



تأثیر افزودن نانولیپوزم حاوی عصاره برگ زیتون بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، میکروبی و حسی کره

مهناز منافی دیزج یکان^۱، محمدحسین حداد خداپرست^۱، صدیف آزاد مرد دمیرچی^{۲*}،

هادی ولیزاده^۳، فریده طباطبایی یزدی^۱

^۱گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، خراسان رضوی، ایران

^۲گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۳دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۱

چکیده

سابقه و هدف: عصاره برگ زیتون به‌عنوان یکی از منابع گیاهی غنی از ترکیبات فنلی دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، درمانی و ضد میکروبی قابل توجهی است. افزودن مستقیم این ترکیب به مواد غذایی به‌علت طعم تلخ چندان رضایت بخش نیست و می‌تواند اثر منفی بر کیفیت محصول داشته باشد. درون‌پوشانی با نانولیپوزم یکی از روش‌های مفید برای حمل ترکیبات زیست‌فعال مانند ترکیبات فنولی است. کره محصولی پر مصرف بوده و به‌لحاظ ماهیت امولسیون و وجود فاز آبی بالا قابلیت رنسدیتی و فساد سریع دارد. لذا هدف از این پژوهش بررسی تأثیر افزودن نانولیپوزم‌های حامل عصاره برگ زیتون در پایداری کره بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا نانولیپوزم عصاره برگ زیتون تهیه و در غلظت‌های صفر (نمونه کنترل)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm به نمونه‌های کره افزوده شد. نمونه‌ها در دمای یخچال به‌مدت ۸۰ روز نگهداری شدند و تحت آزمون‌های فیزیکی شیمیایی (تعیین مقدار رطوبت، چربی و پروفایل اسیدهای چرب، عدد اسیدی و عددی پراکسید)، میکروبی (شمارش کلی میکروارگانیسم‌های سرماگرا) و حسی (از لحاظ طعم تلخی، تندی و پذیرش کلی) قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن نانولیپوزم‌های حامل عصاره برگ زیتون تأثیر معنی‌داری بر ترکیبات کره به‌لحاظ مقدار رطوبت، چربی و پروفایل اسیدهای چرب نداشت. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری اعداد اسیدی و پراکسید نشان دادند که افزودن نانولیپوزم حاوی عصاره برگ زیتون می‌تواند از لیپولیز و تولید اسیدهای چرب آزاد و اکسیداسیون چربی کره و تولید پراکسیدها در طول نگهداری جلوگیری کند. از سوی دیگر، شمارش میکروارگانیسم‌های سرماگرا در نمونه‌های کره با افزودن بیشتر نانولیپوزم کاهش بیشتری نشان داد. ارزیابی حسی نیز قابلیت بالای درون‌پوشانی به‌شکل نانولیپوزم برای جلوگیری از بروز طعم تلخ عصاره برگ زیتون و اثر بازدارندگی آن روی گسترش طعم تندی را تأیید نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که عصاره برگ زیتون می‌تواند به‌صورت مناسبی به‌روش نانولیپوزم درون‌پوشانی شده و در فرمولاسیون محصولات حساس به اکسیداسیون استفاده شود. با بکارگیری نانولیپوزم‌های حاوی عصاره برگ زیتون در فرمولاسیون کره تأثیر منفی بر ویژگی‌های ارگانولپتیکی مشاهده نشد. غنی‌سازی کره با نانولیپوزم‌های حاوی ترکیبات فنولی عصاره برگ زیتون با جلوگیری از فساد شیمیایی و میکروبی کره موجب افزایش ماندگاری این محصول شد.

واژه‌های کلیدی: کره، نانولیپوزم، برگ زیتون، ترکیبات فنولی

مقدمه

کره فرآورده پرچرب شیر و به صورت امولسیون آب در چربی است که در صنعت از زدن خامه و در روش‌های سنتی از ماست تهیه می‌شود. اگرچه پایداری میکروبی کره نسبتاً بالا است اما مستعد تغییرات شیمیایی بوده و از عوامل اصلی فساد و کاهش ماندگاری آن می‌توان به فساد شیمیایی ناشی از اکسیداسیون و لیپولیز چربی اشاره نمود. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی برای مهار اکسیداسیون روغن‌ها و چربی‌ها از دیرباز مرسوم بوده است (۲۳) اما علی‌رغم کارایی بالا و قیمت پایین، استفاده از این ترکیبات شیمیایی به علت عوارض زیان‌بار و احتمال سرطانزایی رو به کاهش است (۲۱). از این رو امروزه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مطرح شده‌اند (۲۳).

