مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۵۲، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰ (ص ۳۲۸-۳۱۱) DOI: 10.22059/ijbse.2020.303743.665314
(علمی – پژوهشی)

Study of Physicochemical Properties of Extra Virgin Olive Oil Extracted from *Koroneiki* Variety in the Golestan Province durin Storage

KASRA MOMENIAN[1], LADAN RASHIDI[2*], MASUD HOMAPOUR[3]

1. Department of Food Science and Technology, Branch of Pharmaceutical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Research Center of Food Technology and Agricultural Products, Research Standard Institute, National Iranian Standards Organization, Alborz, Iran
3. Faculty of Food Science, Department of Food Science and Technology, Branch of Safadasht, Islamic Azad University, Safadasht, Iran

(Received: June 19, 2020- Revised: May 19, 2021- Accepted: June 2, 2021)

ABSTRACT

Detection and determination of physicochemical properties, effective compounds of olive oil as well as its oxidative stability during storage is of particular importance, therefore, in this study, some properties of extra virgin olive oil obtained from the olive fruit of *Kronaikei* cultivar during two years of storage at 4°C and in darkness were investigated. The results showed that the acid value, peroxide value, anisidine index and wax content increased and the unsaponifiable matter, total sterol, and total phenol contents as well as antioxidant activity decreased. No significant change was observed in the amounts of equivalent carbon equivalent (ECN) of triacylglycerols during storage ($p > 0.05$). The main fatty acid and sterol were oleic acid and bet-sitosterol, respectively, and the major biophenolic compound was ferulic acid followed by cafeic acid, catechin, and oleuropein, respectively. Also, the monounsaturated fatty acid content decreased and the content of polyunsaturated fatty acids increased. No important change was seen in the quantity of fatty acid and sterol compounds of storaged olive oils. All quality parameters and physicochemical properties measured during the two years of storage of olive oils were in the range of the limits specified for extra virgin olive oil in the National Standard of Iran No. 1446 as titled “olive oil - characteristics and test methods”.

Keywords: Extra virgin olive oil – Wax- Sterols - Phenolic compounds

*Corresponding author E-mail address: l.rashidi@standard.ac.ir

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی روغن زیتون فرابکر استحصال شده از رقم کرونائیکی استان گلستان طی انبارداری

کسری مومنیان[1]، لادن رشیدی[2*]، مسعود هماپور[3]

۱. دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم داروئی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران. ایران

۲. گروه پژوهشی مواد غذایی و کشاورزی، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، سازمان ملی استاندارد ایران، البرز، ایران

۳. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، واحد صفادشت، دانشگاه آزاد اسلامی، صفادشت،ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۳۰- تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۲/۲۹- تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۳/۱۲)

چکیده

تشخیص و تعیین خواص فیزیکوشیمیایی، ترکیبات موثره روغن زیتون و پایداری اکسایشی آن طی انبارداری از اهمیت خاصی برخوردار است، لذا در این پژوهش برخی از ویژگی‌های روغن زیتون فرابکر حاصل از میوه زیتون رقم کرونائیکی طی دو سال انبارداری در دمای ۴ درجه سلسیوس و در تاریکی بررسی شد. نتایج نشان داد که عدد اسیدیته، عدد پراکسید، عدد آنیزیدین و مقدار موم افزایش و میزان ترکیبات غیرقابل صابونی، استرول کل و فنول کل و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت. در تعداد کربن معادل تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها تغییر حائز اهمیتی مشاهده نشد ($p > ۰/۰۵$). بیشترین اسید چرب، اسید اولئیک، بیشترین ترکیب استرولی، بتاسیتوسترول و بیشترین ترکیبات بیوفنلی، به ترتیب، اسید فرولیک، اسید کافئیک،کاتچین و اولئوروپین بود. همچنین، مقادیر اسیدهای چرب تک غیراشباع کاهش و اسیدهای چند غیراشباع افزایش یافت. از سوی دیگر، طی زمان انبارداری تغییر قابل توجهی در مقدار ترکیب اسیدهای چرب یا ترکیب استرولی روغن‌های زیتون دیده نشد. تمامی پارامترهای کیفی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده در روغن‌های زیتون انبار شده (دوسال) در محدوده‌های تعیین شده در استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۴۶ (روغن زیتون-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون)، برای روغن‌زیتون فرابکر بود.

واژه‌های کلیدی: روغن زیتون فرابکر- موم- استرول ها- ترکیبات فنولی

مقدمه

درخت زیتون یکی از قدیمی ترین درختان کاشته شده در دنیا شناخته شده است. شواهد باستان‌شناسی نشان می‌دهد که قدمت زیتونی که در کرت پرورش یافته است، حدود ۲۵۰۰ سال قبل از میلاد است. قدمت گیاه زیتون بیش از ۶۰۰۰ سال بوده ولی کشت آن در استان‌های گیلان، قزوین و زنجان بر اساس اسناد و مدارک موجود سابقه ۹۰۰ ساله دارد. زیتون اولئا اروپا[1] متعلق به خانواده اولیاسه[2] است. میوه زیتون بیضی شکل است که ابتدا سبز رنگ بوده و هنگام رسیدن به رنگ سیاه متمایل می‌شود. میوه زیتون در پاییز و زمستان جمع‌آوری می شود. درخت زیتون نیاز به آب و هوای گرم و مرطوب دارد و برای رسیدن میوه آن باید تابستان گرم و طولانی باشد (Zare *et al.*, 2014). باید خاطر نشان کرد که اگرچه ایران تولیدکننده مشهوری در زمینه میوه و روغن زیتون نیست، اما تلاش زیادی برای توسعه درختان زیتون در این کشور انجام شده است. ارقام مختلف زیتون در استان‌های گیلان (به ویژه شهرستان رودبار)، زنجان، مازندران، قزوین، گلستان و خوزستان کشت می‌شوند که منطقه طارم در استان زنجان یکی از مهم‌ترین مناطق کشت زیتون است و حدود ۱۲۶۰۰ هکتار زمین در این منطقه به کشت زیتون اختصاص یافته است. بنابر آمار ارائه شده از سوی دفتر طرح زیتون- معاونت باغبانی جهاد کشاورزی، استان‌های زنجان، فارس، گلستان، قزوین و سمنان بیشترین سطح زیرکشت زیتون را دارند و براساس آمار سال ۱۳۹۸، سطح زیرکشت این محصول ۹۲ هزار و ۶۳۰ تن بوده که تولید خود زیتون ۱۴۷ هزار و ۲۲۴ تن و تولید روغن آن ۱۱ هزار و ۶۴۸ تن بوده است و رتبه جهانی ایران در تولید میوه زیتون ۲۰، در سطح زیرکشت ۱۶ و به طور کل رتبه جهانی در عملکرد

* نویسنده مسئول: l.rashidi@standard.ac.ir

1 -*Oleaeuropea*
2- *Oleaceae*

۱۲ بود (Rashidi *et al*., 2020). در بیشتر باغ‌های اقتصادی زیتون ایران، ارقام زرد[1] و روغنی[2] محلی کشت داده شده‌اند و ارقام فیشمی، شنگه و ماری نیز که جزء ارقام بومی ایران هستند، در سطوح بسیار محدودی مشاهده می‌شوند. همچنین، ارقام غیربومی از قبیل آربکینا[3]، مانزالیلا[4] و کرونائیکی[5] نیز در مناطق رودبار، گلستان، فسا و طارم کشت داده شده‌اند که سطح زیر کشت محدودی به آنها اختصاص داده شده است (Rashidi *et al*., 2020). روغن‌های زیتون بکر طبق تعریف ارائه شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۱۴۴۶، روغن‌هایی هستند که از میوه‌های درخت زیتون تنها به وسیله روش‌های مکانیکی یا سایر روش‌های فیزیکی در شرایط معین، به ویژه از نظر دمایی به گونه‌ای که سبب تغییر در ماهیت آن نشود، استخراج می‌شوند و هیچ گونه فرآوری به جز شستشو، صاف کردن، دکانتاسیون و سانتریفیوژ (جداسازی) روی آن‌ها انجام نمی‌شود و به سه دسته روغن‌های زیتون فرابکر، بکر درجه یک و بکر معمولی تقسیم‌بندی می‌شوند. این تقسیم‌بندی براساس حدود تعیین شده برای مقدار عدد اسیدیته است که به ترتیب، بین ۰ تا ۰/۸، ۰/۸ تا ۲، و ۲ تا ۳/۳ گرم در ۱۰۰ گرم برای روغن‌های زیتون فرابکر، بکر درجه یک، و بکر معمولی در نظر گرفته شده است (INSO 1446., 2011). روغن زیتون حاوی ترکیبات بسیار مفیدی است که مصرف آن برای حفظ سلامت انسان لازم و ضروری است. بررسی‌های انجام شده حاکی از آن است که مردمی که در نواحی مدیترانه‌ای زندگی می‌کنند، به دلیل مصرف روزانه روغن زیتون کمتر به بیماری‌های قلبی دچار می‌شوند. مطالعات علمی نشان می‌دهند که روغن زیتون دارای میزان قابل توجهی اسیدهای چرب تک غیراشباع است. به طور مثال اسید اولئیک آن به مقدار ۵۵ الی ۸۳ درصد است که موجب افزایش HDL[6] یا کلسترول خوب خون می‌شوند. عناصر فعال زیستی تشکیل‌دهنده روغن زیتون شامل: فنل‌های قطبی (هیدروکسی تیروزول و مشتقات آن و اولئوکانتال ترکیب فعالی شبیه به ایبوپروفن)، فلاوونوئیدها و اسیدهای فنولی (۱۰۰ الی ۸۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم روغن)، لیگنین، کاروتنوئیدها (۱ الی ۲۰ قسمت در میلیون)، دی‌الکل‌های تری‌ترپن (۱ الی ۲۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم روغن زیتون)، و اسکوالن (بیش از ۱۰۰۰ الی ۸۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روغن) و توکوفرول‌ها، به ویژه آلفاتوکوفرول، است. توکوفرول‌ها ترکیباتی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ویتامینی هستند که آلفاتوکوفرول در حدود ۸۸/۵ درصد از کل توکوفرول‌های موجود در روغن زیتون را تشکیل می‌دهد. همچنین بتا و گاما توکوفرول ۹/۹ درصد و دلتاتوکوفرول ۱/۶ درصد از کل توکوفرول‌های موجود در روغن زیتون را به خود اختصاص داده‌اند. ایزومر آلفاتوکوفرول خاصیت هم‌افزایی با برخی از ترکیبات بیوفنولی دارد که منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌شود (Boskou *et al*., 2006). در پایداری اکسایشی روغن زیتون، مشارکت ترکیب اسیدهای چرب ۲۴ درصد تخمین زده شده است که بسیار کمتر از مشارکت ۵۱ درصدی ترکیبات پلی‌فنولی موجود در آن است. در نتیجه روغن‌های حاوی ترکیب اسیدهای چرب یکسان می‌توانند پایداری اکسایشی متفاوتی داشته باشند (Velaco and Dobarganes, 2002). از سوی دیگر، روغن زیتون حاوی ترکیبات استرولی به شکل آزاد یا استری شده با اسیدهای چرب است که مقدار آن‌ها در حدود ۱۱۳ الی ۲۶۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم روغن زیتون گزارش شده است. این ترکیبات دارای خواص مهمی از قبیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد التهابی هستند (Boskou *et al*., 2006). با توجه به ترکیبات زیست فعال چشمگیر موجود در این روغن، مشاهده شد که روغن زیتون نسبت به اکسیداسیون خود به خودی مقاوم است (Velaco and Dobarganes, 2002)، لذا، پژوهش‌های بسیاری در مورد شناسایی ترکیبات روغن زیتون ارقام مختلف و ماندگاری آن‌ها طی انبارداری انجام شده است. در مطالعه‌ای پایداری روغن‌های زیتون فرابکر حاصل از ۴ رقم زیتون شملالی[7]، چتویی[8]، اسلاتی[9]، و ایی هور[10] طی ۱۸ ماه انبارداری در دماهای مختلف ۵، ۱۵، ۲۵، و ۵۰ درجه سلسیوس بررسی شد و تغییر ترکیبات بیوفنلی آن‌ها در مدت انبارداری ارزیابی شد (Krichene *et al*., 2015). در یک بررسی، خواص فیزیکو شیمیایی روغن‌های زیتون خریداری شده از سوپر مارکت‌های کشور هند مورد ارزیابی قرار گرفت و پایداری این روغن‌ها طی انبارداری در ۳۰ روز و در دمای یخچال و دمای اتاق بررسی شد. تغییرات اسیدهای چرب، عدد پراکسید، عدد اسیدیته، ضریب خاموشی و مقدار فنل کل طی ۳۰ روز انبارداری مطالعه شد (Ashokkumarr *et al*., 2018). در پژوهش دیگری، پایداری اکسایشی روغن‌های زیتون بکر حاصل از ۴ رقم زیتون (آربکینا، کورنیکابرا[11]، پیکووال[12]، و هوجی بلانکا[13]) در دماهای

