

ارزیابی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی در مارملا德 پالپ لیمو تخمیری

مریم شیرپور^۱، مهناز هاشمی روان^{۲*}، رضوان پوراحمد^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی - میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی ، ورامین ، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۵/۱۹)

چکیده

در این تحقیق برای تولید مارملا德 پالپ لیمو تخمیری پروبیوتیک مارملا德 پالپ لیمو با استفاده از ۵۰٪ پالپ لیمو و ۵٪ شکر تهیه گردید. ژلاتین، پودر آبپنیر و شیر خشک با مقدار ۵ گرم، ۱۰ گرم سبب افزودن پروتئین و تقویت رشد پروبیوتیک‌ها و زنده‌مانی آن‌ها گردید. در این پژوهش برای تولید مارملا德 پالپ لیمو تخمیری پروبیوتیک باکتری لاکتوباسیلوس کازئی با تراکم باکتری cfu/ml ($10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}$) تلفیح شد و فرآیند تخمیر به مدت ۴۸ ساعت در دمای $37^\circ C$ انجام گردید و طی مدت ۲۸ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. فاکتورهای pH، اسیدیته، قندهای احیا کننده و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی انجام شد به صورت ۲ فاکتوریل تراکم باکتری 4 سطح cfu/ml ($10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}$) و فاکتور زمان نگهداری در 5 سطح (روز) به همراه شاهد، با 3 تکرار انجام گردید. پس از تخمیر میزان pH کاهش، مقدار اسیدیته افزایش یافت. در طی تخمیر، در کلیه تیمارها بعد از تخمیر تعداد باکتری‌های پروبیوتیک به دلیل مصرف قند و مواد مغذی موجود در مارملا德 زنده ماندند، تیمار برتر با تراکم باکتری $10^8 cfu/ml$ با توجه به حد استاندارد سازمان غذا و دارو بعد از چهار هفته نگهداری به دست آمد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که مارملا德 تخمیری پالپ لیمو پروبیوتیک محیط مناسبی برای رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک و تولید مارملا德 فراسودمند می‌باشد.

کلید واژگان: پالپ لیمو، مارملا德 پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس کازئی

شیر، هیدرولیز شده کازئین و مشتقات پروتئین آب پنیر به فرآورده تخمیری پروپیوتیک اشاره کرد [۹]. ژلاتین، هیدرولوئیدی از جنس پروتئین است که به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد در ایجاد ژل، قوام دهنگی، پایدار کنندگی، امولسیفایری، تشکیل کف و فیلم در صنایع غذایی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰]. پایین بودن قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروپیوتیک به دلیل حساسیت به شرایط نامساعد در محصولات غذایی و دستگاه گوارش یکی از مهم‌ترین مشکلات موجود در صنعت تولید فرآورده‌های پروپیوتیک می‌باشد. باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش لاکتوپاسیلوس کازئی می‌باشد. این باکتری‌های اسیدلاکتیک از زمان‌های قدیم در محصولات لبنی تخمیر شده به کار رفته‌اند [۱۱]. این باکتری یکی دیگر از مهم‌ترین گونه‌های پروپیوتیکی است که کاربرد وسیعی در فرآورده‌های غذایی پیداکرده است. در صنعت از این باکتری برای تولید اسیدلاکتیک از آب‌پنیر استفاده می‌شود. این باکتری در روده کوچک انسان زندگی می‌کند. مقاومت خوبی در برابر شیره معده و نمک‌های صفرایی دارد. لاکتوپاسیلوس کازئی یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای، غیر اسپورزا و غیر متحرک است [۱۲]. هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان تولید مارمالاد پالپ لیموترش ایرانی تخمیری پروپیوتیک با استفاده از پودر آب‌پنیر، پودر شیرخشک و ژلاتین نسبت تلقیح و تراکم باکتری‌های پروپیوتیک و بررسی میزان قند‌های احیا کننده، pH، اسیدیته و زنده‌مانی لاکتوپاسیلوس کازئی پس از تخمیر و در طی ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴°C می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- مواد

مواد مورد استفاده در مارمالاد پالپ لیمو تخمیری پروپیوتیک که از مارمالاد پالپ لیمو (۵۰٪ پالپ لیمو با ۵۰٪ شکر جوشانده سپس خنک شد)، پودر شیرخشک کم‌چرب و پودر آب‌پنیر ایزوله شده کارخانه پگاه، ژلاتین و لاکتوپاسیلوس کازئی ۱۶۰۸ سازمان پژوهش‌های صنعتی ایران در این مارمالاد استفاده گردیده است.