برگ‌های درخت زیتون منبع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی از قبیل سکوریدود (مانند ال‌توروپین، لیگستروسید، دی‌متیل اولئوروپین و ال‌توزید) و همچنین ترکیبات فلاونوئیدی مانند آپیجنین، کامپفرول، لوتئین و ترکیبات فنولی شامل اسید کافئیک، تیروزول و هیدروکسی تیروزول است. اولئوروپین از لحاظ کمی ترکیب فنولی غالب در عصاره برگ زیتون می‌باشد. یکی از ترکیبات مهم حاصل از هیدرولیز ال‌توروپین، هیدروکسی تیروزین است که ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن در آن ۱۰ برابر چای سبز است و یک ماده با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قوی است (۳). مطالعات متعدد حاکی از تأثیر استفاده از عصاره برگ زیتون در افزایش پایداری اکسایشی روغن‌ها است. ال‌مرازک و همکاران (۲۰۱۵) گزارش نمودند که عصاره برگ زیتون را می‌توان جایگزین بالغ بر ۵۰ درصد نیتريت سدیم در مارتادلای گوشت گوساله برای بهبود رنگ و جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها و اکسی

میوگلوبولین نمود (۱). باتسوغلو و همکاران (۲۰۱۴) تأثیر افزودن عصاره برگ زیتون به گوشت پخته را بررسی و گزارش نمودند که افزودن 200 mg kg^{-1} عصاره موجب تأخیر در اکسیداسیون چربی از طریق کاهش در محصولات اکسایشی اولیه (دی‌ان‌های مزدوج و هیدروپراکسیدها) و ثانویه (مالون‌دی‌آلدئید) طی نگهداری به مدت ۹ روز در یخچال می‌گردد (۴). مالهیرو و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر افزودن عصاره برگ زیتون را بر اکسیداسیون روغن سویا طی حرارت‌دهی در اجاق مایکروویو (۱۵-۰ دقیقه، 1000 W) بررسی و مشاهده نمودند که با افزودن عصاره برگ زیتون میزان تولید فرآورده‌های حاصل از اکسایش کاهش یافت و اثر محافظتی بالایی به‌ویژه روی اسیدهای چرب چند غیراشباعی داشت (۱۵). علی‌رغم این مزایا، ترکیبات فنلی همانند بسیاری از ترکیبات زیست فعال به تدریج غیرفعال می‌گردند. از سوی دیگر معمولاً پس‌طعم تلخی را در محصولات غذایی القا می‌کنند و در نهایت با توجه به ماهیت آبدوستی‌شان در مواد غذایی به راحتی پخش نمی‌شوند. کرامتجو و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که اگرچه نمونه‌های کره حاوی عصاره برگ زیتون عدد اسیدی و اندیس پراکسید و شمارش میکروبی پایین‌تری در مقایسه با نمونه کره کنترل داشتند، اما افزودن عصاره برگ زیتون تأثیر منفی بر ویژگی‌های حسی داشت و منجر به کاهش مقبولیت کلی آن شد (۱۴). لذا درون‌پوشانی این ترکیبات در سال‌های اخیر توجه محققان را به خود جلب نموده‌است.

نانولیپوزوم یکی از روش‌های جدید درون‌پوشانی مواد زیست فعال مانند ترکیبات فنولی است که می‌تواند تلخی آنها را پوشش دهد و هر دو طیف ترکیبات فنولی آبدوست (در هسته داخلی) و آبگریز (در بین دو لایه لیپیدی) را حمل و بتدریج در مواد

غلظت ۱۵ میکرومولار با نسبت مولی ۱:۴ با کلسترول و عصاره برگ زیتون در غلظت‌های مختلف در اتانول حل شدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول اتانولی به آرامی به ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر تحت فرایند هموژنیزاسیون با سرعت ۲۰۰۰۰rpm تریق شد. سوسپانسیون لیپوزومی تهیه شده برای آنالیز بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از بررسی ویژگی‌های نانوذرات، نانولیپوزوم‌های تهیه شده با نسبت ۵:۱ فسفاتیدیل کولین به عصاره برگ زیتون با اندازه متوسط ذرات کمتر از ۵۰ نانومتر و پتانسیل زتای منفی بالاتر (۳۳/۵ - میلی‌ولت) و کارایی ریزپوشانی مناسب (۷۴-۷۸ درصد) به عنوان فرمول بهینه انتخاب و برای افزودن به کره مورد استفاده قرار گرفتند (۱۷).

تلقیح نانولیپوزوم‌ها به کره: نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره برگ زیتون به نسبت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm (به ترتیب نمونه‌های N₅₀، N₁₀₀، N₂₀₀ و N₄₀₀) به کره پاستوریزه پس از نرم کردن بافت با حرارت‌دهی در حمام آبی ۵۰ درجه سانتی‌گراد اضافه شدند. این نمونه‌ها به همراه نمونه‌های کره فاقد نانولیپوزوم به عنوان نمونه کنترل (C) به مدت ۸۰ روز در یخچال نگهداری شدند و هر ۲۰ روز یکبار تحت آزمایش‌های فیزیکی شیمیایی و حسی به شرح ذیل قرار گرفتند.

