بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه ارومیه

دانشکده کشاورزی

گروه علوم وصنایع غذایی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته مهندسی علوم و صنایع غذایی

موضوع

شناسایی عوامل تاثیر گذار بر تولید واستخراج آنتی اکسیدان از تفاله سیب با استفاده از کپک رایزوپوس میکروسپوروس واریته اولیگوسپوروس

اساتید راهنما

دکتر محمود رضازاد

دکتر محمد علیزاده

اساتید داور

دکتر فریبا زینالی

دکتر میر خلیل پیروزی فرد

تنظیم ونگارش

سعید حمدی پور

دی۹۱

حق چاپ برای دانشگاه ارومیه محفوظ است.

حمد و سپاس بی کران شایسته الطاف واسعه خدائی است که توفیق سلامتی، تحصیل علم، تحقیق و درک دانش را به من عطا فرمود

تشکر از **معلمان** عزیزی که نه تنها با آموختن علم، بلکه با آموزش روش درست آزاد اندیشیدن و پای بندی به اصول اخلاق حرفه ای، همواره انسانها را از آسیب کج فهمی، تعصب و گمراهی دور نگه داشته و راه زندگی درست و آزادگی را می آموزند. من همواره خود را به چنین معلمان ارزشمندی مدیون دانسته و با استفاده از این فرصت به ساحت آنان ادای احترام می کنم ضمنا بر خود لازم می دانم که از اساتید راهنمایم آقایان **دکتر رضا نژاد و دکتر علیزاده** که در مراحل انجام این پایان نامه لطفشان را از من دریغ نکردند تشکر و قدردانی کنم همینطور از **سایر اساتید** گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه به پاس زحماتشان صمیمانه تشکر می کنم از **دوستان** عزیزم که همواره وجودشان مایه امیدم هست سپاسگذارم.

در نهایت این اثر را هر چند در مقابل لطف و محبتشان ناچیز می دانم ولی تقدیم می کنم به پدر و مادر صبور و مهربانم که بی شک معلمان راستین من هستند و به لطف پروردگار سرم فقط به بهانه بوسیدن دستشان خم می شود.

همتم بدرقه ی راه کن ای طایر قدس که دراز است ره مقصد و من نو سفرم

چکیده

تفاله سـیب از محصـولات جانبی کارخانه های فرآوری سـیب به شمار می آید که می توان از آن ترکیبات زیست فعالی همچون مواد فنلی تولید کرد . در این مطالعه از دو زیر واریته *رایزوپوس میکروسپوروس واریته الیگوسپوروس* جهت تولید مواد زیست فعال آنتی اکسیداتیو در بستر تفاله سیب و پودر آب پنیر استفاده شد. همچنین تغییرات میزان ترکیبات فنولی کل و قدرت آنتی اکسـیدانی این ترکیبات با اسـتفاده از آزمون بازدارندگی رادیکال های آزاد دی پی پی اچ، اندازه گیری فاکتور محافظت آنتی اکسیدانی، شمارش کپک و اندازه گیری pH با استفاده از طرح کرت های خرد شده با ۸ کرت کامل مورد بررسی قرار گرفت. در هریک از تیمارها تاثیر متغیرهایی از قبیل دمای گرمخانه گذاری در سـه سـطح ۲۷،۲۳و۳۱درجه سانتیگراد، زمان گرمخانه گذاری در سه سطح ۸،۳ و۱۳ روز و نسبت اختلاط تفاله سیب به پودر آب پنیر در سوبسترا در سه نسبت ۵۰:۵۰، ۷۰:۳۰، ۹۰:۱۰ ،بررسی شد. میزان تغییرات ترکیبات فنولی کل، درصد بازدارندگی رادیکال دی پی پی اچ، فاکتور محافظت آنتی اکسیدان و شمارش کپک به ترتیب ۱۱/۱۲-۶/۱ معادل میلی گرم اسید گالیک در گرم ماده خشک، ۹۲/۵ ٪-۶۵/۸ ٪، ۴-۲/۴۱، ۱/۵۵-۱/۱۸، ۱۰^۱۰*۳/۱۳-۸^۱۰*۲/۲محاسبه شـد و حداکثر کارایی مربوط به *رایزوپوس الیگوسـپوروس* زیر واریته ۵۲۸۷ می شد و مدت زمان گرمخانه گذاری نسبت به سایر متغیرها بیشترین تاثیر را روی پارامترهای اندازه گیری شده داشت. از دستگاه مادون قرمز برای شـناسـایی گروههای عاملی هیدروکسـیل باقی مانده بعداز استخراج، به عنوان یک آزمون کیفی استفاده شد.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، پودر آب پنیر، تفاله سیب، *رایزوپوس الیگوسپوروس*

