نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۵ شماره ۴/ سال ۱۳۹۴

ارزیابی امکان تولید آب انگور قرمز پروبیوتیک با استفاده از *لاکتوباسیلوس کازئی* ۴۳۱ و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5

پریزاد توتونچی[۱]، جواد حصاری[۲]، مهران مرادی*[۳] و بهرام فتحی آچاچلویی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹٤/٤/١٤

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز
[۲] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[۳] استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
[٤] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
*مسئول مکاتبه: m.moradi@urmia.ac.ir

چکیده

تولید محصولات پروبیوتیک غیر لبنی توجه ویژه‌ای یافته است. هدف از این مطالعه، ارزیابی میزان زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ٤٣١ و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5 در آب انگور قرمز طی ٤ هفته نگهداری در دمای یخچال است. ابتدا آب انگور قرمز با بریکس °١٥ تهیه و به‌مدت ٤ دقیقه در ٨٠ درجه سانتی‌گراد پاستوریزه گردید. متعاقب تلقیح باکتری‌ها به آبمیوه، تخمیر اولیه به مدت ۳ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس نمونه‌ها بمدت ٤ هفته در دمای٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. زنده‌مانی باکتری‌ها، میزان بریکس، اسیدیته، قند کل و pH نمونه‌های آبمیوه در فواصل هفته‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ اندازه‌گیری گردید. تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بعد از ٤ هفته نگهداری در ٤ درجه سانتی‌گراد به $۲/۱\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر آبمیوه رسید، در حالی‌که آب انگور قرمز شرایط لازم برای زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* را نداشت و تعداد آن در انتهای دوره نگهداری به کمترین میزان خود یعنی ۵×۱۰^{٤} باکتری در هر میلی‌لیتر آبمیوه رسید. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* باعث افزایش اسیدیته در طی نگهداری در یخچال شد ($P\geq ۰/۰۵$) و کاهش بریکس و مصرف قند آن بیشتر از *لاکتوباسیلوس کازئی* بود. نتایج این مطالعه نشان داد که آب انگور قرمز، محصولی مناسب برای تولید آب میوه پروبیوتیک با اضافه شدن باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است ولی این امکان در مورد *لاکتوباسیلوس کازئی* حاصل نگردید.

واژگان کلیدی: آب انگور قرمز، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، پروبیوتیک

مقدمه

غذاهایی که سبب بهبود سلامتی شده و مواد مغذی ضروری بدن را تامین می‌کنند، غذاهای فراویژه[1]نامیده می‌شوند (فراری، ۲۰۰۷). براساس تعریف، باکتری‌های پروبیوتیک، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که پس از مصرف، در روده ساکن شده و از طریق بهبود میکروفلور طبیعی روده، اثرات مفیدی در سلامتی انسان بر جای می‌گذارند (راس و همکاران، ۲۰۰۲؛ بویل‌استون و همکاران، ۲۰۰٤). برای تامین سلامتی، توانایی زنده-ماندن باکتری انتخاب شده در محصول در طول تولید و نگهداری بسیار حائز اهمیت است. در این خصوص، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده مانده در ماده غذایی باید حداقل 10^{6} تا 10^{7} باکتری در گرم یا در میلی‌لیتر باشد تا در تامین سلامتی، مفید واقع شود (دووس و همکاران، ۲۰۱۰). در حال حاضر، اغلب فرآورده‌های پروبیوتیک موجود در بازار را فرآورده‌های لبنی پروبیوتیک تشکیل می‌دهند، اما در سال‌های اخیر، تقاضا برای محصولات پروبیوتیکی بر پایه محصولات غیرلبنی افزایش یافته است. وجود کلسترول، که از ترکیبات عمده در فرآورده‌های لبنی می‌باشد، وجود افراد با خصوصیت عدم تحمل لاکتوز، سبب کاهش مصرف محصولات لبنی می‌شود. اگر جایگزین مناسبی برای محصولات پروبیوتیک بر پایه لبنی برای افراد گیاه‌خوار وجود نداشته باشد، به تدریج پروبیوتیک‌ها با خواص دارویی بسیار بالا جایگاه خود را در بین قشر **وسیعی از افراد جامعه از دست خواهند داد**. میوه‌ها و سبزی‌ها به دلیل غنی بودن از نظر آنتی اکسیدانی، ویتامین‌ها، فیبرهای رژیمی و مواد معدنی در دسته غذاهای سالم قرار می‌گیرند. همچنین میوه‌ها و سبزی‌ها معایب گفته شده برای محصولات لبنی از جمله حساسیت زا بودن را که مانع از کاربرد آن‌ها توسط گروه خاصی از افراد می‌گردد را ندارند. (هننان و همکاران، ۲۰۰٤؛ کارلوس و همکاران، ۲۰۰۷؛ یوون و همکاران، ۲۰۰٦) .

