

بررسی اثر نگهداری یخچالی بر قابلیت زیستی سویه‌های بومی و صنعتی پروبیوتیک و برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی در آب زغال‌اخته

آمنه نعمت الهی¹، سارا سهراب‌وندی²، سید امیر محمد مرتضویان فارسانی³، رزیتا کمیلی⁴، سپیده اسدزاده⁴

1- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2- نویسنده مسئول: استادیار گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: sohrabv@ut.ac.ir

3- دانشیار گروه آموزش علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

4- کارشناس گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 93/2/2

تاریخ پذیرش: 93/4/3

چکیده

سابقه و هدف: امروزه تقاضا برای فراورده‌های پروبیوتیک غیرلبنی به دلیل پرطرفدار شدن گیاه‌خواری، عدم تحمل لاکتوز شیر در برخی افراد و میزان بالای کلسترول فراورده‌های لبنی افزایش یافته است. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر نگهداری یخچالی بر قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها و برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی در آب زغال‌اخته است.

مواد و روش‌ها: آب زغال‌اخته با pH طبیعی و تعدیل شده با سدیم‌بی‌کربنات توسط سه سویه صنعتی پروبیوتیک شامل *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *ل*، *پلانتارم* و *ل*، کازئی و دو سویه بومی *ل*، کازئی تلقیح شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از تلقیح وارد یخچال (4°C) شدند. سپس ویژگی‌های شیمیایی از جمله pH، اسیدیته، میزان مواد فنلی، آنتوسیانین‌ها و فعالیت ضداکسیدانی، ویژگی‌های میکروبی از جمله شمارش سلول‌های زنده پروبیوتیک و خواص حسی نمونه‌ها به مدت 4 هفته با فواصل زمانی یک هفته برای نمونه‌های با pH تعدیل‌شده مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و Repeated Measure و نرم‌افزار SPSS انجام شد. سطح معنی‌داری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که نوع تیمار، زمان نگهداری و اثر متقابل این دو عامل بر تغییرات ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در آب زغال‌اخته تأثیر معنی‌داری دارد ($p < 0/05$). نتایج نشان داد که سویه بومی *ل*، کازئی زیر-گونه T4 در مقایسه با سایر پروبیوتیک‌ها، قابلیت زیستی خود را بعد از 4 هفته نگهداری یخچالی در تعداد $8/67 \log \text{cfu/ml}$ حفظ نمود. همچنین بیشترین تغییرات در ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، در تیمارهای آب زغال‌اخته حاوی این سویه پروبیوتیک مشاهده شد که نشان-دهنده‌ی فعالیت تخمیری آن طی نگهداری یخچالی است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که آب زغال‌اخته به دلایلی نظیر pH پایین و وجود ترکیبات فنلی بازدارنده بر قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها به ویژه سویه‌های صنعتی طی نگهداری یخچالی اثر منفی دارد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، زغال‌اخته، فعالیت ضداکسیدانی، قابلیت زیستی، مواد فنلی

• مقدمه

تنوع فراورده‌های غذایی شده است. از طرف دیگر توجه مصرف‌کنندگان به رژیم‌های غذایی دارای اثر سلامت‌بخش و جلوگیری‌کننده از بیماری‌های مزمن نظیر دیابت، سرطان و

توجه رو به افزایش مصرف فراورده‌های غذایی بی‌ضرر عاری از پاتوژن‌ها یا سموم آن‌ها و یا انواع حاوی ریززنده‌هایی که قادر به تغییر ترکیبات شیمیایی هستند؛ باعث افزایش

خیلی اسیدی مانند آب انار توصیه نمی‌شود. همچنین قابلیت زنده‌مانی *L*، پلانتاروم و *L*، دلبروکی طی نگهداری یخچالی در زمان محدود در آب انار نسبت به سایر سویه‌ها موفقیت آمیزتر بود (15). نتایج حاصل از آزمایشات Pereira و همکاران روی تخمیر آب سیب با استفاده از *L*، کازئی نشان داد که این باکتری می‌تواند در شرایط نگهداری یخچالی به رشد خود ادامه دهد (16).

نتایج مطالعه روی قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در نوشیدنی مخلوط شیر- هویج نشان داد که تعداد سلول‌های زنده *L*، پلانتارم، *L*، رامنوسوس و *B*، لاکتیس طی 20 روز نگهداری یخچالی اندکی کاهش پیدا کرد و تعداد *L*، اسیدوفیلوس در حد $6/6 \log \text{cfu/ml}$ باقی ماند (17). اثر نگهداری یخچالی روی قابلیت بقای پروبیوتیک‌ها توسط پژوهشگران زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است. مرتضویان و همکاران در سال 2007 اثر درجه حرارت نگهداری سرد را روی قابلیت بقای پروبیوتیک‌ها در ماست بررسی و گزارش کردند که بالاترین قابلیت زیستی *L*، اسیدوفیلوس بعد از 20 روز نگهداری در درجه حرارت 2°C مشاهده شد. همچنین کاهش بیش از 2 سیکل لگاریتمی در تعداد *L*، اسیدوفیلوس در انتهای زمان نگهداری ماست گزارش شد (18). با این وجود، قابلیت بقای پروبیوتیک‌ها در مواد بر پایه میوه به دلایلی نظیر اسیدی بودن محیط آن‌ها، وجود ترکیبات ضد میکروبی گیاهی و کمبود ترکیبات مغذی مورد نیاز رشد آن‌ها، دشوارتر از فرآورده‌های لبنی است (19). Alegria و همکاران در سال 2011 گزارش کردند که *L*، رامنوسوس در آب پرتقال و قطعات سیب، به ترتیب بعد از 12 و 4 هفته نگهداری در دمای 4°C زنده باقی ماندند (20، 15).

آب میوه زغال‌اخته حاوی مقدار زیادی آنتوسیانین، ویتامین C، تانین و اسیدهای آلی است. این میوه اثرات ضد- التهابی و ضداسیدانی دارد و در داروهای سنتی برای بهبود کار کبد و کلیه و تخفیف درد به کار می‌رود. بنابراین، با توجه به خواص سلامت‌بخش فراوان موجود در آن، این میوه پتانسیل استفاده به عنوان غذای فراسودمند از جمله تولید نوشیدنی پروبیوتیک را دارد (21).

