Archive of SID

فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی (دوره۳-شماره ۱)..... صفحات ۶۷ تا ۸۰

اثرات عصاره پوست انار و اینولین بر زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* و خصوصیات حسی و فیزیکوشیمیایی سس سویای سین‌بیوتیک

مهسا سیفی محمد زاده[۱]، **مهناز هاشمی روان*[۲]**، علیرضا شهاب لواسانی[۳]

۱-گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین، پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین، پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۳-گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین، پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

چکیده

هدف از این تحقیق استفاده از اینولین به‌عنوان ترکیب پری‌بیوتیکی و همچنین عصاره پوست انار به‌عنوان آنتی‌اکسیدان جهت افزایش زمان ماندگاری *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* در سس سویا می‌باشد. برای این منظور نسبت‌های ۳، ۵ و ۷ درصد عصاره پوست انار و اینولین در مقادیر ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد مورداستفاده قرار گرفتند. ارزیابی ویسکوزیته، pH و ارزیابی بقای *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* بود. تیمارها در روزهای صفرم، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم ارزیابی شدند. ۱۳ تیمار در سه تکرار در قالب طرح کامل تصادفی موردبررسی قرار گرفت.نتایج نشان داد که مقادیر بالاتر از ۳ درصد عصاره پوست انار و ۵ درصد اینولین باعث کاهش میزان بقای باکتری پروبیوتیک می‌گردد.نهایتاً یک‌روند کاهشی بین امتیازات تیمارها با افزایش درصد اینولین و عصاره پوست انار وجود داشت. میزان pH نیز به‌طور معنی‌داری با افزایش زمان نگهداری و نسبت اینولین و عصاره پوست انار به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. بالاترین میزان بقای *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* به تیمار (T1) دارای ۵ درصد اینولین و ۳ درصد عصاره پوست انار با کاهش معادل دو سیکل لگاریتمی و جمعیت ۱×۱۰^{۸} CFU/ml تعلق داشت. بالاترین میزان کاهش جمعیت *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* متعلق به تیمار شاهد به میزان ۵ سیکل لگاریتمی و کمترین آن نیز متعلق به تیمار (T1) به میزان ۲/۳۳ و تیمار (T2) به میزان ۳/۳۳ سیکل لگاریتمی در انتهای روز بیست و یکم نگهداری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

کلمات کلیدی: اینولین، *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم*، سس سویا سین‌بیوتیک، عصاره پوست انار

* m_hashemiravan@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

روند تغذیه‌ای صنعت غذا در سال‌های اخیر موجب ایجاد چالش‌های جدیدی درزمینه طراحی و فرمولاسیون محصولات غذایی جدید و با خواص عمل‌گرا، دارویی، فراسودمند، کم‌چرب و کم‌کالری و پروبیوتیک /پری‌بیوتیک شده است و به‌عبارت‌دیگر مصرف‌کنندگان امروزه غذاهایی را ترجیح می‌دهند که علاوه بر ایمن بودن برای آن‌ها منافع تغذیه‌ای نیز داشته باشد. ازاین‌رو صنایع آبمیوه نیز از این چالش مستثنا نیستند (۱).

محصولات پروبیوتیک غیر لبنی می‌توانند در مواردی که حساسیت به لاکتوز، آلرژی به پروتئین‌های شیر و مشکلاتی مانند کلسترول بالا وجود داشته و مردم از مصرف فراورده‌های لبنی امتناع کنند، مورداستفاده قرار گیرند، بنابراین توسعه محصولات پروبیوتیک غیر لبنی از اهمیت بالایی برخوردار است و باید در سبد غذایی مردم قرار گیرد (۲).تمایل مردم به استفاده از غذاهای مفید و فراسودمند از طرفی باعث بالا رفتن سطح سلامت عمومی جامعه شده و از طرف دیگر موجبات پیشرفت و گسترش صنعت غذا را فراهم می‌نماید.در این میان مسئله‌ای که ضروری به نظر می‌رسد افزایش حفظ میزان بقای باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد. انجام تحقیقات در محصولات با درصد نمک بالا مانند سس سویا و ارزیابی میزان زنده‌مانی پروبیوتیک و بهبود خواص حسی آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. پیشرفت‌های اقتصادی و اجتماعی صورت گرفتهٔ اخیر، مشکلات زیادی درزمینهٔ سلامتی انسان به وجود آورده است. تنش و مشغلهٔ زیاد بشر منجر به ایجاد بیماری‌هایی مانند حمله قلبی، فشارخون بالا، اختلالات روده‌ای و انواع مختلف سرطان‌ها گردیده است. یکی از راه‌کارهای مؤثر در پیشگیری یا حذف این بیماری‌ها مصرف فرآورده‌های پروبیوتیک می‌باشد. این فرآورده‌ها در بیشتر کشورهای جهان به‌ویژه اروپا، آمریکا و ژاپن رواج چشمگیری یافته است، به‌طوری‌که بیش از ۹۰ نوع فرآورده پروبیوتیک (حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[1] و *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم*[2]) در سرتاسر جهان تولید می‌گردد. بسیاری از کشورهای اروپایی، آفریقای شمالی و آسیایی، از انواع گوناگون فرآورده‌های پروبیوتیک شامل شیرهای تخمیری، شیرهای تازه، ماست، دسرهای منجمد و پنیر استفاده می‌کنند. در دو یا سه دههٔ گذشته تولید و مصرف فرآورده‌های تجاری پروبیوتیک و عرضه این محصولات به بازار از رشد بالایی برخوردار بوده است (۳).

ماده غذایی فراسودمند یا فرا ویژه، ماده غذایی است که دربردارندهٔ دست‌کم یک خاصیت سلامت بخشِ مشخص و به اثبات رسیده، علاوه بر خواص تغذیه‌ای پایه باشد و به‌صورت فراسودمند توسط تولیدکننده یا دانشمندان علم تغذیه توصیه و توسط مصرف‌کنندگان مصرف شوند. یکی از موارد مهم در ارتباط با انتخاب و تولید غذاهای فراسودمند، ایمن بودن و بی‌خطر بودن مصرف این محصولات است. امروزه و در بیشتر کشورهای دنیا، به دلیل اثبات عملی نتایج نامطلوب ناشی از عدم توازن و بدخوری در جوامع بشری، گرایش یا تولید و مصرف انواع غذاهای فراسودمند افزایش چشمگیری یافته است. پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یکی از تازه‌ترین و محبوب‌ترین فرآورده‌ها و محصولات فراسودمند هستند که از اهمیت خاصی دراین‌ارتباط برخوردارند. وجه تمایز بارز و مهم فرآورده‌های پروبیوتیک با سایر غذاهای فراسودمند در آن است که ترکیب مؤثر یا فراسودمند در

[1] *Lactobacillus acidophilus*
[2] *Bifidobacterium bifidum*

www.SID.ir

Archive of SID

آن‌ها را موجودات زنده، یعنی باکتری‌ها نه ترکیبات شیمیایی غیرزنده، تشکیل می‌دهند (۴).

