امکان سنجی تولید نوشیدنی تخمیری از عصاره چغندر قرمز توسط باکتری های اسید لاکتیک

الهام جوانمردی[1]، محسن لبافی[2*]، فرامرز خدائیان[3]، الناز صالحی[4]

١- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم وصنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
٢- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
٣- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
٤- دانشجوی کارشناسی علوم و صنایع غذایی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ٩٢/١٢/١٢ تاریخ پذیرش: ٩٣/٨/٦)

چکیده

مصرف میوه و سبزی‌ها و عصاره آن‌ها به دلیل وجود مواد مغذی از جمله ویتامین‌ها، مواد معدنی و آنتی‌اکسیدان‌ها همواره مورد توجه بوده است. وجود کربوهیدرات در آب میوه و سبزی‌ها آنها را محیط مناسبی برای رشد باکتری‌های لاکتیک اسید و تخمیر لاکتیکی می‌نماید. در این پژوهش، تولید نوشیدنی فراسودمند از عصاره چغندر قرمز و تخمیر کنترل شده آن در دمای ٣٧ درجه سانتی گراد توسط باکتری‌های لاکتیکی انجام شده و سینتیک رشد باکتری‌ها، مصرف قند و تولید اسید لاکتیک، تغییرات pH و نیز تغییر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای مواد فنلی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج بدست آمده نشان داد که از نظر سینتیک رشد، سریعترین رشد متعلق به لاکتوباسیلوس رئوتری بوده و بعد از آن لاکتوباسیلوس دلبروکی، اسیدوفیلوس، کازئی، پاراکازئی، رامنوسوس، پلانتاروم و هلوتیکوس قرار گرفته‌اند. pH تمام نمونه‌ها نیز بعد از تخمیر کاهش معناداری ($P<0/05$) نشان داد. هم‌چنین بیشترین تغییرات در مصرف قند مربوط به لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس دلبروکی بود. اسید لاکتیک تولید شده در نوشیدنی تخمیر شده توسط لاکتوباسیلوس رئوتری بالاترین غلظت را نسبت به سایر سویه‌های باکتریایی داشت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای مواد فنلی نمونه‌ها طی تخمیر با تمام سویه‌ها افزایش معناداری نشان داد و باکتری‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشترین افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی، رامنوسوس و هلوتیکوس بیشترین افزایش محتوای مواد فنلیک را نسبت به سایر سویه‌های باکتریایی ایجاد نمودند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره چغندر قرمز محیط مناسبی برای رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک و تولید نوشیدنی فراسودمند می‌باشد.

کلید واژگان: عصاره چغندر قرمز، باکتری لاکتیک اسید، نوشیدنی عملگر

*مسئول مکاتبات: mlabbafi@ut.ac.ir

۱- مقدمه

امروزه مصرف کنندگان به سلامت فردی توجه ویژه‌ای داشته و تمایل به مصرف روزانه فرآورده‌هایی دارند که به سلامت آنها کمک نموده و باعث پیشگیری از بروز برخی بیماری‌ها از جمله انواع دیابت، سرطان، فشار خون و بیماری‌های دیگر می‌گردد [۱]. با توجه به افزایش انواع بیماریها از جمله سرطان، افزایش فشار خون، افزایش کلسترول، دیابت، چاقی و غیره، باید در تغییر عادات غذایی مردم تلاش بیشتری نمود. یکی از فعالیت‌هایی که اخیراً در این زمینه صورت پذیرفته است تولید انواع محصولات غیرلبنی تخمیر شده بوسیله باکتریهای اسید لاکتیک بر پایه آب میوه و سبزی‌ها می‌باشد. این فرآورده‌ها با ترکیبات فعالی از جمله پروبیوتیک[1]، پریبیوتیک[2] و سینبیوتیک[3] غنی شده و به عنوان غذاهای فراسودمند یا عملگرا[4] معرفی می‌گردند [۲]. از جمله محصولات فراسودمند که امروزه استفاده فراوانی پیدا کرده اند محصولات پروبیوتیک می‌باشد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی زنده‌ای هستند که دارای تأثیرات سودمندی بر روی میزبان می باشند . البته این در صورتی است که به مقدار مناسب در بدن توزیع گردند وهمچنین تعادل میکروبی محیط معده و روده را نیز بهبود بخشند [۳و٤]. میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک شامل باکتری‌های اسید لاکتیک و یا سایر باکتری‌ها و مخمرهایی هستند که به صورت سلول‌های خشک و یا در محصولات تخمیری استفاده می‌شوند و از طریق مصرف خوراکی باعث بهبود خصوصیات فلور طبیعی روده شده و اثرات مفیدی را برای مصرف کنندگان به دنبال دارند. از میان پروبیوتیک‌ها، باکتری‌های اسید لاکتیک[5] و بیفیدوباکتریوم[6] این خصوصیات را دارا هستند.[۵]. تخمیر نیز بعنوان روشی برای نگهداری مواد غذایی و بهبود کیفیت یا اصلاح طعم غلات، میوه‌ها، سبزی‌ها و گوشت مورد توجه می باشد [٦] که موجب تخریب فاکتورهای نامطلوب موجود در غذاهای خام مثل فیتات‌ها، تانن‌ها و پلی‌فنل‌ها [۷] و کاهش زمان پخت و تامین انرژی می گردد[۸].

