

تولید میزان اسید گلوکورونیک بالا در نوشابه تخمیری کومبوچا تحت شرایط محیطی

فرانک بیگ محمدی^{a*}، احمد کرباسی^b، زهرا بیگ محمدی^c

^a عضو هیأت علمی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد صحنه

^b دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

^c کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه گرگان

چکیده

مقدمه: نوشابه کومبوچا فرآورده‌ای تخمیری است که از تخمیر چای شیرین توسط قارچ کومبوچا تولید می‌شود. یکی از ترکیبات مهم این نوشابه مغذی، که در سم‌زدایی از بدن و پیشگیری از سرطان موثر است، اسید گلوکورونیک می‌باشد. با توجه به اهمیت این ترکیب در نوشابه تخمیری مذکور هدف از این تحقیق بررسی تاثیر شرایط محیطی مانند pH، دما، زمان و بستره قندی در میزان تولید اسید گلوکورونیک نوشابه کومبوچا پایه‌گذاری گردید.

مواد و روش‌ها: پس از بررسی خالص بودن قارچ کومبوچا، نوشابه کومبوچا در شرایط محیطی مختلف یعنی pH در سه سطح ۴، ۵ و ۶، دما در سه سطح ۲۵، ۳۰ و ۳۵°C، زمان در سه سطح ۳، ۵ و ۷ روز و بستره‌های قندی گلوکز مایع، ملاس چغندر قند و ساکارز تهیه گردید. پس از اتمام مراحل تخمیر میزان اسید گلوکورونیک با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۸۰ نانومتر و در حضور معرف نفتورزورسینول اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: با استفاده از آزمون دانکن میانگین غلظت‌های اسید گلوکورونیک مقایسه شد و نتیجه گرفته شد که بین غلظت اسید گلوکورونیک حاصل از ساکارز با گلوکز مایع در سطح اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. با استفاده از برنامه آماری MATLAB شرایط بهینه برای رشد قارچ کومبوچا و تولید میزان بیشتر اسید گلوکورونیک در دمای ۳۱°C با قند ساکارز در pH=۶ به مدت ۷ روز تخمیر به میزان ۵/۴۴ میلی گرم در لیتر گزارش شد که بیش از مقدار گزارش شده توسط Blanc (۲۰ میلی گرم در لیتر) در سال ۱۹۹۶ بود.

نتیجه‌گیری: در تخمیر نوشابه کومبوچا نوع بستره قندی، pH، زمان و دما همگی موثر هستند. نتایج نشان دادند که می‌توان از نوشابه کومبوچایی که تحت شرایط کنترل شده تخمیر می‌شود، به عنوان یک نوشیدنی سالم و مغذی استفاده نمود چراکه بالا بودن میزان اسید گلوکورونیک در نوشابه کومبوچا می‌تواند خاصیت درمانی به ویژه سم‌زدایی و ضد سرطان بودن آن را توجیه نماید.

واژه‌های کلیدی

اسید گلوکورونیک، نوشابه کومبوچا

مقدمه

نوشابه کومبوچا فرآورده تخمیری است که توسط قارچ کومبوچا به دست می آید. این نوشیدنی ساده و تقریباً ارزان قیمت ترکیبی از چای معمولی و شکر بوده، با استفاده از قارچ کومبوچا تخمیر شده و ساختار شیمیایی آن تغییر می کند. پژوهشگران معتقدند که نوشابه کومبوچا یک ماده غذایی مکمل به حساب می آید و مصرف آن سیستم دفاعی بدن را تقویت کرده و موجب جلوگیری از بیماری ها می شود. به اعتقاد محققان ۳۵ درصد سرطان مربوط به فاکتورهای رژیم است و به دلیل این که نوشابه کومبوچا سبب بهبود سیستم گوارشی می شود، به عنوان یک فاکتور مثبت در درمان سرطان دستگاه گوارش شناخته شده است. اکثر مردم دنیا ادعا دارند که نوشابه کومبوچا سبب رهایی آن ها از دردهای فیزیکی می شود. نوشابه کومبوچا نام های بسیاری دارد که از این نام ها می توان به منشاء آن پی برد. در چین به نام Kargosok، در ژاپن و آلمان Kombucha، در برزیل Marine alga، در روسیه Tea kvass و در منچوری به نام Manchurian mushroom شناخته شده است. با توجه به این که نوشابه کومبوچا یک نوشیدنی مغذی و نشاط آور می باشد و تاکنون تنها منبع غذایی شناخته شده حاوی اسید گلوکورونیک است و اسید گلوکورونیک نقش مهمی در سم زدایی بدن توسط کبد دارد و با توجه به این مسئله که امروزه مردم در شرایط آلودگی شدید محیط زیست زندگی می کنند، غذاهای آلوده به مواد شیمیایی، الکل، توتون، مواد غذایی کنسرو شده، غذاهای مانده، آب و گیاهانی که از طریق کودهای شیمیایی و مواد دیگر آلوده شده اند، بار سنگینی را به کبد تحمیل می کند. این در حالی است که بخشی از مواد دارویی، از جمله جیوه ای که در مواد دندان پزشکی وجود دارد بر دامنه مسمومیت های داخلی بدن می افزاید و به دلیل عدم توانایی کبد در تولید اسید گلوکورونیک به اندازه کافی، آلودگی های ایجاد شده در بدن باعث بیماری های مختلف و مهلک می شود. علاوه بر آن اسید گلوکورونیک موجود در این نوشیدنی که در اثر تخمیر ایجاد می شود برای ساخت پلی ساکاریدهای مهم مانند اسید هیالارونیک به کار می رود که وجود

