

تولید نوشیدنی کامبوجا با استفاده از اینولین غده گیاه سیب زمینی ترشی

محمد بلوردی^۱، محمد صفری^{۲*}، مهران حبیبی رضایی^۳، سید محمد هاشم حسینی^۱،
کرامت الله رضایی^۲، سید علی اکبر موسوی موحدی^۴

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۲- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۳- استادیار گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران

۴- استاد موسسه تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۳)

چکیده

کامبوجا یکی از انواع نوشیدنی‌های تخمیری غیر لبنی می‌باشد. ماده اولیه مورد استفاده در تولید کامبوجا معمولاً چای شیرین شده با شکر است. کشت میکروبی کامبوجا با استفاده از منابع کربنی دیگری مانند اینولین و الیگوفروکتوزها نیز صورت می‌گیرد. در این پژوهش از اینولین و الیگوفروکتوزهای استخراج شده از غده سیب‌زمینی ترشی در غلظت‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد، به عنوان سوپسترا برای تخمیر کامبوجا استفاده شد و تغییرات شیمیایی در فرآیند تخمیر این محصول و کامبوجای حاصل از شکر در غلظت‌های یکسان مقایسه شدند. نتایج نشان داد که اینولین سریع‌تر از شکر در کشت کامبوجا مصرف می‌شود. کامبوجای تهیه شده با اینولین pH بالاتری از خود نشان داد. اندازه‌گیری میزان اسید استیک و اسید لاکتیک با استفاده از روش HPLC نشان داد که میزان اسید استیک در محصول تهیه شده با شکر و میزان اسید لاکتیک در محصول تهیه شده با اینولین بالاتر است. میزان پروتئین محلول و فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی نیز در کامبوجای حاصل از اینولین بالاتر از کامبوجای تهیه شده با شکر می‌باشد. بنابراین با استفاده از اینولین به عنوان سوپسترا برای کشت کامبوجا می‌توان زمان تخمیر را کوتاه‌تر کرده و محصولی با pH بالاتر تولید نمود.

کلید واژگان: کامبوجا، اینولین، تخمیر، اسید لاکتیک، اسید استیک.

۱- مقدمه

فشار خون، تسکین ورم مفاصل و تقویت سیستم ایمنی شده و نیز از ابتلا و پیشرفت سرطان جلوگیری نماید [۳]. از آنجا که میکروارگانیسم‌های موجود در کامبوجا جزو میکروب‌های مفید هستند و مقاومت بالایی خصوصاً در شرایط اسیدی دارند، می‌توانند در دستگاه گوارش جایگزین میکروارگانیسم‌های مضر شوند، بنابراین کامبوجا را می‌توان جزو محصولات با خواص پروبیوتیکی به حساب آورد. این اثرات علاقه به مصرف کامبوجا را افزایش

کامبوجا یک نوشیدنی تخمیری است که توسط یک هم کشت از مخمرها و باکتری‌ها تهیه می‌شود. این محصول طعم شیرین و اسیدیته ملایمی داشته و تا حدودی گازدار می‌باشد. کامبوجا یا قارچ چای از دو قسمت، لایه سلولزی شناور بر روی سطح و مایع ترش تخمیر شده تشکیل شده است [۲و۱]. اثرات مفید این محصول روی سلامتی، مصرف این محصول را افزایش داده است. بیان شده که کامبوجا می‌تواند موجب کاهش

* مسوول مکاتبات: msafari@ut.ac.ir

نامیده می‌شوند. اینولین و الیگوفروکتوزها، پری‌بیوتیک بوده و میزان قندهای ساده در آنها پایین است، بنابراین می‌توانند در تغذیه‌های رژیمی مورد استفاده قرار گیرند [۱۲].

با توجه به اینکه یکی از مهمترین مشکلات در مصرف کامبوجا pH پایین و میزان بالای اسید استیک است، افزایش pH کاهش میزان اسید استیک در این محصول می‌تواند حائز اهمیت باشد. این کار از طریق تغییر شرایط تخمیر از جمله تغییر نوع سوبسترا و یا تغییر گونه‌های میکروبی موجود در کشت کامبوجا امکان‌پذیر است. هدف از این پژوهش استفاده از سوبستراهای دیگر (به جز ساکارز)، برای کاهش میزان اسید استیک و افزایش pH کامبوجای تخمیر شده است. برای این منظور از اینولین استخراج شده از عصاره گیاه سیب‌زمینی ترشی به عنوان سوبسترا برای تخمیر کامبوجا استفاده شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- روش تهیه اینولین از عصاره گیاه

سیب‌زمینی ترشی

برای تهیه عصاره سیب‌زمینی ترشی، ابتدا غده‌های شسته و پوست‌گیری شده همراه با ۳ لیتر آب، به ازاء هر یک کیلوگرم غده، در یک مخلوط کن خرد شدند. سوسپانسون حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 90°C – 80°C قرار گرفت تا هم آنزیم‌ها غیر فعال شوند و هم اینولین وارد آب شود. عصاره حاصل با استفاده از یک پارچه کتانی صاف شد، سپس برای حذف ترکیبات پکتینی، پروتئین‌ها و دیگر مواد کلوئیدی، pH عصاره با استفاده از محلول هیدروکسید کلسیم ۵ درصد از ۶–۵ به حدود ۱۲–۱۰ رسانده شد و عصاره به مدت نیم ساعت در دمای 60°C – 50°C قرار گرفت. رسوب حاصل با استفاده از کاغذ صافی معمولی جدا شد. عصاره دارای رنگ سبز تیره و تقریباً شفاف بود. برای حذف کلسیم اضافی و دیگر مواد آلی موجود در عصاره از محلول اسید فسفریک ۱۰ درصد استفاده شد و pH عصاره به ۹–۸ رسانده شد و به مدت ۳–۲ ساعت در دمای 60°C نگهداری شد، تا رسوب تشکیل شود. سپس رسوب حاصل با استفاده از کاغذ صافی معمولی جدا شد. برای اطمینان از فرآیند تصفیه مناسب، مرحله افزودن هیدروکسید کلسیم و اسید فسفریک دو بار انجام شد. عصاره تصفیه شده با

می‌دهد [۴]. ماده اولیه مورد استفاده برای تولید کامبوجا معمولاً چای شیرین شده با شکر می‌باشد. ساکارز موجود در چای توسط مخمرها به گلوکز و فروکتوز هیدرولیز می‌شود، گلوکز در ابتدا بوسیله مخمرها به اتانول و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌شود [۵]. در مرحله بعد اتانول توسط استوباکترها به اسید استیک تبدیل می‌شود. غلظت اتانول در کامبوجا به ندرت به بیش از یک درصد می‌رسد، در حالی که اگر مدت زمان تخمیر طولانی شود مقدار اسید استیک می‌تواند به ۳ درصد نیز افزایش یابد؛ اما به طور معمول مقدار اسید استیک کمتر از یک درصد می‌باشد [۶]. بلانک در سال ۱۹۹۶ متابولیت‌های حاصل از تخمیر چای را با استفاده از قارچ کامبوجا در درصدهای مختلف شکر اندازه‌گیری کرد. در این پژوهش میزان ساکارز، اتانول، اسید استیک، اسید لاکتیک و اسید گلوکونیک موجود در کامبوجا در طول فرآیند تخمیر با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد [۶]. چن و لیو در سال ۲۰۰۰ تغییرات ترکیبات عمده و میکروارگانیسم‌های موجود در محلول کامبوجا را در طول یک دوره تخمیر طولانی ۶۰ روزه بررسی کردند [۷].