اهداف این مطالعه شامل مقایسه‌ی قابلیت زنده‌مانی سویه‌های بومی کشور با سویه‌های صنعتی پروبیوتیک در برابر عوامل بازدارنده‌ی موجود در زغال‌اخته نظیر pH پایین و ترکیبات فنلی، تعدیل pH آب میوه با سدیم‌بی‌کربنات به منظور بررسی اثر pH روی قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها و اثر نگهداری یخچالی بر برخی ویژگی‌های فراسودمند و حسی آب زغال‌اخته پروبیوتیک نظیر ترکیبات فنلی، میزان

فشار خون بالا باعث افزایش تمایل مصرف‌کنندگان به غذاهای طبیعی و مصرف غذاهای فراسودمند شده است (1). غذاهای فراسودمند به عنوان غذاهایی تعریف می‌شوند که علاوه بر ارزش غذایی باعث جلوگیری از بیماری‌ها و کاهش خطر توسعه‌ی آن‌ها می‌شوند و بر میزبان اثرات سلامت‌بخش دارند (2، 3). برای تولید غذاهای فراسودمند، ترکیبات مختلفی مانند پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و فیبرهای رژیمی و متابولیت‌های ثانویه گیاهی نظیر ترکیبات فنلی را به فرآورده‌های غذایی اضافه می‌کنند (4، 5).

واژه پروبیوتیک توسط کمیته متخصصین به صورت ریز- زنده‌هایی تعریف می‌شود که در صورت ورود تعداد کافی آن به روده، اثرات سلامت‌بخشی بر میزبان اعمال می‌کند (6، 7). در تمامی فرآورده‌های پروبیوتیک تعداد سلول‌های زنده پروبیوتیک در هر گرم یا میلی‌لیتر از فرآورده در لحظه مصرف به عنوان ارزش اساسی آن‌ها محسوب می‌شود، از این رو این شاخص تعیین‌کننده‌ی کارایی دارویی این فرآورده‌ها است و باید به اندازه کافی بالا باشد تا پس از مصرف با توجه به نوع فرآورده تعداد کافی سلول زنده پروبیوتیک به محیط روده راه یابد. تعداد باکتری‌های زنده مورد نیاز در زمان مصرف برای اثربخش بودن غذا بر سلامتی باید حداقل 10^6 - 10^9cfu/ml باشد (8). اثرات سلامت‌بخش پروبیوتیک‌ها بر انسان شامل افزایش تحمل و هضم لاکتوز، اثر مثبت بر فلور میکروبی روده، کاهش pH روده، بهبود عملکرد روده، کاهش کلسترول، آمونیاک و دیگر ترکیبات سمی، تولید ویتامین‌های گروه B نظیر فولیک اسید، ترمیم و تجدید فلور طبیعی روده بعد از درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان و جلوگیری از اسهال حاد ایجاد شده به وسیله روتاویروس‌ها (Rotaviruses) و تقویت سیستم ایمنی بدن است (9).

عمدتاً افزودن پروبیوتیک‌ها در فرآورده‌های لبنی نظیر ماست صورت می‌گیرد (9، 10)، این موضوع در حالی است که مشکلاتی نظیر عدم تحمل لاکتوز و میزان کلسترول فرآورده‌های لبنی باعث محدودیت مصرف توسط بخشی از مردم می‌شوند (11، 12). تحقیقات نشان می‌دهند که استفاده از پروبیوتیک‌ها در آب میوه و سبزی می‌تواند جایگزین خوبی برای گروهی از مردم با نیازهای خاص نظیر گیاه‌خواران و افراد با واکنش‌های آلرژیکی به پروتئین‌های شیر باشد (14، 13).

مطالعات مختلفی در مورد استفاده از آب میوه‌جات مختلف به عنوان محیط پایه برای تولید نوشیدنی پروبیوتیک انجام شده است. نتایج تحقیق موسوی و همکاران نشان داد که استفاده از *L*، پاراکازئی و *L*، اسیدوفیلوس در آب میوه‌های

میزان آنتوسیانین: میزان آنتوسیانین کل با روش اختلاف pH اندازه گیری شد. میزان جذب آب میوه در 520 و 700 نانومتر در بافرهای با pH=1 (پتاسیم کلرید 0/2 مولار) و pH=4/5 (استات سدیم 1 مولار) اندازه گیری شد. میزان آنتوسیانین ها با استفاده از ضریب خاموشی مولار 29600 (سیانیدین 3-گلوکوزید) و میزان جذب با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$A = \{(A_{510} - A_{700})_{pH=1} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4.5}\}$$

نتایج بر حسب میلی گرم سیانیدین 3-گلوکوزید در هر 100 میلی لیتر آب میوه بیان شد (23).

میزان مواد فنلی: میزان مواد فنلی کل در آب زغال اخته مطابق روش Folin Ciocalteu با اسپکتروفوتومتر تعیین شد. به 100 میکرولیتر از نمونه، 7 میلی لیتر آب مقطر و 0/50 میلی لیتر معرف فنلی FC (مخلوطی از فسفومولیدات و فسفوتنگستات است که در آزمون رنگ سنجی مواد فنلی و ضد اکسیدان ها استفاده می شود) و بعد از 7 دقیقه 1/5 میلی - لیتر محلول سدیم کربنات 2% و 0/9 میلی لیتر آب مقطر افزوده شد. سپس میزان جذب در 765 نانومتر بعد از 2 ساعت نگهداری در تاریکی، تعیین شد. نتایج نهایی بر حسب میلی - گرم گالیک اسید در هر 100 میلی لیتر آب میوه بیان شد (24).

فعالیت ضد اکسیدانی: فعالیت ضد اکسیدانی با روش اسپکتروفوتومتری تعیین می شود. 100 میکرولیتر از آب میوه به 3/9 میلی لیتر محلول DPPH (محلول متانولی 0/1 میلی مولار) اضافه شد، آنگاه به مدت 60 دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شد. سپس جذب آن در 517 نانومتر در مقابل متانول خوانده شد و درصد فعالیت خورندگی رادیکال DPPH (2، 2، دی فنیل -1- پیکریل هیدرازیل) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100$$

A_{blank} جذب محلول متانولی DPPH و A_{sample} جذب نمونه را نشان می دهند (24).

ارزیابی حسی: ویژگی های حسی یعنی طعم، رنگ و پذیرش کلی توسط 9 ارزیاب آموزش دیده، به صورت مقایسه ای مورد بررسی قرار گرفت. در هر دوره زمانی 6 نمونه به ارزیاب ها ارائه شد. برای شست و شوی ذائقه و طعم بین نمونه ها از آب استفاده می شود (25).