1- Zard
2- Roughani
3- Arbequina
4- Koroneiki
5- Manzanila
6- High – density lipoprotein
7 -*Chemlali*
8 -*Chetoui*
9 -*Oueslati*
10 -*EI Hor*
11- Cornicabra
12- Picual
13- Hojiblanca

۵، ۱۰، و ۲۰ درجه سلسیوس، طی ۳ سال انبارداری، بررسی شد (Alvarruiz *et al.*, 2020). همچنین نمونه‌های روغن زیتون فرابکر رقم کرونائیکی چند منطقه از یونان از نظر خواص فیزیکوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بررسی شد. نتایج حاکی از پایداری اکسایشی و مقدار ترکیبات بیوفنلی بالای روغن حاصل از رقم کرونائیکی مناطق تحت بررسی بود (Kontominas *et al.*, 2017). در پژوهشی دیگر، تغییرات پارامترهای کیفی از قبیل ضریب خاموشی، فنل کل، ترکیب اسید چرب، عدد پراکسید، عدد اسیدیته و ترکیبات فرار در روغن زیتون فرابکر رقم کرونائیکی بسته‌بندی شده در بطری‌های شیشه‌ای تیره و ظروف bag-in-box (به منظور بررسی تاثیر بسته‌بندی)، طی ۱۸ ماه انبارداری در دماهای ۱۵و ۲۲، درجه سلسیوس، مورد بررسی قرار گرفت (Lolis et al., 2020).

در این پژوهش به بررسی تغییرات پارامترهای کیفی (از قبیل عدد پراکسید، عدد اسیدیته، عدد آنیزیدین)، برخی از خواص فیزیکوشیمیایی (مانند ترکیب اسیدهای چرب، ترکیب استرولی، ترکیب تری‌گلیسریدی، مقدار موم و مواد غیرقابل صابونی) و ترکیبات موثره (از طریق اندازه‌گیری مقدار ترکیبات پلی فنولی، فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی)، به منظور بررسی ماندگاری روغن زیتون فرابکر حاصل از رقم کرونائیکی استان گلستان طی دوران انبارداری (از سال ۱۳۹۴ تا سال ۱۳۹۶) در دمای ۴ درجه سلسیوس پرداخته شد. تمامی پارامترهای کیفی و خواص فیزیکوشیمیایی بررسی شده با حدود تعیین شده برای روغن زیتون فرابکر، در استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۴۶، با عنوان روغن زیتون- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون، مقایسه شد. لازم به ذکر است که تعیین تغییرات خواص فیزیکوشیمیایی و خواص آنتی اکسیدانی رقم کرونائیکی استان گلستان طی انبارداری در دمای ۴ درجه سلسیوس برای نخستین بار گزارش می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد

در سال ۱۳۹۴، میوه‌های سالم و بدون لک زیتون رقم کرونائیکی، در اواخر ماه شهریور، از باغی مشخص در استان گلستان چیده شدند. روغن‌کشی با استفاده از دستگاه نیمه صنعتی روغن‌کشی انجام شد، بدین ترتیب که ابتدا میوه‌های زیتون شسته، و برگ‌گیری شدند. سپس، وارد خردکن دستگاه شده و چرخ شدند و محصول چرخ شده وارد قسمت مالاکسور دستگاه (قسمتی که زیتون به صورت خمیر در می‌آید) شد تا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۷ درجه سلسیوس ورز داده شود. در ادامه خمیر زیتون وارد سانتریفوژ (۶۰۰۰ الی ۸۰۰۰ دور بر دقیقه) شده و روغن استحصال شده توسط صافی تعبیه شده در خروجی دستگاه شفاف شد. روغن‌های زیتون به دست آمده در ظروف شیشه‌ای تیره بسته بندی (۳ نمونه یک لیتری) و در شرایط مناسب (دمای ۴ درجه سلسیوس و به دور از نور) نگه‌داری شدند تا مورد آزمون و بررسی قرار گیرند. باید متذکر شد که سال ۱۳۹۴ زمان صفر در نظر گرفته شد، سال ۱۳۹۵ یک سال پس از نمونه‌برداری اولیه بود و سال ۱۳۹۶، دو سال پس از نمونه‌برداری اولیه بود که در نمودارها، به ترتیب، ۰، ۱، و ۲ ارائه شده‌اند.

روش ها

اندازه‌گیری عدد اسیدیته

ابتدا ۵ گرم از نمونه روغن با ۵۰ میلی‌لیتر اتانول خنثی و داغ مخلوط و در نهایت در حضور فنول فتالئین با سود ۰/۱ نرمال تیتر شد تا رنگ صورتی ایجاد شود. سپس، توسط رابطه ۱ عدد اسیدیته محاسبه شد (INSO 4178, 2011).

(رابطه ۱)

$$\text{عدد اسیدیته} = \frac{\text{حجم سود مصرفی} \times \text{نرمالیته سود مصرفی} \times (۲۸/۲)}{\text{وزن نمونه روغن}}$$

اندازه‌گیری عدد پراکسید

بدین منظور، ۳۰ میلی‌لیتر از محلول «اسید استیک + ایزواکتان» که به نسبت ۳ به ۱ تهیه شده بود به ۵ گرم نمونه روغن اضافه شد. سپس، ۰/۵ میلی‌لیتر یدور پتاسیم اشباع (KI) به محتویات ظرف اضافه شد و ظرف به مدت ۱ دقیقه در تاریکی (کابینت تاریک) قرار داده شد. پس از طی شدن مرحله تاریکی، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. سپس، چند قطره معرف چسب نشاسته (محلول نشاسته) یک درصد به ظرف اضافه شد و نمونه آماده شده با تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تیتر شد تا بی‌رنگ شود. برای حذف مقدار یدی که KI آزاد می‌کند از شاهد استفاده شد تا این اختلاف از بین برود. شاهد بدون روغن نیز تیتر شد. سپس، از طریق رابطه ۲ عدد پراکسید محاسبه شد (INSO 4179, 2016).

(رابطه ۲)

$$\text{عدد پراکسید} = \frac{\text{نرمالیته تیوسولفات} \times (\text{حجم تیوسولفات مصرف شده توسط شاهد} - \text{حجم تیوسولفات مصرف شده توسط نمونه روغن}) \times 1000}{\text{وزن نمونه}}$$

اندازه‌گیری عدد آنیزیدین

ابتدا، ۰/۱۲۵ گرم از کریستال‌های آنیزیدین در بالن ۵۰ میلی‌لیتری توسط اسیداستیک به حجم رسانده شد (واکنشگر آنیزیدین). در بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری، ۰/۵ گرم از نمونه با ایزواکتان به حجم رسانده شد (محلول آزمونه). ۵ میلی‌لیتر از محلول آزمونه به لوله آزمایش انتقال یافت و به آن یک میلی‌لیتر اسید استیک اضافه و به مدت ۸ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس، واکنشگر آنیزیدین به آن اضافه شده و ۲ دقیقه زمان داده شد تا واکنش کامل شود (محلول آزمونه واکنش نداده). در لوله آزمایش دیگری ۵ میلی‌لیتر از محلول آزمونه ریخته شد و به آن یک میلی‌لیتر واکنشگر آنیزیدین اضافه شد. لوله آزمایش به مدت ۸ دقیقه در تاریکی قرار گرفت، سپس دو دقیقه فرصت داده شد تا واکنش کامل شود (محلول آزمونه واکنش داده). در یک لوله آزمایش دیگر ۵ میلی‌لیتر ایزواکتان ریخته و یک میلی‌لیتر واکنشگر آنیزیدین به آن اضافه شده و به مدت ۸ دقیقه در تاریکی قرار داده شد، ۲ دقیقه دیگر زمان داده شد تا واکنش کامل گردد (شاهد). جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Perkin Elmer Lambda 265, Massachusetts, America) ، نسبت به حلال ایزواکتان، در طول موج ۳۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس، توسط رابطه ۳ مقدار عدد آنیزیدین محاسبه گردید (INSO 4093, 2016).

(رابطه ۳)

عدد آنیزیدین = (جذب آزمونه واکنش داده - جذب آزمونه واکنش نداده - جذب شاهد) ×۱/۲×۲۵ / وزن نمونه

اندازه گیری میزان مواد غیر قابل صابونی

بدین منظور، نمونه روغن (۵ گرم) با محلول هیدروکسید پتاسیم اتانولی در شرایط تقطیر معکوس جوشانده شد تا صابونی شود. سپس، مواد غیر قابل صابونی با استفاده از هگزان ۳ بار استخراج شده و در یک ظرف (بالن) از قبل توزین شده جمع‌آوری شد. هگزان توسط تبخیرکننده گردان (روتاری) تبخیر شد و پس از تبخیر حلال و خشک کردن، ظرف حاوی ماده غیر قابل صابونی توزین گردید. مقدار مواد غیر قابل صابونی بر حسب درصدی از جرم نمونه و توسط رابطه ۴ محاسبه شد (INSO 4097, 1997).

(رابطه ۴)

مقدار مواد غیر قابل صابونی (درصد وزنی نمونه) = (وزن ظرف (گرم) - وزن مواد باقی‌مانده (گرم)) / وزن نمونه × ۱۰۰

شناسایی و اندازه‌گیری میزان اسیدهای چرب

متیلاسیون نمونه‌های روغن زیتون و آنالیز اسیدهای چرب با استفاده از کروماتوگراف گازی (GC) مطابق روش‌های شرح داده شده در استانداردهای ملی ایران، به ترتیب، به شماره‌های ۲-۱۳۱۲۶ و ۴-۱۳۱۲۶ انجام شدند (INSO 13126-2, 2013; INSO 13126-4, 2013). برای متیلاسیون، روغن با افزودن ۲ میلی‌لیتر هگزان و ۲۰۰ میکرولیتر پتاس متانولی ۲ مولار در دمای محیط متیله شده و پس از آبگیری با سولفات سدیم بدون آب، نمونه متیله شده به دستگاه GC (Young Lin 6500, Seoul, Korea) تزریق گردید. برای ارزیابی ترکیب اسیدهای چرب از دستگاه GC مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله و ستون موئینه (Cpsil-88) با طول ۱۲۰ متر، پرشده با سیانوپروپیل ۷۰ درصد (Agilent J & W, Santa Clara, USA) استفاده شد. قطر ستون ۲/۵ میلی‌متر، ضخامت ستون ۰/۲۵ میکرومتر، گاز حامل هیدروژن (شدت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه) و مقدار نمونه تزریق شده ۱ میکرولیتر بود. برنامه حرارتی از نوع هم دما[2]، درجه حرارت آون ۱۷۵ درجه سلسیوس، درجه حرارت تزریق ۲۸۵ درجه سلسیوس و درجه حرارت آشکارساز ۳۲۰ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد.