۲-۲- روش‌ها

۱-۲-۲- پاستوریزاسیون

۱- مقدمه

مارمالاد طی فرآیند خاص از پوره میوه همراه با قند مجاز تا رسیدن به غلظت مورد نیاز به دست می‌آید [۱]. تاکنون تحقیقات زیادی در ارتباط با فرآیند تولید و خواص شیمیایی، میکروبی و حسی مرباها انجام گرفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به تحقیق سلاجمقه و معینی (۱۳۸۰) عوامل مختلف در ایجاد شرایط بهینه جهت کاربرد گل محمدی در تهیه مربا بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدن بهترین نمونه مربای گل محمدی همراه با گوشت سیب به لحاظ ویژگی‌های ظاهری ارکانولپتیکی است، بیشترین مقدار ویتامین C و پکتین را دارا بود. با گذشت زمان مقدار این ویتامین کاهش یافت. میزان pH اسیدیته در طی نگهداری تغییر معنی داری نشان نداد. اما در ماه اول نگهداری نسبت به دو ماه بعد کمتر بود. مقدار پکتینات کلسیم در طی سه ماه نگهداری ثابت ماند [۲].

اگبکن و همکاران (۱۹۹۸) به بررسی استفاده از میوه کدو شیاردار پرداختند. و به این نتیجه رسیدن پالپ غنی از سدیم، K، آهن، فسفر، منگنز و پکتین ۱۰٪، اما پروتئین کم ۸۶٪ است. مارمالاد حالت ژلی و اسیدی بود [۳].

فوگل و همکاران در سال (۲۰۰۵) به بررسی کیفیت و کترول صحت پوره میوه، آماده سازی میوه‌ها و مربا برای جلوگیری از تقلیل در مربا و مارمالاد پرداختند [۴].

لیسیاردلووماراتور (۲۰۱۱) اثر دما و بعضی از ترکیبات اضافه شده در ثبات مارمالاد پرتقال خونی بررسی نمودند و گزارش نمودند از دست دادن آنتوکیانین در طول ذخیره سازی در هر دو دما ۲۰°C و ۳۵°C می‌باشد [۵].

رانداززو و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه بقا از پروپیوتیک‌ها لاکتوپاسیلوس رامنوزوس در مرباها هلو در طی نگهداری در دهه‌ای مختلف پرداختند. پارامترهای رنگ محصول محیط کشت پروپیوتیک اضافه شده به مربا تغییر قابل توجهی نداشت، با این حال متابولیسم لاکتوپاسیلوس موجب تغییر در pH و ترکیب قند شد [۶].

لیمو دارای خواص درمانی زیادی می‌باشد [۷] پالپ آب‌میوه‌ها سرشار از فیبر و برای بدن و پیشگیری از فشارخون بالا، بیماری‌های قلبی و عروقی و انواع سرطان‌ها بسیار مفید و مؤثر است [۸]. در مورد اثر عوامل رشد و ترکیبات محرك رشد بر قابلیت زیستی و سرعت تخمیر پروپیوتیک‌ها می‌توان به افزودن پروتئین‌های شیر که شامل محلول‌های هیدرولیز شده پروتئین

شدن فرآیند پاستوریزاسیون ارلن‌ها به سرعت تا دمای 80°C و مدت زمان ۲۰ دقیقه استفاده شد [۱۳] برای کامل تختنک شدن [۱۴].

Table 1 Study treatments Lemon Pulp Marmalade

marmalade	bacterial concentrations
T ₁	$10^{10} \text{ cfu/ml} Lactobacillus casei$
T ₂	$10^9 \text{ cfu/ml} Lactobacillus casei$
T ₃	$10^8 \text{ cfu/ml} Lactobacillus casei$
T ₄	$10^7 \text{ cfu/ml} Lactobacillus casei$
c(Control)	-

دماهی $37-47^{\circ}\text{C}$ دماهی مناسبی برای رشد باکتری‌های پروپیوتیک و به خصوص لاکتوپاسیلوس کائزی است. پس از تخمیر تیمارها برای بررسی فاکتورهای مورد نظر در طول ۴ هفته به یخچال با دمای 4°C منتقل شدند [۱۹].

۳-۲-آزمون‌ها

۱-۳-۲ - شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیکی به جهت شمارش سلول‌های میکروبی زنده از روش رقت سازی اعشاری و پورپلیت طبق روش¹ SPC استفاده شد. از این رقت‌ها ۱۰CC به داخل پلیت استریل ریخته شد و سپس محیط MRS آگار استریل شده بر روی آن ریخته شد. بعد از سفت شدن محیط کشت پلیت‌ها به انکوباتور 37°C منتقل شدند و ۴۲ ساعت در این دما گرمخانه گذاری شدند. تعداد کلی‌های رشد کرده پس از ۲۴ ساعت توسط کلنی شمار، شمارش گردید. تعداد کلنی‌ها طبق رابطه (۱) در عکس رقت ضرب و عدد نهایی به صورت تعداد کلنی در میلی‌لیتر (cfu/ml) (بیان شد [۲۰، ۲۱].