آزمون‌های فیزیکی شیمیایی: ترکیب نمونه‌های کره در روز اول تولید شامل میزان رطوبت به روش خشک کردن با آون و میزان چربی به روش ژربر مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۹۷۶ (۱۰) اندازه گرفته شد. اسیدیته به روش استاندارد ملی ایران به شماره ۴۱۷۸ (۱۱)، پراکسید چربی کره به روش استاندارد ملی ایران به شماره ۴۱۷۹ (۱۲)، پروفایل اسیدهای چرب با مشتق‌سازی (تهیه متیل‌استر) و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکار

غذایی آزاد سازد (۶، ۲۴). از سوی دیگر کپسوله کردن ترکیبات زیست فعال در شکل لیپوزومی می‌تواند با افزایش جذب و ماندگاری آنها در سیستم‌هاضمه به توسعه غذاهای فراسودمند کمک کند (۵، ۲۰). تاکاشی و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از لسیتین تجاری لیپوزوم‌های حاوی کورکومین با قطر ذرات در حدود ۲۶۰ نانومتر تهیه کردند (۲۵). سرعت جذب بالاتر و بهتر در کورکومین لیپوزومی مشاهده شد و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در پلاسمای فرد مصرف‌کننده این لیپوزوم‌ها مشاهده گردید (۲۵). تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنولی چای سبز به روش توزیع لایه نازک اولتراسونیک با هدف افزایش زیست‌دسترسی نشان داد نانولیپوزوم‌های مواد فنولی چای سبز از پایداری لازم برخوردار هستند و می‌توانند برای کاربردهای مختلف مورد استفاده قرار گیرند.

با توجه به بررسی‌های به‌عمل آمده، تهیه نانولیپوزوم‌های ترکیبات فنولی موجود در عصاره برگ زیتون و کاربرد آن در مواد غذایی هنوز مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا هدف این تحقیق بررسی تأثیر افزودن نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره برگ زیتون بر پایداری کره بود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: فسفاتیدیل کولین (خلوص >۹۹٪) از شرکت Lipoid (آلمان) تهیه گردید. کلسترول، اتانول و سایر مواد شیمیایی از شرکت شیمیایی مرک (آلمان) تهیه شدند. عصاره برگ زیتون (با میزان فنل کل ۲۰۱/۲ میلی‌گرم در گرم عصاره) از شرکت آدونیس گل دارو تهیه گردید. کره پاستوریزه از شرکت پگاه آذربایجان شرقی خریداری شد.

تهیه لیپوزوم‌ها: لیپوزوم‌ها با استفاده از روش تزریق اتانول تهیه شدند. بدین‌منظور فسفاتیدیل کولین در

تحلیل شدند. اثر افزودن نانولیپوزم حاوی عصاره برگ زیتون در ۴ سطح (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm) به عنوان اثر ثابت و تکرار در زمان به عنوان اثر تصادفی در نظر گرفته شد. آزمون‌های فیزیکی شیمیایی و میکروبی در ۳ تکرار و آزمون‌های حسی در ۱۵ تکرار انجام گرفت. آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش توکی صورت گرفت و سطح احتمال خطای $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از مدل آمیخته نرم‌افزار SAS نسخه ۹٫۱ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۰ صورت گرفت.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی: طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۹۷۶ (۱۰) کره باید حاوی حداقل ۸۲ درصد چربی و حداکثر ۱۶ درصد رطوبت باشد. ترکیب شیمیایی نمونه‌های کره در جدول ۱ آورده شده است.

ساز شعله‌یونشی مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۳۱۲۶ (۱۳) اندازه‌گیری گردید.

آزمون میکروبیولوژیکی: شمارش میکروارگانیسم‌های سرماگرای نمونه‌های کره به روش کشت سطحی انجام شد. کشت در پلیت کانت آگار در دمای ۶/۵ درجه سانتی‌گراد مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۴۰۶ (۹) انجام گرفت.

ارزیابی حسی: ارزیابی ویژگی‌های حسی شامل ویژگی‌های ظاهری (رنگ و سطح)، ویژگی‌های بافتی (سفتی و احساس دهانی)، ویژگی‌های عطر و طعمی و پذیرش کلی توسط ۱۵ نفر پانلیست نیمه‌ماهر به روش هدونیک ۵ نقطه‌ای (درجه‌بندی بر مبنای ۱-۵، ۱: خیلی ضعیف، ۲: ضعیف، ۳: متوسط، ۴: قوی و ۵: خیلی قوی) انجام گرفت (۱۴).

آنالیز آماری: داده‌های حاصل از آزمایش به صورت طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی تجزیه و

جدول ۱- درصد رطوبت و چربی نمونه‌های کره حاوی نانولیپوزوم‌های عصاره برگ زیتون

Table 1. Moisture and fat content of butter samples containing olive leaf extracts nanoliposomes

| C | نمونه Sample | | | | ترکیب Composition |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | N400 | N200 | N100 | N50 | |
| 14.18 ± 0.730 ^a | 14.09 ± 0.840 ^a | 14.19 ± 0.98 ^a | 14.22 ± 0.15 ^a | 14.26 ± 0.200 ^a | رطوبت (%) Moisture (%) |
| 82.19 ± 0.811 ^a | 82.04 ± 0.811 ^a | 82.86 ± 0.811 ^a | 82.41 ± 0.029 ^a | 82.05 ± 0.811 ^a | چربی (%) Fat (%) |

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است ($P > 0.05$).

Similar letters in each row show insignificant difference ($P > 0.05$).

