

اثر عصاره پوست انار بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در آب انار

مینا خان بگی دوگاه^۱، آزاده توفیقی^۲، کیانوش خسروی دارانی^۳، مهرناز دادگر^۱، سید امیر محمد مرتضویان^۴، نگین احمدی^۵

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران
- ۲- استادیار، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران
- ۳- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com
- ۴- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۵- کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: بخش‌های خوراکی میوه انار می‌تواند به صورت تازه مصرف شده یا به جهت تولید آب‌میوه تازه، نوشیدنی‌های کنسرو شده، ژله، مربا و پوره و نیز به منظور افزایش طعم و رنگ برخی نوشیدنی‌های تولیدی به کار رود. در این مطالعه اثر عصاره پوست انار به عنوان منبع طبیعی آنتی‌اکسیدان، ترکیبات پلی‌فنلی و ویتامین بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در آب انار مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: گونه پروبیوتیک مورد استفاده ل. پلانتاروم و ل. دلبروکی بود. نتایج نشان داد بیشترین میزان زنده‌مانی ل. پلانتاروم و ل. دلبروکی را زمانی که باکتری در محیط MRS broth به مدت ۴۸ h انکوبه شده و به محیط مغذی حاوی عصاره پوست انار ۰/۱٪ تلقیح و در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷°C به مدت ۷۲h گرمخانه‌گذاری و در دمای محیط برای مدت ۲ هفته نگهداری شد نسبت به بقیه تیمارها کسب نمود. طعم، عطر و پذیرش کلی آب انار پروبیوتیک حاوی بیشترین تعداد باکتری زنده از طریق مقیاس هدونیک ۹ تایی با نمونه شاهد مقایسه شدند و نتایج توسط طرح کاملاً تصادفی (CRD) و آزمون F بررسی شد. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح معنی‌دار ۰/۵٪ توسط نرم‌افزار SPSS₁₁ انجام شد (P>0.05).

یافته‌ها: بیشترین تعداد باکتری زنده برای ل. پلانتاروم و ل. دلبروکی به ترتیب $(4 \times 10^6 \text{ cfu.ml}^{-1})$ و $(4 \times 10^6 \text{ cfu.ml}^{-1})$ به دست آمد. نتایج نشان داد خواص حسی محصول پروبیوتیک با محصولات مشابه غیر پروبیوتیک تفاوت معنی‌داری نداشت و از نظر مصرف‌کننده قابل قبول بود (P>0.05).

نتیجه‌گیری: آب انار عصاره غلات (مالت یا جودوسر) بر پایداری و زنده‌مانی *L. plantarum* در محصول، بیشتر از *L. reuteri* مؤثر بوده است. فیبر مالت (آرد مالت) در مورد هر دو باکتری تأثیر بهتری نسبت به فیبر جودوسر (آرد جودوسر) داشت. علت این تفاوت را می‌توان به میزان قند بالای مالت ربط داد.

واژگان کلیدی: آب انار، عصاره پوست انار، پروبیوتیک

مقدمه

پروبیوتیک زنده در محصول نهایی وجود ندارد، ولی به‌طور کلی محدوده‌ی $10^7 - 10^6$ عدد باکتری پروبیوتیک در هر گرم از فراورده پروبیوتیک را برای بروز اثرات سلامتی‌بخش ضروری دانسته‌اند (۱-۳). پری‌بیوتیک‌ها نیز اولین بار توسط دو دانشمند به نام‌های گیبسون و رابرفروید (۱۹۹۵) به صورت زیر تعریف شدند:

«اجزاء یا ترکیبات غذایی غیرقابل هضم که اثرات مفیدی را در میزبان از طریق تحریک انتخابی رشد و یا فعالیت یک

در حال حاضر تمایل بسیار زیادی به مصرف موادغذایی عملگر یعنی غذاهای دارای ارزش دارویی و تغذیه‌ای ویژه علاوه بر خواص تغذیه‌ای پایه، به‌وجود آمده است. در این میان مواد غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها و ترکیبات پری‌بیوتیک از این نمونه‌ها هستند. پروبیوتیک‌ها به‌عنوان میکروارگانیزم‌های زنده‌ای که در مقادیر کافی موجب ایجاد تعادل در فلور میکروبی میزبان می‌شوند، معرفی شده‌اند. اگرچه هنوز توافق کلی روی حداقل تعداد باکتری‌های

مانع رشد بیماری‌زایی مثل باکتریوئیدس و کلستریدیوم نیز می‌شود (۱۳). پوست انار علاوه بر کاربردهای تغذیه‌ای و دارویی، در منسوجات به عنوان عامل رنگ دارای اهمیت است. پوست انار از منابع غنی پلی‌فنول‌ها شناخته شده است (۱۴). بررسی‌ها نشان داده است پوست انار خشک و پودر شده و عصاره‌گیری شده، دارای محتویات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی می‌باشد. از پوست انار می‌توان آنتی‌اکسیدان را به‌وسیله مخلوطی از اتانول و متانول و استون استخراج نمود (۱۴).