رابطه (۱)

تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر (cfu/ml) = تعداد کلنی \times عکس فاکتور رقت

۲-۳-۲- اندازه گیری pH، اسیدیته و قندهای احیا کننده

pH به طور مستقیم توسط دستگاه pH متر (مدل-SAT-2002) ساخت کشور ایران) اندازه گیری شد [۲۲]. از روش تیتراسیون توسط هیدروکسید سدیم $0/1$ نرمال تا ایجاد رنگ صورتی کم رنگ پایدار (به مدت ۳۰ ثانیه) برای اندازه گیری اسید لакتیک استفاده شد [۲۲]. اندازه گیری قندهای احیا کننده

۲-۲-۲- آماده سازی سویه جهت تلقیح

فعال سازی لاکتوپاسیلوس کائزی PTCC1608 در محیط کشت MRS مایع و در دمای گرمخانه گذاری 77°C به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. برای تهیه کشت ذخیره از لاکتوپاسیلوس کائزی حدود ۱۰ CC از کشت ۲۴ ساعته با دور ۳۵۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای 25°C سانتریفیوز (سوئیس از شرکت Gerber شد [۱۵]. محیط کشت مایع تخلیه شد و کشت‌های ذخیره با افزودن گلیسرول استریل (۰.۵۰V/V) به کشت‌های فعال شده مرحله قبل آماده شدند. کشت‌های ذخیره در میکروتیوب‌های استریل محتوى ۸ CC سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته در دمای 20°C - نگهداری شدند برای فعال شدن باکتری‌ها حدود ۵ CC از کشت ۲۴ ساعته به مدت ۹۵CC محیط MRS مایع استریل تلقیح شده و شرایط مشابه گرم خانه گذاری شد (کشت مرحله دوم) [۱۱] برای به دست آوردن کلنی‌های تک از باکتری‌های مورد نظر و اطمینان از زنده بودن سلول‌های باکتری لوله حاوی کشت ۴۸ ساعته با همزن کاملاً مخلوط شد و بر روی محیط MRS آگار کشت خطی داده شد و در اطراف پلیت‌ها پارافیلم پیچیده شد و در انکوباتور (آلمان شرکت سازنده Memert) 37°C به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. هدف از این عمل، دسترسی دائم به باکتری‌های پروپیوتیک در فاز رشد لگاریتمی بود [۱۶].

۲-۲-۳- تلقیح میکرووارگانیسم‌ها

جهت تلقیح میکروبی از روش مک فارلند [۱۷] و توتال کانت استفاده شده است. جهت تعیین مقدار باکتری در ۴ سطح با تراکم باکتری cfu/ml ($10^4, 10^5, 10^6, 10^7$) تلقیح شد.

۲-۲-۴- تخمیر نمونه‌ها

تیمارها را برای انجام عملیات تخمیر به انکوباتور با دمای 37°C به مدت ۴۸ ساعت منتقل شدند طبق گزارش [۱۸]

1. Standard plate counts

با توجه به جدول (۲) مقایسه میانگین‌های pH و اسیدیته بررسی داده‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن مشخص گردید. میزان pH اولیه اندازه‌گیری شده کلیه تیمارها ۳/۵۱ بود پس از تلقیح باکتری روند کاهش معنی‌داری در میزان pH مشاهده شد ($p<0.05$). بین تیمارهای T₁ و T₂ و T₄ به ترتیب با تراکم pH باکتری (10^7 ، 10^8 ، 10^9) اختلاف معنی‌داری در میزان pH پس از تلقیح مشاهده نشد ($p>0.05$). نتایج آزمایشات نشان دادند که اسیدیته و pH تفاوت کاملاً معنی‌داری بر اثر تراکم باکتری و زمان ماندگاری دارد ($p<0.01$). روند تغییرات اسیدیته در زمان‌های مورد بررسی در سایر تیمارها کاملاً مشابه بوده و پس از ۴۸ ساعت تخمیر در دمای ۳۷°C چهار هفته نگهداری در دمای ۴°C، میزان اسیدیته با گذشت زمان افزایش یافته و میزان pH با گذشت زمان به طور معنی‌داری کاهش یافته است. همان‌طور که در جدول (۲) مشاهده می‌گردد با افزایش اسیدیته، pH کاهش یافته است.