آن برای اتصال بافت ها مفید است (Hesseltine, 1965 ; Greenwalt, 1998). تحقیقات بعدی در مورد نوشابه کومبوچا نشان داد که اثرات این نوشیدنی تخمیر شده بسیار بیشتر از چیزی است که شناخته شده است. پژوهش های انجام شده وجود مقدار زیادی اسید گلوکورونیک در ترکیبات آن را نشان داد. این اسید در آزمایشگاه و به طور مصنوعی قابل تولید نیست، اما کبد یک انسان سالم قادر است آن را تولید کند. این اسید در بدن انسان به عنوان یک پادزهر عمل می کند و قادر است تاثیر تمام سمومی را که توسط میکروب های بیماری زا در بدن تولید می شود، را از میان ببرد و از طریق سیستم دفع آن ها را از بدن خارج سازد. وجود اسید گلوکورونیک در کومبوچا بیش از هر چیز دیگری مورد توجه سرطان شناسان قرار گرفته و سرطان شناسان روسی به مطالعه و تحقیق در این مورد پرداختند (Dufresne & Farnworth, 2000).

قارچ کومبوچا به صورت یک توده هم زیست از مخمر و باکتری بوده و جزء خانواده قارچ ها می باشد که به صورت یک صفحه مسطح، صاف و لزج است. با هر فرایند تخمیر یک لایه جدید بر روی این صفحه ایجاد می شود که قابل جدا شدن از لایه قبل می باشد. این قارچ ابتدا به صورت ورقه نازکی بر روی سطح چای قرار می گیرد و سپس ضخیم می شود. تاکنون میکروارگانیسم های زیر قارچ کومبوچا جدا شده اند. باکتری های *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium glutanicum*, *Acetobacter aceti* spp. *xylinum*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter Acetobacter pasteurianus*, *aceti*, و مخمرهای *Zygosaccharomyces bailii*, *Berttanomyces Saccharomyces ludwigii bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pishia*, *Candia krusei*, *Candida kefyer*, از این توده زیستی تفکیک شده اند. دانشمندان معتقدند که علاوه بر میکروارگانیسم های فوق مخمرهای دیگری که هنوز شناخته نشده اند، نیز در قارچ کومبوچا وجود دارند. تاکنون ترکیبات زیادی از

اسید گلوکونیک، فروکتوز، اسید سوکسینیک، اسید ایتاکونیک، اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید پروپیونیک و اسید آسکوربیک از این نوشابه تخمیری جدا شد. همچنین با بررسی ساختمان میکروسکوپی قارچ کومبوچا، میکروارگانیسم‌های *Saccharomyces cerevisiae* و *xylum* ایزوله شد. ترکیب مخمر موجود در قارچ کومبوچا بسته به شرایط محیط متفاوت است (Steinkraus, 1996).