مطالعات مختلفی برای بررسی قابلیت آب‌میوه‌جات و سبزیجات مانند گوجه‌فرنگی، کلم و چغندر به عنوان ماده خام برای تولید نوشیدنی پروبیوتیک انجام شده است. در این تحقیقات *ل. اسیدوفیلوس*، *ل. پلاننتاروم*، *ل. کازئی* و *ل. دلبروکی* مورد استفاده قرار گرفتند. در مورد آب گوجه‌فرنگی شمارش سلول‌های باقی‌مانده بعد از ۷۲ ساعت تخمیر به 10^9 cfu.ml⁻¹ رسید و بعد از ۴ هفته نگهداری سرد در 4 درجه سانتی‌گراد به 10^6 تا 10^8 cfu.ml⁻¹ رسید (۱۵). *ل. پلاننتاروم*، *ل. کازئی* و *ل. دلبروکی* در آب کلم به خوبی رشد نمودند و مقدار آنها بعد از ۴۸ ساعت تخمیر به 10^9 cfu.ml⁻¹ رسید. بعد از ۴ هفته نگهداری در 4 درجه سانتی‌گراد زنده‌مانی *ل. پلاننتاروم* و *ل. دلبروکی* به 10^7 و 10^5 cfu.ml⁻¹ رسید. *ل. کازئی* زنده‌مانی خود را بعد از ۲ هفته نگهداری سرد بطور کامل از دست داد (۱۶). اما در مورد چغندر مقدار سلول‌های باقی‌مانده به جز *ل. اسیدوفیلوس* در آب چغندر بعد از ۴ هفته نگهداری سرد در 4 درجه سانتی‌گراد به 10^6 تا 10^8 cfu.ml⁻¹ رسید (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر، تخمیر آب انار با سه گونه *ل. دلبروکی*، *ل. پاراکازئی*، *ل. پلاننتاروم* و *ل. اسیدوفیلوس* مورد بررسی قرار گرفت. اسید سیتریک به عنوان اسید ارگانیک اصلی در آب انار بوسیله همه گونه‌ها مصرف شد. لاکتوباسیلوس پلاننتاروم و لاکتوباسیلوس دلبروکی قابلیت بقا را در ۲ هفته اول نگهداری در 4 درجه سانتی‌گراد به خوبی حفظ کردند ولی اسیدوفیلوس و پاراکازئی بعد از ۲ هفته نگهداری در شرایط مشابه از بین رفتند (۱۸). غنی‌سازی محیط کشت با مواد مغذی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه‌ای آب چغندر و آب هویج با استفاده از مخمر آب‌جو غنی شد. افزودن این مخمر در محیط کشت باعث افزایش شمارش میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک، کاهش زمان تخمیر شده و میزان آمینواسید، ویتامین، مواد معدنی و فعالیت

یا تعداد محدودی از باکتری‌ها در روده اعمال می‌کنند» (۵، ۴). مصرف مواد غذایی حاوی میکروارگانیسم‌های مفید که از آنها تحت عنوان پروبیوتیک یاد می‌شود، کمک شایانی به بقاء و نگهداری میکروب‌های بومی روده و توازن آن کرده و در نتیجه منافع بسیار زیادی را برای سلامت انسان به‌همراه دارد. فراورده‌های سین‌بیوتیک در واقع مخلوطی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک و ترکیبات پری‌بیوتیک بوده که اثرات مثبت بیشتری را بروز می‌دهند. ماتریکس مواد غذایی روی بقاء باکتری پروبیوتیک در محیط روده اثر می‌گذارد و این‌که ماده غذایی حامل چه سیستم یا محیطی باشد، حائز اهمیت است. ارزیابی حسی پروبیوتیک‌ها در سیستم‌های آب‌میوه اهمیت تجاری مهم و حیاتی دارد. درک اثرات حسی کشت‌های پروبیوتیک روی سیستم‌های غیر لبنی و ارزیابی چگونگی اثرات غنی‌سازی پروبیوتیک‌ها در قابلیت پذیرش مصرف‌کننده، اهمیت فراوانی دارد (۸-۶). آب‌میوه‌جات دارای مواد مغذی مفیدی مانند مواد معدنی، ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد و می‌توانند ماده‌ای مناسب برای کشت باکتری‌ها باشند. انجام پژوهش‌های بیشتر در زمینه آب‌میوه‌جات پروبیوتیک و بهبود خواص حسی آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد (۹) این مواد از پتانسیل بالا برای تبدیل شدن به محصول پروبیوتیک برخوردارند زیرا خود فراورده‌ای سلامت‌بخش هستند، توسط گستره‌ی وسیعی از مردم مصرف می‌شوند، از نظر حسی مقبول عام بوده و بر خلاف فراورده‌های لبنی فاقد ترکیبات ناسازگار با بدن نظیر لاکتوز هستند و منجر به محروم شدن بخشی از جمعیت از مصرف آن نمی‌شوند (۱۰).