Table 2 compares the average pH and total acidity in terms of lactic acid (g / 100g) Lemon marmalade (mean \pm SD) with *Lactobacillus casei* bacteria in treatments (T₁, T₂, T₃, T₄) with density of bacteria (10^7 , 10^8 , 10^9 , and 10^{10}) cfu/ml after 48 hours of fermentation process and for a 28-day period

		Marmalade				
day period		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	c(Control)
day 0	pH	3/44 \pm 0/01 ^a	3/42 \pm 0/07 ^{ab}	3/41 \pm 0/01 ^b	3/38 \pm 0/01 ^c	3/37 \pm 0/01 ^c
	Acidity	2/04 \pm 0/07 ^a	1/99 \pm 0/00 ^a	1/90 \pm 0/42 ^a	1/86 \pm 0/02 ^a	1/95 \pm 0/00 ^a
day 7	pH	3/42 \pm 0/07 ^a	3/42 \pm 0/07 ^a	3/41 \pm 0/70 ^a	3/14 \pm 0/01 ^c	3/21 \pm 0/01 ^b
	Acidity	2/00 \pm 0/00 ^{ab}	2/00 \pm 0/00 ^{ab}	1/92 \pm 0/21 ^c	2/01 \pm 0/02 ^a	1/97 \pm 0/00 ^b
day 14	pH	3/39 \pm 0/07 ^a	3/38 \pm 0/01 ^a	3/40 \pm 0/01 ^a	3/02 \pm 0/01 ^b	2/99 \pm 0/01 ^b
	Acidity	2/21 \pm 0/01 ^a	2/23 \pm 0/00 ^a	1/89 \pm 0/02 ^b	2/05 \pm 0/21 ^{ab}	1/98 \pm 0/00 ^{ab}
day 21	pH	3/35 \pm 0/07 ^a	3/28 \pm 0/07 ^a	3/27 \pm 0/03 ^a	2/89 \pm 0/00 ^b	2/85 \pm 0/07 ^b
	Acidity	2/43 \pm 0/01 ^b	2/29 \pm 0/00 ^{bc}	1/91 \pm 0/02 ^c	2/10 \pm 0/42 ^{bc}	1/99 \pm 0/00 ^{bc}
day 28	pH	3/08 \pm 0/00 ^a	3/05 \pm 0/00 ^a	3/03 \pm 0/00 ^a	2/75 \pm 0/70 ^b	2/55 \pm 0/07 ^c
	Acidity	2/50 \pm 0/14 ^{ab}	2/30 \pm 0/00 ^{bc}	1/94 \pm 0/21 ^d	2/11 \pm 0/02 ^{cd}	2/01 \pm 0/00 ^{cd}

Similar letters in each column are not significantly different (0.05 $< p$)

نگهداری) تفاوت کاملاً معنی‌داری بر رشد باکتری‌ها دارد ($p<0.01$).

Table 3 Summary microbial analysis of variance (cfu/ml) lemon pulp marmalade

Source of variation (SOV)	Degrees of freedom (df)	Variance (F)
Effect of bacterial (T) density	4	730/49**
Effect of storage (Z) time	4	146/59**
Interaction effect (T*Z)	16	75/49**

- Mark** Represents a highly significant difference ($p<0.01$)
- Mark * Represents a significant difference ($p<0.05$)
- Mark ns Showing no significant ($p>0.05$)

طبق روش فهلهینگ در استاندارد ملی ایران به شماره ۳۶۸۴ انجام شد [۱].

۴-۲- طرح آماری و تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی نتایج از طرح کاملاً تصادفی به روش فاکتوریل استفاده شد. برای تحلیل واریانس نتایج از نرم افزار SPSS استفاده شد. میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵ درصد مورد مقایسه شدند. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

۳- نتایج

۱-۳- اسیدیته و pH مارمالاد پالپ لیمو بعد از ۴۸ ساعت تخمیر در دمای ۳۷°C و چهار هفته نگهداریدر دمای ۴°C

۲- بررسی تغییرات میکروبی مارمالاد پالپ

لیمو پس از ۴۸ ساعت تخمیر در دمای ۳۷°C

و طی ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴°C

جدول (۳) خلاصه تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای زنده‌مانی لاکتوپاسیلوس کازئی در مارمالاد پالپ لیمو در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد را نشان می‌دهد همان‌طور که از جدول (۱) مشخص است اثر تراکم باکتری و اثر زمان ماندگاری نگهداری بر رشد باکتری‌ها کاملاً معنی‌داری بود ($p<0.01$). همچنین اثر متقابل دو جانبه (تراکم و زمان

دانکن مشخص گردید که قند احیاکننده در مارمالاد دارای اختلاف معنی داری بود ($p < 0.05$).