خصوصیات تغذیه‌ای و سلامت بخش فرآورده‌های غذایی، ازجمله فاکتورهای بسیار مهم در پذیرش محصول از سوی مصرف‌کنندگان می‌باشد. ازاین‌رو متخصصان علوم و صنایع غذایی و همچنین کارخانه‌ها تولیدی در پی طراحی و تولید محصولاتی هستند که علاوه بر خصوصیات حسی و ظاهری مطلوب، دارای خواص سلامتی بخشِ خاص نیز باشند. همان‌طور که گفته شد، یکی از متداول‌ترین انواع غذاهای فراسودمند، محصولات پروبیوتیک[1] می‌باشند. به همین دلیل در سال‌های اخیر تلاش روزافزونی برای افزودن میکروارگانیسم‌های[2] پروبیوتیک به مواد غذایی صورت گرفته است. اغلب فرآورده‌های پروبیوتیکِ موجود در بازار را گروه لبنیات تشکیل می‌دهند. چراکه این محصولات حامل‌های خوبی برای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک هستند. مصرف‌کنندگان آگاه به این حقیقت بوده که با افزودن میکروارگانیسم‌های مفید به محصولات تخمیری لبنی، به‌طور هم‌زمان می‌توانند از خواص سلامتی بخش این میکروارگانیسم‌ها و اثر تخمیری مثبت آن‌ها بهره‌مند شوند. پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف در مقادیر کافی دارای اثرات مفید بر سلامتی میزبان می‌باشند. غذاها و محصولات پروبیوتیک به‌عنوان محصولات عمل‌آوری شده که حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک زنده در مقادیر کافی هستند، معرفی می‌شوند. لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها معمول‌ترین سوش‌ها و گونه‌های پروبیوتیکی هستند که در فرآورده‌های لبنی مورداستفاده قرار می‌گیرند. لاکتوباسیل‌ها در صنعت برای اصلاح بو، طعم و بافت محصولات تخمیری به کار می‌روند، همچنین با توجه به اثر ممانعت کنندگی آن‌ها در رشد باکتری‌های نامطلوب مختلف در محصول، سعی بر آن است تا از این باکتری‌ها با باکتریوسین‌های خالص‌شده، به‌عنوان نگهدارنده بیولوژیکی در صنعت غذا استفاده شوند (۵). در این بررسی به تأثیر عصاره انار و اینولین در سس سویا خواهیم پرداخت.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم ATCC 24451 از کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های ایران تهیه گردید و بر روی محیط MRSA[3] غنی‌سازی شده با g/l ۰/۵ السیستئین (اسیدکلریدریک + ام آر اس)[4] کشت داده شد، سپس در دمای C ° ۳۷ به مدت h ۴۸ گرمخانه شد (۷). نمونه‌های سس سویا از شرکت کرون والی[5] چین (موجود در کلیه فروشگاه‌های زنجیره‌ای) تهیه شد. اینولین CLR از شرکت اکبریه تهیه شد.

آماده‌سازی نمونه

استخراج عصارهٔ پوست انار

به‌منظور استخراج عصاره پوست انار از روش استخراج با حلال متانول استفاده شد. بدین ترتیب که میوه‌ها ابتدا شسته و تمیز شد و سپس با چاقوی دستی پوست آن‌ها جدا شد. پوست با آون در دمای C ° ۶۰ به‌طور کامل خشک و با الک مش ۴۰ یکنواخت شد. سپس پوست انار توزین شد و

[1] Probiotic
[2] Microorganism
[3] De Man Rogosa Sharpe agar
[4] (HCL و MRSA+cys)
[5] Crown Valley

www.SID.ir

Archive of SID

درون ظرف‌های درب دار شیشه‌ای مات ریخته شد و به مدت h ۴ در دمای°C ۳۵ شیکر مغناطیسی قرار گرفت. سپس عصاره از تفاله با کاغذ صافی جدا شد و تفاله مجدداً با حلال دوم تحت شرایط مشابه تحت شیکر مغناطیسی قرار گرفت. هر دو عصاره به‌دست‌آمده با یکدیگر مخلوط و با آون تحت خلأ و دمای°C ۳۸ نمونه تغلیظ شد تا عصاره‌ای نسبتاً غلیظ به‌عنوان عصاره نهایی به دست آید. حلال اولیه استفاده‌شده برای استخراج عصاره پوست انار شامل متانول/آب به نسبت ۲۰:۸۰ (حجمی / حجمی) و حلال دوم که استفاده شد شامل متانول / استون/ آب به نسبت ۲۰:۴۰:۴۰ (حجمی/ حجمی) بود (۶).

آماده‌سازی نمونه

مطابق جدول ۱ کدبندی تیمارها فرموله شد و سپس میزان cfu/ml [۷] ۱۰ از *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* که آماده‌سازی شده بود به تیمارها افزوده شد و برای انجام آزمون‌ها نگهداری شد.

تعیین قدرت ضدمیکروبی عصارهٔ پوست انار

برای تعیین قدرت ضدمیکروبی عصارهٔ پوست انار استفاده‌شده، از روش آزمون حساسیت رقت‌های مایع و محاسبهٔ MBC[۱] و MIC[۲] استفاده شد (۷).