میوه انار یکی از معروف‌ترین میوه‌های بومی کشت‌شده در ایران است و در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری رشد می‌کند. میزان تولید سالانه انار در ایران حدود ۶۷۰۰۰۰ تن در سال می‌باشد. با توجه به آنکه ایران کشوری گرمسیری است و همچنین جمعیت جوانان در ایران زیاد است، مصرف آب‌میوه‌جات در کشورمان بالا می‌باشد (۱۱). آب انار تازه حاوی ۸۵/۴٪ آب، مقدار قابل توجهی مواد جامد محلول، قندهای احیاکننده، آنتوسیانین، فنولیک‌ها، اسید آسکوربیک، پروتئین و آنتی‌اکسیدان می‌باشد (۱۲). آب انار دارای اثرات پری‌بیوتیکی بوده و باعث رشد باکتری‌های مفید روده می‌شود. اثر پری‌بیوتیکی انار با پری‌بیوتیک‌هایی نظیر اینولین متفاوت است زیرا نه تنها باعث رشد باکتری‌های مفید مانند بیفیدوباکتر و لاکتوباسیلوس‌ها می‌شود بلکه

روش اسپکتروفتومتر و میکروسکوپی رسم شد. لذا از لوله‌های آزمایش حاوی پیش‌کشت به‌وسیله سرم فیزیولوژی سری رقت‌های در سه تکرار تهیه و OD (دانسیته نوری) لوله‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. برای شمارش تعداد باکتری‌های محیط پیش‌کشت به‌وسیله شمارش مستقیم توسط میکروسکوپ از رنگ‌آمیزی ساده و لام نوبار استفاده شد. ابتدا رقت‌های 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} به‌وسیله سمپلر در سه تکرار در لوله‌های آزمایش تهیه شد. برای رنگ‌آمیزی درون هر یک از لوله‌های آزمایش یک قطره کریستال‌ویوله که به صورت محلول ۵٪ تهیه شده بود ریخته شد و به منظور شمارش ۱۰ میکرولیتر از آن توسط سمپلر بر قسمت مدرج لام منتقل گردیده و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ مورد بررسی قرار گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌ها: انار خریداری و به‌صورت دستی پوست‌گیری و آبگیری شده و پس از آن پاستوریزه شد و در ظروف مخصوص درب‌دار ریخته و در دمای یخچال نگهداری شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها متغیرها با توجه به طرح آماری پلاکت-برمن بر روی آنها اعمال شد.

توسعه تلقیح از پیش‌کشت به محیط مغذی: آب انار به میزان ۴۰ میلی‌لیتر را اندازه‌گیری نموده و عصاره پوست انار به‌میزان v/v ۰/۱ یا ۰/۱۰٪، به آن اضافه شد. سن تلقیح ۲۴ ساعت می‌باشد به‌همین دلیل در روز دوم تلقیح انجام می‌پذیرد. به‌میزان v/v ۱۰٪ از لوله پیش‌کشت که ۲۴ ساعت انکوبه شده بود برداشت کرده درون سانتریفیوژ قرار داده و بیومس به‌دست‌آمده به آب انار غنی شده با عصاره پوست انار تلقیح شد، سپس نمونه را در انکوباتور 37°C قرار داده، بعد از گذشت ۷۲ h یا ۹۲ h (زمان تخمیر) از انکوباتور خارج نموده، نمونه را در دمای محیط (20°C) یا دمای یخچال (4°C) نگهداری نموده و بعد از گذشت ۱ یا ۲ هفته میزان باکتری‌های زنده اندازه‌گیری شد. هر تیمار سه بار تکرار شد.

شمارش باکتری زنده: برای شمارش سلول زنده از روش پور پلیت استفاده شد. نمونه‌ها با محلول سرم استریل رقیق شده (10^{-6} - 10^{-1}) و در محیط کشت MRS Agar کشت داده شدند و در انکوباتور 37°C برای ۴۸ ساعت انکوبه شدند. کلنی‌های مشخص شده توسط کلنی‌کانترا شمارش شده و به شکل cfu.g^{-1} گزارش شد. این کار در شروع نگهداری و در طول نگهداری انجام گرفت.

آنالیز حسی: محصول توسط ۲۰ پانل تست آموزش ندیده با مقیاس هدونیک ۹ تایی چشیده شد و برای بررسی نتایج

آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی شد (۱۹) در مطالعه دیگری زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در آب‌میوه مدل سازی شده با افزودن ویتامین‌های B_2 , C , B_3 , B_6 و عصاره چای سبز و عصاره دانه انگور سفید به عنوان منابع آنتی‌اکسیدانی بررسی شد. نتایج نشان داد زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در آب‌میوه حاوی عصاره چای سبز و عصاره دانه انگور (که حاوی ویتامین C هستند) افزایش یافت (۲۰).

