بررسی امکان تولید نوشیدنی های پروبیوتیک بر پایه آب کرفس و شاه توت با بکارگیری باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتارم*

مرجان نوری[1*]، آرمین امین مقدسی[1]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸ /۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۷/۲۳)

چکیده

در این پژوهش به منظور تولید نوشیدنی‌های پروبیوتیک شاه‌توت و کرفس از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در دو غلظت ۱ و ۲ درصد در دمای محیط و یخچال استفاده شد. آزمون‌های انجام شده شامل تعیین pH، اسیدیته قابل تیتر، شمارش زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های هدف و ارزیابی حسی بود. نتایج نشان داد که با گذشت زمان و رشد باکتری هدف در نوشیدنی‌های شاه‌توت و کرفس، pH به صورت معنی داری کاهش یافته است. نتایج حاصل از شمارش زنده مانی نشان داد که در میان تمام نمونه‌ها، محلول آب شاه‌توت حاوی ۲ درصد از باکتری نگهداری شده در یخچال بعد از ۲۸ روز نسبت به سایر نمونه‌ها دارای بیشترین تعداد زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها یعنی $۸/۲۵\times۱۰^{۷}$ CFU/ml و همچنین آب‌میوه کرفس حاوی ۲ درصد از باکتری پروبیوتیک نگهداری شده در یخچال بعد از گذشت ۲۱ روز نسبت به سایر نمونه‌ها دارای بیشترین تعداد زنده‌مانی میکروارگانیسم یعنی $٤/۰۲\times۱۰^{۷}$ CFU/ml بود که دو نمونه مورد نظر در این شرایط هنوز با نام نوشیدنی پروبیوتیک قابل نام‌گذاری هستند. نتایج ارزیابی حسی نیز نشان داد که خواص حسی نمونه‌های BLR_1 (آب‌میوه شاه‌توت حاوی ۱ درصد باکتری در یخچال)، BLR_2 (آب‌میوه شاه‌توت حاوی ۲ درصد باکتری در یخچال) و CLR_1 (آب‌میوه کرفس حاوی ۲ درصد باکتری در یخچال) با نمونه‌های شاهد خود بدون تفاوت معنی داری هم امتیاز بوده‌اند اما به طور کلی نمونه‌های آب‌میوه کرفس امتیاز بالاتری نسبت به آب‌میوه شاه‌توت کسب کردند. از یافته‌های حاصل می‌توان نتیجه گرفت که آب شاه‌توت و کرفس بستر خام مناسبی جهت رشد باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بوده‌اند.

کلید واژگان: نوشیدنی، کرفس، شاه‌توت، سلامتی‌بخش، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

* مسئول مکاتبات: marjan.nouri@ut.ac.ir

۱- مقدمه

در دهه‌های گذشته، مصرف پروبیوتیک‌ها توجه زیادی به خود جلب کرده است. طبق گفته سازمان غذا و کشاورزی (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت استفاده در مقادیر کافی مزایای بسیاری برای میزبان خواهند داشت. مصرف آنها می‌تواند تاثیرات مثبتی نظیر افزایش موانع مخاطی، سنتز انواع ویتامین‌های گروه B، کاهش کلسترول سرم، تحریک سیستم ایمنی، مهار التهاب روده، مهار اثر میکروارگانیسم‌های بیماریزا و کاهش علایم اسهال را داشته باشد [۱،۲]. در نتیجه محققان به دنبال توسعه محصولات پروبیوتیک با بسترهای مختلف مانند میوه‌ها هستند. این بسترها حاوی مواد مغذی مفید مانند مواد معدنی، ویتامین‌ها، فیبر و آنتی اکسیدان‌ها هستند، اگرچه سازگاری موفق میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در آب میوه به نوع و ماتریکس مواد غذایی بستگی دارد [۳،٤].

غذاهای فراسودمند یا عملگرا بین غذا و دارو قرار داشته و از سال ۱۹۹۳ در سطح جهان رواج یافته است. مصرف غذاهای فراسودمند، سلامت و تندرستی را بدون اثرات سمی و جهش‌زایی به مصرف کننده ارائه می‌دهند. نوشیدنی‌های فراسودمند شامل مواد مغذی مختلف مثل اسید آسکوربیک، توکوفرول، بتا کاروتن و غیره بوده و مزایای فیتوشیمیایی‌ها را در رژیم غذایی دارا می‌باشد. گروه نوشیدنی‌های فراسودمند به دلیل کم کالری بودن و اطمینان از اثر سلامت بخشی آنها، یکی از مهم‌ترین فرآورده‌هایی هستند که در سال‌های اخیر به عنوان محصولات جدید توسعه یافته‌اند. گسترش بازار نوشیدنی‌های عملگرا در آینده، به علت شیوع بیماری‌های مرتبط با سبک زندگی مانند دیابت و فشار خون بالا انتظار می‌رود [۵،٦،۷].

شاه‌توت به وفور دارای آنتی‌اکسیدان‌ها، آنتوسیانین‌ها، پرو آنتوسیانیدین‌ها و دیگر فلاوونوییدها، سالیسیلیک اسید، الاجیک اسید و فیبر می‌باشد [۸]. شاه‌توت به دلیل داشتن کالری کم (در حدود ۱۱ کیلوکالری/۱۰۰ گرم) و مقادیر بالای الاجیتانین در مقایسه با سایر توت‌ها منحصر به فرد است [۹]. وجود خاصیت ضد میکروبی در شاه‌توت منجر شده است که به عنوان طعم‌دهنده نیز مورد استفاده قرار گیرد و بسته به غلظت آن می‌تواند تا ۹۹ درصد ویروس‌های دهانی را از بین ببرد [۱۰].

در میان ترکیبات فیتوشیمیایی کرفس می‌توان به کربوهیدرات‌ها، فنل‌ها مانند فلاونوئیدها، آلکانوئیدها و استروئیدها اشاره کرد [۱۱]. وجود ترکیباتی مانند لیمونن، سلینن، فروکومارین، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها و ویتامین‌های A و C از دلایلی هستند که کرفس بیشترین کاربرد را در طب سنتی دارد [۱۲].

موسوی و همکاران (۲۰۱۱) از سویه‌های مختلف پروبیوتیک در آب انار بهره بردند و به این نتیجه رسیدند که مقدار تمامی سویه‌های پروبیوتیکی بعد از ٤۸ ساعت تخمیر به 10^8 CFU/mlرسید. در میان سویه‌ها *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* قادر به زنده ماندن در دو هفته اول در دمای ٤ درجه سلسیوس بودند در حالی که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* قابلیت زنده ماندن خود را در شرایط مشابه از دست دادند [۱۳].

