

بررسی تأثیر دماهای مختلف نگهداری بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانترام در سبوس

گندم

لاله مشرف*

۱- استادیار، بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران
تاریخ دریافت، ۱۳۹۷/۴/۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۲۱

چکیده

سبوس منبعی غنی از ترکیبات ارزشمند مانند فیبرهای رژیمی، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، و املاح است. از این رو سبوس، محیط کشتی مناسب برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های مفید برای سلامت انسان است. میکروارگانیسم‌های مفید در پیشگیری و درمان برخی بیماری‌های عفونی، تأثیر بر فلور میکروبی روده، بهبود ایمنی بدن، و کاهش حساسیت نقش دارند. سیستم آنزیمی قوی این میکروارگانیسم‌ها قادر است برخی از ترکیبات موجود در سبوس مانند اسیدفیتیک را تجزیه کند و باعث بهبود خصوصیات تغذیه‌ای آن شود. تثبیت این میکروارگانیسم‌ها در سبوس کاربرد این محصول پری بیوتیک حاوی میکروارگانیسم‌های مفید را در طیفی وسیع از محصولات غذایی، به خصوص محصولات نانویی، امکان‌پذیر می‌سازد. در این پژوهش از باکتری لاکتوباسیلوس پلانترام استفاده می‌شود که دارای خواص پروبیوتیک برای انسان است و کیفیت محصولات نانویی را بهبود می‌بخشد. ابتدا سبوس تخمیر شده با باکتری‌های اسیدلاکتیک در شرایط بهینه رشد تولید شد. پس از آن تأثیر دماهای مختلف نگهداری در یخچال، فریزر، و خشک کردن در شرایط محیطی به ترتیب ۴، ۱۸- و ۲۳ درجه سلسیوس بر میزان زنده ماندن لاکتوباسیلوس پلانترام در سبوس گندم بررسی گردید. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان زنده ماندن این میکروارگانیسم‌ها در روش نگهداری در یخچال، خشک کردن در شرایط محیطی، و فریزر به ترتیب حدود ۹۵، ۸، و ۲ درصد است و نگهداری در یخچال، نسبت به دو روش دیگر، شرایط متعادلی برای حفظ وزنده ماندن این میکروارگانیسم‌ها در سبوس گندم فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی

اسید فیتیک، پروبیوتیک، سبوس تخمیر شده، فیبر رژیمی

مقدمه

غلات، مانع از جذب برخی ریزمغذی‌ها مانند آهن، کلسیم، و روی و حتی مانع جذب پروتئین‌ها می‌شود (Mosharraf *et al.*, 2009). میزان اسید فیتیک در سبوس گندم بستگی دارد به واریته گندم، شرایط آب و هوایی کشت، شرایط آسیاب شدن گندم از جمله اندازه ذرات، میزان آندوسپرم چسبیده به سبوس، و سایر عوامل (Liu *et al.*, 2007). برای بهبود فعالیت بیولوژیکی و جذب بهتر مواد معدنی در بدن انسان امکان کاهش اسید فیتیک مواد

سبوس غلات منبعی غنی از فیبرهای رژیمی است که علاوه بر منابع فیبری، حاوی پروتئین‌های باکیفیت بالای تغذیه‌ای (آلبومین و گلوبولین)، آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات زیست‌فعال مانند اسیدهای فنولیک است. به‌رغم مزایا و ارزش تغذیه‌ای که سبوس غلات دارند، کاربرد آنها در محصولات غذایی به دلیل دارا بودن اسید فیتیک محدود می‌شود. اسید فیتیک، ترکیبی ضد تغذیه‌ای در سبوس

را برای اکثر میکروارگانیسم‌ها دارد و اندازه ذرات آن برای فرایند تخمیر مناسب است به طوری که در عین دارا بودن نسبت سطح به حجم زیاد، بستر حاصل از آن دارای تخلخل مناسب است و منافذ بستر حجم کافی برای رشد میکروارگانیسم‌ها و جریان هوا دارد. سبوس گندم مخلوطی از ذرات با اندازه‌ها و ترکیب‌های مختلف است که علاوه بر نوع گندم به نحوه آسیاب کردن گندم نیز بستگی دارد.