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی نمونه ها در سه تکرار تولید شده و مورد آزمون قرار گرفت. طرح آزمایشات به صورت فاکتوریل کامل بوده و یافتن تفاوت معنی دار میان میانگین داده های حاصل، با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک

آنتوسیانین ها، فعالیت ضد اکسیدانی و تعداد سلول های زنده پروبیوتیک است.

• مواد و روش ها

آماده سازی نمونه ها: ابتدا آب زغال اخته تهیه شده به نسبت 6 به 1 با آب رقیق شد. pH یک دسته از تیمارها با سدیم بی - کربنات تا حدود 3/5 تنظیم و دسته دیگر بدون تغییر pH (2/58) در دمای 95°C به مدت 10 دقیقه پاستوریزه شدند. پس از سرد شدن، نمونه های آب زغال اخته با سویه های صنعتی پروبیوتیک (رامنوسوس، ل. پلانتروم و ل. کازئی) و سویه های بومی (ل. کازئی زیر گونه T4 و TD4) با تعداد حدود 10^8 cfu/ml تلقیح شده و آنگاه تحت نگهداری یخچالی قرار گرفت. سپس ویژگی های شیمیایی، میکروبی و خواص حسی نمونه ها به مدت 4 هفته با فواصل زمانی هر هفته، برای نمونه های با pH تعدیل شده مورد بررسی قرار گرفت. شایان ذکر است که تعدیل pH نمونه ها به منظور بررسی اثر pH و مواد بازدارنده طبیعی موجود در زغال اخته بر قابلیت زیستی پروبیوتیک ها صورت گرفت.

آزمون اندازه گیری pH: دستگاه pH متر با محلول تامپون با pH=4 تنظیم و سپس مقداری از نمونه را در یک بشر 100 میلی لیتر ریخته و توسط pH متر، pH آن تعیین شد (15).

شمارش سلول های پروبیوتیک: سلول های زنده ی پروبیوتیک ها با استفاده از محیط کشت MRS - آگار، مطابق با روش مرتضویان و همکاران (2007) با عنوان Subtractive enumeration method (SEM) به صورت انتخابی شمارش شد. گرمخانه گذاری در 37°C به مدت 72 ساعت انجام شد (22).

اسیدیته قابل تیترا: ابتدا دستگاه pH متر با محلول بافر با pH های برابر 7 و 4 کالیبره شد. سپس 50 میلی لیتر آب مقطر تازه جوشیده و سرد شده به یک بشر منتقل و 20 گرم آب میوه به آن اضافه شد. یک عدد مگنت داخل بشر قرار داده و سپس بشر روی هم زن مغناطیسی گذاشته شد. الکترو د pH متر درون بشر قرار داده شد. سپس محلول سود 0/1 نرمال قطره قطره اضافه شده تا pH نمونه به 8/1 برسد. حجم هیدروکسید سدیم مصرفی یادداشت و مقدار اسیدیته مطابق فرمول زیر بر حسب اسید مالیک بیان می شود (3).

$$A = V \times \frac{0.0067 \times 100}{m}$$

در این فرمول V حجم سود مصرفی، m وزن نمونه برداشتی بر حسب گرم و A اسیدیته کل بر حسب گرم اسید مالیک در هر 100 گرم آب میوه است.

طرفه (One way ANOVA) و تفاوت میانگین‌های هر تیمار طی زمان از آزمون Repeated Measure با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سطح معنی‌داری 0/05 انجام شد.

• یافته‌ها

تغییرات قابلیت زیستی باکتری‌ها در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH طبیعی طی 7 روز نگهداری یخچالی در 4°C: به منظور بررسی قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک در آب زغال‌اخته با pH طبیعی طی نگهداری یخچالی، نمونه‌های تلقیح شده به تعداد $\log \text{cfu/ml}$ 10^8 طی 7 روز نگهداری یخچالی با فواصل زمانی یک روزه، از یخچال خارج شده و تحت شرایط استریل سلول‌های زنده رشد یافته به روش پلیت‌گذاری شمارش شدند. جدول 1 قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها را طی 7 روز نگهداری یخچالی نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH طبیعی نشان می‌دهد. همان طور که در این جدول مشاهده می‌شود؛ سویه‌های پروبیوتیک در آب زغال‌اخته نتوانستند pH پایین را تحمل کنند و بعد از یک هفته نگهداری یخچالی غیرفعال شدند. از آن‌جا که تعداد سلول‌های زنده تمام سویه‌های مورد آزمون در هفته‌ی اول نگهداری یخچالی در 4°C به صفر رسید، برای بررسی تغییرات

خصوصیات شیمیایی، میکروبی و ارزیابی حسی آب زغال‌اخته پروبیوتیک طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C، pH نمونه‌ها توسط سدیم بیکربنات تا حدود 3/5 تعدیل شد. شایان ذکر است که تعدیل pH نمونه‌ها به منظور بررسی اثر pH و مواد بازدارنده طبیعی موجود در زغال‌اخته بر قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها انجام شد.

تغییرات قابلیت زیستی باکتری‌ها در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C: همان طور که در جدول 2 مشاهده می‌شود، پس از یک هفته نگهداری یخچالی، تعداد سلول‌های زنده در تیمارهای حاوی سویه‌های صنعتی L، رامنوسوس ول، پلانتارم با حدود 4 سیکل لگاریتمی کاهش از تعداد اولیه حدود 8 به ترتیب به تعداد 4/24 و $\log \text{cfu/ml}$ 4/2 کاهش پیدا کرد؛ که کمتر از میزان لازم برای ایجاد اثرات سلامت-بخش (10^6cfu/ml) در فرآورده بود. این در حالی بود که تعداد سلول‌های زنده تیمارهای حاوی سویه صنعتی L، کازئی و سویه بومی L، کازئی زیرگونه TD4 با حدود 2 سیکل لگاریتمی کاهش به ترتیب به میزان $\log \text{cfu/ml}$ 6 و 6/23 رسید.

