



Fermentation of button mushroom by *Lactobacillus plantarum* PTCC 1745 to increase shelf life and evaluate the properties of the final product

Mahsa Rakhshankhah¹, Fariba zeynali¹, **Saber Amiri**^{*1}, Farnaz Nabizadeh²

¹ Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

² Institute of Agriculture, Water, Food, and Nutraceuticals, Mah.C., Islamic Azad University, Mahabad, Iran

Received Date:2025.12.25 Accepted Date:2026.02.14

Abstract

In this study, the effect of inoculation of probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* PTCC on physicochemical, microbial, textural and sensorial properties of pickled button mushrooms (*Agaricus bisporus*) was investigated. For this purpose pickled mushroom was produced using apple vinegar and salt and inoculated by *L. plantarum*. The characteristics of fermented and inoculated product were compared with control sample during storage (1, 7, 13 and 19 days). The results showed that the inoculated sample had a low pH and high acidity, which preserves the health of the product and prevents its spoilage. The *L. plantarum* in the inoculated sample was significantly effective in reducing nitrite content. The presence of bacteria caused a decrease in the amount of phenol in the samples but did not have a significant effect on the antioxidant activity. Lactic acid was the main acid in inoculated samples. Microbial analysis of the samples containing *L. plantarum* bacteria showed that the population of *L. plantarum*, yeast and the microbial total count increased initially and then decreased. In the samples without bacteria, the yeast population increased and then remained almost constant, and the total number of microbes decreased to a small amount after increasing. The colorimetric results showed that the samples containing bacteria had higher brightness, lower a* and higher Hue angle than the samples without bacteria, but the presence of bacteria had no significant effect on b* and chroma. The force required to penetrate the sample containing bacteria was less than the sample without bacteria in texture analysis. In the sensory evaluation, the sample containing bacteria had high sensorial scores. In general, the results of this research showed that the use of *L. plantarum* can increase the shelf life of button mushroom, while maintaining some nutritional and sensorial properties.

Keywords: Fermentation, Button mushroom, *Lactobacillus plantarum*, Shelf life

* sa.amiri@urmia.ac.ir

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Edible mushrooms have high amounts of important nutrients and bioactive substances like proteins, polysaccharides, amino acids, minerals, vitamins and polyphenols. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) is the most common edible mushroom all over the world that is very perishable due to its high nutrients and moisture contents, enzymatic activity and respiration rate. So, various approaches have been used to extend its shelf life. For example, thermal treatment, freezing, coating, packaging, irradiation and ultrasound were utilized to conserve mushroom during storage. Biological methods are widely applied to protect raw fruits and vegetables during storage. Lactic acid fermentation is a biological way can improve food products shelf life and sensorial properties as well as their beneficial characteristics for consumer health. Lactic acid bacteria that are inoculated in fermented food products are very beneficial bacteria with antibacterial and antifungal activities which can improve the final products shelf life. Moreover, they produce bioactive substances which are good for human health. In this study we aimed to produce mushroom pickle inoculated with *L. plantarum*.

Materials and methods: Button mushroom pickle was produced and inoculated with *L. plantarum*. Control samples were also produced without inoculation. The samples were stored for 19 days and their physicochemical, textural, color and sensorial properties were compared during storage. pH, acidity and nitrite contents of samples were measured according to standard protocols. The extract of samples was taken out using extractor solvent (ethanol/ water). Total phenolic content, antioxidant activity and organic acids content were assessed using Folin-ciocalteu reagent, the free radical scavenging activity (DPPH) and HPLC methods, respectively. Microbial analysis including *L. plantarum*, Enterobacteriaceae, yeasts and total microbial counts was carried out using MRSA, VRBA, SDA and NA cultures, respectively. Color and textural tests were done by use of Hunter Lab and texture analyzer devices, respectively. Finally, the panelists examined the sensorial properties of samples. The results were analyzed using factorial design and Expert Design software.

Results: Inoculated samples had low pH and high acidity. *L. plantarum* reduced nitrite and phenolic contents. Lactic acid was the main acid in inoculated samples where acetic acid was the dominant acid in samples without inoculation. Addition of *L. plantarum* did not affect the antioxidant activity, b* and chroma indexes. But, a* were lower in inoculated samples. Insertion of *L. plantarum* resulted in lighter and softer texture of product. In microbial analysis, an initial increase was observed in the population of *L. plantarum*, yeast and the microbial total count which proceeded with a decrease. In the samples without bacteria, the yeast count remained constant after development and the microbial total count increased and then decreased. Enterobacteriaceae was not observed in none of the samples. Sensorial properties of inoculated samples were higher than the other ones.

Discussion and Conclusion: *L. plantarum* is a lactic acid bacterium so it could reduce pH and improve acidity of samples by acid production. Lactic acid bacteria can decrease nitrite content by enzymatic reactions. Nitrite reductase is an enzyme in *L. plantarum* that can reduce nitrite. *L. plantarum* decreased the phenolic contents by inverting them to aromatic substances. There was a direct relation between phenolic content and antioxidant activity. Lactic acid is produced by *L. plantarum* and lactic acid bacteria. Moreover, lactic acid bacteria can metabolize citric acid to lactic acid and other flavor inducing materials. It seems that at higher pH, acetic acid is produced in more contents which can be the reason for high concentration of acetic acid in samples without inoculation. Due to anaerobic condition in containers, *L. plantarum* increased initially and then as concentration of acids increased and the nutrients decreased, *L. plantarum* population decreased. Acidic condition is suitable for yeasts but, due to antifungal activity of lactic acid bacteria, it decreased. Yeasts were the dominant microbes in samples without inoculation. pH reduction, acid production and antimicrobial substances inhibited Enterobacteriaceae growth. Initial development of total microbial count was due to high concentrations of carbohydrates and then decreased due to high acidity and antimicrobial activity of lactic acid bacteria. Hydrogen peroxide produced by lactic acid bacteria can prevent from browning of mushroom leading to higher L* and lower a* in inoculated samples. Inoculated samples showed softer texture probably due to enzymatic activity of *L. plantarum*. Aromatic and flavor inducing metabolites of *L. plantarum* resulted in higher sensorial scores. In general, inoculation of button mushroom by *L. plantarum* led to higher acidity, lower total microbial, yeasts and Enterobacteriaceae counts, lower nitrite and lighter, softer texture with appropriate sensorial properties which can extend mushroom shelf life.



تخمیر قارچ دکمه‌ای توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1745 به منظور افزایش زمان ماندگاری و ارزیابی خواص محصول نهایی

مهسا رخشانخواه^۱، فریا زینالی^۱، صابر امیری*^۱، فرناز نبی زاده^۲

^۱ گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲ دانشکده کشاورزی، آب، غذا و فراسودمندها، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۴

چکیده

در این تحقیق تاثیر افزودن آغازگر پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1745 بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میکروبی، بافتی و حسی ترشی قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ترشی قارچ با استفاده از سرکه سیب و نمک تهیه شد و با آغازگر *پلانتاروم* تلقیح و با محصول شاهد طی زمان نگهداری (۱، ۷، ۱۳ و ۱۹ روز) مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد نمونه تلقیح شده دارای pH پایین و اسیدیته بالایی بوده که از فساد آن جلوگیری می‌کند. باکتری *پلانتاروم* در نمونه تلقیح شده به طور معناداری در کاهش نیتريت موثر بود. وجود باکتری باعث کاهش میزان فنل کل در نمونه‌ها شد ولی بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر معنی‌دار نداشت. اسید لاکتیک اسید غالب در نمونه‌های تلقیح شده بود. در آنالیز میکروبی نمونه حاوی باکتری *پلانتاروم*، جمعیت باکتری *پلانتاروم*، مخمر و شمارش کلی میکروبی ابتدا یک روند افزایشی و سپس کاهشی داشت. در نمونه فاقد باکتری جمعیت مخمرها افزایش یافته و سپس تقریباً ثابت ماند و شمارش کلی میکروبی پس از افزایش به مقدار کمی کاهش یافت. نمونه حاوی باکتری دارای میزان روشنایی بیشتر، a^* کمتر و زاویه Hue بیشتری بود ولی حضور باکتری بر b^* و کروما تاثیر معنادار نداشت. از لحاظ بافت سنجی نیروی لازم برای نفوذ به بافت نمونه حاوی باکتری کمتر از نمونه فاقد باکتری بود. نمونه حاوی باکتری امتیازات حسی بالایی داشت. به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد استفاده از *پلانتاروم* می‌تواند مدت زمان ماندگاری قارچ دکمه‌ای را با حفظ برخی خواص تغذیه‌ای و حسی افزایش دهد.