در پژوهشی مشخص شد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری*^۲ و *بیفیدوباکتریوم دنتیوم*^۳ دارای فعالیت بالای تجزیه فیئات‌ها هستند؛ نان حاصل از آرد کامل گندم با حضور این باکتری‌ها خصوصیات کیفی بهتر و میزان اسید فیتیک کمتری نشان داده است (Palacios *et al.*, 2008). رئال و همکاران (Reale *et al.*, 2007) می‌گویند باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌طور مستقیم در کاهش اسید فیتیک نقشی ندارند و در واقع این باکتری‌ها با تولید اسید و کاهش تدریجی pH شرایط را برای افزایش فعالیت آنزیم فیتاز آندروژن گندم و جذب بالاتر منیزیم فراهم می‌آورند. اما تحقیقات آنجلیس و برخی از محققان دیگر در سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۸ مبین این مطلب است که باکتری‌های اسیدلاکتیک و بیفیدوباکترها منبع قابل توجهی از آنزیم فیتاز هستند (Lioger *et al.*, 2007). باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان آغازگر فرایند تخمیر در صنایع غذایی استفاده می‌شوند. این باکتری‌ها به همراه مخمر در تخمیر فرایند نانوائی نقش اصلی دارند. از این رو باکتری‌های اسیدلاکتیک علاوه بر نقش استارتر در خمیرترش می‌توانند به‌عنوان نگهدارنده طبیعی به افزایش طول عمر نگهداری نان و جلوگیری از رشد قارچ‌های فاسد کننده یا بیماری‌زا مثل *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم*، و *پنسیلیوم* کمک کنند و جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی در بسته‌بندی نان شوند (Gerez *et al.*, 2009). آغازگرهای خمیرترش شامل غلظت بالایی از میکروارگانیسم‌های ساده یا مخلوطی از میکروارگانیسم‌ها هستند که موجب افزایش

غذایی به روش‌های گوناگونی وجود دارد مانند جوانه‌زدن، شست‌وشوی سبوس با آب گرم، تیمار هیدروترمال سبوس گندم در pH و دمای خاص، پوست‌گیری دانه گندم به‌منظور حذف یا کاهش این ترکیبات، استفاده از آنزیم فیتاز و به‌خصوص آنزیم فیتاز قارچی، و تخمیر. پایه بیشتر این روش‌ها فعال ساختن آنزیم فیتاز، آنزیم هیدرولیز کننده پیوندهای فسفو مونو استر در اسید فیتیک است (Carlson *et al.*, 2003; Gocmen *et al.*, 2007; Mosharraf *et al.*, 2009; Mullaney *et al.*, 2003). تحقیقات نشان می‌دهد که باکتری‌های اسیدلاکتیک و بیفیدو باکتری‌ها منابع ارزشمند و مطمئن آنزیم فیتاز هستند. فیتاز میکروبی مهم‌ترین منبع برای تولید آنزیم به‌صورت تجاری است. اکثر باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای فعالیت فسفاتاز هستند (Palacios *et al.*, 2008). تحقیقات زامودیو (Zamudio *et al.*, 2001) در خصوص فعالیت آنزیم فیتاز در شش گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیک نشان می‌دهد که از بین این شش گونه باکتریایی فعالیت آنزیم فیتاز *لاکتوباسیلوس پلانتروم* از بقیه بیشتر است. در نان‌هایی که خمیر آنها مرحله تخمیر را می‌گذرانند، میکروفلورهای موجود در خمیرترش حاوی مخلوطی از مخمرها (به‌خصوص *ساکارومایسس سرویسیه*^۱) و باکتری‌های تخمیری هومو و هترو اسیدلاکتیک هستند. این میکروارگانیسم‌ها افزایش طول عمر محصول، بهبود بافت، و ایجاد عطر و طعم مطلوب محصول نهایی را تضمین می‌کنند. باکتری‌های اسیدلاکتیک باعث اسیدی شدن سریع مواد اولیه طی تولید اسیدهای آلی می‌شوند. مطالعات ثابت کرده است که تخمیر سبوس گندم بر اثر مخلوطی از مخمر و باکتری‌های اسیدلاکتیک به کاهش اسید فیتیک، بهبود حجم نان، بهبود ساختمان بافت مرکزی نان، و افزایش مدت زمان ماندگاری آن می‌انجامد (Gibson & Roberfroid, 1995; Katina *et al.*, 2006). از سوی دیگر، سبوس گندم منبع غذایی مناسب برای تخمیرهای جامد است. این ترکیب مواد غذایی لازم

1- *Saccharomyces cerevisiae*2- *Lactobacillus reuteri*3- *Bifidobacterium dentium*

باکتری لاکتوباسیلوس پلاننارم تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بود.