فهرست مطالب

چکیده ..... د
فهرست اشکال ..... ط
فهرست جداول ..... ی
فصل اول ۱
۱-۱- مقدمه ۲
۱-۲- تعریف مسأله و بیان اصلی تحقیق ۴
۱-۳- فرضیه ها ۵
۱-۴- اهداف ۵
۱-۵- کاربردهای تحقیق ۵
۱-۶- تعریف واژه های اختصاصی ۵
فصل دوم ۷
۲-۱- مقدمه ۸
۲-۲- آنتی اکسیدان ها ۸
۲-۲-۱- آنتی اکسیدان های مصنوعی ۸
۲-۲-۲-۱- مواد غذایی دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی ۱۱
۲-۳- ترکیبات فنولیک ۱۳
۲-۳-۱- فلاونوئیدها ۱۳
۲-۳-۲- ترکیبات فنولی سیب ۱۷
۲-۳-۳- خصوصیات آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی ۱۷
۲-۳-۴- خصوصیات آنتی باکتریایی ترکیبات فنولی ۱۸
۲-۳-۵- خصوصیات عملگری ترکیبات فنولی ۱۸
۲-۴- رادیکال های آزاد ۱۸
۲-۴-۱- تاثیر رادیکال های آزاد ۱۹
۲-۵- اکسیداسیون و فساد ۱۹
۲-۵-۱- مراحل اکسیداسیون و مواد حاصل از آن ۱۹

۲-۶- فاکتور حفاظت آنتی اکسیدان ۲۱
۲-۷- نقش میکروارگانیسم ها در صنعت غذا ۲۳
۲-۷-۱- رایزوپوس میکروسپوروس ۲۴
۲-۸- پودر آب پنیر تغلیظ شده ۲۶
۲-۹- ترکیبات فنولیک آنتی اکسیدانی تولید شده از محصولات جانبی مختلف ۲۸
۲-۱۰- نتیجه گیری ۳۰
فصل سوم ۳۱
۳-۱- مقدمه ۳۲
۳-۲- مواد ۳۲
۳-۲-۱- پودر آب پنیر ۳۲
۳-۲-۲- تفاله سیب ۳۲
۳-۲-۳- میکروارگانیسم ۳۲
۳-۲-۴- محیط کشت ۳۳
۳-۲-۵- بتا کاروتن ۳۳
۳-۲-۶- اسید لینولئیک ۳۳
۳-۲-۷- تووین ۴۰ ..... ۳۳
۳-۲-۸- اسید گالیک ۳۳
۳-۲-۹- **DPPH** ۳۳
۳-۲-۱۰- فولین ۳۳
۳-۲-۱۱- کربنات سدیم ۳۴
۳-۲-۱۲- کلروفرم ۳۴
۳-۲-۱۳- آب اکسیژنه و آب مقطر ۳۴
۳-۲-۱۴- اتانول ۳۴
۳-۲-۱۵- لوازم آزمایشگاهی ۳۴
۳-۲-۱۶- آون ۳۵
۳-۲-۱۷- ترازوی دیجیتالی ۳۵

۳-۲-۱۸- انکوباتور و بن ماری ۳۵
۳-۲-۱۹- اسپکتروفتومتر ۳۵
۳-۲-۲۰- دستگاه وکیوم روتاری ۳۵
۳-۲-۲۱- **pH** متر ۳۵
۳-۲-۲۲- دستگاه طیف سنج مادون قرمز(**IR**) ۳۵
۳-۲-۲۳- دستگاه آسیاب و هموژنایزر ۳۵
۳-۳- روش ها ۳۶
۳-۳-۱- تخمیر با بستر جامد ۳۶
۳-۳-۲- رشد و تکثیر ۳۶
۳-۳-۳- آماده سازی سوپرناتانت ۳۶
۳-۳-۴- اندازه گیری ترکیبات فنولیک کل ۳۶
۳-۳-۵- رسم منحنی استاندارد ۳۷
۳-۳-۶- فعالیت مهار رادیکال آزاد ۳۸
۳-۳-۷- آزمون بتا کاروتن ۳۸
۳-۳-۸- اندازه گیری **pH** ۳۹
۳-۳-۹- شمارش میکروبی ۳۹
۳-۳-۱۰- شناسایی اولیه گروه های عاملی ترکیبات ۳۹
۳-۳-۱۱- تهیه حلال های مختلف ۳۹
۳-۳-۱۲- طرح آماری ۳۹
فصل چهارم ۴۲
۴-۱- مقدمه ۴۳
۴-۲- ترکیبات فنولی کل ۴۳
۴-۳- مهار رادیکال های آزاد **DPPH** ۴۶
۴-۴- فاکتور محافظت آنتی اکسیدان ۴۹
۴-۵- جمعیت میکروبی ۵۲
۴-۶- روند تغییرات **pH** ۵۵

۴-۷- بررسی کیفیت استخراج ۵۸
۴-۸- نتیجه گیری کلی ۶۰
فصل پنجم ۶۱
۵-۱- مقدمه ۶۲
۵-۲- خلاصه پژوهش ۶۲
۵-۳- پیشنهادات ۶۲
فهرست منابع و ماخذ ۶۴
منابع مورد استفاده ۶۵
Abstract ۷۳

