نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد دوازدهم، شماره دوم، ۹۹
۶۷-۸۰
http://ejfpp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/ejfpp.2021.12808.1411

مطالعه تغییرات بیوشیمیایی برگ استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) تحت تأثیر زمان انبارداری، منطقه کشت و نوع بسته‌بندی

عظیم قاسم‌نژاد[1*]، مادح احمدی[2]، آتنا تنوری[2]، محمدمهدی فرضی‌نیا[2]

[1]دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[2]دانش‌آموخته، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸

چکیده

سابقه و هدف: استویا یک گیاه دارویی ارزشمند شناخته شده است. با این وجود با معرفی این گیاه به‌عنوان شیرین‌کننده فاقد کالری تقاضا برای آن در سطح جهان افزایش یافته است. گام مهم پس از کشت و کار یک گیاه دارویی، داشتن برنامه‌ریزی مناسب جهت فرآوری و بسته‌بندی آن است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر زمان انبارداری، منطقه و نوع پوشش بسته‌بندی بر میزان ترکیبات شیمیایی گیاه استویا است.

مواد و روش‌ها: این پژوهش پیرامون تأثیر زمان، منطقه و نوع پوشش بسته‌بندی بر کنترل کیفیت برگ‌های خشک‌شده گیاه استویا بر پایه طرح کاملاً تصادفی و آزمون فاکتوریل با ٤ تکرار طراحی و اجرا شد. بدین منظور نمونه‌های برگ جمع‌آوری شده از دو منطقه گرگان و آق‌قلا به‌ترتیب به‌عنوان منطقه جلگه‌ای و نیمه بیابانی سایه‌خشک شدند. برگ‌های خشک‌شده به‌مدت سه ماه در بسته‌بندی‌های مختلف شیشه، پلاستیک، کاغذی و فوم نگهداری شدند. در نهایت کیفیت ظاهری نمونه و تغییرات ترکیبات شیمیایی عصاره برگ در شروع کار (زمان اول) و بعد از سه ماه (زمان دوم) مورد بررسی قرارگرفت. به‌منظور بررسی اثر تیمارهای آزمایش بر ویژگی‌های کیفی برگ فنل کل، فلاونوئید کل، درصد مهار رادیکال‌های آزاد و قند کل و احیاء مورد مقایسه قرار گرفتند. فنل کل به‌روش فولین سیوکالتو، فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید، درصد مهار رادیکال‌های آزاد به‌روش DPPH و قند کل و قند احیاء نیز به روش فهلینگ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان فنل و فلاونوئید نمونه‌های انبار شده نسبت به شاهد کمتر بود. بالاترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد و همچنین بیشترین میزان قند کل و قند احیا در برگ‌های جمع‌آوری شده از منطقه آق‌قلا مشاهده گردید. همچنین درصد مهار رادیکال نمونه‌های انبار شده در مقایسه با شاهد کمتر بود؛ درحالی‌که میزان قند (قند کل و احیا) تحت تأثیر انبارداری افزایش یافت. منطقه کشت و نوع بسته‌بندی تنها بر میزان درصد مهار رادیکال آزاد اثر معنی‌داری داشت. درصد مهار رادیکال‌های آزاد نمونه‌ها در بسته‌بندی شیشه‌ای بطور معنی‌داری در بیشترین سطح تفاوت معنی‌داری نسبت به بقیه تیمارها داشت. درمقابل بیشترین میزان قند احیا نیز در بسته‌بندی پاکت‌های کاغذی و پاکت‌های پلاستیکی تعیین شد. البته در پوشش‌های بررسی‌شده در میزان محتوی فنل، فلاونوئیدکل، قندکل و قند احیا تغییر معنی‌داری حاصل نشد. اثر متقابل زمان انبارداری و منطقه کشت، زمان انبارداری و نوع بسته‌بندی اثر معنی‌داری بر درصد مهار رادیکال‌های آزاد داشت. اثر همزمان منطقه و بسته‌بندی بر درصد مهار رادیکال آزاد و قند کل تفاوت معنی‌داری داشت. نمونه‌های منطقه آق‌قلا نگهداری شده در شیشه پس از مدت

*مسئول مکاتبه: aghasemnajad@hotmail.com

انبارداری نسبت به سایر نمونه‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشتند. همچنین در مقایسه با سایر تیمارها این نمونه‌ها بویژه در زمان نگهداری در پاکت پلاستیکی نسبت به سایر نمونه‌ها بیشترین میزان قندکل را داشت.

نتیجه‌گیری: بیشترین میزان فلاونوئیدکل، قندکل و قنداحیا پس از پایان انبارداری به ثبت رسید. نمونه‌های گیاهی رشدیافته در منطقه آق‌قلا از نقطه‌نظر بیوشمیایی (فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قندکل و قنداحیا) غنی‌تر از منطقه گرگان بود. این موضوع نشان‌دهنده اثر تنش محیطی در فرایندهای بیوشیمیایی گیاه استویا در این منطقه است. بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد در نمونه‌های نگهداری شده در ظروف شیشه‌ای دربسته مشاهده شد. در نهایت نمونه‌های گیاهی آق قلا، ظروف نگهداری شیشه‌ای و مدت زمان انبارداری سه ماه برای استویا پیشنهاد شد.