تمامی تیمارها عدد اسیدی در طول زمان به‌طور معنی‌دار ($P < 0.05$) افزایش یافت. افزایش بیشتر عدد اسیدی در نمونه‌های کره کنترل در مقایسه با نمونه‌های کره حاوی نانولیپوزوم عصاره برگ زیتون نشان‌دهنده تأثیر افزودن نانوذرات در جلوگیری از لیپولیز چربی کره است (جدول ۲). با افزایش غلظت نانولیپوزوم سرعت لیپولیز کاهش یافت و کمترین مقدار اسیدیته مربوط به نمونه حاوی ۴۰۰ ppm

مطابق جدول ۱ افزودن نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره برگ زیتون تأثیر معنی‌داری بر ترکیب شیمیایی کره از لحاظ میزان رطوبت و چربی نداشت ($P > 0.05$). این نتیجه ناشی از افزودن نانوذرات در حد بسیار کم در مقایسه با این ترکیبات است.

تغییرات عدد اسیدی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر نانولیپوزوم عصاره برگ زیتون بر تغییرات عدد اسیدی کره معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در

مهناز منافی دیزج یکان و همکاران

دریافتند در همه نمونه‌ها با گذشت زمان اسیدیته افزایش پیدا کرد؛ اما نمونه‌های دارای آنتی‌اکسیدان در مقایسه با نمونه کنترل عدد اسیدی کمتری داشتند (۲۲).

(N50) بود. این نتایج با گزارش‌های کرامت جو و همکاران (۲۰۱۳) پیرامون کاهش عدد اسیدی کره با افزودن مستقیم عصاره برگ زیتون مطابقت دارد (۱۴). اوزکان و همکاران (۲۰۰۷) با افزودن آنتی‌اکسیدان حاصل از عصاره گیاه *Satureja Cilicica* به کره

جدول ۲- عدد اسیدی نمونه‌های کره حاوی نانولیپوزوم‌های عصاره برگ زیتون

Table 2. Acid value of butter samples containing olive leaf extracts nanoliposomes

| عدد اسیدی | | | | | نمونه Sample |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------|
| Acid value | | | | | |
| روز ۸۰ | روز ۶۰ | روز ۴۰ | روز ۲۰ | روز ۱ | |
| Day 80 | Day 60 | Day 40 | Day 20 | Day 1 | |
| 2.49 ± 0.01 ^{aE} | 2.37 ± 0.04 ^{aD} | 2.22 ± 0.05 ^{aC} | 1.73 ± 0.03 ^{aB} | 0.23 ± 0.01 ^{aA} | C |
| 1.11 ± 0.02 ^{bE} | 0.68 ± 0.03 ^{bD} | 0.48 ± 0.05 ^{bC} | 0.34 ± 0.02 ^{bB} | 0.29 ± 0.05 ^{Ba**} | N ₅₀ |
| 1.03 ± 0.03 ^{cE} | 0.61 ± 0.01 ^{cD} | 0.45 ± 0.05 ^{cC} | 0.34 ± 0.02 ^{bB} | 0.33 ± 0.02 ^{cA} | N ₁₀₀ |
| 0.83 ± 0.03 ^{dE} | 0.60 ± 0.02 ^{cD} | 0.39 ± 0.02 ^{dC} | 0.32 ± 0.03 ^{cB} | 0.35 ± 0.03 ^{cA} | N ₂₀₀ |
| 0.813 ± 0.01 ^{dE} | 0.52 ± 0.05 ^{dD} | 0.38 ± 0.04 ^{dC} | 0.33 ± 0.01 ^{cB} | 0.35 ± 0.01 ^{cA} | N ₄₀₀ |

حروف کوچک غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها در هر ستون و حروف بزرگ غیر مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار طی زمان نگهداری در هر ردیف است.

Different small letters in each column indicate a significant difference ($P < 0.05$) between treatments. Different capital letters in each row indicate a significant difference ($P < 0.05$) over time.

اندیس پراکسید نمونه‌های کره حاوی ۲۰۰ ppm نانولیپوزوم با نمونه‌های حاوی ۴۰۰ ppm نانولیپوزوم در اکثر مقاطع زمانی تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید ($P < 0.05$). بر خلاف نتایج کرامت جو و همکاران (۲۰۱۳) که افزایش عدد پراکسید نمونه‌های حاوی مقادیر بالای عصاره برگ زیتون به شکل آزاد در اواخر دوره نگهداری را گزارش کرده بودند، در تحقیق حاضر افزایش پراکسید نمونه‌های کره حاوی مقادیر بالای عصاره برگ زیتون نانولیپوزومی مشاهده نشد. این موضوع بیانگر موثر بودن استفاده از عصاره برگ زیتون کپسوله به صورت نانولیپوزوم به عنوان آنتی-اکسیدان طبیعی در کاهش شدت اکسیداسیون چربی کره است.