فهرست اشکال

شکل ۲- ۱- ساختار شیمیایی آنتی اکسیدان های سنتتیک ۹
شکل ۲- ۲- ساختار فنیل آلانین و تیروزین ۱۴
شکل ۲- ۳- روند تشکیل فلاوانول ها از PAL ۱۵
شکل ۲- ۴ - ساختار شیمیایی فلاون، فلاونول و فلاوانون ۱۶
شکل ۲- ۵- ساختار شیمیایی انواع فلاون ها و فلاونول ها ۱۶
شکل ۲- ۶- مراحل اکسیداسیون چربی ها و روغن ها ۲۰
شکل ۲- ۷- میزان تشکیل پراکسید در طول زمان ۲۱
شکل ۲- ۸- روند تشکیل هیدر پراکسید از اسید لینولئیک ۲۲
شکل ۲- ۹ - مکانیسم جلوگیری از اکسیداسیون توسط آلفا توکوفرول ۲۳
شکل ۲- ۱۰ - رایزوپوس رشد کرده در محیط کشتPDA ۲۴
شکل ۲- ۱۱- اندام های مختلف رایزوپوس ۲۵
شکل ۲- ۱۲- مقایسه اجزا مختلف کنسانتره های پروتئینی ۲۷

شکل ۳- ۱- نمودار کالیبراسیون اسید گالیک ۳۷

شکل ۴- ۱- تغییرات ترکیبات فنولی با تغییر متغیرها به همراه مقدار بیشینه ٤٤
شکل ۴- ۲- تغییرات ترکیبات فنولی کل با تغییر متغیرها به همراه مقدار کمینه ٤٤
شکل ۴- ۳- نمودار پراکندگی مقدار ترکیبات فنولی حاصل از تیمارها ٤٥
شکل ۴- ۴- تغییرات درصد مهار رادیکال dpph با تغییر متغیرها به همراه مقدار بیشینه ٤٦
شکل ۴- ۵- تغییرات درصد بازدارندگی با تغییر متغیرها به همراه مقدار کمینه ٤٧
شکل ۴- ۶- نمودار داده های حاصل از آزمون dpph ٤٨
شکل ۴- ۷- روند تغییرات APF با تغییر متغیر ها به همراه شرایط بهینه ٤٩
شکل ۴- ۸- روند تغییرات APF با تغییر متغیرها به همراه میزان کمینه ٥٠
شکل ۴- ۹- نمودار داده های حاصل از آزمون فاکتور محافظت آنتی اکسیدان ٥١
شکل ۴- ۱۰- روند تغییرات رشد کپک با تغییر متغیرها به همراه شرایط بهینه ٥٣
شکل ۴- ۱۱- روند تغییر نرخ رشد کپک با تغییر متغیرها به همراه شرایط کمینه ٥٣
شکل ۴- ۱۲- نمودار داده های حاصل از شمارش کپک ها ٥٥
شکل ۴- ۱۳- روند تغییرات pH با تغییر متغیرها به همراه شرایط بهینه ٥٦
شکل ۴- ۱۴- روند تغییرات pH با تغییر متغیرها به همراه مقدار کمینه ٥٦
شکل ۴- ۱۵- نمودار داده های حاصل از اندازه گیری pH ٥٧
شکل ۴- ۱۶- طیف IR بعد از استخراج ٥٨
شکل ٤- ۱۷- طیف IR قبل از استخراج ٥٩

فهرست جداول

جدول ۳- ۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی پودر آب پنیر.....۳۲
جدول ۳- ۲- طرح آماری تحقیق.....۴۰
جدول ۳- ۳- طرح آماری تحقیق.....۴۱

جدول ۴- ۱- دامنه معنی داری تاثیر فاکتورها در افزایش سطح ترکیبات فنولی.....۴۵
جدول ۴- ۲- دامنه معنی داری تاثیر فاکتورها در افزایش درصد بازدارندگی dpph.....۴۸
جدول ۴- ۳- دامنه معنادار بودن تاثیر فاکتور های مخلف روی APF.....۵۱
جدول ۴- ۴- دامنه معنادار بودن یا نبودن تاثیر فاکتورها روی رشد کپک های مورد مطالعه.....۵۴
جدول ۴- ۵- دامنه معنادار بودن یا نبودن تاثیر متغیرها بر روی pH.....۵۷
جدول ۴- ۶- جدول مشخصات طیفی گروه های عاملی مختلف.....۵۹