میکروارگانیسم‌های کامبوجا از دیگر منابع قندی نیز می‌توانند استفاده کنند. مالباسا و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر غلظت ساکارز را روی کامبوجای تهیه شده از ملاس مطالعه کردند [۸]. لنکار و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از میکروارگانیسم‌های کامبوجا عصاره پنج نوع سیب‌زمینی ترشی تهیه شده از مزارع مختلف را تخمیر کردند [۹]. اینولین یک پلیمر کربوهیدراتی ذخیره‌ای در بعضی گیاهان مانند کاسنی، سیب‌زمینی ترشی و کوکب می‌باشد. این ماکرومولکول از واحدهای فروکتوز که با پیوند بتا ۱ به ۲ به هم متصل هستند، تشکیل شده است و در انتهای زنجیر معمولاً یک واحد گلوکز وجود دارد [۱۰]. از نظر شیمیایی اینولین مخلوطی از پلی‌ساکارید و الیگوساکاریدهایی می‌باشد که تقریباً اکثر این مولکول‌ها ساختار GF_n دارند. پیوند بین واحدها به نوعی است که این مولکول را برای همه حیوانات عالی غیر قابل هضم می‌کند. در این فرمول G گلوکز، F فروکتوز و n تعداد واحدهای فروکتوزی می‌باشد که با پیوند بتا ۱ به ۲ به هم متصل شده‌اند [۱۱]. الیگوفروکتوز ممکن است شامل هر دو نوع مولکول GF_n و F_n باشد که درجه پلیمریزاسیون در آنها کمتر از ۱۰ می‌باشد. اینولین و الیگوفروکتوز، فروکتان

کربوهیدراتی آشکار شده روی صفحه TLC فاکتور نسبی (RF) محاسبه گردید. فاکتور نسبی، نسبت ارتفاع مرکز لکه کربوهیدراتی به ارتفاع فاز متحرک (جبهه حلال) می‌باشد. همچنین پس از تولید کامبوجا، فرآیند تخمیر اینولین در کامبوجای تولیدی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک بر اساس روش ذکر شده، مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۲-۲- اندازه‌گیری کربوهیدرات کل

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات کل موجود در نمونه‌ها، از روش فنول سولفوریک اسید استفاده شد. ابتدا به ۲ میلی‌لیتر نمونه، ۱ میلی‌لیتر محلول فنول ۵ درصد، افزوده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد به نمونه‌ها افزوده شد. بعد از ۳۰ دقیقه، جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش از فروکتوز به عنوان استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد رسم شده و میزان قند کل موجود در نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین شد [۱۳].

۲-۲-۳- اندازه‌گیری قند احیاء کننده

برای اندازه‌گیری قند احیاء کننده موجود در نمونه‌ها، از معرف اسید دی‌نیتروسالسیلیک استفاده شد و مقدار قند احیاء کننده نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۵ نانومتر و با استفاده از استاندارد فروکتوز بر اساس روش Miller در سال ۱۹۵۹ اندازه‌گیری شد [۱۴].

۲-۲-۴- تعیین میانگین درجه پلیمریزاسیون اینولین

استخراج شده

میانگین درجه پلیمریزاسیون اینولین استخراج شده از تقسیم درصد وزنی قند کل بر درصد وزنی قند احیاء کننده بدست آمد. میانگین درجه پلیمریزاسیون در تعیین کیفیت اینولین استخراج شده فاکتور مهمی می‌باشد.

۲-۲-۵- اندازه‌گیری pH

برای اندازه‌گیری pH محلول اینولین استخراج شده، ابتدا محلول ۱۰ درصد اینولین در آب تهیه شد و بعد pH این محلول با استفاده از دستگاه pH متر الکترونیکی اندازه‌گیری شد. همچنین pH نمونه‌های کامبوجای تولیدی نیز در روز چهاردهم تخمیر، بلافاصله پس از نمونه‌گیری، بوسیله pH متر الکترونیکی اندازه‌گیری شدند.

افزودن ۳۰ گرم کربن فعال به ازاء هر کیلوگرم غده و همزدن شدید در دمای 60°C در مدت زمان ۳۰-۱۵ دقیقه رنگ‌بری شد و کربن فعال با کاغذ صافی جدا گردید. عصاره حاصل در این مرحله کاملاً بی‌رنگ و شفاف بود و میزان مواد جامد محلول آن ۷-۸ درصد بود، که با استفاده از دستگاه تغلیظ تحت خلأ بیریکس آن به ۴۲ رسید. با توجه به اینکه عصاره تغلیظ شده هنوز حاوی ترکیبات محلول و مواد معدنی بود، برای حذف این ترکیبات، مواد قندی و اینولین با استفاده از اتانول رسوب داده شدند، برای این منظور به عصاره تغلیظ شده به نسبت ۸ به ۱ اتانول ۹۹ درصد افزوده شد. در هنگام افزودن اتانول رسوب سفید رنگی تشکیل شد که به صورت سوسپانسیون بود. این سوسپانسیون برای ته‌نشینی کامل رسوب به مدت ۲ روز در دمای 40°C قرار داده شد. پس از جداسازی مایع فوقانی، رسوب به مدت ۵ روز در دمای 60°C خشک شد. رسوب خشک شده در پایان آسیاب شده و وزن نهایی آن نسبت به وزن غده‌های اولیه بدست آمد [۱۳].

۲-۲-۲- آنالیز پودر اینولین حاصل

برای اندازه‌گیری ترکیبات موجود در پودر حاصل و همچنین بررسی خواص فیزیکی‌شیمیایی آن یک سری آزمایش‌ها روی پودر اینولین استخراج شده انجام شد.