کلمات کلیدی: تخمیر، قارچ دکمه‌ای، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ماندگاری

* sa.amiri@urmia.ac.ir

یک روش ارزان قیمت است. باکتری‌های لاکتیک اسید باکتری‌های مفیدی هستند و می‌توانند فعالیت‌های ضدباکتریایی و ضد قارچی داشته، فاکتورهای ضد تغذیه‌ای را تجزیه کنند، در نتیجه باعث بهبود قابلیت هضم فرآورده تخمیری شوند و ترکیبات زیست‌فعال (ویتامین‌ها، پپتیدها، اگزوپلی ساکاریدها، آنزیم‌ها و غیره) را در محصول افزایش دهند (۱۰). *ل. پلانتاروم* با خصوصیات پروبیوتیکی بطور رایج در صنعت غذا بکار می‌رود و قادر به افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی و بهبود طعم محصول است (۱۱). در این تحقیق ابتدا ترشی قارچ سفید دکمه‌ای با استفاده از سرکه سیب و نمک تهیه شد. سپس باکتری پروبیوتیک *ل. پلانتاروم* جهت تکمیل فرایند تخمیر به ترشی افزوده شد و تاثیر آن بر خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی، بافتی و حسی محصول نهایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد

قارچ دکمه‌ای سفید از مزرعه پرورش قارچ و سرکه سیب از کارخانه سرکه‌سازی در شهرستان ارومیه تهیه شد. باکتری *ل. پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1745¹ لیوفلیزه با منشا گیاهی از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران² تهیه گردید. تمام مواد شیمیایی و محیط‌های کشت از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

روش‌ها

فعالسازی آغازگر

ابتدا یک ویال لیوفلیزه از باکتری *ل. پلانتاروم* در ۵۰ سی‌سی محیط کشت اختصاصی MRS³ براث حاوی توئین ۸۰ تلقیح شد. نمونه به منظور تکثیر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C در داخل انکوباتور قرار گرفت. بعد از انکوباسیون، نمونه را ورتکس کرده و ۵ ml از نمونه حاصل مجدداً در ۱۰۰ ml محیط کشت MRS براث تلقیح شد. سپس با استفاده از سانتریفوژ با ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۵ min باکتری‌ها جداسازی

مقدمه

قارچ‌های خوراکی ارزش غذایی بالایی داشته و غنی از مواد مغذی و زیست‌فعال مثل پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، آمینو اسیدها، مواد معدنی، ویتامین‌ها، پلی‌فنل‌ها و ترپنوئیدها هستند (۲۰). علاوه بر این اثرات سلامت‌بخش مختلفی مانند تقویت سیستم ایمنی (۳) ضد سرطان (۴)، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی نیز دارند (۵). قارچ سفید دکمه‌ای با نام علمی *Agaricus bisporus* معروف‌ترین قارچ در سراسر دنیا است و ۳۵ تا ۴۵٪ از سهم بازار قارچ جهانی را به خود اختصاص داده است. از آنجاییکه قارچ دکمه‌ای فاقد پوشش بیرونی محافظ بوده از طرفی دارای سطح بالایی از پروتئین، رطوبت، سرعت تنفس و فعالیت آنزیمی است، نگهداری آن بصورت پایدار طی نگهداری مشکل است (۶). قدیمی‌ترین روش فرآوری قارچ، خشک کردن بوده و روش‌های رایج دیگری شامل انجماد، مزه‌دار کردن و استریل کردن در آب‌نمک داخل قوطی نیز بکار می‌رود (۷). روش‌های مختلف حرارتی (خشک کردن، سرد کردن)، شیمیایی (پوشش‌دهی، تیمار با اوزون و شستشو با مواد ضد میکروبی) و فیزیکی (بسته‌بندی، پرتودهی و اولتراسوند) برای افزایش ماندگاری قارچ دکمه‌ای بکار رفته است که هر کدام محدودیت‌های خود را دارد (۸). روش‌های بیولوژیکی برای حفظ مواد غذایی یکی از قدیمی‌ترین روش‌هایی است که بطور گسترده در مورد مواد خام (مانند میوه‌ها و سبزیجات) مطالعه شده اند. تخمیر لاکتیکی، حفظ مواد غذایی را تسهیل می‌کند، مقاومت مواد غذایی را به فساد میکروبی افزایش می‌دهد، خصوصیات حسی محصولات غذایی را بهبود می‌بخشد و خواص سلامت‌بخش محصول را با افزایش مقدار متابولیت‌های باکتری‌های لاکتیک اسید و میکروفلور زنده مفید توسعه می‌دهد (۹). علاوه بر این تخمیر

²Persian Type Culture Collection

³ Man Rogosa Sharpe

¹ *Lactobacillus plantarum* subsp. *Plantarum*

قارچ تخمیر شده به طور کامل توسط چرخ گوشت چرخ شد و ماده یکنواخت خمیری شکل به دست آمد. ۱۰۰ gr از نمونه توسط دستگاه ترازوی دیجیتالی وزن شد. سپس ۱۰۰ ml آب مقطر به نمونه افزوده شده و وزن آن توسط ترازو اندازه گیری شد. نمونه تا جایی که یک ترکیب کاملاً یکنواخت به دست بیاید هم زده شد و سپس به مدت ۳۰ min برای ایجاد یک ترکیب هموژن در دستگاه حمام اولتراسونیک قرار داده شد. در مرحله بعد نمونه از کاغذ صافی عبور داده شد و صاف گردید. حدود ۵/۵ ml مایع صاف شده، با ۵/۵ ml آب استریل مخلوط گردید. سپس مخلوط همگن شد و ۴/۵ ml از مخلوط با ۲۵ ml سولفانیل آمید مخلوط شد. مخلوط سپس، همگن شد و بمدت ۵ min ساکن نگه داشته شد. با ۲۵ ml آلفا نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید (۱w/v درصد) مخلوط شده و دوباره بمدت ۵ min انکوبه شد. سپس جذب نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۸ nm قرائت گردید و غلظت نیتريت از روی منحنی استاندارد سدیم نیتريت به دست آمد. محلول فاقد نمونه نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از سدیم نیتريت استفاده شد.

استخراج عصاره نمونه‌ها

برای استخراج عصاره نمونه‌ها از روش (الفی و همکاران، ۱۳۹۶) با کمی تغییرات استفاده شد (۱۵). ابتدا قارچ‌ها توسط چرخ گوشت چرخ شدند تا جایی که یک ماده یکنواخت و تقریباً خمیری شکل به دست آمد. ۱۰ gr از این نمونه قارچ توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ gr اندازه گیری شد و سپس ۳۰ ml حلال استخراج (شامل ۸۰ درصد متانول و ۲۰ درصد آب مقطر) به نمونه اضافه شد. سپس نمونه به طور کامل همزده شد و در داخل یخچال با دمای ۴ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و در نهایت به مدت ۳ min، با ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل، عصاره متانولی قارچ بود که برای سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی و میزان فنول کل مورد استفاده قرار گرفت.

شده و پلت^۱ های بدست آمده در دو مرحله با محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد شستشو داده شد. سپس در محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد تعلیق شد و با آب مقطر رقیق گردید (۱۲).

تهیه ترشی و تلقیح آغازگر

ابتدا ترشی قارچ بر اساس فرمولاسیون بهینه بدست آمده در مطالعه قبلی (۱۳) تهیه گردید. برای این منظور ابتدا قارچ‌هایی با اندازه تقریباً یکسان انتخاب و با آب سرد شسته شد. قارچ‌ها برش داده شده و از وسط به دو قسمت مساوی تقسیم شدند و سپس در آب جوش (۹۸-۹۶ °C) به مدت ۲ min بلانچ شدند. سرکه سیب با غلظت ۳ (v/v) درصد و نمک به میزان ۲/۹۶۳ % (w/v) به آب استریل افزوده شد. بعد در ظروف شیشه‌ای با مقدار ۲۰۰ gr قارچ و محلول با نسبت جامد به مایع ۲ به ۱ پر شده و درب بندی شدند. سپس آغازگر^۲ پلانتاروم به نمونه‌های ترشی تلقیح شد. بدین منظور، باکتری‌های جداسازی شده در مرحله قبل با غلظت حدود ۱۰^۷ CFU/ml به محصول اضافه شدند. همچنین نمونه‌های فاقد آغازگر نیز تهیه شده و بعنوان نمونه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های ترشی تلقیح شده با آغازگر و فاقد آغازگر (نمونه شاهد) در سه تکرار تهیه شده و در روزهای ۱، ۷، ۱۳ و ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

pH و اسیدیته

از بخش مایع نمونه‌ها برای اندازه گیری pH و اسیدیته استفاده شد. pH با دستگاه pH سنج و اسیدیته از طریق تیتراسیون با سود ۰/۱N محاسبه و میزان اسیدیته طبق فرمول زیر بدست آمد (۱۲):

$$A = \frac{V \times 0.0065 \times 100}{M}$$

A: اسیدیته بر حسب درصد، V: حجم سود مصرف شده برای تیتراسیون بر حسب ml، M: جرم نمونه بر حسب gr

میزان نیتريت

مقدار نیتريت قارچ‌های تخمیر شده با روش لیو^۲ و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییرات اندازه گیری شد (۱۴). ابتدا نمونه

² Liu

⁴Pellet

سنجش فنول کل

برای تعیین میزان فنول نمونه‌ها از شناساگر فولین سیوکالتو^۱ و منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده شد. اساس کار، احیا شناساگر فولین سیوکالتو توسط ترکیبات فنولی در محیط و ایجاد یک ترکیب آبی رنگ است. برای اندازه‌گیری فنول ابتدا به ۰/۲ ml از عصاره متانولی استخراج شده، مقدار ۰/۶ ml آب مقطر و ۴ ml فولین سیوکالتو ۱۰ درصد اضافه شده و نمونه توسط ورتکس هم زده شد. ۵ دقیقه بعد از افزودن فولین، ۳/۲ ml سدیم کربنات ۷/۵ درصد اضافه شد و نمونه با ورتکس کاملاً هم زده شد. سپس به مدت ۹۰ min، در دمای محیط و در تاریکی نگهداری شد و در آخر میزان جذب نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ nm قرائت شد. میزان فنول نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد گالیک اسید به دست آمد. برای ترسیم نمودار استاندارد از گالیک اسید، با غلظت‌های ۱۰۰ μmol/lit تا ۲۵۰۰ استفاده شد (۱۶).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

یکی از روش‌های رایج برای اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی، مبنی بر ویژگی خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH^۲ توسط عوامل آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. به میزان ۱ ml از عصاره متانولی استخراج شده ۹ ml محلول DPPH (با غلظت ۰/۰۰۴ درصد) افزوده شد. نمونه بلافاصله توسط ورتکس هم زده شد و در دمای محیط به مدت ۱۵ min در تاریکی قرار گرفت. میزان جذب نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ nm قرائت شد. از محلول فاقد نمونه هم به عنوان شاهد استفاده شد. در نهایت میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی با احتساب میزان رقت و بر حسب مهار رادیکال آزاد با واحد درصد از فرمول زیر محاسبه شد (۱۷):

$$\% \text{ Scavenging radical of DPPH} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100]$$

که در آن A_{control} جذب محلول شاهد و A_{sample} جذب نمونه می‌باشد.