Table 4 compares the average main effect of storage time on reducing sugars (wt%) Lemon Pulp marmalade (mean \pm SD)

Storage time (days)	Reducing sugar (gr/100cc)
Before fermentation	22/65 \pm 2/06 ^a
After fermentation	22/06 \pm 1/98 ^b

Similar letters in each column are not significantly different (0.05 $< p$)

با توجه به جدول (۵) مقایسه میانگین اثر اصلی تراکم باکتری بر قند احیاکننده و بررسی داده ها با روش آزمون چند دامنه ای دانکن مشخص گردید. هرچه تراکم باکتری کمتر است، میزان قند های احیاکننده افزایش پیدا کرده است. در مقایسه میانگین اثر اصلی تراکم باکتری بر قند احیاکننده تراکم باکتری cfu/ml ($10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}$) در مارمالاد پالپ لیمو قند احیاکننده معنی دار بود ($p < 0.05$). همچنین اثر اصلی تراکم باکتری بر قند احیاکننده در مارمالاد پالپ لیمو اختلاف معنی داری ندارند ($p > 0.05$).

Table 5 compares the average effect of reducing sugars on the bacterium density (weight percent) Lemon Pulp Marmalade (mean \pm SD)

Density of (cfu/ml) bacteria	Reducing sugar (g/100cc)
10^{10}	20/50 \pm 0/58 ^d
10^9	20/51 \pm 0/57 ^d
10^8	22/00 \pm 0/60 ^c
10^7	23/29 \pm 0/56 ^b

Similar letters in each column are not significantly different (0.05 $< p$)

۴- نتیجه گیری و بحث

۴-۱- تغییرات pH، اسیدیته، مقدار قندر طول

تخمیر و نگهداری

با اضافه کردن ژلاتین، پودر آب پنیر و شیر خشک که سبب افزودن پروتئین ها که از مهم ترین عوامل جهت تقویت رشد پر بیوتیک ها هستند و سبب افزایش pH تا ۳/۵۱ pH بود. طبق نتایج حاصل از این تحقیق مشخص شد که رشد باکتری ها، کاهش pH و افزایش مقدار اسیدیته را در طی تخمیر و نگهداری به دنبال داشته است. البته کنترل زمان تخمیر مهم و بر کیفیت محصول تولیدی مؤثر می باشد. علت اصلی این امر، مربوط به مصرف قندها و تولید اسیدی های آلی می باشد [۱]. در این

شکل (۱) تغییرات جمعیت میکروبی مارمالاد پالپ لیمو تلقیح شده با باکتری لاکتوبراسیلوس کازئی پس از ۴۸ ساعت تخمیر و طی ۲۸ روز نگهداری بود. میزان زنده مانی لاکتوبراسیلوس کازئی به مرور زمان کاهش یافته است. بیشترین میزان لاکتوبراسیلوس کازئی مربوط به T₁ با تراکم باکتری $10^{10} cfu/ml$ بود. تیمار T₄ با تراکم باکتری $10^7 cfu/ml$ تا ۱۴ افزایش یافته و در روز ۲۱ کاهش پیدا کرده است. اختلاف معنی داری در میزان رشد لاکتوبراسیلوس کازئی در روز ۱۴ تا ۲۱ وجود دارد. تیمار T₁ با تراکم باکتری $10^{10} cfu/ml$ تا ۲۱ ثابت و روز ۲۸ کاهش یافته است. زنده مانی لاکتوبراسیلوس کازئی در مارمالاد پالپ لیمو در تیمار T₂ با تراکم باکتری $10^9 cfu/ml$ تا روز ۲۱ با گذشت زمان کاهش یافته و روز ۲۸ ثابت بوده است. زنده مانی لاکتوبراسیلوس کازئی در مارمالاد پالپ لیمو در تیمار T₃ با تراکم باکتری $10^8 cfu/ml$ پس از تخمیر تا روز ۷ کاهش یافته و روز ۱۴ کاهش کمی یافته و روز ۲۱ به میزان کمی افزایش یافته و در روز ۲۸ کاهش معنی داری یافته است. در تیمار T₄ با تراکم باکتری $10^7 cfu/ml$ تا روز ۲۱ ثابت باقی میماند و میزان زنده مانی لاکتوبراسیلوس کازئی از روز ۲۱ تا روز ۲۸ ثابت مانده است.

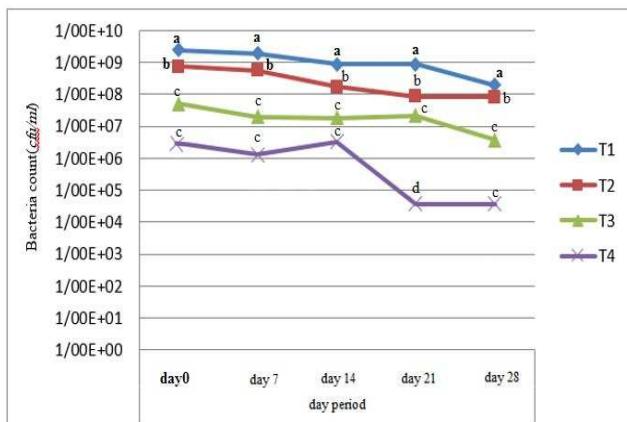


Fig 1 The microbial population of lemon pulp with Lactobacillus casei bacteria in treatments (T₁, T₂, T₃, T₄) with density of bacteria ($10^7, 10^8, 10^9$, and 10^{10}) cfu/ml after 48 hours of fermentation process and for a 28-day period