شناسایی و اندازه‌گیری میزان استرول‌ها

تعیین استرول‌ها طبق روش ذکر شده در استاندارد ملی ایران انجام گردید (INSO 16324, 2011). مقدار ۱ میلی لیتر محلول استاندارد داخلی (α-کلستانول) به ۵ گرم نمونه اضافه شد. سپس، ۱۰میلی‌لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم اتانولی و سنگ جوش به آن اضافه شد. لوله شیشه‌ای کندانسور برگشتی به بالن سرسمباده‌ای متصل شده و به مدت یک ساعت حرارت داده شد. محتویات بالن به قیف جداکننده انتقال داده شد و با دی اتیل اتر (هر بار ۸۰ میلی لیتر) ۳ بار استخراج انجام شد. هر بار به فاز آبی (لایه زیرین) دی اتیل اتر اضافه شده و فاز دی اتیل اتری فوقانی در یک قیف جداکننده جمع آوری گردید. در نهایت فاز دی اتیل اتری جمع‌آوری شده نیز با آب مقطر چندین بار شستشو داده شد. سپس، محتویات دی اتیل اتری تبخیر شد. مواد غیرقابل صابونی در مقدار کمی دی اتیل اتر حل و با استفاده از میکروسرنگ در فاصله ۲ سانتیمتری از لبه پایینی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک خطی از محلول فوق کشیده شد. تانک توسعه با حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول توسعه (به نسبت حجمی مساوی هگزان و دی‌اتیل‌اتر) پر شده و سپس صفحه کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)[1] درون تانک قرار داده شد. مناطق مشخصه استرول‌ها با استفاده از کاردک جمع آوری و به بشر کوچکی منتقل شد. سپس، ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول به آن اضافه و پس از مخلوط کردن، لایه حلال جدا و با عبور جریان گاز نیتروژن تبخیر

1 -Thin Layer Chromatography

شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر واکنشگر سیلیله کننده (پیریدین، هگزامتیل دیسیلازن، و تری‌متیل کلروسیلان به نسبت ۹:۳:۱) به باقی‌مانده اضافه و به دستگاه GC (Young Lin 6500, Seoul, Korea) تزریق شد. ستون دستگاه GC، DB-5 (Agilent J & W, Santa Clara, USA) (با ابعاد ۲۵۰m μ ×ID mm ۰/۲۵ × m ۵۰)، گاز حامل هیدروژن با شدت جریان ۳۶ سانتی‌متر بر ثانیه، سیستم تزریق شکافته (دو قسمتی) با نسبت ۱ به ۲۰، دمای تزریق کننده و آشکارساز، به ترتیب، ۳۲۰ درجه سلسیوس و ۲۸۰ درجه سلسیوس، برنامه دمایی آون ۲۴۰ تا ۲۵۵ درجه سلسیوس با سرعت ۴ درجه سلسیوس در هر دقیقه، و حجم تزریق ۱ میکرولیتر بود. مقادیر به صورت نسبت سطح زیر هر پیک به مجموع سطوح تمامی پیکها و بر حسب درصد بیان گردید.

شناسایی و اندازه‌گیری میزان بیوفنل‌ها با استفاده از HPLC

اندازه‌گیری بیوفنول‌ها به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)[1] (Korea) Young Lin 9100, Seoul, مجهز به آشکارساز UV و ستون LiChrospher®100 RP-18 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) با طول ۱۵۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۳/۲ میلی‌متر و ضخامت ذرات ۵ میکرومتر انجام شد (INSO 16323, 2013). این روش بر پایه استخراج مستقیم ترکیبات جزیی بیوفنولی قطبی از روغن زیتون با استفاده از محلول متانول بود که توسط HPLC با کمک آشکارساز UV در طول موج ۲۸۰ نانومتر شناسایی و اندازه‌گیری شدند. فاز متحرک شامل: (A) آب حاوی ۰/۲ درصد حجمی اسید فسفریک، و (B) متانول و استونیتریل (۵۰:۵۰) بود. زمان برنامه گرادیان مورد استفاده برای شناسایی ترکیبات بیوفنلی ۷۰ دقیقه بوده که شامل ۹۶ درصد (A) و ۴ درصد (B) (۴۰ دقیقه)، ۵۰ درصد (A) و ۵۰ درصد (B) (۴۵ دقیقه)، ۴۰ درصد (A) و ۶۰ درصد (B) (۶۰ دقیقه) و ۰ درصد (A) و ۱۰۰ درصد (B) (۷۰ دقیقه) بود. در یک بالن ۱۰ میلی‌لیتری درب دار ۲ گرم روغن ریخته شد، و ۵ میلی‌لیتر محلول متانول/آب به نسبت حجمی/حجمی ۲۰ به ۸۰ به آن افزوده و ۱ دقیقه تکان داده شد. سپس در حمام فراصوت ده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، عمل استخراج انجام شد. محتویات بالن در یک لوله سانتریفوژ ریخته شده و در سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. فاز شفاف بالایی با استفاده از یک سرنگ پلاستیکی ۵ میلی لیتری برداشته شده و با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری PVDF، صاف شد. شدت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، دمای ستون ۲۵ درجه سلسیوس و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود. ترکیب درصد هر ترکیب بیوفنولی، بر اساس تزریق ماده مرجع هر بیوفنل به دستگاه HPLC و شناسایی زمان بازداری پیک آن در کروماتوگراف به دست آمد.

اندازه‌گیری مقدار فنول کل

محتوای فنول کل با استفاده از روش رنگ سنجی تعیین گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده حاوی ترکیبات بیوفنلی (عصاره حاصل از روغن زیتون که در قسمت قبل به دست آمد)، ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر، و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف فولین-سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu) مخلوط شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰ درصد حجمی/وزنی) اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-VIS (Perkin Elmer Lambda 265, Massachusetts, America) در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. نمونه شاهد با آب مقطر به جای عصاره تهیه شد و تمامی مراحل روی آن انجام شد. منحنی استاندارد اسید گالیک از ۰-۲۰۰ میلی‌گرم / لیتر به دست آمد و محتوای فنولی کل برحسب میلی‌گرم اسید گالیک /کیلوگرم ماده خشک بیان گردید (Kontominas *et al*., 2017).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی، ۰/۵ میلی لیتر از محلول استخراج شده حاوی ترکیبات بیوفنلی به ۱/۵ میلی لیتر از محلول متانولی ۰/۱۳۵ میلی مولار DPPH[2] اضافه گردید. ۰/۵ میلی لیتر از شاهد (پس از طی کردن مراحل استخراج بدون افزودن نمونه) نیز به ۱/۵ میلی لیتر محلول متانولی DPPH به عنوان نمونه کنترلی اضافه شد. نمونه و کنترل پس از یک دقیقه تکان دادن، به مدت نیم ساعت در مکان تاریک قرار گرفتند. سپس، جذب آن‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS (Perkin Elmer Lambda 265, Massachusetts, America) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شدند. برای تمامی نمونه‌ها سه مرتبه جذب خوانده شد. با استفاده از رابطه ۵ میزان فعالیت آنتی اکسیدانی محاسبه گردید (Kontominas *et al*., 2017).

(رابطه ۵)

$$\text{درصد فعالیت آنتی اکسیدانی} = \frac{\text{(جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتر-جذب نمونه کنترل در ۵۱۷ نانومتر)}}{\text{جذب نمونه کنترل در ۵۱۷ نانومتر}} \times ۱۰۰$$

1 -High Performanc Liquid Chromatography

2 -2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

اندازه‌گیری اختلاف میزان تئوری و واقعی تری‌آسیل گلیسرول‌ها با استفاده از تعداد کربن معادل ۴۲ (ECN42) [1]

تری‌گلیسیریدهای موجود در روغن بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۷۳۷۹ تعیین شدند. تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها بر اساس نوع اسیدهای چرب موجود، ECNهای متفاوتی دارند که از فرمول ECN=CN-2n محاسبه می‌شود که در آن CN، مجموع تعداد اتم کربن اسیدهای چرب در مولکول تری‌آسیل‌گلیسیرول و n، تعداد باندهای دوگانه در اسیدهای چرب می‌باشد.

به منظور انجام آزمون، حدود ۲/۵ گرم از نمونه کاملاً شفاف، یکنواخت و خشک شده، با دقت ۰/۰۰۱ گرم در یک بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری توزین گردید و با حلال شستشو (۲۰ میلی‌لیتر) به حجم رسانیده شد. با استفاده از پیپت حجمی ۲۰ میلی‌لیتر از محلول به داخل ستون سیلیکاژلی آماده شده ریخته و شیر باز شد تا سطح فوقانی سیلیکاژل پایین بیاید. سپس، با ۱۵۰ میلی‌لیتر حلال شستشو داده شد و سرعت حرکت حلال در حدود ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم گردید. محلول خروجی ستون در یک بالن ته گرد ۲۵۰ میلی‌لیتری که قبلاً در آون خشک و توزین شده بود، جمع‌آوری شد. حلال در فشار پایین، در تبخیرکننده دورانی جدا شد (INSO 17379, 2014). سپس، ۰/۵ گرم از نمونه خالص شده در بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری توزین شده و با حلال استن به حجم رسانیده شد. اندازه‌گیری تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها با استفاده از دستگاه HPLC مجهز به آشکارساز رفراکتومتر دیفرانسیلی با حساسیت 10^{-4} واحد ضریب شکست انجام شد. برای فعال‌سازی دستگاه HPLC، محلول شستشو (فاز متحرک: استونیتریل و استون به نسبت ۱:۱) را با سرعت ۱/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه برای پاک‌سازی کل سیستم پمپ کرده تا زمانی که خط پایه ثابت شود. سپس، ۲۰ میکرولیتر از نمونه آماده شده به دستگاه HPLC (Young Lin 9100, Korea Seoul,) تزریق شد. ستون مورد استفاده LiChrospher® 100 RP-18 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) با ابعاد: طول ۱۵۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۳/۲ میلی‌متر و ضخامت ذرات ۵ میکرومتر بود و دمای آن در ۳۵ درجه سلسیوس تنظیم شد. جداسازی بر اساس ناحیه خروج پیک‌ها است که با عدد زنجیری هم ارز ۴۲ مطابقت دارد (INSO 17379, 2014). ECN42 تئوری از طریق ترکیب اسید چرب به دست آمد و ECN42 واقعی با استفاده از دستگاه HPLC تعیین گردید.

اندازه گیری مقدار موم

مقدار موم با استفاده از روش شرح داده شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۹۷۰۷ اندازه‌گیری شد (INSO 9707, 2016). بدین ترتیب که ۰/۵ گرم از نمونه در ۲ میلی‌لیتر هگزان حل و از یک ستون سیلیکاژلی (حاوی ۱۵ گرم) با کمک حلال هگزان و ماده رنگی سودان عبور داده شد. ماده خالص در یک ظرف جمع‌آوری گردید. حلال هگزان جمع‌آوری شده تبخیر و ماده تبخیر شده مجدداً در ۱ میلی‌لیتر هگزان حل شد. سپس، به دستگاه GC (Young Lin 6100, Seoul, Korea) حاوی تزریق کننده – خنک کننده سر ستون تزریق شد. ستون مورد استفاده، DB-5 (Agilent J & W, Santa Clara, United States) با طول ۱۲ متر، قطر ۰/۳۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۵۳ میکرومتر بود. دمای آون و تزریق‌کننده در ۸۰ درجه سلسیوس تنظیم و با سرعت ۵ درجه سلسیوس بر دقیقه به دمای ۳۴۰ درجه سلسیوس رسید. دمای آشکار ساز در ۳۲۰ درجه سلسیوس و شدت جریان گاز حامل هیدروژن ۳ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. حجم تزریق یک میلی‌لیتر بود.

آنالیز آماری

تمامی آزمایشات در این پژوهش در سه تکرار انجام شد. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 20 مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میانگین داده ها به وسیله آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد. شکل‌ها به وسیله نرم افزار اکسل ۲۰۱۰ رسم شدند و نتایج در جداول به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شدند.

