

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

مرجان نوری^{۱*}، آرمین امین مقدسی^۱

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 نوشیدنی های پروبیوتیک شاه توت و کرفس از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در دو غلظت ۱ و ۲ درصد در دمای محیط و یخچال استفاده شد. آزمون های انجام شده شامل تعیین pH، اسیدیته قابل تیتر، شمارش زنده مانی میکروارگانیسم های هدف و ارزیابی حسی بود. نتایج نشان داد که با گذشت زمان و رشد باکتری هدف در نوشیدنی های شاه توت و کرفس، pH به صورت معنی داری کاهش یافته است. نتایج حاصل از شمارش زنده مانی نشان داد که در میان تمام نمونه ها، محلول آب شاه توت حاوی ۲ درصد از باکتری نگهداری شده در یخچال بعد از ۲۸ روز نسبت به سایر نمونه ها دارای بیشترین تعداد زنده مانی میکروارگانیسم ها یعنی $8/25 \times 10^7$ CFU/ml و همچنین آب میوه کرفس حاوی ۲ درصد از باکتری پروبیوتیک نگهداری شده در یخچال بعد از گذشت ۲۱ روز نسبت به سایر نمونه ها دارای بیشترین تعداد زنده مانی میکروارگانیسم یعنی $4/02 \times 10^7$ CFU/ml بود که دو نمونه مورد نظر در این شرایط هنوز با نام نوشیدنی پروبیوتیک قابل نام گذاری هستند. نتایج ارزیابی حسی نیز نشان داد که خواص حسی نمونه های BLR_۱ (آب میوه شاه توت حاوی ۱ درصد باکتری در یخچال)، BLR_۲ (آب میوه شاه توت حاوی ۲ درصد باکتری در یخچال) و CLR_۱ (آب میوه کرفس حاوی ۲ درصد باکتری در یخچال) با نمونه های شاهد خود بدون تفاوت معنی داری هم امتیاز بوده اند اما به طور کلی نمونه های آب میوه کرفس امتیاز بالاتری نسبت به آب میوه شاه توت کسب کردند. از یافته های حاصل می توان نتیجه گرفت که آب شاه توت و کرفس بستر خام مناسبی جهت رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم بوده اند.

کلید واژگان: نوشیدنی، کرفس، شاه توت، سلامتی بخش، لاکتوباسیلوس پلانتاروم

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

۱- مقدمه

در دهه های گذشته، مصرف پروبیوتیک ها توجه زیادی به خود جلب کرده است. طبق گفته سازمان غذا و کشاورزی (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که در صورت استفاده در مقادیر کافی مزایای بسیاری برای میزبان خواهند داشت. مصرف آنها می تواند تاثیرات مثبتی نظیر افزایش موانع مخاطی، سنتز انواع ویتامین های گروه B، کاهش کلسترول سرم، تحریک سیستم ایمنی، مهار التهاب روده، مهار اثر میکروارگانیسم های بیماریزا و کاهش علائم اسهال را داشته باشد [۱،۲]. در نتیجه محققان به دنبال توسعه محصولات پروبیوتیک با بسترهای مختلف مانند میوه ها هستند. این بسترها حاوی مواد مغذی مفید مانند مواد معدنی، ویتامین ها، فیبر و آنتی اکسیدان ها هستند، اگرچه سازگاری موفق میکروارگانیسم های پروبیوتیک در آب میوه به نوع و ماتریکس مواد غذایی بستگی دارد [۳،۴].

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 جهش زایی به مصرف کننده ارائه می دهند. نوشیدنی های فراسودمند شامل مواد مغذی مختلف مثل اسید آسکوربیک، توکوفرول، بتا کاروتن و غیره بوده و مزایای فیتوشیمیایی ها را در رژیم غذایی دارا می باشد. گروه نوشیدنی های فراسودمند به دلیل کم کالری بودن و اطمینان از اثر سلامت بخشی آنها، یکی از مهم ترین فرآورده هایی هستند که در سال های اخیر به عنوان محصولات جدید توسعه یافته اند. گسترش بازار نوشیدنی های عملگرا در آینده، به علت شیوع بیماری های مرتبط با سبک زندگی مانند دیابت و فشار خون بالا انتظار می رود [۵،۶،۷].