کشت باکتری به روش تخمیر جامد

برای کشت باکتری بر محیط کشت سبوس، ده گرم سبوس (به عنوان محیط کشت) با بیست میلی لیتر آب مقطر مخلوط و در ارلن ریخته شد. پس از آن ۱ میلی لیتر از پیش کشت باکتری (کشت داده شده در محیط MRS (Broth حاوی 10^9 CFU باکتری، به آن افزوده و پس از اختلاط کامل و قرار دادن درپوش در انکوباتور در شرایط بی هوازی در دمای ۳۵ درجه سلسیوس تخمیر شد. شرایط کشت بی هوازی برای باکتری شامل استفاده از انکوباتور مجهز به کپسول دی اکسید کربن تحت عنوان انکوباتور CO_2 بوده است. این انکوباتور شرایط کشت بی هوازی را فراهم می کند. یادآوری می شود که رطوبت محیط کشت اتولیز شده حدود ۵۰ درصد بود و تنظیم اولیه رطوبت ضرورت نداشت (Mosharraf, 2014).

شمارش باکتری های زنده (CFU)

با توجه به اینکه حداکثر تعداد باکتری به ازای هر گرم سبوس در این آزمایش ها به حدود 10^9 می رسد، ۹ لوله حاوی سرم فیزیولوژی به حجم ۹ میلی لیتر تهیه و استریل شد. به لوله اول یک گرم از نمونه سبوس فراوری شده اضافه شد، سپس رقیق سازی به نسبت یک به ده تا لوله شماره ۹ ادامه یافت. از لوله های ۷، ۸ و ۹، یک میلی لیتر به پلیت های نظیر آنها اضافه و سپس محیط ام آر اس آگار به پلیت ها افزوده شد. پس از بسته شدن محیط، پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO_2 انکوبه گردید. پس از طی شدن این مدت زمان، کلونی ها شمارش و بدین روش تعداد باکتری زنده باقی مانده به دست آمد. شمارش باکتری و اندازه گیری پارامترهای شیمیایی به مدت ۱۱ ساعت، هر ساعت یکبار، نمونه برداری و تکرار شد (Mosharraf, 2014).

خصوصیات تغذیه ای و بهبود خصوصیات فیزیوشیمیایی خمیر و نان و موجب افزایش مدت زمان ماندگاری نان تولیدی می شوند (Brandt, 2007; Kulp & Lorenz, 2003). بنابراین، برای تولید خمیرترش خشک تلاش های زیادی شده است. خمیرترش خشک تاکنون با کمک خشک کن انجمادی، خشک کن با بسترسیال، و خشک کن افشانه ای تولید شده است (Brandt, 2007; Decock & Cappelle, 2005). روش هایی گوناگون برای محافظت طولانی مدت میکروارگانیسم ها وجود دارد. نگهداری طولانی مدت باکتری ها این امکان را می دهد که سوبه های میکروبی ماه ها و حتی سال ها زنده باقی بمانند. از جمله بهترین روش ها می توان به خشک کردن میکروارگانیسم ها به روش خشک کردن انجمادی، خشک کردن پاششی و خشک کردن در بسترسیال اشاره کرد. در تحقیق حاضر اثر چند فرایند مختلف بر زنده ماندن میکروارگانیسم کشت داده شده روی سبوس بررسی شده است که به عنوان سبوس فراوری شده به روش تخمیر می تواند در محصولات نانوائی کاربرد داشته باشد.

مواد و روش ها

سبوس گندم مورد استفاده در این تحقیق از رقم گندم سپاهان که در منطقه اصفهان کشت می شود، در سال زراعی ۹۴-۹۵ تهیه شد. نمونه های گندم در سال ۹۵ به موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر و نهال کرج فرستاده شد. در آنجا پس از آماده سازی دانه های گندم (در آب با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت) سبوس گیری با آسیاب بوهرلر مدل (Buhler AG, Mlu, Switzerland, 202) آغاز و سبوس گندم تهیه شد. در واقع محیط کشت اصلی در این پژوهش به دلیل وجود ترکیبات غذایی و منافذ و تخلخل مناسب، سبوس گندم انتخاب شد. میکروارگانیسم های مورد استفاده نیز شامل یک گونه

محلول جدا و با محلول غلیظ اسیدسولفوریک و اسید نیتریک هضم شد. پس از هضم و افزودن محلول رنگی هپتا مولیبدات آمونیم و وانادات آمونیم، محلول با آب مقطر به حجم رسانده شد. جذب نمونه ها در ۴۲۰ نانومتر خوانده شد و مقدار اسید فیتیک برحسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم نمونه خشک محاسبه شد.