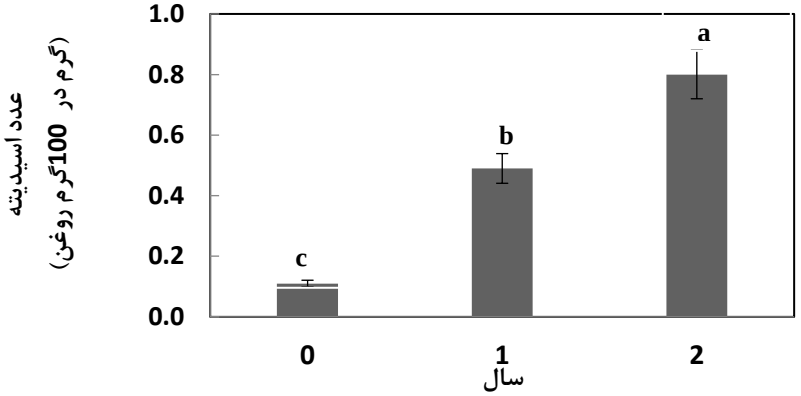
یافته‌ها

در این بخش نتایج آزمون‌های تعیین‌کننده ویژگی‌های کیفی (از قبیل عدد پراکسید، عدد اسیدیته، عدد آنیزیدین)، خواص فیزیکوشیمیایی (ترکیب اسیدهای چرب، ترکیب استرولی، ترکیب تری گلیسریدی، مقدار موم و مواد غیرقابل صابونی) و ترکیبات موثره (اندازه‌گیری مقدار ترکیبات پلی فنولی، فنل کل، و فعالیت آنتی‌اکسیدانی) روغن زیتون فرابکر حاصل از رقم کرونائیکی استان گلستان طی دوران انبارداری (از سال ۱۳۹۴ تا سال ۱۳۹۶) در دمای ۴ درجه سلسیوس ارائه شده است. لازم به ذکر است که دمای نگه‌داری روغن‌های زیتون ۴ درجه سلسیوس بوده و پس از هر بار آزمون نمونه‌ها درب بندی شده و در شرایط تاریکی (شیشه کدر قهوه ای) و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

1 -Equivalanet Carbon Number

عدد اسیدیته

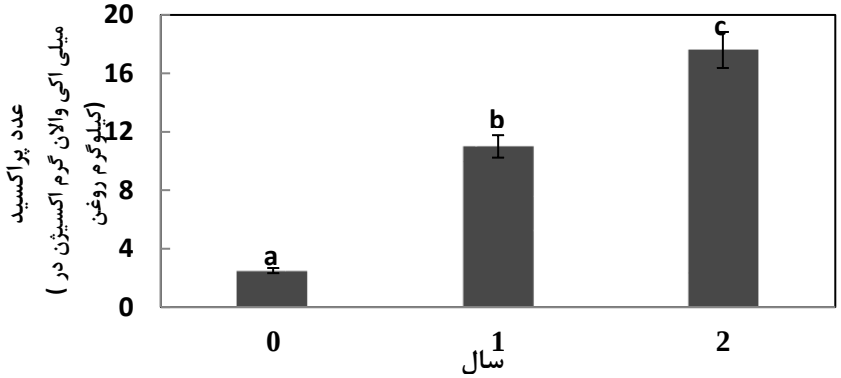
طبق نتایج به دست آمده در شکل ۱، اثر گذشت زمان بر مقدار اسیدیته در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار است. لذا می‌توان گفت که با گذشت زمان انبارداری، مقدار اسیدیته در روغن زیتون انبار شده به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین مقدار اسیدیته (۰/۸ گرم در ۱۰۰ گرم روغن) در نمونه روغن انبار شده بعد از گذشت ۲ سال (سال ۱۳۹۶) و کمترین مقدار آن (۰/۱ گرم در ۱۰۰ گرم روغن) در زمان نمونه‌برداری یا زمان صفر (سال ۱۳۹۴) مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند.



شکل ۱- تغییرات مقادیر عدد اسیدیته روغن‌های زیتون بکر رقم کرونائیکی انبار شده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس، حروف غیر مشابه a، b و c بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$).

عدد پراکسید

طبق نتایج به دست آمده در شکل ۲، مشخص شد که اثر انبارداری بر مقدار عدد پراکسید در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار است. لذا می‌توان گفت که طی گذشت زمان، مقدار عدد پراکسید در روغن زیتون به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. بیشترین مقدار عدد پراکسید (۱۷/۶ میلی‌اکی‌والان گرم اکسیژن در هر کیلوگرم روغن) پس از گذشت دو سال و کمترین مقدار آن (۲/۵ میلی‌اکی‌والان گرم اکسیژن در هر کیلوگرم روغن) در سال ۱۳۹۴ یا زمان صفر مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند.



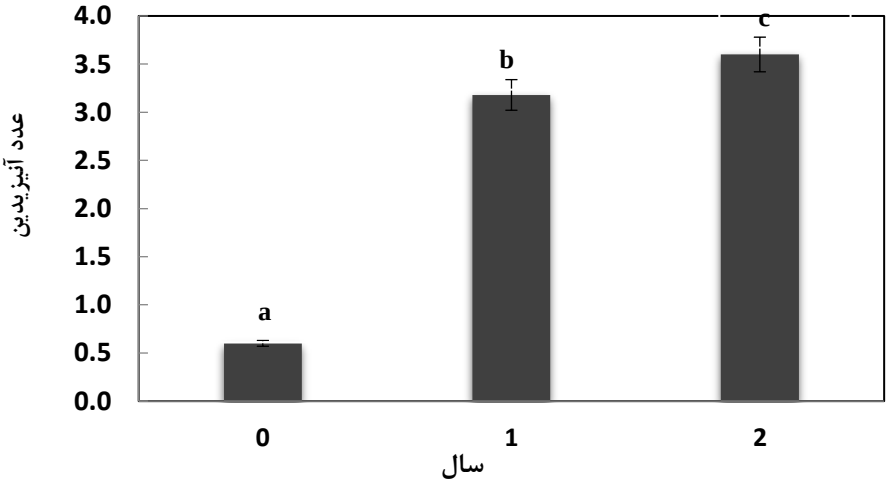
شکل ۲- تغییرات مقادیر عدد پراکسید در روغن‌های زیتون بکر رقم کرونائیکی انبارشده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس، حروف غیر مشابه a، b و c بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$).

عدد آنیزیدین

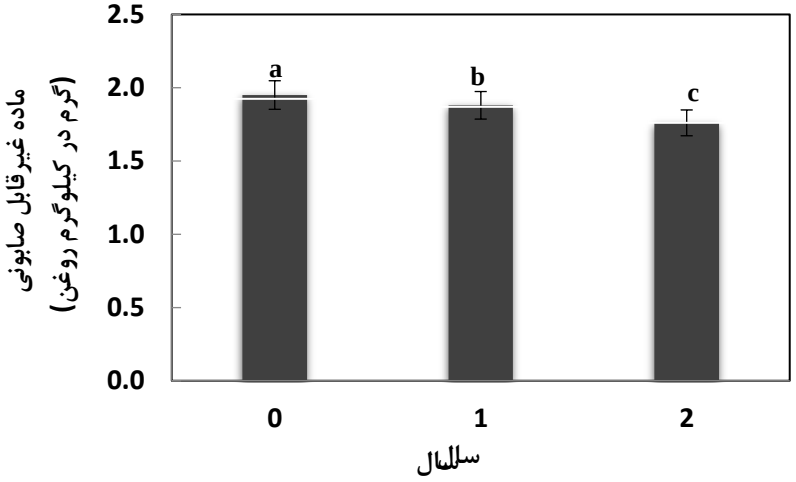
طبق نتایج به دست آمده در شکل ۳، اثر گذشت زمان انبارداری بر مقدار عدد آنیزیدین در روغن‌های انبار شده در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار است. لذا می‌توان گفت که با گذشت زمان انبارداری، عدد آنیزیدین در روغن زیتون به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. کمترین میزان عدد آنیزیدین (۰/۶) در روغن سال ۱۳۹۴ یا زمان صفر مشاهده شد و بیشترین مقدار آن (۳/۶) در روغن نمونه‌برداری شده در سال ۱۳۹۶ دیده شد که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند.

مواد غیرقابل صابونی

طبق نتایج بدست آمده در شکل ۴، مشخص شد که اثر گذشت زمان انبارداری، بعد از دو سال، بر مقدار مواد غیر قابل صابونی در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار است. بیشترین ترکیبات غیر قابل صابونی (۱/۹۵ گرم در کیلوگرم روغن) در روغن اندازه‌گیری شده در سال ۱۳۹۴ مشاهده شد.



شکل ۳- تغییرات مقادیر عدد آنیزیدین در روغن‌های زیتون بکر رقم کرونائیکی انبار شده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس، حروف غیر مشابه a، b و c بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$).



شکل ۴- تغییرات مقادیر مواد غیرقابل صابونی در روغن‌های زیتون بکر رقم کرونائیکی انبارشده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس، حروف غیر مشابه a، b و c بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$).

ترکیب اسیدهای چرب

نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که اسید اولئیک (۷۳/۴ الی ۷۴/۴ درصد)، اسید پالمیتیک (۱۳/۹ الی ۱۴/۳ درصد)، و اسید لینولئیک (۵/۹ الی ۶/۲ درصد)، به ترتیب، بیشترین مقادیر ترکیب اسیدهای چرب روغن زیتون رقم کرونائیکی را به خود اختصاص داده‌اند. نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از ان است که طی دوران انبارداری میزان اسید اولئیک کاهش اندک و مقدار اسید لینولئیک افزایش بسیار کمی داشته است. همچنین، نسبت اسیدهای چرب تک غیراشباع به چند غیراشباع کاهش اندکی داشت که به دلیل کاهش مقدار اسیدهای چرب تک غیراشباع و افزایش میزان اسیدهای چرب چند غیراشباع است.

ترکیب استرول‌ها و استرول کل

بررسی نتایج به دست آمده در جدول ۲ نشان داد که بیشترین ترکیبات استرولی در روغن‌های زیتون رقم کرونائیکی انبار شده، به ترتیب، بتاسیتواسترول (۸۴/۹۹ الی ۸۵/۳۷ درصد)، دلتا-۵-اونااسترول (۵/۴۷ الی ۵/۹۲ درصد)، و کمپسترول (۳/۶۴ الی ۳/۸۰ درصد) هستند. همچنین مقادیر کلسترول، کمپسترول، استیگمااسترول، کلرسترول و بتاسیتوسترول طی انبارداری اندکی کاهشی داشته‌اند. این در حالی است که میزان استرول کل اندازه‌گیری شده در سال ۱۳۹۴ به کمترین مقدار خود در سال ۱۳۹۶، طی دوسال انبارداری، رسیده است که دلیل آن کاهش استرول‌های خاص طی زمان انبارداری است. نتایج حاکی از کاهش بسیار ناچیز دلتا-۷-کمپسترول و براسیکا استرول بود ($p>۰/۰۵$).

جدول ۱- تغییرات مقادیر اسیدهای چرب روغن زیتون بکر رقم کرونائیکی انبار شده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس

ترکیب اسیدهای چرب (درصد)	سال		
	۰	۱	۲
اسید پالمیتیک (C16:0)	۱۴/۳۰±۰/۴۵^{b}	۱۴/۰۰±۰/۳۵^{a}	۱۳/۹۰±۰/۶۰^{a}
اسید پالمیتولئیک (C16:1c)	۱/۱۰±۰/۱۶^{a}	۱/۰۰±۰/۱۵^{b}	۰/۹۰±۰/۱۲^{c}
اسید مارگاریک (C17:0)	۰/۱۰±۰/۰۴^{a}	۰/۱۰±۰/۰۳^{a}	۰/۱۰±۰/۰۳^{a}
اسید هپتادکانوائیک (C17:1c)	۰/۱۰±۰/۰۳^{a}	۰/۱۰±۰/۰۵^{a}	۰/۱۰±۰/۰۵^{a}
اسید استئاریک (C18:0)	۲/۵۰±۰/۱۹^{b}	۲/۶۰±۰/۲۰^{b}	۲/۶۰±۰/۱۸^{b}
اسید اولئیک (C18:1c)	۷۴/۴۰±۱/۳۱^{a}	۷۳/۷۰±۱/۲۱^{b}	۷۳/۴۰±۱/۲۴^{b}
اسید لینولئیک (C18:2c)	۵/۹۰±۰/۰۲^{b}	۶/۲۰±۰/۰۳^{a}	۶/۲۰±۰/۰۵^{a}
اسید لینولنیک (C18:3c)	۰/۷۰±۰/۰۷^{b}	۰/۸۰±۰/۰۶^{a}	۰/۸۰±۰/۰۶^{a}
اسید آراشیدیک (C20:0)	۰/۴۰±۰/۰۱^{a}	۰/۴۰±۰/۰۱^{a}	۰/۴۰±۰/۰۱^{a}
اسید ایکوزانوئیک (C20:1c)	۰/۳۰±۰/۰۲^{a}	۰/۳۰±۰/۰۲^{a}	۰/۳۰±۰/۰۳^{a}
اسید بهنیک (C22:0)	۰/۲۰±۰/۰۲^{a}	۰/۲۰±۰/۰۱^{a}	۰/۲۰±۰/۰۲^{a}
مجموع اسیدهای چرب تک غیراشباع: ΣMUFA	۷۵/۹۰ ±۱/۵۲^{a}	۷۵/۱۰ ±۱/۴۳^{b}	۷۴/۷۰±۱/۴۴^{b}
مجموع اسیدهای چرب چند غیراشباع: ΣPUFA	۶/۶۰ ±۰/۰۹^{b}	۷/۰۰ ±۰/۰۹^{a}	۷/۰۰±۱/۱۰^{a}
مجموع اسیدهای چرب اشباع: ΣSFA	۱۷/۵۰ ±۰/۹۱^{a}	۱۷/۳۰ ±۰/۹۵^{a}	۱۷/۲۰±۰/۸۴^{a}
نسبت اسیدهای چرب تک غیراشباع به چند غیر اشباع: ΣMUFA/ ΣPUFA	۱۱/۵۰ ±۰/۵۲^{a}	۱۰/۷۳±۰/۴۰^{b}	۱۰/۶۷±۰/۳۲^{b}

نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین ارائه شده اند.