فصل اول

کلیات

۱-۱- مقدمه

تامین نیازهای غذایی و نگهداری غذا از زمان انسان های اولیه تا مدرن، مورد توجه بوده است . غذا پس از تولید باید به طریق مناسب نگه داری شود در غیر این صورت دچار فساد و ضایعات خواهد شد. یکی از روش های نگهداری مواد غذایی استفاده از افزودنی ها ی غذایی می باشد .امروزه کم تر ماده غذایی یافت می شود که با مواد افزودنی در ارتباط نباشد چرا که این مواد اغلب باعث افزایش ماندگاری این محصولات می شود(گوپتا و پراکاش،۱۹۹۷) سیب یکی از میوه های مهم در جهان است که سالانه میلیون ها تن از آن برای تولید محصولات گوناگون از قبیل مربا، ژله ، شراب و آب سیب و... مورد استفاده قرار می گیرد (بوشان و همکاران ۲۰۰۸) بنابراین استفاده بهینه از ضایعات کارخانجات فرآوری سیب یکی از مسایل مهم در این زمینه بوده از طرفی تفاله سیب به دست آمده از کارخانه ها دارای ترکیبات فنولی با قابلیت استخراج بالا می باشد(پینگرت و همکاران ۲۰۱۲) فرآورده های جانبی تولیدی از فرآوری سیب همچنین به عنوان غنی کننده های آنتی اکسیدانی مواد غذایی به کار می روند و خاصیت ضد سرطانی دارند(گاسارا و همکاران ۲۰۱۲)که تاثیر این ترکیبات در جلوگیری از سرطان روده بزرگ در شرایط آزمایشگاهی مورد تایید می باشد(مک کان و همکاران ۲۰۰۷) علیرغم وجود آنتی اکسیدا نهای مختلف در پلاسما، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکا لهای آزاد ایجاد شده در بدن نیست، به همین جهت نیاز به تأمین آنتی اکسیدان از منابع خارجی دارد که از طریق منابع غذایی تأمین می شود(یانگ و ودساید ۲۰۰۱) شواهد بسیار زیادی وجود دارد که سمی بودن و اثرات سوء تغذی های آنتی اکسیدا نهای ساختگی اضافه شده به مواد غذایی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، بوتیل هیدروکسی تولوئن(BHT) و ترت بتا هیدروکسی کینون(TBHQ) را تأ ئید می کند .علاوه بر این خطر آسیب کبدی و ایجاد سرطان درحیوانات آزمایشگاهی ا ز معایب ا ستفاده ا ز آنتی ا کسیدا نهای ساختگی ا ست(گاوو و همکاران ۱۹۹۹، ویلیامز و همکاران ۱۹۹۹) بنابراین نیاز به آنتی اکسیدا نهای قوی با سمیت کمتر و اثر بخشی بیشتر یک ضرورت اجتناب ناپذیر است .امروزه بسیاری از متخصصین تغذیه برای تأمین آنتی اکسیدا ن های مورد نیاز بدن، مصرف گیاهان، میوه جات و سبزیجات را توصیه می نمایند، زیرا معمولاً مصرف آنتی آکسیدا ن های گیاهی عوارض جانبی کمتر و درمان بهتری ایجاد می نمایند(فرانکل ۱۹۹۹) در طول پروسه تولید آب سیب حدود ۳۰-۲۵درصد تفاله سیب و حدود ۱۰-۵درصد نیز پوسته سیب تولید می شود(دیلون و همکاران ۲۰۱۲)که توجه به این مواد و تولید موادی با ارزش افزوده بالاتر اعم از ترکیبات فنولیک (ابراهیم و همکاران ۲۰۱۰)بازیابی پکتین (اسشایبر و همکاران ۲۰۰۳)تولید آنزیم (تورس و همکاران ۲۰۰۶)تولید اتانول و ترکیبات معطر(پاگانینی و همکاران ۲۰۰۵) و سایر مواد مغذی از اهمیت بالایی برخوردار است در حالیکه پتانسیل تفاله سیب به عنوان منبع غنی از ترکیبات فنولیک آنتی اکسیدان واضح و روشن است اما اطلاعات کمی در ارتباط با چگونگی استخراج این ترکیبات وجود دارد چرا که بسیاری از این ترکیبات فنولیک به صورت متصل شده با ترکیبات کربوهیدراتی هستند (به صورت گلیکوزید) که وجود این اتصالات از خاصیت آنتی اکسیدانی فنول ها می کاهد(دیراج و شتی ۲۰۰۳) ضایعات میوه ها معمولا منبع مهم شکر، فیبر و سایر موادبا ارزش از قبیل ترکیبات فنولیک می باشند بیش از ۸۰۰۰ نوع ساختار فنولیک در سبزیجات و میوه ها شناسایی شده اند(کوریا و همکاران ۲۰۰۳)