۲-۲-۱- تعیین قندها با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

برای بررسی کیفی قندهای موجود در پودر از کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد، برای این منظور محلول یک درصد قندهای استاندارد و همچنین اینولین استخراج شده تهیه شد و بعد با ۳۰ میکرولیتر از محلول حاصل لکه‌گذاری روی صفحه TLC (پلیت آلومینیومی پوشیده شده با سیلیکا ژل) انجام شد و صفحه در تانک اشباع شده قرار گرفت. فاز متحرک درون تانک، شامل محلول بوتانول، ایزوپروپانول و آب به ترتیب به نسبت‌های (V/V/V) ۳، ۱۲ و ۴ بود. بعد از گذشت ۸ ساعت صفحه از تانک TLC خارج شده و پس از آنکه فاز متحرک آن خشک شد، با استفاده از محلول آشکارساز، لکه‌ها روی صفحه ظاهر شدند. این محلول روی صفحه پاشیده شد و پس از خشک شدن، صفحه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 110°C قرار گرفت و لکه‌های کربوهیدرات روی صفحه به صورت لکه‌های تیره مشاهده شدند. به منظور تفسیر بهتر نتایج حاصل شده در کروماتوگرافی لایه نازک، برای هر یک از لکه‌های

۶-۲-۲- اندازه‌گیری درصد ماده خشک

برای اندازه‌گیری درصد ماده خشک نمونه از روش (AOAC, 2000b) استفاده شد [۱۵] و نمونه در ۳ تکرار در دمای 100°C خشک شد. بر اساس اختلاف وزن نمونه قبل و بعد از قرار دادن در آون، درصد ماده خشک از معادله ۱ محاسبه شد.

$$\text{درصد ماده خشک} = \left(\frac{\text{جرم نمونه خشک ماده}}{\text{جرم نمونه اولیه}} \right) \times 100 \quad (1)$$

۷-۲-۲- اندازه‌گیری خاکستر کل

برای اندازه‌گیری خاکستر کل از روش (AOAC, 2000a) استفاده شد [۱۶] و نمونه در ۳ تکرار در کوره الکتریکی با دمای 500°C سوخته شد. پس از رسیدن به وزن ثابت، درصد خاکستر نمونه از روی وزن اولیه نمونه و وزن خاکستر حاصل، از معادله ۲ محاسبه شد.

$$\text{درصد خاکستر} = \left(\frac{\text{جرم خاکستر}}{\text{جرم نمونه اولیه}} \right) \times 100 \quad (2)$$

۸-۲-۲- اندازه‌گیری کمی ترکیبات قندی

برای اندازه‌گیری کمی ترکیبات قندی موجود در اینولین استخراج شده، از روش HPLC استفاده شد. HPLC با استفاده از دستگاه Knauer (ساخت آلمان) انجام شد و حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. جداسازی با استفاده از ستون تبادل یونی (Eurokat H, $10\mu\text{m}$, $300 \times 8\text{ mm ID}$) و شناسایی با استفاده از آشکارساز ضریب شکست (RI Detector k-2301) انجام شدند. اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان فاز متحرک، در دمای محیط مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات عمده حاصل از تخمیر شکر و اینولین در تولید کامبوجا نیز، با استفاده از HPLC به روشی مشابه اندازه‌گیری شدند، با این تفاوت که حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر و سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه، در نظر گرفته شدند [۱۷].

۳-۲- کشت کامبوجا

لایه کامبوجا از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. برای تولید لایه جدید کامبوجا ابتدا ۲ لیتر آب جوش تهیه شده و بعد ۱۰ گرم چای سیاه ایرانی به آن افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه چای صاف شده و ۲۰۰ گرم شکر در آن حل شد و ۵ دقیقه در دمای جوش حرارت داده شد. محلول چای شیرین

شده پس از سرد شدن در یک ظرف شیشه‌ای ریخته شد و یک لایه کامبوجا که از کشت قبلی تهیه شده بود همراه با ۲۰۰ میلی‌لیتر مایع کامبوجای حاصل از کشت قبلی به آن افزوده شد. سپس درب ظرف شیشه‌ای با یک پارچه کتان پوشیده شد. تخمیر به مدت ۱۰ روز در یک محیط دور از تابش مستقیم نور و در دمای اتاق (حدود 24°C) بدون همزدن انجام شد [۶].

۴-۲- تخمیر نمونه‌ها و تولید کامبوجا

برای تهیه کشت‌ها به این ترتیب عمل شد که ابتدا به آب جوشیده شده ۰/۵ درصد چای سیاه افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه چای صاف شد. سپس با این چای، محلول‌های اینولین و همچنین شکر در غلظت‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد تهیه شدند. این محلول‌ها در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری (در هر ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول) در ۳ تکرار ریخته شدند. ارلن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C استریل شدند و پس از سرد شدن به هر کدام از ارلن‌ها ۵ گرم از لایه کامبوجای تهیه شده با سوبسترای شکر به همراه ۱۰ میلی‌لیتر محلول کامبوجای تهیه شده با شکر افزوده شد و پس از پوشیدن درب ارلن‌ها با پارچه کتان تخمیر دور از تابش مستقیم نور در دمای $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ انجام شد. نمونه‌برداری از ارلن‌ها در روز چهاردهم تخمیر در شرایط استریل انجام گرفت و آزمون‌های مورد نظر روی این نمونه‌ها انجام شدند.

۵-۲- اندازه‌گیری پروتئین محلول در نمونه‌ها

برای اندازه‌گیری پروتئین محلول در نمونه‌ها از روش بردفورد استفاده شد. در این روش از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد و ترکیب Coomassie Brilliant Blue G-250 به عنوان معرف استفاده شد. از کامبوجاهایی که با ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد ساکاروز و اینولین تهیه شده بودند در روز چهاردهم نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. میزان پروتئین محلول در نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر و مقایسه با منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد [۱۸].

۶-۲- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

کامبوجا

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کامبوجا از روش ری و همکاران در سال ۱۹۹۹ استفاده شد. برای تهیه کردن

در اینولین‌های استاندارد (فاکتور نسبی = ۰) هیچ بانندی مشاهده نمی‌شود، به این دلیل که در این اینولین درجه پلیمریزاسیون بالا بوده و ترکیبات قندی با وزن مولکولی بالا با سیستم حلال مورد استفاده به بالا رانده نمی‌شوند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، باندهایی که در مورد پودر اینولین استخراج شده مشاهده می‌شوند (مقادیر فاکتور نسبی به ترتیب از بالا به پائین ۰/۶۲، ۰/۵۵، ۰/۵۰، ۰/۴۴، ۰/۳۸، ۰/۳۲) مربوط به مولکول‌های اینولین با درجه پلیمریزاسیون پایین و الیگوفروکتوزها می‌باشند. البته در پودر استخراج شده باندهایی با فاکتور نسبی کم یا حتی ۰ نیز وجود دارد که نشان می‌دهد بخشی از پودر استخراج شده همانند اینولین استاندارد دارای درجه پلیمریزاسیون بالا و ترکیبات قندی با وزن مولکولی بالا می‌باشد. اینولین استخراج شده به صورت پودری سفید رنگ بوده و pH محلول ۱۰ درصد آن ۶/۹۲ بود. میزان ماده خشک اینولین استخراج شده ۹۳/۲۳ درصد بود. همچنین آزمون فنول سولفوریک اسید نشان داد، پودر حاصل دارای ۸۵ درصد کربوهیدرات است، با توجه به نتایج حاصل از HPLC، این کربوهیدرات‌ها به طور عمده شامل ۷۸/۷۹ درصد اینولین و الیگوفروکتوز، ۱/۰۸ درصد فروکتوز، ۰/۸۳ درصد گلوکز و ۲/۲۰ درصد ساکارز هستند. همان‌گونه که نتایج HPLC نشان می‌دهد مقداری منوساکارید همراه با اینولین رسوب کرده بود، این منوساکاریدها باعث می‌شوند میانگین درجه پلیمریزاسیون در مقایسه با اینولین تجاری تهیه شده از سیب‌زمینی ترشی کمتر باشد و به ۲۶/۳۱ برسد. اندازه‌گیری قند احیاء کننده با روش DNS نیز نشان داد ۳/۲۳ درصد قند احیاء کننده در پودر استخراج شده وجود داشت، که شامل فروکتوز، گلوکز و همچنین اینولین و الیگوفروکتوزهای با انتهای احیاء کننده بودند. میزان خاکستر پودر اینولین ۶/۴۹ درصد است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت مقدار زیادی مواد معدنی همراه با اینولین وجود دارد که این ترکیبات می‌توانند به رشد میکروارگانیسم‌های کامبوجا کمک کرده و باعث افزایش رشد و تولید متابولیت‌ها توسط این میکروارگانیسم‌ها شوند. نتایج آزمون‌های انجام شده بر روی پودر اینولین در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