حروف غیر مشابه a، b و c در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار (p <۰,۰۵) است.

جدول ۲- تغییرات مقادیر ترکیب استرول‌ها و استرول کل در روغن‌های زیتون بکر رقم کرونائیکی انبار شده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس

ترکیب استرول‌ها (درصد)	سال		
	۰	۱	۲
کلسترول	۰/۳۲±۰/۰۸^{a}	۰/۱۳±۰/۰۶^{b}	۰/۰۵±۰/۰۱^{c}
براسیکااسترول	۰/۰۵±۰/۰۰^{a}	۰/۰۵±۰/۰۲^{a}	۰/۰۵±۰/۰۱^{a}
ارگسترول	ND	ND	ND
۲۴-متیلن کلسترول	ND	ND	ND
کمپسترول	۳/۹۷±۰/۰۷^{a}	۳/۸۰±۰/۰۹^{b}	۳/۶۴±۰/۰۷^{c}
کمپستانول	ND	ND	ND
استیگمااسترول	۱/۳۰±۰/۰۲^{a}	۱/۱۳±۰/۰۲^{b}	۱/۰۳±۰/۰۵^{c}
دلتا-۷-کمپسترول	۰/۰۳±۰/۰۱^{a}	۰/۰۳±۰/۰۱^{a}	۰/۰۴±۰/۰۲^{a}
دلتا-۵ و۲۳-استیگمااستادی‌انول	۰/۱۷±۰/۰۴^{a}	۰/۱۱±۰/۰۳^{b}	۰/۱۲±۰/۰۱^{b}
کلرسترول	۱/۱۱±۰/۰۵^{a}	۰/۷۴±۰/۱۴^{b}	۰/۷۵±۰/۱۲^{b}
بتاسیتواسترول	۸۵/۳۷±۰/۵۰^{a}	۸۵/۳۴±۰/۵۲^{a}	۸۴/۹۹±۰/۲۵^{b}
دلتا-۵-اونااسترول	۵/۹۲±۰/۵۰^{a}	۵/۵۹±۰/۲۵^{b}	۵/۴۷±۰/۴۵^{b}
سیتوستانول	۰/۶۰±۰/۰۱^{a}	۰/۵۶±۰/۰۲^{a}	۰/۱۰±۰/۰۱^{b}
دلتا-۵و۲۴-استیگمااستادی‌انول	۰/۲۹±۰/۰۲^{a}	۰/۲۳±۰/۰۱^{b}	۰/۲۸±۰/۰۱^{a}
دلتا-۷-استیگمااسترول	۰/۵۰±۰/۰۱^{a}	۰/۳۰±۰/۰۸^{b}	۰/۲۷±۰/۰۲^{b}
استرول کل (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۱۰۹^{a}	۱۰۷۹^{b}	۱۰۲۵^{c}

نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین ارائه شده اند.

حروف غیر مشابه a، b و c در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار (p <۰/۰۵) است. **ND : غیر قابل تشخیص**

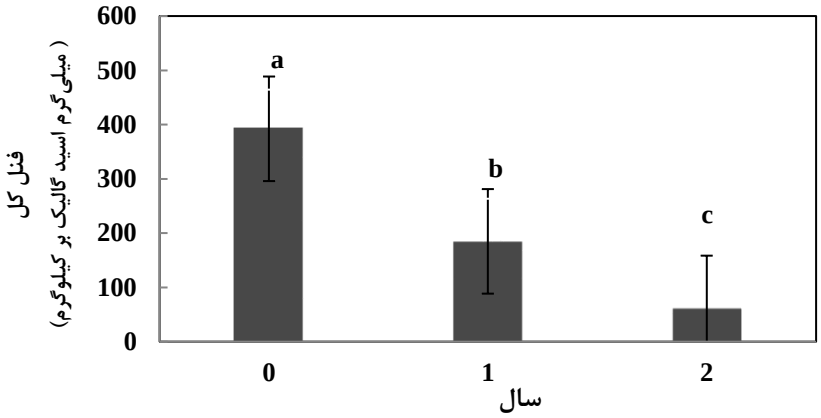
مقدار فنل کل

طبق نتایج بدست آمده در شکل ۵، مشاهده شد که تاثیر زمان انبارداری بر میزان فنول کل در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار است. لذا می‌توان گفت که با گذشت زمان، میزان فنول کل در روغن زیتون به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. بیشترین میزان فنول کل (۳۹۲/۳ میلی‌گرم اسید گالیک بر کیلوگرم) در نمونه روغن سال ۱۳۹۴ (روغن تازه استخراج شده) و کمترین مقدار آن (۶۲/۲ میلی‌گرم اسید گالیک بر کیلوگرم) در روغن سال ۱۳۹۶ (پس از گذشت ۲ سال) مشاهده گردید که اختلاف معنی داری با هم داشتند.

اندازه‌گیری مقدار و نوع ترکیبات بیوفنلی

در جدول ۳، نوع و مقدار هر ترکیب بیوفنولی در نمونه‌های روغن

زیتون طی دوسال انبارداری ارائه شده است. براساس نتایج به دست آمده، بیشترین ترکیبات بیوفنلی شناسایی شده، به ترتیب، اسید فرولیک (۷/۷۰ الی ۲۰/۲۰ درصد)، اسید کافئیک (۱۰/۳۰ الی ۱۴/۰۰ درصد)، کاتچین (۱۰/۹۰ الی ۱۲/۲۰ درصد)، و اولئوروپین (۲/۱ الی ۱۱/۴ درصد) بود.



شکل ۵- تغییرات مقدار فنل کل در روغن‌های زیتون بکر رقم کرونائیکی انبار شده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس، حروف غیر مشابه a، b و c بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$).

جدول ۳- مقادیر ترکیبات بیوفنلی موجود در روغن‌های زیتون بکر رقم کرونائیکی انبار شده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس

ترکیب بیوفنل‌ها (درصد)	سال ۰	سال ۱	سال ۲
هیدروکسی تیروزول	۲/۳۰±۰/۰۳^{a}	۱/۹۹±۰/۰۱^{b}	۱/۲۰±۰/۰۱^{c}
تیروزول	۱/۵۰±۰/۱۲^{b}	۱/۵۰±۰/۱۰^{b}	۳/۳۰±۰/۰۶^{a}
اسید سینامیک	۱/۵۰±۰/۰۷^{a}	۱/۴۰±۰/۰۶^{a}	۱/۱۰±۰/۰۱^{b}
اولئوروپین	۱۱/۴۰±۱/۶۱^{a}	۹/۲۰±۱/۳۰^{b}	۲/۱۰±۰/۲۱^{c}
اسید گالیک	ND	ND	ND
وانیلین	۰/۶۰±۰/۰۱^{c}	۴/۲۰±۰/۰۸^{b}	۱۶/۲۰±۰/۰۶^{a}
اسید فرولیک	۲۰/۲۰±۰/۰۹^{a}	۱۰/۵۰±۰/۰۱^{b}	۷/۷۰±۰/۰۹^{c}
کاتچین	۱۲/۲۰±۰/۰۹^{a}	۱۱/۸۰±۰/۰۳^{b}	۱۰/۹۰±۰/۰۱^{c}
اسید کافئیک	۱۴/۰۰±۰/۰۸^{a}	۱۴/۰۰±۰/۰۵^{a}	۱۰/۳۰±۰/۰۲^{b}
کوئرستین	۵/۳۰±۰/۰۹^{a}	۴/۶۰±۰/۱۰^{b}	۲/۸۰±۰/۰۲^{c}
لوتئولین	۲/۶۰±۰/۰۲^{a}	۲/۳۰±۰/۰۱^{b}	۱/۸۰±۰/۰۱^{c}
روتین	۱/۹۰±۰/۰۳^{a}	۱/۴۹±۰/۰۱^{ab}	۱/۱۹±۰/۰۵^{b}
ناشناخته	۲۶/۵۰±۲/۲۴^{c}	۳۷/۰۲±۱/۷۹^{a}	۳۴/۸۹±۰/۵۵^{b}

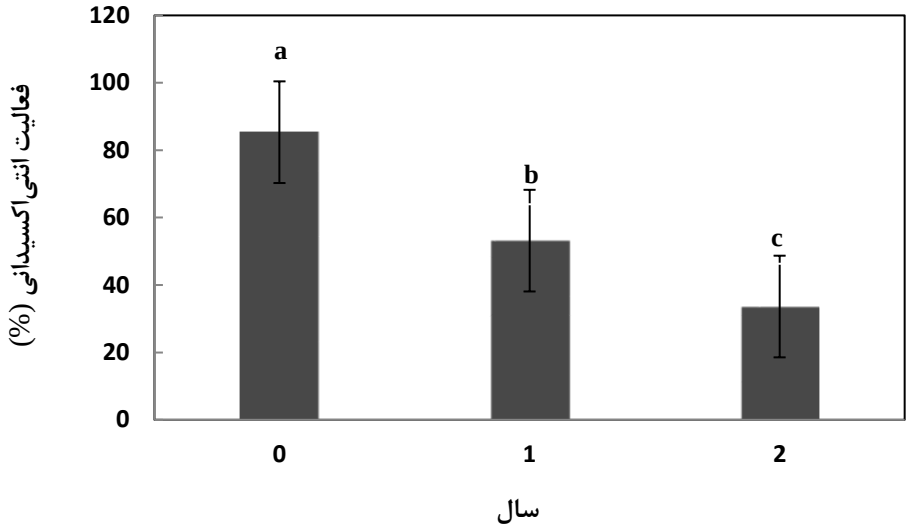
نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین ارائه شده اند.

حروف غیر مشابه a، b و c در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p < ۰/۰۵$) است. ND : غیر قابل تشخیص

طبق نتایج به دست آمده در جدول ۳، مشاهده گردید که روغن زیتون سال ۱۳۹۴ (زمان صفر) دارای بیشترین مقدار ترکیبات بیوفنولی بوده که با گذشت زمان این ترکیبات کاهش معنی‌داری یافته‌اند. درحالیکه افزایش چشمگیری در مقدار تیروزل و وانیلین مشاهده شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

طبق نتایج به دست آمده در شکل ۶ مشخص شد که زمان انبارداری روغن زیتون بر مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی تا سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار بود. لذا می‌توان گفت که با گذشت زمان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روغن زیتون به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. بیشترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی (۸۵/۳۵ درصد) در روغن نمونه‌برداری شده در زمان صفر (سال ۱۳۹۴) و کمترین مقدار آن (۳۳/۶۲ درصد) در روغن انبار شده بعد از گذشت دو سال مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند.



شکل ۶- تغییرات درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی روغن‌های زیتون بکر رقم کرونائیکی انبار شده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس، حروف غیر مشابه a، b و c بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$).

تعداد کربن معادل (ECN)

نتایج مقایسه‌ای از میانگین مقدار واقعی ECNتری‌آسیل گلیسرول‌ها، بر پایه عدد کربن معادل ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۸، ۵۰ و ۵۲، به دست آمده از آنالیز HPLC در جدول ۴ ارائه شده است. با توجه به نتایج، اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین ECNهای نمونه‌های روغن زیتون کرونائیکی استحصال شده در زمان‌های انبارداری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). مشاهده شد که در مدت زمان انبارداری، در هر ۳ تیمار، ECN42 کمترین میزان و ECN48 بیشترین میزان را داشت. همچنین، طی مدت زمان انبارداری مقادیر ECN44، ECN46، ECN48 و ECN42 بعد از گذشت دو سال انبارداری تغییر معنی‌داری نیافت.