روش تجزیه و تحلیل داده ها

طرح آماری برای آنالیز داده ها و بررسی اطلاعات به دست آمده در این تحقیق به صورت طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. آزمایش ها به طور عمده در سه تکرار دنبال شد و میانگین و انحراف معیار به دست آمد. برای بررسی وجود اختلاف آماری معنی دار بین تیمارهای مختلف، از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد. در تمام مراحل تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS ۱۶ استفاده شد.

نتایج و بحث

آزمون های شیمیایی سبوس گندم

میزان فیبر و پروتئین در سبوس گندم تابع رقم، نوع خاک، و شرایط آب و هوایی زمان کاشت و برداشت محصول است. تغییرات میزان پروتئین، فیبر، رطوبت، خاکستر و اسید فیتیک نمونه های سبوس گندم سپاهان در فرایند تخمیر در جدول (۱) آورده شده است. جدول (۱) نشان می دهد که تخمیر سبوس گندم با باکتری های لاکتوباسیلوس پلاتنارم در مدت زمان ۱۰/۵ ساعت از نظر آماری اثری بر خصوصیات شیمیایی سبوس ندارد و ترکیبات مفید آن مثل پروتئین ها و فیبرها را کاهش نداده است. تفاوت میزان رطوبت نمونه ها ممکن است به دلیل خطای آزمایشگر یا نوسانات دمایی در حین انکوبه کردن نمونه ها باشد که برای رفع این مشکل و به دست آوردن مقایسه صحیح، محاسبات بر اساس درصد ماده خشک بیان شد.

نگهداری سبوس تخمیر شده در شرایط مختلف دمایی در این پژوهش، سبوس تخمیر شده با باکتری های اسیدلاکتیک در بهترین شرایط رشد یعنی ۸ ساعت پس از کشت، به منظور تأثیر شرایط نگهداری مورد بررسی قرار گرفت. بهترین شرایط شامل رساندن میزان اسید فیتیک به حداقل و بالاترین جمعیت میکروارگانیسم های تکثیر یافته بود. برای بررسی اثر روش نگهداری بر بقای باکتری های تکثیر شده در سبوس، سبوس گندم تخمیر شده به سه صورت یعنی در یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس)، فریزر (دمای ۱۸- درجه سلسیوس)، و شرایط محیطی (دمای ۲۳ درجه سلسیوس) به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. به این صورت که نمونه های سبوس تخمیر شده در ارن های استریل با درپوش آلومینیمی گذاشته و در شرایط هوایی در سه محل ذکر شده نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت، شمارش میکروارگانیسم ها به روش ۳-۵ آغاز شد.

آزمون های شیمیایی

روش اندازه گیری شاخص های معرفی شده یعنی: رطوبت (با استفاده از آون ۱۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه)، خاکستر (با استفاده از کوره با دمای ۶۰۰-۵۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت)، پروتئین (با روش هضم اسیدی نمونه و تیتراسیون با اسیدسولفوریک)، و فیبر خام (به روش سوزاندن در کوره و سپس هضم اسیدی و قلیایی و قرار دادن در کوره ۴۰۰-۵۰۰ درجه سلسیوس) برای نمونه های مورد آزمایش با استفاده از روش های مصوب AACC^۱ به ترتیب به شماره های ۱۶-۴۴، ۰۷-۰۸، ۱۲-۴۶ و ۱۷-۳۲ در نظر گرفته شد (AACC، ۲۰۰۳). روش تعیین میزان اسید فیتیک نیز روش ناهاپتین به کار گرفته شد (Nahapetian & Bassiri, 1975). طبق این روش اسید فیتیک با اسید کلریدریک ۱/۲ درصد حاوی ۱۰ درصد سولفات سدیم استخراج و با سولفات سدیم ۵ درصد رسوب داده شد. رسوب فیتات آهن با سانتیفریوژ کردن از

جدول ۱ - خصوصیات شیمیایی نمونه سبوس (بر اساس درصد ماده خشک)* در اثر تخمیر بالاکتوباسیلوس پلانتراروم