خاصیت این ترکیبات این است که دهنده هیدروژن خوبی هستند وبا دادن هیدروژن خود به مواد خطرناک تبدیل نمی شوند وبا این مکانیسم از اکسیداسیون مواد حساس به اکسیداسیون جلوگیری می کنند(چیونگ و همکاران ۲۰۰۲). آنتی اکسیدان ها معمولا به صورت یک افزودنی در صنعت غذا مورد استفاده قرار می گیرند اگرچه آنتی اکسیدان های سنتتیک به صورت عمده مورد مصرف قرار می گیرند اما امکان تشکیل مواد سمی و سرطانزا در طول تجزیه این مواد وجود دارد(ینگ و چانگ ۲۰۰۲). بنابراین آنتی اکسیدان های طبیعی پتانسیل جایگزینی با نوع مصنوعی را دارند اما گران بودن آنتی اکسیدان های طبیعی و همین طور میزان اثربخشی کمتر آنها نسبت به انواع مصنوعی دو مشکل اساسی استفاده از این ترکیبات می باشد بنابراین یافتن منبعی ارزان ودر عین حال با قدرت تاثیر بیشتر بسیار حایز اهمیت می باشد استفاده از میکروارگانیسم ها این امکان را تا حدودی فراهم می کند(ینگ و چانگ ۲۰۰۲). توانایی میکروارگانیسم ها برای بالا بردن سطح ترکیبات فنولیک با تولید متابولیت های ثانویه از قبیل آنزیم ها در ضایعات کشاورزی مثل تفاله سیب که انباشته شدن آنها منجر به مشکلات زیست محیطی نیز می شود یکی از موضوعات مهم به شمار می رود و از آنجاییکه بیشتر ترکیبات فنولی به صورت پیوند با گروه هیدروکسیلی کربوهیدرات ها هستند میکروب ها با تولید آنزیم هایی مثل بتا گلوکوزیداز منجر به بالا رفتن سطح ترکیبات فنولیک آزاد با خاصیت آنتی اکسیدانی می شوند یکی از این میکروارگانیسم ها کپک *رایزوپوس میکروسپوروس* می باشد این کپک food grade بوده (کوریا و همکاران ۲۰۰۳، موراشیما و همکاران ۲۰۰۱) و در سیستم تخمیر با بستر جامد بسیار خوب رشد می کند که این سیستم تشکیل شده از سوبسترای جامد در حضور مقدار کمی رطوبت برای رشد کپک می باشد(راند هیر و شتی ۲۰۰۶). در این مطالعه فقط از آب به عنوان حلال استفاده گردید. پودر آب پنیر می تواند به عنوان منبع مغذی می تواند سوبسترای میکروارگانیسم ها باشد، دمای حلال مورد استفاده نیز بسیار مهم است به طوریکه افزایش دما تا حدی منجر به افزایش ترکیبات فنولی می شود(آجیلا و همکاران ۲۰۱۰). مدت زمان نیز یکی از فاکتور های موثر در افزایش میزان ترکیبات فنولی مورد استخراج می باشد(برور ۲۰۱۱). در همه این موارد ظرفیت آنتی اکسیدانی کل به عنوان یکی از روشهای مرجع برای تعیین میزان و سطح ترکیبات فنولیک و قدرت آنتی اکسیدانی این مواد به کار می رود(مودووا ۲۰۱۱). بسیاری از ترکیبات غذایی هستند که از اجزاء مفید و بسیار مستعد به اکسیداسیون تشکیل شده اند که علارغم دارا بودن خواص مناسب برای سلامتی و داشتن ارزش غذایی بالا در معرض اکسیداسیون هستند بنابراین کاهش اکسیداسیون این مواد منجر به افزایش کیفیت مواد غذایی می شود که یکی از بهترین افزودنی ها در این زمینه آنتی اکسیدان های طبیعی می باشد(برور ۲۰۱۱) آب پنیر به صورت معمولی ۶-۵ درصد لاکتوز، ۱-۰/۸درصد پروتیین و ۰/۰۶درصد چربی دارد و حدود ۰/۸-۰/۷ درصد مواد معدنی دارد (کرژی و اوزمائیسی ۲۰۰۵). آب پنیر یکی از محصولات فرعی تولید پنیر محسوب می شود که در صورت عدم مدیریت صحیح تبدیل به مشکلات زیست محیطی می شود تبدیل آن به پودر آب پنیر و استفاده از آن در شرکت های تولید شیر خشک و ...و همینطور به عنوان سوبسترای میکروبی برای تولید اتانول وسایر مواد با ارزش افزوده بالاتر از اهمیت بالایی برخوردار است چرا که دارای ریزپپتیدها و سایر مواد مغذی است(کوشواها و همکاران ۲۰۱۰، گویمارائیس و همکاران۲۰۱۰، شون و هاگو ۲۰۰۷).

۱-۲- تعریف مسأله و بیان اصلی تحقیق

آنتی اکسیدان ها معمولا به عنوان افزودنی در صنعت غذا مورد استفاده قرا ر می گیرند تا از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کنند اگر چه آنتی اکسیدان های سنتتیک به صورت گسترده در فرایند های غذایی مورد استفاده قرار می گیرند اما ترکیبات سمی و سرطانزای حاصل از تجزیه این مواد در طول فرآوری محصولات غذایی نگرانی زیادی را در ارتباط با این نوع افزودنی ها ایجاد کرده است از طرفی آنتی اکسیدان های طبیعی پتانسیل جایگزینی آنتی اکسیدان های سنتتیک را دارند آنتی اکسیدان های طبیعی علی رغم ارزش غذایی و تکنولوژیکی بالا معمولا گران قیمت هستند بنابراین پیدا کردن راهی برای تولید ارزان آنتی اکسیدان های طبیعی و در عین حال با همان ارزش تکنولوژیکی بسیار حائز اهمیت است منابع میکروبی پتانسیل تولید این آنتی اکسیدان ها را دارند (چین ین و چان۲۰۰۳، شتی و همکاران۲۰۰۳).

از طرفی مشکل ضایعات کارخانجات آب میوه و کارخانجات لبنی روز به روز در حال افزایش است بنابراین پیدا کردن راهی برای تبدیل این ضایعات به موادی با ارزش افزوده بالاتر بسیار حایز اهمیت است پس استفاده از این مواد به عنوان سوبسترا برای تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی می تواند با ارزش باشد(شتی وهمکاران۲۰۰۳).

استفاده از ضایعات و تفاله سیب درختی به عنوان سوبسترا به دو دلیل مورد توجه است : اول اینکه این مواد به عنوان ضایعات کاربرد خاصی ندارند و موجب ایجاد مشکلات زیست محیطی می شوند بنابراین تبدیل انها به مواد با ارزش تر اهمیت زیادی دارد، دومین دلیل این است که تفاله سیب دارای مقداری ترکیبات فنولیک است که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند و به طور کلی ترکیبات فنولیک در میوه ها و سبزیجات به صورت گسترده وجود دارد(آمین و همکاران۲۰۰۴).