جدول 1. تغییرات قابلیت زیستی باکتری‌ها در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH طبیعی طی 7 روز نگهداری یخچالی در 4°C

قابلیت زیستی (logcfu/ml)								تیمار*
d ₇	d ₆	d ₅	d ₄	d ₃	d ₂	d ₁	d ₀	
0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	8 ^{aA}	R
0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}	8/02 ^{a bA}	P
0 ^{aE}	0 ^{aE}	0 ^{aE}	0 ^{aE}	1/4 ^{bD}	3/7 ^{bC}	4/64 ^{bB}	8/02 ^{a bA}	C
0 ^{aG}	1/9 ^{bF}	3/5 ^{bE}	4/5 ^{bD}	8/5 ^{cC}	8/6 ^{cB}	8/03 ^{cA}	8/03 ^{bA}	T4
0 ^{aE}	0 ^{aE}	0 ^{aE}	0 ^{aE}	2/5 ^{dD}	3/2 ^{dC}	3/8 ^{dB}	8/06 ^{cA}	TD4

*R: ل. رامنوسوس، P: ل. پلانتارم، C: ل. کازئی، T4: ل. کازئی زیرگونه T4، TD4: ل. کازئی زیرگونه TD4

- حروف کوچک یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها است.

- حروف بزرگ یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین دوره‌های نگهداری است.

جدول 2. تغییرات قابلیت زیستی باکتری‌ها در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل‌شده طی 28 روز نگهداری یخچالی در 4°C

قابلیت زیستی (log cfu/ml)					تیمار*
d ₂₈	d ₂₁	d ₁₄	d ₇	d ₀	
0 ^{aD}	0 ^{aD}	3/92 ^{aC}	4/24 ^{aB}	8/03 ^{aA}	R
2/15 ^{bE}	2/46 ^{bD}	3/6 ^{bC}	4/2 ^{bB}	8/02 ^{a bA}	P
4/74 ^{cE}	4/87 ^{cD}	4/95 ^{cC}	6 ^{cB}	8/04 ^{aA}	C
8/67 ^{dE}	8/8 ^{dD}	8/46 ^{dC}	8/22 ^{dB}	8/01 ^{bA}	T4
4/57 ^{eE}	5/3 ^{eD}	5/34 ^{eC}	6/23 ^{eB}	8/04 ^{aA}	TD4

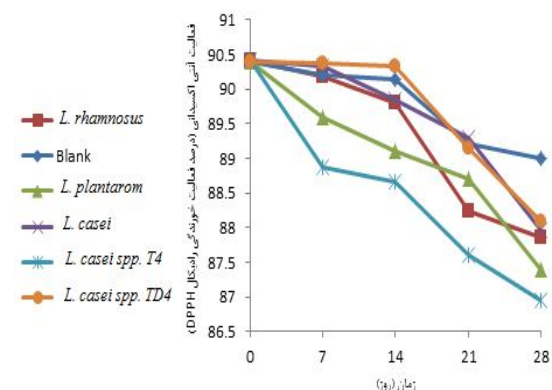
*R: ل. رامنوسوس، P: ل. پلانتارم، C: ل. کازئی، T4: ل. کازئی زیرگونه T4، TD4: ل. کازئی زیرگونه TD4

- حروف کوچک یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها است.

- حروف بزرگ یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین دوره‌های نگهداری است.

می‌یابد. افزایش pH در تیمار حاوی سویه صنعتی *L. رامنوسوس* می‌تواند ناشی از اتولیز پیکره باکتری‌ها و آزادسازی پپتیدها به درون محیط باشد. در مورد سایر سویه‌ها نیز pH در طول نگهداری یخچالی افزایش می‌یابد که از نظر آماری معنی‌دار نیست. مطابق جدول 4 کاهش اسیدیته تنها در مورد سویه بومی *L. کازئی* زیرگونه T4 از نظر آماری معنی‌دار است ($P < 0/05$)، و در مورد سایرین تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

تغییرات فعالیت ضد اکسیدانی در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل‌شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C: مطابق شکل 1 روند تغییرات فعالیت ضد-اکسیدانی طی 4 هفته نگهداری یخچالی در تمامی تیمارهای آب زغال‌اخته به صورت معنی‌دار کاهش پیدا کرد ($P < 0/05$). شایان ذکر است که این کاهش برای تیمار شاهد با کمترین شدت (1/5% کاهش) و برای تیمار دارای سویه بومی *L. کازئی* زیرگونه T4 با بیشترین شدت (4% کاهش) صورت گرفت. به طوری که میزان فعالیت ضد اکسیدانی برای تیمار حاوی سویه بومی *L. کازئی* زیرگونه T4 از میزان 90/4% به 88/08% تیمار شاهد از 90/4% به 89% کاهش پیدا کرد.



شکل 1. تغییرات فعالیت ضد اکسیدانی در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل‌شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

سویه بومی *L. کازئی* زیرگونه T4 برخلاف سایر تیمارها در هفته اول نگهداری قابلیت زیستی خود را به طور کامل حفظ کرد و افزایش اندک اما معنی‌داری ($P < 0/05$) در میزان سلول‌های زنده آن مشاهده شد. در هفته دوم و سوم نگهداری یخچالی تمام سویه‌ها به جز سویه بومی *L. کازئی* زیرگونه T4 روند کاهشی خود را ادامه دادند. به عنوان مثال تعداد سلول‌های زنده سویه بومی *L. کازئی* زیرگونه TD4 در هفته دوم به کمتر از میزان لازم برای ایجاد اثرات سلامت‌بخش در مصرف‌کننده رسید و سویه صنعتی *L. رامنوسوس* بعد از 3 هفته نگهداری یخچالی به طور کامل قابلیت زیستی خود را از دست داد. در هفته چهارم نگهداری یخچالی، تعداد سلول‌های زنده تمامی پروبیوتیک‌ها کاهش پیدا کرد که این کاهش در مورد سویه بومی *L. کازئی* زیرگونه T4 به طور معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها شدت کمتری داشت و هنوز در مقدار لازم برای ایجاد اثر سلامت‌بخش در مصرف‌کننده بود ($8/67 \log \text{cfu/ml}$).