تعیین حداقل مهار کشندگی (MIC)

آزمایش MIC در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش براث میکرودایلوشن انجام شد. ابتدا از محیط کشت مولر هینتون براث (مرک آلمان) µl ۱۰۰داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد و سپس به اولین چاهک هر ردیف µl ۱۰۰ عصارهٔ پوست انار اضافه شد و از خانه دوم به سوم و به همین ترتیب تا خانه نهم رقیق شد.در آخر به همه چاهک‌ها µl ۱۰۰ سوسپانسیون میکروبی رقیق‌شده معادله لوله نیم مک فارلند از هر یک از دو باکتری *اشرشیاکلی*[۳] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[۴] اضافه گردید. بعد از h ۲۴ انکوباسیون در دمای°C ۳۷ به‌وسیله پایه پلیت بعد از h ۲۴ انکوباسیون در دمای°C ۳۷ به‌وسیله پایه پلیت[۵] که به همین منظور ساخته شد، کف پلیت زیر نور آینه در آینه مشاهده شد. وجود کدورت که نشان‌دهنده رشد یا عدم رشد باکتری بود در جدول مخصوص یادداشت گردید و طبق تعریف غلظت (رقیق‌ترین) چاهکی که هیچ کدورتی در آن ایجاد نشده بود، معادل MIC قرار داده شد. خانه کنترل اسانس، محیط کشت و میکروب نیز جداگانه منظور شد (۷).

جدول(۱) کدبندی تیمارهای تحقیق

کد تیمارها	درصد عصاره پوست انار	درصد اینولین
تیمار T1	۳	۵
تیمار T2	۳	۱۰
تیمار T3	۳	۱۵
تیمار T4	۳	۲۰
تیمار T5	۵	۵
تیمار T6	۵	۱۰
تیمار T7	۵	۱۵
تیمار T8	۵	۲۰
تیمار T9	۷	۵
تیمار T10	۷	۱۰
تیمار T11	۷	۱۵
تیمار T12	۷	۲۰
تیمار T(سس سویا با *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*)	-	-

[1] Minimum Bactericidal Concentration
[2] Minimum Inhibitory Concentration
[3] *Escherichia coli*
[4] *Staphylococcus aureus*
[5] Tray –reading stand

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای آزمایش MBC همه چاهک‌های فاقد کدورت جداگانه بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴h کمترین غلظتی از اسانس که باکتری در آن رشد نکرده بود به‌عنوان غلظت کشندگی MBC گزارش شد (۷).

اندازه‌گیری مقدار فنل کل عصارهٔ پوست انار

میزان ترکیبات فنولی طبق روش فولین سیوکالتیو[1] اندازه‌گیری شد. گالیک اسید به‌عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری پلی فنل‌ها در تهیهٔ منحنی استاندارد استفاده شد. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۶۵ nm قرائت شد و نمودار منحنی کالیبراسیون گالیک اسید برحسب جذب نوری رسم شد. همین روش برای نمونه‌های آزمایشی نیز انجام شد و پس از قرائت جذب در طول‌موج ۷۶۵ nm و با استفاده از منحنی استاندارد اسیدگالیک میزان پلی فنول کل نمونه محاسبه شد .این آزمون در پنج تکرار و با نمونه‌های تصادفی از پوست انار انجام گردید (۸).

اندازه‌گیری pH

مطابق با استاندارد ملی۳۴۱۴ برای اندازه‌گیری pH نمونه‌های سس سویا از دستگاه pH متر مدل ۶۲۲ (شرکت Metrohem) و مطابق با استاندارد ملی شماره ۳۱۹۵ استفاده شد (۹).

ارزیابی قابلیت زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم*

برای شمارش *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* رقت اول مقدار ۵ g نمونه سس سویا با ۴۵ ml آب پپتونه استریل ۰/۱ درصد رقیق شد. سری بعدی رقت‌ها با افزودن ۱ ml از هر رقت به ۹ ml آب پپتونه استریل ۰/۱ درصد آماده شد. برای شمارش *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* از محیط کشت RCA۲به روش پورپلیت استفاده شد. سپس بلیت‌ها در دمای C ۳۷° به مدت ۷۲h در شرایط بی‌هوازی گرمخانه گذاری شدند. پلیت‌های حاوی ۳۰-۳۰۰ کلنی شمارش گردیدند (۱۰).

ارزیابی ویسکوزیته

ویسکوزیته نمونه‌های آماده با استفاده از رئومتر تنش ثابت (Brookfield, LV, II-DV, Viscosimeper, VSA) مجهز به اسپیندل ULA، اندازه‌گیری شد. برای به دست آوردن نتایج قابل‌اطمینان انجام شد. آزمایش‌ها در سه مرحله پس از تولید نمونه‌ها انجام شد. قانون توان برای تعیین ضریب ثابت و شاخص رفتار جریان از نمونه با استفاده از داده‌های تنش برشی به‌دست‌آمده از افزایش اندازه‌گیری سرعت برش بر اساس (رابطه۱) استفاده شد (۱۱).

$$\delta = k\, r^{n} \qquad \text{رابطه (۱)}$$

در این رابطه δ تنش برشی، k ضریب ثبات، r نرخ برش و n شاخص رفتار جریان را نشان می‌دهند.

ارزیابی حسی

برای ارزیابی حسی، نمونه‌های سس سویا تهیه‌شده توسط ۱۰ نفر ارزیاب حسی آموزش‌دیده دانشکده علوم صنایع غذایی تهران ازنظر خصوصیات طعم، رنگ، بو، بافت و پذیرش کلی به روش پنج نقطه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. بدیهی است که امتیاز یک به‌منزله بسیار بد و امتیاز ۵ به‌منزله عالی در نظر گرفته شد. کلیه آزمون‌ها در روزهای صفرم، هفتم، چهاردهم، بیستم و بیست و یکم صورت گرفت (۷).

[1] Folin-Cieu caltiue

[2] Reinforced Clostridial Agar

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

نتایج مقادیر حداقل غلظت کشندگی و مهارکنندگی

برای تعیین قدرت ضدمیکروبی عصاره پوست انار استفاده‌شده، از روش آزمون حساسیت رقت‌های مایع و محاسبه MIC وMBC استفاده شد. MIC و MBC عصاره‌ها به این دلیل مهم هستند که کمترین غلظت عصاره را معین می‌کنند که به ترتیب اثر بازدارندگی و کشندگی بر میکروارگانیسم‌های هدف مؤثر را نشان می‌دهند. با توجه به نتایج جدول(۲) مقادیر مهارکنندگی۷۵۰ ppm برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و۱۲۵ ppm برای *اشرشیاکلی* و مقادیر کشندگی نیز ۲۵۰ ppm برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و۱۲۵ ppm برای *اشرشیاکلی* به دست آمد.