تغییرات عدد پراکسید: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از معنی‌دار بودن اثر افزودن نانولیپوزوم عصاره بزرگ زیتون بر تغییرات عدد پراکسید بود ($P < 0.05$). از سوی دیگر عدد پراکسید در تمامی نمونه‌ها در طول زمان نگهداری در ابتدا روند افزایشی و پس از ۶۰ روز روند کاهش نشان داد (جدول ۳) که با نتایج حاصل از پژوهش‌های کرامت جو و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت داشت (۱۴). تبدیل شدن ترکیبات اولیه اکسیداسیون به ترکیبات ثانویه موجب کاهش عدد پراکسید در انتهای زمان نگهداری می‌شود. افزایش عدد پراکسید در نمونه‌های کره کنترل (C) و نمونه حاوی ۲۰۰ ppm نانولیپوزوم برترتیب بالاترین و پایین‌ترین سرعت را داشت. بین

جدول ۳- عدد پراکسید نمونه‌های کره حاوی نانولیپوزوم‌های عصاره برگ زیتون

Table 3. The peroxide values of butter samples containing olive leaf extracts nanoliposomes

| عدد پراکسید peroxide value | | | | | نمونه Sample |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------|
| روز ۸۰ Day 80 | روز ۶۰ Day 60 | روز ۴۰ Day 40 | روز ۲۰ Day 20 | روز ۱ Day 1 | |
| 1.80 ± 0.09 ^{aE} | 1.88 ± 0.08 ^{aD} | 1.92 ± 0.07 ^{aC} | 1.19 ± 0.12 ^{aB} | 0.54 ± 0.11 ^{aA} | C |
| 1.21 ± 0.07 ^{bE} | 1.41 ± 0.11 ^{bD} | 1.48 ± 0.13 ^{bC} | 1.20 ± 0.08 ^{aB} | 0.60 ± 0.07 ^{aA**} | N ₅₀ |
| 1.01 ± 0.10 ^{bE} | 1.45 ± 0.09 ^{bD} | 1.41 ± 0.10 ^{bC} | 0.94 ± 0.05 ^{bB} | 0.69 ± 0.05 ^{bA} | N ₁₀₀ |
| 1.17 ± 0.17 ^{bE} | 1.21 ± 0.12 ^{cD} | 1.39 ± 0.08 ^{bC} | 0.81 ± 0.09 ^{eB} | 0.65 ± 0.04 ^{bA} | N ₂₀₀ |
| 1.04 ± 0.11 ^{cE} | 1.15 ± 0.12 ^{cD} | 1.30 ± 0.11 ^{cC} | 0.81 ± 0.04 ^{eB} | 0.71 ± 0.02 ^{bA} | N ₄₀₀ |

حروف کوچک غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر ستون و حروف بزرگ غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار طی زمان نگهداری در هر ردیف است.

Different small letters in each column indicate a significant difference ($P < 0.05$) between treatments. Different capital letters in each row indicate a significant difference ($P < 0.05$) over time.

(جدول ۴). ترکیبات فنولی عصاره برگ زیتون علاوه بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، اثرات ضد میکروبی بر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها نیز نشان می‌دهند که از جمله آنها می‌توان به سودوموناس، اشیریشیا کلی، استافیلوکوکوس ارئوس، کلبسیلا پنومونیا، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی و ویبریو پاراهمولیتیکوس اشاره کرد (۱۸). محققان دیگر نیز اثر ضد میکروبی قوی عصاره برگ زیتون را بر روی طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها گزارش کردند (۲)، (۱۹).

شمارش میکروارگانیسم‌های سرماگرا: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که افزودن نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره برگ زیتون اثر بازدارندگی معنی‌داری ($P < 0.05$) بر رشد میکروارگانیسم‌های سرماگرا در کره دارد. بیشترین شمارش سرماگراها مربوط به نمونه‌های کنترل بود که در عرض کمتر از ۴۰ روز از مرز حداکثر مجاز cfu/g ۱۰۰۰۰ طبق استاندارد گذشت. در حالیکه در نمونه‌های کره غنی شده با نانولیپوزوم عصاره برگ زیتون تا ۶۰ روز نگهداری شمارش میکروارگانیسم‌های سرماگرا کمتر از حد مجاز بود

جدول ۴- شمارش کلی میکروارگانیسم‌های سرماگرا در نمونه‌های کره

Table 4. The Psychrotrophic total counts in butter samples

| شمارش کلی باکتری (cfu/g) Microbial total counts (cfu/g) | | | | | نمونه Sample |
|--|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| روز ۸۰ Day 80 | روز ۶۰ Day 60 | روز ۴۰ Day 40 | روز ۲۰ Day 20 | روز ۱ Day 1 | |
| 90000 ^{aE} | 50000 ^{aD} | 11000 ^{aC} | 5000 ^{aB} | 100 ^{aA} | C |
| 40000 ^{bE} | 20000 ^{bD} | 5000 ^{bC} | 700 ^{bB} | 100 ^{aA} | N ₅₀ |
| 30000 ^{bE} | 8000 ^{dD} | 5000 ^{bC} | 500 ^{bB} | 100 ^{aA} | N ₁₀₀ |
| 20000 ^{cE} | 4000 ^{dD} | 5000 ^{bC} | 300 ^{eB} | 100 ^{aA} | N ₂₀₀ |
| 20000 ^{cE} | 6000 ^{dD} | 6000 ^{bC} | 400 ^{eB} | 100 ^{aA} | N ₄₀₀ |

حروف کوچک غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر ستون و حروف بزرگ غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار طی زمان نگهداری در هر ردیف است.