رادیکال ABTS•، محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در آب، بوسیله محلول ۲/۵۴ میلی‌مولار پرسولفات پتاسیم (به نسبت مولی ۱ به ۰/۵) در یک مکان تاریک به مدت ۱۶-۱۲ ساعت اکسید شد. سپس محلول رادیکال ABTS•، با محلول بافر فسفات ۵ میلی‌مولار ($\text{pH} = 7/4$) رقیق شد تا جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر به 0.7 ± 0.2 برسد، در مرحله بعد ۴۰ میکرولیتر نمونه به ۱ میلی‌لیتر معرف ABTS• افزوده شد و جذب در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. از ویتامین E محلول در آب (Trolox) به عنوان یک ترکیب استاندارد با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده گردید [۱۹].

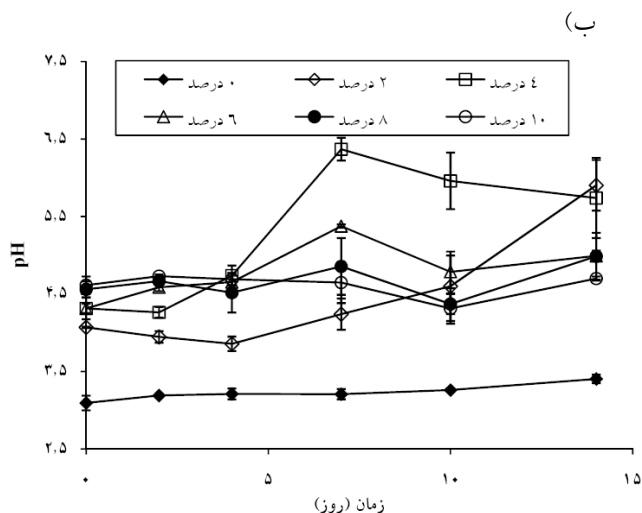
۳- نتایج و بحث

۳-۱- خصوصیات اینولین استخراج شده

بررسی کیفی پودر اینولین استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) وجود ترکیبات قندی با درجه پلیمریزاسیون متفاوتی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بالاترین باند ظاهر شده در پودر اینولین (فاکتور نسبی = ۰/۷۴) با باند ظاهر شده از استاندارد فروکتوز در یک سطح می‌باشد و این نشان می‌دهد که مقداری فروکتوز در پودر حاصل وجود دارد.



شکل ۱ صفحه TLC قندها، ۱- گلوکز، ۲- ساکارز، ۳- فروکتوز، ۴- اینولین (استاندارد ۱)، ۵- اینولین (استاندارد ۲)، ۶- اینولین استخراج شده در پژوهش حاضر



شکل ۲ تغییرات pH در کامبوجای تهیه شده با درصدهای مختلف

شکر (الف) و اینولین (ب)

در کامبوجاهایی که با درصدهای مختلف ساکارز تهیه شده بودند، با افزایش مقدار شکر اولیه مورد استفاده در تخمیر، کاهش pH شدیدتر است که علت آن وجود مقدار بیشتری سوبسترا برای مصرف میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. کمترین مقدار pH که در کامبوجای تهیه شده با ۱۰ درصد شکر در روز چهاردهم مشاهده شد که برابر ۲/۴۶ بود. در کامبوجای تهیه شده با اینولین (شکل ۲) pH به طور مشخص با گذشت زمان کاهش نمی‌یابد و در بعضی از نمونه‌ها، افزایش pH در طول دوره تخمیر مشاهده می‌شود. در نمونه‌های تهیه شده با ۶، ۸ و ۱۰ درصد اینولین روند تغییرات pH تقریباً شبیه هم است و تا روز هفتم افزایش pH مشاهده می‌شود و پس از آن تا روز دهم کاهش یافته و بعد تا پایان دوره تخمیر روند افزایشی ملامتی دارد. این یافته‌ها با نتایج پژوهش مالاباسا و همکاران در سال ۲۰۰۲ هماهنگی دارد [۲۰]. همانطور که نتایج HPLC نشان می‌دهد، تفاوت بین کامبوجای تهیه شده با اینولین و شکر احتمالاً به دلیل تفاوت در مقدار اسید استیک تشکیل شده در حین تخمیر است. در شکل ۳، pH کامبوجای تهیه شده با شکر و اینولین در روز چهاردهم پس از تلقیح مقایسه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، pH کامبوجای تهیه شده با اینولین بالاتر از کامبوجای تهیه شده با شکر است که این افزایش در pH به علت خاصیت بافری محلول اینولین استخراج شده و از طرف دیگر میزان اسید استیک پایین در محلول حاصل از تخمیر اینولین است. توانائی بافری محصول