اندازه‌گیری مقدار فنل کل عصارهٔ پوست انار

جدول (۳) مشخصات ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره پوست انار را نشان می‌دهد که بالاترین میزان آن متعلق به اسید کلروژنیک می‌باشد.

با توجه به نمودار (۱) شاهد اختلافات معنی‌داری در میزان pH هر یک از تیمارها با تیمار شاهد وجود داشت (۰/۰۵ >p). همان‌گونه که در نمودار (۱) ملاحظه گردید بالاترین میزان امتیازات pH متعلق به تیمار شاهد و سپس تیمار با ۳ درصد عصاره پوست انار و ۵ درصد اینولین گزارش گردید. با افزایش سطوح اینولین و عصاره پوست انار مورداستفاده کاهش معنی‌داری در میزان اسیدیته تیمارها ملاحظه گردید. همان‌گونه که در نمودار (۲) نیز فراوان است پایین‌ترین میزان pH به تیمار با ۲۰ درصد اینولین و ۷ درصد عصاره پوست انار تعلق داشت. زمان نگهداری نیز تأثیرات معنی‌داری بر میزان pH تیمارها نشان داد. به‌طورکلی بالاترین میزان pH متعلق به‌روز صفرم پس از تولید و کمترین میزان pH نیز متعلق به‌روز بیست و یکم نگهداری تعلق داشت.

با توجه به نمودار (۱) نیز ملاحظه گردید که اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری نیز بر روی میزان pH تیمارها معنی‌دار بود(۰/۰۵ >p). یک‌روند کاهش کلی با افزایش غلظت سطوح اینولین و عصاره پوست انار و همچنین افزایش مدت‌زمان نگهداری بین میزان pH وجود داشت.

تأثیر بر میزان بقای بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم

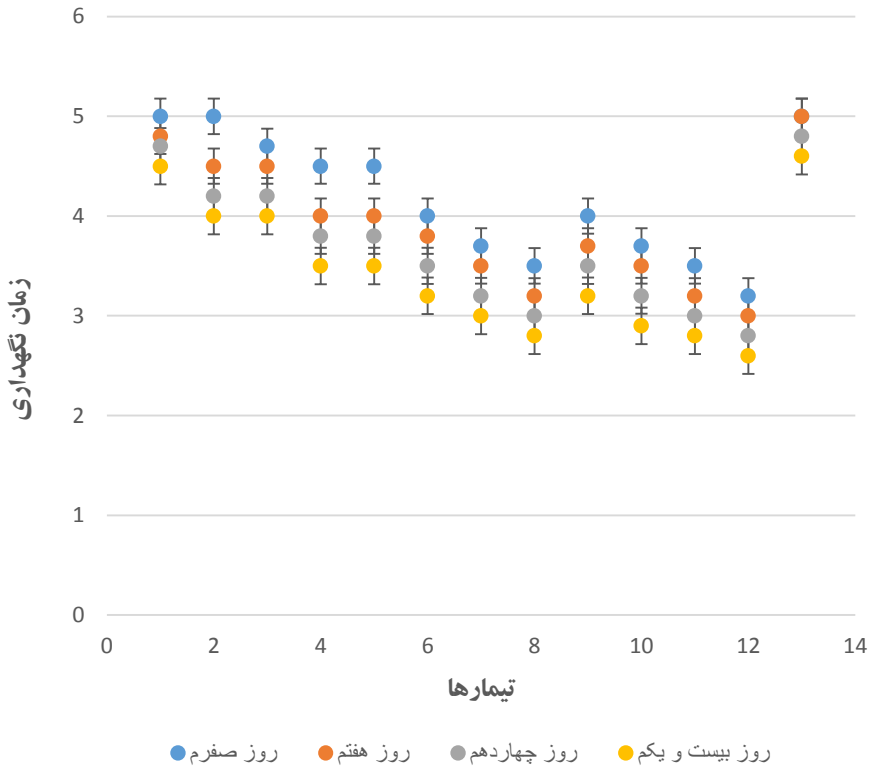
با توجه به نمودار (۲) ملاحظه شد که اختلافات معنی‌داری بین میزان جمعیت *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* مشاهده گردید. بالاترین میزان جمعیت *بیفیدوباکتریوم* متعلق به سطوح ۳ درصد عصاره پوست انار و ۵ و ۱۰ درصد اینولین بود (۰/۰۵ >p)؛ اما با افزایش میزان عصاره پوست انار به سطح ۷ درصد و اینولین به سطح ۲۰ درصد و میزان *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (۰/۰۵>p). بر اساس نتایج شکل ۲ ملاحظه گردید که بالاترین میزان کاهش جمعیت *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* متعلق به تیمار شاهد(T) به میزان ۵ سیکل لگاریتمی و کمترین آن نیز متعلق به تیمار(T1) به میزان ۲/۳۳ و تیمار(T2) به میزان ۳/۳۳ سیکل لگاریتمی در انتهای روز بیست و یکم نگهداری مشاهده شد (۰/۰۵>p). یکی از دلایل مهم عدم بقای باکتری‌های پروبیوتیک و همچنین *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* به میزان بالای اسیدیته و همچنین میزان پایین pH آن مربوط می‌گردد. با افزایش درصد عصاره انار به جهت بالا رفتن ترکیبات تانن و همچنین اسیدگالیک و ترکیبات پلی فنولی غشای سلولی دیواره‌های باکتری دچار پلاسمولیز و نشت ترکیبات درون‌سلولی به

www.SID.ir

Archive of SID

جدول (۲) نتایج اثر ضدمیکروبی عصاره آلی انار بر میکروارگانیسم‌های آزمون

نوع میکروارگانیسم	رقت‌های مختلف عصاره پوست انار برحسب ppm					
	۵۰	۷۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
اشرشیاکلی O157:H7	**	**	۲ کلنی	–	–	–
استافیلوکوکوس اورئوس	**	**	**	۸ کلنی	–	–



شکل(۱) مقایسه میانگین pH بر اساس اثرات متقابل تیمار * زمان نگهداری

خارج‌شده و از میزان بقای آن‌ها کاسته می‌شود. همچنین اینولین در مقادیر ۱۰ و ۲۰ درصد با افزایش تخمیر اسیدی نشاسته باعث افزایش اسیدیته می‌گردد که به افزایش هر چه بیشتر اسیدیته محیطی کمک کرده و باعث کاهش بقای *بیفیدوباکتریوم* می‌شود.