[1] Functional Food

استفاده از سویه‌های مختلف باکتری‌های پروبیوتیک در آب گوجه (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA39*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم C3*، *لاکتوباسیلوس کازئی A4* ، *لاکتوباسیلوس دلبروکی D7*) (یون و همکاران، ۲۰۰٤)، تولید نوشیدنی پروبیوتیکی با استفاده از مالت، جو و مخلوطی از هر دو (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*) (راتورو همکاران، ۲۰۱۱)، آب پرتقال و آب آناناس (*لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس پاراکازئی*) (شیهان و همکاران، ۲۰۰۷)، آب هویج (*بیفیدوباکتریوم لاکتیس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم*) (کن و همکارانش ۲۰۰۸)، آب سیب (شیخ قاسمی و زمردی ۱۳۹۳) آب چغندر (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) (یون و همکاران، ۲۰۰۵)، آب پرتقال و آب گوجه‌فرنگی (*لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG، *لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس فرمانتوم*) (موسوی و آدامز، ۲۰۰۸) و آب انار، گریپ فروت و توت‌فرنگی (*بیفیدوباکتریوم لانگوم*) (نوئالکائکول و همکاران، ۲۰۱۱) مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از این تحقیق، بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس* کازئی در آب انگور قرمز ارگانیک و مطالعه اثرات باکتری‌ها در خواص فیزیکی‌شیمیایی محصول نهایی و در نهایت تولید آب انگور قرمز ارگانیک پروبیوتیک بود.

مواد و روش‌ها

روش تهیه آبمیوه و تلقیح باکتری

کنسانتره آب انگور قرمز ارگانیک از شرکت شادلی تهیه و پیش از استفاده در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کنسانتره آب انگور قرمز ارگانیک با بریکس °٦٥ تا بریکس °١٥ با استفاده از آب مقطر رقیق و سپس به-مدت ٤ دقیقه در۸۰ درجه سانتی گراد به روش استاندارد مورد استفاده در کارخانه، پاستوریزه شد. به

هر ظرف آزمایش حاوی ٤٠٠ میلی‌لیتر، آب انگور قرمز ارگانیک پاستوریزه ریخته و تمامی نمونه‌ها با باکتری تلقیح شد. دوز تلقیح هر دو باکتری پروبیوتیک، ٦×١٠^{٩}-٥ باکتری در هر میلی‌لیتر بود.

آماده کردن باکتری های پروبیوتبک

باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس* کازئی از شرکت کریستین هانسن دانمارک خریداری گردید. بسته‌های حاوی باکتری با دقت در شرایط استریل باز و پس از فعال‌سازی، در کرایوتیوپ‌های مخصوص در دمای ١٨- درجه سانتی-گراد نگهداری گردید. در هر محله، یک گرانول از باکتری در١٠٠ میلی‌لیتر محیط MRS براث، به‌صورت یکنواخت مخلوط و در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. سپس یک میلی‌لیتر از کشت حاصل دوباره به ٩ میلی‌لیتر محیط کشت تازه اضافه و در انکوباتور ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت قرار داده شد. در نهایت سوسپانسون باکتری توسط روش سانتریفوژ در ٤٥٠٠ دور در دقیقه، به‌مدت ٥ دقیقه سانتریفوژ شد، رسوب حاصله از سانتریفوژ جداسازی و در دو مرحله با محلول ٠/١ درصد پپتون-واتر شسته و رسوب باکتری در آب پپتونه ٠/١ درصد حل گردید، سپس جذب نوری باکتری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ٥٩٥ نانومتر تعیین شد. همزمان با تعیین میزان جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر، شمارش باکتریایی به روش شمارش صفحه‌ای سطحی انجام گردید (قاسمی، ١٣٩٢). ٣ تیمار به شرح ذیل آماده گردید: تیمار شاهد (آب انگور قرمز بدون پروبیوتیک)، تیمار آب انگور قرمز ارگانیک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و تیمار آب انگور قرمز حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*. پس از تلقیح باکتری، نمونه‌ها در ٣٧ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٧٢ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. از آبمیوه‌های مورد نظر در فواصل صفر، ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت جهت آنالیزهای شیمیایی و میکروبی نمونه برداری شد. پس از ٧٢ ساعت، نمونه‌ها به مدت ٤ هفته در ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. آنالیزهای شیمیایی و میکروبی مشابه در فواصل هفته‌های ١، ٢، ٣ و ٤ هفته در این مرحله نیز انجام گردید .

آزمایش‌های میکروبی

در فواصل هفته‌های ١، ٢، ٣ و ٤ هفته، ١ میلی‌لیتر نمونه را در ٩ میلی لیتر آب پپتونه ٠/١ درصد هموژن نموده سپس رقت‌های بعدی را در لوله های حاوی آب پپتونه ٠/١ درصد تهیه شد. برای شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از محیط MRS– سوربیتول آگار (١٠ میلی لیتر محلول ١٠ درصد سوربیتول به ٩٠ میلی لیتر محیط کشت قبل از ریختن در پلیت‌ها اضافه شد) کشت داده شد. سپس پلیت‌ها تحت شرایط بی‌هوازی توسط گاز پک نوع C در جار بی‌هوازی، به مدت ٧٢ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند. روند کشت *لاکتوباسیلوس کازئی* مشابه *لاکتوباسیلوس* اسیدوفیلوس بوده با این تفاوت که پلیت‌ها مستقیماً در انکوباتور٣٧ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شد و به محیط کشت آن سوربیتول اضافه نشد (کراسائکوپت و همکاران، ٢٠٠٤؛ دیو و شاه، ١٩٩٧).