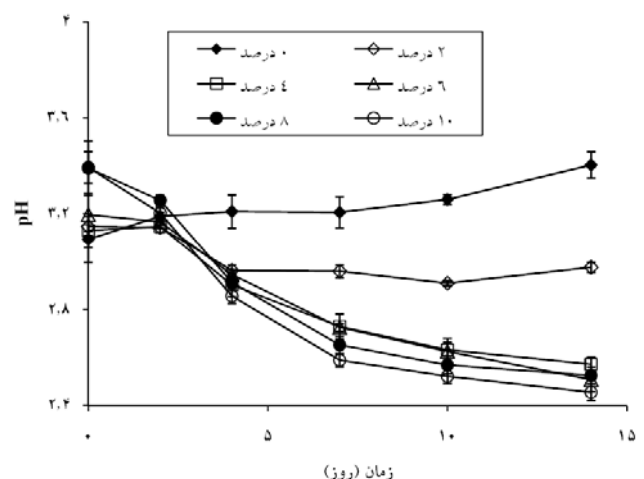
جدول ۱ خصوصیات اینولین استخراج شده

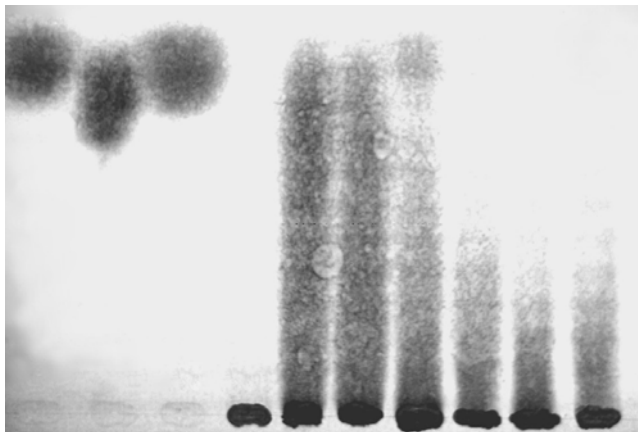
۲۶/۳۱	میانگین درجه پلیمریزاسیون
۹۳/۲۳	درصد ماده خشک
۸۵	کربوهیدرات کل
۶/۹۲	pH در محلول ۱۰ درصد
پودر سفید رنگ	وضعیت ظاهری
۶/۴۹	درصد خاکستر کل
۷۸/۷۹	درصد اینولین و الیگوفروکتوز
۳/۲۳	درصد قند احیاء کننده
۲/۲۰	درصد ساکارز
۱/۰۸	درصد فروکتوز
۰/۸۳	درصد گلوکز

۲-۳- تغییرات pH در فرآیند تخمیر

اندازه‌گیری pH نمونه‌ها در روزهای مختلف نشان می‌دهد که در نمونه‌های تهیه شده با شکر (شکل ۲) در طول دوره تخمیر pH به طور مرتب کاهش می‌یابد. کاهش pH در کامبوجای تهیه شده با شکر به علت تولید اسیدهای آلی توسط میکروارگانیسم‌های کامبوجا در حین تخمیر است.

(الف)





شکل ۴ صفحه TLC تخمیر اینولین، ۱- گلوکز، ۲- ساکارز، ۳-

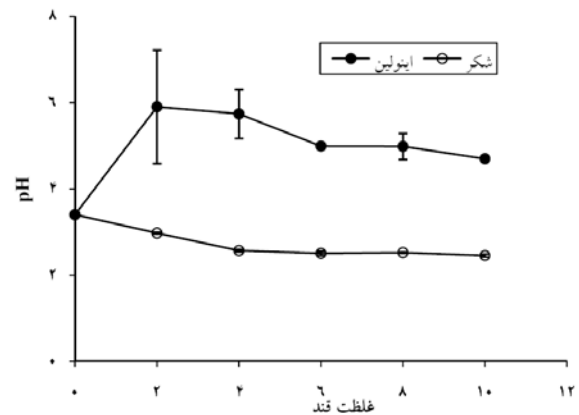
فروکتوز، ۴-اینولین با درجه پلیمریزاسیون بالا، ۵ تا ۱۰- سوپسترای تخمیر به ترتیب در روزهای ۰، ۲، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ پس از شروع تخمیر

توسط آنزیم‌های میکروبی هیدرولیز شده و به فروکتوز تبدیل می‌شوند و فروکتوز به عنوان منبع کربن مورد استفاده میکروارگانیسم‌های موجود در لایه کامبوجا قرار می‌گیرد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در روز چهارم قسمت بالای باند (فاکتور نسبی ۰/۷۰ تا ۰/۷۴)، پررنگتر شده است، زیرا مقداری قندهای با وزن مولکولی پایین (مانند فروکتوز) در اثر فعالیت آنزیم‌های میکروبی تولید شده است. نتایج حاصل از TLC مایع تخمیر در روزهای مختلف، با نتایج به دست آمده از پژوهش لنکار و همکاران در سال ۲۰۰۷ سازگار است [۹].

۳-۴- میزان پروتئین محلول در نمونه‌ها

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، به هنگام استفاده از درصد‌های مختلف منبع قندی مشاهده گردید که با افزایش درصد اینولین اولیه میزان پروتئین محلول افزایش می‌یابد، ولی در مورد کامبوجای تهیه شده با شکر تا ۶ درصد قند میزان پروتئین افزایش یافته و پس از آن کاهش می‌یابد. محتوی پروتئین محلول در کامبوجای حاصل از سوپسترای اینولین احتمالاً به علت رشد بهتر میکروارگانیسم‌ها در حضور این سوپسترا بود؛ که در نتیجه میزان بیشتری آنزیم‌های برون‌سلولی و پروتئین‌های محلول توسط این میکروارگانیسم‌ها به درون مایع ترشح می‌شود. اختلاف معنی‌دار در میزان پروتئین این دو محصول می‌تواند ناشی از اثرات تشدیدکنندگی احتمالی اینولین یا محصولات متابولیکی آن بر روی سیستم ماشین ترجمه میکروارگانیسم‌ها در کامبوجا باشد. خاصیت بافری بالا

تهیه شده از اینولین می‌تواند به علت تولید متابولیت‌هایی همانند پروتئین در حین تخمیر بوده که ویژگی‌های بافری نشان می‌دهند.



شکل ۳ pH کامبوجای تهیه شده با شکر و اینولین در روز

چهاردهم تخمیر

۳-۳- بررسی فرآیند تخمیر با استفاده از

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

برای بررسی مصرف اینولین طی فرآیند تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های موجود در لایه کامبوجا، ابتدا از ارلن‌هایی که غلظت اولیه اینولین در آنها ۱۰ درصد بود در روزهای مختلف تخمیر (۰، ۲، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴ پس از تخمیر) نمونه‌برداری صورت گرفت. نتایج کروماتوگرافی لایه نازک کامبوجای تهیه شده با سوپسترای اینولین نشان می‌دهد که قند اینولین در فرآیند تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های کامبوجا هیدرولیز و مصرف شده است. همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در کامبوجای تهیه شده با ۱۰ درصد اینولین در روزهای مختلف تخمیر با گذشت زمان بعضی از باندهای ظاهر شده ناپدید شده اند، که نشان دهنده کاهش مقدار ترکیبات قندی در محلول به دلیل مصرف آنها می‌باشد.