اندازه‌گیری اسیدهای آلی

برای اندازه‌گیری اسیدهای آلی شامل اسید لاکتیک، اسید سیتریک، اسید مالیک و اسید استیک از روش دستگاهی HPLC^۳ و مشابه روش لیو و همکاران (۲۰۱۶) استفاده شد (۱۴). به این منظور ابتدا قارچ توسط چرخ گوشت به طور کامل چرخ شد و ماده‌ای نسبتاً خمیری شکل به دست آمد، سپس از کاغذ صافی عبور داده شد. ۲ ml از مایع صاف شده در ۸ ml محلول اسید فسفریک با pH برابر ۲/۶۵ رقیق شد و به مدت ۲۵ min در دمای ۷۵°C قرار گرفت. سپس نمونه به مدت ۲۰ min و در دمای ۴۰°C با دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل برای آنالیز HPLC استفاده شد. برای آنالیز اسیدهای آلی از دستگاه HPLC کروماتوگراف Agilent مجهز به دتکتور فوتودیود آرای و ستون LiChrospher 100 RP، ۱۸ ستونه (۲۵۰ mm × ۴/۶ μm، ۵) استفاده شد. فاز متحرک محلول فسفریک اسید با pH برابر ۲/۶۵ بود. تمام نمونه‌ها در طول موج ۲۱۴ nm بررسی شدند. با توجه به نمودار دیاگرام HPLC به دست آمده برای هر نمونه و منحنی استاندارد اسید مورد نظر، غلظت اسید محاسبه شد.

آزمون‌های میکروبی

برای انجام آزمون‌های میکروبی عمل رقت سازی با استفاده از محلول پیتون واتر^۱ ۰/۱ انجام شد. به این منظور ابتدا ۱ ml از بخش مایع هم‌زده نمونه ترشی تحت شرایط استریل برداشته شده و به داخل ۹ ml پیتون واتر ۰/۱ اضافه شد. نمونه حاصل ورتکس شد که در این صورت رقت ۱۰^{-۱} از نمونه تهیه شد. سری رقت‌های بعدی نیز به همین ترتیب تهیه شد. برای شمارش باکتری‌های *L. پلانٹاروم*، از محیط کشت MRSA، روش کشت پورپلیت و انکوباسیون ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C، جهت شمارش باکتری‌های *انتروباکتریاسه*، از محیط کشت VRBA، روش کشت پورپلیت و انکوباسیون ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C، برای شمارش مخمرها از محیط کشت SDA، روش کشت سطحی و انکوباسیون ۴۸ ساعت

^۱ Folin- Ciocalteu

^۲ و ^۳ دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازین

^۳ High Performance Liquid Chromatography

نمونه‌ها توسط ارزیاب‌های مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور ۱۰ نفر پانلیست از افراد عادی نمونه‌ها را با درجه بندی عالی (نمره ۵)، خوب (نمره ۴)، متوسط (نمره ۳)، بد (نمره ۲)، خیلی بد (نمره ۱) ارزیابی کردند (۱۹).

آنالیزهای آماری

در این پژوهش اثر دو فاکتور شامل زمان نگهداری (۱، ۷، ۱۳ و ۱۹ روز) و روش تهیه (تلقیح شده با آغازگر و بدون آغازگر) بر ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی، بافتی و حسی ترشی فارچ دکمه‌ای بررسی شد. به این منظور از طرح فاکتوریل در قالب بلوک‌های کاملاً تصادفی استفاده شد. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. آزمون دانکن جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار Expert Design نسخه ۱۱ در سطح ۵ درصد انجام گرفت و نمودارها رسم گردید.

نتایج

pH و اسیدیته

آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد تلقیح باکتری *L. پلانتاروم*، زمان نگهداری و اثر متقابل آنها تاثیر معنی‌داری بر میزان pH و اسیدیته نمونه‌ها داشت ($p < 0.05$). در نمونه‌های حاوی باکتری میزان pH همواره در تمام روزهای آزمون کمتر از نمونه‌های فاقد باکتری (شکل ۱ A) و میزان اسیدیته بالاتر بود (شکل ۲ B). با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها از ۱ تا ۱۹ روز میزان pH کاهش پیدا کرد، طوری که میزان pH نمونه حاوی باکتری در روز اول برابر 4.1 ± 0.04 و در روز ۱۹ برابر 3.0 ± 0.01 بود (شکل ۱ A). با گذشت زمان میزان اسیدیته نمونه‌های حاوی باکتری از میزان تقریبی ۰/۲۷۷ درصد در روز اول تا میزان تقریبی ۰/۳۷۶ درصد در روز ۱۹م افزایش پیدا کرد.

در دمای 25°C و برای شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها از محیط کشت NA، روش کشت پور پلیت و انکوباسیون ۲۴ ساعت در دمای 37°C استفاده شد (۱۲).

آزمون رنگ

برای اندازه‌گیری رنگ نمونه‌ها شاخص‌های L^* ، a^* و b^* اندازه‌گیری شد. L^* میزان تیره و روشن بودن محصول را بیان می‌کند و در محدوده مقادیر صفر (تیره) تا ۱۰۰ (روشن) قرار دارد. محدوده a^* از عدد ۶۰- (سبز) تا ۶۰+ (قرمز) و b^* از ۶۰- (آبی) تا ۶۰+ (زرد) متغیر می‌باشد (۱۷). زاویه هیو^۱ شاخصی از رنگ ماده غذایی است که زاویه صفر و یا ۳۶۰ درجه، نشان‌دهنده رنگ قرمز و زاویه‌های ۹۰، ۱۸۰ و ۲۷۰ درجه به ترتیب بیانگر رنگ‌های زرد، سبز و آبی هستند. شاخص کروما^۲ بیانگر میزان اشباع‌شدگی یا شدت رنگ است که مقدار صفر بیانگر رنگ خنثی و مقدار ۶۰ بیانگر رنگ شدید می‌باشد (۱۸). زاویه هیو و شاخص کروما با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

$$\text{Hue angle} = \arctan (b^*/a^*)$$

$$\text{Chroma} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

آزمون بافت

از تست نفوذ^۳ برای ارزیابی بافت نمونه‌ها استفاده شد. آزمون بافت‌سنجی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه بافت‌سنج (مدل TA Plus XT، شرکت استیل میکروسیستم، انگلستان) در محل دانشگاه ارومیه انجام شد. پروب مورد استفاده استوانه‌ای با قطر ۲mm، عمق نفوذ ۵mm و سرعت پروب ۱mm/s بود. نیروی نفوذ با دقت ۰/۱N و جابه‌جایی پروب با دقت ۰/۰۰۱S ثبت گردید. با استفاده از نمودارهای نیرو- زمان، حداکثر نیروی لازم برای نفوذ بر حسب kgr محاسبه گردید (۱۷).

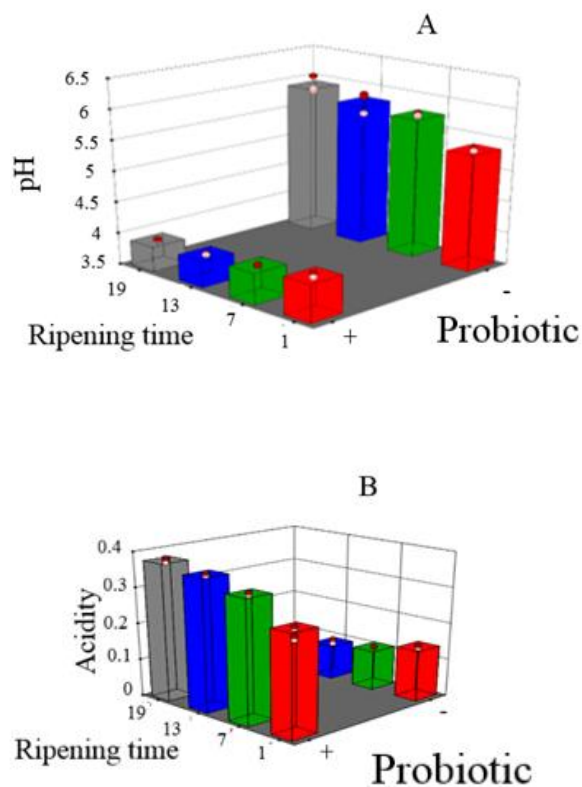
ارزیابی حسی

از آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای برای ارزیابی حسی نمونه‌ها استفاده شد. ویژگی‌های ظاهر، بافت، طعم و پذیرش کلی

³ Penetration

¹ Hue angel

² Chroma

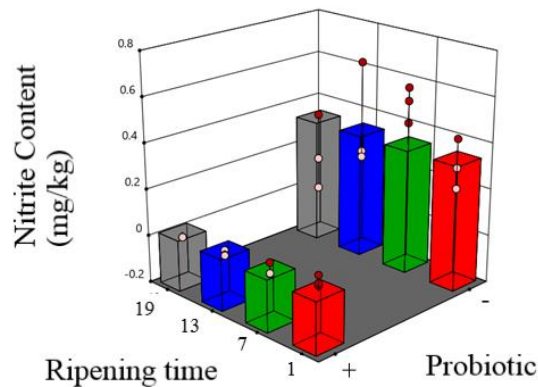


شکل ۱: تاثیر تلقیح *L. پلانتاروم* و زمان نگهداری بر A: pH و B: اسیدیته نمونه‌ها

میزان نیتريت

با توجه به نتایج آنالیز واریانس تلقیح باکتری *L. پلانتاروم* تاثیر معنی‌داری بر میزان نیتريت نمونه‌ها داشت ($p < 0.05$). میزان نیتريت نمونه تلقیح شده در روز اول برابر 0.06 ± 0.02 mg/Kg و میزان نیتريت در نمونه فاقد باکتری برابر 0.11 ± 0.03 mg/Kg بود (شکل ۲).