۴-۲-۳- بررسی تغییرات قندهای احیاکننده در مارمالاد پالپ لیمو

با توجه به جدول (۴) مقایسه میانگین اثر اصلی زمان نگهداری بر قند احیاکننده و بررسی داده ها با روش آزمون چند دامنه ای

پروبیوتیک (لاکتوپاسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیوپاکتریوم لاکتیس) از تعداد باکتری‌های پروبیوتیک کاسته شد [۲۳]. نتایج حاصل از بررسی تولید مارمالاد لیموی تخمیری پروبیوتیک که در طی تخمیر، در کلیه تیمارها باکتری‌های پروبیوتیک به دلیل مصرف قند و مواد مغذی موجود در مارمالاد پالپ لیمو زنده که با نتایج بررسی یحیائی صوفیانی، (۱۳۹۳) مطابقت داشت [۲۴].

همچنین براساس نتایج مطالعه انجام شده توسط رانداززو همکاران در سال (۲۰۱۳) به بررسی بقای باکتری پروبیوتیک لاکتوپاسیلوس رامنوزوس در مرتبهای هلو در طول ذخیره‌سازی در ماهات مختلف پرداختند. متabolیسم لاکتوپاسیلوس موجب تغییر در pH و ترکیب قند شد [۶]. در مقایسه با مطالعات انجام گرفته، نتایج مشابه با آزمایشات تحقیق مذکور به دست آمد. که رشد لاکتوپاسیلوس کائزی موجب کاهش میزان قندهای احیاکننده و کاهش میزان pH مارمالادها شده است.

۵-نتیجه گیری کلی

در تحقیق حاضر فاکتورهای pH، اسیدیته کل بر حسب اسیدلاکتیک، قندهای احیاکننده، و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک مارمالاد پالپ لیمو تخمیری پروبیوتیک توسط سویه laktopasilius کائزی در ۴ سطح تلقیح cfu/ml ($10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}$) و یک نمونه شاهد، مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج مشخص گردید که میزان pH در طول مدت نگهداری مارمالاد کاهش یافت که به دلیل مصرف قندهای احیاکننده میزان pH در طول نگهداری زمانی که به کمتر از ۳۰۱ کاهش پیدا کرد، سبب از بین رفتن باکتری laktopasilius کائزی گردید. میزان اسیدیته در طول مدت نگهداری افزایش یافت و در طول مدت ۴ هفته نگهداری در دمای $^{\circ}\text{C}$ میزان اسیدیته افزایش یافت که سبب از بین رفتن laktopasilius کائزی گردید. در طی تخمیر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک با مصرف قند و مواد مغذی موجود در مارمالاد شامل پودر شیر خشک و ژلاتین و پودر آب پنیر افزایش یافت. بیشترین میزان رشد laktopasilius کائزی در تیمار T_1 با تراکم 10^{10}cfu/ml از حد مجاز استاندارد غذا و دارو بیشتر 10^{11}cfu/ml است. در تیمار T_4 با تراکم باکتری 10^{10}cfu/ml در هفتۀ سوم میزان رشد باکتری با توجه به حد استاندارد سازمان غذا و دارو کمتر از 10^{10}cfu/ml است. در نتیجه بهترین تیمار T_3 با تراکم باکتری 10^{10}cfu/ml به حد استاندارد سازمان غذا و دارو می‌باشد در همه تیمارها میزان باکتری‌های پروبیوتیک در طی تخمیر افزایش یافته و در طی چهار هفته نگهداری در دمای $^{\circ}\text{C}$ از میزان باکتری‌های پروبیوتیک کاهش یافت. که با نتایج سیدی، (۱۳۹۰) مطابقت داشت. به مرور زمان در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای $^{\circ}\text{C}$ در آب پرتقال غنی شده با پودر آب پنیر و باکتری‌های

تحقیق که به بررسی قنداحیا کننده مارمالاد پالپ لیمو قبل از تخمیر، پس از ۴۸ ساعت تخمیر در دمای 37°C پرداخته شد. در قندهای احیا کننده با توجه به افزایش تراکم باکتری میزان قندهای احیا کننده کاهش یافت که نشان دهنده مصرف توسط پروبیوتیک‌ها می‌باشد. در مربا و مارمالاد به مرور زمان به دلیل مصرف قندهای احیا کننده تغییرات رنگ مشاهده شده است. طبق نتایج حاصل از این تحقیق مشخص شد که رشد باکتری‌ها، کاهش میزان قندهای احیاکننده را در طی تخمیر و نگهداری به دنبال داشته است.