در مورد آب پنیر که یکی از ضایعات کارخانجات لبنی می باشد که استفاده از آنها نیز به این دلیل است که به عنوان منبع نیتروژن در مراحل رشد کپک رایزوپوس مورد استفاده قرار می گیرد چرا که آب پنیر غنی از پروتئین ودر نتیجه منبع نیتروزن می باشد، کپک *Rhizopus oligosporus* به دلیل تولید بتا گلوکوزیداز در حین رشد و همینطور تولید برخی ترکیبات فنولیک به صورت متابولیت های ثانویه مورد استفاده قرار می گیرد چرا که آنزیم تولیدی از این کپک اتصال بین ترکیب فنولی وگلوکوزید را شکسته وباعث می شود ترکیب فنولی به صورت آزاد در بیاید و بتواند خاصیت آنتی اکسیدانی از خود نشان دهد(شتی و همکاران۲۰۰۳).

Rhizopus oligosporus از جمله کپک های food grade می باشد که به صورت موفقیت آمیزی در سیستم هایی با سوبسترای جامد که ضایعات میوه ها به عنوان سوبسترا می باشد رشد می کنند و با تولید بتاگلوکوزیداز به بیشتر ظاهر شدن خواص آنتی اکسیدانی کمک می کند (واتم و شتی ۲۰۰۲).

اندازه گیری قدرت آنتی اکسیدانی ترکیبات حاصله با روش DPPH و همینطور B-carotene oxidation assay انجام می شود که از معتبرترین روش های سنجش قدرت آنتی اکسیدانی می باشد (واتم و شتی ۲۰۰۲، کرواتو و همکاران۲۰۰۰).

۱-۳- فرضیه ها

گرمخانه گذاری در سطوح دمایی مختلف باعث تغییر در سرعت تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی می شودکه این مساله در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت همچنین افزودن پودر آب پنیر به عنوان سوبسترا در سطوح مختلف باعث تغییر در میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی می شودکه این فرضیه نیز در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد و تاثیر نوع کپک در میزان ترکیبات فنولی استخراجی نیز از جمله فرضیه هایی بود که برای این تحقیق متصور شدیم.

۱-۴- اهداف

۱- شناسایی فاکتور هایی که بیشترین تاثیر را در تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی دارند.
۲- استفاده از ضایعات کارخانجات مواد غذایی و تبدیل آنها به موادی که ارزش افزوده بالاتری دارند.
۳- تعیین روشهایی که بالاترین سرعت را در تولید ترکیبات فنولیک دارند.

۱-۵- کاربردهای تحقیق

صنعتی کردن این طرح برای تولید آنتی اکسیدان ها که می توانند در صنعت روغن و به عنوان یک جایگزین بسیار مناسب برای آنتی اکسیدان های سنتتیک که امروزه سرطانزا بودن مواد حاصل از تجزیه آنها به اثبات رسیده، مورد استفاده قرار گیرند.

۱-۶- تعریف واژه های اختصاصی

آنتی اکسیدان: ترکیباتی هستند که با دادن هیدروژن به ترکیبات رادیکالی از اثرات مخرب تولید هیدروپراکسید جلوگیری می کنند این ترکیبات باید دارای شرایط زیر باشد:

۱- دهنده هیدروژن خوبی باشند.
۲- با دادن هیدروژن به رادیکال آزاد خطرناک و مخربی تبدیل نشود.
۳- از تجمع برآیند واکنش های رخ داده در بین رادیکال های آزاد ترکیبات خطرناکی تولید نشود(فاطمی ۱۳۸۶).

ترکیبات فنولی: مولکول هایی هستند که دارای گروههای هیدروکسیلی بوده و برخی از این ترکیبات تمامی ویژگی های لازم برای یک آنتی اکسیدان خوب را دارا هستند(پوکورنی و همکاران ۲۰۰۱).

DPPH: مولکول های ۲و۲ دی فنیل- ۱- پیکریل- هیدرازیل که با توجه به داشتن تک الکترون و خاصیت واکنش پذیری بالا در سنجش قدرت ترکیبات آنتی اکسیدانی به کار می رود(پوکورنی و همکاران ۲۰۰۱).

APF(Antioxidant Protection Factor): عبارت است از نسبت دوره کند اکسیداسیون در حضور آنتی اکسیدان به دوره کند اکسیداسیون در نبود آنتی اکسیدان(پوکورنی و همکاران ۲۰۰۱).

IC_{50}: عبارت است از میزان ترکیبات فنولی کل یک نمونه که منجر به نصف حداکثر بازدارندگی مولکول های دی پی پی اچ می شود(آجیلا و همکاران ۲۰۱۰).