تغییرات pH و اسیدیته در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل‌شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C:

همان طور که در جدول 3 نشان داده شده است افزایش pH در مورد سویه‌های بومی و سویه صنعتی *L. رامنوسوس* طی 28 روز نگهداری یخچالی معنی‌دار است ($P < 0/05$). نتایج نشان داد که سلول‌های باکتریایی دارای برخی فعالیت‌های تخمیری حتی در طول نگهداری در 4°C هستند. بنابراین افزایش تعداد سلول‌های زنده سویه بومی *L. کازئی* زیرگونه T4 نشانگر داشتن فعالیت‌های تخمیری در درجه حرارت نگهداری یخچالی است که تغییرات بیشتر pH توسط این سویه در مقایسه با سایرین طی نگهداری یخچالی بیان‌گر این واقعیت است. این افزایش در مورد سویه‌های بومی می‌تواند ناشی از تبدیل مالیک اسید به لاکتیک اسید باشد که باعث کاهش pH و افزایش اسیدیته می‌شود. متابولیت‌های اسیدی مثل اسید لاکتیک، ثابت اسیدیته بالاتری ($pK_a = 3/86$) نسبت به مالیک اسید ($pK_a = 2$) دارند بنابراین اسیدیته کل کاهش

جدول 3. تغییرات میزان pH در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل‌شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

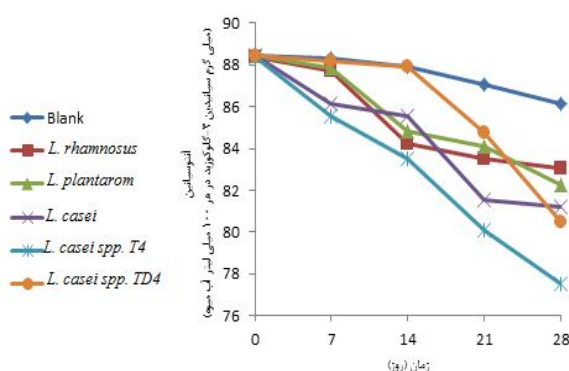
تیمار*	d0	d7	d14	d21	d28
B	3/49 ^a	3/49 ^a	3/49 ^a	3/49 ^a	3/49 ^a
R	3/5 ^a	3/5 ^a	3/5 ^a	3/51 ^a	3/52 ^b
P	3/51 ^a	3/5 ^a	3/5 ^a	3/51 ^a	3/51 ^b
C	3/5 ^a	3/49 ^a	3/5 ^a	3/51 ^a	3/51 ^b
T4	3/49 ^a	3/5 ^a	3/51 ^a	3/53 ^b	3/55 ^c
TD4	3/5 ^a	3/5 ^a	3/5 ^a	3/52 ^b	3/53 ^b

*B: تیمار شاهد بدون پروبیوتیک، R: *L. رامنوسوس*، P: *L. پلانترم*، C: *L. کازئی*، T4: *L. کازئی* زیرگونه T4، TD4: *L. کازئی* زیرگونه TD4

- حروف کوچک یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها است.

- حروف بزرگ یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین دوره‌های نگهداری است.

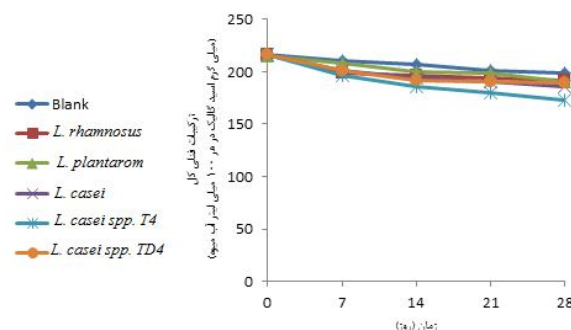
تغییرات میزان آنتوسیانین‌ها در نمونه‌های آب زغال-اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C: مطابق با شکل 3 در هفته اول، کاهش معنی‌دار میزان آنتوسیانین تمامی تیمارهای آب زغال‌اخته در سطح اطمینان 95% مشاهده شد. این روند کاهشی در روزهای 14، 21 و 28 نگهداری یخچالی برای تمام تیمارها به صورت معنی‌دار ادامه یافت ($P<0/05$). شایان ذکر است که این کاهش برای تیمار شاهد با کمترین شدت تا حدود 2/5% و برای تیمار دارای سویه بومی L. کازئی زیر گونه T4 با بیشترین شدت تا حدود 12% دیده شد. میزان آنتوسیانین‌ها برای تیمار حاوی سویه بومی L. کازئی زیر گونه T4 از میزان 88/4 به 77/56 و تیمار شاهد از میزان 88/45 به 86/16 میلی گرم سیانیدین-3-گلوکوزید در هر 100 میلی لیتر آب میوه کاهش پیدا کرد.



شکل 3. تغییرات میزان آنتوسیانین‌ها در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

مطابق جدول 4 کاهش اسیدیته تنها در مورد سویه بومی L. کازئی زیر گونه T4 از نظر آماری معنی‌دار است ($P<0/05$)، و در مورد سایرین تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

تغییرات میزان مواد فنلی در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C: مطابق شکل 2 در روز هفتم نگهداری یخچالی، کاهش معنی‌دار میزان مواد فنلی تمامی تیمارهای آب زغال‌اخته در سطح اطمینان 95% مشاهده شد. نیز این کاهش معنی‌دار ($P<0/05$) میزان مواد فنلی در تمامی تیمارهای آب زغال‌اخته در روزهای 14، 21 و 27 نگهداری یخچالی مشاهده شد. مطابق شکل 2 بیشترین کاهش در میزان مواد فنلی (تا حدود 20%) در طول نگهداری یخچالی برای تیمار حاوی سویه بومی L. کازئی زیر گونه T4 و کمترین میزان کاهش (تا حدود 8%) برای تیمار شاهد مشاهده شد. میزان مواد فنلی برای تیمار حاوی سویه بومی L. کازئی زیر گونه T4 از میزان 216/1 به 172/5 و تیمار شاهد از میزان 215/9 به 199/03 میلی گرم گالیک اسید در هر 100 میلی لیتر آب میوه کاهش پیدا کرد.



شکل 2. تغییرات میزان مواد فنلی در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

جدول 4. تغییرات میزان اسیدیته در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

تیمار*					زمان (روز)
d28	d21	d14	d7	d0	
1/01 ^{aA}	1/01 ^{aA}	1/01 ^{aA}	1 ^{aA}	1 ^{aA}	B
1 ^{aA}	1 ^{abA}	1/01 ^{aA}	1 ^{aA}	1 ^{aA}	R
1 ^{aA}	1 ^{abA}	1 ^{aA}	1 ^{aA}	1 ^{aA}	P
1 ^{aA}	1 ^{abA}	1 ^{aA}	1 ^{aA}	0/99 ^{aA}	C
0/97 ^{bC}	0/98 ^{bBC}	1/01 ^{aA}	1/02 ^{aA}	1 ^{aAB}	T4
1 ^{aA}	1/01 ^{aA}	1/02 ^{aA}	1/02 ^{aA}	1/01 ^{aA}	TD4

*B: تیمار شاهد بدون پروبیوتیک، R: L. rhamnosus، P: L. plantarum، C: L. کازئی، T4: L. کازئی زیر گونه T4، TD4: L. کازئی زیر گونه TD4

- حروف کوچک یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها است.