واژه‌های کلیدی: فنل‌کل، فلاونوئیدکل، زمان، منطقه، بسته‌بندی

مقدمه

امروزه مصرف گیاه استویا به‌عنوان نسل جدیدی از شیرین‌کننده‌های طبیعی کم‌کالری به‌منظور کنترل وزن بدن و کاهش قند خون رواج یافته و جایگزین مناسبی برای شیرین‌کننده‌های مصنوعی مانند آسپارتام، ساخارین و سیکلامات می‌باشد. استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni. گیاهی است از خانواده آستراسه که به‌صورت وحشی در جنوب آمریکا، پاراگوئه و برزیل پراکنش داشته و از صدها سال پیش در این مناطق به‌عنوان گیاه شیرین کننده، کاهنده قند خون، هاضم، مرهم پوست، درمانگر بیماری‌های عفونی، قارچی و باکتریایی، درمانگر سرما خوردگی و آنفولانزا و درمانگر عفونت‌های لثه شهرت داشته است (۱٤، ۱۷، ۲۸، ۳۰). این گیاه در سال ۲۰۰۸ از طرف سازمان جهانی غذا و دارو به‌دلیل فقدان کربوهیدرات فعال و عدم تأثیر گلیکوزیدهای شیرین موجود در آن در میزان قند خون به‌عنوان یک ماده غذایی ایمن تأیید شد (۱۸، ۲۲، ۳۲). استویا همانند سایر گیاهان پس از جمع‌آوری، مقادیر فراوانی رطوبت در خود دارد که این امر شرایط مطلوب برای رشد میکروارگانیسم‌ها و اکسیداسیون ترکیبات را به‌وجود می‌آورد. تا جایی که نگهداری این گیاه حتی برای مدت کوتاهی غیرقابل امکان می‌شود. بدین منظور با عمل خشک کردن میزان رطوبت اندام دارویی گیاه با استفاده از عمل تبخیر تا حد رسیدن به آستانه خاص کاهش می‌یابد، تا محصول برای مدت طولانی قابل نگهداری باشد. اما حتی با وجود خشک کردن اندام‌ها با گذشت زمان و قرار گرفتن در معرض نور، هوا و میکروارگانیسم‌ها، خواص دارویی خود را از دست می‌دهند و این امر سبب افت کیفیت این گیاهان می‌گردد. در ایران به‌دلیل عرضه سنتی این داروها و در واقع به‌دلیل عدم وجود بسته‌بندی متناسب با نوع گیاه، اعتمادی به سلامت این نوع داروهای گیاهی وجود ندارد. همچنین عدم بسته‌بندی متناسب با هر گیاه در طول فرآیند توزیع و صادرات آن باعث کاهش کیفیت گیاهان دارویی ایران در مقایسه با تولیدات سایر کشورها شده است (۱۰). استانداردهای مناسب جهانی بسته‌بندی ضامن پذیرش محصولات دارویی در بازارهای جهانی خواهد بود. با ایجاد بسترهای مناسب در زمینه جلوگیری از هدر رفتن این ثروت ملی، صادرات گیاهان دارویی با کیفیت و براساس تقاضای جهانی صورت خواهد گرفت و با رعایت استانداردهای کیفی می‌توان سود بالایی به‌لحاظ اقتصادی از تجارت گیاهان دارویی بدست آورد (۱۰). از آنجایی که استویا به‌دلیل ارزش دارویی و ارزش غذایی بالا، تقاضای بسیاری در بازار جهانی داشته و ایران به‌دلیل داشتن شرایط مناسب موقعیت

پرورش این گیاه را دارد. بنابراین مطالعه در مورد بسته‌بندی، مدت زمان انبارداری و منطقه کشت این گیاه در ایران امری لازم و ضروری است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ابتدا شرایط اقلیمی، هواشناسی و همچنین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک دو منطقه شصت‌کلا (جلگه‌ای) و مزرعه نمونه آق‌قلا (نیمه بیابانی) مورد آنالیز قرار گرفت. سپس از برگ‌های گیاه استویا کشت شده در این دو منطقه استفاده شد (جدول ۱ و۲). در طول دوره رشد گیاهان آزمایشی از نظر کوددهی و آبیاری در شرایط برابری قرار داشتند. گیاهان در اواسط اردیبهشت‌ماه و به‌منظور حصول کیفیت حداکثری صبح هنگام برداشت شده و در اتاق در دمای تقریبی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت پایین خشک شدند. نمونه‌های خشک شده گیاه در ظروف شیشه‌ای، پاکت کاغذی معمولی، فومی و کیسه پلاستیکی فریزر از جنس پلی‌اتیلن با دانسیته بالا بسته‌بندی شده و در شرایط و دمای اتاق به مدت سه ماه نگهداری شدند.

جدول ۱- مشخصات خاک محل آزمایش (دو منطقه کاشت)

Table 1. Specifications of the experiment site (two planting areas)

صفات خاک Soil traits	آق قلا Aghghala	گرگان Gorgan
هدایت الکتریکی EC (دسی زیمنس بر متر)	۰/۹۶	۰/۹۰
pH	۸/۲	۷/۹
کل مواد خنثی‌شونده T.N.V (درصد)	۱٤/۳	۱٦/٦
مواد آلی O.M (درصد)	۰/۹۸	۱/٤۰
نیتروژن کل (درصد) Total nitrogen (%)	۰/۰٥٤	۰/۰٦٦
بافت خاک soil texture	لوم رس Clay loam	لوم رس سیلتی Silicate clay loam
عمق نمونه‌برداری Sampling depth	۳۰ سانتی‌متر (cm)	۳۰ سانتی‌متر (cm)

جدول ۲- آمار هواشناسی مربوط به منطقه‌ی آق‌قلا و گرگان

Table 2. Meteorological statistics related to the Aghqhala and Gorgan regions

	میانگین درجه حرارت Average temperature ^{0}C	میانگین بارندگی Average rainfall mm	میانگین روزهای بارندگی Average rainfall days	میانگین میزان تبخیر Average evaporation rate mm	میانگین رطوبت نسبی Average relative humidity ٪	میانگین ساعات آفتابی Sunny hours average H
٦ ماهه اول سال- آق‌قلا 6th month of the first year -Aghghala	۲۳/۱	۱٦/۷	٥/۳	۱٥۸	٥۹	۲٤٥/۳٥
٦ ماهه اول سال- گرگان 6th month of the first year - Gorgan	۲٤	۲۰/٥	٦	۱۷٤/٥	۷۰/۷	۲۳٤/۲

اندازه‌گیری فنل کل: در شروع کار (زمان اول) و پس از مدت تعیین‌شده شاخص‌های کیفی برگ از جمله توانمندی آنتی‌اکسیدانی که شامل اندازه‌گیری میزان فنل کل با روش فولین سیوکالتو (۳۱) اندازه‌گیری شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره بیان شد؛ به‌طور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره متانولی با ۱/۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو مخلوط شد. بعد از گذشت ۵ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به آنها افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن، درون حمام آب با دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر (UV1800) در طول موج ۷٦۰ نانومتر ثبت و مقدار فنل کلبر حسب اسیدگالیک به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

سنجش فلاونوئید کل: فلاونوئید کل با روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید (٦) اندازه‌گیری شد و به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ۳۰ دقیقه در طول موج ٤۱۵ نانومتر نسبت به شاهد (متانول ۸۰ درصد) اندازه‌گیری گردید. میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها براساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد. برای تعیین میزان فلاونوئید کل از رابطه استاندارد کوئرستین (رابطه ۱ Y=0.7735X) استفاده گردید.

قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH: درصد مهار رادیکال‌های آزاد با استفاده از روش DPPH (٢٤) انجام شد. ۲ میلی‌لیتر عصاره متانولی با ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۰۰٤ درصد DPPH مخلوط گردید. محلول کنترل شامل ۲ میلی‌لیتر DPPH و ۲ میلی‌لیتر متانول بود. محلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شده و جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد (مخلوط متانول و DPPH) خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد هر عصاره به کمک رابطه ۲ محاسبه شد.

رابطه ۲ $I\% = (A_{control} - A_{sample}) / A_{control} \times 100$

میزان قند کل و احیاء: میزان قند کل و احیاء با روش فهلینگ (۱۳) اندازه‌گیری و تغییرات آن‌ها با میزان ترکیبات ذکر شده در شروع انبارداری (زمان اول و شروع کار) مقایسه شد. برای تعیین قندهای احیاءکننده قبل از هیدرولیز یک گرم از نمونه در آب دیونیزه با استفاده از همزن مغناطیسی حل شده و به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به حجم ۵ میلی‌لیتر از محلول‌های فهلینگ A و B ۱۵ میلی‌لیتر محلول فوق اضافه گردید و تیتراسیون مطابق روش بالا صورت پذیرفت. درصد قندهای احیاکننده با استفاده از رابطه ۳ به‌دست آمد:

رابطه ۳ $S= ((F\times250)/ (V\times W\times1000))\times 100$

S گرم قندهای احیاء کننده در نمونه، F: عیار فهلینگ، V: حجم محلول استاندارد مصرف شده، W: وزن نمونه

برای تعیین قندهای احیا کننده به ۵ میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های فهلینگ A و B ۲۵ میلی‌لیتر محلول فوق تا رسیدن به حجم ٤۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد. تیتراسیون همانند روش قبلی صورت پذیرفت. درصد قندهای احیاء کننده بعد از هیدرولیز با استفاده از رابطه ٤ محاسبه گردید.

رابطه ٤

$S= ((F\times250\times100)/ (V\times W\times50\times1000))\times 100$

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل معنی‌داری صورت گرفت.

نتایج و بحث

ویژگی‌های بیوشیمیایی یکی از مهمترین پارامترهای اندازه‌گیری است که در فرآوری گیاهان دارویی در صنعت غذا و دارو مورد توجه قرار می‌گیرد. در این تحقیق اثر زمان، منطقه، نوع بسته‌بندی و اثر متقابل آنها بر شاخص‌ها و ترکیبات بیوشیمیایی برگ استویا در فرایند انبارداری مورد بررسی قرار گرفت. جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که زمان اندازه‌گیری بر تمامی پارامترهای اندازه‌گیری شده اثر معنی‌داری داشت ($P<0/01$). منطقه و بسته‌بندی تنها بر میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد اثر معنی‌داری داشت ($P<0/01$).

اثر زمان بر میزان فنل، فلاونوئید و درصد مهار رادیکال‌های آزاد: بر اساس اندازه‌گیری‌های صورت گرفته، میزان فنل و درصد مهار رادیکال‌های آزاد نمونه‌های برگ استویا خشک شده در زمان شروع کار در بالاترین میزان بود و با گذشت زمان انبارداری از این میزان بصورت معنی‌دار کاسته شد. در مقابل میزان فلاونوئید با دوره انبارداری رابطه مستقیم داشته و بیشترین مقدار آن در پایان دوره مشاهده شده که نسبت به دوره اول اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ٤). به‌عبارت دیگر در دوره انبارداری ترکیباتی فنلی به ترکیبات فلاونوئیدی تبدیل شدند؛ بطوریکه در درصد مهار رادیکال‌های آزاد نمونه‌های انباری موثر بوده و این موضوع بیانگر تغییرات بیوشیمیایی در نمونه‌های گیاهی خشک است.

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان ترکیبات بیوشیمیایی برگ خشک‌شده استویا

Table 3. Analysis of variance for the stevia dried leaves biochemical composition

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	فنل Phenol	فلاونوئید Flavonoid	درصد مهار رادیکال آزاد Free radical scavenging percent	قند کل Total sugar	قند احیا Reducing sugar
زمان Time	۱	٦۳/٥٥**	۲٥/۲۷**	۱٦٦/۳۳**	۱۸۲۸۹۷۲**	۹۰۰۱۰۸/۲**
منطقه Location	۱	۰/۸۱^{ns}	۰/۰۰٦^{ns}	۱۰۸/٥۲**	۱٦٥۷۷/۹۳^{ns}	۱۷۱۰/۹^{ns}
بسته بندی Packing	۳	۰/۳۲^{ns}	۰/۲٥^{ns}	۸۱/٦٥**	٥۳۷٦/٦۳^{ns}	٤۳۱٥/۳۰۹^{ns}
زمان× منطقه Time × Location	۱	۰/۸۱^{ns}	۰/۰۰٦^{ns}	۱۰۸/٥۲**	۱٦٥۷۷/۹۳^{ns}	۱۷۱۰/۹^{ns}
زمان × بسته‌بندی Time × Packing	۳	۰/۳۲^{ns}	۰/۲٥^{ns}	۸۱/٦٥**	٥۳۷٦/٦۳^{ns}	٤۳۱٥/۳۰۹^{ns}
منطقه× بسته بندی Location× Packing	۳	۰/۰٦^{ns}	۰/۳۲^{ns}	٤٥/۷۲*	۷۲۲۲۱/٥٥**	۳۲۸۸/۷۹^{ns}
زمان × منطقه ×بسته بندی Time × Location× Packing	۳	۰/۰٦^{ns}	۰/۳۲^{ns}	٤٥/۷۲*	۷۲۲۲۱/٥٥**	۳۲۸۸/۷۹^{ns}
خطا Error		۰/۳	۱/۲۹	۱۲/۱۲	۱۱۷٥٤/۳٥	۱۲۲٤٥/۱۸
ضریب تغییرات CV		۱٥/۷	۱٤/۸۱	٦/۰۹	٤۷/٦۷	۱۲/٥٥