نصرتی و همکاران (۲۰۱٤) در آزمایشی که روی مخلوط آب سبزیجات انجام دادند به این نتیجه رسیدند که *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* طی مدت زمان نگهداری ٤ هفته در دمای ٤ درجه سلسیوس بدون هیچ گونه مکمل تغذیه‌ای رشد کرده و زنده ماندند. این آب سبزیجات دارای مقدار کافی باکتری‌های پروبیوتیک جهت حداکثر مزایای سلامتی بود [۱٤].

هاشمی و همکاران (۲۰۱۷) در آزمایشی که روی آب لیمو شیرین انجام دادند به این نتیجه رسیدند که اسید سیتریک، ترکیبات فنلی کل و محتوای قندی به طور قابل ملاحظه‌ای در آب لیمو شیرین تخمیر شده کاهش یافته بودند، در نتیجه توانایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای مصرف مقدار زیاد

سوبسترا در مقایسه با سویه‌ها اندازه گیری شد. بعد از ۳۶ ساعت تخمیر مقدار سلول‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به ۸/۵۲ log CFU/mL رسید که این مقدار پس از ۲۸ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس به ۷/۱٤ log CFU/mL کاهش پیدا کرد که قابل قبول بود [۱].

اوکینا و همکاران (۲۰۱۸) در آزمایشی که روی آب انگور سفید انجام دادند به این نتیجه رسیدند که اضافه کردن میکروارگانیزم پروبیوتیک به آب انگور سفید منجر به تیرگی و قرمزی رنگ آب‌میوه شد و همچنین ترکیبات فنلی کاهش یافت، اگرچه باعث پایداری رنگ و فعالیت آنتی اکسیدانی در طی نگهداری در یخچال شد. آب‌میوه پروبیوتیک حاوی مقدار کافی باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* ۱۰^{۹} CFU/200ml در ۲۱ روز نگهداری یخچال بود اما برای شرایط شبیه سازی شده گوارشی تا ۲۸ روز باقی ماند. نتایج نشان داد که آب انگور سفید حامل مناسبی برای *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* است و قابلیت نگهداری تا ۲۸ روز را دارد [۱۵].

آگولار و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی دانه‌های کیویچا (kiwicha) در تولید آب‌میوه پروبیوتیک پرداختند و نتایج نشان داد که رشد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به مقادیر بالاتر از ۱۰^{۸} CFU/mL رسید که حداقل مقدار مورد نیاز را در زمان مصرف تضمین می‌کند. تک کشت *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و کشت مشترک *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *بیفیدوباکتریوم لانگوم* تاثیرات مطلوبی را در مقایسه با استفاده تنها از کشت *بیفیدوباکتریوم لانگوم* داشت که رشد آن با کاهش pH کاهش یافت [۱٦].

تا کنون مطالعات فراوانی در زمینه تولید آب‌میوه‌های پروبیوتیک انجام شده است اما در این مطالعه امکان بقا و رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در دو آب‌میوه کرفس و شاه‌توت مورد بررسی قرار گرفت که دلیل آن خواص بی نظیر دو محصول مورد نظر و عدم بکارگیری آنها به عنوان بستری برای نوشیدنی‌های پروبیوتیک بود.

۲- مواد و روش

۲-۱- تهیه آب میوه‌های شاه توت و کرفس به عنوان نمونه‌های مورد آزمایش

شاه‌توت و کرفس تازه از بازار تهران به صورت کاملا تصادفی تهیه گردید. در ابتدا زواید و ناخالصی‌ها حذف گردید سپس به طور کامل شستشو و آبگیری انجام شد و پس از این مرحله با استفاده از صافی، آب آنها نسبتاً صاف و در داخل بطری شیشه‌ای دربندی و به روش دمای بالا و زمان کوتاه (HTST) در بن ماری دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه پاستوریزه گردیدند [۱۷]. هر یک از مراحل گفته شده برای آبمیوه‌های کرفس و شاه‌توت به صورت جداگانه انجام شدند.

۲-۲-انتقال باکتری به آب‌میوه‌ها

بسته‌ی لیوفیلیزه محتوی گرانول‌های باکتری گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*lactobacillus plantarum pTcc1058*) از شرکت تک ژن زیست تهران تهیه گردید. گونه باکتریایی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس در محیط کشت MRS[1] آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) که حاوی ۲۰ درصد گلیسرول، کشت داده شد. باکتری‌ها به مدت ٤۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شد. مرحله بعدی افزودن باکتری پروبیوتیک هدف در نسبت های ۰، ۱ و ۲ درصد به ترتیب به نمونه‌های آب شاه‌توت و کرفس بود که نمونه‌ها در دو دمای محیط و یخچال نگهداری شدند و در بازه‌های زمانی ۱، ۷، ۱٤، ۲۱ و ۲۸ روز و در سه تکرار مورد آزمون‌های شیمیایی و میکروبی قرار گرفتند. تیمارهای مختلف موجود در این پژوهش در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

1. De man, Rogoasa and sharpe agar often abbreviated to MRS

Table 1 Introduction of tested trials in the research (blackberry and celery)

Treatment	Description
BAC	Blackberry juice without *lactobacillus plantarum* (control) at ambient temperature
BLA_1	Blackberry juice with 1% *lactobacillus plantarum* at ambient temperature
BLA_2	Blackberry juice with 2% *lactobacillus plantarum* at ambient temperature
BRC	Blackberry juice without *lactobacillus plantarum* (control) at refrigerator temperature
BLR_1	Blackberry juice with 1% *lactobacillus plantarum* at refrigerator temperature
BLR_2	Blackberry juice with 2% *lactobacillus plantarum* at refrigerator temperature
CAC	Celery juice without *lactobacillus plantarum* (control) at ambient temperature
CLA_1	Celery juice with 1% *lactobacillus plantarum* at ambient temperature
CLA_2	Celery juice with 2% *lactobacillus plantarum* at ambient temperature
CRC	Celery juice without *lactobacillus plantarum* (control) at refrigerator temperature
CLR_1	Celery juice with 1% *lactobacillus plantarum* at refrigerator temperature
CLR_2	Celery juice with 2% *lactobacillus plantarum* at refrigerator temperature

۲-۳- آزمون‌های شیمیایی و میکروبی

۲-۳-۱ آزمون‌های شیمیایی

روی هر نمونه، آزمون‌های اندازه گیری pH و اسیدیته انجام گرفت. اندازه‌گیری pH با استفاده از pH متر (ساخت کمپانی EDT مدل GP353) پس از کالیبره کردن آن با بافرهای ٤ و ۷ صورت گرفت. برای اندازه‌گیری اسیدیته بر حسب اسید سیتریک آب‌میوه‌ها ابتدا ۱۰ میلی لیتر از آنها با ۲۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و چند قطره شناساگر فنل فتالئین به آن اضافه گردید سپس با سود ۰/۱ نرمال تا ظهور رنگ صورتی تیتر گردیدند [۱۸،۱۹].