Different small letters in each column indicate a significant difference ($P < 0.05$) between treatments. Different capital letters in each row indicate a significant difference ($P < 0.05$) over time.

تلخی در روز ۸۰ مشاهده شد. علاوه بر آن، در طول زمان نگهداری افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) در شدت طعم تلخ اکثر نمونه‌های کره به استثنای نمونه‌های حاوی ۵۰ ppm نانولیپوزوم مشاهده شد؛ هر چند میزان افزایش کم بود. این نتایج موید موفق‌بودن کپسولاسیون عصاره برگ زیتون به صورت نانولیپوزوم در پوشاندن طعم تلخ ترکیبات فنولی عصاره است.

ارزیابی حسی: نتایج ارزیابی حسی نمونه‌های کره از لحاظ تلخی در روزهای ۱، ۴۰ و ۸۰ نگهداری در جدول ۵، ۶ و ۷ آورده شده است. طبق جدول ۵، افزودن نانولیپوزوم عصاره برگ زیتون تأثیر معنی‌داری بر طعم تلخی نمونه‌های کره در روز اول نداشت اما در روز چهل نمونه‌های حاوی ۴۰۰ ppm نانولیپوزوم اندکی تلخی بیشتری در مقایسه با سایر نمونه‌ها نشان دادند. وضعیت مشابهی برای نمونه‌های کره از لحاظ

جدول ۵- ارزیابی حسی طعم تلخی نمونه‌های کره

Table 5. Sensory Evaluation in terms of bitterness for butter samples

| میانگین امتیاز طعم تلخی | | | نمونه Sample |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------|
| Average score of bitterness | | | |
| روز ۸۰ Day 80 | روز ۴۰ Day 40 | روز ۱ Day 1 | |
| 1.55 ± 0.65 ^{ab} | 1.45 ± 0.71 ^{aA} | 1.38 ± 0.44 ^{aA} | C |
| 1.48 ± 0.63 ^{aA} | 1.410 ± 0.28 ^{aA} | 1.42 ± 0.35 ^{aA} | N ₅₀ |
| 1.52 ± 0.70 ^{ab} | 1.38 ± 0.25 ^{aA} | 1.33 ± 0.23 ^{aA} | N ₁₀₀ |
| 1.67 ± 0.41 ^{ab} | 1.45 ± 0.45 ^{aA} | 1.40 ± 0.50 ^{aA} | N ₂₀₀ |
| 2.30 ± 0.69 ^{cb} | 1.75 ± 0.22 ^{ba} | 1.48 ± 0.18 ^{aA} | N ₄₀₀ |

حروف کوچک غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر ستون و حروف بزرگ غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار طی زمان نگهداری در هر ردیف است.

Different small letters in each column indicate a significant difference ($P < 0.05$) between treatments. Different capital letters in each row indicate a significant difference ($P < 0.05$) over time.

مشاهده نگردید. این نتایج با داده‌های مربوط به عدد اسیدی و عدد پراکسید نمونه‌های کره مطابقت دارد و حاکی از کارآمدی نانولیپوزوم‌های عصاره برگ زیتون در کاهش گسترش طعم تند کره می‌باشد. از لحاظ مقبولیت کلی هم مطابق جدول ۸ اگر چه در روز اول نگهداری، نمونه‌های کره کنترل اندکی امتیاز بیشتری را از نمونه‌های حاوی نانولیپوزوم کسب کردند، اما در طول نگهداری حالت عکس مشاهده شد و نمونه‌های حاوی نانولیپوزوم عصاره برگ زیتون از امتیاز بالایی از لحاظ مقبولیت کلی برخوردار بودند. در روز ۸۰، بالاترین امتیاز مقبولیت کلی مربوط به نمونه‌های حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm و کمترین مربوط به نمونه کنترل بود.

از سوی دیگر در حالی که بین نمونه‌های کره در روز اول از لحاظ شدت طعم تندی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$)، اما در روز ۴۰ و ۸۰ تفاوت معنی‌داری در شدت طعم تندی نمونه‌های کره غنی شده با نانولیپوزوم‌های عصاره برگ زیتون با نمونه کنترل مشاهده شد و نمونه‌های کره حاوی نانولیپوزوم از شدت طعم تندی کمتری برخوردار بودند. بیشترین و کمترین شدت طعم تندی به ترتیب در نمونه‌های کره کنترل و کره حاوی ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm مشاهده شد؛ بطوری‌که در پایان روز ۸۰ نگهداری شدت تندی به مقادیری نزدیک به پنجاه درصد نمونه کنترل رسید. بین نمونه‌های کره حاوی ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm نانولیپوزوم تفاوت معنی‌داری