آزمایش‌های شیمیایی

اندازه گیری pH

برای تعیین pH، بعد از کالیبره کردن دستگاه pH متر توسط بافر استاندارد ٤ و ٧ ، الکترود pH متر مستقیماً در داخل نمونه‌ها قرار گرفت و pH قرائت گردید (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ٢٦٨٥).

تعیین بریکس (مواد جامد محلول در آب)

پس از تنظیم رفراکتومتر با آب مقطر، چند قطره از نمونه با دمای ٢٠ درجه سانتی‌گراد روی منشور رفراکتومتر قرار گرفت. پس از حذف پراکندگی نوری و ایجاد دو بخش مساوی روشن و تاریک در صفحه نماینگر، غلظت مواد جامد محلول در آب بر حسب بریکس قرائت شد. نتیجه بر حسب گرم در صد گرم

نمونه بیان شد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۲۶۸۵).

اندازه‌گیری اسیدیته

به ۵ گرم از نمونه، مقدار ۲۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه و سپس در مجاورت شناساگر فنل فتالئین، با محلول سود ۰/۱ نرمال، تا ایجاد رنگ صورتی کم رنگ پایدار (به مدت ۳۰ ثانیه)، تیتر شد. اسیدیته بر حسب درصد اسید تارتاریک بیان گردید (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۲۶۸۵).

اندازه‌گیری قند های کل

برای اندازه گیری از روش لین و آینون استفاده گردید (استاندارد ملی ایران به شماره ۲۶۸۵).

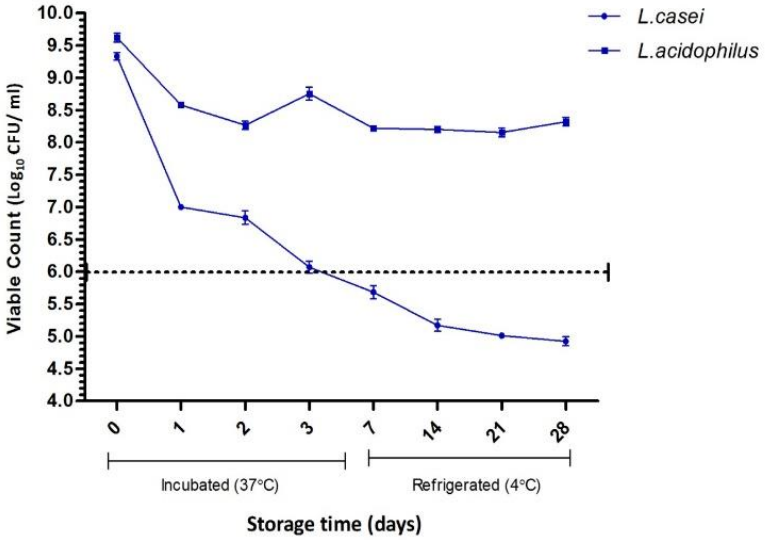
آنالیز آماری

تمامی آزمایشات، در حداقل سه تکرار انجام می گردد. اطلاعات بدست آمده، توسط نرم افزار GraphPad (Version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد. تجزیه تحلیل آماری با رویه ANOVA و تست Newman-Keuls post در سطح معنی دار $P < ۰/۰۵$ انجام گرفت.

نتایج و بحث

قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها

قابلیت ماندگاری و رشد پروبیوتیک‌ها در مرحله انکوباسیون و نگهداری در یخچال در آب انگور قرمز تلقیح شده با ۲ باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل۱- الگوی زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در آب انگور قرمز نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ هفته

نتایج بدست آمده حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین دو باکتری مورد مطالعه در روزهای نگهداری است. مقدار ابتدایی باکتری تلقیح شده حدود $۱۰^{۹} \times ٦-٥$ باکتری در هر میلی‌لیتر بود. در پایان ٤ هفته نگهداری

در ٤ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌های حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بین ۱/۵–۱ سیکل لگاریتمی کاهش نشان دادند یعنی توانستند ماندگاری خود را حفظ کرده و تعداد آن از ۵×۱۰^{۹} باکتری در هر میلی‌لیتر، به حدود $۲/۱\times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر، بعد از ٤ هفته نگهداری در ٤ درجه سانتی‌گراد رسید. در حالی که این کاهش در نمونه‌های حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* ٤/٥–٤ سیکل لگاریتمی بود. به‌طوریکه تعداد باکتری از $۱۰^{۹}\times ٦$ در ابتدا، به ۵×۱۰^{٤} باکتری در هر میلی‌لیتر آبمیوه کاهش یافت که این میزان کمتر از میزان توصیه شده (حداقل $۱۰^{٦}$ در هر میلی‌لیتر) برای محصولات پروبیوتیک است (دووس و همکاران، ۲۰۱۰).