هدف از این مطالعه تعیین قابلیت آب انار به عنوان ماده خام برای تولید آب‌میوه پروبیوتیک به‌وسیله باکتری‌های پروبیوتیک *L. پلانتراروم* و *L. دلبروکی* می‌باشد. عصاره پوست انار به‌عنوان منبع طبیعی آنتی‌اکسیدان، ترکیبات پلی‌فنلی و ویتامین از متغیرهای اصلی منتخب در این طرح است. عمومی شدن مصرف آب انار غنی سازی شده به‌وسیله پروبیوتیک‌ها به علت خواص درمانی انار، نقش پری‌بیوتیکی انار و خواص سلامت‌بخش پروبیوتیک‌ها می‌تواند بر سلامت افراد جامعه تاثیرگذار باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه کشت فرعی (subculture): برای تهیه کشت فرعی محیط کشت استریل MRS agar به‌درون پلیت‌ها منتقل شد. پس از خنک و بسته شدن آگار *L. پلانتراروم* از استوک اولیه به پلیت منتقل و به‌صورت خطی کشت داده شد. همچنین عملیات پاساژ برای *L. دلبروکی* نیز تکرار گشت. سپس پلیت‌ها به‌صورت بی‌هوای درون انکوباتور در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد و در نتیجه بعد از گذشت این زمان کلنی‌هایی از هر دو باکتری بر روی محیط کشت ایجاد گشت که این پلیت‌ها برای انجام مراحل بعدی به‌مدت یک ماه قابل استفاده بودند.

تهیه پیش‌کشت (preculture): برای تهیه پیش‌کشت به‌وسیله لوپ استریل در نزدیکی شعله از کلنی‌های *L. پلانتراروم* و *L. دلبروکی* برداشته و هریک را به‌طور جداگانه به ارلن حاوی محیط کشت استریل MRS broth و بعد از آن به لوله‌های آزمایش انتقال داده شد. سپس لوله‌های آزمایش به صورت بی‌هوای درون انکوباتور در درجه حرارت 37°C درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده و در نتیجه بعد از گذشت این زمان توده‌ای که نشان‌دهنده رشد این باکتری‌ها بود در محیط مایع دیده شد. این لوله‌ها برای انجام مراحل بعدی به‌مدت یک هفته قابل استفاده بودند.

برای کنترل میزان تلقیح و امکان تخمین تعداد با داشتن OD نمونه، منحنی کالیبراسیون OD در برابر تعداد به دو

ل. پلانتاروم به ترتیب متعلق به آزمون شماره ۹ و ۱۲ بود. به‌همین ترتیب بیشترین تعداد باکتری زنده در روز هفتم و روز چهاردهم به ترتیب به آزمایش شماره ۴ و ۱ مربوط می‌شد، به عبارتی تیمار شماره ۱ بالاترین تعداد باکتری زنده ل. پلانتاروم را بعد از دو هفته نگهداری نمونه کسب کرد. اما در مورد باکتری پروبیوتیک ل. دلبروکی در مرحله شروع انبار مانی بیشترین تعداد باکتری زنده مربوط به آزمون شماره ۱ بوده و به همین ترتیب آزمایش شماره ۱ بیشترین تعداد باکتری ل. دلبروکی را در روز چهاردهم کسب کرد. همان‌طور که در نمودارهای a-1 و b-1 نمایش داده شده است، بعد از گذشت دو هفته زنده‌مانی ل. پلانتاروم و ل. دلبروکی افزایش یافته است و این بدین علت است که باکتری با انجام فعل و انفعالات خود را با محیط سازگار نموده است.

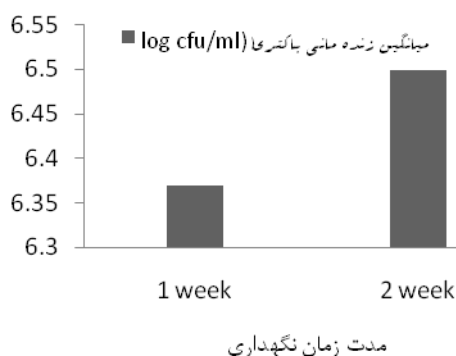
از آزمون دانکن و جدول ANOVA با سطح معنی‌دار ۰/۵ استفاده شد. در این مقیاس انتخاب امتیاز ۱ به معنای حداقل علاقه و انتخاب امتیاز ۹ به معنای حداکثر علاقه است. پانل تست‌ها بدون داشتن اطلاعات در مورد محصول آن را خورده و امتیاز خود را اعلام داشتند (۲۱).