در این تحقیق میزان تغییرات ترکیبات فنولی و قدرت آنتی اکسیدانی این ترکیبات در شرایط مختلف و با تغییر متغیرهایی از قبیل دما و زمان و نسبت پودر تفاله سیب به پودر آب پنیر و دو ساب واریته کپک *رایزوپوس میکروسپوروس* واریته الیگوسپوروس بررسی شده است که در فصول بعدی این پایان نامه مواد وروشهای استفاده شده در آزمایشگاه و چگونگی به دست آوردن داده ها و همچنین آنالیز داده ها وتجزیه و تحلیل آنها مورد بحث قرار می گیرد و همینطرر از تحقیق انجام گرفته می شود پیشنهاد هایی برای کار های تحقیقاتی احتمالی که در آینده می تواند انجام آورده می شود.

فصل دوم

بررسی ادبیات موضوع و سابقه تحقیق

۲-۱- مقدمه

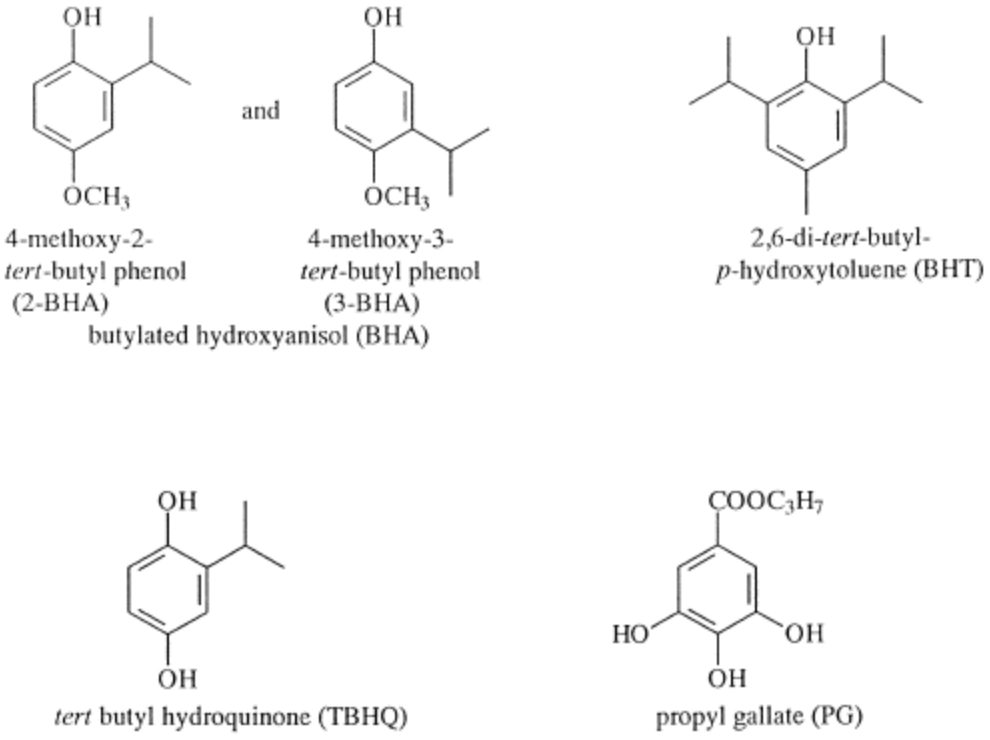
افزایش روز افزون نیاز به آنتی اکسیدان های طبیعی از یک طرف و ضرورت تبدیل ضایعات کارخانجات مواد غذایی به موادی با ارزش افزوده بالاتر از طرف دیگر ضرورت انجام چنین پروژه هایی را مشخص می کند(موساتو و همکاران ۲۰۱۱، شتی و همکاران ۲۰۰۳) بنابراین در سراسر دنیا و در تمامی شرکت هایی که به نوعی با مواد غذایی در ارتباط هستند انجام چنین تحقیقاتی در اولویت قرار دارند همچنین ایجاد شرایطی برای صنعتی کردن چنین طرح هایی که بتواند جایگزینی آنتی اکسیدان های طبیعی با نوع سنتزی به نتیجه برساند مورد بحث است از طرفی طبق آمار FAO ایران در سال ۲۰۰۳ با تولید ۲۴۰۰۰۰۰۰ تن سیب از نظر رتبه تولید این میوه در جهان رتبه هفتم را به خود اختصاص داده است(ولی بیگی ۱۳۸۴) که این رقم در سال ۲۰۰۶ به ۲۶۶۱۹۰۱۰ تن رسیده و ایران سومین کشور تولید کننده این میوه بوده است که میزان بسیار زیادی از آن وارد کارخانجات تولید کننده آب سیب و... می شود که استفاده از ضایعات این کارخانه ها حائز اهمیت است(شهابی و همکاران ۱۳۸۶). در این فصل مروری خواهیم داشت بر برخی از کارهایی که در این زمینه انجام گرفته و نتایجی که گزارش شده است.