جدول ۴- تغییرات میانگین مقدار واقعیECN تری‌آسیل گلیسرول‌ها در روغن‌های زیتون بکر رقم کرونائیکی طی دوسال انبارداری در دمای ۴ درجه سلسیوس (با استفاده از HPLC)

سال	ECN (%)					
	ECN52	ECN50	ECN48	ECN46	ECN44	ECN 42
۰	۱/۴±۰/۰۴^{a}	۷/۰±۰/۰۱^{a}	۷۱/۷±۰/۰۵^{b}	۱۶/۵±۰/۰۴^{b}	۳/۱±۰/۰۶^{a}	۰/۳±۰/۰۳^{c}
۱	۱/۳±۰/۰۳^{b}	۶/۹±۰/۰۲^{b}	۷۱/۷±۰/۰۴^{b}	۱۶/۴±۰/۰۷^{b}	۳/۲±۰/۰۱^{a}	۰/۵±۰/۰۱^{a}
۲	۱/۳±۰/۰۲^{b}	۶/۹±۰/۰۲^{b}	۷۱/۸±۰/۰۲^{a}	۱۶/۶±۰/۰۴^{a}	۳/۲±۰/۰۱^{a}	۰/۴±۰/۰۲^{b}

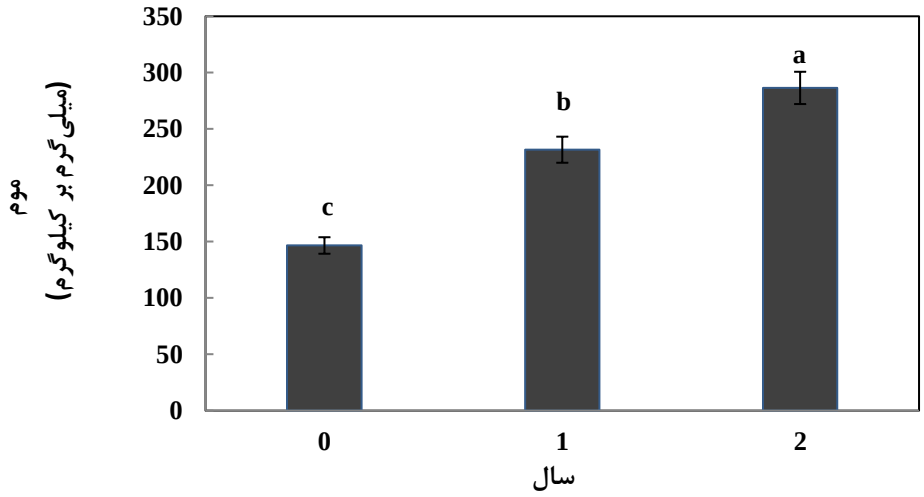
نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین ارائه شده اند.

حروف غیر مشابه a، b و c در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p< ۰/۰۵$).

ΔECN42 برای نمونه‌های روغن زیتون براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۷۳۷۹ محاسبه شد. بدین ترتیب که اختلاف میزان تئوری ECN تری‌آسیل گلیسرول ها (محاسبه شده از طریق ترکیب اسید چرب حاصل از آنالیز GLC) و مقدار واقعی ECN تری‌آسیل گلیسرول ها (به دست امده از آنالیز HPLC)، برای هر نمونه روغن زیتون، طی زمان‌های ۰، ۱، و ۲ سال، به ترتیب، ۰/۲، ۰/۱۹، و ۰/۱۹ به دست آمد.

موم

طبق نتایج به دست آمده در شکل ۷، مشخص گردید که اثر سال بر مقدار موم در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار است. به طوری‌که میزان موم از زمان نمونه‌برداری اولیه تا پس از گذشت دو سال انبارداری به طور خطی افزایش یافت. لذا می‌توان گفت که با گذشت زمان انبارداری، مقدار موم در روغن زیتون به طور معنی‌داری افزایش خواهد یافت. بیشترین مقدار موم (۲۸۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در موم روغن زیتون اندازه‌گیری شده پس از گذشت ۲ سال (سال ۱۳۹۶) و کمترین مقدار آن (۱۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در روغن سال ۱۳۹۴ مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند.



شکل ۷- تغییرات مقادیر موم در روغن‌های زیتون بکر رقم کرونائیکی انبار شده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس، حروف غیر مشابه a، b و c بیانگر اختلاف معنی‌دار است (p< ۰/۰۵).

بحث

بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۴۶، اسیدیته آزاد روغن‌های زیتون فرابکر و بکر درجه یک، بر حسب درصد اسید اولئیک، به ترتیب، نباید بیشتر از ۰/۸ و ۲ گرم درصد گرم روغن باشد (INSO 1446, 2011). نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که پس از گذشت ۲ سال انبارداری در دمای ۴ درجه سلسیوس، مقادیر اندازه‌گیری شده عدد اسیدیتهٔ نمونه‌ها در محدوده روغن زیتون فرابکر قرار داشتند. لازم به ذکر است که اسیدیته نتیجه هیدرولیز تری آسیل گلیسرول‌ها به واسطه واکنش لیپاز حاضر در میوه زیتون و/یا رشد میکروبی در گوشت میوه است. میزان اسیدیته روغن متاثر از نوع میوه، شرایط نگهداری میوه، روش استخراج، فرآوری و انبارداری روغن (رطوبت، نور و دما) می باشد. اندازه‌گیری عدد اسیدیته مهم است اما نمی‌تواند به تنهایی نشان دهنده پایداری اکسایشی روغن زیتون باشد، زیرا اسیدهای چرب آزاد حالت ناپایدار داشته و ممکن است به محض تشکیل، اسیدهای چرب اکسیـد و به سایر فرآورده‌ها تجزیه و تبدیل شوند (Bosque-Sendra *et al*., 2011). طبق پژوهشی که برای بررسی ترکیب شیمیایی روغن‌های زیتون ارقام مختلف در جنوب برزیل و ارتباط آن با پایداری اکسایشی انجام شد، روغن‌های زیتون ارقام مختلفی از قبیل: آربکینا، کوراتینا[1]، فرانتویو[2]، و کرونائیکی (تمامی شرایط روغن‌کشی یکسان بود) مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج پژوهش نشان داد که مقدار عدد اسیدیته تا حدودی به نوع رقم زیتون بستگی دارد و به همین دلیل روغن رقم کوراتینا کمترین مقدار و فرانتویو بیشترین مقدار عدد اسیدیته را داشت (Bruscatto *et al*., 2017). در پژوهشی دیگر به منظور بررسی پایداری اکسایشی روغن زیتون فرابکر، تغییرات مقدار عدد اسیدیته یا اسیدهای چرب آزاد در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس و در زمان‌های انبارداری ۰، ۱، ۳، ۶، و ۱۲ روز گزارش شد. افزایش مقدار عدد اسیدیته با افزایش زمان انبارداری در هر دو دما مشاهده شد ولی تغییرات عدد اسیدیته در دمای ۴ درجه سلسیوس بسیار ناچیز بود (Piscopo *et al*., 2018). همچنین، پایداری اکسایشی روغن‌های زیتون بکر حاصل از ۴ رقم زیتون (آربکین، کورنیکابرا[3]، پیکووال، و هوجی بانکا) در دماهای ۵، ۱۰، و ۲۰ درجه سلسیوس، طی سه سال انبارداری بررسی شد و نتایج بیانگر افزایش عدد اسیدیته در هر سه دمای مورد بررسی بود، لیکن مقادیر عدد اسیدیته حتی در دمای ۲۰ درجه سلسیوس در تمامی روغن‌های زیتون انبار شده کمتر از حد تعیین شده در استانداردهای بین‌المللی برای روغن زیتون فرابکر (۰/۸ میلی‌گرم پتاس مصرف شده در ازاء گرم روغن) بود (Alvarruiz *et al*., 2020).

عدد پراکسید از جمله کمیت‌هایی است که به طور مستمر در مراحل تولید، نگهداری و فروش روغن مورد بررسی قرار می‌گیرد. عدد پراکسید نشان دهنده درجه اکسایش سیستم لیپیدی بر حسب میزان هیدرو پراکسیدهای تولید شده است. پراکسیدها که محصولات اولیه اتواکسیداسیون هستند به عنوان شاخصی برای تعیین کیفیت و پایداری روغن زیتون در نظر گرفته می‌شوند (Alvarruiz *et al*., 2020). نتایج حاصل از اندازه‌گیری عدد پراکسید در روغن‌های زیتون رقم کرونائیکی نشان داد که

1 *Coratina*
2 *Frantoio*
3 *Cornicabra*

پس از گذشت دو سال عدد پراکسید به ۱۷/۶ میلی‌اکی‌والان گرم اکسیژن در هر کیلوگرم روغن می‌رسد که با توجه به حد تعیین شده برای آن در استاندارد ملی ایران به شماره ۱۴۴۶، ۲۰ میلی‌اکی‌والان گرم اکسیژن در ازاء کیلوگرم روغن، هنوز قابل مصرف است. نتایج حاصل از پژوهش انجام شده روی روغن‌های زیتون بکر حاصل از ۴ رقم میوه زیتون (آربکینا، کورنیکابرا، پیکووال، و هوجی بانکا) طی نگه‌داری در دماهای ۵، ۱۰، و ۲۰ درجه سلسیوس به مدت سه سال، نیز حاکی از افزایش مقدار عدد پراکسید در دماهای مورد بررسی بود و مقادیر عدد پراکسید نمونه‌های انبار شده (سه سال انبارداری) در دماهای ۵ و ۱۰ درجه سلسیوس در محدوده تعیین شده برای روغن زیتون بکر بود. همچنین نتایج پژوهش نشان داد که عدد پراکسید در برخی از نمونه‌های روغن زیتون نگه‌داری شده در دمای ۲۰ درجه سلسیوس پس از گذشت ۲۸ ماه به حداکثر مقدار، ۲۰ میلی‌اکی‌والان گرم اکسیژن در ازاء کیلوگرم روغن، رسید، و در سایر نمونه‌های نگه‌داری شده در این دما از حد تعیین شده برای روغن زیتون بکر فراتر شد (Alvarruiz *et al*., 2020). در استاندارد ملی ایران ۱۴۴۶ و همچنین استانداردهای بین‌المللی حدی برای عدد آنیزیدین در روغن زیتون بکر تعیین نشده است اما با توجه به آنکه بعد از گذشت دو سال مقدار عدد آنیزیدین در روغن زیتون کرونائیکی به مقدار کم ۳/۶ رسیده است می‌توان دریافت که پیشرفت اکسیداسیون ثانویه و ترکیبات حاصل از آن به کندی صورت گرفته است (INSO, 4093). در پژوهش انجام شده روی نمونه‌های روغن زیتون بکر جمع‌آوری شده از سوپرمارکت‌های کشور هند و انبارداری آن‌ها در دمای یخچال و دمای محیط، طی ۳۰ روز، مشاهده شد که مقدار عدد آنیزیدین در نمونه‌های نگه‌داری شده در دمای یخچال پس از گذشت ۳۰ روز به مقدار ۲/۸ رسید، در حالی‌که مقدار عدد آنیزیدین در نمونه‌های نگه‌داری شده در دمای محیط ۴/۲ بود. همچنین، پس از گذشت ۳۰ روز، مقادیر عدد اسیدیته و عدد پراکسید در نمونه‌های روغن زیتون نگه‌داری شده در دمای یخچال، به ترتیب، ۰/۳۴ گرم در ۱۰۰ گرم روغن و ۵/۳ میلی‌اکی‌والان گرم اکسیژن در هر کیلوگرم روغن و در نمونه‌های نگه‌داری شده در دمای محیط، به ترتیب، ۰/۶۳ گرم در ۱۰۰ گرم روغن و ۸/۴ میلی‌اکی‌والان گرم اکسیژن در هر کیلوگرم روغن گزارش شد که از حدود تعیین شده برای روغن زیتون فرابکر در استانداردهای بین المللی کمتر بود (Ashokkumarr *et al*., 2018).