۲-۳-۲- آزمون میکروبی

این آزمون بدین صورت انجام شد که ابتدا از هر نمونه ۱ میلی لیتر توسط پیپت برداشته و با ۹ میلی لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد هموژن نموده و سپس رقت‌های بعدی در لوله‌های حاوی آب پپتونه ۰/۱ درصد تهیه گردید. برای شمارش از محیط کشت MRS آگار حاوی سوربیتول (۱۰ میلی لیتر محلول ۱۰ درصد سوربیتول استریل شده توسط فیلتر سر سرنگی به ۹۰ میلی لیتر محیط کشت قبل از ریختن در پلیت‌ها اضافه شد) استفاده شد و کشت باکتری بصورت عمقی و دو لایه بدین صورت انجام شد که ابتدا ۱ میلی‌لیتر از نمونه داخل پلیت ریخته و سپس محیط کشت به آن اضافه گردید سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در شرایط بی‌هوازی که توسط پمپ خلاء ایجاد گردید به مدت ٤۸ ساعت نگهداری شد [۲۰].

۲-٤-ارزیابی حسی

ارزیابی حسی بر اساس روش‌های استاندارد توسط هفت ارزیاب آموزش دیده صورت گرفت. به منظور پرهیز از بروز خطاهای متداول در ارزیابی حسی نظیر خطای حاصل از انتظار ارزیاب‌ها یا خطای حاصل از محرک، نمونه‌ها در اندازه و ظروف مشابه مخصوصی که با اعداد سه رقمی و به صورت تصادفی رمزگذاری شده بودند در اختیار ارزیاب‌ها قرار داده شد. نمونه‌های پروبیوتیک و غیر پروبیوتیک از آب شاه‌توت و کرفس از لحاظ رنگ، طعم، بو، مزه و بافت مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر کدام از ارزیابان حسی بر اساس مقیاس هدونیک از ۱ برای "غیر قابل پذیرش" و ۵ برای "عالی" نمره دادند [۲۱].

۲-۵- آنالیز آماری

جامعه آماری بدین صورت بود که تعداد ۳٦ نمونه آب‌میوه شاه‌توت و کرفس بین ۱۲ تیمار مختلف طوری تقسیم شد که به هر گروه ۳ نمونه تعلق گرفت. ابتدا آزمون نرمال بودن داده‌ها انجام پذیرفت و در صورت نرمال بودن، آنالیزهای تجزیه واریانس برای داده‌ها انجام گرفت. تابعیت متغیرهای وابسته (pH، اسیدیته قابل تیتر، آزمون میکروبی و ارزیابی حسی) نسبت به افزایش درصدهای باکتری پروبیوتیک به عنوان متغیر مستقل (x) در دو دمای محیط و یخچال سنجیده شد. پس از محاسبه ضرایب تابعیت معنی‌دار بودن یا نبودن آنها توسط جداول تجزیه واریانس ANOVA ارزیابی شد و مقایسه میانگین‌ها چند دامنه دانکن در سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شده است.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آزمون‌های شیمیایی

۳-۱-۱- تغییرات pH آب شاه‌توت و کرفس در دو دمای محیط و یخچال

در شکل ۱ (A,B) نتایج تغییرات pH آب شاه‌توت و کرفس

در دو دمای محیط و یخچال به ترتیب نشان داده شده است. شکل ۱ (A) نشان می‌دهد که pH دو نمونه BLA_1 و BLA_2 در پایان مدت زمان نگهداری به صورت معناداری کاهش پیدا کرد و به ترتیب برابر با ۳/۵۱ و ۳/۴۸ بود. pH نمونه BLR_2 تا روز ۲۱ تغییرات معناداری نداشته ولی از روز ۲۱ تا پایان مدت نگهداری به صورت چشمگیری کاهش پیدا کرده است. pH نمونه‌های BRC و BRL_1 تا پایان مدت نگهداری تغییرات چشم‌گیری نداشته است. pH نمونه BAC تا روز ۱۴ تقریبا ثابت بوده و از روز ۱۴ تا پایان مدت نگهداری به صورت معناداری تغییر پیدا کرده است.

شکل ۱ (B) نشان داد که بیشترین تغییر pH مربوط به نمونه CLA_2 بوده و کمترین تغییر مربوط به نمونه CLR_2 است. pH نمونه CLA_1 تا روز ۱۴ تقریبا ثابت بوده و از روز ۱۴ تا پایان مدت نگهداری به طور معناداری کاهش پیدا کرده است. pH نمونه CAC از ابتدا تا پایان مدت نگهداری روند کاهشی داشته است. pH نمونه CLR_2 از ابتدای نگهداری تا انتها تغییر معناداری نداشته است. pH نمونه CLR_1 از روز ۷ تا روز ۱۴ کاهش پیدا کرد و از آن به بعد تا پایان مدت نگهداری تقریبا ثابت بوده است. pH نمونه CRC تا روز ۲۱ کاهش داشته و از آن به بعد تا پایان روز نگهداری تقریبا ثابت بوده است. pH نمونه CLA_2 به صورت معناداری از روز ۷ تا پایان مدت نگهداری کاهش پیدا کرده است. کاهش pH می‌تواند به دلیل تولید اسید لاکتیک توسط باکتری و نیز همزمان مرگ جمعیتی از باکتری‌ها باشد، با توجه به اینکه مرگ باکتری منجر به آزاد شدن اسید شده و pH کاهش می‌یابد [۲۱]. توتونچی و همکاران (۱۳۹۴) نیز در آزمایش آب انگور قرمز پروبیوتیک گزارش کردند که در آخرین روز نگهداری نمونه آنها pH به صورت معنا داری کاهش یافته است [۲۲]. قضاوی و همکاران (۱۳۹۵) در آزمایش تولید آب انار پروبیوتیک گزارش کردند که pH آب انار نطنز و شهرضا در روز ۵ و ۱۵ پس از تلقیح باکتری کاهش معناداری را نشان داد، همچنین در روز ٤ افزایش pH در هر دو تیمار دیده شد که می‌تواند به علت مصرف اسید سیتریک آب انار به عنوان یک ماده‌ی مغذی توسط باکتری‌ها باشد [۲۱]. شکرگزار و همکاران (۱۳۹۵) در آزمایش تولید آب پرتقال- انبه پروبیوتیک گزارش کردند که pH نکتار پرتقال- انبه حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در هفته اول از ۲/۷ به ۲/٦ و در هفته دوم از ۲/٦ به ۲/۵ رسید و در هفته سوم تغییری در pH نکتار ایجاد نشد [۲۳].