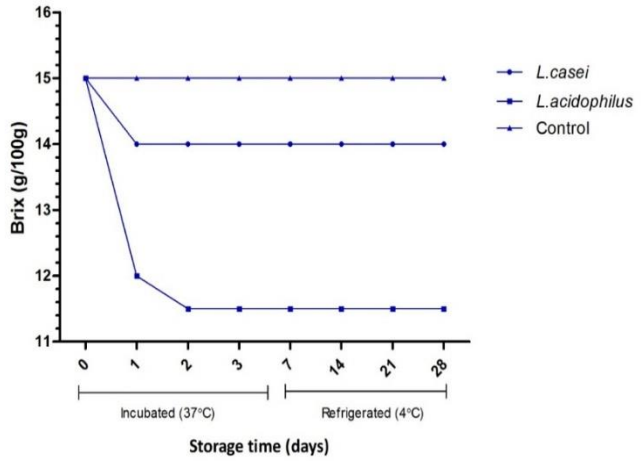
از آنجایکه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* یک باکتری اسیددوست است (رضایی مکرم و همکاران، ۱۳۸۸)، با توجه به نتایج حاصله به‌نظر می‌رسد که محیط آب انگور (از لحاظ pH) برای حفظ تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ماده غذایی مناسبی است. کاهش جمعیت میکروبی در تعداد این باکتری در طی ساعت اولیه‌ی تخمیر مشاهده شد، به‌طوری که بعد از ٤٨ ساعت تخمیر، تعداد باکتری‌ها به $۱/۷\times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر، کاهش یافت. فشار القاء شده به باکتری جهت تطبیق خودش با محیط جدید (به دلیل تمایز مابین محیط پیش کشت و محیط تخمیری) منجر به کاهش سرعت رشد تا ٤٨ ساعت اولیه تخمیر شد. MRS براث به‌عنوان پیش کشت، دارای pH حدود ٥/٦، بود اما pH اولیه آب انگور قرمز نسبتاً پایین و حدود ۳/۸۸ بود. یانز و همکاران، ۲۰۰۸، گزارش کردند که pH پایین محیط می‌تواند منجر به کاهش سرعت رشد حداکثر و افزایش زمان فاز تأخیری گردد. سلول های باکتریایی سعی می‌کنند تا خودشان را با وضعیت جدید وفق دهند. طولانی کردن زمان تخمیر از ٤٨ تا ٧٢ ساعت باعث افزایش در تعداد باکتری‌ها شد، به طوری که تعداد باکتری‌ها در نهایت از $۱/۷\times ۱۰^{۸}$ به حدود ٦×۱۰^{۸} باکتری در هر میلی‌لیتر رسید. شمارش سلول‌های زنده *لاکتوباسیلوس کازئی* پس از ۲ هفته نگهداری در ٤ درجه سانتی گراد $۱/۱\times۱۰^{٦}$ باکتری در هر میلی‌لیتر بود، *لاکتوباسیلوس کازئی* توانایی تحمل pH پائین و شرایط اسیدیته بالا در دیگر آب میوه‌ها از جمله آب کلم تخمیر شده در ٤ درجه سانتی گراد را نیز ندارد و زنده مانی خود را به طور کامل بعد از ۲ هفته نگهداری در سرما از داد (یون و همکاران، ۲۰۰٦). شیخ قاسمی وهمکاران در ۱۳۹۳ نشان دادند که در طول نگهداری تعداد پروبیوتیک‌ها در تیمارهای آب سیب حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌صورت آزاد و کپسوله شده به‌ترتیب دو و یک سیکل لگاریتمی کاهش و در تیماری که pH آن توسط پودر آب پنیر به ٤/٤ تنظیم شده همراه با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، حدود ۰/۵ سیکل لگاریتمی افزایش یافت. تعداد نهایی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در پایان دوره نگهداری در تیمارهای حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به صورت آزاد، کپسوله شده و حاوی پودر آب پنیر به ترتیب ٦/٦، ٧/٦ و ٩/٠٤ سیکل لگاریتمی بود. نمونه حاوی پروبیوتیک آزاد و کپسوله شده از لحاظ خواص حسی با آب سیب شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت.

به‌طورکلی، بقای سلولی بسته به نژادهای مورد استفاده، برهمکنش مابین گونه‌های موجود، شرایط محیط کشت، محتوی اکسیژن، اسیدیته نهایی محصول و غلظت اسید لاکتیک و اسید استیک بستگی دارد (دیکرمن و لیبرمن، ۱۹۵۲). پدرسون و فیشر، ۱۹٤٤ نشان دادند که رشد و بقاء محدود *لاکتوباسیلوس کازئی در* آب کلم به دلیل عدم وجود برخی مواد مورد نیاز برای رشد باکتری و وجود برخی مواد بازدارنده در این ماد غذایی است. مطالعات اولیه نشان داد که ماده‌ای ضدباکتریایی در آب کلم وجود دارد که اثرات ممانعت کنندگی روی باکتری-های پروبیوتیک دارد. عدم رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* در نمونه آب انگور می‌تواند به دلیل حضور برخی ترکیبات باز دارنده از جمله ترکیبات فنولی باشد. در آب میوه‌هایی همچون توت فرنگی، انار و انگور که حاوی