اسید گلوکونیک در واقع با سموم موجود در بدن ترکیب شده آن‌ها را به ترکیبات قابل حل در آب تبدیل کرده و سپس حذف می‌کند. این واکنش توسط آنزیم UDP-Glucuronyltransferase که در همه ارگان‌های بدن از جمله قلب، کلیه، غده فوق کلیوی و تیموس وجود دارد، تسریع می‌شود. آنزیم دیگری به نام گلوکوروئیداز وجود دارد که عمل آن عکس آنزیم قبلی است، یعنی ترکیب اسید گلوکونیک را می‌شکند. این واکنش توسط ساکارولاکتون کنترل می‌شود. با این عمل اسید گلوکونیک آزاد شده دوباره جذب می‌شود و با مواد سمی ترکیب تشکیل می‌دهد (Blanc, 1996).

با توجه به این که اسید گلوکونیک نقش بسیار مهمی در سوخت و ساز بدن به ویژه فعالیت کبد ایفا می‌کند، هرچه میزان اسید گلوکونیک در نوشابه کومبوچا بیشتر باشد، ارزش غذایی و دارویی آن بیشتر است. در این تحقیق، تاثیر شرایط محیطی مانند pH، دما، بستره قندی و مدت زمان تخمیر به منظور بهینه سازی میزان تولید اسید گلوکونیک بررسی شد.

مواد و روش‌ها

- بررسی خالص بودن قارچ کومبوچا

جهت تایید خالص بودن قارچ کومبوچا و عدم آلودگی آن به قارچ‌های مولد مایکوتوکسین، قارچ کومبوچا روی محیط کشت YGC آگار کشت داده شد. با در نظر گرفتن اسیدیته‌ای که این قارچ ایجاد می‌کند خوشبختانه مشکل آلودگی به باکتری‌های بیماری‌زا وجود ندارد. آلودگی به اسپریلوس می‌تواند بیشترین اثر سوء را داشته باشد. به همین دلیل از محیط کشت YGC آگار که محیط کشت عمومی برای رشد کپک و مخمر است به روش سطحی استفاده شد.

نوشابه کومبوچا جدا شده اند که می‌توان به اسید استیک، اسید کربنیک، اسید فولیک، اسید گلوکونیک، اسید لاکتیک، اسید اگزالیک، اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید بوتیریک، اسید نوکلئیک، اتانول، آنتی بیوتیک، دی اکسید کربن، ویتامین ث، ویتامین‌های گروه B شامل B₁، B₂، B₆ و B₁₂ اشاره کرد (Sievers et al., 1996; Mayser et al., 1995; Toeh et al., 2004).

اسید گلوکونیک که یکی از ترکیبات مهم نوشابه کومبوچا است به دلیل خاصیت سم‌زدایی اش از اهمیت بسیاری برخوردار است. این اسید در واقع UDP-glucuronic acid بوده که فرم فعال اسید گلوکونیک است، با مواد سمی ترکیب شده و آن‌ها را در آب محلول ساخته و قدرت جداسازی آن‌ها را از بدن داراست. جذب مواد سمی توسط آنزیم UDP-glucuronyltransferase که در ارگان‌های اصلی بدن از جمله قلب، کلیه، غده فوق کلیوی و تیموس است، تسریع می‌شود.

اسید گلوکونیک دارای سه عملکرد عمده در بدن است:

الف) سم‌زدایی از بدن از طریق ترکیب شدن و حذف آن‌ها

ب) انتقال هورمون و سایر مواد مهم از طریق ترکیب شدن با آن‌ها و آزاد کردن آن‌ها در محل موردنظر

ج) ترکیب واسطه در تولید ویتامین ث (Thomson, 2006; Dufresne & Farnworth, 2000)

کشت *Clostridium botulinum* در محیط حاوی نوشابه کومبوچا، سبب غیرفعال شدن باکتری می‌شود. برخی از ترکیبات چای سیاه و سبز از جمله کاتچین دارای خاصیت ضدباکتریایی بوده که تحت تاثیر تخمیر خاصیت آن تشدید می‌شود. کاتچین دارای خاصیت آنتی اکسیدان، ضدسرطان، ضد دیابت و ضد تصلب شرایین است و در محیطی که که حاوی اسید استیک و اسید گلوکونیک باشد خواص خود را بهتر اعمال می‌کند (Yokihiko & Watanabe, 1989).