شاهتوت به وفور دارای آنتی اکسیدان ها، آنتوسیانین ها، پرو آنتوسیانیدین ها و دیگر فلاونوئیدها، سالیسیلیک اسید، الاجیک اسید و فیبر می باشد [۸]. شاهتوت به دلیل داشتن کالری کم (در حدود ۱۱ کیلوکالری/۱۰۰ گرم) و مقادیر بالای الاجیتانین در

مقایسه با سایر توت ها منحصر به فرد است [۹]. وجود خاصیت ضد میکروبی در شاهتوت منجر شده است که به عنوان طعم دهنده نیز مورد استفاده قرار گیرد و بسته به غلظت آن می تواند تا ۹۹ درصد ویروس های دهانی را از بین ببرد [۱۰].

در میان ترکیبات فیتوشیمیایی کرفس می توان به کربوهیدرات ها، فنل ها مانند فلاونوئیدها، آلکانوئیدها و استروئیدها اشاره کرد [۱۱]. وجود ترکیباتی مانند لیمونن، سلینن، فروکومارین، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها و ویتامین های A و C از دلایلی هستند که کرفس بیشترین کاربرد را در طب سنتی دارد [۱۲].

موسوی و همکاران (۲۰۱۱) از سویه های مختلف پروبیوتیک در آب انار بهره بردند و به این نتیجه رسیدند که مقدار تمامی سویه های پروبیوتیکی بعد از ۴۸ ساعت تخمیر به 10^8 CFU/ml رسید. در میان سویه ها لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس دلبروکی قادر به زنده ماندن در دو هفته اول در دمای ۴ 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 (۲۰۱۴) در آزمایشی که روی مخلوط آب سبزیجات انجام دادند به این نتیجه رسیدند که لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پلاتناروم طی مدت زمان نگهداری ۴ هفته در دمای ۴ درجه سلسیوس بدون هیچ گونه مکمل تغذیه ای رشد کرده و زنده ماندند. این آب سبزیجات دارای مقدار کافی باکتری های پروبیوتیک جهت حداکثر مزایای سلامتی بود [۱۴].

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 ملاحظه ای در آب لیمو شیرین تخمیر شده کاهش یافته بودند، در نتیجه توانایی لاکتوباسیلوس پلاتناروم برای مصرف مقدار زیاد

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 کاملاً 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 *Lactobacillus plantarum* (پلاتاروم) از شرکت تک ژن زیست تهران تهیه گردید. *pTcc1058* از شرکت تک ژن زیست تهران تهیه گردید. گونه باکتریایی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس در محیط کشت MRS^۱ آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) که حاوی ۲۰ درصد گلیسرول، کشت داده شد. باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شد. مرحله بعدی افزودن باکتری پروبیوتیک هدف در نسبت های ۱، ۰ 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، ۱۴، 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.

سوبسترا در مقایسه با سویه‌ها اندازه گیری شد. بعد از ۳۶ ساعت تخمیر مقدار سلول‌های لاکتوباسیلوس پلاتاروم به $\log \text{CFU/mL}$ ۸/۵۲ رسید که این مقدار پس از ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس به $\log \text{CFU/mL}$ ۷/۱۴ 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 میکروارگانیسم 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 10^9 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].

آگلار 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 10^8 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 [۱۶].

تا کنون مطالعات فراوانی در زمینه تولید آب‌میوه‌های پروبیوتیک انجام شده است اما در این مطالعه امکان بقا و رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلاتاروم در دو آب‌میوه کرفس و شاه‌توت مورد بررسی قرار گرفت که دلیل آن خواص بی نظیر