با توجه به اینکه باندهای بالاتر زودتر ناپدید شده‌اند، مشخص می‌شود که مولکول‌های اینولین با درجه پلیمریزاسیون پایین‌تر (فاکتور نسبی بالاتر) نسبت به مولکول‌های با وزن مولکولی بالاتر (فاکتور نسبی پایین‌تر)، زودتر مصرف می‌شوند. علت این پدیده آن است که مولکول‌های کوچکتر سریعتر و آسانتر

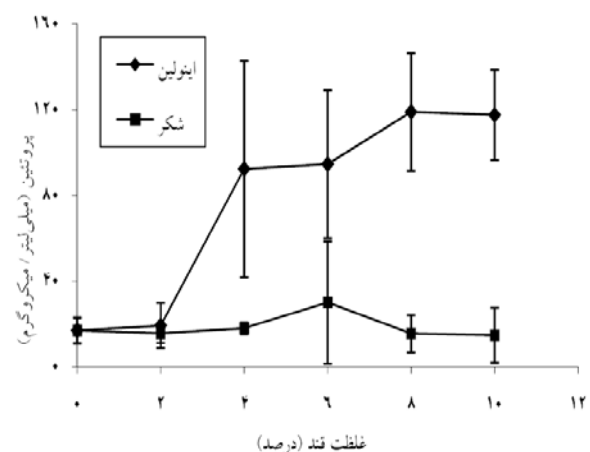
مربوط به تجزیه ترکیبات پلی فنولی موجود در چای در حین فرآیند تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های موجود در لایه کامبوجا و همچنین واکنش ترکیبات پلی فنولی چای با متابولیت‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها است که باعث کاهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود [۲۲]. تفاوت در خاصیت آنتی‌اکسیدانی کامبوجای تهیه شده از اینولین با کامبوجای تهیه شده از شکر احتمالاً مربوط به تفاوت در متابولیت‌های تولید شده از این دو سوبسترا است. بیشترین مقدار اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به محصول تخمیری حاصل از ۱۰ درصد اینولین و برابر با ۶۴/۵ درصد بود. در مورد سوبسترای اینولین مشاهده شد که با افزایش میزان اینولین تا ۴ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد و پس از آن با افزایش درصد اینولین فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. درحالی‌که در کامبوجای حاصل از شکر تفاوت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در درصدهای متفاوت قند در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخی از پروتئین‌ها قبلاً مورد بررسی قرار گرفته است [۲۳]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها ناشی از اسیدهای آمینه آنها می‌باشد. بسیاری از باقیمانده‌های اسیدهای آمینه یا از طریق دادن پروتون (تریپتوفان، فنیل آلانین، تیروزین، هیستیدین و سیستین) به رادیکال‌های آزاد و یا از طریق جذب یون‌های فلزی (گلوتامین، آسپاراژین، لیزین، آرژنین و هیستیدین) دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. بنابراین مقدار بالاتر پروتئین تولید شده سبب ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر در کامبوجای تهیه شده از اینولین می‌شود. علاوه بر این، اخیراً اثر تشدیدکنندگی اینولین روی سنتز اکسید نیتریک (NO) گزارش شده است [۲۴]. مشخص شده است که سنتز اکسید نیتریک در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها وجود دارد. رادیکال اکسید نیتریک مسوول ایجاد تغییرات در بیان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مختلف می‌باشد.

۳-۶- اندازه‌گیری ترکیبات عمده حاصل از

تخمیر با HPLC

با استفاده از روش HPLC مقادیر اینولین، ساکارز، گلوکز، فروکتوز، اسید لاکتیک، اسید استیک و اتانول به طور هم‌زمان با

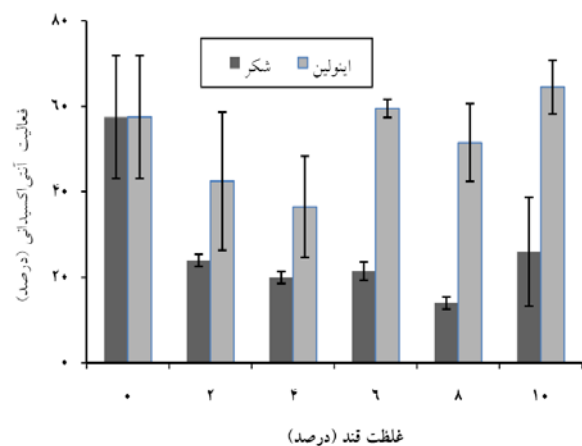
در کامبوجای تهیه شده از اینولین ناشی از غلظت بالای پروتئین‌های ایجاد شده طی تخمیر است. در حقیقت اختلاف در خاصیت بافری بین دو نمونه کامبوجا، ناشی از گروه‌های بافری‌کننده است. پروتئین‌ها به علت داشتن تعداد زیادی گروه‌های قابل یونیزه شدن می‌توانند خاصیت بافری زیادی را اعمال نمایند [۲۱].



شکل ۵ میزان پروتئین در کامبوجای تهیه شده با شکر و اینولین در روز چهاردهم تخمیر

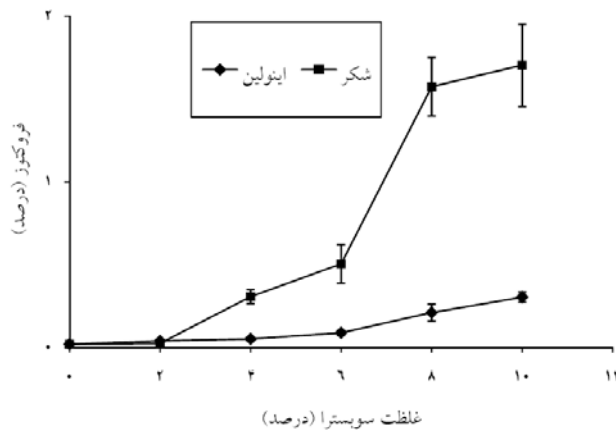
۳-۵- فعالیت آنتی‌اکسیدانی کامبوجا

فعالیت آنتی‌اکسیدانی در درصدهای مختلف سوبسترا در روز چهاردهم تخمیر در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۶ فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کامبوجای تهیه شده با شکر و اینولین در روز چهاردهم تخمیر

همانطور که مشاهده می‌شود کامبوجای حاصل از سوبسترای اینولین خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به کامبوجای حاصل از ساکارز دارد. در کامبوجای تهیه شده با شکر در حین تخمیر اثر آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد. این حالت احتمالاً



شکل ۷ میزان گلوکز (الف) و فروکتوز (ب) در درصدهای مختلف

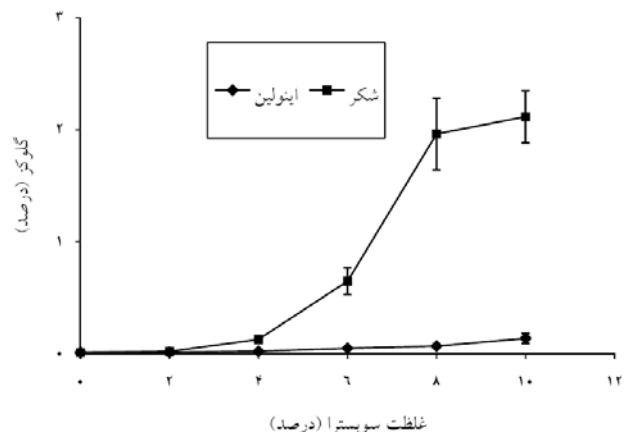
سوبسترای شکر و اینولین در روز چهاردهم تخمیر