زمان پس از شروع تخمیر (ساعت)	رطوبت (درصد)	پروتئین ^{ns} (درصد)	فیبر ^{ns} (درصد)	خاکستر ^{ns} (درصد)	اسیدفیتیک (میلی گرم / گرم)
۰	۴/۱۸±۰/۱۱ ^b	۱۹/۵۲±۰/۰۸	۱۴/۰۹±۰/۰۵	۵/۱۱±۰/۱۵	۲۹/۷±۰/۱۵ ^a
۵/۵	۴/۳۴±۰/۲۰ ^b	۱۹/۲۸±۰/۰۹	۱۳/۹۰±۰/۱۵	۵/۳۳±۰/۲۰	۸/۸±۰/۲۵ ^b
۶/۵	۳/۸۴±۰/۰۶ ^c	۱۹/۴۹±۰/۰۳	۱۴/۵۶±۰/۰۱	۵/۵۷±۰/۰۷	۵/۲±۰/۱۲ ^c
۷/۵	۶/۱۷±۰/۰۶ ^a	۱۹/۶۷±۰/۰۸	۱۴/۳۸±۰/۲۰	۵/۲۲±۰/۲۰	۵/۱±۰/۰۵ ^c
۸/۵	۴/۹۱±۰/۱۴ ^b	۱۹/۴۴±۰/۱۰	۱۴/۲۰±۰/۰۵	۵/۴۷±۰/۰۳	۴/۹±۰/۱۲ ^c
۹/۵	۴/۱۸±۰/۱۴ ^b	۱۹/۳۹±۰/۰۹	۱۴/۷۱±۰/۰۹	۵/۲۴±۰/۲۰	۴/۹±۰/۰۹ ^c
۱۰/۵	۴/۸۲±۰/۱۴ ^b	۱۹/۲۶±۰/۰۸	۱۴/۲۰±۰/۰۵	۵/۰۸±۰/۰۹	۴/۸±۰/۱۱ ^c

* اعداد، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. میانگین‌های هر ستون که حروف مشترک دارند فاقد تفاوت آماری در سطح احتمال ۵ درصد هستند. ns: فاقد تفاوت آماری در سطح احتمال ۵ درصد.

بررسی روند تکثیر لاکتوباسیلوس پلانتراروم در محیط کشت سبوس گندم

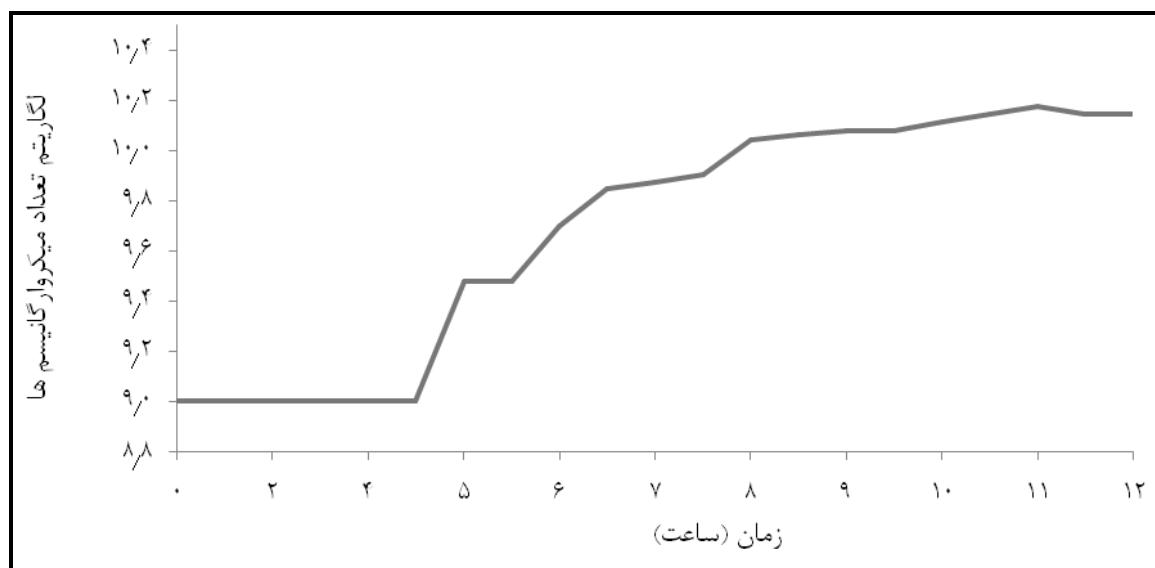
منحنی رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتراروم طی کشت بر محیط سبوس گندم، پس از گذشت ۱۱/۵ ساعت، در شکل (۱) نشان داده شده است. در این شکل، رشد نمایی باکتری طی ۱۱/۵ ساعت اولیه تخمیر و پس از گذراندن یک‌فاز تأخیر چندساعته قابل مشاهده است.