میزان بالایی از این ترکیبات است، رشد و بقاء پروبیوتیک بسیار پایین گزارش شده است (نوئالکائکول و همکاران، ۲۰۱۱). در مطالعه‌ای از آب گوجه به عنوان ماده خام در تولید آب میوه پروبیوتیک از ٤ باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA39*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم C3*، *لاکتوباسیلوس کازئی A4*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی D7*، استفاده گردید. جمعیت سلولی زنده هر ٤ باکتری بعد از ٤٨ ساعت تخمیر در ۳۰ درجه سانتی-گراد به بیش از 1×10^{8} باکتری در هر میلی‌لیتر رسید. طولانی کردن زمان تخمیر از ٤٨ تا ۷۲ ساعت باعث افزایش قابل توجهی در شمارش سلولی زنده نشد. این امر مرتبط با pH پایین و اسیدیته بالا آب گوجه تخمیر شده است (یون و همکاران ۲۰۰٤). موسوی و همکاران (۲۰۱۱)، تولید آب انار پروبیوتیک توسط ٤ نژاد از باکتری‌های اسیدلاکتیک: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم، ل.دلبروکی، ل.پاراکازئی، ل.اسیدوفیلوس* را مورد بررسی قرار دادند باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم و دلبروکی*، در نمونه آب انار در طی زمان نگهداری، زنده‌مانی بیشتر را نسبت به *لاکتوباسیلوس پاراکازئی و اسیدوفیلوس* نشان می‌دهند و شمارش سلول های زنده آنها در طی ۲ هفته نگهداری در ٤ درجه سانتی‌گراد بیشتر از 10^{6} باکتری در هر میلی‌لیتر نمونه است (موسوی و همکاران ۲۰۱۱).

تغییرات بریکس

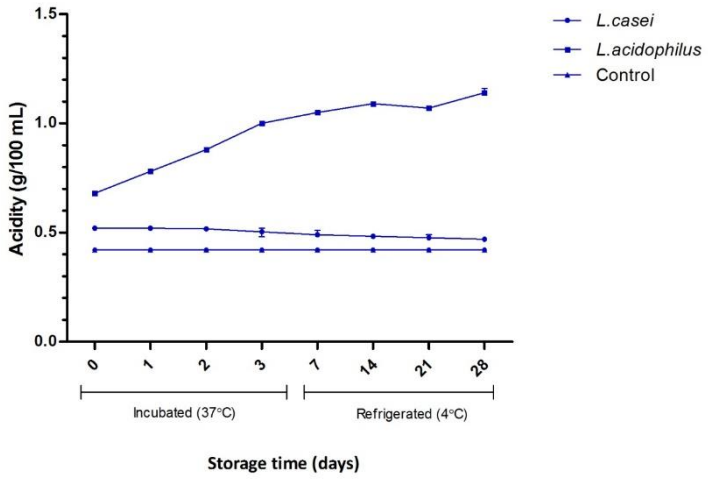
همچنانکه در شکل ۲ آورده شده است، اختلاف معنی-داری در میزان بریکس در روزهای نگهداری بین نمونه-های حاوی دو باکتری مورد مطالعه و بین نمونه کنترل و تیمارها مشاهده شد. بریکس هر دو آبمیوه در ساعت صفر بعد از تلقیح باکتری ۱۵ گرم در ۱۰۰گرم بود. متعاقب اضافه شدن باکتری به آبمیوه و انکوباسیون، مقدار بریکس در هر دو تیمار کاهش یافت که این کاهش در آب انگور حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نسبت به *کازئی* بیشتر بود، به‌طوری که بریکس نهایی نمونه حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بعد از ٤ هفته نگهداری در ٤ درجه، ۱۱/۵ ولی بریکس نهایی نمونه حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* ١٤ گرم در ۱۰۰گرم شد. کاهش چشمگیر در طول ٢٤ ساعت اول انکوباسیون اتفاق افتاد، به طوری که بریکس نمونه آبمیوه حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بعد از ٢٤ ساعت انکوبه-گذاری تا ۱۲ گرم در ۱۰۰گرم کاهش یافت. با توجه به اینکه بریکس شامل مواد جامد محلول در آب است و قندهای موجود در آبمیوه جزئی از بریکس محسوب می‌شوند، با انجام عمل تخمیر توسط باکتری و تبدیل شدن قندها به اسیدهای آلی(اسید لاکتیک) و یکسری ترکیبات فرار، کاهش در مقدار قند و در نهایت کاهش بریکس اتفاق می‌افتد، که با مقایسه شکل ۲ با نتایج اندازه گیری قند کل (شکل۵)، مشخص می‌شود که کاهش چشمگیر مشابهی در مقدار قند در طی ٢٤ ساعت اولیه انکوباسیون اتفاق افتاده است، که به نوعی با کاهش بریکس همگام است. بنابراین علت کاهش بریکس به دلیل مصرف قند توسط پروبیوتیک‌هایی باشد که به صورت آزاد استفاده شدند. (شه و همکاران، ۲۰۱۰)، گزارش کردند که بریکس مدل آب‌میوه‌های مختلف حاوی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بعد از ٦ هفته نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد از ۱۱/۸ به ۹/۱ گرم در ۱۰۰گرم کاهش یافت، که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.