- حروف بزرگ یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین دوره‌های نگهداری است.

کازئی زیرگونه TD4 تفاوت‌های معنی‌داری مشاهده شد ($P<0/05$). نتایج حاصل از این جدول نشان می‌دهد که بلافاصله بعد از تلقیح و طی 4 هفته نگهداری یخچالی، در نمونه‌های تلقیح‌شده با سویه بومی *ل*، کازئی زیرگونه TD4 بوی تیز و طعم گس تشخیص داده شد. در کل، طعم نامعمول شناسایی شده در این تیمار، بدطعمی نبود؛ بلکه بیشتر خاص بود و حتی نسبتاً مطبوع گزارش شد و طی 4 هفته، بین این تیمار و تیمار شاهد فاقد پروبیوتیک از نظر بو، طعم و پذیرش کلی از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($P<0/05$).

ارزیابی حسی در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل‌شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C: همان طور که در جدول 5 مشاهده می‌شود، بین نمونه‌های شاهد بدون پروبیوتیک و نمونه‌های تلقیح‌شده با سویه‌های صنعتی *ل*، *رامنوسوس*، *ل*، *پلانتارم* و *ل*، کازئی سویه بومی *ل*، کازئی زیرگونه T4 طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C، از نظر طعم، بو و پذیرش کلی تفاوت معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد ($P>0/05$). درحالی که بین نمونه‌های شاهد بدون پروبیوتیک و نمونه‌های تلقیح‌شده با سویه بومی *ل*.

جدول 5. آزمون حسی مقایسه‌ای نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل‌شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

دوره نگهداری (هفته)														
4			3			2			1			0		
OA	T	O	OA	T	O	OA	T	O	OA	T	O	OA	T	O*
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05$	$P<0/05^{***}$

* O = بو، T = مزه و OA = پذیرش کلی

** B: تیمار شاهد بدون پروبیوتیک، R: *رامنوسوس*، P: *ل*، پلانتارم، C: *ل*، کازئی، T4: *ل*، کازئی زیرگونه T4، TD4: *ل*، کازئی زیرگونه TD4

*** تفاوت‌های معنی‌دار، نتیجه ارزیابی نمونه‌ها توسط 9 ارزیاب حسی بود.

• بحث

تغییرات قابلیت زیستی باکتری‌ها در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH طبیعی طی 7 روز نگهداری یخچالی در 4°C: به منظور بررسی قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک در آب زغال‌اخته با pH طبیعی طی نگهداری یخچالی، نمونه‌های تلقیح‌شده به تعداد $10^8 \log \text{cfu/ml}$ طی 7 روز نگهداری یخچالی با فواصل زمانی یک روزه، از یخچال خارج شده و تحت شرایط استریل سلول‌های زنده رشد یافته به روش پلیت‌گذاری شمارش شدند. جدول 1 قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها را طی 7 روز نگهداری یخچالی نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH طبیعی نشان می‌دهد. همان طور که در این جدول مشاهده می‌شود؛ سویه‌های پروبیوتیک در آب زغال‌اخته نتوانستند pH پایین را تحمل کنند و بعد از یک هفته نگهداری یخچالی غیرفعال شدند. آن‌جا که تعداد سلول‌های زنده تمام سویه‌های مورد آزمون در هفته‌ی اول نگهداری یخچالی در 4°C به صفر رسید، برای بررسی تغییرات خصوصیات شیمیایی، میکروبی و ارزیابی حسی آب زغال‌اخته پروبیوتیک طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C، pH نمونه‌ها توسط سدیم بیکربنات تا حدود 3/5 تعدیل شد. شایان ذکر است که

تعدیل pH نمونه‌ها به منظور بررسی اثر pH و مواد بازدارنده طبیعی موجود در زغال‌اخته بر قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها انجام شد.

تغییرات قابلیت زیستی باکتری‌ها در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل‌شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C: همان طور که در جدول 2 مشاهده می‌شود، پس از یک هفته نگهداری یخچالی، تعداد سلول‌های زنده در تیمارهای حاوی سویه‌های صنعتی *ل*، *رامنوسوس* و *ل*، پلانتارم با حدود 4 سیکل لگاریتمی کاهش از تعداد اولیه حدود 8 به ترتیب به تعداد $4/24$ و $4/2 \log \text{cfu/ml}$ کاهش پیدا کرد؛ که کمتر از میزان لازم برای ایجاد اثرات سلامت-بخش (10^6cfu/ml) در فرآورده بود. این در حالی بود که تعداد سلول‌های زنده تیمارهای حاوی سویه صنعتی *ل*، کازئی و سویه بومی *ل*، کازئی زیرگونه TD4 با حدود 2 سیکل لگاریتمی کاهش به ترتیب به میزان $6 \log \text{cfu/ml}$ و 6/23 رسید. سویه بومی *ل*، کازئی زیرگونه T4 برخلاف سایر تیمارها در هفته اول نگهداری قابلیت زیستی خود را به طور کامل حفظ کرد و افزایش اندک اما معنی‌داری ($P<0/05$) در میزان سلول‌های زنده آن مشاهده شد. در هفته دوم و سوم

کازئی زیرگونه T4 با بیشترین شدت (4% کاهش) صورت گرفت. به طوری که میزان فعالیت ضد اکسیدانی برای تیمار حاوی سویه بومی ل. کازئی زیرگونه T4 از میزان 90/4% به 88/08% و تیمار شاهد از 90/4% به 89% کاهش پیدا کرد.

تغییرات میزان مواد فنلی در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

مطابق شکل 2 در روز هفتم نگهداری یخچالی، کاهش معنی‌دار میزان مواد فنلی تمامی تیمارهای آب زغال‌اخته در سطح اطمینان 95% مشاهده شد. نیز این کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) میزان مواد فنلی در تمامی تیمارهای آب زغال‌اخته در روزهای 14، 21 و 27 نگهداری یخچالی مشاهده شد. مطابق شکل 2 بیشترین کاهش در میزان مواد فنلی (تا حدود 20%) در طول نگهداری یخچالی برای تیمار حاوی سویه بومی ل. کازئی زیرگونه T4 و کمترین میزان کاهش (تا حدود 8%) برای تیمار شاهد مشاهده شد. میزان مواد فنلی برای تیمار حاوی سویه بومی ل. کازئی زیرگونه T4 از میزان 216/1 به 172/5 و تیمار شاهد از میزان 215/9 به 199/03 میلی گرم گالیک‌اسید در هر 100 میلی‌لیتر آب میوه کاهش پیدا کرد.