جدول ۶- ارزیابی حسی طعم تندى نمونه‌های کره

Table 6. Sensory Evaluation of butter samples in terms of rancid flavor

| میانگین امتیاز طعم تندى | | | نمونه |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------|
| Average score of rancidity | | | |
| روز ۸۰ | روز ۴۰ | روز ۱ | Sample |
| Day 80 | Day 40 | Day 1 | |
| 4.81 ± 0.70 ^{aC} | 2.28 ± 0.49 ^{aB} | 1.08 ± 0.78 ^{aA} | C |
| 3.77 ± 0.68 ^{bC} | 1.98 ± 0.50 ^{bB} | 1.11 ± 0.53 ^{aA} | N ₅₀ |
| 3.63 ± 0.66 ^{cC} | 1.50 ± 0.34 ^{cB} | 1.15 ± 0.62 ^{aA} | N ₁₀₀ |
| 2.67 ± 0.92 ^{cB} | 1.35 ± 0.79 ^{cA} | 1.12 ± 0.39 ^{aA} | N ₂₀₀ |
| 2.55 ± 0.38 ^{cB} | 1.30 ± 0.55 ^{cA} | 1.25 ± 0.78 ^{aA} | N ₄₀₀ |

**حروف کوچک غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر ستون و حروف بزرگ غی‌مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار طی زمان نگهداری در هر ردیف است.

Different small letters in each column indicate a significant difference ($P < 0.05$) between treatments. Different capital letters in each row indicate a significant difference ($P < 0.05$) over time.

جدول ۷- ارزیابی حسی مقبولیت کلی نمونه‌های کره

Table 7. Total acceptance of butter samples

| میانگین امتیاز مقبولیت کلی | | | نمونه |
|--|---------------------------|---------------------------|------------------|
| Average score of overall acceptability | | | |
| روز ۸۰ | روز ۴۰ | روز ۱ | Sample |
| Day 80 | Day 40 | Day 1 | |
| 1.75 ± 0.45 ^{aC} | 3.18 ± 0.62 ^{aB} | 4.55 ± 1.03 ^{aA} | C |
| 2.20 ± 0.55 ^{bB} | 4.10 ± 0.54 ^{bA} | 4.11 ± 0.29 ^{bA} | N ₅₀ |
| 2.61 ± 0.28 ^{cB} | 4.00 ± 0.29 ^{cA} | 4.15 ± 0.20 ^{bA} | N ₁₀₀ |
| 2.72 ± 0.64 ^{cC} | 4.06 ± 0.49 ^{cB} | 4.37 ± 0.59 ^{cA} | N ₂₀₀ |
| 2.08 ± 0.43 ^{dB} | 3.99 ± 0.29 ^{cA} | 4.07 ± 0.82 ^{bA} | N ₄₀₀ |

حروف کوچک غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر ستون و حروف بزرگ غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار طی زمان نگهداری در هر ردیف است.

Different small letters in each column indicate a significant difference ($P < 0.05$) between treatments. Different capital letters in each row indicate a significant difference ($P < 0.05$) over time.

نتیجه‌گیری کلی

میکروارگانیزم‌های سرماگرا در کره که از عوامل اصلی فساد میکروبی آن محسوب می‌شود جلوگیری کرد. ارزیابی حسی نیز قابلیت مناسب بهره‌گیری از روش ریزپوشانی با نانولیپوزوم در جلوگیری از بروز طعم تلخ عصاره برگ زیتون و اثر بازدارندگی آن روی گسترش طعم تندى را نشان داد. در نهایت افزودن ۲۰۰ ppm نانولیپوزوم عصاره برگ زیتون برای افزایش پایداری شیمیایی و میکروبی کره پیشنهاد می‌گردد.

طبق نتایج حاصل شده از این پژوهش، افزودن نانولیپوزوم حاوی عصاره برگ زیتون بدون اینکه ترکیب کره را از لحاظ میزان رطوبت، چربی و پروفایل اسیدهای چرب تحت تأثیر قرار دهد اثر بازدارندگی روی لیپولیز و اکسیداسیون آن در طول نگهداری دارد. از لحاظ میکروبی هم می‌توان با تلقیح نانولیپوزوم عصاره برگ زیتون از افزایش بار میکروبی