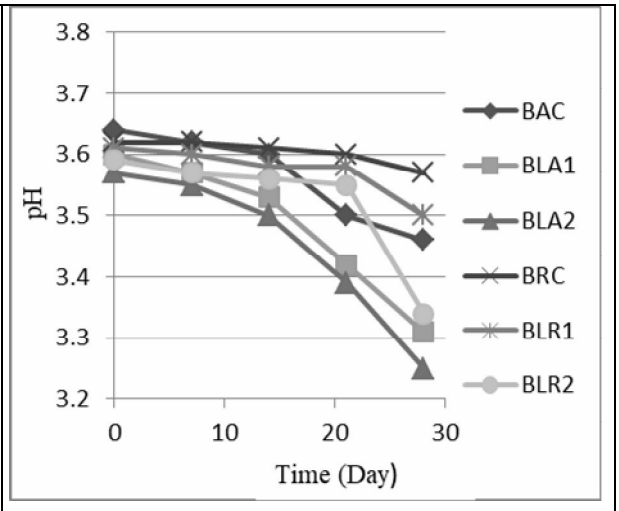

Fig 1 A- Changes in pH of blackberry juice in ambient and fridge temperature

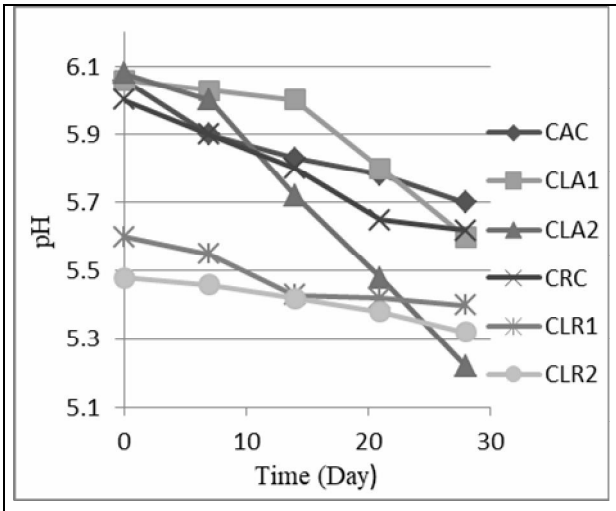

Fig 1 B- Changes in pH of celery juice in ambient and fridge temperature

۳-۱-۲ تغییرات اسیدیته آب شاه‌توت و کرفس در دو دمای محیط و یخچال

شکل ۲ (A) نشان داد که نمونه‌های BLA_2 و BLR_2 و BLA_1 از روز یکم تا روز چهاردهم افزایش اسیدیته معناداری را بر حسب اسید سیتریک داشته اند و از آن به بعد تغییر محسوسی مشاهده نشد. نمونه‌های BRC و BAC و BLR_1 از روز یکم تا پایان مدت نگهداری هیچ گونه تغییر معناداری نداشته‌اند. نمونه BRC نسبت به سایر نمونه‌ها با تفاوت معناداری دارای کمترین اسیدیته است. نمونه BLA_2 بیشترین تغییر اسیدیته را داشت و در مقابل نمونه BLR_1 کمترین تغییر اسیدیته را دارا بود.

شکل ۲ (B) نشان داد که نمونه CLA_2 بیشترین تغییر اسیدیته

را داشته است و از روز ۲۱ تا ۲۸ اسیدیته آن به طور معناداری تغییر پیدا کرده است و اسیدیته آن از سایر نمونه‌ها بیشتر است. نمونه CRC کمترین تغییر اسیدیته و نمونه CLR_1 کمترین میزان اسیدیته را داشتند. قضاوی و همکاران (۱۳۹۵) در آزمایش تولید آب انار پروبیوتیک گزارش کردند که اسیدیته آب انار شهرضا در روز صفر برابر ۰/۵۲٤ بود که در پایان مدت زمان بقای باکتری در آب انار روز دهم میزان اسیدیته برابر ۰/٤۵ بود و تفاوت معناداری مشاهده نشد [۲۱]. توتونچی و همکاران (۱۳۹٤) در آزمایش تولید آب انگور پروبیوتیک گزارش کردند که اسیدیته آب انگور قرمز (نمونه شاهد) ۰/٤۲ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر بود و تا پایان دوره نگهداری هیچ تغییری نداشت در حالیکه بعد از اضافه کردن باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *اسیدوفیلوس* به نمونه اسیدیته آن افزایش یافت، اسیدیته ابتدایی ۰/٦۹ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در پایان دوره ۱/۱٤ شد ولی اسیدیته ۰/۵۲ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر ابتدایی آب انگور تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس کازئی* در انتهای دوره نگهداری کاهش جزئی داشت و به ۰/٤۷ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید [۲۲].