۲-۲- آنتی اکسیدان ها

آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که مانع فعالیت رادیکال های آزاد شده ویا سبب حذف آنها می شود و سلول های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگاه می دارند و از این رو با روند پیری و ابتلا به بیماری های مختلف,مبارزه می کنند.آنتی اکسیدان ها به دو روش به ترمیم آسیب های وارد شده به بدن توسط رادیکال های آزاد کمک می کنند این مواد می توانند از تشکیل رادیکال های آزاد در بدن جلوگیری کنند ودر صورت تشکیل,تاثیرآنها را بر بدن کاهش دهند.در حقیقت آنتی آکسیدان ها ترکیباتی هستند که برای پیشگیری و یا کند نمودن آسیب های ناشی از واکنش های اکسیداسیون در بدن و سیستم های غذایی به کار می روند و به عنوان خنثی کننده رادیکال های آزاد عمل نموده و از این رو از آسیب ناشی از این ترکیبات جلوگیری می کنند آنتی اکسیدا نها از یک طرف باعث کاهش خطر ابتدا به بیمار یهای قلبی عروقی و سکته می شوند و از طرف دیگر از پیشرفت سرطا نها که موجب آسیب به DNA می شوند جلوگیری می کنند(نوقوچی و نیکی ۲۰۰۰).

۲-۲-۱- آنتی اکسیدان های مصنوعی

این ترکیبات دارای خواص آنتی اکسیدانی بوده اما به صورت مصنوعی ساخته می شوند لازم به ذکر است که خواص سرطانزایی اغلب ای ترکیبات به اثبات رسیده است و در کشور هایی مثل آمریکا استفاده از آنها ممنوع است، ساختار شیمیایی مهمترین ترکیبات آنتی اکسیدانی سنتتیک در شکل ۲-۱ آورده شده است.



شکل ۲- ۱- ساختار شیمیایی آنتی اکسیدان های سنتتیک

۲-۲-۲- آنتی اکسیدان های طبیعی

ترکیباتی هستند که از واکنش های زنجیره ای اکسیداسیون جلوگیری می کند و به صورت طبیعی در مواد غذایی و در طبیعت وجود دارند که به برخی از آنها اشاره می شود:

ویتامین C

ویتامین C یا اسید اسکوربیک ,از ویتامین های محلول در آب است که از طریق مواد غذایی دریافت می شود,این ماده با غیر فعال کردن رادیکال های آزاد محلول در آب به طور اختصاصی از اثرات مخرب آنها جلوگیری می کند. مهم ترین منابع این ویتامین عبارتند از: مرکبات، فلفل، کلم بروکلی، کیوی، کلم، طالبی، توت فرنگی، اسفناج و سیب زمینی(شتی و همکاران ۲۰۰۶).

ویتامین B

ویتامین B در انواع مختلف از ویتامین های محلول در آب هستند که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و فعالیت سیستم ایمنی را تقویت می کند.بهترین منابع ویتامین B غذاهای حاوی پروتئین از جمله مرغ، جگر، گوشت، تخم مرغ، شیر و سایر فرآورده های لبنی، سویا و دانه های گیاهی هستند(شتی و همکاران ۲۰۰۶).

ویتامین E

ویتامین E یا توکوفرول ویتامینی محلول در چربی است که از اکسید شدن لیپید ها(چربی ها) به ویژه چربی های اشباع نشده و تا حدودی از اکسیداسیون LDL یا کلسترول مضر در بدن جلوگیری می کند. مهم ترین منابع غذایی این ویتامین عبارتند از: روغن های گیاهی، جوانه گندم، آجیل(مغزها) و غلات سبوس دار(شتی و همکاران ۲۰۰۶).

کاروتنوئیدها

کاروتنوئیدها از آنتی اکسیدان های قدرتمند و پر ارزش در سلول ها هستند که از اکسید شدن لیپیدها در مراحل ابتدایی جلوگیری کرده و سطح چربی خون را پایین نگه می دارند و نیز از صدمات آلاینده های محیطی جلوگیری می نمایند. ازجمله ترکیبات کاروتنوئیدی می توان آلفا و بتا کاروتن، لیکوپن و کریپتوگزانتین را نام برد. هویج، کلم بروکلی، سیب زمینی، اسفناج، گوجه فرنگی، طالبی، هلو، زردآلو، کاهو و انبه از منابع این مواد به ویژه کاروتن ها هستند(شتی و همکاران ۲۰۰۶).

بیوفلاونوئیدها

ترکیبات بیوفلاونوئیدی نیزدارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند.این ترکیبات فعالیت های ویتامین C را تشدید و از شکنندگی عروق جلوگیری می نمایند.دریافت این ترکیبات ازطریق رژیم غذایی موجب کاهش خطر بیماری های قلبی عروقی و سرطان ها می شود.بیوفلاونوئیدها در گیاهانی وجود دارند که دارای رنگدانه های قرمز، آبی و زرد هستند.عسل نیز از مواد غذایی دارای فلاونوئید است.

یوبی کینون ها

یوبی کینون ها نیز از ترکیبات با خاصیت آنتی اکسیدانی هستند . ازاین گروه می توان به کوآنزیم اشاره کرد.این ترکیب در بدن با استفاده از پیش سازهایی تهیه شده و مانند یک آنتی اکسیدان محلول در چربی نظیر ویتامین E عمل می کند.به طورکلی این ترکیبات در بهبود برخی بیماری های قلبی مفیدند.پیش سازه های این ماده در مواد غذایی نظیر لوبیای سویا، انواع ماهی، جوانه گندم، لوبیا سبز، سیر، کلم و اسفناج وجود دارد(شتی و همکاران ۲۰۰۶).