** و * اثر معنی‌داری به ترتیب در سطح احتمال ۱ و ٥ درصد، ns عدم معنی‌داری.

* ,** and ns: Significancy at 1% and 5% probability values and non-significant effects

اثر زمان بر میزان قند کل و احیا: داده‌های حاصل از مقایسه میانگین‌ها (جدول ٤) نشان داد که مدت زمان انبارداری اثر افزایشی معنی‌داری بر میزان قند کل و قند احیاء برگ خشک شده گیاه استویا داشت؛ به‌نحوی‌که بیشترین میزان قند کل و قند احیاء ۳ ماه پس از انبارداری حاصل گردید.

اثر منطقه بر میزان فنل، فلاونوئید و درصد مهار رادیکال‌های آزاد: براساس مشاهدات صورت گرفته، منطقه کشت اثر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نداشت (جدول٤). درصد مهار رادیکال آزاد نمونه‌های برگ استویا که از منطقه آق‌قلا برداشت شدند، نسبت به برگ‌های برداشت شده از منطقه گرگان بیشتر بود (جدول ٤). به عبارت دیگر نمونه‌های به‌دست آمده از منطقه خشک‌تر با خاکی شور ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری داشتند. به دنبال تنش خشکی و شوری، تنش‌های ثانویه نظیر تنش اکسیداتیو بروز می‌کند که در این حالت، تولید و انباشتگی رادیکال‌های فعال به اکسیدشدن پروتئین‌ها، لیپیدها و در نهایت مرگ سلول منجر می‌شود (۲۵، ۲۷). در تعدادی از گونه‌های گیاهی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش کلیدی در تحمل به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند (۱۱، ۲۹). گیاهان برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو از سیستم دفاعی مؤثر شامل فعالیت‌های آنزیمی و شیمیایی استفاده می‌کنند. در کنار مهمترین آنزیم‌های دخیل در فعالیت آنتی‌اکسیدانی شامل اسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسیددسموتاز، پراکسیداز، گلوتاتیون‌ردوکتاز، ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی بویژه فلاونوئیدها با توجه به ماهیت ساختاری خود نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند (۳٤). غلظت این بیومولکول‌ها پس از مواجه گیاه با عوامل تنش‌زا به‌سرعت افزایش یافته و هزینه‌های پاسخ به تنش را در گیاه تعدیل می‌کنند. از آنجا که گیاهان رشدیافته در منطقه آق‌قلا نسبت به گیاهان رشدیافته در منطقه گرگان با خاک و آب شور، آب و هوای نیمه‌خشک و کم‌بارش‌تری روبه‌رو بودند، همواره در برابر تنش شوری و خشکی قرار گرفته و در نتیجه فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در این گیاهان بیشتر بود.

جدول ٤- مقایسه میانگین اثرات ساده صفات اندازه‌گیری شده

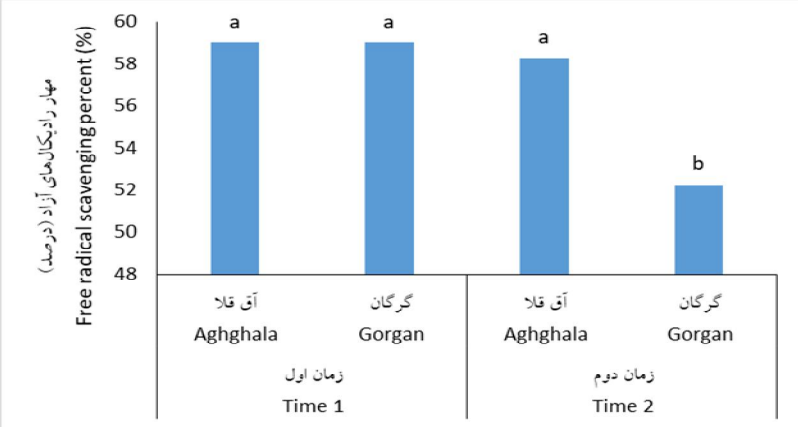
Table 4. Comparison of the average effects of measured traits

	فنل Phenol	فلاونوئید Flavonoid	درصد مهار رادیکال آزاد Free radical scavenging percent	قند کل Total sugar	قند احیا Reducing sugar
زمان اول Time 1	٤/٦٣ a	٦/٩٥ b	٥٨/٩٨ a	٣٢/٢٢ b	٣٩/٩٥ b
زمان دوم Time 2	٢/٣٣ b	٨/٤١ a	٥٥/٢٧ b	٤٢٢/٦٣ a	٣١٣/٨٤ a
منطقه اق قلا Aghghala	٣/٣٥ a	٧/٦٧ a	٥٨/٦٣ a	٢٤٦/٠١ a	١٨٢/٨٧ a
منطقه گرگان Gorgan	٣/٦١ a	٧/٦٩ a	٥٥/٦٢ b	٢٠٨/٨٤ a	١٧٠/٩٣ a
شیشه مربایی Jam glass	٣/٤٤ a	٧/٨٩ a	٦٠/٢٨ a	١٩٥/٨٣ a	١٦٢/٥ a
پاکت کاغذی Paper bags	٣/٣٣ a	٧/٦٥ a	٥٦/١٨ bc	٢٣٦/٤٩ a	١٩٨/٤٨ a
پاکت پلاستیکی Plastic bags	٣/٧٢ a	٧/٦١ a	٥٤/١٤ c	٢٤٠/٩٧ a	١٥٩/٥٢ a
فوم Foam	٣/٤٥ a	٧/٥٧ a	٥٧/٩١ ab	٢٣٦/٤ a	١٨٧/٠٩ a