در تجزیه نوشابه کومبوچا با HPLC و MS ترکیباتی مانند اسید سیتریک، اسید گلوکونیک،

- تهیه نوشابه کومبوچا در شرایط محیطی مختلف در تمامی آزمایشات مقدار قند ثابت و به میزان ده درصد مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به میزان مواد جامد محلول در آب (بریکس) گلوکز مایع که ۳۷/۲ درصد بوده، برای تهیه نوشابه کومبوچا ۲۶۸/۶ گرم از گلوکز مایع، با توجه به میزان مواد جامد محلول در آب ملاس چغندر قند که ۴۰/۶ بود ۲۴۶/۳ گرم و از ساکارز ۱۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه نوشابه کومبوچا در شرایط کاملاً سترون به یک لیتر آب در حال جوش به میزان مورد نیاز از بستره قندی اضافه شد. بعد از این که مخلوط ۵ دقیقه جوشید، ظرف را از روی شعله برداشته و ۱۰ گرم چای سیاه گلستان به آن اضافه کرده و فرصت داده تا چای دم بکشد. پس از دم کشیدن و جدا کردن تفاله با استفاده از اسید سیتریک pH در سه سطح ۴، ۵ و ۶ تنظیم شد در شرایط کاملاً سترون قارچ کومبوچا به آن اضافه شد. درب ظرف با پارچه کتان استریل پوشیده شد تا هوا برای تنفس قارچ وارد ظرف شود. این مایع در محیطی تاریک در سه سطح دمای ۲۵°C، ۳۰°C، ۳۵°C در سه سطح زمانی ۳، ۵ و ۷ روز نگهداری شد (Rodrigues et al., 2006).

- روش اندازه‌گیری اسید گلوکوروبیک

بعد از اتمام مراحل تخمیر میزان اسید گلوکوروبیک به روش زیر اندازه‌گیری شد: ۲ میلی لیتر نوشابه کومبوچا با ۲ میلی لیتر معرف نفتورزوسینول و ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ در لوله آزمایش ریخته شد. برای تهیه بافر از ۲ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. درب لوله‌ها بسته شد و در حمام آب جوش به مدت ۳۰ دقیقه و پس از آن در حمام آب ۰°C به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد. سپس ۱۰ میلی لیتر استات اتیل به آن اضافه شد و بمدت ۳۰ ثانیه شدیداً بهم زده شد. لایه استات اتیل جدا شده و میزان جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر JENWAY مدل 6405 UV/VIS در طول موج ۵۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Inoue & Miyawak, 1975; Fishman & Green, 1955; Nir, 1964)

- منحنی استاندارد گلوکوروبیک

غلظت‌های ۵ تا ۵۰ میلی گرم از اسید گلوکوروبیک استاندارد تهیه شده، جذب آن در ۵۸۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و سپس منحنی استاندارد آن رسم شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

از طرح کاملاً تصادفی برای تجزیه و تحلیل استفاده شد و برای این منظور نرم افزار آماری SPSS و روش آماری Backward استفاده شد و برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد.

یافته‌ها

با کشت قارچ کومبوچا در محیط کشت YGC اگر پرگنه‌های سفیدرنگ و ریزی تشکیل شد که مربوط به مخمر و باکتری‌ها بود و رشد هیچ‌گونه کپکی مشاهده نشد. همچنین بررسی میکروسکوپی موید وجود باکتری و مخمر بود. برخی از مخمرها جوانه‌دار بود که مربوط به تکثیر قارچ کومبوچا و تشکیل یک لایه جدید بر روی لایه قبلی می‌باشد.

در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ نتایج حاصل از میزان غلظت اسید گلوکوروبیک در محیط‌های حاوی گلوکز مایع در pHهای چهار، پنج و شش و در جداول ۴، ۵ و ۶ نتایج حاصل از میزان غلظت اسید گلوکوروبیک در محیط‌های حاوی ساکارز در pHهای ۴، ۵ و ۶ در روزهای سوم، پنجم و هفتم بر حسب میلی گرم بر لیتر نشان داده شده است. نتایج حاصل از نمونه تیمار حاوی قند ملاس نشان داد احتمالاً این ماده دارای ترکیباتی بوده که از رشد باکتری و مخمر موجود در این قارچ جلوگیری کرده و سبب کاهش رشد آن می‌شود. بنابراین نمونه‌هایی که حاوی قند ملاس بودند تخمیری در آن‌ها صورت نگرفته بود، یا تخمیر آن خیلی کم بود و مورد قبول واقع نشد. از طرفی چون قند ملاس تیره بود در اسپکتروفتومتری مشکل ایجاد کرد بنابراین آزمایش با دو قند ساکارز و گلوکز مایع ادامه یافت.