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 <i>lactobacillus plantarum</i> (control) at ambient temperature
BLA ₁	Blackberry juice with 1% <i>lactobacillus plantarum</i> at ambient temperature
BLA ₂	Blackberry juice with 2% <i>lactobacillus plantarum</i> at ambient temperature
BRC	Blackberry juice without <i>lactobacillus plantarum</i> (control) at refrigerator temperature
BLR ₁	Blackberry juice with 1% <i>lactobacillus plantarum</i> at refrigerator temperature
BLR ₂	Blackberry juice with 2% <i>lactobacillus plantarum</i> at refrigerator temperature
CAC	Celery juice without <i>lactobacillus plantarum</i> (control) at ambient temperature
CLA ₁	Celery juice with 1% <i>lactobacillus plantarum</i> at ambient temperature
CLA ₂	Celery juice with 2% <i>lactobacillus plantarum</i> at ambient temperature
CRC	Celery juice without <i>lactobacillus plantarum</i> (control) at refrigerator temperature
CLR ₁	Celery juice with 1% <i>lactobacillus plantarum</i> at refrigerator temperature
CLR ₂	Celery juice with 2% <i>lactobacillus plantarum</i> at refrigerator temperature

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 ۳۶ 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 تیتراژ، 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 $p < 0.05$ 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

۲-۳- آزمون‌های شیمیایی و میکروبی

۲-۳-۱ آزمون‌های شیمیایی

روی هر نمونه، آزمون‌های اندازه‌گیری pH و اسیدیته انجام گرفت. اندازه‌گیری pH با استفاده از pH متر (ساخت کمپانی EDT مدل GP353) پس از کالیبره کردن آن با بافرهای ۴ 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 فتالین به آن اضافه گردید سپس با سود ۰/۱ نرمال تا ظهور رنگ صورتی تیتراژ گردیدند [۱۹، ۱۸].

۲-۳-۲ آزمون میکروبی

این آزمون بدین صورت انجام شد که ابتدا از هر نمونه ۱ میلی لیتر توسط پمپ 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 میلی لیتر 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 ۴۸ ساعت نگهداری شد [۲۰].

۲-۴- 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

از آن به بعد تا پایان روز نگهداری تقریباً 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 معناداری 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 ۴ افزایش pH در هر دو تیمار دیده شد که می‌تواند به علت مصرف اسید سیتریک آب انار به عنوان یک ماده 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 ۲/۶ و در هفته دوم از ۲/۶ به ۲/۵ رسید و در هفته سوم تغییری در pH نکتار ایجاد نشد [۲۳].

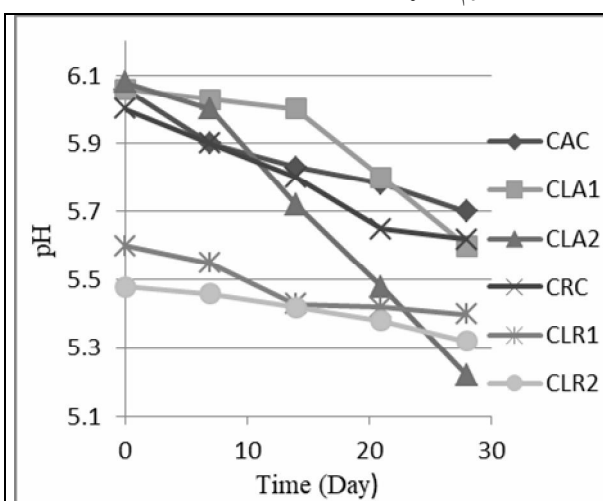


Fig 1 B- Changes in pH of celery juice in ambient and fridge temperature

از روز یکم تا پایان مدت نگهداری هیچ گونه تغییری 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

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 تقریباً 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 تقریباً 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 تقریباً ثابت بوده است. pH نمونه CRC تا روز ۲۱ کاهش داشته و

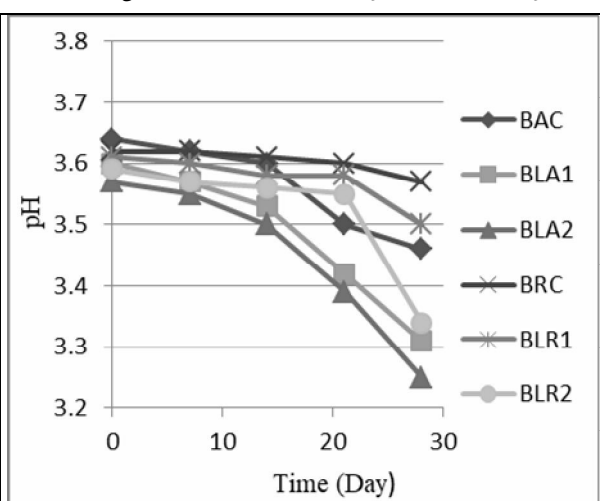


Fig 1 A- Changes in pH of blackberry juice in ambient and fridge temperature

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 از روز یکم تا روز چهاردهم افزایش اسیدیته معناداری را بر حسب اسید سیتریک داشته‌اند و از آن به بعد تغییر محسوسی مشاهده نشد. نمونه‌های BRC و BAC و BLR_1

گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر بود و تا پایان دوره نگهداری هیچ تغییری نداشت در حالیکه بعد از اضافه کردن باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس به نمونه اسیدیته آن افزایش یافت، اسیدیته ابتدایی ۰/۶۹ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر نمونه حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در پایان دوره ۱/۱۴ شد ولی اسیدیته ۰/۵۲ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر ابتدایی آب انگور تلقیح شده با لاکتوباسیلوس کازئی در انتهای دوره نگهداری کاهش جزئی داشت و به ۰/۴۷ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر رسید [۲۲].

را داشته است و از روز ۲۱ تا ۲۸ اسیدیته آن به طور معناداری تغییر پیدا کرده است و اسیدیته آن از سایر نمونه ها بیشتر است. نمونه CRC کمترین تغییر اسیدیته و نمونه CLR₁ 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 ۰/۵۲۴ بود که در پایان مدت زمان بقای باکتری در آب انار روز دهم میزان اسیدیته برابر ۰/۴۵ بود و تفاوت معناداری مشاهده نشد [۲۱]. توتونچی و همکاران (۱۳۹۴) در آزمایش تولید آب انگور پروبیوتیک گزارش کردند که اسیدیته آب انگور قرمز (نمونه شاهد) ۰/۴۲

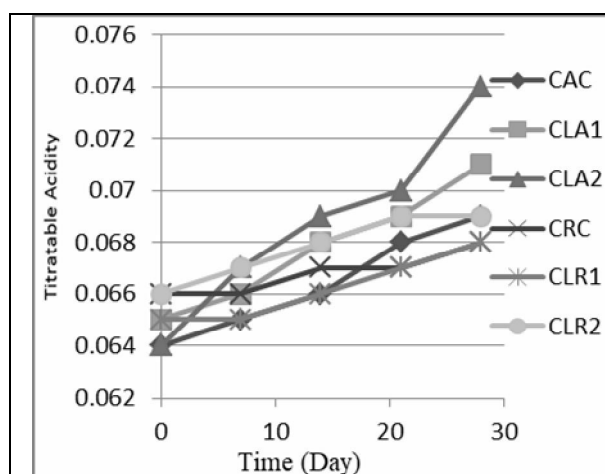


Fig 2 B- Acidity changes of celery juice in ambient and fridge temperature

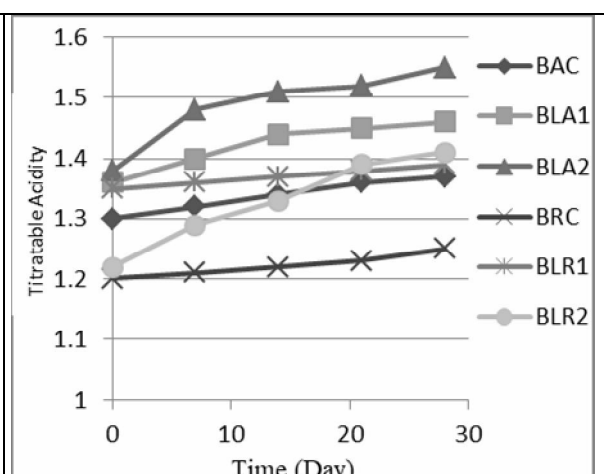


Fig 2 A- Acidity changes of blackberry juice in ambient and fridge temperature

پروبیوتیک قرار ندارد. میزان باکتری نمونه BLR₂ در آخر به $8/25 \times 10^7$ CFU/ml رسید که کاهش قابل توجهی با میزان اولیه باکتری تلقیح شده ندارد و حداکثر میزان مجاز باکتری برای آب میوه پروبیوتیک است به نظر می رسد علت آن به دلیل تلقیح بیشتر باکتری و نگهداری در دمای یخچال بود.