اثر منطقه بر میزان قند کل و احیا: با توجه به جدول ٤ اگرچه روند تغییرات میزان قند کل و احیاء در برگ استویا کاشته شده در منطقه آق‌قلا نسبت به گرگان افزایشی بود، با این وجود این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. قندها به عنوان مهمترین گروه اسمولیت‌های گیاهی در تنظیم پتانسیل سلول‌های ریشه نقش مهمی دارند (۳۳). با در نظرگرفتن شرایط آب و هوایی آق‌قلا نسبت به گرگان بویژه سطح تبخیر بیشتر و دمای بالاتر در کنار املاح بیشتر، عدم تفاوت معنی‌دار در میزان قند را شاید بتوان به فاصله کوتاهتر آبیاری گیاهان در شرایط کشت آق قلا نسبت داد. توانایی گیاهان در مقاومت به تنش‌های مختلف متفاوت است. این مقاومت می‌تواند به صورت اجتناب از تنش و تحمل تنش طبقه‌بندی شود. یک گیاه می‌تواند از طریق ایجاد موانع فیزیکی و یا متابولیکی از بروز تنش اجتناب کند. در شرایط تنش، تجمع مواد محلول به گیاهان اجازه می‌دهد تا با حفظ تورژسانس سلول به رشد خود ادامه دهند. البته این پدیده که در نتیجه تولید اسموپروتکتانت‌ها ایجاد می‌شود، شاخص تعیین مقاومت گیاه به استرس بویژه شوری و خشکی بوده و گیاهان بر اساس این قابلیت به گیاهان مقاوم و غیرمقاوم به شوری و خشکی تقسیم‌بندی می‌شوند (۱، ٤، ۷، ۲٦).

نتایج برخی مطالعات نشان داد که شوری موجب تجزیه نشاسته و تجمع قندها در گیاهچه برنج می‌شود (۸). آنتولین و همکاران (۱۹۹۳) اعلام کردند که انباشت قندهای محلول واکنش سریعی نسبت به تغییرات محتوی نسبی آب و پتانسیل آب برگ‌ها دارند (۳). همان گونه که از جدول تجزیه واریانس (۳) مشاهده می‌شود، درصد مهار رادیکال‌های آزاد نمونه‌ها در شرایط بسته‌بندی متفاوت تغییرات معنی داری نسبت به هم داشتند. در مقابل تغییرات فنل کل، فلاونوئید کل برگ استویا و قند کل و احیاء تحت تأثیر نوع بسته‌بندی قرار نگرفت.

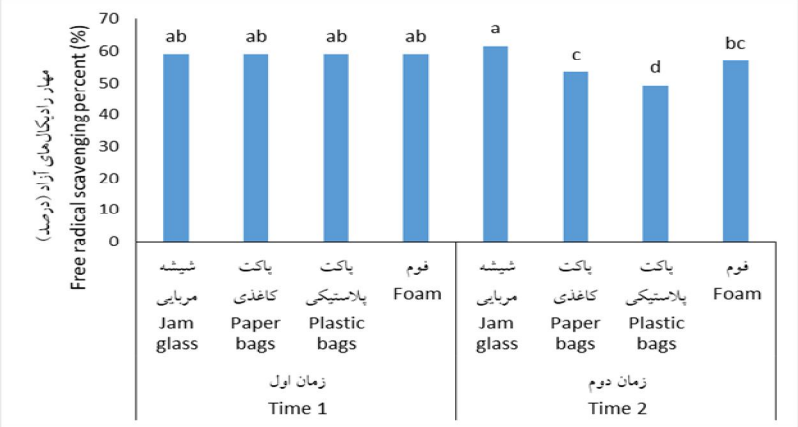
نتایج نشان داد که بسته‌بندی در شیشه مربایی، پایداری اکسایشی معنی‌داری در مقایسه با سایر نمونه‌های بسته‌بندی ایجاد کرد. حفظ ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برگ استویا در شیشه مربایی می‌تواند به‌دلیل عدم نفوذ هوا، سازگاری شیشه و عدم وجود ترکیبات اکسایشی در ترکیبات شیشه باشد (جدول ٤). نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که از میان صفات اندازه‌گیری شده اثر متقابل زمان و منطقه تنها بر میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد اثر معنی‌داری داشت. طبق داده‌های حاصل از نمودار مقایسه میانگین (شکل ۱) بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد در زمان دوم و منطقه آق قلا مشاهده شد.



شکل ۱- اثر زمان و منطقه بر درصد مهار رادیکال آزاد برگ استویا

Figure 1. Effect of time and location on the free radical scavenging activity of stevia leaf

نتایج حاصل از آزمایش تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر متقابل زمان و بسته‌بندی تنها بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد اثر معنی‌داری داشته و سایر صفات اندازه‌گیری تحت تأثیر آن قرار نداشت. براساس نمودار مقایسه میانگین بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد در زمان دوم و بسته‌بندی شیشه مربای مشاهده شد که نسبت به بسته‌بندی‌های دیگر در همان زمان اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۲). با این وجود در مقایسه با زمان اول اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.