جدول ۱- غلظت اسید گلوکوروبونیک با گلوکز مایع در pH=۴ در زمان های متفاوت

دما (°C)	زمان (روز)	غلظت اسید گلوکوروبونیک (mg/L)
۳۵	۳	۷ / ۶
۳۰	۳	۱۵ / ۴
۲۵	۳	۱۰ / ۹
۳۵	۵	۲۱ / ۷
۳۰	۵	۲۰ / ۵
۲۵	۵	۲۴ / ۰
۳۵	۷	۲۲ / ۰
۳۰	۷	۲۳ / ۵
۲۵	۷	۳۸ / ۹

جدول ۲- غلظت اسید گلوکوروبونیک با گلوکز مایع در pH = ۵ در زمان های متفاوت

دما (°C)	زمان (روز)	غلظت اسید گلوکوروبونیک (mg/L)
۳۵	۳	۱۹ / ۱
۳۰	۳	۱۲ / ۵
۲۵	۳	۱۱ / ۲
۳۵	۵	۲۲ / ۱
۳۰	۵	۱۳ / ۹
۲۵	۵	۱۵ / ۵
۳۵	۷	۲۷ / ۰
۳۰	۷	۱۴ / ۵
۲۵	۷	۱۷ / ۹

بحث

میزان تولید اسید گلوکوروبونیک با گلوکز مایع در pH = ۴ در زمان های متفاوت

همان طور که جدول ۱ نشان می دهد با افزایش زمان غلظت اسید گلوکوروبونیک افزایش یافته است. فاکتورهای موثر در غلظت اسید گلوکوروبونیک مجذور زمان و تاثیر متقابل مجذور زمان در دما بودند. مجذور زمان تاثیر معنی داری بر غلظت اسید گلوکوروبونیک داشت، بنابراین تاثیر زمان هم معنی دار بود. در تاثیر متقابل بین مجذور زمان و دما رفتار پیچیده ای مشاهده شد. بدین ترتیب با ثابت نگه داشتن زمان اگر دما افزایش یابد، غلظت اسید گلوکوروبونیک ابتدا افزایش و سپس کاهش می یابد. ضریب F مشخص کرد که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p=۰/۰۰۵) معنی دار است و به احتمال بیش از ۹۵ درصد بین فاکتورهای فوق

با غلظت اسید گلوکوروبونیک رابطه معنی دار وجود دارد. ضریب همبستگی یا R² مشخص کرد که بین فاکتورهای فوق و غلظت اسید گلوکوروبونیک همبستگی ۰/۸۳۲ وجود دارد.

میزان تولید اسید گلوکوروبونیک با گلوکز مایع در pH = ۵ در زمان های متفاوت

همان طور که جدول ۲ نشان می دهد زمان به تنهایی تاثیر معنی داری در غلظت اسید گلوکوروبونیک نداشته و تاثیر دما نیز معنی دار بود. با افزایش دما غلظت اسید گلوکوروبونیک ابتدا با شیب ملایم و سپس با شیب تندی افزایش می یابد. فاکتورهای دما، مجذور دما و تاثیر متقابل مجذور دما و زمان تاثیر معنی داری در غلظت اسید گلوکوروبونیک داشتند. در تاثیر متقابل بین مجذور دما و زمان رفتار پیچیده ای مشاهده شد. بدین ترتیب که در زمان ثابت با افزایش دما، غلظت اسید گلوکوروبونیک افزایش یافت.

جدول ۳- غلظت اسید گلوکورونیک با گلوکز مایع در pH=6 در زمان‌های متفاوت

غلظت اسید گلوکورونیک (mg/L)	زمان (روز)	دما (°C)
۱۴ / ۶	۳	۳۵
۸ / ۵	۳	۳۰
۱۴ / ۲	۳	۲۵
۱۷ / ۰	۵	۳۵
۲۱ / ۲	۵	۳۰
۲۶ / ۱	۵	۲۵
۲۸ / ۶	۷	۳۵
۲۶ / ۰	۷	۳۰
۲۶ / ۱	۷	۲۵

جدول ۴- غلظت اسید گلوکورونیک با ساکارز در pH=4 در زمان‌های متفاوت

غلظت اسید گلوکورونیک (mg/L)	زمان (روز)	دما (°C)
۱۸ / ۸	۳	۳۵
۴۲ / ۴	۳	۳۰
۱۷ / ۰	۳	۲۵
۲۳ / ۷۰	۵	۳۵
۴۳ / ۳	۵	۳۰
۱۸ / ۷	۵	۲۵
۲۷ / ۹	۷	۳۵
۴۴ / ۰	۷	۳۰
۲۲ / ۵	۷	۲۵