شکل۲- تغییرات بریکس در آبمیوه انگور قرمز حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طی ۳ روز انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۴ هفته نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد

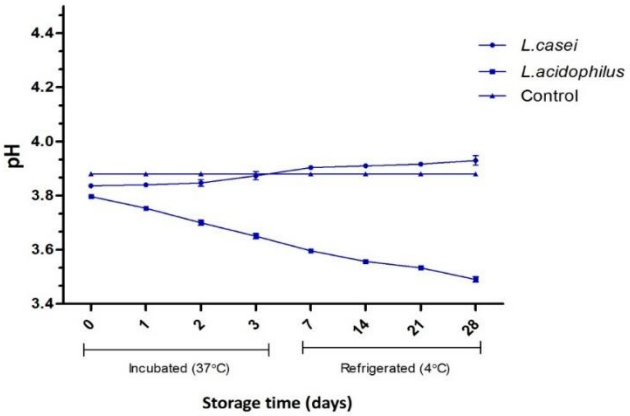
تغییرات اسیدیته و pH

نتایج اسیدیته بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در طول زمان نگهداری نمونه‌ها در بین دو باکتری مورد مطالعه است (شکل ۳). اسیدیته آب انگور قرمز (نمونه شاهد) ۰/۴۲ گرم بر۱۰۰ میلی‌لیتر بود که 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 ۰/۶۹ گرم بر۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در پایان دوره ۱/۱۴ شد، ولی اسیدیته۰/۵۲ گرم بر۱۰۰ میلی‌لیتر ابتدایی آب انگور قرمز تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس کازئی در* انتهای دوره نگهداری کاهش جزئی نشان داده و به ۰/۴۷ گرم بر۱۰۰ میلی‌لیتر رسید.



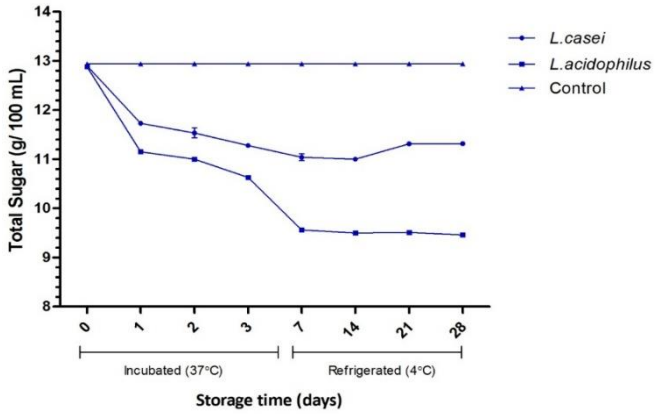
شکل۳- تغییرات اسیدیته در آبمیوه انگور قرمز حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طی ۳ روز انکوباسیون در ۳۷ درجه و ۴ هفته نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد

شکل ٤ تغییرات pH آب انگور قرمز تلقیح شده با ۲ باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را در طول دوره نگهداری و تاثیرات نوع پروبیوتیک بر میزان تغییرات را نشان می‌دهد. نتایج بدست آمده از این شاخص نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌داری در تمامی روزهای نگهداری بین دو باکتری مورد مطالعه است. تغییرات pH در آب انگور قرمز تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس کازئی* در طول نگهداری بسیار جزئی بود و علت آن، به دلیل به فعالیت بالا و قابلیت زنده مانی بیشتر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و توانایی این باکتری در تولید مقادیر بیشتری اسیدلاکتیک نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی* بود. مطالعاتی نشان می‌دهد اختلاف معنی داری بین سویه-های پروبیوتیک در مورد مقاومت آنها در برابر اسید وجود دارد (شیهان و همکاران، ۲۰۰۷) و ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیکی را به تجمع مواد بازدارنده‌ای مثل اسید لاکتیک تولید شده در طی تولید و کاهش pH و نگهداری در سرما، مربوط دانستند (نوئالکائکول و همکاران،۲۰۱۱).



شکل۴- تغییرات pH در آبمیوه انگور قرمز حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طی ۳ روز انکوباسیون در ۳۷ درجه و ۴ هفته نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد

یانز و همکاران، ۲۰۰۸ نیز گزارش کردند که pH پایین محیط می‌تواند منجر به کاهش سرعت رشد و افزایش فاز تأخیری گردد. این مرحله کاملاً برای تمامی گونه-هایی که فعالیت متابولیکی شامل مصرف قند و تولید اسید، پایین دارند قابل شناسایی است و سلول‌های باکتریایی سعی می‌کنند تا خودشان را به وضعیت جدید وفق دهند. این فرضیه در مورد آب انگور قرمز حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* مطابقت دارد، که در آن pH و اسیدیته آبمیوه ثابت باقی مانده و اصلاح و تغییر آن‌ها قابل اغماض می‌باشد. طبق تحقیق موسوی و همکاران، ۲۰۱۱، باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *دلبروکی*، *پاراکازئی* و *اسیدوفیلوس* بلافاصله پس از شروع تخمیر در آب انار قادر به متابولیزه کردن اسید سیتریک هستند، در حالی‌که مصرف قند توسط تمامی گونه‌ها، در این مرحله بسیار پایین‌تر بوده است. این پدیده را می‌توان به دلیل محتوای بسیار پایین قند در آب انار توضیح داد، برخلاف محتوای قندی، آب انار دارای مقادیر قابل ملاحظه اسیدهای آلی مثل اسید سیتریک بود. در نتیجه، گونه‌های باکتریایی اسید سیتریک را به عنوان منبع اصلی کربن موجود در آب انار، متابولیزه می‌کنند (دی‌وریس و استات‌هامر، ۱۹٦۷).