غذاهای تخمیری آن دسته از غذاهایی هستند که در تولید آن‌ها، فعالیت میکروارگانیسم‌ها و یا آنزیم‌ها دخالت دارند و موجب تغییرات بیوشیمیایی خوشایند می گردند. این میکروارگانیسم‌های اضافه شده برای تخمیر می‌توانند جزء میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی باشند، مانند گونه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک باشند[٤]. برای رسیدن به نوشیدنی تخمیری مطلوب، مهمترین مسئله انتخاب سوش میکروبی مناسب است. از عوامل مهم و مؤثر در انتخاب سوش‌ها میزان تغییرات pH، افت ترکیبات تغذیه ای مهم، کاهش غلظت نیترات، تولید آمین‌های بیوژنیک، قابلیت پذیرش سوبسترا در پذیرش استارتر و نوع متابولیسم است. انتخاب نوع سوش‌ها بر اساس میزان رقابت استارترهای اضافه شده و فلور طبیعی نمونه، نرخ رشد و تولید اسید، ویژگی‌های حسی و توانایی‌های کشت پروبیوتیک صورت می‌گیرد [۹]. باکتری‌های اسید لاکتیک از زمانهای قدیم در محصولات لبنی تخمیر شده بکار رفته‌اند و هیچگونه خصوصیات بیماریزایی برای لاکتوباسیل‌ها گزارش نشده است[۱۰]. سوبستراهای غیرلبنی که اغلب برای تخمیر باکتری‌های لاکتیکی استفاده شده‌اند شامل پروتئین سویا و غلات هستند. در سال‌های اخیر مطالعات متعددی نیز در استفاده از آب میوه و سبزی‌ها بعنوان محیط پایه برای تخمیرلاکتیکی انجام شده که با توجه به پتانسیل بیولوژیکی وتغذیه‌ای عصاره سبزی و میوه‌ها و اینکه اغلب آب میوه و سبزی‌ها فاقد ترکیبات آلرژی‌زا می‌باشند، به نظر می‌رسد که استفاده از عصاره آنها بسیار مفید و سودمند بوده و این محصولات توسط بخش وسیعی از مردم مورد استفاده قرار گیرند. در حال حاضر بعضی نوشیدنی‌های پروبیوتیک غیر لبنی، تجاری شده و مصرف آن در جهان رو به افزایش می‌باشد. تنوع زیاد میوه‌ها و سبزی‌ها و تعداد زیاد سوش‌های لاکتوباسیلوس، فرصت زیادی را برای توسعه نوشیدنی‌های تخمیری غیر لبنی با ارزش افزوده فراهم می‌کند. با توجه به ارزش تغذیه‌ای چغندر قرمز، فراوانی و قیمت مناسب آن در کشور و جایگاه ویژه آن نزد مردم، فرآوری عصاره این سبزی بصورت یک نوشیدنی تخمیری، در افزایش ارزش تغذیه‌ای، کاهش ضایعات و افزایش ارزش افزوده آن بسیار مؤثر است. هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان تولید نوشیدنی تخمیری بر پایه عصاره چغندر قرمز جهت تولید محصولی نوین و تخمیری در صنعت غذا و افزایش ارزش تغذیه‌ای آن

1. Probiotics
2. Prebiotics
3. Synbiotics
4. Functional Food
5. Lactic acid bacteria
6. *Bifidobacterium*

می‌باشد. در واقع تولید این قبیل محصولات سودمند، افزایش رضایت مشتریان، کاهش بیماری و توسعه بهداشت جامعه را به دنبال خواهد داشت. البته افزایش سطح آگاهی جامعه نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

۲- مواد و روش های آزمایش

۲-۱- فعال سازی باکتری ها

ابتدا زیر هود میکروبی استریل لامینار از ویال محتوی میکروارگانیسم ها سه مرتبه از ویال۰ به ^{CC} ۱۰ محیط MRS broth استریل شده موجود در لوله آزمایش تلقیح کرده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت قرار گرفت . در مرحله بعد میکروارگانیسم‌ها از محیط مایع MRS broth به محیط جامد MRS Agar منتقل گردید و کشت خطی داده شد . اطراف پلیت ها پارافین کشیده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ -٤٨ ساعت قرار گرفت . بعد از این مدت باکتری‌های خامه‌ای رنگ رشد یافته بر روی محیط جامد، باکتری‌های فعال شده می‌باشند که در مراحل بعدی پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند .

۲-۲- تهیه و پاستوریزاسیون عصاره چغندر قرمز

نمونه های آزمایشی خریداری شده از نظر واریته و فصل کشت دارای شرایط یکسان بودند و در در دما و رطوبت یخچال (حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد رطوبت و دمای صفر تا چهار درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. نمونه برداری برای هر آزمایش به طور تصادفی انجام گرفت. برای تهیه عصاره، چغندرها را شسته و پوست و قسمت‌های زائد آن را جدا کرده، قطعه قطعه نموده و با آبمیوه‌گیری خانگی (Moulinex)، عصاره آن خارج شد و سپس توسط صافی پارچه‌ای صاف گردید. جهت پاستوریزاسیون نمونه‌ها، آن‌ها را در ارلن‌های ۱۰۰ سی سی ریخته و پنبه گذاری گردید. در یکی از ارلن‌ها یک دماسنج قرار داده و طوری تنظیم گردید که بتوان دمای یک چهارم پایینی ظرف را به عنوان نقطه سرد قرائت کرد. زمانی که این دما به ۸۰ درجه سانتی گراد رسید، ۱۰ دقیقه زمان گرفته شد تا ریز زنده‌های احتمالی آن از بین برود.

۲-۳- انتقال باکتری های فعال به نمونه

سه تا چهار لوپ پر از میکروارگانیسم‌های رشد یافته به ۱۰۰ سی سی نمونه بعنوان Preculture منتقل شد و به مدت ١٦-١٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. پس از این مدت به میزان ۱۰٪ حجمی- حجمی از Preculture توسط به ۱۰۰ سی سی نمونه جدید بعنوان Main Culture تلقیح گردید. محیط کشت اصلی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٣٦ ساعت قرار داده شد. برای انجام آزمایشات نمونه برداری در شرایط استریل زیر هود در فواصل زمانی مختلف طی ٣٦ ساعت انجام گرفت.

۲-٤- شمارش باکتری های لاکتیکی

جهت شمارش باکتری‌ها در نمونه از روش رقت سازی دهگانی و پورپلیت استفاده شد. ابتدا محلول سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ توسط کلرید سدیم خالص تهیه شد. سپس در لوله‌های آزمایش به میزان نه سی سی تقسیم و استریل گردید. پس از استریل و خنک شدن لوله‌ها CC ۱ از نمونه حاوی ریززنده محیط کشت اصلی به اولین لوله جهت دستیابی به رقت 10^{-1} اضافه شد. این کار تا حاصل شدن رقت 10^{-8} تکرار گردید. سپس تحت شرایط استریل ، توسط نمونه بردار ، ۱۰۰۰ میکرولیتر از رقت مورد نظر به داخل پلیت استریل منتقل شد و به میزان کافی محیط MRS جامد استریل به آن اضافه گردید. پس از بسته شدن محیط کشت‌ها، اطراف پلیت‌ها با پارافیلم پوشانده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤٨-٢٤ ساعت گرمخانه گذاری گردید. تعداد کلنی‌های تشکیل یافته در هر میلی لیتر نمونه توسط فرمول زیر محاسبه گردید :

تعداد کلنی در هر میلی لیتر(CFU/ml) = تعداد کلنی × عکس فاکتور رقت

۲-۵- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها از رادیکال آزاد DPPH طبق روش کام و همکاران (۲۰۰۹) با کمی تغییرات استفاده شده است. ابتدا نمونه‌ها به نسبت‌های مختلف با آب مقطر رقیق شدند. ۳ رقت در محدوده ۱-۰/۱ وزنی ـ حجمی از نمونه‌ها تهیه شد. سپس محلول متانولی DPPH با غلظت ۰/۰٦mM تهیه گردید. پودر DPPH به دقت برای رسیدن به غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر توزین شد و در بالن حجمی مناسب ریخته شد. پس با متانول به حجم رسید و به خوبی

مخلوط شد. صد میکرولیتر از غلظت‌های مختلف هر کدام از نمونه‌ها درون لوله آزمایش ریخته شد و ۳/۹ سی سی از محلول DPPH به آنها اضافه شد و به خوبی ورتکس شد و جهت رسیدن به جذب پایدار به مدت ۲ ساعت در تاریکی قرار گرفت. سپس جذب در nm ۵۱۵ خوانده شد. بعد از خواندن جذب نمونه‌ها و محاسبه غلظت آنها از روی معادله و منحنی استاندارد، درصد DPPH باقیمانده محاسبه گردید. پس از محاسبه DPPH % باقیمانده نمونه‌ها، نمودار آن با غلظت نمونه‌ها رسم شد. پس از تعیین بخش خطی نمودار حاصل، EC ۵۰ نمونه‌ها یعنی غلظتی از نمونه که کاهش ۵۰ % از غلظت اولیه DPPH را تامین می‌کند، بدست آمد.

۲-۶- اندازه گیری pH

ابتدا دستگاه pH متر توسط بافرهای ٤ و ۷ کالیبره شد و الکترود آن درون نمونه‌های تخمیری و غیر تخمیری قرار گرفت. پس از ثابت شدن عدد نشان داده شده بر روی صفحه نمایش دستگاه، pH یادداشت گردید.

۲-۷- اندازه گیری قند با استفاده از گاز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

به منظور شناسایی و تعیین کمی قندهای گلوکز، فروکتوز و ساکارز ، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[7]، استفاده گردید. جداسازی با ستون(Eurokat (300 × 8 mm و در دمای ۳۰°C انجام شد. جداسازی طبق روش میگل و همکاران با اندکی تغییر صورت گرفت . جهت تعیین کمی قندها , منحنی‌های استاندارد این ۳ قند در غلظت‌های ۰/۰۵٪ تا ۱٪ تهیه گردید. هر غلظت دارای سطح زیر پیک مشخصی است. در انتها، با مقایسه سطح زیر پیک بدست آمده برای هر قند با منحنی استاندارد آن، مقدار کمی ان قند بدست آمد.