بر طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۴۴۶، میزان مواد غیر قابل صابونی در روغن های زیتون نباید از ۱۵ گرم در کیلوگرم بیشتر باشد (INSO 1446., 2011) که نتایج به دست آمده برای این پارامتر نیز کمتر از حد تعیین شده در این استاندارد ملی بود. مواد غیر قابل صابونی عبارتند از موادی که در موقع صابونی کردن روغن با مواد قلیایی تبدیل به صابون نشده ولی در حلال‌های معمولی روغن‌ها حل می‌شوند. استرول‌ها، پیگمان‌ها، هیدروکربن‌ها و روغن‌های معدنی نیز در مجاورت با مواد قلیایی صابونی نمی‌شوند. در یک پژوهش انجام شده روی روغن‌های زیتون حاصل از سه رقم کوراتینو[1]، لچینو[2]، و فرانتویو مشاهده شد که طی نگه‌داری این روغن‌ها به مدت ۶ ماه در بطری‌های شیشه‌ای بی‌رنگ و کدر تغییر قابل ملاحظه‌ای در مقدار عدد صابونی و مواد غیرقابل صابونی آن‌ها مشاهده نشده است (Sharma and Sharma, 2006).

اسیدهای چرب غیراشباع از مواد اولیه اصلی اکسیداسیون، طی فرآیند و نگه‌داری، به روش اکسیداسیون خود به خودی و نور محسوب می‌شوند. در یک پژوهش کاهش اسید اولئیک و افزایش اسید لینولئیک طی ۱۲ روز انبارداری روغن‌های زیتون ارقام کارولیا [3]و اوتوبراتیکا[4] در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گزارش شد (Piscopo *et al*., 2018). در پژوهش دیگری، کاهش میزان اسید اولئیک و اسید لینولئیک و اسید لینولنیک طی ۳ الی ۶ ماه انبارداری در روغن زیتون واریته پیکولین[5] گزارش گردید (El haouhay *et al*., 2018).

در پژوهش انجام شده دیگر، روغن‌های زیتون ارقام بلانکاتا[6] و آگروکریتا[7] به مدت دو سال در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و در تاریکی انبار شدند و مشاهده شد که محتوای اسید اولئیک و اسید استئاریک افزایش و اسید لینولئیک و اسید پالمیتیک کاهش داشت (Kracmar *et al*., 2019). در پژوهش حاضر در مورد روغن زیتون رقم کرونائیکی، کاهش ناچیز اسید اولئیک در طول دو سال انبارداری مشاهده شد. بر اساس آنالیزهای انجام شده در این پژوهش مشاهده شد که نسبت اسیدهای چرب تک غیراشباع به اسیدهای چرب چند غیراشباع مقدار بالایی دارد و طبق گزارشات این نسبت با پایداری اکسایشی روغن رابطه مستقیمی دارد (Kracmar *et al*., 2019)، لذا روغن حاصل از این رقم پایداری اکسایشی بالایی دارد که طبیعتاً طی

1- *Corationo*
2- *Leccino*
3 -*Carolea*
4 - *Ottobratica*
5 - *Picholine*
6 - *Blanqueta*
7 - *Agrocreta*

دوران انبارداری کاهش می‌یابد. افزایش محتوای اسید لینولئیک به دلیل آن رخ می‌دهد که علاوه بر بیوسنتز تری‌گلیسریدها، آنزیم اولئات دسچوراز[1] فعال بوده و منجر به تبدیل اسید اولئیک به اسید لینولئیک می‌شود (Bengana *et al.*, 2013). همچنین، گزارش شده است که تغییر در میزان اسیدهای اولئیک و لینولئیک روغن‌های زیتون بکر، به دلیل کاهش نسبت اسید چرب تک اشباع به اسیدچرب چند غیراشباع می‌تواند علت کاهش پایداری اکسایشی روغن را توضیح دهد (Lerma-Garcia *et al.*, 2009; Frankel *et al.*, 2010). در پژوهشی دیگر، روغن‌های زیتون جمع‌آوری شده از سوپرمارکت‌های هند در دو دمای محیط و دمای یخچال طی ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاکی از عدم تغییر مقادیر ترکیب اسیدهای چرب در هر دو شرایط دمایی بود (Ashokkumarr *et al.*, 2018). نتایج مشابهی از بررسی ترکیب شیمیایی در روغن‌های زیتون ارقام آربکینا، کوراتینا، فرانتویو، و کرونائیکی در جنوب برزیل به دست آمد که مشخص گردید که اسید چرب اصلی در تمام واریته‌های روغن زیتون اسید اولئیک بود (Bruscatto *et al.*, 2017). در پژوهش انجام شده روی روغن زیتون کرونائیکی بسته‌بندی شده در ظروف bag-in-box و بطری‌های شیشه‌ای تیره انبار شده به مدت ۱۸ ماه، در دماهای ۱۵ و ۲۲ درجه سلسیوس، و مقایسه پارامترهای عدد پراکسید، عدد اسیدیته، ترکیب اسیدهای چرب، فنل کل و ضریب خاموشی، مشاهده شد که میزان فنل کل در هر دو مورد نمونه‌های بسته‌بندی شده کاهش یافته، اما تغییر چندانی در ترکیب اسیدهای چرب دیده نشد. در روغن زیتون کرونائیکی بسته‌بندی شده در ظروف bag-in-box و بطری‌های شیشه‌ای، مقادیر عدد پراکسید و ضریب خاموشی و عدد اسیدیته طی ۹ ماه انبارداری در دماهای ۱۵ و ۲۲ درجه سلسیوس در حد روغن زیتون فرابکر حفظ شده بود (Lolis *et al.*, 2020).

در روغن‌های زیتون فراوان‌ترین و مهم‌ترین نوع استرول را بتاسیتوسترول تشکیل می‌دهد که حدود ۷۵ الی ۹۰ درصد است و بعد از آن دلتا-۵-اوناسترول، کمپسترول، و استیگمااسترول حائز اهمیت هستند (Bruscatto *et al.*, 2017). اندازه‌گیری ترکیبات استرولی روغن‌های گیاهی معیار با اهمیتی برای شناسایی منشاء گیاهی آن‌ها است (Bruscatto *et al.*, 2017). با توجه به حدود گزارش شده در استاندارد ملی شماره ۱۴۴۶ روغن زیتون، حدود استرول ها برای انواع روغن زیتون به شرح زیر است: کلسترول کمتر از ۰/۵ درصد، براسیکااسترول کمتر از ۰/۱ درصد، کمپسترول کمتر از ۴/۵ درصد، استیگمااسترول کمتر از کمپسترول در روغن های گیاهی، بتاسیتواسترول ظاهری بیش از ۹۳ درصد از استرول تام، دلتا-۷-استیگمااسترول کمتر از ۰/۵ درصد، و استرول تام بیش از ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترکیب استرول طی دوره انبارداری بیانگر آن است که مقادیر استرول‌های تام و خاص و همچنین بتاسیتواسترول ظاهری در محدوده تعیین شده در استاندارد ملی ۱۴۴۶ قرار داشت و مقدار ترکیب استرول‌ها طی دوره انبارداری کاهش معنی‌داری نداشت. گزارش شده است که برخی از ترکیبات استرولی طی انبارداری اکسید می‌شوند، در حقیقت ۳۰ تا ۴۰ درصد استرول‌ها در حضور گروه اتیل ای‌دی‌ان اکسید می‌گردند که می‌تواند دلیلی برای کاهش ناچیز برخی از ترکیب‌های استرولی طی انبارداری باشد (Bruscatto *et al.*, 2017). ترکیبات فنولی در کنار توکوفرول‌ها و کاروتنوئیدها از مهمترین ترکیبات دارای خاصیت آنتی اکسیدانی در روغن زیتون هستند. ویژگی‌هایی مانند رنگ، طعم و بوی روغن به وجود ترکیبات فنولی نسبت داده می‌شود، از طرفی این ترکیبات سبب افزایش پایداری اکسیداتیو روغن و خنثی سازی رادیکال آزاد اکسیژن می‌شوند. کاهش ترکیبات بیوفنلی، اغلب در مشتقات سکوئیریدوایدیک[2] از قبیل ۳و۴- دی‌هیدروکسی فنیل اتانول-النولیک اسید دی‌الدئید (3,4-DHPEA-EDA) و ۳و۴ دی‌هیدروکسی فنیل اتانول-النولیک اسید (3,4-DHPEA-EA) شناسایی شده است که نشان دهنده مشارکت فعال این ترکیبات در فرآیندهای اکسیداتیو است، زیرا که این ترکیبات به راحتی اکسید می‌شوند (Ghanbari Shendi *et al.*, 2018).

کاهش فنول کل روغن زیتون واریته سورانی[3] از ۳۴۲ به ۲۵۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم طی یک سال انبارداری در دمای محیط گزارش شد (Ghanbari Shendi *et al.*, 2018). همچنین، گزارش شده است که میزان فنل کل در نمونه‌های روغن زیتون بکر (خریداری شده از بازار)، طی ۳۰ روز نگه‌داری در دمای محیط، از ۱۶۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ۱۳۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم، و در دمای یخچال از ۱۶۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ۱۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافته که این نتایج حاکی از حفظ ترکیبات بیوفنلی نمونه‌های روغن زیتون نگه‌داری شده در دمای یخچال است (Ashokkumar *et al.*, 2018).

همچنین، کاهش اکثر ترکیبات بیوفنلی روغن زیتون رقم سورانی، طی یک سال انبارداری در دمای بین ۱۸ الی ۲۴ درجه سلسیوس گزارش شد و در عین حال تنها ترکیب بیوفنلی که طی انبارداری افزایش یافته بود، تیروزول (از ۲/۸ به ۸/۸ میلی‌گرم بر

1- *Oleate Desaturase*
2- Secoiridoidic
3- *Saurani*

کیلوگرم) گزارش شد. بیشترین ترکیب بیوفنلی در روغن زیتون بکر، لوتئولین گزارش شد که در اثر انبارداری ۱۰ درصد کاهش یافته بود و سایر ترکیبات بیوفنلی نیز در اثر انبارداری کاهش چشمگیری داشتند (Ghanbari Shendi *et al*., 2018). در این پژوهش نیز مقدار تیروزول در روغن‌های زیتون حاصل از رقم کرونائیکی، طی دو سال انبارداری، از ۱/۵ به ۳/۳ درصد افزایش یافته بود. این افزایش به دلیل فرآیندهای هیدرولیزی مشتقات سکوئیریدوایدیک است که نمایانگر اشکال پیوند یافته آن‌ها می باشد (Ghanbari Shendi *et al*., 2018).

بررسی میزان تغییرات ترکیبات فنولی و پایداری اکسایشی روغن زیتون طی نگه‌داری نشان داد که بالا بودن میزان ترکیبات فنولی معیاری از پایداری میزان روغن زیتون و نشان دهنده تمایل کمتر روغن به اکسایش است. از این رو، بیشترین میزان پایداری اکسایشی مربوط به نمونه‌های حاوی مقادیر بیشتر ترکیبات فنولی اولیه بود (Lerma-Garcia *et al*., 2017).

روغن زیتون حاوی بیش از ۳۰ ترکیب بیوفنولی متفاوت است که بسیاری از آنها در افزایش مقاومت روغن زیتون نسبت به فساد اکسایشی نقش موثری دارند. همچنین، بین میزان ترکیبات فنولی یا فنول کل و پایداری اکسایشی (مقاومت) روغن زیتون بکر رابطه مستقیمی وجود دارد. نتایج به دست آمده از این پژوهش هم تاییدکننده این رابطه است، زیرا با کاهش میزان فنل کل، مقاومت روغن زیتون طی انبارداری کاهش یافته است. میزان فنول ها در روغن زیتون بکر بین ۸۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متغیر است (Servili et *al*., 1999). در بررسی ترکیب شیمیایی روغن‌های زیتون (ارقام آربکینا، کوراتینا ، فرانتویو، و کرونائیکی) در جنوب برزیل و ارتباط آن با پایداری اکسایشی مشاهده شد که روغن زیتون استحصال شده از رقم کوراتینا دارای بیشترین میزان فنل کل (۱۷۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و توکوفرول (۴۳۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بوده است (Bruscatto *et al*., 2017).