تغییرات میزان آنتوسیانین‌ها در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

مطابق با شکل 3 در هفته اول، کاهش معنی‌دار میزان آنتوسیانین تمامی تیمارهای آب زغال‌اخته در سطح اطمینان 95% مشاهده شد. این روند کاهشی در روزهای 14، 21 و 28 نگهداری یخچالی برای تمام تیمارها به صورت معنی‌دار ادامه یافت ($P < 0/05$). شایان ذکر است که این کاهش برای تیمار شاهد با کمترین شدت تا حدود 2/5% و برای تیمار دارای سویه بومی ل. کازئی زیر گونه T4 با بیشترین شدت تا حدود 12% دیده شد. میزان آنتوسیانین‌ها برای تیمار حاوی سویه بومی ل. کازئی زیرگونه T4 از میزان 88/4 به 77/56 و تیمار شاهد از میزان 88/45 به 86/16 میلی گرم سیانیدین 3-گلوکوزید در هر 100 میلی‌لیتر آب میوه کاهش پیدا کرد.

ارزیابی حسی در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

همان طور که در جدول 5 مشاهده می‌شود، بین نمونه‌های شاهد بدون پروبیوتیک و نمونه‌های تلقیح شده با سویه‌های صنعتی ل. رامنوسوس، ل. پلاتارم و ل. کازئی سویه بومی ل. کازئی زیرگونه T4 طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C، از نظر طعم، بو و پذیرش کلی تفاوت معنی‌داری از نظر

نگهداری یخچالی تمام سویه‌ها به جز سویه بومی ل. کازئی زیر گونه T4 روند کاهشی خود را ادامه دادند. به عنوان مثال تعداد سلول‌های زنده سویه بومی ل. کازئی زیر گونه TD4 در هفته دوم به کمتر از میزان لازم برای ایجاد اثرات سلامت-بخش در مصرف‌کننده رسید و سویه صنعتی ل. رامنوسوس بعد از 3 هفته نگهداری یخچالی به طور کامل قابلیت زیستی خود را از دست داد. در هفته چهارم نگهداری یخچالی، تعداد سلول‌های زنده تمامی پروبیوتیک‌ها کاهش پیدا کرد که این کاهش در مورد سویه بومی ل. کازئی زیرگونه T4 به طور معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها شدت کمتری داشت و هنوز در مقدار لازم برای ایجاد اثر سلامت‌بخش در مصرف‌کننده بود ($8/67 \log \text{cfu/ml}$).

تغییرات pH و اسیدیته در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

همان طور که در جدول 3 نشان داده شده است افزایش pH در مورد سویه‌های بومی و سویه صنعتی ل. رامنوسوس طی 28 روز نگهداری یخچالی معنی‌دار است ($P < 0/05$). نتایج نشان داد که سلول‌های باکتریایی دارای برخی فعالیت‌های تخمیری حتی در طول نگهداری در 4°C هستند. بنابراین افزایش تعداد سلول‌های زنده سویه بومی ل. کازئی زیرگونه T4 نشانگر داشتن فعالیت‌های تخمیری در درجه حرارت نگهداری یخچالی است که تغییرات بیشتر pH توسط این سویه در مقایسه با سایرین طی نگهداری یخچالی بیان‌گر این واقعیت است. این افزایش در مورد سویه‌های بومی می‌تواند ناشی از تبدیل مالیک اسید به لاکتیک اسید باشد که باعث کاهش pH و افزایش اسیدیته می‌شود. متابولیت‌های اسیدی مثل اسید لاکتیک، ثابت اسیدیته بالاتری ($pK_a = 3/86$) نسبت به مالیک اسید ($pK_a = 2$) دارند بنابراین اسیدیته کل کاهش می‌یابد. افزایش pH در تیمار حاوی سویه صنعتی ل. رامنوسوس می‌تواند ناشی از اتولیز پیکره باکتری‌ها و آزادسازی پپتیدها به درون محیط باشد. در مورد سایر سویه‌ها نیز pH در طول نگهداری یخچالی افزایش می‌یابد که از نظر آماری معنی‌دار نیست.

تغییرات فعالیت ضد اکسیدانی در نمونه‌های آب زغال‌اخته با pH تعدیل شده طی 4 هفته نگهداری یخچالی در 4°C

مطابق شکل 1 روند تغییرات فعالیت ضد اکسیدانی طی 4 هفته نگهداری یخچالی در تمامی تیمارهای آب زغال‌اخته به صورت معنی‌دار کاهش پیدا کرد ($P < 0/05$). شایان ذکر است که این کاهش برای تیمار شاهد با کمترین شدت (1/5% کاهش) و برای تیمار دارای سویه بومی ل.

بوی تیز و طعم گس تشخیص داده شد. در کل، طعم نامعمول شناسایی شده در این تیمار، بدطعمی نبود؛ بلکه بیشتر خاص بود و حتی نسبتاً مطبوع گزارش شد و طی 4 هفته، بین این تیمار و تیمار شاهد فاقد پروبیوتیک از نظر بو، طعم و پذیرش کلی از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($P < 0/05$).

آماري مشاهده نشد ($p > 0/05$). درحالي که بين نمونه‌هاي شاهد بدون پروبيوتیک و نمونه‌هاي تلقیح شده با سويه بومي ل. کازئی زیرگونه TD4 تفاوت‌هاي معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). نتایج حاصل از این جدول نشان می‌دهد که بلافاصله بعد از تلقیح و طی 4 هفته نگهداری یخچالی، در نمونه‌هاي تلقیح‌شده با سويه بومي ل. کازئی زیرگونه TD4