میزان pH نمونه‌های تلقیح نشده در اثر گذشت زمان از میزان $5.0 \pm 0.38/0.1$ در روز اول تا میزان 5.39 ± 0.13 در روز ۱۹م نگهداری افزایش پیدا کرد. همچنین در نمونه‌های تلقیح نشده با باکتری میزان اسیدیته از مقدار 0.14 در روز اول تا 0.08 در روز ۱۹م نگهداری کاهش پیدا کرد.

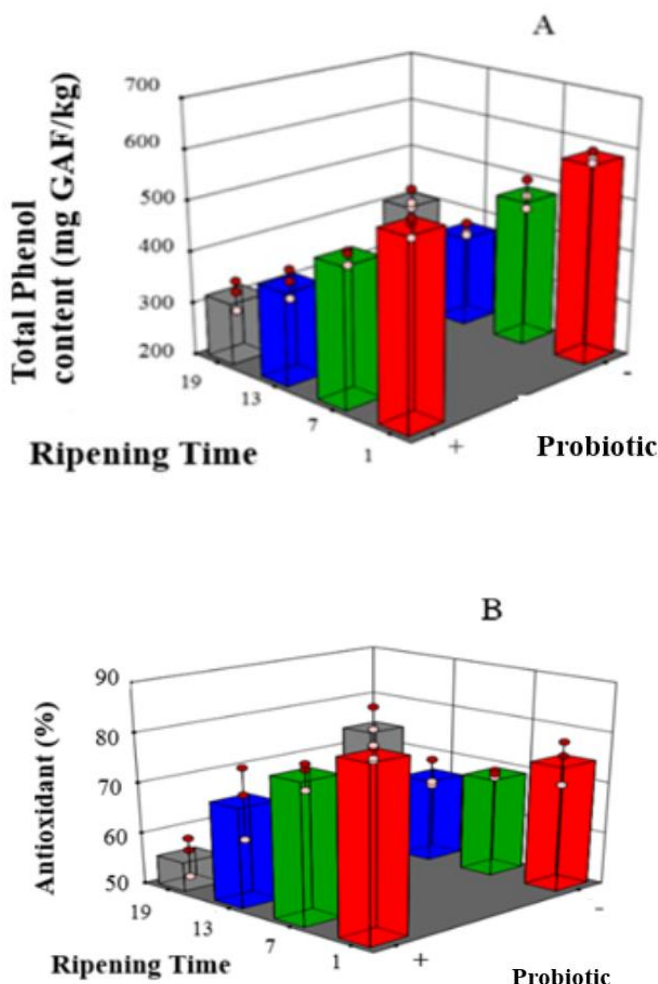


شکل ۲: تاثیر تلقیح *ل. پلانتاروم* و زمان نگهداری بر مقدار نیتريت نمونه‌ها

میزان فنول کل نمونه‌ها به طور پیوسته کاهش پیدا کرد و از میزان $558/18 \pm 9/07 \text{ mg GA/Kg}$ در روز اول به میزان $321/29 \pm 06/93 \text{ mg GA/Kg}$ در روز ۱۹ ام کاهش پیدا کرد (شکل ۳A). در نمونه تلقیح نشده با باکتری نیز میزان فنول نمونه از مقدار اولیه $588/11 \pm 18/57 \text{ mg GA/Kg}$ در روز اول تا مقدار $380/12 \pm 14/88 \text{ mg GA/Kg}$ در روز ۱۳ کاهش یافته و سپس به مقدار $411/20 \pm 47/38 \text{ mg GA/Kg}$ در روز ۱۹ افزایش یافت.

میزان فنول کل

طبق نتایج بدست آمده تلقیح باکتری *ل. پلانتاروم* تاثیر معناداری بر میزان فنول نمونه‌ها داشت ($p < 0/05$). غیر از روز ۱۳ ام، میزان فنول در نمونه فاقد باکتری بیشتر از نمونه تلقیح شده با باکتری بود (شکل ۳A). طبق نتایج به دست آمده زمان نگهداری نمونه‌ها تاثیر معناداری بر میزان فنول کل نمونه‌ها داشت ($p < 0/05$). در نمونه تلقیح شده با باکتری



شکل ۳: تاثیر تلقیح *L. پلانتاروم* و زمان نگهداری بر A: مقدار فنول و B: فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها

اولیه $74/87 \pm 4/33\%$ در روز اول تا میزان $66/7 \pm 2/94\%$ درصد در روز ۱۳ کاهش یافت و سپس تا میزان $74/51 \pm 4/13\%$ در روز ۱۹ افزایش یافت (شکل ۳ B).

اسیدهای آلی

غلظت اسیدهای آلی در روز ۱۹ نگهداری تعیین گردید و در جدول ۱ نشان داده شده است. مقدار اسید لاکتیک و اسید مالیک در نمونه‌های تلقیح شده بالاتر از نمونه‌های غیر تلقیحی بود در حالیکه غلظت اسید سیتریک و اسید استیک در نمونه‌ها غیر تلقیحی بالاتر بود.

خاصیت آنتی اکسیدانی

طبق نتایج به دست آمده تلقیح باکتری *L. پلانتاروم* در نمونه تاثیر معناداری بر خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها نداشت ($p < 0/05$). ولی زمان نگهداری نمونه‌ها بر خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها تاثیر معنی دار داشت ($p < 0/05$). در نگهداری از ۱ تا ۱۹ روز، میزان خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها از میزان اولیه $83/5 \pm 1/22\%$ به طور پیوسته به $55/4 \pm 83/06\%$ درصد کاهش پیدا کرد. همچنین در نمونه تلقیح نشده با باکتری خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه از میزان

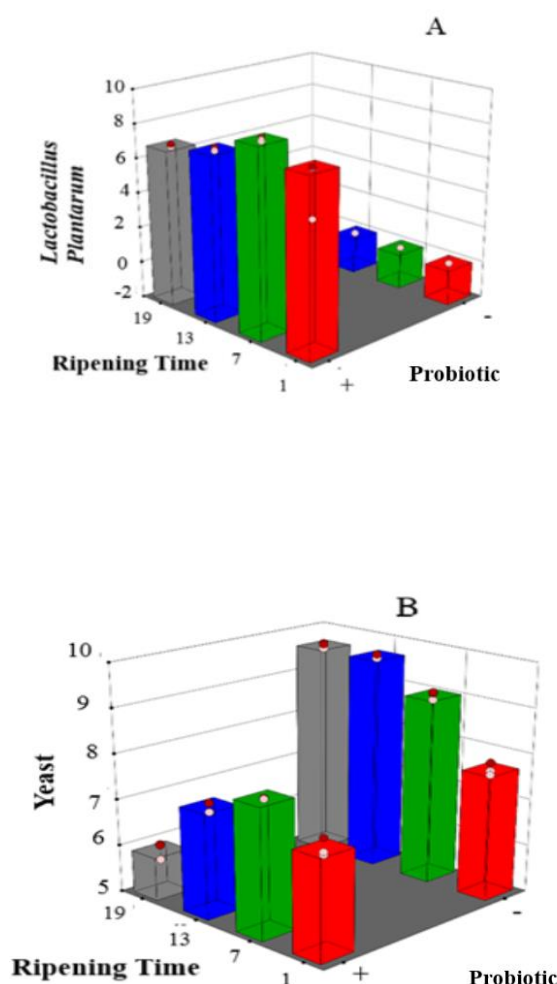
جدول ۱: اسیدهای آلی در دو نوع ترشی قارچ دکمه‌ای تلقیح شده با/ پلانتاروم و بدون تلقیح.

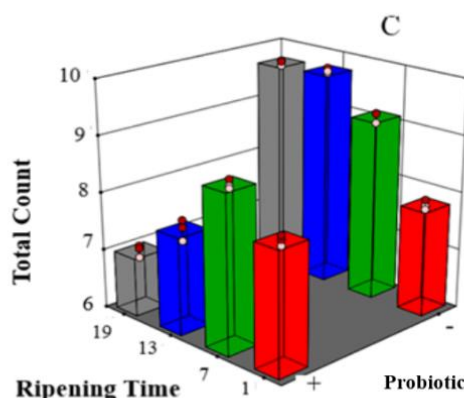
بدون تلقیح	تلقیح شده	
۱۵۹۶/۶۳	۹۱۳۰/۳۴	اسید لاکتیک
۵۴۸/۳۷	۳۹۰/۷۸	اسید سیتریک
۲۰۶۴۹/۲۵	۲۲۰۰/۷۶	اسید استیک
۳۰۲/۵۷	۵۹۹/۳۷	اسید مالیک

آزمون‌های میکروبی

با توجه به نتایج به دست آمده از شمارش میکروبی باکتری ل. پلانتاروم در نمونه تلقیح شده با باکتری، تعداد باکتری‌ها ابتدا از میزان اولیه $7.0 \pm 9.2/0.3 \text{ Log CFU/ml}$ در روز اول به ماکزیمم مقدار خود در روز ۷م یعنی میزان Log

$8.0 \pm 6.1/0.9 \text{ CFU/ml}$ افزایش و سپس در یک روند نزولی به ترتیب در روزهای ۱۳ و ۱۹ آنالیز به میزان Log $6.8 \pm 0.8/0.1$ و $7.0 \pm 3.8/0.9 \text{ CFU/ml}$ کاهش یافت (شکل ۴A). در هیچ یک از دو نوع نمونه تلقیحی و غیرتلقیحی تولید شده و در هیچ زمانی باکتری انتروباکتریاسه رشد نکرد.