منابع

- Al Marazzeq, K., Haddadin, M., Al Abdullah, B. and Angor, M. 2015. Effect of Nitrite Substitution with Olive Leaves Extract on Color and Sensory Properties of Beef Mortadella. *J. of Agricultural Science*. 7 :120-129.
- Aliabadi, M.A., Darsanaki, R.K., Rokhi, M.L., Nourbakhsh, M. and Raeisi, G. 2012. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Annals of Biological Research*. 3: 4189-4191.
- Bianco, A., Uccella, N. 2000. Biophenolic components of olives. *Food Research International*. 33: 475-485.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D. and Papageorgiou, G. 2014. Effect of olive leaf (*Olea europea* L.) extracts on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties enriched with n-3 fatty acids. *J. of the Science of Food and Agriculture*. 94: 227-234.
- Emami, S., Azadmard-Damirchi, S., Peighambaroust, S.H., Valizadeh, H. and Hesari, J. 2016. Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *J. of Experimental Nanoscience*. 11: 1-23.
- Fang, Z. and Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science and Technology*. 21: 510-523.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2003. Psychrotroph bacteria count method, No. 11976 (In Persian).
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2006. Pasteurized butter, Specification and test method, No. 162 (In Persian).
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2008. Microbiology of milk and milk products Specifications, No. 2406 (In Persian).
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2009. Butter-Determination of moisture, non-fat solids and fat contents (Routine methods), No. 11976 (In Persian).
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2010. Animal and vegetable fats and oils, Determination of acid value and acidity, Test method, No. 4178 (In Persian).
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2010. Animal and vegetable fats and oils, Determination of Peroxide Value, Iodometric (visual) endpoint determination, No. 4179 (In Persian).
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2010. Animal and vegetable fats and oils- Gas chromatography of fatty acid methyl esters, No. 13126 (In Persian).
- Keramatjou, E., Hesari, J., Azadmard Damirchi, S., Peighambaroust, H. Nemat. M. 2013. Antioxidant Effect of Olive Leaf of stability of Butter. *Electronic J. of Food Processing and Preservation*. 5: 81-94.
- Malheiro, R., Rodrigues, N., Manzke, G., Bento, A., Pereira, J.A., and Casal, S. 2013. The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating. *Industrial Crops and Products*. 44: 37-43.
- Manafi, M., Haddad Khodaparast, M.H., Azadmard Damirchi, S., Valizadeh, H. Tabatabaei, F. Preparation and some characteristics of Nano liposomes containing olive leaf extract. *Iranian J. of Food Science and Technology*. In press.
- Markin, D., Duek, L. and Berdicevsky, I., 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*. 46: 132-136.
- Martín-Vertedor, D., Garrido, M., Pariente, J.A., Espino, J. and Delgado-Adámez, J. 2016. Bioavailability of Bioactive Molecules from Olive Leaf Extracts and its Functional Value. *Phytotherapy Research*. In Press.
- Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., and Singh, H. 2006. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *J. of the Science of Food and Agriculture*. 86: 2038-2045.
- Shankel, D.M., Hartman, P.E., Kada, T., Hollaender, A., Wilson, C.M. and Kuny, G. 2013. Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms (Vol. 39). Springer Science & Business Media.

21. Ozkan, G., Simsek, B. and Kuleasan, H. 2007. Antioxidant activities of Satureja cilicica essential oil in butter and in vitro. *J. of Food Engineering*. 79: 1391- 1396.
22. Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M.H. eds., 2001. Antioxidants in food: practical applications. 42-45.
23. Sun-Waterhouse, D., and Wadhwa, S.S. 2013. Industry-relevant approaches for minimising the bitterness of bioactive compounds in functional foods: a review. *Food and Bioprocess Technology*. 6: 607-627.
24. T Liu, N., and Park, H.J. 2009. Chitosan-coated nanoliposome as vitamin E carrier. *J. of microencapsulation*. 26: 235-242.
25. Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y., and Wada, K. 2009. Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-capsulated curcumin. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 9141-9146.

Effects of olive leaf extract nanoliposomes on physicochemical, microbiological and sensory properties of butter

M. Manafi Dizajyekan¹, M.H. Hadad Khodaparast^{1*}, S. Azadmard-Damirchi²,
H. Valizadeh³, F. Tabatabaei Yazdi¹

¹Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

²Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

³Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Received: 2016/05/14; Accepted: 2017/04/10

Abstract

Background and objectives: Olive leaf extract as a rich plant source of phenolic compounds has significant antioxidant, therapeutic and antimicrobial properties. Today, due to the unique properties of olive leaves, it is widely used in pharmacy and there is a great interest for its application in food industry. However, adding it directly to food is not very satisfactory due to its bitter taste, which may have a negative effect on the quality of the product. Encapsulation in nanoliposome may be used as delivery system to protect phenolic compounds during processing and storage. Butter is a high-consumption product and in terms of emulsifying nature and the presence of a high aqueous phase in its composition, can quickly be rancid. Hence, this study aimed to investigate the effect of olive leaf extract-loaded nanoliposomes on butter stability.

Materials and methods: First, nanoliposomes containing olive leaf extract (OLE) were prepared and different OLE-loaded nanoliposome concentrations including zero (control sample), 50, 100, 200 and 400 ppm added to butter formulation. Samples were stored at refrigerator temperature for 80 days and subjected to physicochemical (determination of fatty acids, acid number and peroxide value), microbial (total cold-resistant microorganisms count) and sensory analysis (in terms of bitter taste, sharpness and total acceptance).

Results: The results showed that the addition of OLE-loaded nanoliposome had no significant effect on butter composition in terms of moisture and fat content along with fatty acid profile. Data from acid number and peroxide value showed that the addition of OLE-loaded nanoliposome could prevent lipolysis, the oxidation of butter, and production of free fatty acids and peroxides during storage. On the other hand, the psychrotrophic counts in butter samples decreased further with the addition of nanoliposomes. Sensory evaluation also confirmed the high ability of encapsulation in the form of nanoliposomes to prevent the bitter taste of olive leaves and its inhibitory effect on the development of rancid taste.

Conclusion: Olive leaf extract can be properly encapsulated as nanoliposome to be used in butter formulation without adverse effect on its organoleptic properties. Enrichment of butter with OLE-loaded nanoliposome effectively prevent chemical and microbial spoilage of butter and increase its shelf life.

Keywords: Butter, Nanoliposomes, Olive leaf, Phenolic compounds

*Corresponding author: khodaparast@um.ac.ir