میران باکتری های نمونه CLA₁ و CLA₂ از میزان اولیه تلقیح شده که برابر با $7/24 \times 10^8$ CFU/ml بود در هفته آخر کاهش پیدا کرد و به ترتیب برابر با $3/41 \times 10^6$ CFU/ml و $5/67 \times 10^6$ CFU/ml شده است که با توجه به کاهش اما میزان باکتری پروبیوتیک باقی مانده در حد مجاز برای آب میوه های پروبیوتیک بود. نمونه های CLR₁ و CLR₂ از میزان اولیه باکتری به ترتیب به مقدار $6/31 \times 10^6$ CFU/ml و $8/24 \times 10^6$ CFU/ml رسید که کاهش معنی داری با مقدار اولیه ندارد و علت آن نگهداری آب میوه در دمای یخچال بود. طبق استانداردهای بین المللی وجود 10^6 تا 10^8 CFU/ml

۲-۳ تغییرات جمعیت میکروبی آب شاه توت و

کرفس در دو دمای محیط و یخچال

جدول ۲ نشان داد که نمونه BLA₁ از مقدار اولیه باکتری تلقیح شده که برابر با $7/24 \times 10^8$ CFU/ml بود به صورت مداوم در هفته های اول، دوم، سوم و چهارم کاهش پیدا کرد و در آخر به میزان $3/22 \times 10^6$ CFU/ml رسید که از میزان مجاز باکتری برای آب میوه های پروبیوتیک کمتر بود. نمونه BLA₂ نیز از مقدار باکتری اولیه تلقیح شده به میزان $4/42 \times 10^6$ CFU/ml رسید، به نظر می رسد که کاهش شدید میزان باکتری پروبیوتیک به این دلیل می باشد که این نمونه ها در دمای محیط نگهداری شده اند و این دما باعث مرگ و میر باکتری ها شده است. میزان باکتری تلقیح شده نمونه BLR₁ در آخر به مقدار $8/40 \times 10^6$ CFU/ml رسیده است که کاهش معنی داری داشته است و در بازه مجاز باکتری برای آب میوه های

اول از 10^6 CFU/ml به 10^2 CFU/ml رسید، در تیمار دوم در هفته اول تعداد باکتری زنده از 10^6 CFU/ml به 10^0 CFU/ml رسید، در هفته دوم از 10^0 CFU/ml به 10^3 CFU/ml، در هفته سوم به 10^1 CFU/ml رسید و در تیمار سوم تعداد باکتری در هفته اول از 10^8 CFU/ml به 10^6 CFU/ml، در هفته دوم از 10^6 CFU/ml به 10^4 CFU/ml و در هفته سوم به 10^3 CFU/ml رسید که در تمامی موارد از حداقل میزان مجاز برای باکتری پروبیوتیک کمتر بود [۲۳].

پریرا و همکاران (۲۰۱۰) در تولید آب میوه پروبیوتیک نوعی واریته سیب (Cashew apple) توسط لاکتوباسیلوس کازئی با میزان باکتری اولیه $7/48$ Log CFU/ml در ۱۰۰ میلی لیتر از آب میوه و ۱۶ ساعت تخمیر به مدت ۴۲ روز نگهداری شد. تعداد باکتری‌های زنده از $8/41$ Log CFU/ml در شروع نگهداری به $8/72$ Log CFU/ml در روز ۲۱ رسید، در روز ۳۵ با مقداری کاهش به $8/62$ 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 پالاتاروم کردند که بعد از ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس تعداد باکتری زنده از تقریباً 7 Log CFU/ml به $7/14$ Log CFU/ml رسید که در بازه مجاز برای آب میوه‌های پروبیوتیک قرار داشت [۱].