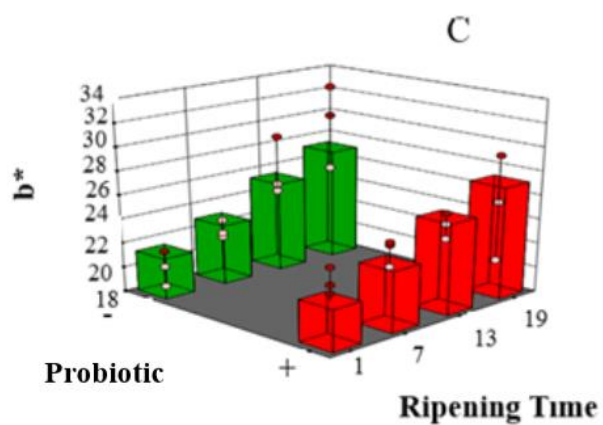
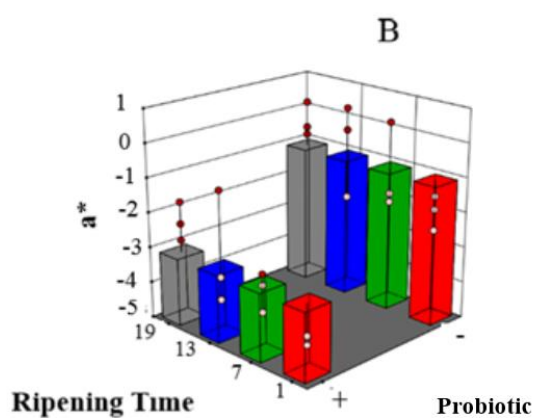
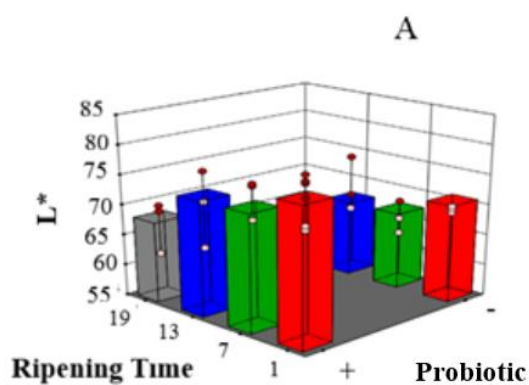
شکل ۴: تعداد A: ل. پلانتاروم، B: مخمر و C: شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌ها طی زمان نگهداری

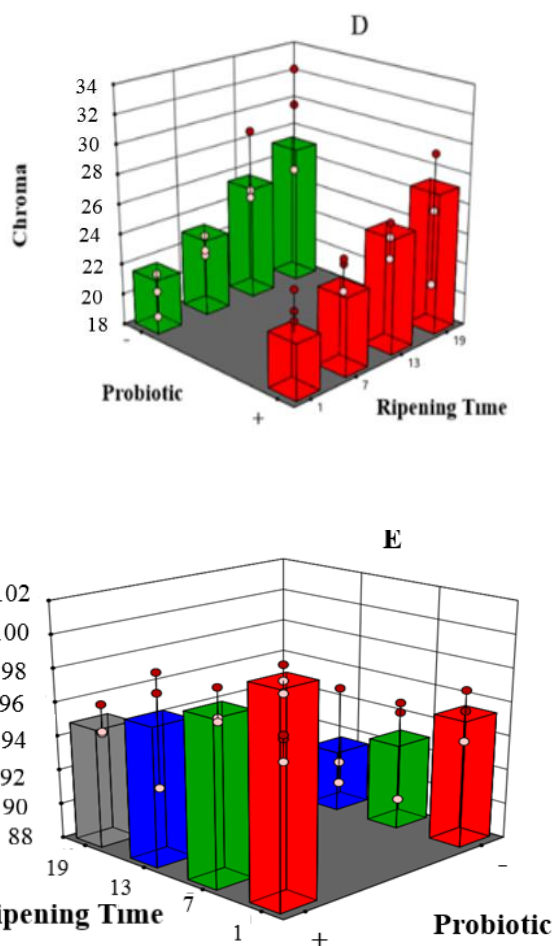
روز ۱۳ رسید و سپس در روز ۱۹ام نگهداری به میزان Log CFU/ml 9.0 ± 0.69 کاهش یافت (شکل ۴C). نتایج آزمون میکروبی نشان داد در هیچ یک از دو نوع نمونه تلقیحی و غیرتلقیحی باکتری انتروباکتریاسه مشاهده نشد.

ارزیابی رنگ

طبق نتایج آنالیز واریانس، تلقیح باکتری ل. پلانتاروم و زمان نگهداری تاثیر معناداری بر میزان روشنایی نمونه‌ها داشتند ($p < 0.05$). طوری که نمونه‌های حاوی باکتری ل. پلانتاروم در تمام زمان‌های ارزیابی شده روشنایی بیشتری نسبت به نمونه‌های فاقد باکتری داشتند (شکل ۴A). زمان نگهداری نمونه‌ها تاثیر معناداری بر میزان روشنایی نمونه‌ها داشتند؛ طوری که در نمونه‌های حاوی باکتری با گذشت زمان نگهداری از ۱ تا ۱۹ روز میزان روشنایی نمونه‌ها از میزان 7.33 ± 0.79 به میزان 4.42 ± 0.67 کاهش یافت. همچنین میزان روشنایی در نمونه‌های فاقد باکتری بطور پیوسته از میزان 5.1 ± 0.69 در روز اول به میزان تقریبی 1.6 ± 0.63 کاهش یافت.

با توجه به نتایج حاصل از شمارش مخمرها در نمونه‌های تلقیح شده با باکتری ل. پلانتاروم تعداد مخمرها در ابتدا از میزان 7.17 ± 0.18 Log CFU/ml در روز اول به میزان حداکثر خود یعنی 7.81 ± 0.01 Log CFU/ml در روز هفتم رسید و سپس طبق یک روند کاهشی به میزان 5.94 ± 0.19 Log CFU/ml در روز ۱۹ام رسید (شکل ۴B). در نمونه‌های تلقیح نشده با باکتری، تعداد مخمرها از میزان 7.73 ± 0.13 Log CFU/ml در روز اول به مقدار 9.64 ± 0.05 Log CFU/ml در روز ۱۳ رسید و سپس تقریباً ثابت ماند (شکل ۴B). طبق نتایج آنالیز داده‌ها در نمونه‌های تلقیح شده با باکتری ل. پلانتاروم، تعداد کلی میکروب‌ها از میزان اولیه 8.12 ± 0.08 Log CFU/ml در روز اول ابتدا افزایش پیدا کرده و به میزان 8.73 ± 0.07 Log CFU/ml در روز ۷ام رسید و سپس طی یک روند کاهشی به میزان 7.02 ± 0.11 Log CFU/ml در روز ۱۹ام نگهداری رسید (شکل ۴C). همچنین در نمونه‌های تلقیح نشده با باکتری ل. پلانتاروم تعداد کلی میکروب‌ها از میزان 7.08 ± 0.83 Log CFU/ml در روز اول افزایش یافته و به میزان 8.04 ± 0.74 Log CFU/ml در





شکل ۵: تاثیر تلقیح ل. پلانتروم و زمان نگهداری بر A: a^* , B: L^* , C: b^* , D: کروما و E: زاویه هیو نمونه‌ها

به طور پیوسته از میزان اولیه $19/1 \pm 98/51$ در روز اول نگهداری تا میزان $29/45 \pm 3/63$ در روز ۱۹ام نگهداری افزایش یافت (شکل C۵). با توجه به شکل D۵ تلقیح و یا عدم تلقیح نمونه‌ها با باکتری ل. پلانتروم تاثیر معناداری بر میزان کرومای نمونه‌ها نداشت ($p > 0/05$). ولی زمان نگهداری نمونه‌ها بر میزان کرومای نمونه‌ها تاثیر معنی‌دار داشت ($p < 0/05$). با افزایش زمان نگهداری در نمونه‌های تلقیح شده، میزان کروما از مقدار اولیه $23/23 \pm 1/01$ در روز اول تا $25/37 \pm 4/41$ در روز ۱۹ام افزایش پیدا کرد. همچنین در نمونه‌های تلقیح نشده میزان کروما به طور پیوسته از مقدار $20/08 \pm 1/5$ در روز اول تا $29/45 \pm 3/63$ در روز ۱۹ام افزایش پیدا کرد. که این مساله بیانگر این است که شدت رنگ با گذشت زمان افزایش پیدا می‌کند. طبق نتایج آنالیز واریانس، باکتری ل. پلانتروم و زمان نگهداری نمونه‌ها هر دو

