اثر سه نوع اسید مختلف همراه با یون آهن ($FeCl_2$) ۷۷

جدول ۱۸. مقایسه میانگین انواع تیمار ها ۷۷

جدول ۱۹. تجزیه واریانس آزمایش اثر اسید آسکوربیک و کلسیم (غلظت فورفورال) ۷۸

جدول ۲۰. مقایسه میانگین انواع تیمار ها ۷۸

جدول ۲۱. تجزیه واریانس آزمایش اثر اسید آسکوربیک و کلسیم (اندیکس تخریب آنتوسیانین) ..... ۷۹.

جدول ۲۲. مقایسه میانگین انواع تیمار ها..... ۷۹

به نام خالق زیبایی‌ها

نیروی عجیبی‌ست، راهی‌ست پر تلاطم و
صحنه‌هایی پر از رویا و حادثه، باید
طی شود این مسیر بی‌انتها، من آن را
ازآن دارم، که می پرستمش.

به نام خداوندی که نعمت بزرگ پدر و مادر را بر
فرزندانش ارزانی داشت

این مجموعه را تقدیم می کنم :

به پدرم، او که اسوه صبر وتلاش است
به مادرم، که مهرش تا ابد در دلم جای دارد
به برادرانم، خواهرم و همسرش و مارتیای عزیز که
همواره یار و یاورم بودند
تقدیم به آنان که در این راه مشوقم بودند
تقدیم به آنان که دعای خیرشان بدرقه ی راهم

چکیده

آنتوسیانین‌ها، ترکیبات فلاوونوئیدی در گیاهان و عامل رنگ آبی، قرمز و بنفش در گل‌ها و میوه‌ها هستند. این ترکیبات ضداکساینده‌های قوی هستند که به عنوان مکمل غذایی در جلوگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی و دیگر بیماری‌ها در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرارمی‌گیرند. همچنین می‌توانند ارزش غذایی غذاهای فراوری شده را توسط مهاراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها در محصولات غذایی بهبود بخشند. علاوه بر فواید زیادی که برای انسان دارند برای خود گیاهان نیز نقش‌های مهمی، از جمله کاهش آسیب ناشی از تابش اشعه ماوراءبنفش، ایفا می‌کنند. میوه‌های توت‌مانند منابع غنی از آنتوسیانین‌ها می‌باشند. ناپایداری این ترکیبات، استفاده گسترده از آن‌ها را با وجود فواید زیادی که برای انسان دارند، محدود کرده است، کوپیگمانتاسیون بین آنتوسیانین و کو پیگمانت ها مکانیسم اصلی پایدار کننده رنگ در شرایط طبیعی می‌باشد. تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که اسیدآسکوربیک تحت شرایط اکسیداسیون و حرارت با تبدیل شدن به فورفورال می‌تواند منجر به تخریب آنتوسیانین‌ها شود. در این تحقیق تاثیر یون‌های فلزی روی پایداری آنتوسیانین‌ها و کوپیگمانتاسیون در میوه توت‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفته‌است. اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در λ_{max} توسط اسپکتروفتومترنشان داد که یون‌های فلزی آهن ومس به واسطه تشکیل کمپلکس با آنتوسیانین‌ها نقش مثبتی در پایداری آن‌ها ایفا می‌کنند. همچنین، نتایج نشان دادند که اضافه کردن آهن تاثیر کوپیگمانتاسیون آنتوسیانین با اسیدکافئیک، اسیدسیتریک و اسیدمالیک، را افزایش می‌دهد. از بین کوپیگمانت‌ها اسیدکافئیک تاثیر بهتری داشته است. با توجه به نتایج، اختلاف معنی‌داری (در سطح $p < ۰/۰۵$) بین تاثیر یون‌های آهن روی کوپیگمانتاسیون آنتوسیانین و کافئیک اسید وجود دارد، $FeCl_3$ پایداری کمپلکس تشکیل شده را کاهش می‌دهد. اندازه‌گیری مقدار فورفورال در عصاره‌هایی که تحت تاثیر اسیدآسکوربیک به تنهایی و همراه با یون کلسیم (در دمای ^{o}C ۹۰ به مدت ۲ ساعت) قرار گرفته بودند، توسط دستگاه RP-HPLC انجام شد. نتایج نشان داد که تشکیل کمپلکس نقش مهمی در کاهش اثر تخریبی اسیدآسکوربیک روی آنتوسیانین داشته باشد. همچنین محاسبه اندیکس تخریب آنتوسیانین (DI)در نمونه‌ها نشان داد که اضافه کردن کلسیم باعث کاهش تخریب آنتوسیانین در مقایسه با نمونه‌ای که فقط اسیدآسکوربیک اضافه شده بود، می‌شود. بنابراین، این نتایج نشان می‌دهند که یون‌های فلزی می‌توانند نقش مهمی در پایداری آنتوسیانین‌ها داشته باشند، که می‌تواند امید بخش استفاده بیشتر از این ترکیبات در فرآورده‌های غذایی باشد.