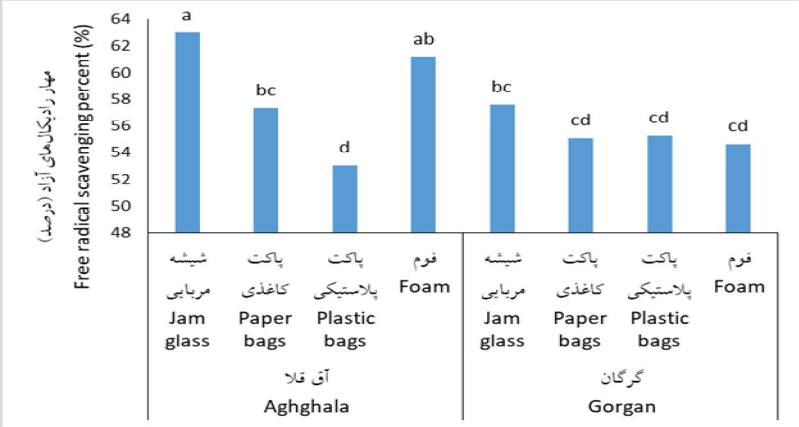
شکل ۲- اثر زمان و بسته‌بندی بر درصد مهار رادیکال آزاد برگ استویا

Figure 2. Effect of time and packing on the free radical scavenging activity of stevia leaf

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر متقابل منطقه و نوع بسته بندی بر میزان فنل، فلاونوئید کل و قند احیاء معنی‌دار نبود. با این وجود درصد مهار رادیکال آزاد و تغییرات قند کل نمونه‌ها تحت تأثیر منطقه رشد گیاه و نوع بسته‌بندی قرار داشت. طبق داده‌های مقایسه میانگین (شکل ۳) بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد در نمونه‌های گیاهی رشدیافته در منطقه آق‌قلا بسته‌بندی شده شیشه مربایی و فوم مشاهده شد. در مقابل نمونه‌های بسته‌بندی‌شده در کیسه‌های پلاستیکی یکبار مصرف (پلی اتیلن) کمترین توانمندی آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند. دلیل این یافته ممکن است به تبادل گازی و رطوبتی بسته بندی مرتبط باشد. بابالار و همکاران (۲۰۱٤) در بررسی اثر نوع بسته‌بندی بر کیفیت بادرشبی گزارش کردند که در فرایند انبارداری کمترین میزان تغییر اسانس نمونه‌های بسته‌بندی شده در بسته‌بندی های پلی‌اتیلن-پلی‌آمیدی تحت‌خلأ و تاریکی اتفاق افتاده است؛ درحالی‌که بیشترین کاهش اسانس بادرشبی در بسته‌های پلی‌اتیلنی قابل نفوذ مشاهده شده است (٤). نکته جالب اینکه وجود یا عدم وجود نور در شرایط بسته‌بندی و کیفیت محصول برداشت شده در تحقیق آنها موثر بود؛ به‌نحوی‌که نمونه‌های بسته‌بندی شده در پاکت‌های پلی‌اتیلنی-پلی‌آمیدی حاوی ۵ درصد اکسیژن و ۹۵ درصد نیتروژن که تحت تابش نور بودند، بطور قابل‌توجهی نسبت به تاریکی کاهش اسانس داشتند. بنابراین می‌توان بیان کرد که نه تنها نوع بسته‌بندی و میزان دسترسی به اکسیژن، نور و دما نیز بر میزان تغییرات محصول برداشت شده موثر خواهد بود.

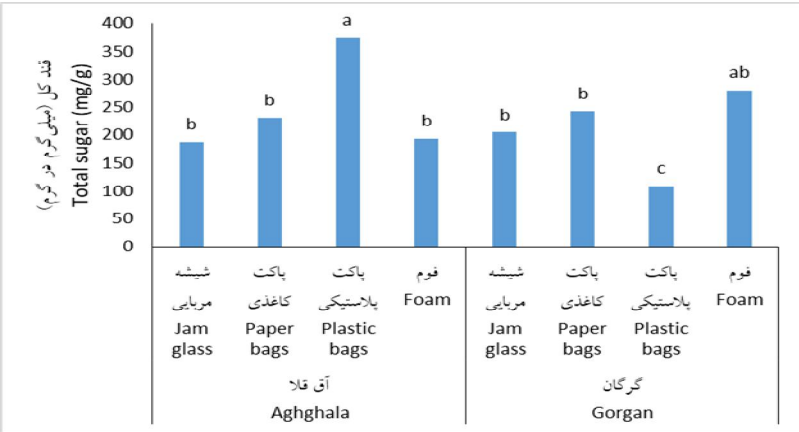
نکته جالب اینکه نه تنها درصد مهار نمونه‌های منطقه گرگان نسبت به آق‌قلا کمتر بود، بلکه تحت تأثیر نوع بسته بندی مقدار آنها تغییر قابل‌توجهی نداشت (شکل ۳). همچنین اثر متقابل این دو تیمار بر میزان قند کل معنی دار بود؛ به‌نحوی‌که بیشترین

میزان قند کل از نمونه‌های برگی برداشت شده از منطقه آق‌قلا بسته‌بندی شده در کیسه پلاستیکی مشاهده شد. البته از نقطه نظر آماری تغییرات میزان قند کل در برگ استویا برداشت شده از آق قلا و بسته‌بندی شده در شیشه مربایی، پاکت کاغذی و فوم ثابت و فاقد اثر معنی‌داری بود. در مقابل بیشترین مقدار قند کل در برگ استویا برداشت شده از گرگان در بسته بندی فوم و کمترین میزان این در بسته‌بندی پلاستیک فریزر مشاهده شد (شکل ٤) که دلیل این یافته به‌درستی روشن نیست.



شکل ۳- اثر منطقه و بسته‌بندی بر درصد مهار رادیکال آزاد برگ استویا

Figure 3. Effect of location and packing on the free radical scavenging activity of stevia leaf



شکل ٤- اثر منطقه و بسته‌بندی بر میزان قند کل برگ‌های خشک شده استویا

Figure 4. Effect of location and packing on the total sugar content of stevia dried leaves

افزایش توانمندی آنتی‌اکسیدانی گیاهان پرورش یافته در منطقه آق قلا نسبت به گرگان را می‌توان به شرایط متفاوت آب و هوایی بویژه شدت نور نسبت داد. بخش اعظم فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مواد گیاهی به تجمع ترکیبات فنیل پروپانوئیدی از جمله فلاونوئیدها مرتبط است (٢٦). ترکیبات فلاونوئیدی به‌عنوان سپر حفاظتی گیاه در مقابل طول موج‌های مخرب فرابنفش نور خورشید در اپیدرم بافت‌های گیاهی تجمع می‌یابند. این ترکیبات نه تنها مراکز فتوسنتزی را از آسیب‌های مستقیم نور فرابنفش حفظ می‌نمایند بلکه رادیکال‌های احتمالی ناشی از انواع تنش‌های محیطی را خنثی می‌کنند. با بررسی تفاوت آب و هوایی گرگان و آق قلا می‌توان به این تفاوت پی برد. همانگونه که در شکل ۳ نشان داده شده است،