یافته‌های محمدی ثانی و همکاران، (۱۳۹۰) در ارزیابی تأثیرات پری‌بیوتیکی پلی فروکتان استخراج‌شده از گیاه سیب‌زمینی ترشی بر باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم در شرایط آزمایشگاهی با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (۱۲). همچنین نتایج تحقیقات نعیمی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی تأثیر افزودن اینولین و فرآیند ریز پوشانی بر میزان زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در طول دوره نگهداری ماست بستنی سین‌بیوتیک به نتایج مشابهی دست یافتند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (۱۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول (۳) ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره پوست انار

نام ترکیب	Rt (min)	ناحیه (درصد)
پیروگالول	۵/۵۲۵	۰/۵۲۹
کلروژنیک اسید	۸/۸۹۱	۱۱/۹۱۵
کاتچین	۱۱/۹۱۱	۰/۰۱۹
روتین	۱۵/۲۶۲	۴/۸۲۸
کوماریک اسید	۱۵/۵۸۰	۱/۲۹۷
فرولیک اسید	۱۶/۶۱۷	۰/۰۷۷
بنزوئیک اسید	۱۸/۷۳۹	۰/۰۲۵
آکاستین	۱۹/۴۴۸	۰/۰۲۴
سینامیک اسید	۲۳/۲۱۶	۰/۰۱۸
جنیستئین	۲۳/۹۶۶	۰/۰۱۳
کمپفرول	**۲۴/۵۱۳**	**۰/۰۲۴**

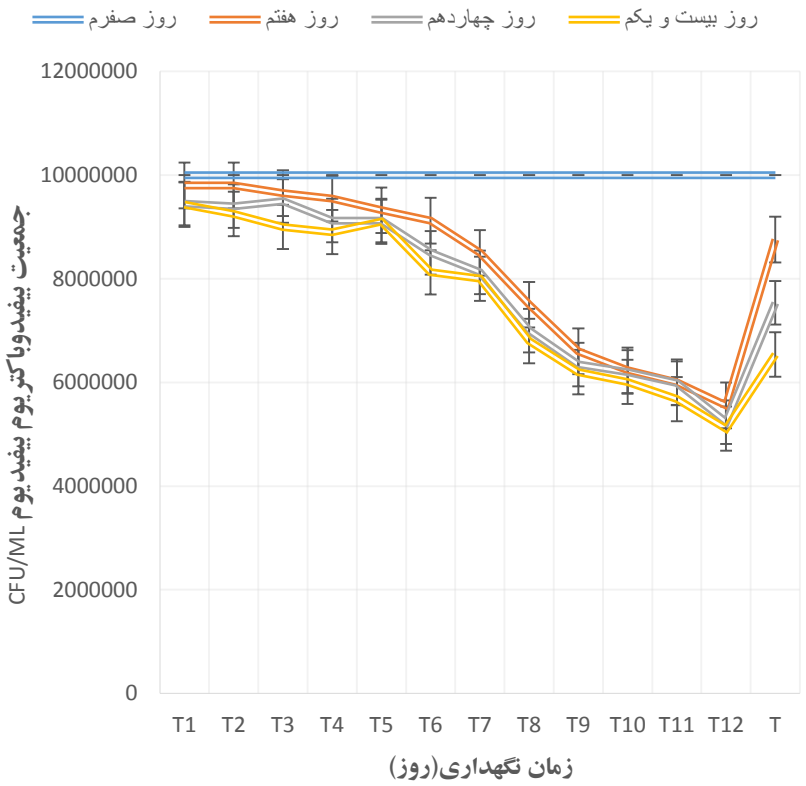
همچنین عصاره پوست انار به دلیل دارا بودن ترکیبات و مواد مغذی مطلوب و همچنین از بین بردن فلور میکروبی سس سویا به بقای *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* کمک نمود اما در مقادیر بالا به دلیل کاهش شدید میزانpH بقای باکتری را به کاهش داد. در طی زمان نگهداری به دلیل رقابت در دسترسی به منابع غذایی و افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه باکتریایی میزان زنده‌مانی باکتری به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$).

تأثیر بر میزان ویسکوزیته تیمارهای سس سویا

در نمودار(۳) اختلافات معنی‌داری بین میزان ویسکوزیته تیمارها با یکدیگر و با تیمار شاهد (T) وجود داشت ($p< ۰/۰۵$). همچنین روند افزایشی در میزان ویسکوزیته تیمارها با افزایش میزان عصاره پوست انار و میزان غلظت اینولین وجود داشت. بالاترین میزان ویسکوزیته متعلق در تیمار (T12) ۷ درصد عصاره پوست انار و ۲۰ درصد غلظت اینولین مشاهده شد. استفاده از عصاره پوست انار به میزان ۳ درصد و اینولین به میزان ۵ درصد اختلافات معنی‌داری را در میزان ویسکوزیته تیمارها ایجاد نکرد($p<۰/۰۵$).

www.SID.ir

Archive of SID

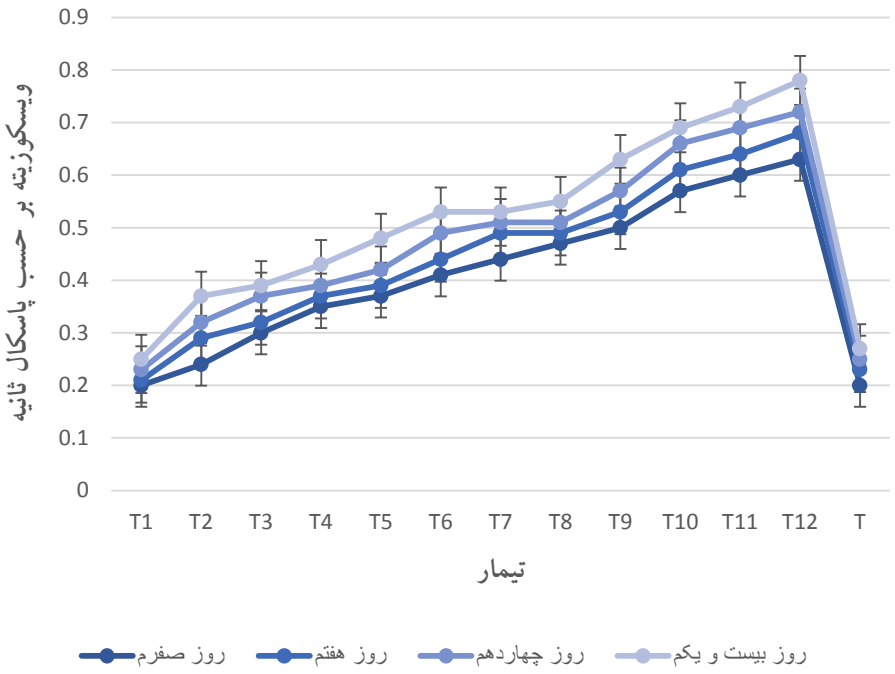


نمودار (۲) مقایسه میانگین بقای *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* بر اساس اثرات متقابل تیمار * زمان نگهداری