یافته‌ها

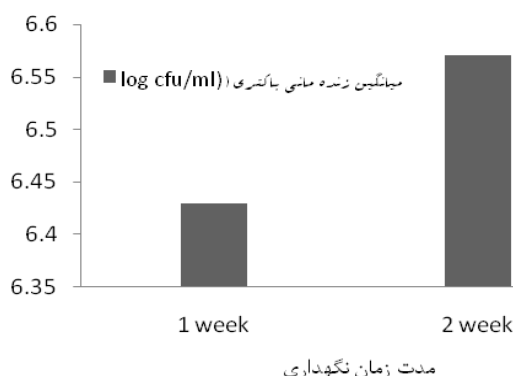
شمارش تعداد باکتری‌های زنده ل. پلانتاروم و ل. دلبروکی در طول نگهداری در آب انار: برای اندازه‌گیری باکتری‌های زنده ل. پلانتاروم و ل. دلبروکی از روش پورپلیت در محیط MRS Agar استفاده شد. نتایج به دست آمده به شرح زیر است. بر طبق جدول ۱ در طی دو هفته نگهداری آب انار پروبیوتیک، در بعضی از تیمارها تعداد باکتری با گذشت زمان افزایش و در بعضی کاهش یافته است. در روز اول از زمان نگهداری، بیشترین و کمترین تعداد باکتری زنده

جدول ۱. قابلیت زیستی ل. پلانتاروم و ل. دلبروکی (cfu.ml^{-1}) تلقیح شده در آب انار غنی شده با عصاره پوست انار قبل و بعد از نگهداری

شماره	محیط کشت آب انار + عصاره	زمان تخمیر (ساعت)	زمان و دمای نگهداری	شروع انبارمانی (انحراف معیار \pm میانگین)		بعد از یک هفته (انحراف معیار \pm میانگین)		بعد از دو هفته (انحراف معیار \pm میانگین)	
				ل. پلانتاروم	ل. دلبروکی	ل. پلانتاروم	ل. دلبروکی	ل. پلانتاروم	ل. دلبروکی
۱	٪۰/۱	۷۲	۲۰°C هفته ۲	۳/۷۷×۱۰ ^۶ ±۰/۰۱	۳/۶۳×۱۰ ^۶ ±۰/۱۳	-	-	۴/۷۴×۱۰ ^۶ ±۰/۱۱	۴×۱۰ ^۶ ±۰/۲
۲	٪۰/۰۱	۹۲	۲۰°C هفته ۲	۳/۶۵×۱۰ ^۶ ±۰/۱۲	۳/۲۵×۱۰ ^۶ ±۰/۰۴	-	-	۴/۱۵×۱۰ ^۶ ±۰/۱۳	۳/۴۰×۱۰ ^۶ ±۰/۱۴
۳	٪۰/۱	۹۲	۴۰°C هفته ۲	۳/۲۳×۱۰ ^۶ ±۰/۰۶	۳/۱۳×۱۰ ^۶ ±۰/۰۸	-	-	۳/۸۰×۱۰ ^۶ ±۰/۱۱	۳/۱۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۷
۴	٪۰/۱	۹۲	۴۰°C هفته ۱	۳/۳۴×۱۰ ^۶ ±۰/۰۶	۲/۲۳×۱۰ ^۶ ±۰/۰۴	۳/۶۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۳	۲/۳۰×۱۰ ^۶ ±۰/۱۸	-	-
۵	٪۰/۰۱	۷۲	۴۰°C هفته ۱	۳/۹×۱۰ ^۶ ±۰/۰۴	۳/۹×۱۰ ^۶ ±۰/۰۸	۲/۷۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۵	۲/۵۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۸	-	-
۶	٪۰/۱	۷۲	۲۰°C هفته ۱	۳/۹×۱۰ ^۶ ±۰/۱۶	۳/۵×۱۰ ^۶ ±۰/۱۵	۳/۴۰×۱۰ ^۶ ±۰/۱۷	۲/۹۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۳	-	-
۷	٪۰/۱	۷۲	۴۰°C هفته ۲	۳/۷۱×۱۰ ^۶ ±۰/۰۲	۳/۲۱×۱۰ ^۶ ±۰/۰۳	-	-	۳/۹۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۳	۳/۶۰×۱۰ ^۶ ±۰/۱۱
۸	٪۰/۱	۹۲	۲۰°C هفته ۱	۳/۱×۱۰ ^۶ ±۰/۰۱	۳/۱×۱۰ ^۶ ±۰/۰۷	۲/۲۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۶	۱/۸۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۷	-	-
۹	٪۰/۰۱	۷۲	۲۰°C هفته ۲	۴/۱×۱۰ ^۶ ±۰/۱۶	۳/۳×۱۰ ^۶ ±۰/۰۳	-	-	۳/۲۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۹	۲/۴۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۶
۱۰	٪۰/۰۱	۹۲	۴۰°C هفته ۲	۳/۱×۱۰ ^۶ ±۰/۰۲	۳/۲×۱۰ ^۶ ±۰/۱۲	-	-	۲/۹۰×۱۰ ^۶ ±۰/۱	۲/۹۰×۱۰ ^۶ ±۰/۲۱
۱۱	٪۰/۰۱	۹۲	۲۰°C هفته ۱	۲/۲×۱۰ ^۶ ±۰/۱۱	۲/۱×۱۰ ^۶ ±۰/۰۶	۲/۷۰×۱۰ ^۶ ±۰/۱۲	۲/۷۰×۱۰ ^۶ ±۰/۱۲	-	-
۱۲	٪۰/۰۱	۷۲	۴۰°C هفته ۱	۲/۱×۱۰ ^۶ ±۰/۰۶	۱/۲×۱۰ ^۶ ±۰/۱۱	۲/۰۲×۱۰ ^۶ ±۰/۱	۱/۹۰×۱۰ ^۶ ±۰/۰۶	-	-