آزمون‌های اسیدفیتیک نمونه‌های سبوس گندم

نتایج تحقیق محققان در خصوص کاهش میزان اسید فیتیک سبوس به روش تخمیر، حاکی از کاهش میزان اسید فیتیک در اثر فرایند تخمیر توسط لاکتوباسیلوس پلانتراروم به میزان ۷۸-۹۰ درصد است (Mosharraf, 2014). جدول (۱) نشان می‌دهد که با رشد و تکثیر باکتری‌های اسیدلاکتیک روی سبوس، ضمن ایجاد محیطی اسیدی، زمینه برای فعالیت آنزیم میکروبی فراهم می‌شود و با گذشت زمان و با افزایش فعالیت آنزیم فیتاز میزان اسید فیتیک در سبوس کاهش می‌یابد. علت

کاهش میزان اسید فیتیک در سبوس گندم در حین تخمیر، افزایش فعالیت فیتاز اندروژن سبوس گندم و فیتاز باکتریایی است. تحقیقات نشان داده است که مخمرها، باکتری‌های اسیدلاکتیک، و بیفیدو باکتری‌ها منابع ارزشمند و مطمئن آنزیم فیتاز هستند. منبع میکروبی فیتاز مهم‌ترین منبع برای تولید آنزیم به صورت تجاری است. اکثر باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای فعالیت فسفاتاز هستند (Palacios et al., 2008).

رنال و همکاران در تحقیقی گزارش داده‌اند که باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌طور مستقیم در کاهش اسید فیتیک نقش دارند. در واقع این باکتری‌ها با تولید اسید و کاهش تدریجی pH باعث مهیا شدن شرایطی برای افزایش فعالیت آنزیم فیتاز اندروژن گندم و جذب بالاتر منیزیم می‌شوند (Reale et al., 2007). اما تحقیقات آنجلیس و برخی از محققان دیگر در سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۸ مبین این مطلب است که مخمرها، باکتری‌های اسیدلاکتیک، و بیفیدوباکتری‌ها منبع قابل توجهی از آنزیم فیتاز هستند (De Angelis et al., 2003).



شکل ۱- منحنی رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلانترام کشت شده به روش تخمیر جامد در شرایط بی‌هوازی بر سبوس گندم

نگهداری در فریزر به مدت ۴۸ ساعت موجب مرگ تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های تولیدی شده است، درحالی‌که نگهداری در یخچال قسمت اعظم میکروارگانیسم‌ها را زنده باقی گذاشته است. خشک کردن در شرایط محیطی بقای محدودی از میکروارگانیسم‌ها را به دنبال داشته است.

تأثیر دما در روش‌های مختلف نگهداری بر بقای میکروارگانیسم‌های سبوس نتایج بررسی اثر روش نگهداری بر بقای باکتری‌های تکثیرشده در سبوس در شرایط نگهداری در یخچال، فریزر، و شرایط محیطی در جدول (۲) آمده است.

جدول ۲ - تأثیر روش نگهداری بر بقای میکروارگانیسم‌های سبوس گندم

رطوبت سبوس (درصد)		جمعیت باکتری‌ها (CFU)		شرایط نگهداری
ثانویه	اولیه	ثانویه	اولیه	
۷۸	۷۸	$9/55 \times 10^9$	1×10^{10}	یخچال به مدت ۴۸ ساعت
۷۸	۷۸	2×10^8	1×10^{10}	فریزر به مدت ۴۸ ساعت
۹/۵	۷۸	8×10^8	1×10^{10}	شرایط محیطی به مدت ۴۸ ساعت

نگهداری در یخچال توانسته است حدود ۹۵ درصد میکروارگانیسم‌ها را زنده نگه دارد. ولی نگهداری در فریزر یا خشک کردن در شرایط محیطی به ترتیب کمتر از ۲ و ۸ درصد از میکروارگانیسم‌ها را زنده داشته است. جمعیت اولیه باکتری در سبوس تخمیر شده که در بهترین شرایط کشت داده شده قبل از شروع خشک شدن حدود 1×10^{10} عدد به ازای هر گرم وزن خشک سبوس بوده است.

با اینکه گفته می‌شود خشک کردن مطمئن‌ترین روش نگهداری سبوس تخمیر شده حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک است، اما نگهداری و خشک کردن سبوس فراوری شده به روش تخمیر در شرایط محیطی، به دلیل تبخیر آب و کاهش تدریجی فعالیت آبی، باعث مرگ بیش از ۹۰ درصد از میکروارگانیسم‌های زنده موجود در سبوس تخمیری مرطوب می‌شود. بر اساس داده‌های جدول (۲)،