ویسکوزیته یا مقاومت در برابر جریان، ویژگی فیزیکی مهمی است که بر کیفیت حسی و ساختار محصول تأثیر عمده‌ای می‌گذارد. بررسی نتایج نمودار۳ نشان داد که میزان ویسکوزیته با افزایش میزان اینولین به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد($p<۰/۰۵$). بالا رفتن درصد ویسکوزیته سس سویا با افزایش درصد اینولین به دلیل وزن مولکولی بالای این پلی‌ساکارید با درجه پلیمریزاسیون بیشتر از ۲۳ و باند شدن با مولکول‌های آب و توانایی برهم‌کنش با پروتئین‌های سویا مانند گلیسین می‌باشد. همچنین در طی زمان نگهداری به دلیل در هم رفتن زنجیره‌های بلند اینولین میزان ویسکوزیته به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. مهدیان و همکاران، (۱۳۹۲) نیز در مقایسه تأثیر افزودن اینولین و کنسانتره پروتئینی شیر در سه سطح صفر، ۲ و ۴ درصد در بستنی کم‌چرب حاوی ۵ درصد چربی به این نتیجه رسیدند که با افزایش مقدار اینولین و کنسانتره پروتئینی شیر ویسکوزیته ظاهری نمونه‌های بستنی افزایش می‌یابد ولی نمونه‌های حاوی کنسانتره پروتئینی شیر در مقایسه با نمونه‌های حاوی اینولین ویسکوزیته بالاتری داشتند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (۱۴).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار (۳) مقایسه میانگین ویسکوزیته بر اساس اثرات متقابل تیمار * زمان نگهداری

ایسماعیل[1] و همکاران(۲۰۱۳) بامطالعه تأثیر افزودن اینولین در بستنی کم‌چرب حاوی ۳ درصد چربی شیر در سطوح صفر، ۲/۵ و ۵ درصد اینولین مشاهده کردند با افزایش سطح اینولین تا ۲/۵ درصد ویسکوزیته افزایش ولی در سطح ۵ درصد ویسکوزیته کاهش یافت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. همچنین عصاره انار به دلیل دارا بودن اسیدسیتریک باعث هیدرولیز نسبی نشاسته بلند زنجیر و افزایش چسبندگی بیشتر و کاهش تنش تسلیم و شدت‌جریان می‌شود که ویسکوزیته را افزایش می‌دهد (۱۵).

تأثیر بر خواص حسی تیمارهای سس سویا

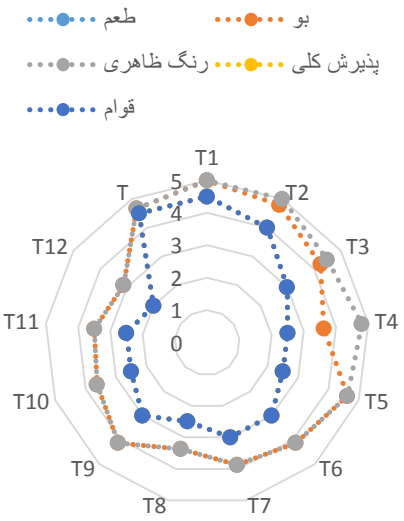
بررسی نتایج امتیاز ارزیابی حسی (نمودار ۴) نشان داد که با افزایش میزان اینولین در فرمولاسیون سس سویا میزان امتیاز طعم و مزه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت($p<۰/۰۵$). دلیلی که می‌توان به آن اشاره کرد این است که قابلیت انحلال اینولین نسبت به قندهای ساده‌تر مانند تاگاتوز و ساکارز کمتر است و دردهان حالت جمع شوندگی و چسبندگی ایجاد می‌کند که این حالت در تیمارهای دارای مقادیر بالای اینولین کاملاً مشهود بود. همچنین اینولین منبع پلی‌ساکاریدی است که به میزان بالا در محیط تخمیر شده و باعث کاهش میزان pH و افزایش‌ترشی سس سویا شد و میزان مطلوبیت طعم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در این راستا تحقیقات مشابهی نیز وجود دارد. شوریده و همکاران (۱۳۹۰) نیز در تحقیقات خود با عنوان تأثیر کاربرد D- تاگاتوز، اینولین و استویا به‌عنوان جایگزین ساکارز بر بعضی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات تیره به نتایج مشابهی دست یافتند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (۱۵).

بررسی نتایج ارزیابی عطر و بو نیز حاکی از افت امتیاز ارزیابی حسی در تیمارهای سس سویا با مقادیر بالای ۳ درصد عصاره پوست انار بود.