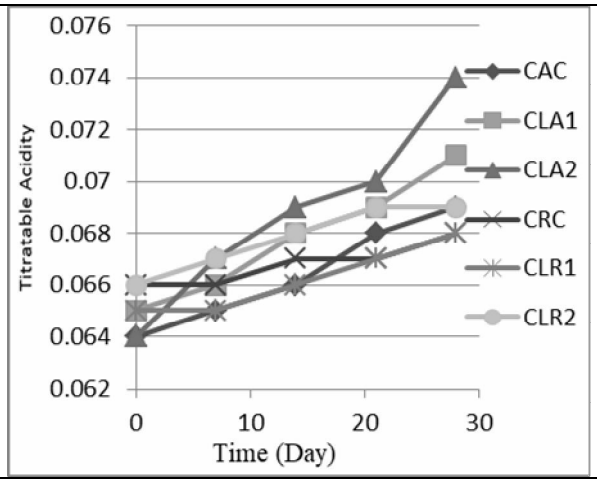

Fig 2 B- Acidity changes of celery juice in ambient and fridge temperature

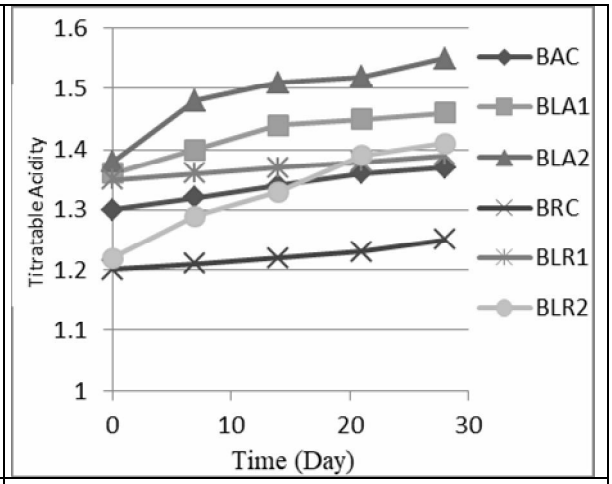

Fig 2 A- Acidity changes of blackberry juice in ambient and fridge temperature

۳-۲ تغییرات جمعیت میکروبی آب شاه‌توت و کرفس در دو دمای محیط و یخچال

جدول ۲ نشان داد که نمونه BLA_1 از مقدار اولیه باکتری تلقیح شده که برابر با $۷/۲٤\times۱۰^{۸}$ CFU/ml بود به صورت مداوم در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم کاهش پیدا کرد و در آخر به میزان $۳/۲۲\times۱۰^{۵}$ CFU/ml رسید که از میزان مجاز باکتری برای آب‌میوه‌های پروبیوتیک کمتر بود. نمونه BLA_2 نیز از مقدار باکتری اولیه تلقیح شده به میزان $٤/٤۲\times۱۰^{۵}$ CFU/ml رسید، به نظر می‌رسد که کاهش شدید میزان باکتری پروبیوتیک به این دلیل می‌باشد که این نمونه‌ها در دمای محیط نگهداری شده‌اند و این دما باعث مرگ و میر باکتری‌ها شده است. میزان باکتری تلقیح شده نمونه BLR_1 در آخر به مقدار $۸/٤۰\times۱۰^{۵}$ CFU/ml رسیده است که کاهش معنی‌داری داشته است و در بازه مجاز باکتری برای آب‌میوه‌های پروبیوتیک قرار ندارد. میزان باکتری نمونه BLR_2 در آخر به $۸/۲۵\times۱۰^{۷}$ CFU/ml رسید که کاهش قابل توجهی با میزان اولیه باکتری تلقیح شده ندارد و حداکثر میزان مجاز باکتری برای آب‌میوه پروبیوتیک است به نظر می‌رسد علت آن به دلیل تلقیح بیشتر باکتری و نگهداری در دمای یخچال بود.

میزان باکتری‌های نمونه CLA_1 و CLA_2 از میزان اولیه تلقیح شده که برابر با $۷/۲٤\times۱۰^{۸}$ CFU/ml بود در هفته آخر کاهش پیدا کرد و به ترتیب برابر با $۳/٤۱\times۱۰^{٦}$ CFU/ml و $۵/٦۷\times۱۰^{٦}$ CFU/ml شده است که با توجه به کاهش اما میزان باکتری پروبیوتیک باقی‌مانده در حد مجاز برای آب‌میوه‌های پروبیوتیک بود. نمونه‌های CLR_1 و CLR_2 از میزان اولیه باکتری به ترتیب به مقدار $٦/۳۱\times۱۰^{٦}$ CFU/ml و $۸/۲٤\times۱۰^{٦}$ CFU/ml رسید که کاهش معنی‌داری با مقدار اولیه ندارد و علت آن نگهداری آب‌میوه در دمای یخچال بود. طبق استانداردهای بین المللی وجود $۱۰^{٦}$ تا $۱۰^{۸}$ CFU/ml

باکتری پروبیوتیک در محصول هنگام مصرف لازم است تا تعداد کافی و مناسب از ارگانیسم‌های زنده بتوانند به روده بزرگ برسند و در آنجا فعالیت‌های مفید خود را انجام دهند [۲۳].

قضاوی و همکاران (۱۳۹۵) اقدام به تولید آب انار پروبیوتیک با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* کردند که مشخص شد جمعیت باکتری پروبیوتیک در طی هفته اول از میزان اولیه ۷/۴۹ (شهرضا) و ۷/۴۳ (نطنز) سیکل لگاریتمی به ۵/۳۳ (شهرضا) و ٤/۵۰ (نطنز) سیکل لگاریتمی کاهش یافت و نتیجه نشان داد که آب انار دارای pH پایین‌تری نسبت به pH مطلوب برای رشد باکتری است [۲۳].

توتونچی و همکاران (۱۳۹٤) در تولید آب انگور پروبیوتیک با استفاده از *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به این نتیجه رسیدند که در پایان هفته چهارم، نمونه‌های نگهداری شده در یخچال حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بین ۱/۵-۱ سیکل لگاریتمی کاهش بار میکروبی نشان دادند و تعداد باکتری از ۵×۱۰^{۹} CFU/ml به $۲/۱\times۱۰^{۸}$ CFU/ml رسید، درحالیکه نمونه‌های حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* ٤/۵-٤ سیکل لگاریتمی کاهش پیدا کردند به طوری که تعداد باکتری‌ها از ٦×۱۰^{۹} CFU/ml به ۵×۱۰^{٤} CFU/ml رسیدند که کمتر از میزان توصیه شده بود [۲۲].

شکرگزار و همکاران (۱۳۹۵) اقدام به تولید آب میوه پرتقال-انبه پروبیوتیک با استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در سه تیمار کردند که شمار بار میکروبی تیمار اول در هفته اول از $۱۰^{٦}$ CFU/ml به $۱۰^{۲}$ CFU/ml رسید، در تیمار دوم در هفته اول تعداد باکتری زنده از $۱۰^{٦}$ CFU/ml به $۱۰^{۵}$ CFU/ml رسید، در هفته دوم از $۱۰^{۵}$ CFU/ml به $۱۰^{۳}$CFU/ml، در هفته سوم به $۱۰^{۱}$ CFU/ml رسید و در تیمار سوم تعداد باکتری در هفته اول از $۱۰^{۸}$ CFU/ml به $۱۰^{٦}$ CFU/ml، در هفته دوم از $۱۰^{٦}$CFU/ml به $۱۰^{٤}$ CFU/ml و در هفته سوم به $۱۰^{۳}$ CFU/ml رسید که در تمامی موارد از حداقل میزان مجاز برای باکتری پروبیوتیک کمتر بود [۲۳].