فصل ۱. کلیات

۱. مقدمه

ارزش غذایی و فواید سلامتی غذاها جزء مواردی است که برای مصرف‌کنندگان کل جهان حائز اهمیت است و آن‌ها ترجیح می‌دهند از مواد غذایی طبیعی به جای مواد مصنوعی استفاده کنند. بررسی خصوصیات عملکردی مواد طبیعی به ویژه آن‌هایی که در رژیم غذایی انسان وجود دارند، در سال‌های اخیر مورد توجه بوده‌است (۱۵۹). از جمله این ترکیبات طبیعی که در سال‌های اخیر روی نقش مثبت آن‌ها در سلامتی انسان بسیار تاکید شده است رنگیزه‌ای به نام آنتوسیانین است.

آنتوسیانین‌ها جزء ترکیبات فلاوونوئیدی، که گروه بزرگی از مواد آلی گیاهی (پلی‌فنول‌ها) را تشکیل می‌دهند، می‌باشند . این ترکیبات عامل رنگ آبی، قرمز و بنفش در گل‌ها و میوه‌ها هستندو می‌توانند به عنوان رنگ‌دهنده‌های مواد غذایی با میزان سمیت پایین دارای کاربرد ویژه‌ای باشند. توت‌فرنگی منبع خوبی از آنتوسیانین‌ها می‌باشند که می‌تواند به طور گسترده‌ای به عنوان یک رنگ طبیعی در نوشیدنی‌ها، انواع مختلف شیرینی، آدامس، آبنبات‌ها و... مورد استفاده قرار گیرد (۱۰٤). استفاده بیشتر از این ترکیبات گیاهی به جای ترکیبات شیمیایی نه تنها میزان سمیت را در بدن کاهش می‌دهد بلکه مطالعات بسیاری، فعالیت‌های ضداکسایندگی و فواید سلامتی آن‌ها را درمیوه‌ها و سبزیجات مختلف نشان می‌دهد (۵، ۵۸،٤٤،٦۲،۷۲،۸۹،۹۸). محدودیتی که در استفاده از این رنگیزه‌های طبیعی وجود دارد، ناپایداری و تحت تاثیر قرار گرفتن آن‌ها با فاکتورهای مختلف از جمله ساختار شیمیایی، غلظت، pH، دما، اکسیژن، نور و کوفاکتورها می‌باشد. کلات شدن آنتوسیانین‌ها با یون‌های فلزی و اتصال آن‌ها به ترکیبات دیگر، از جمله پلی‌فنلیک‌ها از اتفاقات رایج در طبیعت است که به عنوان پدیده‌ی کوپیگمانتاسیون شناخته شده است و تاثیر بسزایی روی پایداری این رنگیزه‌های طبیعی دارند (٦۷،۱۸) . معمولاً کوپیگمانت‌های مختلفی به عصاره میوه‌ها که دارای آنتوسیانین‌ها هستند جهت بهبود پایداری آن‌ها و افزایش ارزش غذایی فرآورده‌های غذایی افزوده می‌شوند(۱۲۹) . آنتوسیانین‌ها دارای گروه آزاد هیدروکسیل در حلقه B هستند که توانایی ایجاد کلات با فلزات را دارند و قادرند با یون‌های فلزی تشکیل یک کمپلکس پایدارتربدهند. همچنین بعضی از یون‌های فلزی قادرند پایداری کمپلکس تشکیل شده بین آنتوسیانین‌ها و کوپیگمانت‌ها را افزایش دهند(۹۵،۹۶). در تحقیقات زیادی نشان داده شده است که اسیدآسکوربیک تاثیر منفی روی پایداری آنتوسیانین‌ها داشته و منجر به تخریب آن‌ها می‌شود. بنابراین اسیدآسکوربیک به

عنوان یکی از عوامل اصلی تغییر رنگ و کیفیت فرآورده‌های غذایی در فرایند ذخیره‌سازی ونگهداری مورد توجه است (۳٤). تحت تاثیر حرارت، فورفورال یکی از فرآورده‌های تخریب اسیدآسکوربیک می‌باشد که می‌تواند باعث تخریب آنتوسیانین‌ها شود (٤١، ١٥٧). بنابراین با توجه به مطالب فوق، در این تحقیق تاثیر یون‌های فلزی (آهن ومس)، یون‌های آهن II و آهن III همراه با کوپیگمانت‌ها (اسیدکافئیک، اسیدسیتریک و اسیدمالیک)، روی پایداری آنتوسیانین‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومترمورد بررسی قرار گرفته‌است. همچنین تاثیر کلسیم در کاهش اثر تخریبی اسیدآسکوربیک روی آنتوسیانین‌ها، با اندازه‌گیری مقدار فورفورال تولید شده در نمونه‌ها توسط دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفته‌است.