(a)

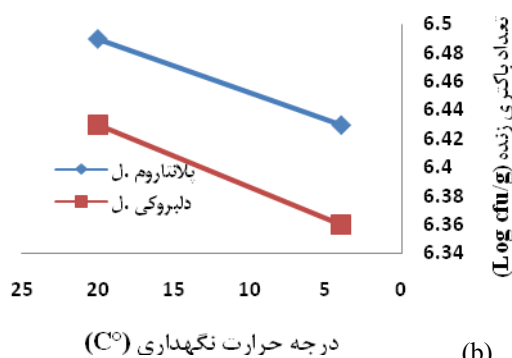


(a)

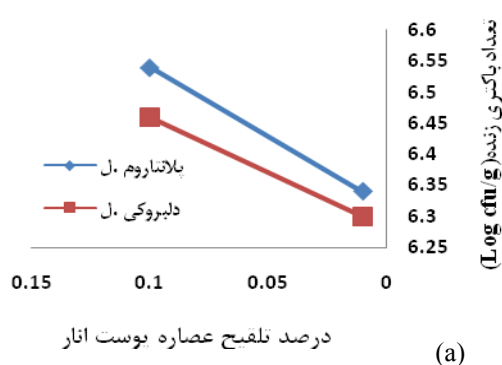
شکل ۱- a. میانگین تعداد زنده‌مانی باکتری ل. پلاتناروم، b. میانگین زنده‌مانی باکتری ل. دلبروکی.

محصول در دمای محیط (درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد) برای ۲ هفته نتیجه بهتری را نشان داده است. در مدت زمان ۲ هفته باکتری توانسته با محیط (محصول) سازش کرده و در مواردی رشد کمی هم داشته باشد. توانایی میکروارگانیسم برای رشد و زنده‌مانی به‌طور وسیعی به ظرفیت سازش‌پذیری آن با محیط بستگی دارد. در مورد زمان تخمیر هم مدت زمان ۷۲ ساعت (۳ روز) نتیجه بهتری را نشان داده است.

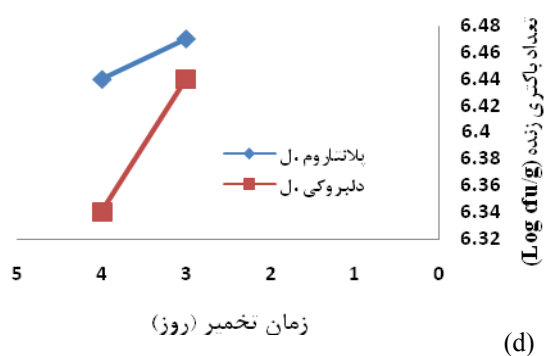
آنالیز آماری زنده‌مانی باکتری: نتایج حاصل از تاثیر درصد تلقیح عصاره پوست انار، درجه حرارت نگهداری، زمان نگهداری و زمان تخمیر بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک ل. پلاتناروم و ل. دلبروکی در نمودارهای ۲- (d-a) نمایش داده شده است. با توجه به این نمودارها آب انار حاوی ۰/۱٪ عصاره پوست انار تأثیر بهتری بر زنده‌مانی باکتری‌ها داشته که علت آن را می‌توان ترکیبات فنولیک و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره پوست انار دانست. نگهداری



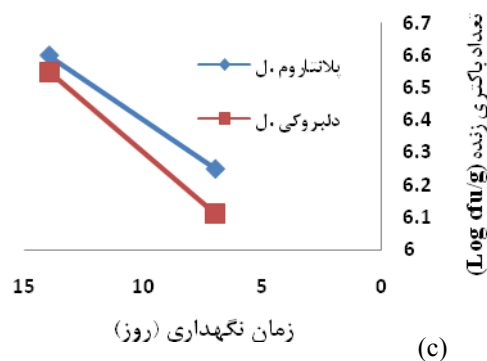
(b)



(a)



(d)



(c)

شکل ۲- a. تاثیر درصد تلقیح عصاره پوست انار، b. درجه حرارت نگهداری محصول، c. زمان نگهداری محصول، d. مدت زمان تخمیر بر قابلیت زیستی ل. پلاتناروم و ل. دلبروکی.