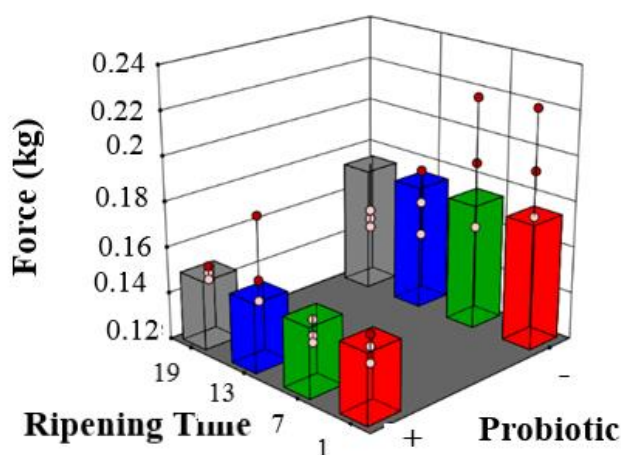
با توجه به شکل (B ۵) حضور باکتری ل. پلانتروم بر میزان a^* تاثیر معنی‌دار داشت ($p < 0/05$). ولی مدت زمان نگهداری نمونه بر میزان a^* تاثیر معنی‌دار نداشت ($p > 0/05$). حضور باکتری ل. پلانتروم باعث کاهش میزان a^* در نمونه‌ها شد؛ بطوری که نمونه حاوی باکتری دارای میزان a^* برابر $3/1 \pm 0/5/0/5$ در تمام روزهای آزمون و نمونه‌ی فاقد باکتری دارای a^* برابر $1 \pm 1/06$ بود. تلقیح یا عدم تلقیح باکتری بر میزان b^* نمونه‌ها اثر معنی‌دار نداشت ($p > 0/05$). ولی زمان نگهداری نمونه‌ها بر میزان b^* نمونه‌ها تاثیر معنی‌دار داشت ($p < 0/05$). با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها از ۱ تا ۱۹ روز در نمونه‌های تلقیح شده، به طور پیوسته میزان b^* از میزان اولیه $22/87 \pm 1/05$ در روز اول تا $25/4 \pm 27/4$ در روز ۱۹ام افزایش یافت. همچنین در نمونه‌های فاقد باکتری نیز میزان b^*

روز اول آنالیز برابر $95/48 \pm 1/52$ بود که به تدریج کاهش یافته و به میزان $90/6 \pm 0/97$ در روز ۱۹م رسید (شکل ۵ E).

ارزیابی بافت

نتایج آزمون بافت‌سنجی، نشان داد زمان نگهداری نمونه‌ها تاثیر معناداری بر بافت نمونه‌ها نداشت ($p > 0/05$). ولی افزودن باکتری بر بافت نمونه‌ها تاثیر معنی‌دار داشت ($p < 0/05$). طوری که نمونه‌های فاقد باکتری تقریباً در تمام روزهای آنالیز سفتی^۱ بافت بیشتری نسبت به نمونه‌های حاوی باکتری داشتند (شکل ۶).

تاثیر معناداری بر میزان زاویه هیو داشتند ($p < 0/05$). نتایج نشان داد تلقیح نمونه‌ها با باکتری باعث افزایش زاویه هیو نمونه‌ها شد (شکل ۵ E). زاویه هیو در نمونه تلقیح نشده در روز اول برابر $95/48 \pm 1/52$ و در نمونه حاوی باکتری برابر $100/0 \pm 1/75$ بود که این اختلاف در تمام روزهای آنالیز بین این دو نمونه برقرار بود. با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها میزان زاویه هیو کاهش پیدا کرد. در نمونه تلقیح شده با باکتری زاویه هیو در روز اول برابر $100/1 \pm 0/75$ بود که به طور پیوسته کاهش یافته و به میزان $94/95 \pm 0/96$ در روز ۱۹م رسید. همچنین در نمونه فاقد باکتری میزان زاویه هیو در



شکل ۶: تاثیر تلقیح ل. پلانتاروم و زمان نگهداری بر سفتی نمونه‌ها

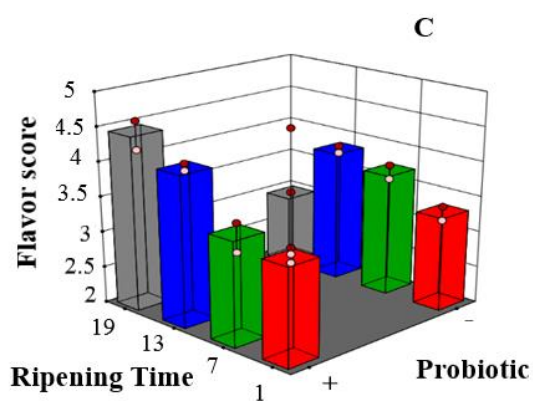
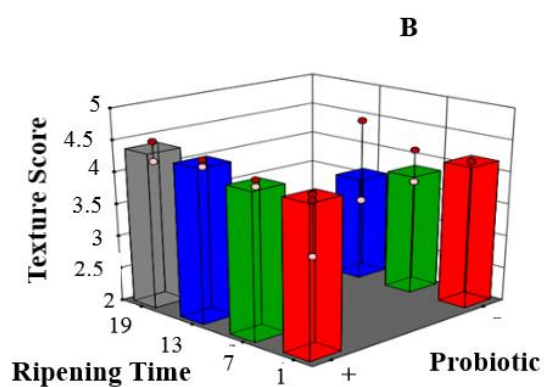
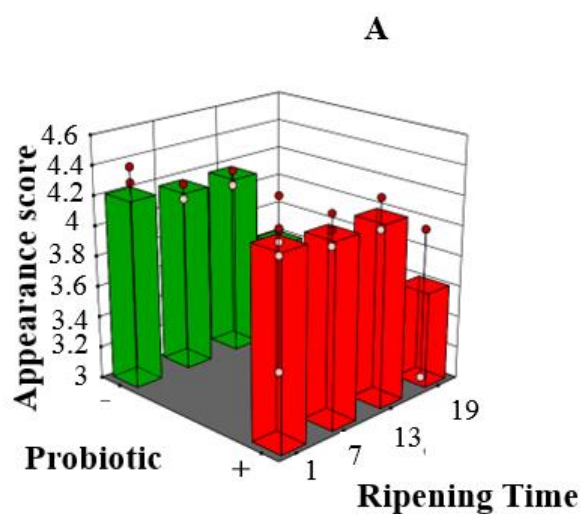
در روز اول با $4/4 \pm 0/06$ و کمترین امتیاز مربوط به روز ۱۹ نگهداری با $3/6 \pm 0/1$ به دست آمد (شکل ۷ A). تلقیح باکتری ل. پلانتاروم و زمان نگهداری هر دو تاثیر معناداری بر امتیاز نمونه‌ها از لحاظ بافت داشتند ($p < 0/05$). به طور کلی نمونه‌های تلقیح شده با باکتری میزان امتیاز بیشتری از لحاظ بافت نسبت به نمونه‌های تلقیح نشده داشتند. در ارزیابی بافت نمونه‌های تلقیح شده بافت نرم‌تری داشتند (شکل ۶). در نمونه‌های حاوی باکتری حداقل امتیاز بافت در روز ۷م $4/4 \pm 0/17$ و حداکثر امتیاز در روز ۱۹ برابر $4/4 \pm 0/17$ به دست آمد. همچنین در نمونه‌های فاقد باکتری میزان امتیاز

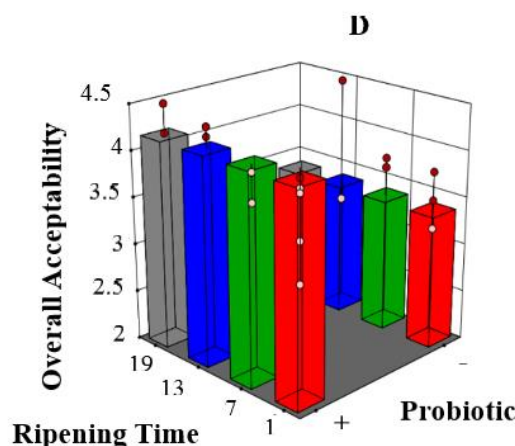
ارزیابی حسی

نتایج ارزیابی حسی نشان داد که تلقیح باکتری ل. پلانتاروم تاثیر معناداری بر روی رنگ و ظاهر نمونه‌ها در هیچ یک از روزهای ارزیابی نداشتند ($p > 0/05$). ولی زمان نگهداری، تاثیر معناداری بر این ویژگی داشت ($p < 0/05$). با گذشت زمان امتیاز ویژگی ظاهر کاهش یافت و در نمونه‌های تلقیح شده با باکتری، از امتیاز $4/2 \pm 0/11$ در روز ۱۳ به کمترین امتیاز در روز ۱۹ با $3/7 \pm 0/57$ امتیاز به رسید. همین روند در مورد نمونه‌های فاقد باکتری نیز وجود داشت و حداکثر امتیاز

¹ Firmness

نمونه‌ها از لحاظ بافت با گذشت زمان کاهش یافت به طوری که حداکثر مقدار در روز ۱ با امتیاز ۴/۲ و حداقل آن در روز ۱۹ با امتیاز 2.7 ± 0.61 به دست آمد (شکل ۷ ب).