شکل۵ - تغییرات قند کل در آبمیوه انگور قرمز حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طی ۳ روز انکوباسیون در ۳۷ درجه و ۴ هفته نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد

موسوی و همکاران، ۲۰۱۱، گزارش کردند که اسید سیتریک که اسید اصلی شناخته شده در آب انار می‌باشد، به عنوان منبع کربن توسط باکتری مصرف می‌شود و سپس متابولیزه گردیده و منجر به کاهش اسیدیته آبمیوه می‌گردد. تولید متابولیت‌های اسیدی مثل اسیدلاکتیک با ثابت اسیدی بالاتر (PKa=3.86) نسبت به اسید سیتریک (PKa=3.06) که توسط باکتری‌ها مصرف می‌شود نیز می‌تواند این کاهش pH را پشتیبانی کند. هرچند که، غلظت اسید لاکتیک تولید شده جهت پوشش دادن به این کاهش غلظت اسید سیتریک به حد کافی بالا نیست، در نتیجه، کل اسیدیته کاهش می‌یابد که این نیز در مورد نمونه انگور قرمز حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* این مطالعه مطابقت دارد.

نتایج این مطالعه، مشابه نتایج تحقیق یون و همکاران، ۲۰۰۵، می‌باشد که روی آب چغندر تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس* انجام دادند. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ٤٨ ساعت پس از آغاز تخمیر، باعث کاهش شدید pH چغندر از مقدار اولیه ٦/٣ به ٤/٥ گردید. در حالیکه *لاکتوباسیلوس کازئی* pH را حتی بعد از ۷۲ ساعت تخمیر فقط تا ٥ کاهش داد و این به دلیل توانایی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در تولید مقادیر بیشتری اسیدلاکتیک نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی* بود. اسیدیته اولیه آب چغندر ۰/۱۳ بود که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* باعث افزایش اسیدیته تا ۰/٥٦ بعد از ۷۲ ساعت تخمیر شد در حالیکه این مقدار در مورد *لاکتوباسیلوس کازئی* ۰/۲۵بود. همچنین یون و همکاران، ۲۰۰٦، سه باکتری اسید لاکتیکی شامل *لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس دلبروکی* را از جهت توانایی‌شان برای تولید آبمیوه پروبیوتیک کلم مورد آزمایش قرار دادند. هم *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و هم *لاکتوباسیلوس دلبروکی* نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی*، اسیدیته قابل تیتر بیشتری به صورت اسید لاکتیک تولید کردند. میزان تولید اسید لاکتیک توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* ۷۲ ساعت پس از تخمیر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، یک درصد بود در حالی که در شرایط مشابه این میزان در مورد، *لاکتوباسیلوس کازئی* ۰/۷٤ درصد گزارش گردید.

قند کل

تغییرات قند کل آب انگور قرمز تلقیح شده با ۲ باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس* در طول دوره نگهداری و تاثیرات نوع پروبیوتیک بر میزان تغییرات در شکل ٥ آورده شده است. کاهش در مقدار قند طی انکوباسیون و نگهداری نمونه مشاهده گردید. روند

کاهش مقدار قند در نمونه‌های حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی* بیشتر بود به‌طوری که از میزان اولیه ۱۲/۹٤ گرم در۱۰۰ میلی‌لیتر در روز صفر به ترتیب به ۹/٤٦ و ۱۱/۳ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر در انتهای دوره کاهش یافت، که ناشی از قابلیت زنده‌مانی بیشتر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی* در این آبمیوه می‌باشد. در مطالعه انجام شده توسط یون و همکاران، ۲۰۰٤، تغییر در محتوای قند و شمارش سلول‌های زنده در طی تخمیر آب گوجه توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس دلبروکی* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری‌ها باعث کاهش محتوی قند در طی تخمیر آب گوجه پس از ۷۲ ساعت تخمیر، شدند و شمارش سلول‌های زنده آنها در طی٤ هفته نگهداری در ٤ درجه سانتی‌گراد بیشتر از10^{6}باکتری در هر میلی‌لیتر نمونه بود. کاهش در میزان قند کل مشابهی در استفاده از *لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس دلبروکی در آب کلم گزارش شده است* (یون و همکاران، ۲۰۰٦).

نتیجه‌گیری

با وجود مطالعات بیشمار انجام شده در خصوص کاربرد مفید باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات غذایی غیر لبنی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تولید آب انگور قرمز، تنها با استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس میسر بوده و لاکتوباسیلوس کازئی کارایی* لازم برای استفاده در این محصول مفید از لحاظ تغذیه‌ای را ندارد. البته این ادعا نیاز به انجام مطالعات تکمیلی از جمله بررسی برهمکنشی بین باکتری با ترکیبات آبمیوه از جمله ترکیبات فنلی دارد. کاربرد، دیگر باکتری‌های پروبیوتیک در این محصول نیز می-تواند زمینه مناسبی برای تکمیل این ایده باشد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تبریز و شرکت اروم نارین (شادلی) انجام پذیرفته است. بدینوسیله از مدیریت و کارکنان این شرکت قدرانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

رضائی مکرم ر، مرتضوی ع، حبیبی نجفی م. ب، شهیدی ف و خمیری م، ۱۳۸۸. اثر میکروانکسپولاسیون آلژینات کلسیم در قابلیت زنده مانی *لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس* در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده انسان. هیجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران. مشهد.-۹٤-۹۳.