لیسیاردلوماراتور در سال (۲۰۱۱) بیان نمودند که در مارمالاد و مربا، مدت زمان نگهداری سبب کاهش pH می‌شود [۵]. که با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر که بیانگر کاهش سریع تر pH در طی نگهداری مارمالاد پروبیوتیک بوده است، مطابقت داشت.

۴-۲- تغییرات رشد باکتری در طی تخمیر و

نگهداری

برای زنده‌مانی پروبیوتیک laktopasilius کائزی در این آزمایش از مواد پروتئینی و مغذی استفاده شده است. که پودر آب پنیر، پودر شیرخشک و ژلاتین سبب زنده‌مانی پروبیوتیک laktopasilius کائزی در طی دوره نگهداری شده است. وقتی pH طی مدت نگهداری کاهش و میزان اسیدیته افزایش پیدا کرده است سبب مرگ laktopasilius کائزی شده است. بیشترین میزان رشد laktopasilius کائزی در تیمار T_1 با تراکم باکتری 10^{10}cfu/ml مشاهده شده است و تیمار T_1 با تراکم باکتری 10^{10}cfu/ml و تیمار T_2 با تراکم باکتری 10^9cfu/ml هفتۀ سوم رشد laktopasilius کائزی بیشتر از استاندارد غذا و دارو 10^7-10^8 هست . در تیمار T_4 با تراکم باکتری 10^7cfu/ml در هفتۀ سوم میزان رشد باکتری با توجه به حد استاندارد سازمان غذا و دارو کمتر از 10^7cfu/ml مشاهده شده است. در نتیجه بهترین تیمار T_3 با تراکم باکتری 10^{10}cfu/ml به حد استاندارد سازمان غذا و دارو می‌باشد در همه تیمارها میزان باکتری‌های پروبیوتیک در طی تخمیر افزایش یافته و در طی چهار هفته نگهداری در دمای $^{\circ}\text{C}$ از میزان باکتری‌های پروبیوتیک کاهش یافت. که با نتایج سیدی، (۱۳۹۰) مطابقت داشت. به مرور زمان در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای $^{\circ}\text{C}$ در آب پرتقال غنی شده با پودر آب پنیر و باکتری‌های

- growth of probiotics. Fifteenth Iranian Veterinary Congress.
- [10] HosseiniParvar, S. H. Keramat, J. Kadivar, M. Khanipour, E. Milani, E.(2007), Optimization of Enzymic Extraction of Edible Gelatin from Cattle Bones Using Response Surface Methodology (RSM), Scientific Information Database (SID) .mjlh Agricultural Sciences.
- [11] Agurre,M., and Collins, M.D., (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection.j.Appl. Bacteriol.75:95-107.
- [12] Homayouni Rod, AS. , Yarmand,m.s., ahsani, m. r. Azizi, a., (2008),Increase the viability of probiotics in ice cream Fravyzhh by microencapsulation. Eighteenth National Congress of Food Science and Technology. Science and technology park Khorasan, Khorasan Razavi Institute of Food Science and Technology, Iran.
- [13] Aguirre-Ezkauriatza, E. J., Aguilar-Yáñez, J. M., Ramírez-Medrano,A., Alvarez,M.M.,(2010) Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures.Bioresource Technology.VOLUME 101, Issue 8 Pages 2837–2844.
- [14] Kun, S., Rezessy-Szabo, J. M., Nguyen, Q. D., Hoschke, A.,(2008), Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. Journal of Process Biochemistry, 43, 816-821.
- [15] Mokarram, R.R., S.A. Mortazavi. M.B. HabibiNajafi and F. Shahidi. (2009).The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. Food Research International. 42:1040- 1045.
- [16] Mousavi. ZE, SM. Mousavi, SH. Razavi, Z .Emam- Djomeh and H .Kiani.,(2011), Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria., World J MicrobiolBiotechnol, 27, 123–128.
- [17] Ashrafi,f.,(2006), Microbiology Practical , Ahsan Publishing, First Edition.
- [18] Saxelin, M., Mattila-Sandholm, T., Saarela, M., Satokari ,R., Tynkkynen ,S.,(1999),Comparison of Ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Typing of *Lactobacillusrhamnosus* and *L.*

میزان قنداحیاکننده مارمالاد پالپ لیمو قبل از تخمیر، پس از ۴۸ ساعت تخمیر در دمای 37°C ۳۷ مورد بررسی قرار گرفت. میزان قندهای احیاکننده با توجه به افزایش تراکم باکتری، کاهش یافت که نشان دهنده مصرف قند توسط باکتری پروبیوتیک می‌باشد.