پریرا و همکاران (۲۰۱۰) در تولید آب‌میوه پروبیوتیک نوعی واریته سیب (Cashew apple) توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* با میزان باکتری اولیه ۷/٤۸ Log CFU/ml در ۱۰۰ میلی لیتر از آب‌میوه و ۱٦ ساعت تخمیر به مدت ٤۲ روز نگهداری شد. تعداد باکتری‌های زنده از ۸/٤۱ Log CFU/ml در شروع نگهداری به ۸/۷۲ Log CFU/ml در روز ۲۱ رسید، در روز ۳۵ با مقداری کاهش به ۸/٦۲ Log CFU/ml رسید و جدا از کاهشی که در آخر دوره نگهداری وجود داشت مقدار *لاکتوباسیلوس کازئی* همواره در حداکثر مقدار خود برای باکتری‌های پروبیوتیک قرار داشت [۲۵].

هاشمی و همکاران (۲۰۱۷) اقدام به تولید آب لیمو شیرین پروبیوتیک توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* کردند که بعد از ۲۸ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس تعداد باکتری زنده از تقریبا ۷ Log CFU/ml به ۷/۱٤ Log CFU/ml رسید که در بازه مجاز برای آب میوه‌های پروبیوتیک قرار داشت [۱].

Table 2 Changes in the population of *Lactobacillus plantarum* in blackberry and celery juice

Samples	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
BAC	0	0	0	0	0
BLA_1	7.24×10^{8}	5.50×10^{7}	4.16×10^{6}	3.60×10^{6}	3.22×10^{5}
BLA_2	7.24×10^{8}	6.40×10^{7}	5.74×10^{6}	4.58×10^{6}	4.42×10^{5}
BRC	0	0	0	0	0
BLR_1	7.24×10^{8}	4.24×10^{8}	1.07×10^{7}	9.02×10^{6}	8.40×10^{5}
BLR_2	7.24×10^{8}	5.65×10^{8}	4.01×10^{8}	3.56×10^{7}	8.25×10^{7}
CAC	0	0	0	0	0
CLA_1	7.14×10^{8}	6.23×10^{7}	5.12×10^{7}	4.24×10^{6}	3.41×10^{6}
CLA_2	7.14×10^{8}	6.60×10^{7}	6.14×10^{7}	5.88×10^{6}	5.67×10^{6}
CRC	0	0	0	0	0
CLR_1	7.14×10^{8}	3.90×10^{8}	1.92×10^{8}	1.28×10^{7}	6.31×10^{6}
CLR_2	7.14×10^{8}	5.24×10^{8}	3.20×10^{8}	4.02×10^{7}	8.24×10^{6}

۳-۳- نتایج ارزیابی حسی آب شاه‌توت و کرفس در دو دمای محیط و یخچال

شکل ۳ (A) تغییرات حسی در ۷ روز اول نوشیدنی بر پایه آب شاه‌توت را نشان داد که در روز هفتم بین نمونه‌های BLA_1 و

BLA_2 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، تمامی نمونه‌ها امتیاز کمی برای شاخص‌های بافت، مزه، بو و طعم دریافت کرده‌اند و نمونه BAC امتیاز بالاتری نسبت به نمونه‌های تلقیح شده با باکتری داشت. همچنین بین نمونه‌های BRC و BLR_1 و BLR_2 نیز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و همگی در شاخص‌های مختلف امتیاز بالاتری نسبت به نمونه‌های نگهداری شده در محیط دریافت کرده‌اند.

شکل ۳ (B) تغییرات حسی در روز ۲۱ ام نوشیدنی بر پایه آب شاه‌توت را نشان داد که بین نمونه‌های BAC و BRC از لحاظ بافت، بو و رنگ اختلاف معنی داری وجود داشت و نمونه نگهداری شده در دمای محیط امتیاز بیشتری دریافت کرده است. همچنین بین نمونه‌های BLA_1، BLR_1، BLA_2 و BLR_2 اختلاف معنی‌داری وجود داشت و نمونه یخچالی امتیاز بالاتری نسبت به نمونه محیطی دریافت کرده است.

شکل ٤ (A) نشان داد که بین نمونه‌های CLA_1 و CLA_2 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و تقریبا مورد پذیرش کلی قرار گرفته‌اند. بین نمونه‌های CRC، CLR_1 و CLR_2 نیز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و مورد پذیرش قرار گرفته‌اند.

شکل ٤ (B) نشان می‌دهد که نمونه‌های CLA_1 و CLA_2 در تمامی شاخص‌ها کمترین امتیاز را دریافت کرده‌اند و نمونه CAC امتیاز بیشتری نسبت به نمونه‌های تلقیح شده با باکتری پروبیوتیک دریافت کرد. نمونه CRC در شاخص مزه، طعم، بو و رنگ کمترین امتیاز را دریافت کرده است و در تنها در شاخص بافت امتیاز بالاتری دریافت کرد. میان نمونه‌های CLR_1 و CLR_2 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و مورد پذیرش کلی بوده است.

قضاوی و همکاران (۱۳۹۵) در مورد آب انار پروبیوتیک گزارش کردند که افزودن باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به آب انار اثر نامطلوبی بر خواص حسی آن نسبت به نمونه شاهد نداشته است [۲۱]. الندرسن و همکاران (۲۰۱۲) در مورد آب سیب پروبیوتیک توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* گزارش کردند که آب سیب پروبیوتیک نگهداری شده به مدت ۲۸ روز طعم اسیدی بیشتری داشت که به دلیل متابولیسم باکتری بوده است، همچنین آب‌میوه پروبیوتیک شیرینی کمتری نسبت آب سیب غیر پروبیوتیک داشت که به دلیل مصرف قند توسط باکتری بوده است [۲۵.] آگولار و همکاران (۲۰۱۸) در مورد خواص حسی آب دانه کیویچا توسط لاکتوباسیلوس پاراکازئی و بیفیدوباکتریوم لانگوم گزارش کردند که آب‌میوه پروبیوتیک با آب‌میوه غیر پروبیوتیک تفاوت معنی‌داری نداشته و امتیاز ۵ و ٦ از ۷ امتیاز دریافت کرده است و همچنین آب‌میوه با طعم‌های پرتقال و توت فرنگی امتیاز ٦ و ۷ دریافت کرده است که به معنی پذیرش زیاد آن می‌باشد [١٦]. سوری و همکاران (۱۳۹۷) در مورد خواص حسی آب هندوانه پروبیوتیک گزارش کردند که در شاخص بافت آب هندوانه افزودن عصاره چای سبز اختلاف معنی‌داری را با نمونه شاهد ایجاد ننمود و در تمامی تیمارها با گذشت زمان امتیاز اختصاص یافته به فاکتور طعم به طور معنی‌داری کاهش یافت [٤].