References

- Hilliam M. Functional Food-How big is the market. World Food Ingrid 2000;12:50-52.
- Sanders ME. Overview of Functional Foods: Emphasis on Probiotic Bacteria. Int Dairy J 1998;8(5-6):341-7.
- Prado FC, Parada JL, Pandey A, Soccol CR. Trends in non-dairy probiotic beverages. Food Res Int 2008;41(2):111-23.
- Puupponen-Pimiä R, Aura A-M, Oksman-Caldentey K-M, Myllärinen P, Saarela M, Mattila-Sandholm T, et al. Development of functional ingredients for gut health. Trends Food Sci Technol 2002;13(1):3-11.
- do Espírito Santo AP, Perego P, Converti A, Oliveira MN. Influence of food matrices on probiotic viability-A review focusing on the fruity bases. Trends Food Sci Technol 2011;22(7):85-7.
- Guarner F, Schaafsma G. Probiotics. Int J Food Microbiol 1998;39(3):237-8.
- Joint F. WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina October. 2001:1-4.
- Sheehan VM, 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(2):279-84.
- Ásványi-Molnár N, Sipos-Kozma Z, Tóth Á, Ásványi B, Varga L. Development of functional dairy food enriched in spirulina (Arthrospira platensis). Tejszázad. 2009;69(2):15-22.
- Almeida Md, Cruz Ad, Faria J, Moura M, Carvalho Ld, Freitas M. Effect of the açai pulp on the sensorial attributes of probiotic yogurts. Int J Probiotics Prebiotics 2009;4(1):41-4.
- Tantipabulvut S, Soontornsophon C, Luangviphusavanich S. Fermentation of roselle juice by lactic acid bacteria. Asian J Food Agro-Ind 2008; 1(4): 217-227.
- Krasaekoopt W, Pianjareonlap R, Kittisuriyanont K, editors. Probiotic fruit juices. The 2nd International Conference on Fermentation Technology for Value added Agricultural Products, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand; 2007.
- Marhamatizadeh MH, Rezazadeh S, Kazemeini F, Kazemi MR. The study of probiotic juice product conditions supplemented by culture of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum. Middle-East J Sci Res 2012;11(3):287-95.
- Röfle C, Auty MA, Brunton N, Gormley RT, Butler F. Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. Innov Food Sci Emerg Technol 2010;11(1):203-9.
- Mousavi Z, Mousavi S, Razavi S, Emam-Djomeh Z, Kiani H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. World J Microbiol Biotechnol 2011;27(1):123-8.
- Pereira ALF, Maciel TC, Rodrigues S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus casei. Food Res Int 2011;44(5):1276-83.
- Daneshi M, Ehsani MR, Razavi SH, Labbafi M. Effect of refrigerated storage on the probiotic survival and sensory properties of milk/carrot juice mix drink. Electronic J Biotechnol 2013;16(5):5-11.
- Mortazavian A, Ehsani M, Mousavi S, Rezaei K, Sohrabvandi S, Reinheimer J. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. Int J Dairy Technol 2007;60(2):123-7.
- Mortazavian A, Sohrabvandi S. Probiotics and food probiotic products based on dairy probiotic products. First ed. Tehran: Eta Publication; 2006: p. 24-34 [in persian].
- Nualkaekul S, Charalampopoulos D. Survival of Lactobacillus plantarum in model solutions and fruit juices. Int J Food Microbiol 2011;146(2):111-7.
- Tešević V, Nikićević N, Milosavljević S, Bajić D, Vajs V, Vučković I, et al. Characterization of volatile compounds of 'Drenja', an alcoholic beverage obtained from the fruits of Cornelian cherry. J Serbian Chemic. Soc 2009;74(2):117-28.
- Mortazavian A, Ehsani M, Sohrabvandi S, Reinheimer J. MRS-bile agar: its suitability for the enumeration of mixed probiotic cultures in cultured dairy products. Milchwissenschaft 2007;62(3):270-2.
- Hassanpour H, Yousef H, Jafar H, Mohammad A. Antioxidant capacity and phytochemical properties of cornelian cherry (Cornus mas L.) genotypes in Iran. Sci Hort 2011;129(3):459-63.
- Šamec D, Piljac-Žegarac J. Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures—Comparison with blackberries, white and red grapes. Sci Hort 2011;131:15-21.
- Luckow T, Delahunty C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. Food Qual Preference 2004;15(7):751-9.
- Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. Journal of applied microbiology. 2001;90(4):494-507.
- Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. Int J Food Microbiol 2008;124(3):295-8.
- Patthamakanokporn O, Puwastien P, Nitithamyong A, Sirichakwal PP. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. J Food Composition Analysis 2008;21(3):241-8.

Studying the Effect of Refrigerated Storage on the Viability of Native and Industrial Probiotic Strains and Some Physico-chemical and Sensory Properties in Cornelian Cherry Juice

Nematollahi A¹, Sohrabvandi S^{2*}, Mortazavin Farsani AM³, Komeyli R⁴, Asadzade S⁴

1. 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
2. *Corresponding author: Assistant Prof. (in Research), Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: sohrabv@sbtu.ac.ir
3. Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. 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

Received 22 Apr, 2014

Accepted 24 Jun, 2014

Background and Objectives: Recently, an increased demand for nondairy probiotic products comes from the popularity of vegetarianism, lactose intolerance, and high cholesterol content in dairy products. The objective of this study is evaluating the effect of refrigerated study on the viability of probiotics and some physicochemical characteristics in cornelian cherry juice.

Materials and Methods: Cornelian cherry juice with natural and adjusted pH with sodium bicarbonate was inoculated with three industrial bacteria (*L. rhamnosus*, *L. plantarum* and *L. casei*) and two native probiotic bacteria (*L. casei*) (10^8 cfu/ml). Then the samples were placed in the refrigerator (4°C) immediately after inoculation. Next, the changes in chemical characteristics such as pH, acidity, phenolic compounds content, anthocyanin content, antioxidant activity, microbial characteristics (such as enumeration of live probiotic cells), and sensory properties were evaluated during 4 weeks with the time intervals of one week for the samples with adjusted pH. Significant differences between the averages of obtained data were checked by one way ANOVA test. Also differences between the averages of each treatment during the refrigerating time were examined by repeated measure test using SPSS software at the significant level of 0.05.

Results: Data analysis showed that treatment type, storage period and interaction effect of these two factors have significant effects on the changes of physicochemical characteristics and probiotic viability ($P < 0.05$). The results revealed that native probiotic strain *L. casei* spp. T4 compared to other strains maintained its viability at $8.67 \log$ cfu/ml after 4 weeks of refrigerated storage. Also there were the most changes in physicochemical characteristics in the cornelian cherry treatments containing this strain, which is a marker of fermentative activity during the refrigerated storage.

Conclusion: The results showed that cornelian cherry juice because of low pH and presence of inhibitor phenolic compounds has negative effect on viability of probiotics, especially industrial strains during the refrigerated storage.

Keywords: Probiotics, Cornelian cherry, Anti-oxidant activity, Viability, Phenolic compounds