میزان اسید لاکتیک موجود در نمونه‌ها با افزایش درصد سوبسترا در اینولین و شکر افزایش می‌یابد، اما همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، در مقادیر یکسان اینولین و شکر میزان اسید لاکتیک در کامبوجای تهیه شده با اینولین بیشتر بود. دانشمندان در سال‌های اخیر کشف کرده‌اند که اسید لاکتیک یک ماده اولیه مهم برای متابولیسم کربوهیدرات‌ها است [۲۵]. مشخص شده است افرادی با استقامت بیشتر دارای سطح بیشتری از لاکتات بوده و این ماده در حقیقت برای محافظت از ماهیچه‌ها لازم می‌باشد [۲۶]. علاوه بر تاثیر بازدارندگی اسید لاکتیک روی گونه‌های مضر باکتریایی [۲۷]، اسید لاکتیک جذب کلسیم، فسفر و آهن را در روده افزایش می‌دهد [۲۸]. بنابراین افزایش اسید لاکتیک که مرتبط با کاهش سطح گلوکز و فروکتوز است، به عنوان یک مزیت برای نوشیدنی کامبوجای تولید شده از اینولین در تغذیه‌های رژیمی می‌باشد.

در کامبوجای تهیه شده با اینولین هم نرخ تولید اسید استیک حین تخمیر و هم غلظت نهائی این اسید پائین‌تر است. چون pH پائین می‌تواند سبب رشد بهتر باکتری‌های اسید استیکی شود. تولید بیشتر اسید استیک در حضور ساکارز سبب ایجاد شرایط محیطی مناسب‌تر برای رشد این باکتری‌ها می‌شود. همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، با افزایش میزان سوبسترای شکر تا ۴ درصد، اسید استیک به شدت افزایش می‌یابد و به ۲/۳۳ درصد می‌رسد و پس از آن با افزایش درصد شکر میزان اسید استیک مرتباً کاهش می‌یابد، که احتمالاً به این دلیل است که باکتری‌های تولید کننده اسید استیک در ۴ درصد شکر بیشترین فعالیت را دارند و نیز با افزایش غلظت شکر، میزان تولید اتانول کاهش می‌یافت. اتانول پیش‌ساز تولید اسید استیک است و با اکسید شدن به اسید استیک تبدیل می‌شود.

استفاده از ستون تبادل کاتیونی اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری ترکیبات عمده در کامبوجای تهیه شده از اینولین و شکر، رشد میکروارگانیسم‌ها و تخمیر منابع قندی را به خوبی نشان می‌دهد. همچنین از روی نتایج به دست آمده با HPLC مشخص شد، بین کامبوجای تهیه شده از اینولین و شکر تفاوت عمده‌ای وجود دارد. مقادیر زیاد اینولین باقیمانده پس از تخمیر می‌تواند ویژگی‌های تغذیه‌ای کامبوجا را بهبود دهد. زیرا اینولین به عنوان یک فیبر تغذیه‌ای محلول شناخته می‌شود که انتظار می‌رود جمعیت *Bifidobacteria* مقاوم را در فلور گوارشی انسان افزایش دهد.

در پایان روز چهاردهم تخمیر ترکیبات عمده موجود در کامبوجای تهیه شده با درصدهای مختلف اینولین و شکر با روش HPLC اندازه‌گیری شدند. شکل ۷ میزان گلوکز و فروکتوز را در درصدهای مختلف سوبسترا در روز چهاردهم تخمیر نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود با افزایش درصد شکر میزان قندهای احیاء کننده گلوکز و فروکتوز افزایش می‌یابد، اما در کامبوجای تهیه شده با ۸ و ۱۰ درصد شکر میزان قندهای احیاء کننده گلوکز و فروکتوز با شدت بیشتری افزایش می‌یابد. در کامبوجای تهیه شده با اینولین نیز با افزایش درصد قند، میزان گلوکز و فروکتوز افزایش می‌یابد، اما میزان این قندها در سوبسترای اینولین خیلی کمتر است. کاهش میزان مونوساکاریدها خصوصاً گلوکز در کامبوجا می‌تواند دارای اهمیت باشد، زیرا گلوکز باعث افزایش قند خون در بیماران دیابتی می‌شود، بنابراین کامبوجایی با میزان ساکارز و گلوکز پایین می‌تواند توسط این بیماران مورد استفاده قرار گیرد.

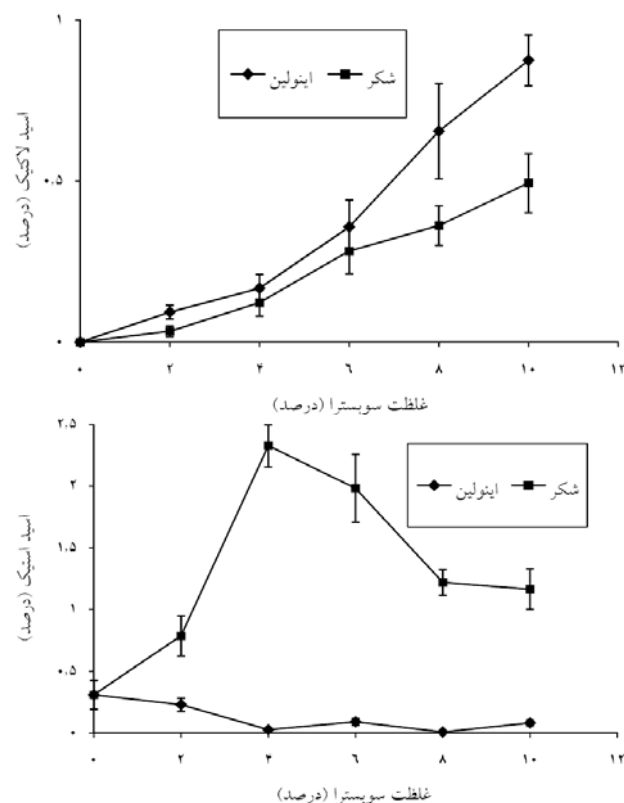


باقیمانده می‌تواند به عنوان یک ترکیب پری‌بیوتیک سبب تشدید رشد باکتری‌های مفید در دستگاه گوارش انسان شود. کامبوجای تولیدی از اینولین می‌تواند برای تغذیه‌های رژیمی مناسب بوده و توسط بیماران مبتلا به دیابت نیز مورد استفاده قرار گیرد. چون مصرف‌کنندگان به دنبال محصولات حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند، محصول کامبوجا با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر مورد استقبال مصرف‌کنندگان بیشتری قرار خواهد گرفت.