۶- منابع

- [1] ISIRI number 3684. (1995). Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Glucose syrup- Specifications and test methods.
- [2] Salajegheh, F., Moeni, S., (2002), Optimized for use in the preparation of various factors rose jam, Journal of Agricultural and Iran, Volume 33, Number 3. 420-413.
- [3] Egbeekun, M. K., Nda-Suleiman, E. O., Akinyeye, O., (1998), Utilization of fluted pumpkin fruit (*Telfairiaoccidentalis*) in marmalade manufacturing, Journal of PlantFoods for Human Nutrition (FormerlyQualitasPlantarum), 52(2), 171-176.
- [4] Fügel, R, Carle R, Schieber, A, (2005),Quality and authenticity control of fruit purees, fruit preparations and jams— areview, Trends in Food Science &Technology, 16, 433–441.
- [5] Licciardello, F., Muratore, G., (2011). Effect of Temperature and Some Added Compounds on the Stability of Blood Orange Marmalade. Journal of Food Science. Vol. 76, Nr. 7.
- [6] Randazzo, C., Pitlno, I., Licciardello, F.,Murtore, G., Caggia, C., (2013), Survival of *Lactobacillus rhamnosus*probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. Food Science and Technology. 0101-2061.
- [7] Mortazavi .s. AS.,and Zia alHaq,s.h.r,(2006), Citrus processing technology and byproducts. University of Mashhad.
- [8] dadvar, p. Diani, a. morvad, m. Gholami, g., (2000), Determine the in vitro digestibility (In-vitro) lemon pulp treated with *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Islamic Azad University microbial biotechnology.
- [9] MarhamatiZadeh, H., Yqtyn, AS., And Jafari, AS., (2008), the effect of whey on

- [22] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Jam and marmalade and jelly jam. ISIRI no 214. ISIRI; (2013).3rd revision.
- [23] Saidi, sh., Hashemiravan, m., Noorbakhsh, f., (2012), The growth of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacteriumlactis* in orange juice, the second national seminar on food security, Islamic Azad University Access.
- [24] YahyaeiSoofyani, z., Hashemiravan,m., Pourahmad, r., (2014), Study of production possibility of beverage based on probiotic fermented mixture of malt extract and red fruit juices, Food Technology Master's thesis, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University of Varamin.
- casei*Strains Applied and Envirionmental Microbiology.Valio Ltd. Research and Development Centre, P.O. Box 30, FIN-00039 Valio, Finland.
- [19] Yoon, K., E. Woodams and Y. Hang, (2004). Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria, The Journal of Microbiology, vol. 42, pp. 315-318.
- [20] Vinderola, C. G. and J.A. Reinheimer. (2000). Enumeration *Lactobacillus casei* in the presence of *L.acidophilus* .*Bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. International Dairy Journal. 10,4, 271-275.
- [21] Mortazavian ,AM,, Sohrabvandi ,S.,(2006). Probiotics and probiotic food products: Ata, 20-45.

Assess the viability of *Lactobacillus casei* in fermented lemon pulp marmalade

Shirpour, M. ^{1*}, Mahnaz Hashemiravan², Rezvan Pourahmad³

1. M.Sc. in Food science and Microbiology, Faculty Of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Faculty Of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
3. Department of Food Science and Technology, , Faculty Of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

(Received: 2015/12/26 Accepted: 2016/08/09)

In this study, for production of probiotic fermented lemon pulpMarmalade , lemon pulp MarmaladeWas produced by using of 50% lemon pulp and 50% sugar. Adding gelatin, sweet whey powder, and dried milk (2, 5, and 10 grams, respectively) to the pulp and sugar mixture increased protein content and enhanced growth and viability of probiotics. In this research, *Lactobacillus casei* was inoculated at bacterial concentrationsof 10^7 , 10^8 , 10^9 , and 10^{10} cfu/ml, the fermentation process took place at 37°C for 48 hours, and the mixture was evaluated for a 28-day period .Factors such as pH, acidity , reducing sugars and viability of probiotic bacteria properties were studied during this period.Data analysis was conducted using a completely randomized design in a 2 factorial 4 levels of density of bacteria(10^7 , 10^8 , 10^9 , and 10^{10}) cfu/ml and factor holding time in five levels (28 days) along with control, with three repeats done. During fermentation while the pH value decreased and the amount of acid increased, During fermentation, a number of probiotic bacteria survived in all of the treatments after fermentation because of the use of sugar and due to the presence of nutrients in the marmalade, The superior treatment T₃, with the bacterial concentration of 10^3 cfu/ml, reached the standard limit set by the Food and Drug Administration after the marmalade was kept for four weeks. In all, results of this research showed fermented probiotic lemon pulp marmalade was a suitable environment for the growth of lactic acid bacteria and functional marmalade production.

Keywords: Lemon pulp, Probiotic marmalade, *Lactobacillus casei*

*Corresponding Author E-Mail Address: maryam.shirpour@yahoo.com