۲ هفته نگهداری شد بیشترین تعداد باکتری زنده برای *L. پلانتاروم* و *L. دلبروکی* به ترتیب (4×10^6) و ($4/74 \times 10^6$) به دست آمد. در نتیجه ترکیبات فنولیک موجود در عصاره پوست انار نقش تاثیرگذاری را در تحریک رشد و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها ایفا کرده است. استفاده از درصد مناسبی از پوست انار در آب‌میوه علاوه بر این که طعم نامطلوبی ایجاد ننمود بلکه باعث افزایش زنده‌مانی باکتری‌ها شد که می‌تواند راه حلی مناسب برای استفاده از ضایعات انار باشد. این نتایج با نتایج به دست آمده در ارتباط با این که آنتی‌اکسیدان‌ها و ویتامین‌ها باعث افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط نگهداری می‌شوند کاملاً هم‌خوانی دارد (۲۰).

با توجه به نتایج انبارداری محصول در دمای ۲۰ (دمای محیط) برای مدت ۲ هفته نتایج خوبی را نشان داده است. چرا که در دمای پایین (دمای یخچال) رشد باکتری بسیار کند است در نتیجه دمای محیط مناسب‌تر واقع شده تا باکتری با انجام فعل و انفعالات مورد نیاز خود با محیط سازگار شود. در ضمن دمای رشد بهینه برای باکتری‌های *L. پلانتاروم* و *L. دلبروکی* ۳۰-۳۷ درجه سانتی‌گراد است. این موضوع با اظهارات محققان دیگر نیز هم‌خوانی دارد (۲۲). در مدت زمان نگهداری ۲ هفته باکتری توانسته با محیط (محصول) سازش کند و در مواردی رشد کمی هم داشته است با توجه به گفته‌ی برخی از دانشمندان توانایی میکروارگانیزم برای رشد و زنده‌مانی به‌طور وسیعی به ظرفیت سازش‌پذیری آن با محیط خود بستگی دارد (۲۳، ۲۴).

در مورد مدت زمان تخمیر نیز نتیجه بدست آمده با مطالعات پیشین که بیان می‌کند جمعیت میکروبی *L. پلانتاروم* و *دلبروکی* در آب انار بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه کاهش می‌یابد مطابقت دارد (۱۸).

سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استخراج شده است. بدینوسیله از کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی به دلیل حمایت‌های مالی تشکر می‌شود.

آنالیز حسی نمونه‌های تولیدی: خواص حسی یا ارگانولپتیکی از مهمترین ویژگی‌های فراورده‌های پروبیوتیک می‌باشد چرا که اولین شرط پذیرش محصول نزد مصرف‌کننده، خواص حسی است. فاکتورهای طعم، بو و پذیرش کلی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. از میان آزمایش‌ها صورت گرفته تیمارهایی را که تقریباً حاوی بیشترین جمعیت میکروبی بوده، یکی از آن‌ها در دمای محیط و دیگری در یخچال نگهداری شده بود را انتخاب نموده و توسط ۲۰ ارزیاب به‌وسیله‌ی مقیاس هدونیک ۹ تایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در مقایسه با آب اناری که به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد به شرح جدول ۲ است. تیمارها تفاوت معنی‌داری از نظر طعم، عطر و پذیرش کلی نداشتند. میانگین‌ها با آزمون مقایسه میانگین Duncan در سطح معنی‌دار ۵٪ بررسی شدند و تمامی آن‌ها در یک گروه دسته‌بندی شدند یعنی تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. به طور کلی خواص حسی آب انار پروبیوتیک مطلوب ارزیابی شد.

جدول ۲. ارزیابی حسی آب انار پروبیوتیک حاوی

باکتری‌های *L. پلانتاروم* و *دلبروکی* و مقایسه آنها با نمونه شاهد

نمونه	شاخص‌های حسی			مجموع امتیاز
	طعم	عطر	پذیرش کلی	
شاهد	۷/۱	۵/۸	۶/۴	۳/۱۹
۱	۵/۸	۴/۹	۵/۳	۱۶
۷	۶/۲	۵/۱	۵/۵	۱۶/۸

ضریب طعم (مزه و بو): ۰/۱۶

بحث

با توجه به نتایج تیمار شماره ۱ بیشترین میزان زنده‌مانی *L. پلانتاروم* و *دلبروکی* را نسبت به بقیه تیمارها کسب نمود.