فاکتورهای دما، زمان و تاثیر متقابل مجذور زمان بر دما و تاثیر متقابل مجذور دما بر زمان تاثیر معنی‌داری بر غلظت اسید گلوکورونیک داشتند. با افزایش زمان غلظت اسید گلوکورونیک افزایش یافت. در تاثیر متقابل بین دما و زمان رفتار پیچیده‌ای مشاهده شد. در زمان ثابت با افزایش دما، غلظت اسید گلوکورونیک افزایش یافت و در دمای ثابت با افزایش زمان، غلظت اسید گلوکورونیک ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. ضریب F مشخص کرد که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p=0/035$) رگرسیون معنی‌دار است و به احتمال بیش از ۹۵ درصد بین فاکتورهای فوق با غلظت اسید گلوکورونیک رابطه معنی‌دار وجود دارد. ضریب همبستگی یا R^2 مشخص کرد که بین فاکتورهای دما، زمان و تاثیر متقابل آن‌ها با غلظت اسید گلوکورونیک همبستگی ۰/۹۸۸ وجود دارد.

ضریب F مشخص کرد که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p=0/001$) رگرسیون معنی‌دار است و به احتمال بیش از ۹۵ درصد بین فاکتورهای فوق با غلظت اسید گلوکورونیک رابطه معنی‌دار وجود دارد. ضریب همبستگی یا R^2 مشخص کرد که بین فاکتورهای فوق و غلظت اسید گلوکورونیک همبستگی ۰/۹۴۴ وجود دارد.

میزان تولید اسید گلوکورونیک با گلوکز مایع در pH = 6 در زمان‌های متفاوت

همان‌طور که جدول ۳ نشان می‌دهد غلظت اسید گلوکورونیک تحت تاثیر هر دو فاکتور دما و زمان و تاثیر متقابل آن‌ها قرار گرفت. تاثیر زمان به مراتب بیشتر از دما می‌باشد و تاثیر افزایش زمان در افزایش میزان اسید گلوکورونیک در مقایسه با افزایش دما در این جدول به خوبی دیده می‌شود.

جدول ۵ - غلظت اسید گلوکورونیک با ساکارز در pH=۵ در زمان‌های متفاوت

دما (°C)	زمان (روز)	غلظت اسید گلوکورونیک (mg/L)
۳۵	۳	۲۲ /۷
۳۰	۳	۲۰ /۸
۲۵	۳	۲۲ /۳
۳۵	۵	۲۴ /۳
۳۰	۵	۲۴ /۲
۲۵	۵	۲۳ /۹
۳۵	۷	۲۵ /۸
۳۰	۷	۲۵ /۳
۲۵	۷	۲۹ /۴

جدول ۶ - غلظت اسید گلوکورونیک با ساکارز در pH=۶ در زمان‌های متفاوت

دما (°C)	زمان (روز)	غلظت اسید گلوکورونیک (mg/L)
۳۵	۳	۱۸
۳۰	۳	۳۰ /۸
۲۵	۳	۱۹ /۳
۳۵	۵	۳۹ /۵
۳۰	۵	۳۶ /۰
۲۵	۵	۲۷ /۷
۳۵	۷	۴۳ /۶
۳۰	۷	۳۸ /۴
۲۵	۷	۲۹ /۹

افزایش دما، غلظت اسیدگلوکورونیک ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. ضریب F مشخص کرد که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p=0/000$) معنی دار است و ضریب همبستگی یا R^2 مشخص کرد که بین فاکتورهای T و T^2 و غلظت اسیدگلوکورونیک همبستگی $0/989$ وجود دارد.

- میزان تولید اسیدگلوکورونیک با ساکارز در pH=۵ در زمان‌های متفاوت

همان‌طور که جدول ۵ نشان می‌دهد با افزایش زمان غلظت اسیدگلوکورونیک افزایش یافت. افزایش زمان نقش مهمی در افزایش غلظت اسیدگلوکورونیک دارد تنها فاکتور موثر و معنی دار در غلظت اسیدگلوکورونیک مجذور زمان بود. بنابراین زمان نیز تاثیر معنی دار و موثری در غلظت