شکل ۷: تاثیر تلقیح *L. پلانتاروم* و زمان نگهداری بر امتیازات A: ظاهر، B: بافت، C: طعم و D: پذیرش کلی نمونه‌ها

سلامی و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت. آن‌ها تخمیر زیتون سبز را با تیمارهای مختلف باکتری *L. پلانتاروم* مورد بررسی قرار دادند (۲۰). نمونه‌ی غیرتلقیحی حاوی اسید استیک همواره pH بیشتری نسبت به نمونه تلقیحی با *L. پلانتاروم* در طی آنالیز ۱۰۰ روزه داشت. افزایش میزان اسید تولیدی حاصل از فعالیت باکتری‌های اسید لاکتیک با گذشت زمان باعث کاهش pH طی نگهداری می‌باشد (۱۹). کاهش اسیدیته در نمونه‌های بدون آغازگر طی نگهداری احتمالاً می‌تواند به سبب رشد مخمرها و در نتیجه افزایش pH ناشی از تولید متابولیت‌های حاصل از فعالیت مخمرها باشد (۹). لیئل سانچز^۱ و همکاران (۲۰۰۳) از *L. پلانتاروم* برای تخمیر زیتون سبز استفاده کردند. نتایج نشان داد در بازه ۶۰ روزه اسیدیته نمونه‌های تلقیح شده با غلظت‌های مختلف باکتری بیشتر از نمونه شاهد بود (۲۱). همچنین مون^۲ و همکاران (۲۰۱۸) اثر سه نوع باکتری اسید لاکتیک را در تخمیر کلم برگ مورد بررسی قرار دادند. مطابق نتایج آنها با گذشت زمان نگهداری در هر سه نوع نمونه تلقیح شده میزان اسیدیته همواره افزایش پیدا کرد که مطابق با نتایج این تحقیق است (۲۲). باکتری‌های اسید لاکتیک بویژه جنس *لاکتوباسیلوس* بطور موثری مقدار نیتريت را کاهش می‌دهند (۲۳). باکتری‌های

تلقیح نمونه‌ها با باکتری *L. پلانتاروم* تاثیر معناداری بر پذیرش نمونه‌ها از لحاظ طعم داشت ($p < 0.05$). نمونه‌های تلقیح شده با باکتری امتیاز طعم بالاتری نسبت به نمونه‌های فاقد باکتری داشتند و با گذشت زمان امتیاز این ویژگی افزایش یافت و در روز ۱۹ نگهداری به حداکثر مقدار خود یعنی 4.4 ± 0.23 رسید (شکل ۷ C). طبق نتایج به دست آمده تلقیح باکتری *L. پلانتاروم* تاثیر معناداری بر پذیرش کلی نمونه‌ها داشت ($p < 0.05$). ولی زمان نگهداری تاثیر معناداری بر پذیرش کلی نمونه‌ها نداشت ($p > 0.05$). به طور کلی نمونه‌های تلقیح شده با باکتری *L. پلانتاروم* در تمام روزهای ارزیابی شده پذیرش کلی بیشتری نسبت به نمونه‌های فاقد باکتری داشتند (شکل ۷ D). بیشترین امتیاز پذیرش کلی، مربوط به نمونه حاوی باکتری در روز ۱۹ام نگهداری با امتیاز 4.0 ± 0.17 بود.

بحث و نتیجه گیری

از آنجاییکه باکتری *L. پلانتاروم*، تولید کننده اسید لاکتیک می‌باشد بدیهی است که میزان pH نمونه را بیشتر از نمونه فاقد این نوع باکتری که فقط در آن تخمیر خود به خودی رخ داده، کاهش می‌دهد (۲۰). نتایج به دست آمده با نتایج

² Moon

¹ Leal-Sánchez

اسید لاکتیک از طریق احیا آنزیمی باعث کاهش نیتريت می شوند. آنزيم نيتريت ردوكتاز^۱ موجود در باكتري *L. پلانتاروم* باعث احيا نيتريت به آمونياك می شود (۲۴). محمد حسنی و همكاران (۲۰۱۱) اثر *لوكونوستوك مزنتروئیدیس* و *L. پلانتاروم* را بر کاهش نيتريت طی دوره تخمير در کلم تخمیری (کلم شور) بررسی کردند. نتايج آنها نشان داد میانگين نيتريت باقیمانده در کلم شور تلقیح شده با *L. پلانتاروم* و *لوكونوستوك مزنتروئیدیس* به ترتیب به میزان ۶۷/۷٪ و ۶۸/۹٪ درصد کاهش یافته در حالی که در تیمار شاهد به میزان ۵۱/۹٪ کاهش داشته است (۲۵).

باكتري های *L. پلانتاروم* با تجزیه برخی ترکیبات فنولی به ترکیباتی که باعث بهبود در طعم و آرومای محصول می شوند، باعث کاهش در محتوای فنولی نمونه می شوند (۲۶). مارزیلو^۲ و همكاران (۱۹۹۶) از باكتري *L. پلانتاروم* برای تخمير زيتون استفاده کردند. نتايج آنها نشان داد باكتري *L. پلانتاروم* با هیدرولیز *اولئوروپین* به عنوان اصلی ترین گلوکوزیداز میوه زيتون باعث کاهش محتوای فنولی زيتون تخمیری توسط باكتري *L. پلانتاروم* شد (۲۷). جابلونسکا-ریس^۳ و همكاران (۲۰۱۶) نیز نتايج مشابهی در مورد تلقیح باكتري *L. پلانتاروم* در قارچ دکمه ای گزارش کردند (۷). کاهش تدریجی در میزان فنول نمونه ها طی نگهداری، می تواند به سبب فعالیت آنزيم های هیدرولیز کننده داخل سلولی یا آنزيم های تولید شده توسط باكتري های مسئول تخمير باشد (۲۸). همچنین این کاهش می تواند در اثر تاثیر آنزيم پلی فنول اکسیداز بر ترکیبات فنولی قارچ باشد (۲۹). نتايج نشان داد روند تغییرات خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه ها دقیقاً مشابه روند تغییرات محتوای فنول کل نمونه ها می باشد. نتايج به دست آمده با نتايج جابلونسکا-ریس و همكاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت. در پژوهش آنها نیز ارتباط مستقیمی بین خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه ها و محتوای فنول نمونه ها وجود داشت.

اسید لاکتیک توسط باكتري *L. پلانتاروم* نسبت به تخمير خود به خودی توسط باكتري های اسید لاکتیک در نمونه تلقیح

نشده با باكتري بیشتر است. به همین سبب غلظت اسید لاکتیک در نمونه های تلقیح شده بالاتر بود. سیتريک اسید از اصلی ترین اسیدهای آلی است که توسط باكتري های اسید لاکتیک متابولیزه شده و تبدیل به اسید لاکتیک و ترکیبات طعم دهنده مانند دی استیل، استوئین، بوتان دی ال و استالدهید می شود (۳۰). میرمحمدی و همكاران (۲۰۲۱) نشان دادند که باكتري *L. پلانتاروم* می تواند اسید سیتريک را بعنوان منبع کربن متابولیزه نماید و ترکیبات آروماتیک ۴ کربنه احتمالاً محصول نهایی این متابولیسم هستند (۳۱). بنابراین در نمونه تلقیح شده با باكتري، میزان اسید سیتريک به دلیل متابولیزه شدن توسط باكتري های اسید لاکتیک کمتر از میزان اسید سیتريک در نمونه فاقد باكتري بود. غلظت اسید استیک با میزان pH نمونه ها در ارتباط است و هر قدر میزان pH بالاتر باشد امکان تولید استیک اسید بیشتر می شود (۳۲). اسید استیک همچنین ممکن است از اسید سیتريک تولید شود (۳۳). بنابراین اسید غالب در نمونه های تلقیح شده اسید لاکتیک و در نمونه های بدون تلقیح اسید استیک بود. اسیدهای آلی نقش مهمی را در محصولات تخمير لاکتیکی ایفا می کنند، بطوریکه تعیین کننده پایداری محصول نهایی هستند. خصوصیات ضد باکتریایی و ضد قارچی آنها مانع از رشد میکروفلور نامطلوب در محصول نهایی می شود (۳۴). جابلونسکا-ریس و همكاران (۲۰۲۲) گزارش کردند اسید لاکتیک اسید عمده در تخمير لاکتیکی توسط *L. پلانتاروم* بوده و این باكتري هگزوزها را از مسیر امبدن-میرهوف متابولیزه می کند (۱۹).