[1] Ismail

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار(۴) مقایسه خصوصیات حسی بر اساس اثرات متقابل تیمار * زمان نگهداری

ازجمله دلایلی که می‌توان به آن اشاره کرد این است که در مقادیر ۵ درصد و ۷ درصد عصاره پوست انار به جهت افزایش میزان غلظت ترکیبات عطر و بو باعث افزایش ترکیبات عامل عطر و بوی انار در سس سویای پروبیوتیک شده و امتیازات ارزیابی حسی با اندکی کاهش مواجه گردید اما تغییرات عطر و بو در طی زمان نگهداری ناشی از عطر و بو و ترکیبات آروماتیک میوه نبود، بلکه ترکیبات اسیدی ناشی از تخمیر باعث ایجاد عطر و بوی اسیدی و دی سولفیدی ناشی از متابولیسم باکتری‌ها در محصول گردید که به‌نوبه خود در طی زمان نگهداری باعث کاهش امتیاز عطر و بوی تیمارها گردید. بررسی نتایج ارزیابی رنگ ظاهری نشان داد که استفاده از اینولین در مقادیر بالا به دلیل این‌که اینولین ترکیب نشاسته‌ای و سفیدرنگ است و از میزان شاخص قرمزی سس سویا و رنگ طبیعی آن می‌کاهد و تأثیرات نامطلوبی بر روی رنگ ظاهری تیمارهای سس سویا داشت. تحقیقات شوریده و همکاران (۱۳۹۰) در بررسی کاربرد اینولین در فرمولاسیون شکلات نیز با نتایج تحقیقات حاضر مطابقت داشت (۱۵)؛ اما در مقدار بالای عصاره پوست انار به جهت تأثیر ترکیبات اسیدی قوی عصاره متانولی انار متابولیزه کردن و تخمیر ترکیبات موجود در سس سویا و فرآیندهای قهوه‌ای شدن آنزیمی رخ داد. چرا که این ترکیبات اسیدی دیواره پکتیکی ترکیبات را هضم نموده و باعث دسترسی بیشتر و انجام اکسیداسیون بیشتر ترکیبات می‌شود. عصاره متانولی دارای ترکیبات آهن بالایی می‌باشد که در صورت افزایش غلظت ترکیبات باعث اکسیداسیون بیشتر و تغییر رنگ سس سویا شده و در طی زمان نگهداری نیز با انجام اکسیداسیون بیشتر میزان امتیاز رنگ ظاهری به‌طور معنی‌داری کاهش یافت($p<۰/۰۵$). غلظت‌های ۳ درصد عصاره متانولی با کاهش فرآیند اکسیداسیون باعث حفظ رنگ ظاهری در مقایسه با سایر تیمارها گردید. خواص حسی یا ارگانولپتیکی از مهم‌ترین ویژگی‌های فراورده‌های پروبیوتیک می‌باشد چرا که اولین شرط پذیرش محصول نزد مصرف‌کننده، خواص حسی است. فاکتورهای رنگ، بو و طعم، در این مطالعه موردبررسی قرار گرفت. امتیاز رنگ تیمارهای سس سویا با کاهش میزان زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* به دلیل کاهش فعالیت آبی و افزایش میزان فشار اسمزی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$) که باعث افزایش کدورت در سس سویای پروبیوتیک گردید. با افزایش میزان کدورت تیمارها رنگ ظاهری تغییر کرد($p<۰/۰۵$). رنگ ظاهری محصول به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در محصولات پروبیوتیک، کدورت و برخی رسوبات به دلایل مختلفی تولید می‌گردد که کدورت ثانویه نامیده می‌شود و توسط برخی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، پروتئین‌ها، تانن‌ها، آرابان‌ها، نشاسته، پکتین، ساپونین و یون‌های فلزی (پتاسیم، کلسیم، منیزیم، آهن، مس، سولفور، فسفات، سولفات) ایجاد می‌شود. واکنش بین این عوامل ممکن است باعث ایجاد رسوب شود. همچنین کاهش میزان pH و افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

ویسکوزیته تیمارها نیز اثر معنی‌داری بر روی تغییرات رنگ داشت که به جهت نامطلوب بودن شرایط فیزیولوژیکی، مرگ باکتری‌ها و افزایش تجمع سلولی، افزایش کدورت و درنهایت کاهش میزان روشنایی تیمارها همراه بود که بر روی رنگ تأثیر داشت. نتایج تحقیق با یافته‌های وثوق و همکاران (۱۳۸۸) در بررسی اثر عرق نعناع بر قابلیت بقای باکتری‌های پروبیوتیک در نوشیدنی سنتی ایرانی (دوغ) تطابق داشت (۱۷). بررسی نتایج ارزیابی قوام نیز نشان داد که با افزایش درصد اینولین در فرمولاسیون تیمارهای سس سویا از میزان مطلوبیت قوام به‌طور معنی‌داری کاسته شد($p<۰/۰۵$). یکی از دلایلی که برای این مسئله وجود دارد این است که اینولین دارای ساختار پلی‌ساکاریدی منشعب با زنجیره‌ی بلند می‌باشد که به جهت عدم امکان انحلال مناسب در فرمولاسیون سس سویا باقی‌مانده و نهایتاً ته‌نشین می‌شود و باعث عدم ایجاد یکنواختی در فرمولاسیون سس سویا می‌گردد که به‌طور معنی‌داری از امتیاز ارزیابی حسی کاسته شد. در این راستا تحقیقات مشابهی نیز وجود دارد. تحقیقات ساودرا-لئوس[1] و همکاران (۲۰۱۴) اثرات استفاده از اینولین در فرمولاسیون آب‌پرتقال پروبیوتیک را بررسی نمودند که با افزایش میزان اینولین تا ۳ درصد زنده‌مانی سویه‌های مخلوط پروبیوتیک افزایش یافت و با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (۱۸). در بررسی نتایج ارزیابی حسی با در نظر گرفتن کلیه فاکتورهای حسی، تیمار شاهد (T)و تیمار(T1) با ۳ درصد عصاره پوست انار و ۵ درصد اینولین به‌عنوان تیمار برتر انتخاب گردید. اگرچه سایر نسبت‌ها قادر به افزایش میزان بقای *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* هستند اما با در نظر گرفتن خصوصیات حسی تیمارها به‌عنوان تیمار بهینه ارزیابی نمی‌شوند. لذا تیمار با ۳ درصد عصاره پوست انار و ۵ درصد عصاره اینولین به‌عنوان تیمار بهینه معرفی گردید.

منابع

1. Buruleanu, L. C. L. Nicolescu. D. Avram. M. G. Bratu and Manea l. Survival of probiotic bacteria during lactic acid fermentation of vegetable juices. 2009. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. 15(1):132-139.

2. Champagne & Gardner, F. Probiotic and prebiotic world Gastroenterology Organization Practice Guideline, 2008. 1-22.

3. Granato GK, RP Singh, KK.SakariahAntioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro.2010. Food Chemistry 73 (3), 285-290.

4. Saarela M. Alakomi H.L. Mättö J. Ahonen A.M. Puhakka A. Tynkkynen S. Improving the storage stability of Bifidobacterium breve in low pH fruit juice.2011. International Journal of Food Microbiology 149; 106–110.