از طرفی، تحقیقات محققان نشان داده است که زنده ماندن میکروارگانیسم‌ها به‌شدت به جنس میکروارگانیسم‌ها و روش مورد استفاده برای نگهداری آنها بستگی دارد. در تحقیقات این محققان مشاهده می‌شود که در روش خشک کردن به‌خصوص روش خشک کردن پاششی، احتمال زنده ماندن میکروارگانیسم‌ها بیشتر است تا در روش معمول فریز کردن یا استفاده از خشک‌کن تصعیدی، که با نتایج تحقیق ما تطابق دارد (To & Etzel, 2006). در تحقیقی دیگر مشخص گردید دما و مقدار آب ماده، دو عامل مهم برای زنده ماندن میکروارگانیسم‌ها هستند (Brandt, 2007).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که شرایط یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد)، نسبت به دو روش دیگر، برای حفظ و زنده ماندن باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانترام متعادل تر است.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که اثر سه روش نگهداری (در یخچال، در فریزر، و خشک کردن در شرایط محیطی) بر میزان زنده ماندن میکروارگانیسم‌های موجود (باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانترام) متفاوت است. به‌طور کلی میزان زنده ماندن میکروارگانیسم‌ها به روش نگهداری در یخچال، شرایط محیطی، و فریزر به ترتیب حدود ۹۵، ۸، و ۲ درصد است که به نظر می‌رسد روش نگهداری در یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد) شرایط متعادلی برای حفظ و زنده ماندن این میکروارگانیسم‌ها نسبت به دو روش دیگر است. نتایج این تحقیق مبین این مطلب است که نوع میکروارگانیسم و شرایط مورد استفاده در فرآوری بر میزان زنده ماندن میکروارگانیسم‌ها بسیار مؤثر است.

همان‌گونه که مشاهده می‌شود با کاهش رطوبت سبوس تأثیر دمای خشک کردن بر مرگ میکروارگانیسم‌ها افزایش یافته است. در فرایند خشک کردن و فریز کردن، پیوندهای یونی اساساً افزایش پیدا می‌کنند و فعالیت آبی و ایجاد تنش اسمزی کاهش می‌یابد که در این هنگام میکروارگانیسم‌ها با انباشته شدن و به هم چسبیدن با کاهش فعالیت آبی مقابله می‌کنند (Brown, 1976). با ایجاد شدن این شرایط، فشار اسمزی متعادل بین سلولی و بین سلول و محیط ایجاد می‌شود که نقش مهمی در پایداری پروتئین و ترکیبات سلول در هنگام کاهش فعالیت آبی دارد (Csonka, 1989). فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم‌ها را با نگهداری آنها در دمای بسیار پایین (۱۵۰- تا ۱۹۶- سلسیوس) می‌توان تا حد قابل توجهی کاهش داد. دسترسی به دمای پایین با استفاده از نیتروژن مایع امکان پذیر است. در این حالت، ابتدا میکروارگانیسم تا انتهای مرحله لگاریتمی و رسیدن به مرحله ساکن کشت داده می‌شود. پس از آن، سلول‌ها در محیط کشت حاوی معرف محافظت کننده در برابر سرما (مانند گلیسرول ۱۰ درصد) به حالت سوسپانسیون درمی‌آیند و پیش از نگهداری در نیتروژن مایع در ظروف مخصوص کاملاً بسته و بدون منفذ منجمد می‌شوند. در پژوهش حاضر از هیچ ماده محافظتی استفاده نشد و فرایندهای مورد نظر روی سبوس تخمیر شده بررسی گردید. تحقیقات کومار و همکاران (Kumar et al., 2011) نشان داده‌است که سبوس گندم حاوی قندها، ترکیبات پروتئینی مانند پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه، ویتامین‌های مختلف مانند بیوتین، ریبوفلاوین، تیامین، K، D، E و املاح پتاسیم، منیزیم، روی و آهن هستند که می‌توانند باعث رشد و نگهداری باکتری‌ها شوند و به‌صورت طبیعی اثر محافظت‌کنندگی دارند.