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۷۱. ویژگیها و روشهای آزمون میکروبیولوژی، شماره ۳٤۱٤.

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷. آبمیوه: ویژگی‌ها و روش‌های آزمون، شماره ۲٦۸٥.

شیخ قاسمی ش و زمردی ش، ۱۳۹۳. تاثیر کپسوله کردن بر زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و خواص کیفی آب سیب در طول نگهداری در دمای محیط. فصلنامه علوم و تغذیه. دوره ۱۱ شماره ۳، صفحات ۸۱-۹۰.

Boylston T D, Vinderola C G, Ghoddusi H B and Reinheimer J A, 2004. Incorporation of *bifodobacterium* into cheeses: challenges and rewards. International Dairy Journal 14: 375–387.

Carlos K, Ferrai B and Faculdades, C. 2007. Functional food and physical activities in health promotion of again people. Maturitas 58: 327-339.

Dave R I and Shah N P, 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy Journal 7: 31-41.

De Vos P, Faas M M, Spasojevic M and Sikkema J, 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. International Dairy Journal 20: 292-302.

Dickerman J M and Liberman S, 1952. Studies on the chemical nature of an antibiotic present in water extracts of cabbage. Journal of Food Science 17: 438-441.

Ferrari C K, 2007. Functional foods and physical activities in health promotion of aging people. Maturitas, 58: 327-339.

Heenan C N, Adams M C, Hosken, R W and Fleet G H, 2004. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a no fermented frozen vegetarian dessert. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology 37: 461–466.

Krasaekoopt W, Bhandari B and Deeth H, 2004. The Influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. International Dairy Journal 14: 737-743.

Kun S, Judit M and Rezessy-Szabo´ D 2008. Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. Process Biochemistry 43: 816–821.

Moussavi M P and Adams H, 2008. a study on the survival of probiotic *Lactobacilli* in tomato and orange juice. Asia Pacific Journal of Nutrition 17: 141-142.

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: 123-128.

Nualkaekul S and Charalampopoulos D, 2011. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. International Journal of Food Microbiology 146: 111–117.

Nualkaekul S, Salmeron I and Charalampopoulos D, 2011. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. Food Chemistry 129: 1037–1044.

Pederson C S and Fisher P, 1944. The bactericidal action of cabbage and other vegetable juices. New York State AgricExptSta Bull, 273.

Rathore S, Ivan Salmeron S and Pandiella S, 2011. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with *lactic acid bacteria* cultures. Food Microbiology 30: 239-244.

Ross R P, Fitzgerald G, Collins K and Stanton C, 2002. Cheese delivering biocultures: probiotic cheese. Australian Journal of Dairy Technology 57: 71-78.

Shah N P, Ding W K, Fallourd M J and Leyer G, 2010. Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants, Journal of Food Science 75: M278-82.

Sheehan V M, Ross P and Fitzgerald G F, 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices, Innovative Food Science and Emerging Technologies 8: 279–284.

Yanez R, Marques S, Gírio F M and Roseiro J C, 2008. The effect of acid stress on lactate production and growth kinetics in *Lactobacillus rhamnosus* cultures. Process Biochemistry 43: 356-361.

Yoon K Y, Edward E, Woodams E E and Hang Y D, 2004. Probiotication of tomato juice by *Lactic Acid Bacteria*. Journal of Microbiology 42: 315-318.

Yoon K Y, Woodams E E and Hang Y D, 2005. Fermentation of beet juice by beneficial *lactic acid bacteria*. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 38: 73–75.

Yoon K Y, Woodams E E and Hang Y D, 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. Bioresource Technology 97: 1427–1430.

Production and evaluation of probiotic red grape juice by *Latobacillus acidophilus* LA5, and *Lactobacillus casei*

P Totonchi[1], J Hesari[2], M Moradi[3*] and B Fathi Achacheoie[3]

Received: December 04, 2014 Accepted: July 05, 2015

[1]MSc Graduated Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
*Corresponding author: E-mail: m.moradi@urmia.ac.ir

Abstract

Production of probiotic non-dairy food has a great attention. The objective of this study was to investigate the survival of *Lactobacillus acidophilus* type LA-5 and *L. casei* type 431 in red grape juice during storage at refrigerated condition for 4 weeks. Red grape juice with Brix 15° prepared and pasteurized at 80 ºC for 4 min. A preliminary fermentation of juice containing both bacteria was done at 37 ºC for 3 days was done and all treatments were maintained at 4 ºC for 4 weeks. Survival of bacteria, Brix, titrable acidity, pH, and total sugar contents were measured during fermentation and storage period. The results showed that after 4 weeks of storage at 4 ºC, the viable cell counts of *L. acidophilus* were stabilized at 2.1×10^8 cfu/mL, while *L. casei* did not survive the low pH and high acidity conditions in red grape juice and declined to its lowest level as 5×10^4 cfu/mL. The results also showed that *L. acidophilus* made increase in acidity during the stages of fermentation ($P\geq 0.05$) and the storage time and the sugar consumption and reducing of Brix was also higher in *L. acidophilus* compared with *L. casei.* It is concluded that red grape juice could serve as a raw material for the production of probiotic juice by *L. acidophilus* as compared by incorporating *L. casei*.

Keywords: Red grape juice, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, Probiotic