۲-۸- اندازه گیری اسید لاکتیک با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

به منظور شناسایی و تعیین کمی اسیدهای آلی از دستگاه Knauer HPLC استفاده شد. ستون (۳mm ×۲۵۰)، در دمای ۳۰°C مورد استفاده قرار گرفت . به منظور شناسایی اسید لاکتیک موجود بسته به نوع اسید، محلول ۰/۱٪ وزنی –حجمی یا حجمی–حجمی از اسیدلاکتیک تهیه و به دستگاه تزریق شد. نمونه‌های تخمیری عصاره چغندر قرمز تخمیری تا ۵ برابر بوسیله آب مقطر رقیق و پس از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتر به وسیله سرنگ مخصوص دستگاه به آن تزریق شدند. با مقایسه سطح زیر پیک نمونه‌ها با منحنی استاندارد میزان کمی اسیدهای آلی تعیین شد.

۲-۹- تعیین ترکیبات فنولیک کل

میزان ترکیبات فنولیک کل بر اساس روش فولین-سیوکالتو[8]اندازه گیری شد. به این ترتیب که ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از نمونه رقیق شده را در داخل لوله آزمایش ریخته، سپس مقدار ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین ۱۰٪ به آن افزوده، به مدت ۳ دقیقه به آن استراحت داده و سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ به آن افزوده و پس از یک ساعت، جذب آن در طول موج ۷٦۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید [۱۱و۱۲].

۳- نتایج و بحث

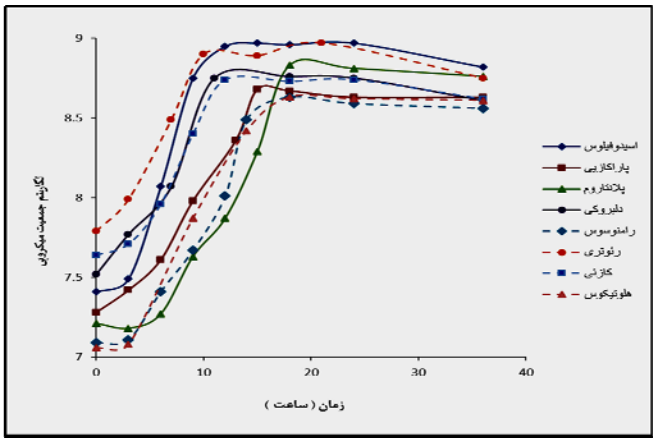
۳-۱- نتایج بررسی سینتیک رشد باکتری ها

سینتیک رشد باکتری های مورد بحث در مدت ۳٦ ساعت و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بررسی شد . نتایج این بررسی در نمودار ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده تعداد باکتری رئوتری پس از ۱۰ ساعت تخمیر $۷/۹۵\times۱۰^{۷}$ CFU/ml، دلبروکی پس از ۱۱ ساعت تخمیر $۵/٦۲\times۱۰^{۷}$ CFU/ml، کازئی و اسیدوفیلوس پس از ۱۲ ساعت به ترتیب $۵/٤۹\times۱۰^{۷}$ CFU/ml و ۸/۹، پاراکازئی پس از ۱۳ ساعت $۲/۲۹\times۱۰^{۷}$ CFU/ml، رامنوسوس پس از ۱٤ ساعت $۳/۰۹\times۱۰^{۷}$ CFU/ml و پلانتاروم و هلوتیکوس پس از ۱۸ ساعت به ترتیب به $٦/۷٦\times۱۰^{۷}$ CFU/ml و $٤/۲۷\times۱۰^{۷}$ CFU/ml رسید. که از بین این باکتری‌ها سرعت رشد لاکتوباسیلوس رئوتری نسبت به گونه‌های دیگر بالاتر بوده و در زمان کوتاهتری به اوج تعداد خود رسید. پس از آن به ترتیب دلبروکی، کازئی، اسیدوفیلوس، پاراکازئی، رامنوسوس و پلانتاروم در زمان کوتاه‌تری به حداکثر میزان خود رسیدند. و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس آهسته ترین رشد را در بین باکتری‌ها به خود اختصاص داد. این تفاوت‌ها در رشد می‌تواند به دلیل تفاوت در خصوصیات فیزیولوژیکی باکتری‌ها و نیز

7. High Liquid Gas Chromatography

8. Folin-Ciocalteu

محیط رشد آنها که در این مطالعه عصاره چغندر قرمز است، باشد.



نمودار ١ سینتیک رشد باکتری‌ها

٣-٢- نتایج بررسی سینتیک کاهش PH

با توجه به فعالیت باکتری‌ها در طول فرآیند تخمیر لاکتیکی کربوهیدرات‌ها مصرف شده و اسیدلاکتیک تولید می‌شود که این مسئله منجر به کاهش pH می گردد. pH نمونه‌ها قبل از تخمیر حدوداً برابر ٦ بود که پس از ٢٤ ساعت تخمیر توسط باکتری‌های اسید لاکتیک این مقدار تا نزدیک ٣/٥ کاهش یافت.این کاهش سریع و شدیدpH ناشی از تولید اسیدهای آلی در دوره رشد لگاریتمی باکتری‌های لاکتیکی است که منجر به فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌ها [١٣] و بهبود خواص ارگانولپتیکی غذاهای تخمیری و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های ناخواسته می‌شود [١٤]. همانطور که در نمودار٢ مشاهده می‌شود پاراکازئی با کاهش pH نمونه به ٣/٤٥ بیشترین کاهش pH را داشت. مقدار pH نهایی محصول با تخمیر توسط بقیه باکتری‌ها بصورت زیر است. لاکتوباسیلوس دلبروکی ٣/٥٣، لاکتوباسیلوس رئوتری و رامنوسوس ٣/٥٥، هلوتیکوس ٣/٥٦، پلانتاروم و اسیدوفیلوس ٣/٦. لاکتوباسیلوس کازئی با pH ٣/٦٧ کمترین کاهش pH را در بین سوش‌ها به خود اختصاص داد. باکتری‌های لاکتیک اسید با تولید اسید محیط را برای رشد باکتری‌های بیماری زا و فاسد کننده نامناسب می سازند. تولید باکتریوسین توسط این باکتری‌ها افزایش ماندگاری و زمان نگهداری این محصول را به دنبال دارد [١٥و١٦].

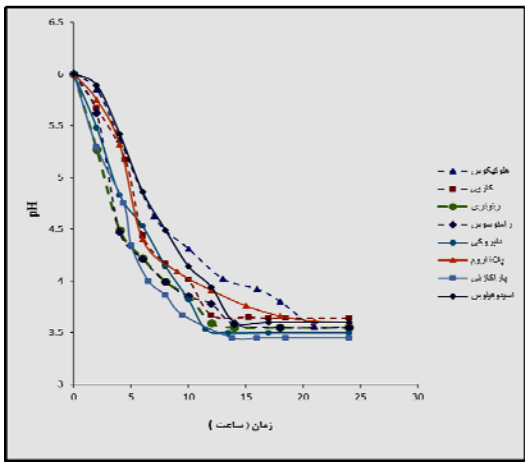
٣-٣- نتایج بررسی مصرف قند

میزان قند ساکارز، گلوکز و فروکتوز قبل و بعد از تخمیر توسط هشت سوش مورد استفاده برسی گردید. تمام سوش‌ها، کل گلوکز و فروکتوز موجود را مصرف کردند ولی مصرف ساکارز در سوش‌های مختلف، متفاوت بود. میزان ساکارز در نمونه تخمیر نشده (g/l) ٣٣/٧٥ می‌باشد. کازئی و دلبروکی بیشترین مصرف قند را داشتند و ساکارز موجود در نمونه را بترتیب به (g/l) ٣١/١٨ و (g/l) ٣١/٢٥ کاهش دادند. پس از آن بیشترین مصرف قند به ترتیب مربوط به رامنوسوس، پاراکازئی، اسیدوفیلوس، هلوتیکوس، رئوتری و پلانتاروم بودند. رشد بهتر سلول‌های باکتریایی ممکن است به دلیل استفاده بهتر از محیط، استفاده بیشتر از قندهای احیاکننده و تولید بیشتر اسید باشد. این مسئله می تواند باعث کاهش بیشتر pH و باقی ماندن کمتر قندهای احیاکننده شود [١٧]. از طرفی در پژوهش‌های بسیاری از محققین، قند گلوکز به عنوان اصلی ترین منبع کربوهیدراتی برای لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک معرفی گردیده است. [٢و١٨و١٩و٢٠].

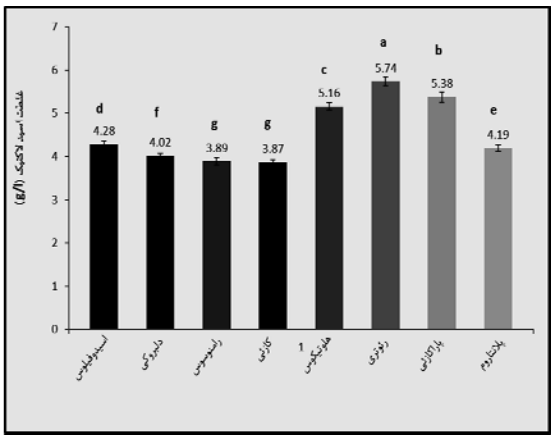
٣-٤- نتایج بررسی تولید اسیدلاکتیک توسط باکتری های مورد آزمایش

طبق تعریف باکتری‌های اسید لاکتیک باکتری‌هایی هستند که می‌توانند از منبع قند مثلا گلوکز طی فرایند تخمیر تولید اسید لاکتیک کنند [٢١]. اثرات آنتی میکروبی اسیدهای آلی از جمله اسید لاکتیک، اسید استیک و اسید پروپیونیک اسید تولید شده طی فرایند تخمیر لاکتیکی به خوبی شناخته شده است [٢٢]. نمودار ٣ میزان تولید اسید لاکتیک را توسط هشت باکتری پس از تخمیر در دمای ٣٧ درجه سانتی گراد نشان می دهد. بیشترین میزان اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس رئوتری (٥/٧٤) و پس از آن، پاراکازئی(٥/٣٨)، هلوتیکوس(٥/١٦)، اسیدوفیلوس(٤/٢٨)، پلانتاروم(٤/١٩) و دلبروکی(٤/٠٢) تولید شده بود. رامنوسوس و کازئی کمترین میزان تولید اسید لاکتیک را با تولید (g/l) ٣/٨٧ و (g/l) ٣/٨٩ را داشتند. مطالعات متعددی که بر روی مواد مغذی لازم برای تولید اسید لاکتیک صورت گرفته است، ثابت کرده اند که با افزودن اجزای نیتروژنی و مواد معدنی میزان تولید اسید لاکتیک بیشتر می شود [١٩و ٢٣ و٢٤ و٢٥]. از همین رو میزان قابل توجه اسید

تولیدی در نمونه‌های تخمیر شده می‌تواند به دلیل غنی بودن محیط رشد باکتری‌ها از ترکیبات نیتروژنی باشد.



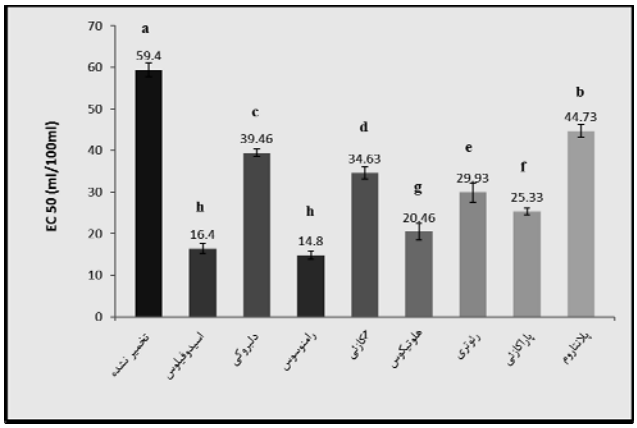
نمودار۲ سینتیک کاهش pH



نمودار۳ تولید اسید لاکتیک توسط باکتری‌های اسید لاکتیکی

۳-۵- نتایج آزمایش بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

همانطور که پیشتر ذکر شد، روش تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی با استفاده روش رادیکال DPPH انجام گرفت و نتایج به صورت EC۵۰ بیان شد. این فاکتور معادل غلظتی از نمونه است که قادر به بازداری ۵۰٪ فعالیت رادیکال DPPH باشد. آنالیز آماری داده‌های حاصل نشان می‌دهد فرایند تخمیر با هر هشت گونه، افزایش معناداری در فعالیت آنتی اکسیدانی و کاهش در EC۵۰ نمونه‌ها داشته است. آنالیز آماری داده‌ها در نمودار ٤ نشان داده شده است. افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه تخمیر شده با لاکتوباسیلوس رامنوسوس و اسیدوفیلوس به صورت معناداری ($p<۰/۰۵$) بالاتر از سایر گونه‌ها بوده، بطوریکه EC۵۰ نمونه تخمیر نشده را از ۵۹/٤ به ترتیب به ۱٤/۸ و ۱٦/٤ کاهش دادند و این بدین معناست که خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه پس از تخمیر با این دو باکتری حدود چهار برابر شده است. پس از آنها هلوتیکوس، پاراکازئی، رئوتری،کازئی، دلبروکی و پلانتاروم هر کدام به ترتیب EC۵۰ را به ۲۰/٤٦، ۲۵/۳۳، ۲۹/۹۳، ۳٤/٦۳، ۳۹/٤٦ و ٤٤/۷۳ کاهش دادند. پلانتاروم کمترین اثر را بر افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه گذاشته بود. نوع سوش میکروبی فعال در انجام عمل تخمیر و مدت زمان فرایند تخمیر اثر قابل توجهی بر تغییر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد [۲٦] و سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم می‌تواند به عنوان یک آغازگر در تخمیر غذاها و نیز یک پروبیوتیک به کار روند زیرا در محیط اسیدی به خوبی رشد می‌کند [۲۷].

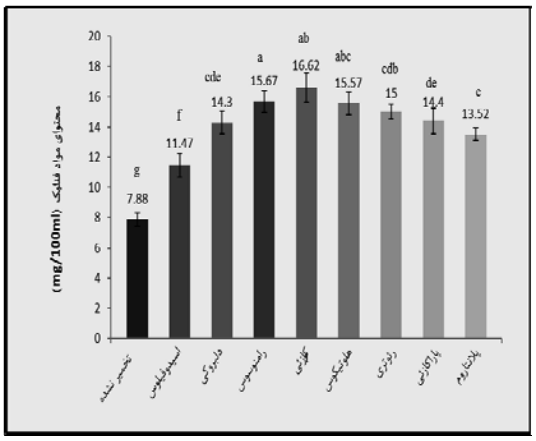


نمودار٤ EC۵۰ توسط باکتری‌های اسید لاکتیکی

۳-٦- نتایج آزمایش اندازه گیری محتوای مود فنولیک

همان طور که ذکر شد ترکیبات فنولیک کل به روش فولین – سیو کالتو اندازه گیری شدند. همانطور که در نمودار۵ مشاهده می‌شود، پس از تخمیر در تمام سوش‌ها میزان فنل افزایش معنی‌داری داشتند. تخمیر توسط لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس توانست بیشترین تاثیر را بر فنل کل نمونه تخمیر نشده گذاشته و میزان فنل کل را از (mg/100ml) ۷/۸۸ به ترتیب به ۱٦/٦۲، ۱۵/٦۷ و ۱۵/۵۷ (mg/100ml) افزایش دهد. پس از آن میزان فنل سوش‌های لاکتوباسیلوس رئوتری، پاراکازئی، دلبروکی، پلانتاروم و اسیدوفیلوس به ترتیب ۱۵، ۱٤/٤، ۱٤/۳، ۱۳/۵۲ و ۱۱/٤۷ (mg/100ml) بود. به طور کلی تخمیر منجر به هیدرولیز ترکیبات فنولی گلیکوزیل و ایجاد ترکیبات فنولی

آزاد می‌شود. تولید آنزیم‌هایی نظیر بتاگلوکوزیداز توسط باکتری‌های تخمیری، در ایجاد چنین تغییرات پیچیده‌ای نقش دارد [٢].



نمودار٥ محتوای مواد فنلیک

٤- نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که باکتری لاکتوباسیلوس رئوتری نسبت به گونه‌های دیگر رشد سریع‌تری داشته و پس از آن به ترتیب لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در زمان کوتاه‌تری به حداکثر میزان خود رسیدند. لاکتوباسیلوس هلوتیکوس آهسته ترین رشد را در بین باکتری‌ها به خود اختصاص داد. از نظر سایر فاکتورهای مورد بررسی، باکتری‌ها عملکردهای متفاوتی از خود نشان دادند. تمامی سوش‌های باکتریایی در جریان تخمیر pH محیط را از pH اولیه ٦ به میزان کمتر از ٣/٥ طی ٢٤ ساعت تخمیر رساندند. بالاترین درصد قند موجود در محیط متعلق به ساکارز بود که سوش‌های مختلف بطور متفاوت از آن استفاده کرده بودند. پس از ساکارز، به ترتیب گلوکز و سپس فروکتوز در نمونه تخمیر نشده وجود داشت که هر هشت سوش تمام گلوکز و فروکتوز موجود را مصرف کرده بودند. در میان باکتری‌های لاکتیکی، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس دلبروکی تمایل بیشتری به مصرف ساکارز از خود نشان دادند. لاکتوباسیلوس پلانتاروم کمترین میزان مصرف قند را از خود نشان داد. بالاترین میزان تولید لاکتیک اسید متعلق به لاکتوباسیلوس رئوتری بود که میزان آن ٥/٧٤ گرم در لیتر بود و کمترین میزان تولید اسید متعلق به لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس رامنوسوس بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها طی تخمیر به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. این افزایش به صورت کاهش در میزان EC٥٠ نمونه‌ها گزارش شده است. کمترین EC٥٠ در لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مشاهده شد و پس از آن لاکتوباسیلوس هلوتیکوس، لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس رئوتری، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس دلبروکی قرار داشتند و لاکتوباسیلوس پلانتاروم کمترین افزایش را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نشان داد. لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس توانستد بیشترین تاثیر را بر افزایش فنل کل داشته باشند. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس کمتر از سایر سوش‌ها فنل کل را افزایش داد. بنابراین می توان از ترکیب عصاره چغندر قرمز با سایر آب سبزی و میوه‌ها به منظور تولید نوشیدنی تخمیری ترکیبی، کفیر و سایر باکتری‌های پروبیوتیک به جای باکتری‌های اسید لاکتیکی برای تخمیر عصاره چغندر قرمز و همچنین جایگزینی عصاره چغندر قرمز به جای رنگ‌های قرمز مصنوعی در محصولات صنعتی، به خصوص در نوشیدنی‌ها استفاده نمود.

٥- منابع

[1] Jian, L., A. H. Lee. and C. W. Binnes. 2007. Tea and lycopene protect against prostate cancer. Asia pac, 16: 1-7

[2] Ebrahimzadeh, Z. 1388. Production of functional pomegranate juice. Msc. Thesis, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran

[3] FAO/WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nation and Word Health Organization Expert Consultation Report

[4] Espinoza, Y. R. and Y. G. Navarro. 2010. Non-dairy probiotic products. Journal of Food Microbiology, 27: 1-11

[5] Philip, T. and T. S. Chen. 1988. Development of a method for the quantitative estimation of provitamin A carotemoids in some fruits. Journal of Food Science, 53(6): 1703-1706.

[6] Luckow, T. and C. Delahunty. 2004. Which juice is `healthier`? A consumer study

of probiotic non-dairy juice drinks. Food Quality and Preference, 15: 751-759.
[7] Cadago, T. H., A. N. Mutukumira., J. A. Narvhus. and S. B. Feresu. 1999. A review of traditional fermented food and beverages of Zimbabwe, 53: 1-11.
[8] Liu.S.-Q, 2003, Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. International Journal of Food Microbiology, 83, 115– 131
[9] Karovicova, J. and Z. Kohajdova. 2003. Lactic acid- fermented vegetable juices-palatable and wholesome foods Chemical papers, 59(2): 143-148
[10] Hugenholtz J. 2008. The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production, International Dairy Journal, 18: 466–475
[11] Anttonen, M. J. and R.O. Karjalainen. 2005. Enviromental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. Journal of Food Composition and Analysis, 18: 759-769.
[12] Butkhup, L. and S. Samappito. 2008. Analysis of anthocyanin, Flavonoids and phenolic acids in Tropical Bignay Berries. Journal of Fruit Science, 8:1-2, 15-34.
[13] 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.
[14] Caplic, E. and fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International journal of Food Micribiology, 50, 131-149
[15] Pereira, A. L. F., T. C. Maciel. and S. Rodrigues. 2011. Probitic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. Journal of Food Research International, 44: 1276-1283.
[16] Amrane, A. 2005. Analysis of the kinetics of growth and lactic acid production for *Lactobacillus helveticus* growing on supplemented whey permeate. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 8: 345–352
[17] Doelle, W. 1982. The existence of two separate constitutive enzymes for glucose and fructose in *Zymomonas mobilis*. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 15(1) 20-24
[18] Helland H. Merete, Trude Wicklund, Judith A. Narvhus, 2004, Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley, International Journal of Food Microbiology 91 , 305– 313
[19] Kun, S., J. M. Rezessy-Szabo., Q. D. Nguyen. and A. Hoschke. 2008. Chenges of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected Bifidobacterium strains. Journal of Process Biochemistry, 43: 816-821
[20] Jahandideh, F., S. M. Mousavi. and S. H. Razavi. 2011. Utilization of Echium amoenum extract as a growth medium for the production of organic acids by selected Lactic acid bacteria. Journal of Food Bioprocess Technol, doi: 10.1007/s11947-011-0564-0.
[21] Liu.S.-Q, 2003, Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. International Journal of Food Microbiology, 83, 115– 131
[22] Davidson, R. H., S. E. Duncan., C. R. Hachney., W. N. Eigel. and J. W. Boling. 1997. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. Journal of Dairy Science, 83: 666-673.
[23] Oh, H., Wee, Y.J., Yun, J.S., Han, S.H., Jung, S.W., Ryu, H.W., 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. Bioresource Technology, 96, 1492–1498
[24] Nancib, N., A. Nancib., A. Boudjelab., C. Benslimane., F. Blanchard. and J. Boudrant. 2005. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp.ehamnosus. Bioresource Technology, 78(1): 149-153
[25] Kao, Y., Y. Liu. and Y. Shyu. 2006. Identification of Lactobacillus spp. in probiotic products by real time PCR and melting curve analysis. Food Research International, 40: 71-79
[26] 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.
[27] Kuda Takashi, Kaneko Natsuki, Toshihiro Yano, Mayumi Mori. 2010, Induction of superoxide anion radical scavenging capacity in Japanese white radish juice and milk by *Lactobacillus plantarum* isolated from aji-narezushi and kaburazushi, Food Chemistry, 120, 517–522.

Feasibility study of Production of red beet juice by fermentation Lactic acid bacteria

Javanmardi, E. [1], Labbafi, M. [2*], Khodaiyyan, F. [3], Salehi, E. [4]

1. MSc. Student, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran.
2. Faculty member, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran.
3. Faculty member, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran.
4. BSc. Student, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran.

(Received: 92/12/12 Accepted: 93/8/6)

Fruits, vegetable and juices are always interested due to their nutritional contents such as vitamins, minerals and antioxidants. They also seemed to be a suitable media culture for lactic acid bacteria growth and lactic fermentation. In this research, production of a functional beverage red beet juice and fermenting in 37ºC by lactic acid bacteria was carried out. Bacterial growth kinetics, sugar consumption, Acid production and changes in antioxidant activity have been investigated. *Lactobacillus reuterii* were found to grow faster and produced higher amount of viable cells during fermentation followed by *L. delbruckii*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus, L. plantarum* and *L. helveticus*. Reducing sugars including sucrose, fructose and glucose were consumed by *L. casei* and *L. delbruckii* were more intended to use lactose. Lactic acid was the predominant produced lactic acid which was manufactured by *L. reuterii*. Antioxidant activity and total polyphenolic compounds increased significantly fermentation and maximum reduction in EC50 has been observed in fermentation by *L. rhamnosus* and, *L. acidophilus* in anti-oxidant activity and *L. casei*,*L. rhamnosus and L. helveticus* in total polyphenolic compounds. Finally, *L. casei* was found to growing well in this beverage, resulted in producing functional fermented beverage.

Key words: Red beet juice, Functional beverage, Lactic acid bacteria.

* Corresponding Author E-Mail Address: mlabbafi@ ut.ac.ir