مراجع

- American Association of Cereal Chemists. 2003. Approved Methods of the AACC, St Paul. MN.
- Brandt, M. 2007. Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiology*. 24(2):161-164.
- Brown, A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*.40(4): 803-846.
- Carlson, D. and Poulsen H.D. 2003. Phytate degradation in soaked and fermented activity, PH and temperature. *Animal Feed Science and Technology*. 103(1-4):141-154.
- Csonka, L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*. 53(1):121-147
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, MR., McSweeney, PLH., Faccia, M., Giovine, M. and Gobbetti, M. 2003 Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Food Microbiology*. 87(3):259-270.
- Decock, P. and Cappelle, S. 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science and Technology*. 16(1-3):113-120.
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollan, G. and Font de Valdez, G. 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*. 20(2):144-148.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Nutrition*. 125(6):1401-1412.
- Gocmen, D., Gurbuz, O., Kumral, A.Y., Dagdelen, A.F. and Sahin, E. 2007. The effects of wheat sourdough on glutenin patterns, dough rheology and bread properties. *European Food Research Technology*. 225(5-6):821-830.
- Kaenhammer, T. 2000. Probiotic bacteria; today and tomorrow. *Journal of Nutrition*. 130,451-416.
- Katina, K., Salmenkallio-Marttila, M., Partanen, R., Forssell, P. and Autio, K. 2006. Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*. 39(5):479-491.
- Kulp, K. and Lorenz, K. 2003. *Handbook of Dough Fermentation*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Kumar, P., Yadava, R.K. and Gollen, B. 2011. Nutritional contents and medicinal properties of wheat: a review. *Life Science and Medicine Research*. 22, 1-10.
- Lioger, D., Leenhardt, F., Demigne, C. and Remesy, C. 2007. Sourdough fermentation of wheat fractions rich in fibres before their use in processed food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87(7):1368-1373.
- Liu, Z.H., Wang, H.Y., Wang, X.E., Zhang, G.P., Chen, P.D. and Liu, D.J. 2007. Phytase activity, phytate, iron, and zinc contents in wheat pearling fractions and their variation across production locations. *Journal of Cereal Science*. 45(3):319-326.
- Mosharraf, L., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2009. Effect of hydrothermally treated bran on physicochemical, rheological and microstructural characteristics of Sangak bread. *Journal of Cereal Science*. 49(3): 398-404.
- Mosharraf, L. 2014. Investigation of wheat bran fermentation to improve of its nutritional properties Investigation of wheat bran fermentation to improve of its nutritional properties. Agriculture Engineering Research Institute. Research Report No. 45793.
- Mullaney, E.J. and Ullah, A.H.J. 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312(1):179-184.

- Nahapetian, A. and Bassiri, A. 1975. Changes in concentrations and interrelationships of phytate, phosphorus, magnesium, calcium, and zinc in wheat during maturation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 23(6):1179-1182.
- Palacios, M.C., Haros, M., Rosell, C.M. and Sanz, Y. 2008. Selection of phytate-degrading human bifidobacteria and application in whole wheat dough fermentation. *Food Microbiology*. 25(1):169-176.
- Palacios, M.C., Haros, M., Sanz Y. and Rosell, M.C. 2008. Selection of lactic acid bacteria with high phytate degrading activity for application in whole wheat bread making. *LWT-Food Science and Technology*. 41(1): 82-92.
- Reale, A., Konietzny, U., Coppola, R., Sorrentino, E. and Greiner, R. 2007. The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55(8):2993-2997.
- To, B. and Etzel, M. 2006. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *Journal of Food Science*. 62(3):576-578.
- Zamudio, M., Gonz  , A. and Medina, A. 2001. *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Letters in Applied Microbiology*. 32(3): 181-184.

Study of Different Storage Temperatures on Viability of *Lactobacillus Plantarum* in Wheat Bran

L. Mosharraf*

* Corresponding Author: Assistant professor, Agricultural Engineering Research Department, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran.

Email :mosharaf@ag.iut.ac.ir

Received: 25 June 2018, Accepted: 12 September 2018

Wheat bran is a rich source of valuable and nutrient compounds such as dietary fibers, amino acids, vitamins and minerals. Because of these valuable compounds, bran is a suitable medium for growth and reproduction of beneficial microorganisms for human health. Several studies have confirmed the beneficial bacteria have different health benefits. These properties include the prevention and treatment of some infectious diseases, the beneficial impact on the intestinal flora, improve immune function and reduce allergy. Strong enzyme systems of these microorganisms can break down some of the components of the bran such as phytic acid and improve its nutritional properties. By fixing of these microorganisms on bran, prebiotic product containing beneficial microorganisms can be used in a wide range of food products including bakery products. In this study, *Lactobacillus plantarum* which has beneficial properties for human and also improve bread quality were used to ferment the wheat bran. Fermented bran by lactic acid bacteria was produced under optimal growth conditions. Then the effect three methods of storage including drying in ambient condition and storage at refrigerator and freezer temperature at different temperature, 23, 4 and -18 °C, respectively, on survival rate of microorganisms were investigated. It was observed that the survival rate of microorganisms using refrigerator, drying in ambient condition and freezing, was 95, 8 and 2%, respectively. Results showed that storage at refrigerator keeps the balance condition for survival of microorganisms comparing to other studied methods.

KeyWords: Dietary fiber, Fermented bran, Phytic acid, Probiotic