5. Bozkurt, L. C. L. Nicolescu. D. Avram. M. G. Bratu and Manea l. Survival of probiotic bacteria during lactic acid fermentation of vegetable juices.2006. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. 15(1):132-139.

6. Hayrapetyan, H. Hazeleger, W. C. & Beumer, R. R. Inhibition of Listeria monocytogenes by pomegranate (Punica granatum) peel extract in meat paté at different temperatures.2012. Food Control, 23, 66-72.

۷- عادلی میلانی م، میزانی م، قوامی م. اثر پودر خردل زرد برpH، جمعیت میکروبی زنده و خواص حسی سس مایونز، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. ۱۳۸۹ ,دوره ۵ ,شماره پی در پی ۱۷, ۴۴-۳۵.

۸- کرمی مقدم آ، امام جمعه ز، یاسینی اردکانی س. ع. بررسی خواص فیزیکی، مکانیکی، ممانعت کنندگی و ضدمیکروبی فیلم کازئینات سدیم حاوی عصارهٔ پوست انار.۱۳۹۳. مهندسی بیوسیستم ایران، دورهٔ ۴۵ شمارهٔ ۲، ص ۱۳۰-۱۲۱.

[1] Saavedra-Leos

www.SID.ir

Archive of SID

۹- بی نام. سس سویا – ویژگی‌ها و روش‌های آزمون، استاندارد ملی ۷۷۲۰. ۱۳۸۳.موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۱۰- نادعلی ن، زمردی ش، خسروشاهی اصل ا، تأثیر آرد عدس قرمز و کنسانتره انگور قرمز بر زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و خواص کیفی ماست قالبی ۱۳۹۴.نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۵ شماره ۱، ص ۱۳-۱.

11. Lanciotti, R. Gianatti, A. patrignani, F. belletti, N. Guerzoni, M.E. and Gardini, f. 2004.Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. J. food Science & Technology, 15(4): 201-208.

۱۲- محمدی ثانی ع.م، میلانی ا، منصوری ا، نوربخش ل. ارزیابی تأثیرات پری‌بیوتیکی پلی فروکتان استخراج‌شده از گیاه سیب‌زمینی ترشی بر باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در شرایط آزمایشگاهی.۱۳۹۰. همایش ملی صنایع غذایی، قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان.

۱۳- نعیمی ه، مرتضوی س.ع، میلانی ا، کوچکی آ. *لاکتوباسیلوس کازئی* در طول دوره نگهداری ماست بستنی سین‌بیوتیک، تاثیر افزودن اینولین و فرآیند ریز پوشانی بر میزان زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در طول دوره نگهداری ماست بستنی سین‌بیوتیک.۱۳۹۲. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۴۰، دوره ۱۰، ص ۳۶-۲۷.

۱۴- مهدیان ا، کاراژیان ر، صبری س. بررسی اثر جایگزینی چربی شیر با اینولین و کنسانتره پروتئینی شیر بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی بستنی کم‌چرب.۱۳۹۲. نوآوری در علوم و فناوری غذایی (علوم و فناوری غذایی)، دوره ۵، شماره ۴، ص ۵۱-۴۳.

15. Ismail, E. A. Al-Saleh, A. Metwalli, M. Effect of inulin supplementation on rheological properties of Low-fat Ice cream. 2013. Life Science Journal, 10 (3):1742-1746.

۱۶- شوریده م، تسلیمی ا، محمدی فر م.ا، عزیزی م.ح. بررسی تاثیر D- تاگاتوز و اینولین بعنوان جایگزین ساکارز بر خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و رئولوژیکی شکلات شیری.۱۳۹۰. فصلنامه علوم و صنایع غذایی دوره ۸، شماره ۲۹، ص ۱۲۵-۱۱۳.

۱۷- وثوق ا. ص. خمیری م، کاشانی نژاد م، جعفری س. م. اثر عرق نعناع بر قابلیت بقای باکتری های پروبیوتیک در نوشیدنی سنتی ایرانی (دوغ).۱۳۸۸. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، شماره دوم، ص ۱۱۰-۱۰۹.

18.Saavedra-Leos M.Z. Leyva-Porras C. Martínez-Guerra E. Pérez-García S.A. Aguilar-Martínez J.A. Álvarez-Salas C. Physical properties of inulin and inulin–orange juice: Physical characterization and technological application, Carbohydrate Polymers, Volume 105, Pages 10-19.

www.SID.ir

Archive of SID

The effects of pomegranate and inulin on the survival of *Bifidobacterium bifidium* and the sensory and physicochemical properties of Synbiotic soy sauce

Mahsa Seifi Mohammadzadeh [1], **Mahnaz Hashemiravan[1]**, Alireza Shahab Lavasani [3]

1- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin Unit, Faculty of Science, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin Unit, Faculty of Science, Islamic Azad University, Varamin, Iran
3- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin Unit, Faculty of Science, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Abstract

The aim of this study was to use inulin as a peri-biotic compound as well as pomegranate peel extract as an antioxidant to increase the shelf-life of *Bifidobacterium bifidium* in soy sauce. For this purpose, 3, 5 and 7% pomegranate extract and inulin were used at 5, 10, 15 and 20% then viscosity, pH and *Bifidobacterium bifidium* survival were evaluated. The treatments were evaluated on the days of zero, seventh, fourteenth and twenty one. 13 treatments were evaluated in three replications in a randomized complete block design. Results showed that treatments higher than 3% of pomegranate peel extract and 5% inulin significantly reduced the probiotic bacteria survival. Finally, a decrease in the number of treatments points with increasing percentages Inulin and pomegranate peel extract. The pH also significantly decreased with increasing storage time and the ratio of inulin and pomegranate peel extract significantly decreased. The highest *Bifidobacterium bifidium* survival (T1) with 5% inulin and 3% of pomegranate peppermint extract was associated with a decrease in logarithmic equivalents and a population of 1×10^{8} CFU / ml. The highest reduction in the population of *Bifidobacterium bifidium* belonged to the control treatment at 5 logarithmic cycles, and the lowest of T1 treatment was 2.33 and T2 treatment was 3.33 logarithmic cycles at the end of the 21st day of storage ($p<0.05$).

Keywords: Inulin, *Bifidobacterium bifidium*, Synbiotic soy sauce, Pomegranate peel extract

[1]m_hashemiravan@yahoo.com

www.SID.ir