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 $7/49$ (شهرضا) و $5/33$ (نطنز) سیکل لگاریتمی به $5/33$ (شهرضا) و $4/50$ (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 (۱۳۹۴) 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 $1-1/5$ سیکل لگاریتمی کاهش بار میکروبی نشان دادند و تعداد باکتری از 5×10^9 CFU/ml به $2/1 \times 10^8$ CFU/ml رسید، درحالی‌که نمونه‌های حاوی لاکتوباسیلوس کازئی $4/5-4$ سیکل لگاریتمی کاهش پیدا کردند به طوری که تعداد باکتری‌ها از 6×10^9 CFU/ml به 5×10^4 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

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

شکل ۳ (A) تغییرات حسی در ۷ روز اول نوشیدنی بر پایه آب شاه‌توت را نشان داد که در روز هفتم بین نمونه‌های BLA₁ و

۳-۳- نتایج ارزیابی حسی آب شاه‌توت و

کرفس در دو دمای محیط و یخچال

شاخص بافت امتیاز بالاتری دریافت کرد. میان نمونه های CLR_1 و CLR_2 اختلاف معنی داری 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 آب میوه پروبیوتیک شیرینی کمتری نسبت آب سیب غیر پروبیوتیک داشت که به دلیل مصرف قند توسط باکتری بوده است [۲۵]. آگلوار و همکاران (۲۰۱۸) در مورد خواص حسی آب دانه کویچا توسط لاکتوباسیلوس پاراکازئی و بیفیدوباکتریوم لانگوم گزارش کردند که آب میوه پروبیوتیک با آب میوه غیر پروبیوتیک تفاوت معنی داری نداشته و امتیاز ۵ و ۶ از ۷ امتیاز دریافت کرده است و همچنین آب میوه با طعم های پرتقال و توت فرنگی امتیاز ۶ و ۷ دریافت کرده است که به معنی پذیرش زیاد آن می باشد [۱۶]. سوری و همکاران (۱۳۹۷) در مورد خواص حسی آب هندوانه پروبیوتیک گزارش کردند که در شاخص بافت آب هندوانه افزودن عصاره چای سبز اختلاف معنی داری را با نمونه شاهد ایجاد ننمود و در تمامی تیمارها با گذشت زمان امتیاز اختصاص یافته به فاکتور طعم به طور معنی داری کاهش یافت [۴].

BLA_2 اختلاف معنی داری وجود نداشت، تمامی نمونه ها امتیاز کمی برای شاخص های بافت، مزه، بو و طعم دریافت کرده اند و نمونه BAC امتیاز بالاتری نسبت به نمونه های تلقیح شده با باکتری داشت. همچنین بین نمونه های BLR_1 و BLR_2 و نیز اختلاف معنی داری وجود نداشت و همگی در شاخص های مختلف امتیاز بالاتری نسبت به نمونه های نگهداری شده در محیط دریافت کرده اند.

شکل ۳ (B) تغییرات حسی در روز ۲۱ ام نوشیدنی بر پایه آب شاه توت را نشان داد که بین نمونه های 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 نمونه های BLA_1 ، BLR_1 ، BLA_2 و BLR_2 اختلاف معنی داری وجود داشت و نمونه یخچالی امتیاز بالاتری نسبت به نمونه محیطی دریافت کرده است.

شکل ۴ (A) نشان داد که بین نمونه های CLA_1 و CLA_2 اختلاف معنی داری وجود نداشت و تقریباً مورد پذیرش کلی قرار گرفته اند. بین نمونه های CLR_1 ، CRC و CLR_2 نیز اختلاف معنی داری وجود نداشت و مورد پذیرش قرار گرفته اند.

شکل ۴ (B) نشان می دهد که نمونه های CLA_1 و CLA_2 در تمامی شاخص ها کمترین امتیاز را دریافت کرده اند و نمونه CAC امتیاز بیشتری نسبت به نمونه های 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

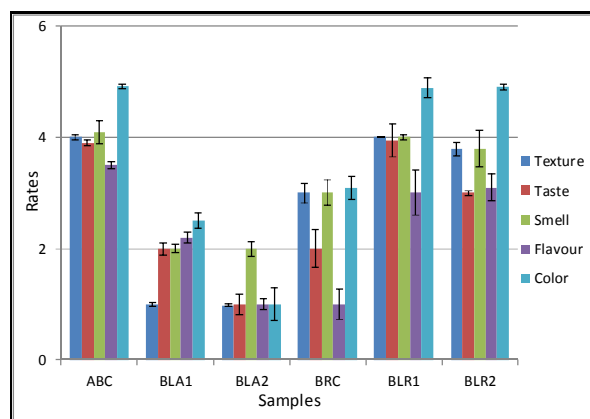


Fig 3 B- Sensory evaluation of blanked and probiotic blackberry juice in 21st day after *Lactobacillus plantarum* incubation

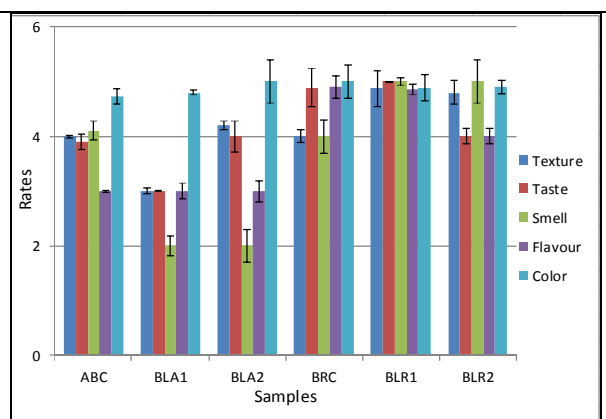


Fig 3 A- Sensory evaluation of blanked and probiotic blackberry juice in 7th day after *Lactobacillus plantarum* incubation

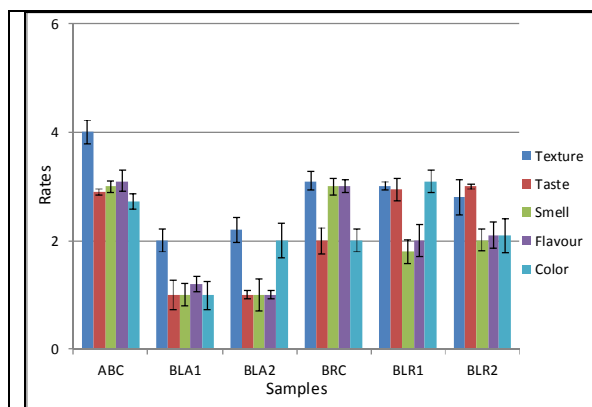


Fig 4 B- Sensory evaluation of blanked and probiotic celery juice in 21st day after *Lactobacillus plantarum* incubation

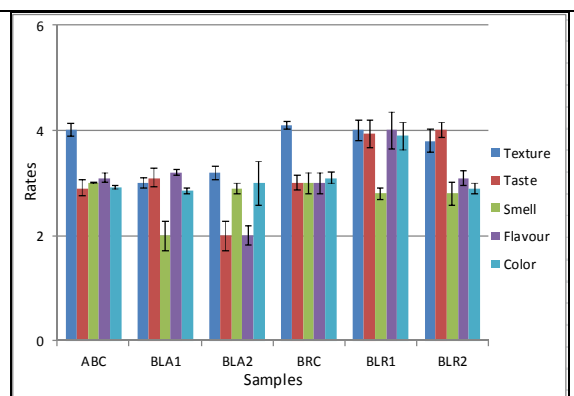


Fig 4 A- Sensory evaluation of blanked and probiotic celery juice in 7th day after *Lactobacillus plantarum* incubation

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.,

۴- نتیجه گیری 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، ۱۴، 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 نسبت به سایر نمونه‌ها دارای بیشترین تعداد زنده‌مانی بوده‌اند ($8/31 \times 10^6$ CFU/ml و $8/25 \times 10^7$ CFU/ml برای آب شاهتوت و $6/31 \times 10^6$ CFU/ml و $8/31 \times 10^6$ CFU/ml برای آب کرفس) اما بیشتر از این مدت زمان خصوصیات هدف ناپدید شد. نتایج حاصل از ارزیابی حسی نشان داد که نمونه‌های CLR₁، CLR₂، BLR₁ و BLR₂ بهترین امتیاز را از نظر شاخص‌های بافت، مزه، طعم، بو و رنگ دریافت کردند.

۵- 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,

- 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.
- 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

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 BLR₁ (Blackberry beverage with 1% bacteria in refrigerator), BLR₂ (Blackberry beverage with 2% bacteria in refrigerator) and CLR₁ (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