۵- منابع

- [1] Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63(7), 976-981.
- [2] Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102, 392-398.
- [3] Dufresne, C. & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International* 33: 409-421.
- [4] Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 198, 258-261.
- [5] Sreeramulu, G., Zhu, Y., & Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 48(6), 2589-2594.
- [6] Blanc, P. J. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology letters*, 18(2), 139-142.
- [7] Chen, C., & Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 834-839.
- [8] Malbasa, R., Loncar, E., Djuric, M., & Dosenovic, I. (2008). Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry*, 108, 926-932.
- [9] Loncar, E. S., Malbasa, R. V., & Kolarov, L. A. (2007). Kombucha fermentation on raw extracts of different cultivars of jerusalem artichoke. *APTEFF*, 38, 37-44.

در سوبسترای اینولین مشاهده می‌شود با افزایش میزان سوبسترا تا ۴ درصد، مقدار اسید استیک تولید شده کاهش می‌یابد، اما پس از آن روند مشخصی ندارد.



شکل ۸ میزان اسید لاکتیک (الف) و اسید استیک (ب) در درصد‌های مختلف سوبسترای شکر و اینولین در روز چهاردهم تخمیر

با استفاده از روش HPLC، در کامبوجای تهیه شده با درصد‌های مختلف اینولین، اتانول تشخیص داده نشد؛ زیرا مقدار اتانول کمتر از حد تشخیص آشکارساز HPLC بود. در کامبوجای تهیه شده با شکر نیز در ۲ و ۴ درصد شکر اتانول تشخیص داده نشد، اما در ۶، ۸ و ۱۰ درصد شکر به ترتیب ۰/۲۷، ۰/۲۶ و ۰/۱۶ درصد اتانول اندازه‌گیری گردید. یکی از علل کاهش درصد اتانول با افزایش غلظت شکر، احتمالاً ناشی از کاهش فعالیت مخمرها در نتیجه افزایش فشار اسمزی محلول می‌باشد [۲۹].

۴- نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده نشان دادند که اینولین و اولیگوفروکتوزها می‌توانند به عنوان یک سوبسترای جایگزین مناسب برای میکروارگانیسم‌های کامبوجا به کار روند. محصول به دست آمده از اینولین، دارای گلوکز و فروکتوز کمتری بوده و اینولین

- beverage. *Romanian Biotechnological Letters*, 7(5), 891-895.
- [21] Gilson, M. K. (2004). Multiple-site titration and molecular modeling: Two rapid methods for computing energies and forces for ionizable groups in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 15(3), 266 - 282.
- [22] Chu, S. C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98, 502-507.
- [23] Arcan, I., & Yemencioğlu, A. (2007). Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*, 103(2), 301-312.
- [24] Koo, H. N., Hong, S. H., Seo, H. G., Yoo, T. S., Lee, K. N., Kim, N. S., Kim, C. H., & Kim, H. M. (2003). Inulin stimulates NO synthesis via activation of PKC- α and protein tyrosine kinase, resulting in the activation of NF- κ B by IFN- γ -primed RAW 264.7 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(10), 598-605.
- [25] Hall, G. V. (2002). Lactate as a fuel for mitochondrial respiration. *Acta Physiologica Scandinavica*, 168(4), 643 - 656.
- [26] Nielsen, O. B., Paoli, F., & Overgaard, K. (2001). Protective effects of lactic acid on force production in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 536(1), 161-166.
- [27] Smulders, F. J. M., Barendsen, P., Logtestijn, J. G. V., Mossel, D. A. A., & Marel, G. M. V. D. (2007). Review: Lactic acid: considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant. *International Journal of Food Science & Technology*, 21(4), 419 - 436.
- [28] Chonan, O., Takahashi, R., Yasui, H., & M. Watanuki (1998). Effect of L-lactic acid on the absorption of calcium in gastrectomized rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 44(6), 869-875.
- [29] Najafpour, G., Younesi, H., Syahidah, K., & Ismail, K. (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 92, 251-260.
- [10] Roberfroid, M. (2005). *Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients*. CRC Press.
- [11] Kaur, N., & Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Bioscience*, 27(7), 703-714.
- [12] Kays, S. J., & Nottingham, S. F. (2008). *Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke*. CRC press. Boca Raton. 53-85
- [13] Paseephol, T., Small, D., & Sherkat, F. (2007). Process optimisation for fractionating Jerusalem artichoke fructans with ethanol using response surface methodology. *Food Chemistry*, 104, 73-80.
- [14] Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 420-428.
- [15] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2000b). Solids (Total) and Moisture in Flour. In *Official methods of analysis* (17th ed. Official Method 925.10, Chapter 32.1.03). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists.
- [16] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2000a). Ash of flour. In *Official methods of analysis* (17th ed. Official Method 923.03, Chapter 32.1.05). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists.
- [17] Tomlins, K. I., D. M. Baker, et al. (1990). HPLC Method for the Analysis of Organic Acids, Sugars, and Alcohol in Extracts of Fermenting Cocoa Beans. *Chromatographia* 29(11/12): 557-561.
- [18] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-253.
- [19] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- [20] Malbasa, R., Loncar, E., & Kolarov, L. J. A. (2002). L-lactic, L-ascorbic, total and volatile acids contents in dietetic kombucha

Kombucha production using extracted inulin from jerusalem artichoke tuber

Balvardi, M.¹, Safari, M.^{2*}, Habibi Rezaei, M.³, Hosseini, S. M. H.¹, Rezaei, K.²,
Mosavi Movahedi, S. A. A.⁴

1- Ph. D. Student, Dept. of Food Science and Engineering, Collage of Agriculture, University of Tehran

2- Associate Prof., Dept. of Food Science and Engineering, Collage of Agriculture, University of Tehran

3- Assistant Prof., Dept. of Cellular and Molecular Science, Collage of Biology, University of Tehran

4- Professor of Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran

(Received: 88/3/3 Accepted: 88/1/25)

Kombucha is a non-dairy fermented beverage. Traditional substrate for kombucha production is sweetened black tea. Kombucha culture can also use other carbohydrates such as inulin and oligofructose as a substrate. In this study inulin and oligofructose extracted from Jerusalem artichoke tuber at 0, 2, 4, 6, 8 and 10% were used as substrates for kombucha fermentation. The chemical changes during fermentation period were compared with those occurred during traditional substrate fermentation at the same concentrations. The rate of inulin fermentation by kombucha culture was higher than that of sucrose fermentation. The pH value in kombucha produced with inulin was higher than that of traditional product. Acetic acid and lactic acid measurements using HPLC showed that the acetic and lactic acid contents of traditional product was higher and lower than the kombucha produced with inulin, respectively. Soluble protein content and antioxidant activity was higher in kombucha produced with inulin as a substrate. Thus, using inulin as a substrate for kombucha culture decreases fermentation time and produces a product with high pH.

Keywords: kombucha, inulin, fermentation, lactic acid, acetic acid.

* Corresponding Author E-Mail address: msafari@ut.ac.ir