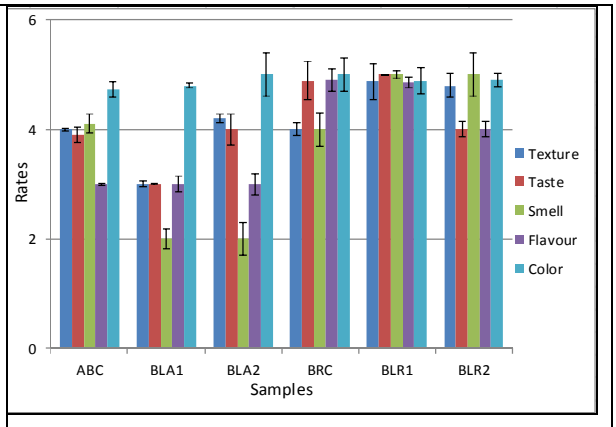

Fig 3 A- Sensory evaluation of blanked and probiotic blackberry juice in 7th day *after Lactobacillus plantarum* incubation

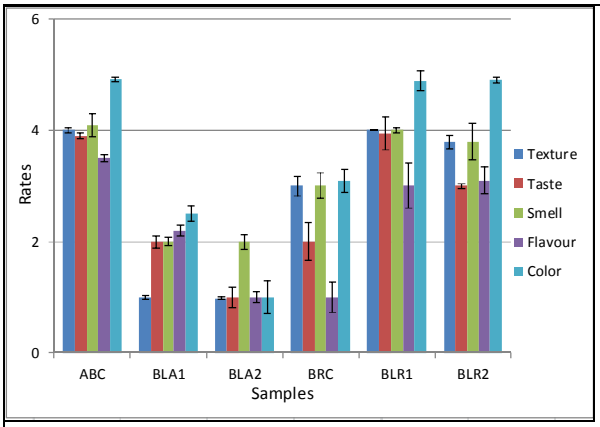

Fig 3 B- Sensory evaluation of blanked and probiotic blackberry juice in 21st day after *Lactobacillus plantarum* incubation

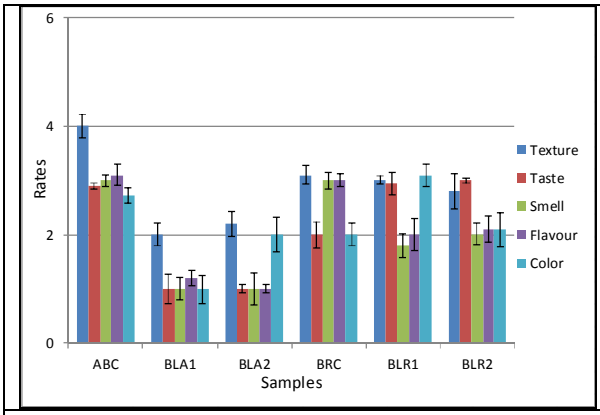

Fig 4 B- Sensory evaluation of blanked and probiotic celery juice in 21st day after Lactobacillus plantarum incubation

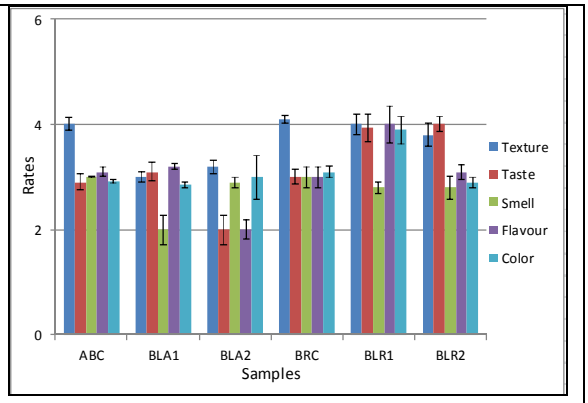

Fig 4 A- Sensory evaluation of blanked and probiotic celery juice in 7th day after Lactobacillus plantarum incubation

٤- نتیجه‌گیری کلی

در تحقیق مورد نظر از دو آب‌میوه کرفس و شاه‌توت استفاده شد و پس از افزودن میکروارگانیسم *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* آزمون‌های شیمیایی، میکروبی و حسی در روزهای ۰، ۷، ۱٤، ۲۱ و ۲۸ انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که با گذشت زمان و رشد باکتری هدف در نوشیدنی شاه‌توت و کرفس pH به صورت معنی‌داری کاهش یافته است که به مصرف قند، انجام فرآیند تخمیر و تولید اسید توسط باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نسبت داده می‌شود و همچنین اسیدیته برخلاف pH افزایش پیدا کرد. نتایج حاصل از شمارش زنده‌مانی نشان داد که محلول آب شاه‌توت و کرفس حاوی ۱ و ۲ درصد از باکتری پروبیوتیک نگهداری شده در یخچال بعد از گذشت ۲۸ روز تسبت به سایر نمونه‌ها دارای بیشترین تعداد زنده‌مانی بوده‌اند ($۸/۳۱\times۱۰^{۵}$ CFU/ml و $۸/۲۵\times۱۰^{۷}$ CFU/ml برای آب شاه‌توت و $۶/۳۱\times۱۰^{۶}$ CFU/ml و $۸/۳۱\times۱۰^{۶}$ CFU/ml برای آب کرفس) اما بیشتر از این مدت زمان خصوصیات هدف نابود شد. نتایج حاصل از ارزیابی حسی نشان داد که نمونه‌های CLR_1، CLR_2، BLR_1 و BLR_2 بهترین امتیاز را از نظر شاخص‌های بافت، مزه، طعم، بو و رنگ دریافت کردند.

٥- منابع

[1] Hashemi, S.M.B., Khaneghah, A.M., Barba, F.J., Nemati, Z., Shokofti, S.S. and Alizadeh, F., 2017. Fermented sweet lemon juice (Citrus limetta) using *Lactobacillus plantarum* LS5: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of functional foods*, *38*, pp.409-414.

[2] Martins, E.M.F., Ramos, A.M., Vanzela, E.S.L., Stringheta, P.C., de Oliveira Pinto, C.L. and Martins, J.M., 2013. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, *51*(2), pp.764-770.