دلیل افزایش شدید تعداد باكتري های *L. پلانتاروم* در ابتدا احتمالاً به دلیل محیط بی هوازی به وجود آمده در اثر مصرف تدریجی اکسیژن توسط باكتري های هوازی موجود در ظرف نمونه ها بود که شرایط بهتری برای رشد باكتري *L. پلانتاروم* به وجود آورد. با گذشت زمان و افزایش تدریجی غلظت اسیدهای آلی در محیط و کاهش مواد مغذی شرایط نامطلوبی برای رشد باكتري های *L. پلانتاروم* به وجود آمد و باعث کاهش تعداد باكتري ها شد (۱۴). جابلونسکا-ریس و

³ Jabłońska-Ryś

¹Nitrite reductase

² Marsilio

همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک *ل. پلاتناروم* در قارچ تخمیری ابتدا افزایش و سپس به تدریج کاهش یافت (۱۹). لیو و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند جمعیت باکتری‌های *لاکتیک اسید* در سه نوع قارچ تخمیر شده به سرعت طی ۳ روز اول تا حدود $\log$ ۸/۵ CFU/ml افزایش یافت و سپس تا $\log$ ۷/۵ CFU/ml در روز ۱۸ کاهش یافت (۱۴). کاهش باکتری‌های *لاکتیک اسید* بعثت اثر بازدارندگی pH پایین، غلظت بالای اسیدهای آلی و کاهش مقدار کربوهیدرات‌های در دسترس است. نتایج نشان داد که مخمرها همراه با باکتری‌های *ل. پلاتناروم* در محصول حضور داشته و روند رشدی مشابه آن‌ها داشتند ولی در تمام روزهای بررسی شده تعداد کمتری نسبت به باکتری‌های *اسید لاکتیک* داشتند. کوسوما و درماسیوی (۲۰۲۵) نیز روند مشابهی را برای جمعیت مخمرها در تخمیر قارچ شیمجی^۲ توسط *ل. بولگاریکوس* گزارش کردند (۱۲). شرایط اسیدی تخمیر برای رشد مخمرها مناسب است (۳۵). در مراحل اولیه تخمیر، وجود مواد مغذی و کربوهیدرات‌ها می‌تواند رشد مخمرها را تقویت نماید. کاهش جمعیت مخمرها در انتهای تخمیر بعثت شرایط شدید اسیدی، تجمع اسیدهای آلی و فعالیت ضد قارچی باکتری‌های *لاکتیک اسید* است (۳۶). لیو و همکاران (۲۰۱۶) از سه نوع باکتری *لاکتوباسیلوس* برای تخمیر قارچ صدفی استفاده کردند و نتایج به دست آمده نشان داد در هر سه نوع باکتری روند رشد مخمرها تقریباً یکسان بوده و تعداد مخمرها ابتدا افزایش یافته و سپس با یک روند نزولی تقریباً ثابت کاهش یافته است (۱۴). دلیل محتمل بر افزایش تعداد مخمرها در نمونه‌های بدون آغازگر، می‌تواند به این سبب باشد که عدم وجود باکتری‌های *اسید لاکتیک* به میزان کافی در این نمونه‌ها، بالاتر بودن pH و کم بودن اسیدیته سبب شده تا مخمرها، که عامل اصلی فساد در محصولات تخمیری هستند، بتوانند به سرعت افزایش پیدا کنند و فلور میکروبی غالب محصول شوند. نتایج به دست آمده در مورد شمارش کلی

میکروارگانیزم‌ها با نتایج آلان و یلدیز (۲۰۲۱) مطابقت داشت. آن‌ها از پنج گونه باکتری *لاکتوباسیلوس* برای تخمیر ترشی کلم استفاده کردند. نتایج نشان داد در تمام نمونه‌های تلقیح شده با باکتری روند تغییرات میکروبی تقریباً شبیه هم بوده و تعداد کل باکتری‌های مزوفیل از مقدار اولیه $\log$ ۶/۵ CFU/ml افزایش یافته و بعد از ۱۵ روز به مقدار ماکزیمم خود در حدود $\log$ ۷-۷/۵ CFU/ml رسیده و بعد از آن تا روز ۳۰ام نگهداری کاهش یافته است (۳۷). کاهش سریع pH، تولید اسیدهای آلی و ترکیبات ضد میکروبی از جمله باکتریوسین‌ها مانع از رشد آنتروباکتریاسه‌ها می‌شوند. آنتروباکتریاسه‌ها نمی‌توانند شرایط اسیدی را تحمل کنند (۱۲) و این به افزایش زمان ماندگاری محصول کمک می‌کند؛ زیرا باکتری آنتروباکتریاسه جزو باکتری‌های عامل فساد محسوب می‌شود.

هیدروژن پراکسید یک فرآورده ضد میکروبی است که در اثر فعالیت و متابولیسم باکتری‌های *اسید لاکتیک* تولید می‌شود (۳۸). پراکسید هیدروژن تولید شده از متابولیسم *ل. پلاتناروم* با جلوگیری از رشد عوامل باکتریایی و در نتیجه حفظ استحکام دیواره و غشاء سلولی از قهوه‌ای شدن قارچ جلوگیری می‌کند، همچنین هیدروژن پراکسید با داشتن خاصیت سفیدکنندگی و همچنین با تاثیر مستقیم بر آنزیم‌های گروه پلی فنول اکسیداز و غیرفعال کردن آن‌ها از تیره شدن محصول جلوگیری می‌کند (۳۹). کاهش میزان روشنایی نمونه‌ها طی نگهداری می‌تواند با قهوه‌ای شدن آنزیمی و غیرآنزیمی نمونه‌ها مرتبط باشد (۱۴). باکتری *ل. پلاتناروم* احتمالاً می‌تواند به دلیل کاهش میزان قهوه‌ای شدن نمونه‌ها باعث کاهش a^* باشد. جابلونسکا-ریس و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند عمل تخمیر توسط *ل. پلاتناروم* باعث افزایش شاخص L^* ، کاهش a^* و افزایش b^* در قارچ‌های سفید شده است و طی نگهداری در دمای یخچال، شاخص‌های رنگ تغییر نکرده‌اند (۱۹). در حالیکه لیو و همکاران (۲۰۱۶) نتایج مغایری گزارش کردند. آن‌ها نشان دادند که شاخص b^* در

³ Alan and Yildiz

¹ Kusuma and Darmaswi

² shimeji

قارچ پلئوروتوس^۱ افزایش یافته ولی شاخص‌های a^* و L^* کاهش یافته اند و دلیل این امر را واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی و غیر آنزیمی بیان کرده اند (۱۴).

سفتی بصورت نیروی لازم برای نفوذ در بافت نمونه تعریف می شود و به فشار تورژانس سلولی، اندازه سلول، مقاومت دیواره سلولی و چسبندگی بین سلولی مربوط می شود (۴۰). جابلونسکا-ریس و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که تخمیر لاکتیکی با استفاده از آغازگر *L. پلانتاروم* باعث کاهش سفتی قارچ شده ولی طی نگهداری در یخچال این پارامتر تغییر نکرده است. آنها دلیل نرم شدن بافت را به فعالیت آنزیمی نسبت داده اند (۱۹). در تحقیق حاضر نیز نمونه‌های تلقیح شده بافت نرم تری نسبت به نمونه‌های فاقد آغاز گر داشتند که احتمالاً به دلیل فعالیت آنزیمی با منشا میکروبی می باشد.

تمام ویژگی‌های حسی مورد مطالعه در نمونه‌های قارچ تلقیح شده با باکتری *L. پلانتاروم* بالاتر بود. که به علت تولید متابولیت‌های میکروبی و ایجاد عطر و طعم بهتر توسط باکتری‌های *L. پلانتاروم* است. باگذشت زمان نگهداری امتیاز ظاهر نمونه‌ها کاهش یافت که در ارزیابی رنگ نیز با گذشت زمان میزان روشنایی (L^*) نمونه‌ها کاهش یافته بود. کوسوما

و درماسیوی (۲۰۲۵) نیز نشان دادند تخمیر قارچ شیمجی با *L. بولگاریکوس* باعث بهبود ویژگی‌های حسی می شود (۱۲). جابلونسکا-ریس و همکاران (۲۰۱۶) نیز نتایج مشابهی را برای ویژگی‌های حسی قارچ سفید دکمه‌ای تخمیر شده با *L. پلانتاروم* گزارش کردند (۷).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد تلقیح باکتری آغازگر *L. پلانتاروم*، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، بافتی و حسی ترشی قارچ سفید دکمه‌ای را تحت تاثیر قرار داده است بطوریکه تلقیح باکتری باعث کاهش pH و در نتیجه جلوگیری از فساد محصول توسط مخمرها و آنتروباکتریاسه‌ها شد. در نمونه‌های تلقیح شده شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و مخمرها بعد از ۱۹ روز نگهداری بطور قابل ملاحظه ای کاهش یافت. تلقیح آغازگر باعث کاهش میزان نیتريت شد و نمونه‌های تلقیح شده روشن تر و نرم تر بودند. امتیازات ویژگی‌های حسی نمونه‌های تلقیح شده بالاتر بود. می توان گفت تلقیح باکتری *L. پلانتاروم* با جلوگیری از رشد فلور نامطلوب و بهبود خصوصیات حسی باعث بهبود ماندگاری محصول گردید.

¹ Pleurotus

منابع

- Kumar K, Mehra R, Guiné RPF, Lima MJ, Kumar N, Kaushik R, Ahmed N, Yadav AN, Kumar H. Edible Mushrooms: A Comprehensive Review on Bioactive Compounds with Health Benefits and Processing Aspects. *Foods*. 2021; 10(12):2996.
- Podkowa A, Kryczyk-Poprawa A, Opoka W, Muszyńska B. Culinary–medicinal mushrooms: a review of organic compounds and bioelements with antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 2021. 247, 513–533.
- Pathak I, Saxena M, Pandey S. A review on *Ganoderma lucidum*: an important medicinal mushroom. *International Journal on Biological Sciences*. 2022;1.
- Xu J, Shen R, Jiao Z, Chen W, Peng D, Wang L, Yu N, Peng C, Cai B, Song H, Chen F. Current advancements in antitumor properties and mechanisms of medicinal components in edible mushrooms. *Nutrients*. 2022 Jun 24;14(13):2622.
- NIE Y, LI W, AL-MAQTARI QA, Ana H, Li B. Isolation, identification, and fermentation characteristics of endogenous lactic acid bacteria derived from edible mushrooms. *Food Science and Technology*. 2023. Vol. 43.
- Bartkiene E, Zarovaite P, Starkute V, Mockus E, Zokaityte E, Zokaityte G, Rocha J M, Ruibys R, Klupsaite D. Changes in Lacto-Fermented *Agaricus bisporus* (White and Brown Varieties) Mushroom Characteristics, including Biogenic Amine and Volatile Compound Formation. *Foods*. 2023 12(13), 2441.
- