ارزیابی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در مارمالاد پالپ لیمو تخمیری

مریم شیرپور [١]، مهناز هاشمی روان [٢*]، رضوان پوراحمد [٣]

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

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

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

(تاریخ دریافت: ٩٤/١٠/٠٥ تاریخ پذیرش: ٩٥/٠٥/١٩)

چکیده

در این تحقیق برای تولید مارمالاد پالپ لیمو تخمیری پروبیوتیک مارمالاد پالپ لیمو با استفاده از ٥٠ ٪ از پالپ لیمو و ٥٠٪ شکر تهیه گردید. ژلاتین، پودر آب‌پنیر و شیر خشک با مقادیر٢ گرم، ٥ گرم و١٠ گرم سبب افزودن پروتئین وتقویت رشد پروبیوتیک‌ها و زنده‌مانی آن‌ها گردید.در این پژوهش برای تولید مارمالاد پالپ لیمو تخمیری پروبیوتیک باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* با تراکم باکتری*cfu/ml* (10^{10}،10^{9}،10^{8}،10^{7}) تلقیح شد و فرآیند تخمیر به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٣٧°C انجام گردیدو طی مدت ٢٨ 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 به‌صورت ٢ فاکتوریل تراکم باکتری٤ سطح*cfu/ml* (10^{10}،10^{9}،10^{8}،10^{7}) و فاکتور زمان نگهداری در ٥ سطح (٢٨ روز) به همراه شاهد، با ٣ تکرار انجام گردید. پس از تخمیر میزانpH 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 مارمالاد زنده ماندند، تیمار برترT_3با 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 مارمالاد تخمیری پالپ لیمو پروبیوتیک محیط مناسبی برای رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک و تولید مارمالاد فراسودمند می‌باشد.

کلید واژگان: پالپ لیمو ، مارمالاد پروبیوتیک ،*لاکتوباسیلوس کازئی*

* مسئول مکاتبات: m_hashemiravan @yahoo.com

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 ازجمله آن‌ها می‌توان به تحقیق سلاجقه 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 ارگانولپتیکی است، بیشترین مقدار ویتامین C و پکتین را دارا بود. با گذشت زمان مقدار این ویتامین کاهش یافت . میزان اسیدیته در طی نگهداری تغییر معنی داری نشان نداد. اما pH در ماه اول نگهداری نسبت به دو ماه بعد کمتر بود. مقدار پکتینات کلسیم در طی سه ماه نگهداری ثابت ماند[۲].

اگبکن وهمکاران (۱۹۹۸) به بررسی استفاده از میوه کدو شیاردار پرداختند. و به این نتیجه رسیدن پالپ غنی از سدیم ، K، آهن، فسفر،منگنز و پکتین ۱/۰۱ ٪ ، اما پروتئین کم ۰/۸٦٪ است. مارمالاد حالت ژلی و اسیدی بود [۳].

فوگل وهمکاران در سال (۲۰۰۵) به بررسی کیفیت و کنترل صحت پوره میوه ، آماده سازی میوه‌ها و مربا برای جلوگیری از تقلب در مربا و مارمالاد پرداختند[٤].

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

رانداززو و همکاران (۲۰۱۳) مطالعه بقا از پروبیوتیک‌ها *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* در مرباهای هلو در طی نگهداری در دماهای مختلف پرداختند. پارامترهای رنگ محصول محیط کشت پروبیوتیک اضافه شده به مربا تغییر قابل توجهی نداشت، با این حال متابولیسم لاکتوباسیلوس موجب تغییر در pH و ترکیب قند شد[٦].

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 محرک رشد بر قابلیت زیستی و سرعت تخمیر پروبیوتیک‌ها می‌توان به افزودن پروتئین‌های شیر که شامل محلول‌های هیدرولیز شده پروتئین شیر، هیدرولیز شده کازئین و مشتقات پروتئین آب پنیر به فرآورده تخمیری پروبیوتیک اشاره کرد [۹]. ژلاتین، هیدروکلوئیدی از جنس پروتئین است که به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد در ایجاد ژل، قوام دهندگی، پایدار کنندگی، امولسیفایری، تشکیل کف و فیلم در صنایع غذایی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد[۱۰]. پایین بودن قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک به دلیل حساسیت به شرایط نامساعد در محصولات غذایی و دستگاه گوارش یکی از مهم‌ترین مشکلات موجود در صنعت تولید فرآورده‌های پروبیوتیک می‌باشد. باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش *لاکتوباسیلوس کازئی* می‌باشد. این باکتری‌های اسیدلاکتیک از زمان‌های قدیم در محصولات لبنی تخمیر شده به کار رفته‌اند [۱۱]. این باکتری یکی دیگر از مهم‌ترین گونه‌های پروبیوتیکی 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 صفراوی دارد. *لاکتوباسیلوس 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 پروبیوتیک با استفاده ازپودر آب‌پنیر، پودر شیرخشک و ژلاتین نسبت تلقیح و تراکم باکتری‌های پروبیوتیک و بررسی میزان قندهای احیا کننده ، pH ، اسیدیته و زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* پس از تخمیر و درطی ۲۸ روز نگهداری در دمای٤°C می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده در مارمالاد پالپ لیمو تخمیری پروبیوتیک 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 *لاکتوباسیلوس کازئی* ۱٦۰۸ سازمان پژوهش‌های صنعتی ایران در این مارمالاد استفاده گردیده است.

۲-۲-روش‌ها

۲-۲-۱-پاستوریزاسیون

برای پاستوریزاسیون مارمالاد قبل از تلقیح از بن ماری با دمای ۸۰°C و مدت زمان ۲۰ دقیقه استفاده شد[۱۳] برای کامل شدن فرآیند پاستوریزاسیون ارلن‌ها به‌سرعت تا دمای ۳۷°Cخنک شدند [١٤].

Table 1 Study treatments Lemon Pulp Marmalade

marmalade	bacterial concentrations
T_1	10^{10} *cfu/mlLactobacillus casei*
T_2	10^{9}*cfu/mlLactobacillus casei*
T_3	10^{8} *cfu/mlLactobacillus casei*
T_4	10^{7}*cfu/mlLactobacillus casei*
c(Control)	–

۲-۲-۲- آماده سازی سویه جهت تلقیح

فعال سازی *لاکتوباسیلوس کازئی*PTCC1608 در محیط کشت MRS مایع و در دمای گرمخانه گذاری۷۷°C به مدت ٤٨ساعت انجام شد .برای تهیه کشت ذخیره از *لاکتوباسیلوس کازئی* حدود۱۰ cc ازکشت ٢٤ ساعته با دور ۳۵۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵°C سانتریفوژ(سوئیس از شرکت) Gerber شد[۱۵]. محیط کشت مایع تخلیه شد و کشت‌های ذخیره با افزودن گلیسرول استریل (۵۰v/v٪) به کشت‌های فعال شده مرحله قبل آماده شدند. کشت‌های ذخیره در میکروتیوپ‌های استریل محتوی ۸ CC سوسپانسیون کشت ٢٤ ساعته در دمای ۲۰°C – نگهداری شدند برای فعال شدن باکتری‌ها حدود ۵ cc از کشت ٢٤ ساعته به 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 ٤٨ ساعته با همزن کاملا مخلوط شد و برروی محیطMRS آگارکشت خطی داده شد و در اطراف پلیت‌ها پارافیلم پیچیده شد و در انکوباتور (آلمان شرکت سازنده Memert) ۳۷°C به مدت ٤٨ ساعت قرار داده شد. هدف از این عمل، دسترسی دائم به باکتری‌های پروبیوتیک در فاز رشد لگاریتمی بود[١٦].

۲-۲-۳-تلقیح میکروارگانیسم‌ها

جهت تلقیح میکروبی از روش مک فارلند[۱۷] و توتال کانت استفاده شده است. جهت تعیین مقدار باکتری در ٤ سطح با تراکم باکتری*cfu/ml* ($۱۰^{۱۰}$،$۱۰^{۹}$،$۱۰^{۸}$،$۱۰^{۷}$) تلقیح شد.

۲-۲-٤-تخمیر نمونه‌ها

تیمارها را برای انجام عملیات تخمیر به انکوباتور با دمای۳۷°C به مدت ٤٨ ساعت منقل شدند طبق گزارش[۱۸] دمای ۳۷-٤۷ °C دمای مناسبی برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک و به خصوص *لاکتوباسیلوس کازئی* است. پس از تخمیر تیمارها برای بررسی فاکتورهای مورد نظر در طول ٤ هفته به یخچال با دمای٤ °C منقل شدند [۱۹].

۲-۳-آزمون‌ها

۲-۳-۱ – شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک

به جهت شمارش سلول‌های میکروبی زنده از روش رقت سازی اعشاری و پورپلیت طبق روش SPC[1] استفاده شد. از این رقت‌ها ۱cc 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 ۳۷°C منتقل شدند و ٤٢ ساعت در این دما گرمخانه گذاری شدند . تعداد کلنی‌های رشد کرده پس از ٢٤ 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[۲۱،۲۰].

رابطه (۱)

تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر (*cfu/ml*) = تعداد کلنی×عکس فاکتور رقت

۲-۳-۲- اندازه گیریpH ، اسیدیته و قندهای احیا کننده

pH به طور مستقیم توسط دستگاه pH متر (مدل SAT-2002ساخت کشور ایران) اندازه‌گیری شد [۲۲].از روش تیتراسیون توسط هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال تا ایجاد رنگ صورتی کم رنگ پایدار(به مدت ۳۰ ثانیه) برای اندازه‌گیری اسید لاکتیک استفاده شد[۲۲].اندازه‌گیری قندهای احیا کننده

1. Standard plate counts

طبق روش فهلینگ در استاندارد ملی ایران به شماره۳٦٨٤ انجام شد[۱] .

۲-٤- طرح آماری و تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی نتایج از طرح کاملا تصادفی به روش فاکتوریل استفاده شد. برای تحلیل واریانس نتایج از نرم افزار۲۲ SPSSاستفاده شد. میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح۹۵ درصد مورد مقایسه شدند.برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

۳- نتایج

۳-۱- اسیدیته و pH مارمالاد پالپ لیمو بعد از ٤٨ ساعت تخمیر در دمای °C۳۷ و پس از چهار هفته نگهداریدر دمای °C٤

با توجه به جدول (۲) مقایسه میانگین‌های pH و اسیدیته بررسی داده‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن مشخص گردید. میزانpH اولیه اندازه‌گیری شده کلیه تیمارها ۳/۵۱ بود پس از تلقیح باکتری روند کاهش معنی‌داری در میزان pH مشاهده شد(p<۰/۰۵). بین تیمارهایT_1،T_2وT_4 به ترتیب با تراکم باکتری*cfu/ml* ($۱۰^{۷}$و$۱۰^{۱۰}$،$۱۰^{۹}$) اختلاف معنی‌داری در میزان pH پس از تلقیح مشاهده نشد(p>۰/۰۵). نتایج آزمایشات نشان دادند که اسیدیته وpH تفاوت کاملاً معنی‌داری بر اثر تراکم باکتری و زمان ماندگاری دارد (p<۰/۰۱). روند تغییرات اسیدیته در زمان‌های مورد بررسی در سایر تیمارها کاملا" مشابه بوده وپس از ٤٨ ساعت تخمیر در دمای °C۳۷ و چهار هفته نگهداری در دمای °C٤، میزان اسیدیته با گذشت زمان افزایش یافته ومیزانpH باگذشت زمان به‌طور معنی‌داری کاهش‌یافته است.همان‌طور که در جدول(۲) مشاهده می‌گردد با افزایش اسیدیته ، pH کاهش‌یافته است.

Table 2 compares the average pH and total acidity in terms of lactic acid (g / 100g) Lemon marmalade (mean ± SD) with *Lactobacillus casei* bacteria in treatments (T_1, T_2, T_3, T_4) 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

day period \ Marmalade		T_1	T_2	T_3	T_4	c(Control)
day 0	pH	$3/44±0/01^{a}$	$3/42±0/07^{ab}$	$3/41±0/01^{b}$	$3/38±0/01^{c}$	$3/37±0/01^{c}$
	Acidity	$2/04±0/07^{a}$	$1/99±0/00^{a}$	$1/90±0/42^{a}$	$1/86±0/02^{a}$	$1/95±0/00^{a}$
day7	pH	$3/42±0/07^{a}$	$3/42±0/07^{a}$	$3/41±0/70^{a}$	$3/14±0/01^{c}$	$3/21±0/01^{b}$
	Acidity	$2/00±0/00^{ab}$	$2/00±0/00^{ab}$	$1/92±0/21^{c}$	$2/01±0/02^{a}$	$1/97±0/00^{b}$
day 14	pH	$3/39±0/07^{a}$	$3/38±0/01^{a}$	$3/40±0/01^{a}$	$3/02±0/01^{b}$	$2/99±0/01^{b}$
	Acidity	$2/21±0/01^{a}$	$2/23±0/00^{a}$	$1/89±0/02^{b}$	$2/05±0/21^{ab}$	$1/98±0/00^{ab}$
day 21	pH	$3/35±0/07^{a}$	$3/28±0/07^{a}$	$3/27±0/03^{a}$	$2/89±0/00^{b}$	$2/85±0/07^{b}$
	Acidity	$2/43±0/01^{b}$	$2/29±0/00^{bc}$	$1/91±0/02^{c}$	$2/10±0/42^{bc}$	$1/99±0/00^{bc}$
day 28	pH	$3/08±0/00^{a}$	$3/05±0/00^{a}$	$3/03±0/00^{a}$	$2/75±0/70^{b}$	$2/55±0/07^{c}$
	Acidity	$2/50±0/14^{ab}$	$2/30±0/00^{bc}$	$1/94±0/21^{d}$	$2/11±0/02^{cd}$	$2/01±0/00^{cd}$

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

۳-۲-بررسی تغییرات میکروبی مارمالاد پالپ لیمو پس از ٤٨ ساعت تخمیر در دمای °C ۳۷ و طی ۲۸ روز نگهداری در دمای °C ٤

جدول (۳) خلاصه تجزیه واریانس تاثیر تیمارهابر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در مارمالاد پالپ لیمو در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای ٤ 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<۰/۰۱). همچنین اثر متقابل دوجانبه (تراکم وزمان نگهداری) تفاوت کاملاًمعنی‌داری بر رشد باکتری‌ها دارد (p<۰/۰۱).

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)

شکل (١)تغییرات جمعیت میکروبی مارمالاد پالپ لیمو تلقیح شده با باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* پس از ٤٨ ساعت تخمیر وطی ٢٨ روز نگهداری بود. میزان زنده‌مانی*لاکتو باسیلوس کازئی* به مرور زمان کاهش یافته است. بیشترین میزان *لاکتوباسیلوس کازئی* مربوط به T_1با تراکم باکتری 10^{10}*cfu/ml*بود. تیمارT_4 با تراکم باکتری 10^{7}*cfu/ml* در روز ٧ تا ١٤ افزایش یافته و در روز ٢١ کاهش پیدا کرده است اختلاف معنی داری در میزان رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* در روز ١٤ تا ٢١ وجود دارد. تیمار T_1با تراکم باکتری 10^{10}*cfu/ml*روز ١٤ تا ٢١ ثابت و روز ٢٨ کاهش یافته است.زنده‌مانی*لاکتوباسیلوس کازئی* در مارمالاد پالپ لیمو در تیمار T_2با تراکم باکتری 10^{9}*cfu/ml*تا روز ٢١ با گذشت زمان کاهش یافته و روز ٢٨ ثابت بوده است. زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در مارمالاد پالپ لیمو در تیمار T_3با تراکم باکتری 10^{8}*cfu/ml*پس ازتخمیر تا روز ٧ کاهش یافته و روز ١٤ کاهش کمی یافته و روز ٢١ به میزان کمی افزایش یافته و در روز ٢٨ کاهش معنی داری یافته است.در تیمار T_2با تراکم باکتری 10^{9}*cfu/ml*و تیمار T_4 با تراکم باکتری *cfu/ml* 10^{7}از روز ٢١ تا روز ٢٨ میزان زنده‌مانی *لاکتو باسیلوس کازئی* ثابت مانده است.

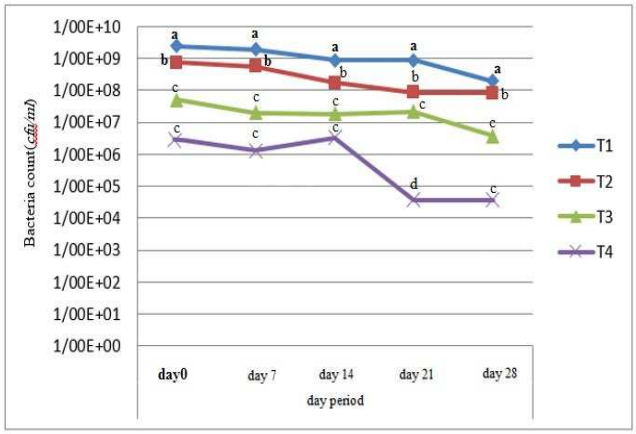

Fig 1 The microbial population of lemon pulp with Lactobacillus casei bacteria in treatments (T_1, T_2, T_3, T_4) with density of bacteria (10^7, 10^8, 10^9, and 10^{10}) *cfu/ml* after 48 hours of fermentation process and for a 28-day period

٣-٢- بررسی تغییرات قندهای احیاکننده درمارمالاد پالپ لیمو

با توجه به جدول (٤) مقایسه میانگین اثراصلی زمان نگهداری برقند احیاکننده و بررسی داده‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن مشخص گردید که قنداحیاکننده در مارمالاد دارای اختلاف معنی‌داری بود($p<٠/٠٥$).

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

Storage time (days)	Reducing (gr/100cc) sugar
Before fermentation	22/65±2/06[a]
After fermentation	22/06±1/98[b]

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

با توجه به جدول (٥) مقایسه میانگین اثراصلی تراکم باکتری بر قند احیاکننده و بررسی داده‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن مشخص گردید. هرچه تراکم باکتری کم‌تر است، میزان قندهای احیاکننده افزایش پیدا کرده است . درمقایسه میانگین اثر اصلی تراکم باکتری بر قنداحیاکننده تراکم باکتری *cfu/ml* (10^{7}،10^{8}) در مارمالاد پالپ لیمو قند احیاکننده معنی‌دار بود ($p<٠/٠٥$).همچنین اثر اصلی تراکم باکتری بر قند احیاکننده در مارمالاد پالپ لیمو اختلاف معنی‌داری ندارند($p>٠/٠٥$).

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

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

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

٤- نتیجه گیری و بحث

٤-١-تغییرات pH، اسیدیته، مقدار قنددر طول تخمیر و نگهداری

با اضافه کردن ژلاتین ، پودر آب پنیر و شیر خشک که سبب افزودن پروتئین‌ها که از مهم‌ترین عوامل جهت تقویت رشد پروبیوتیک‌ها هستند وسبب افزایش pH تا ٣/٥١ بود. طبق نتایج حاصل از این تحقیق مشخص شد که رشد باکتری‌ها، کاهش pHو افزایش مقدار اسیدیته را در طی تخمیر و نگهداری به دنبال داشته است. البته کنترل زمان تخمیر مهم و بر کیفیت محصول تولیدی مؤثر می‌باشد. علت اصلی این امر،مربوط به مصرف قندها و تولید اسیدهای آلی می‌باشد[١] . در این

تحقیق که به بررسی قنداحیا کننده مارمالاد پالپ لیمو قبل از تخمیر، پس از ٤٨ ساعت تخمیر در دمای $37^{\circ}C$ 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.

لیسیاردلوومارا‌تور در سال (٢٠١١)بیان نمودند که در مارمالاد و مربا، مدت زمان نگهداری سبب کاهش pH می‌شود[٥]. که با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر که بیانگر کاهش سریع‌ترpH در طی نگهداری مارمالاد پروبیوتیک بوده است، مطابقت داشت.

٤-٢- تغییرات رشد باکتری در طی تخمیر و نگهداری

برای زنده‌مانی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* در این آزمایش از مواد پروتئینی و مغذی استفاده شده است. که پودر آب پنیر، پودر شیرخشک و ژلاتین سبب زنده‌مانی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* در طی دوره نگهداری شده است. وقتی pH طی مدت نگهداری کاهش و میزان اسیدیته افزایش پیدا کرده است سبب مرگ *لاکتوباسیلوس کازئی* شده است. بیشترین میزان رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* در تیمار T_1 با تراکم باکتری 10^{10} *cfu/ml* مشاهده شده است و تیمارT_1 با تراکم باکتری 10^{10} *cfu/ml* و تیمارT_2 با تراکم باکتری 10^{9} *cfu/ml* تا هفته سوم رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* بیشتر از استاندارد غذا و دارو 10^{7}-10^{6} هست . در تیمار T_4 با تراکم باکتری 10^{7} *cfu/ml* در هفته سوم میزان رشد باکتری با توجه به حد استاندارد سازمان غذا و دارو کم‌تر از 10^{6} مشاهده شده است. در نتیجه بهترین تیمارT_3 با تراکم باکتری 10^{8} *cfu/ml* با توجه 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 $4^{\circ}C$ از میزان باکتری‌های پروبیوتیک کاهش یافت. که با نتایج سیدی،(١٣٩٠)مطابقت داشت. به مرور زمان در طول ٢٨ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$، در آب پرتقال غنی شده با پودر آب پنیر و باکتری‌های پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس*) از تعداد باکتری‌های پروبیوتیک کاسته شد[٢٣].

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 مانده که با نتایج بررسی یحیایی صوفیانی، (١٣٩٣) مطابقت داشت[٢٤].

همچنین براساس نتایج مطالعه انجام شده توسط راندازووو همکاران در سال (٢٠١٣) به بررسی بقای باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* درمرباهای هلو در طول ذخیره‌سازی در دماهای مختلف پرداختند. متابولیسم لاکتوباسیلوس موجب تغییر درpH و ترکیب قند شد[٦].در مقایسه با مطالعات انجام‌گرفته، نتایج مشابه با آزمایشات تحقیق مذکور به دست آمد. که رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* موجب کاهش میزان قندهای احیاکننده وکاهش میزان pH مارمالادها شده است.

٥ -نتیجه گیری کلی

در تحقیق حاضرفاکتورهای pH، اسیدیته کل برحسب اسیدلاکتیک، قندهای احیاکننده، و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک مارمالاد پالپ لیمو تخمیری پروبیوتیک توسط سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* در ٤ سطح تلقیح *cfu/ml* (10^{10}،10^{9}،10^{8}،10^{7}) 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 ٣/٠١ کاهش پیدا کرد،سبب از بین رفتن باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* گردید. میزان اسیدیته در طول مدت نگهداری افزایش یافت و در طول مدت ٤ هفته نگهداری در دمای $4^{\circ}C$میزان اسیدیته افزایش‌یافته که سبب از بین رفتن *لاکتوباسیلوس کازئی* گردید. در طی تخمیر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک با مصرف قند و مواد مغذی موجود در مارمالاد شامل پودر شیر خشک و ژلاتین و پودر آب‌پنیر افزایش یافت. بیشترین میزان رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* در تیمار T_1 با تراکم باکتری 10^{10} *cfu/ml* از حد مجاز استاندارد غذا و دارو بیشتر گزارش‌شده است مشاهده گردید. تیمار برتر تیمارT_3 با تراکم باکتری 10^{8} *cfu/ml* با توجه به حد استاندارد سازمان غذا و دارو پس از چهار هفته نگهداری را بوده است.

میزان قنداحیاکننده مارمالاد پالپ لیمو قبل از تخمیر، پس از ٤٨ ساعت تخمیر در دمای ٣٧°C مورد بررسی قرار گرفت. میزان قندهای احیاکننده با توجه به افزایش تراکم باکتری، کاهش یافت که نشان دهنده مصرف قند توسط باکتری پروبیوتیک می‌باشد.

٦- 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] Egbekun, 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] Fu¨gel. 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 Ja'fari, AS., (2008), the effect of whey on 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.*

[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.

*casei*Strains.Applied and Envirionmental Microbiology.Valio Ltd. Research and Development Centre, P.O. Box 30, FIN-00039 Valio, Finland.

[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.

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

Shirpour, M. [1*], Mahnaz Hashemiravan[2], Rezvan Pourahmad[3]

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 T_3, 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