[3] Dos Santos Filho, A.L., Freitas, H.V., Rodrigues, S., Abreu, V.K.G., de Oliveira Lemos, T., Gomes, W.F., Narain, N. and Pereira, A.L.F., 2019. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. *LWT*, *99*, pp.371-378.

[4] Souri, A. Mirzaei, M. and Mirdamadi, S., 2019. The effect of green leaf tea extract on probiotic bacterial viability in watermelon juice. *Food Science and Technology*, *15*(85), pp.73-86.

[5] Shukla, M., J, Y.K. and Admassu, S., 2013. Development of probiotic beverage from whey and pineapple juice. *Journal of Food Processing and Technology*, *4*(206), pp.1-4.

[6] Lakzadeh, L. Sabzevari, A. and Amouheidari, M., 2019. Fortification of pomegranate juice with inulin extracted from Jerusalem artichoke for high shelf life prebiotic juice production. *Food Science and Technology*, *15*(84), pp. 51-59.

[7] Mozaffarpour Nuri, A. Nateghi, L. and Meimandipour, A., 2018. Evaluation of the effect of transglutaminase enzyme and beta-glucan on survival of lactobacillus acidophilus and physicochemical and sensory properties of probiotic low-fat yogurt. *Food Science and Technology*, *15*(83), pp. 57-69.

[8] Yang, H., Hewes, D., Salaheen, S.,

Federman, C. and Biswas, D., 2014. Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of Lactobacillus. *Food Control*, *37*, pp.15-20.

[9] Laaksonen, O., Knaapila, A., Niva, T., Deegan, K.C. and Sandell, M., 2016. Sensory properties and consumer characteristics contributing to liking of berries. *Food quality and preference*, *53*, pp.117-126.

[10] Çolak, A.M., 2018. Effect of melatonin and gibberellic acid foliar application on the yield and quality of Jumbo blackberry species. *Saudi journal of biological sciences*, *25*(6), pp.1242-1246.

[11] Peter, K. V., 2012. Handbook of herbs and spices, volume 2, Elsevier, pp. 249-267.

[12] Kooti, W. and Daraei, N., 2017. A review of the antioxidant activity of celery (Apium graveolens L). *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, *22*(4), pp.1029-1034.

[13] Mousavi, Z.E., Mousavi, S.M., Razavi, S.H., Emam-Djomeh, Z. and Kiani, H., 2011. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(1), pp.123-128.

[14] Nosrati, R., Hashemiravan, M. and Talebi, M., 2014. Fermentation of vegetables juice by probiotic bacteria. *International Journal of Biosciences*, *4*(3), pp.171-180.

[15] Okina, V.S., Porto, M.R.A., Pimentel, T.C. and Prudencio, S.H., 2018. White grape juice added with *Lactobacillus paracasei* ssp. probiotic culture. *Nutrition & Food Science*, 48(4), pp.631-641.

[16] Aguilar, E.F. and Rivera, E.D. F., 2018. Assessment of the use of the hydrolyzed liquid fraction of the kiwicha grain in the fermentation process of probiotic drinks from tarwi juice: microbiological, chemical and sensorial analysis. *Food Science and Technology*, (AHEAD), 16(1), pp. 1-7.

[17] Galeb A .D .S, Wrolstad R .E and Mcdaniel M .R., 2002. Composition and quality of clarified cantaloupe juice concentrate. *Journal of Food Processing and Preservation*; 26(2), pp. 39-56.

[18] Hassimotto, N.M.A., Mota, R.V.D., Cordenunsi, B.R. and Lajolo, F.M., 2008. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (Rubus sp.) grown in Brazil. *Food Science and Technology*, *28*(3), pp.702-708.

[19] Guerra, N., Carrozzi, L., Goñi, M.G., Roura, S. and Yommi, A., 2010. Quality characterization of celery (Apium graveolens L.) by plant zones and two harvest dates. *Journal of food science*, *75*(6), pp.S327-S332.

[20] http://www.isiri. org/ portal/ files/ std/6332. doc.

[21] Ghazavi, N. and Abedi, R., 2018. Using *Lactobacillus acidophilus* in production of probiotic pomegranate juice. *Food Science and Technology*, *15*(77), pp.107-99.

[21] Totonchi, P., Hesari, J., Moradi, M. and Fathi, A.B., 2015. Production and evaluation of probiotic red grape juice by *Latobacillus acidophilus LA5*, and *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Research, 4*(25), pp.655-666.

[22] Shokrgozar, S., Ghobadi, D.M. and Salami, M., 2016. A survey on possibility of using orange/mango nectar as a probiotic carrier. *Journal of Applied Microbiology in Food Industry, 1(2*), pp.15-24.

[23] Pereira, A.L.F., Maciel, T.C. and Rodrigues, S., 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, *44*(5), pp.1276-1283.

[24] de Souza Neves Ellendersen, L., Granato, D., Bigetti Guergoletto, K. and Wosiacki, G., 2012. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. *Engineering in Life Sciences*, *12*(4), pp.475-485.

Investigating the possibility of probiotic production base on Celery and Blackberry beverages by using *Lactobacillus plantarum*

Nouri, M. [1*], Moghadasi, A. A. [1]

1. Young Researchers and Elite Club, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

(Received: 2019/05/11 Accepted:2019/10/15)

In this study, *Lactobacillus plantarum* bacteria were used for production of blackberry and celery probiotic beverages in two concentrations of 1 and 2% at ambient temperature and refrigerator. The tests included determination of pH, titratable acidity, counting viability of target microorganisms and sensory evaluation. The results showed that with passing time and growth of target bacteria in blackberry and celery beverages, pH was significantly dropped. The results of counting viability showed that among all samples, blackberry beverage containing 2% of the bacteria stored in the refrigerator after 28 days had the highest viability of microorganisms, which is 8.25×10^7 CFU/ml as well as celery beverage containing 2% of probiotic bacteria stored in the refrigerator after 21 days had the highest viability of microorganisms, 4.02×10^7 CFU/ml, than the other samples, of which two samples were in these conditions Still called by the name of probiotic beverage. The sensory evaluation also showed that the sensory properties of the BLR_1 (Blackberry beverage with 1% bacteria in refrigerator), BLR_2 (Blackberry beverage with 2% bacteria in refrigerator) and CLR_1 (Celery beverage with 2% bacteria in refrigerator) with their evidence samples also scored without significant difference, but in general, samples of celery beverage scored more than blackberry beverage. From the findings, it can be concluded that blackberry and celery beverages were suitable raw material for growth of *Lactobacillus plantarum*.

keywords: Drinks, Celery, Blackberry, Healthy, *Lactobacillus Plantarum*

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