- میزان تولید اسید گلوکورونیک با ساکارز در pH=۴ در زمان‌های متفاوت

همان‌طور که جدول ۴ نشان می‌دهد زمان تاثیر معنی داری بر غلظت اسیدگلوکورونیک نداشته و تاثیر دما معنی دار بوده و باعث افزایش غلظت اسیدگلوکورونیک شد. در تاثیر متقابل بین دما و زمان در زمان ثابت، با افزایش دما غلظت اسیدگلوکورونیک ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. دما و تاثیر متقابل بین مجذور دما و زمان تاثیر معنی داری در غلظت اسیدگلوکورونیک داشتند. با افزایش دما، غلظت اسیدگلوکورونیک افزایش یافت. در تاثیر متقابل بین مجذور دما و زمان رفتار پیچیده‌ای مشاهده شد. بدین ترتیب در دمای ثابت با

بوده و فقط ۴۰/۶ درصد آن ساکارز است، احتمالاً ترکیبات ناخالص موجود در آن اثر بازدارندگی بر رشد باکتری دارد.

نتیجه گیری

با بررسی عوامل موثر بر فرایند تخمیر، روند پیشرفت فرایند و تولید متابولیت ها می توان عوامل موثر در کنترل فرایند را مشخص کرد که در تخمیر نوشابه کومبوچا نوع بستره قندی، pH، زمان و دما همگی موثر هستند. با استفاده از آزمون دانکن میانگین غلظت های اسید گلوکورونیک مقایسه شد و نتیجه گرفته شد که بین غلظت اسید گلوکورونیک حاصل از ساکارز با گلوکز مایع در سطح اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی دار وجود دارد. سپس با استفاده از برنامه آماری MATLAB بهترین شرایط بهینه برای رشد قارچ کومبوچا و افزایش میزان اسید گلوکورونیک آن در دمای ۳۱°C و pH=۶ با قند ساکارز به میزان ۴۴/۵ میلی گرم در لیتر گزارش شد. این مقدار بیشتر از آن چیزی بود که توسط Blanc به دست آمد (Blanc, 1996). وی نوشابه کومبوچای تولید شده در دمای محیط با قند ساکارز به میزان ده درصد با همان pH چای شیرین به مدت ۷ روز را با HPLC تجزیه کرد و میزان کمتر از ۲۰ میلی گرم در لیتر اسید گلوکورونیک به دست آورد. بالا بودن میزان اسید گلوکورونیک در نوشابه کومبوچا می تواند خاصیت درمانی به ویژه سم زدایی و ضد سرطان بودن آن را توجیه کند.

سپاسگزاری

از تمامی کارکنان بخش علوم و صنایع غذایی و مسئولین پژوهشی و آموزشی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز که در تامین امکانات لازم و مراحل اجرایی این پژوهش همکاری داشته اند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

- Akerstrand, K. (1996). Fungi that are not just fungi. *Var Foeda*, 43 (3), 32. (Abs).
Blanc, P. J. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters*, 18 (2), 139-142.
Dufresne, C. & Farnworth, E. (2000).

اسید گلوکورونیک دارد. ضریب F مشخص کرد که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p=0/003$) رگرسیون معنی دار است و ضریب همبستگی یا R^2 مشخص کرد که بین فاکتور زمان و غلظت اسید گلوکورونیک همبستگی ۰/۷۴۱ وجود دارد.

- میزان تولید اسید گلوکورونیک با ساکارز در pH=۶ در زمان های متفاوت

همان طور که جدول ۶ نشان می دهد غلظت اسید گلوکورونیک تحت تاثیر متقابل زمان و دما قرار گرفته و هر دو با هم در افزایش غلظت اسید گلوکورونیک موثرند. مطابق شکل غلظت اسید گلوکورونیک تحت تاثیر هر دو فاکتور زمان و دما قرار گرفته است. فاکتور موثر و معنی دار در غلظت اسید گلوکورونیک حاصل ضرب مجذور دما یا فاکتور $T^2.t$ است. بدین ترتیب که در دمای ثابت با افزایش زمان غلظت اسید گلوکورونیک نیز افزایش یافت. ضریب F مشخص می کند که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p=0/005$) رگرسیون معنی دار است و ضریب همبستگی یا R^2 مشخص می کند که بین فاکتور $T^2.t$ با غلظت اسید گلوکورونیک همبستگی ۰/۷۰۲ وجود دارد.

- بررسی رشد قارچ کومبوچا با ملاس چغندر قند
قند ملاس احتمالاً دارای ترکیباتی بوده که از رشد باکتری و مخمر موجود در این قارچ جلوگیری کرده و سبب کاهش رشد آن می شود. بنابراین نمونه هایی که حاوی قند ملاس بودند تخمیری در آنها صورت نگرفته بود، یا تخمیر آن خیلی کم بود و مورد قبول واقع نشد. از طرفی چون قند ملاس تیره بود در اسپکتروفتومتری مشکل ایجاد کرد بنابراین آزمایش با دو قند ساکارز و گلوکز مایع ادامه یافت. این نتیجه مشابه نتیجه سیورز بود (Sievers et al., 1996). وی از عسل به جای ساکارز استفاده کرد و مشاهده کرد که یا اصلاً تخمیری صورت نگرفته یا مدت زمان تخمیر طولانی شد. وی دلیل این امر را روغن های فرار و ترکیبات فنلی دانست که در عسل وجود داشته و اثر بازدارندگی بر رشد باکتری موجود در قارچ دارد. با توجه به این که ملاس چغندر قند یک ترکیب ناخالص

Tea, Kombucha., and health: a review: Food Research International, 33, 409-421.

Fishman, W. H. & Green, S. (1955). Microanalysis of glucuronide glucuronic acid as applied to β -glucuronidase and glucuronic acid studies, J. Biological Chemistry, 512-527.

Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H. & Ledford, R. A. (1998). Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. J. Food Science and Technology, 31(3), 291-296.

Hesseltine, C. W. (1965). A millennium of fungi, food and fermentation. Mycologica, 57, 149-197.

Inoue, S. & Miyawak, M. (1975). Quantitative analysis of iduronic acid and glucuronic acid in sulfated galatosaminoglycuronans gas chromatography. Analytical Biochemistry, 65, 167-174.

Mayser, P., Fromme, S. & Gruenddr, K. (1995). The yeast of spectrum of tea fungus kombucha. Mycoses, 34 (7), 289-295.

Nir, I. (1964). Determination of glucuronic acid by naphthoresorcinol. Analytical Biochemistry, 8, 20-23.

Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A. & Oliveria, R. (2006). Low cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. Biochemical Engineering Journal, 32, 135-142.

Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler, S. U. & Teaber, M. (1996). Microbiology and fermentation of balance in a kombucha beverage obtained from tea fungus fermentation. Systematic and Applied Microbiology, 18 (4), 590-594.

Steinkraus, K. H. (1996). Indigenous Fermented Food. Tea Fungus/kombucha. Marcel Dekker Inc. New York. 493-496.

Thomson, S. (2006). Kombucha green tea symbiont: a scientific health literature review. <http://www.gaiaresearch.co.za/kombucha.html>.

Toeh, A. L., Heard, G. & Cox, J. (2004). Yeast ecology of kombucha fermentation. J. Food Microbiology, 95 (2), 119 -126.

Yokihiko, H. & Watanabe, M. (1989). Antibacterial activity of tea polyphenols against *Clostridium botulinum*. J. Japanese Society of Food Science and Technology, 36 (12), 951-955.

Production of High Glucuronic Acid Level in Kombucha Beverage under the Specific Environmental Condition

F. Beigmohammadi ^{a*}, A. Karbasi ^b, Z. Beigmohammadi ^c

^a Academic Member of the Food Science and Technology Department, Sahneh Branch, Islamic Azad university, Iran.

^b Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

^c M. Sc. of Food Science and Technology, Gorgan University, Iran.

5

۸

Abstract

Introduction: Kombucha beverage is a fermentation product produced by kombucha mushroom in sweet tea. One of the most important ingredient in this beverage that plays a critical role in detoxification of the body and prevention of cancer, is glucuronic acid. In this research, the effect of environmental conditions such as pH, time, temperature and sugar substrate, in production of this beverage and its glucuronic acid content were studied.

Material & Methods: Three levels of pH 4, 5 and 6; temperature 25, 30 and 35 °C; time 3, 5 and 7 days and different sugar substrates, corn syrup, molasses and sucrose were applied. Glucuronic acid content was measured spectrophotometrically in the presence of naphthoresorcinol.

Results: Optimum conditions for growth of kombucha mushroom and production of high level of glucuronic acid (44.5 mg/l) were reported using MATLAB programming to be 31 °C with sucrose on pH=6.

Conclusion: The results show that if kombucha beverage is fermented in controlled condition, it might be regarded as a healthy and nutrient beverage.

Keywords: Glucuronic Acid, Kombucha Beverage.