اگرچه تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های گیاهی تحت تأثیر نوع بسته‌بندی قرار داشت، با این وجود توانمندی آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های برداشت‌شده از آق‌قلا برتری محسوسی داشت؛ بطوری‌که پس از پایان انبارداری بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های آق قلا بسته‌بندی شده در شیشه مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

نتایج بررسی حاضر نشان داد که در مقایسه با نمونه‌های تازه برداشت شده، منطقه و نوع بسته‌بندی بر شاخص‌های کیفی مهم برگ استویا از جمله بر درصد مهار رادیکال آزاد، قند کل و قند احیاء برگ استویا موثر بوده و میزان این اثرپذیری با گذشت زمان افزایش می‌یابد. گیاه با تأثیرپذیری از شرایط محیطی و ادافیکی محیط رشد خود نحوه رشد و تنوع ترکیبات بیوشیمیایی خود را تنظیم می‌نماید. نه تنها کیفیت مواد گیاهی در زمان برداشت با شرایط رشدی بویژه پارامترهای یادشده رابطه مستقیم دارد، بلکه نوع بسته‌بندی و شرایط انبارداری و تغییرات کیفی مواد گیاهی نگهداری شده با شرایط رشدی گیاه مادری رابطه تنگاتنگ دارد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، برگ‌های برداشت شده از منطقه آق‌قلا به لحاظ پتانسیل بیوشیمیایی غنی‌تر از منطقه گرگان بود. همچنین برای برگ‌های خشک شده استویا ظروف شیشه جهت حفظ حداکثری توانمندی آنتی‌اکسیدانی برگ بهتر بوده و توصیه می‌شود که برای نگهداری طولانی مدت استویا برای مصارف خانگی در شیشه نگهداری شود.

منابع

1. Ahmad, M.S., Ashraf, M., and Ali, Q. 2010. Soil salinity as a selection pressure is a key determinant for the evolution of salt tolerance in Blue Panic grass (*Panicum antidotale* Retz.). J. of Flora. 205: 1.37-45.
2. Ahmadi, S.H., and Niazi Ardekani, J. 2006. The effect of water salinity on growth and physiological stages of eight canola (*Brassica napus*) cultivars. Irrigation Science. 25: 11–20.
3. Antholine, W.E., Hanna, P.M., and McMillin, D.R. 1993. Low frequency EPR of *Pseudomonas aeruginosa* Azurin. Biophysical J. 64: 1.267-272.
4. Babalar, M., Mohtashemi, S., Ebrahimzadeh., Mousavi, S.M., and Mirjalili, M.H. 2014. The effect of different packing methods on quantitative and qualitative characteristics of herb *Dracocephalum moldavica*. Iranian Herbal Medicines and Herbs Research. 30: 1.142-157.
5. Blum, A. 1996. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. Plant Growth Regulation. 20: 135-148. In: E. Belhassen, (Ed). Drought tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis. Kluwer Academic Publishers.
6. Bolarin, N.C., Santa-Cruz, A., Cayuela, E., and Perez-Alfocea, F. 1995. Short-term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedling under salinity. J. of Plant Physiology. 147: 4.463-468.
7. Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2006. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. of Food and Drug Analysis. 10: 3.178-182.
8. Dow, E. W., Daynard, T. B., Muldoon, J. F., Major, D. J., and Thutell, G. W. 1984. Resistance to drought and density stress in Canadian and European maize (*Zea mays* L.) hybrids. Canadian J. of Plant Science. 64: 3.575-585.
9. Dubey, R.S., and Rani, M., 1999. Influence of NaCl salinity on growth and metabolic status of proteins and amino acids in rice seedling. J. of Agronomy. 162: 2.97-106.
10. Duke, J. 1993. *Stevia rebaudiana* (Bert). In: Duke J. ed. CRC Handbook of Alternative Cash Crops. CRC Press. Pp. 422-424.

11. Ebadi, M.T. 2015. Principles of medicinal and aromatic plants packaging and storage. Baghdar Magazine. 97: 19-26. (In Persian).
12. Fadrzilla, M.M., Finch, R.P., and Burdon, R.H. 2007. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. J. of Experimental Botany. 48: 307.325-331.
13. Fakhraee , S. H., Digger, Z., Mehri, A., Larijani, B., and Ranjbar, Sh. H. 2013. A systematic review of the efficacy and safety of *Urtica dioica* in the treatment of diabetes. Iranian J. of Diabetes and Lipid. 12: 6.500-523.
14. Fehling, F. 1849. "Die quantitative Bestimmung von Zucker und Stärkmehl mittelst Kupfervitriol". Annalen der Chemie und Pharmacie. 72: 1.106-113.
15. Ginsberg, H. 2000. Insulin resistance and cardiovascular disease. J. of Clinical Investigation. 106: 453-458.
16. Goettemoller, J., and Ching, A. 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana* in: Janik J. ed. Perspectives on new Crops and new Uses. Journal of American Society for Horticultural Science. 510-511.
17. Gomez-Perez, F.J., Aguilar-Salinas, C.A., Almeda-Vales, P., Cuevas-Ramos, D., Lerman Garber, I., and Rull, J.A. 2010. HBA1c for the diagnosis of diabetes mellitus in a develping country. Archives of Medical Research. 41: 4.302-308.
18. Gosh, S., Subudhi, E., and Nayak, S. 2008. Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extract against 10 pathogens. International Journal of Integrative Boilogy. 2: 1.27-31.
19. Gujral, S. 2004. Stevia: 0% Calorie, 100% nature. Science techonology Entrepreneur. 12: 10.1-7.
20. Hashemi, N., Rabiee, H., Tavakolipour, H., and Gazerani, S. 2014. Effect of Stevia (*Stevia rebaudiana*) as a substitute for sugar on physicochemical, rheological and sensory properties of dietary saffron syrup. Saffron Agronomy and Technology. 2: 4.303-310.
21. Kochhar, A., Dhindsa, S., and Sachdeva, R. 2008. Effect of stevia (*Stevia rebaudiana*) leaf powder supplementation and nutrition counselling on anthropometric parameters and gain in knowledge of the subjects. Studies on Ethno-Medicine. 2: 2.107-113.
22. Kriedemann, P. E. 1986. Stomatal and photosynthetic limitations to leaf growth. Functional Plant Biology. 13: 1.15-31.
23. Lemus-Mondaca, R., Vega-Galvez, A., Zura-Bravo, L., and Ah-Hen, K. 2012. *Stevia rebaudiana Bertoni*, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive Review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry. 132: 3.1121–1132.
24. McKersie, B.D., and Leshem, Y.Y. 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, London.
25. Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., and Vanbeek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry. 85: 2.231-237.
26. Moharram, H.A., and Youssef, M.M. 2014. Methods for determining the antioxidant activity: A Review. Alexandria J. of Food Science and Technology. 11: 1.31-42.
27. Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., and Therios, I. 2006. Boron induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM9 (*Malus domestica Borkh*). Environmental Experimental Botany. 56: 54-62.
28. Monneveux, P., and Belhassen, E. 1996. The diversity of drought adaptation in the wide. Plant Growth Regulation. 20: 85-92. In: E. Belhassen (Ed.). Drought tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis. Kluwer Academic Publishers.
29. Nasir Khan, M., M.H. Siddiqui, F. Mohammad, M. Masroor, A. Khan and M. Naeem. 2007. Salinity induced changes in growth, enzyme activities, photosynthesis, proline accumulation and yield in linseed genotypes. World J. of Agricultural Science. 3: 5.685-695.

30. Ojha, A., Sharma, V.N., and Sharma, V. 2010. An efficient protocol for in vitro clonal propagation of natural sweetener plant (*Stevia rebaudiana Bertoni*). African J. of Plant Science. 4: 8.319-321.
31. Raza, S.H., Ashraf, M., and Athar, H.R. 2007. Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzyme activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance. Environmental and Experimental Botany. 60: 3.368-376.
32. Reis, M., Coelho, L., Santos, G. Kienle, V., and Beltrao, J. 2015. Yield response of stevia (*Stevia rebaudiana Beroni*) to the salinity of irrigation water. Agricultural water Management. 152: 217-221.
33. Slinkard, K., and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. American J. of Enology and Viticulture. 28: 1.49-55.
34. Snehal, R., and Madhukar, KH. 2011. Quantitative estimation of biochemical content of various extracts of *stevia rebaudiana* leaves. Asian J. of Pharmaceutical and Clinical Research. 5: 1.115-117.
35. Tarahomi, G., lahouti, M., and Abbassi, F. 2010. The effect of drought stress on soluble sugars, chlorophyll and potassium *Salvia leriifolia Benth*. The Quarterly J. of Animal Physiology and Development. 9: 2.1-7.
36. Walker, M.A., and McKersie, B.D. 1993. Role of the ascorbateglutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. J. of Planta Physiology. 141: 2.234-239.

EJFPP, Vol. 12 (2): 67-80
http://ejfpp.gau.ac.ir

Evaluation of the biochemical changes in stevia leaves affected by storage time, cultivation region, and packaging type

A. Ghasemnejad[1*], M. Ahmadi[2], A. Tanouri[2], M.M. Farzinia[2]
[1]Associate Professor, Faculty of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Graduated, Faculty of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
Received: 2018/02/18; Accepted: 2019/03/09

Abstract

Background and objective: Stevia is a valuable medicinal plant. However, by introduction of stevia as non-calorie sweetener its demand is increased worldwide. Consequently, the important step after medicinal plant cultivation is proper planning for its processing and packaging. The main objective of this study was to evaluate the effects of storage time, cultivation region, and type of packaging on the biochemical composition of Stevia plant.

Materials and methods: This research was designed concerning the effects of storage time, growing region, and the type of packaging, on the stevia dried leaves quality, based on factorial design with four replications. For this purpose, leaf samples were collected from both Gorgan and Aghghala as steppe and semi-arid lands, respectively. The harvested leaves were dried under shad conditions and kept for three months in different packages including glass, plastic, paper and foam types. Finally, the visual quality of the samples and the variation of chemical compounds at the end of experiment were investigated compared to the control. Finally, total phenol (Folin-Ciocalteu), total flavonoids, DPPH scavenging antioxidant activity, total sugar, and reduced sugar content (Fehling) were measured.

Results: Analysis of variance showed that the total phenolic compounds as well as flavonoid contents were decreased by storage time. The highest antioxidant activity as well as the highest total sugar content was observed in the leaves collected from Aghghala area. The antioxidant activity of stored samples was relatively lower than that of control. Unlike, the reducing sugar and total sugar of samples showed increasing trend over the storage time. The cultivation area and the type of packaging showed significant effects on the antioxidant activity. Among different types of packaging materials, the highest antioxidant activity was observed in the samples stored in glass packaging. In contrast, the reducing sugar of stevia leaf extract increased in the package of paper packets and plastic bags. The investigated packages did not show significant effect on the total phenol and flavonoid contents as well as total sugar. The simultaneous effects of cultivation area and packaging type on the antioxidant activity, total sugar and reduced sugar showed a significant difference. Samples which were packaged in plastic sacs contained higher amounts of total sugar compare to the other treatments.

Conclusion: It can be concluded that the maximum amount of total flavonoid, total sugar and reducing sugar were recorded at the end of storage period. According to the results, stevia collected from Aghghala region was biochemically more potent than those from Gorgan. It has been shown that dried leaves of stevia in glass packaging had the highest antioxidant activity. Thus, it is recommended that for long-term storage time the dried leaves of stevia should be stored in glass containers.

Keywords: Total phenol, Total flavonoid, Storage time, Region, Packaging.

[*]Corresponding author: aghasemnajad@hotmail.com