زمانی که باکتری در محیط MRS broth به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و به محیط مغذی حاوی عصاره پوست انار ۱/۱٪ تلقیح و در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷°C به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و در دمای محیط برای مدت

References

1. KhosraviDarani K, Kooshki M. Probiotics in Milk and Dairy Products. 1st ed. Tehran: Marze Danesh. p. 105-110.
2. Mortazavian AM, Sohrabvandi S. Review of Probiotics and Probiotic Food Products (with emphasis on dairy products). 1st ed. Tehran: Ata 2007. p. 147-2.
3. Reyed RM. Probiotics: A new strategies for prevention and therapy of diarrhea disease. *J Appl Sci Res* 2007; 3(4): 299-291.
4. Ziemer CJ, Gibson GR. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: Perspective and future strategies. *Int Dairy J* 1998; 8: 479-473.
5. Shah NP, Ravula R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australia J Dairy Technol* 2000; 55: 144-139.
6. Khurana HK, Kanawjia SK. Recent trends in development of fermented milks: *Current Nutr Food Sci* 2007; vol.3: 108-91.
7. Tamime AY. Probiotic dairy products. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing 2005. p. 216-1.
8. Sheehan V, Ross P, Fitzgerald GF. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2007; 8: 284-279.
9. Luckow T, Delahunty C. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Research Int* 2004; 37: 814-805.
10. Hekmat S, Reid G. Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. *Nutr Research* 2006; 26: 166-163.
11. Tarrega A, Rocafull A, Costell E. Effect of blends of short and long- chain inulin on the rheological and sensory properties of prebiotic low- fat custards. *Ann Microbiol* 2003; 33-1.
12. Aviram M, Dornfeld L, Kaplan M, Coleman R, Gaitini D, Nitecki S, et al. Pomegranate juice favonoids inhibit LDL oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Exp Clin Res* 2002; 28: 62-49.
13. Clifford M, Gibson G, Henglong HU, Rodig-Penman A. Prebiotic use of fruits and fruit juices in the promotion of beneficial gut microflora. *Eur Pat Specific* 2006; 1-12.
14. Li Y, Gue Ch, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng Sh. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract *Food Chem* 2006; 96: 260-254.
15. Yoon KY, Woodams E, Hang YD. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *J microbiol* 2004; 4: 318-315.
16. Yoon KY, Woodams E, Hang YD. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technol* 2006; 97: 1430-1427.
17. Yoon KY, Woodams E, Hang YD. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol* 2005; 38: 75-73.
18. Mousavi ZE, Mousavi SM, Razavi SH, Emam-Djomeh Z, Kiani H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria: *World J Microbiol Biotechnol* 2010; DOI 10.1007/s11274-010-0436-1.
19. Rakin M, Vukasinovic M, Siler-Marinkovic S, Maksimovic M. Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate. *Food Chem* 2007; 100: 602-599.
20. Shah NP, Ding WK, Fallourd MJ, Leyer G. Improving the Stability of Probiotic Bacteria in Model Fruit Juices Using Vitamins and Antioxidants. *Journal of Food Sci* 2010; 75: 45-41.
21. Guergoletto K, Magnani M, San Martin J, Andrade C, Garcia S. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2010; 11: 421-415.
22. Shah NP. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy food. *J Dairy Sci* 2001; 83: 907-894.
23. Kingsley A, Emanuel O, Humphrey O, Gregor R. Yogurt containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR- 1 and *Lactobacillus reuteri* RC- 14 helps resolve moderate diarrhea and increase CI count in HIV/ AIDS patients. *J Clinic Gastroenterol* 2008; 42: 243-239.
24. Lacroix C, Yildirim S. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18: 183-176.

Influence of pomegranate peel on viability of probiotic bacteria in pomegranate juice

Khanbagy Dogahe M¹, Towfighi A², Khosravi-Darani K^{3*}, Dadgar M¹, Mortazavian AM⁴, Ahmadi N⁵

1. Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
2. Assistant Prof. Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
3. *Corresponding author: Associate prof (in Research), Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: kiankh@yahoo.com
4. Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Students` Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Edible parts of pomegranate fruit can be eaten fresh or used for production of fresh juice, caned drinks, jellies, jams and purees and also used to enhance color and flavor of beverages. In this research, effect of pomegranate peel extract as natural antioxidants, polyphenolic ingredients and vitamins on viability of probiotic bacteria in pomegranate juice is studied. Two different strains of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*) were used in this study.

Materials and Methods: Flavor, odore and overall acceptability of probiotic pomegranate juice containing the highest number of viable bacteria were compared with control sample by hedonik scale divided into nine and results by a completely randomized design (CRD) and the F test were evaluated. The mean comparisons was performed by Duncan method at the significance level $\alpha=5\%$ by SPSS software (version=11.0).

Results: The results showed that the highest rate survival of *L. Plantarum* and *L. delbrueckii* was seen when bacteria were incubated in MRS broth for 48h, inoculated in nutrient medium containing pomegranate peel extract 0/1% and incubated in anaerobic conditions for 72 hours at 37°C and stored at room temperature for 2 weeks. The highest number of live bacteria for *L. Plantarum* and *L. delbrueckii* was obtained respectively 4.74×10^6 and 4.74×10^6 (cfu.ml⁻¹). The sensory properties of probiotic products were not significant difference with similar non-probiotic products and were acceptable in terms of consumer ($P>0.05$).

Conclusion: Using of appropriate percent of pomegranate peel extract not only did not produce undesirable flavors but also led to increasing survival of bacteria.

Keywords: Pomegranate juice, Pomegranate peel extract, *Probiotic*