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نقش بسیار مهمی در پایداری اکسایشی روغن‌های خوراکی ایفا می‌کنند. ترکیبات فنولی و توکوفرولی از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند. لذا کاهش این ترکیبات در روغن منجر به کاهش میزان فعالیت انتی‌اکسیدانی می‌گردد. ترکیبات فنولی، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و یکی از فاکتورهای مهم برای ارزیابی کیفیت روغن‌های زیتون می باشند (Bruscatto *et al*., 2017).

تری گلیسریدهای ECN42 شاخص مهمی برای روغن‌های دارای اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند. از سوی دیگر، ترکیب آسیل‌گلیسرول‌ها ارتباط مستقیمی با کیفیت و خلوص روغن‌های گیاهی دارد. به همین دلیل ΔECN42 برای شناسایی تقلبات در روغن زیتون بکر به کار می‌رود (Khadem *et al*., 2019). مقدار ΔECN42 در استاندارد ملی ایران به شماره ۱۴۴۶ برای روغن زیتون بکر باید کمتر از ۰/۲ باشد، و نتایج حاصل از محاسبات انجام شده برای سه نمونه مورد بررسی نشان داد که مقادیر ΔECN42 نمونه‌ها در محدوده استاندارد ۱۴۴۶ برای روغن زیتون بکر است. از آنجائیکه مقادیر ΔECN42 در هر سه نمونه به هم نزدیک بود، می‌توان نتیجه گرفت که انبارداری نمونه های روغن زیتون تاثیری بر روی ECNتری‌آسیل گلیسرول‌ها ندارد.

بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۴۴۶ اندازه‌گیری موم به منظور تعیین اختلاط روغن تفاله زیتون با انواع روغن زیتون بکر کاربرد دارد. ترکیب موم در روغن زیتون تحت تاثیر سال برداشت و رقم میوه زیتون است. موم‌ها استرهای الکل چرب و اسید چرب هستند که حلالیت بسیار پائینی در آب دارند. همچنین زمانی که دمای محل انبارداری کاهش پیدا می‌کند و به صفر یا نزدیک به صفر می‌شود، بلورینگی تری آسیل گلیسرول‌های اشباع شده و موم‌ها رخ می‌دهد و در نتیجه آن حالت ابری در روغن زیتون بکر مشاهده می‌شود (Giuffre *et al*., 2013). نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر افزایش مقدار موم در روغن‌های زیتون انبارداری شده از ۱۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ۲۸۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که حاکی از آن است که طی انبارداری مقدار موم افزایش می‌یابد. دلیل افزایش موم را می‌توان به استریفیکاسیون طبیعی الکل‌های چرب و اسیدهای چرب نسبت داد (Mariani & Venturini, 1996) .

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده از پارامترهای اندازه‌گیری شده در روغن‌های زیتون فرابکر رقم کرونائیکی انبار شده طی دو سال در دمای ۴ درجه سلسیوس، می‌توان دریافت که زمان انبارداری بر روی مقادیر اسیدیته، عدد پراکسید و عدد آنیزیدین که جزء پارامترهای کیفی روغن هستند، تاثیر گذاشته و مقادیر آن‌ها طی انبارداری افزایش خواهد یافت. با گذشت زمان مشاهده شد که در روغن زیتون انبار شده میزان ترکیبات غیر قابل صابونی، فنول کل و نیز فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یافت. بیشترین میزان اسید چرب در نمونه‌های روغن زیتون رقم کرونائیکی اسید اولئیک بود که طی زمان انبارداری کاهش اندکی داشت. میزان استرول تام کاهش معنی‌داری داشت. همچنین، مجموع اسیدهای چرب تک غیراشباع کاهش و چند غیراشباع افزایش ناچیزی داشت. از سوی دیگر ترکیبات بیوفنلی روغن زیتون مانند اولئوروپین و اسید فرولیک و اسید کافئیک نیز طی انبارداری کاهش معنی‌داری داشتند. در تمامی نمونه های روغن زیتون کرونائیکی، ECN42

کمترین میزان و ECN48 بیشترین میزان را داشت ولی تغییر چندانی در ECN تری آسیل گلیسرول‌ها طی انبارداری مشاهده نشد. با توجه به نتایج آزمایشات به دست آمده می توان بیان نمود که مقدار موم طی انبارداری افزایش خواهد یافت. نتایج حاصل از این پژوهش نمایانگر آن بود که تمامی پارامترهای کیفی و خواص فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده در روغن زیتون فرابکر حاصل از رقم کرونائیکی، طی دو سال انبارداری در دمای ۴ درجه سلسیوس، در محدوده تعیین شده برای هر پارامتر، برای روغن زیتون فرابکر، در استاندارد ملی ایران به شماره ۱۴۴۶ است و پس از گذشت ۲ سال روغن زیتون کرونائیکی هنوز قابلیت مصرف خوراکی را داشت.

سپاسگزاری

با تشکر فراوان از جناب آقای مهندس سید رحمت الله پریچهر-مجری محترم دفتر طرح زیتون-وزارت جهاد کشاورزی در ارائه اطلاعات مربوط به کشت زیتون در ایران و همکاران آزمایشگاه روغن‌ها و چربی‌های خوراکی-پژوهشکده غذایی و کشاورزی-پژوهشگاه استاندارد، به ویژه سرکار خانم مهندس زهرا غلامی، که وسایل و امکانات مورد نیاز برای انجام این پژوهش را فراهم نمودند.

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

Alvarruiz, A., Pardo, J.E., Copete, M.E., Miguel, C., Rabadán, A., López, E. & Álvarez-Ortí, M. (2020). Evolution of virgin olive oil during long-term storage. *Journal of Oleo Science*. 69(8). 809-814.

Ashokkumar, C., Murugan, B., Baskaranand, D. & Veerapandian, V. (2018). Physicochemical properties of olive oil and its stability at different storage temperatures. *International Journal of Chemical Studies.* 6(2). 1012-1017.

Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). *Olive oil composition*. Olive Oil: Chemistry and Technology (Second Edition). p. 41-72.

Bengana, M., Bakhouche, A., Lozano-Sanchez, J., Amir, Y., Youyou, A., Segura-Carretero, A. & Fernandez-Gutierrez, A. (2013). Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil. *Food Research International.* 54. 1868-1875.

Bosque-Sendra, J., De La Mata-Espinosa, P., Cuadros-Rodríguez, L., González-Casado, A., Rodríguez-García, F. & García-Toledo, H. (2011). Stability for olive oil control materials. *Food Chemistry*. 125(4). 1418-1422.

Bruscatto, M.H., Zambiazi, R.C., Crizel-Cardoso, M. & Piatnicki, C.M.S. (2017). Chemical characterization and oxidative stability of olive oils extracted from olive trees of Southern Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB.* 52(12). 1231-1240.

El haouhay, N., Samaniego-Sánchez, C., Asehraou, A., Giménez-Martínez, R.J., Villalón-Mir, M. & López-García de la Serrana, H. (2018). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of Materials and Environmental Sciences.* 9. 854-863.

Frankel, E.N. (2010). Chemistry of extra virgin olive oil: adulteration, oxidative stability, and antioxidants, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58(10). 5991-6006.

Ghanbari Shendi, E., Ozay, D.S., Ozkaya, M.T. & Ustune, N.F. (2018). Changes occurring in chemical composition and oxidative stability of virgin olive oil during storage. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids (OCL).* 25(6). A602.

Giuffre, A.M. (2013). Influence of harvest year and cultivar on wax composition of olive oils. *Euroupean Journal Lipid Science and Technology*. 115(5). 549-555.

Iranian National Standard Organization (INSO): 4097. (1997). Animal and vegetable fats and oils- Determination of unsaponifiable matter- Part 2: Rapid method using hexane extraction.

Iranian National Standard Organization (INSO): 4178. (2011). Animal and vegetable oils and fats- Acid value and acidity- Test method.

Iranian National Standard Organization (INSO): 16324. (2011). Olive oil- Determination of the composition and content of sterols and triterpene dialcohols by capillary column gas chromatography.

Iranian National Standard Organization (INSO): 1446. (2011). Olive oil- Specifications and test methods.

Iranian National Standard Organization (INSO): 13126-4. (2013). Animal and vegetable fats and oils- Gaschromatography of fatty acid methyl esters- Part 4: Determination by capillary gaschromatography.

Iranian National Standard Organization (INSO): 9707. (2013). Olive oil- Determination of wax content by capillary column gas chromatography- Test method.

Iranian National Standard Organization (INSO): 16323. (2013). Olive oil- Determination of biophenols by HPLC- Test method.

Iranian National Standard Organization (INSO): 13126-2. (2013). Animal and vegetable fats and oils- Gaschromatography of fatty acid methyl esters- Part 2: Preparation of fatty acid methyl esters.

Iranian National Standard Organization (INSO): 17379. (2019). Olive oil- Determination ofthedifferencebetween actual and theoretical content oftriacylglycerols with ECN42- Test method.

Iranian National Standard Organization (INSO): 4179.

(2016). Animal and vegetable fats and oils- Determination of peroxide value- Iodometric (visual) endpoint determination.

Iranian National Standard Organization (INSO): 4093. (2016). Animal and vegetable fats and oils- Determination of anisidine value- Test method.

Khadem, S., Rashidi, L. & Homapour, M. (2019). Antioxidant Capacity, Phenolic Composition and Physicochemical Characteristics of Whole Olive Stone Oil Extracted from Different Olive Varieties Grown in Iran. *European Journal Lipid Science and Technology.* 121(4). 1-8.

Krichene, D., Salvador, M.D. & Fregapane, G. (2015). Stability of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds during Long-Term Storage (18 Months) at Temperatures of 5-50 °C. *Jounrnal of Agriculture and Food Chemistry*. 63(30). 6779-6786.

Kontominas, M. (2017). Geographical Differentiation of Greek Extra Virgin Olive Oil from Late-Harvested Koroneiki Cultivar Fruits. *Journal of the American Oil Chemists' Society.*1-13.

Kráčmar, S., Fišera, M., Přikrylová, V., Fišerová, L., Málek, Z. & Tvrzník, P. (2019). Storage of extra virgin olive oil and its impact on fatty acid levels. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences.* 8 (5). 1228-1230.

Lerma-García, M.J., Simó-Alfonso, E.F., Chiavaro, E., Bendini, A., Lercker, G. & Cerretani, L. (2009). Study of chemical changes produced in virgin olive oils with different phenolic contents during an accelerated storage treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 57(17). 7834-7840.

Lolis, A., Badeka, A.V., & Kontominas, M.G. (2020). Quality retention of extra virgin olive oil, Koroneiki cv. packaged in bag-in-box containers under long term storage: A comparison to packaging in dark glass bottles. *Journal of Food Packaging and Shelf Life*. 26. 100549.

Mariani, C., & Venturini, S. (1996). Sull'aumento delle cere durante la conservazione degli oli di olive. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. 73(11). 489-498.

Piscopo, A., Bruno, A.D., Zappia, A., Gioffrè, G., Grillone, N., Mafrica, R. & Poiana, M. (2018). Effect of olive storage temperature on the quality of Carolea and Ottobratica oils. *Emirates Journal of Food and Agriculture.* 30(7). 563-572.

Rashidi L., Parichehr S.R.A., Dastmalchi, F., Rashidi Noudeh, H., Homapour, M. & Hosseini, S. (2020). Determination of physicochemical and biophenolic properties of olive oils extracted from single varieties of *Manzanilla*, *Arbequina* and *Koroneiki* in Roudbar County, Project Code Number 98093. Standard Research Institute of Iran. http://www.standard.ac.ir.

Servili, M., Baldioli, M., Mariotti, F. & Montedoro, G.F. (1999). Phenolic composition of olive fruit and virgin olive oil: Distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during oil mecjhanical extraction *process. Acta Horticulture*. 474. 609-613.

Sharma, R. & Sharma, P.C. (2006). Storage behaviour of olive (Olea europaea L.) oil in different packages. *Journal of Scientific and Industrial Research.* 65, 244-247.

Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 661-676.

Zare, F., Najafi, G.M., Tavakoli Hashjin, T. & Kermani, A.M. (2014). Determination of physical, mechanical and aerodynamic properties of four olive cultivars produced in Iran. *Journal of Food Science and Technology.* 11. 1-10.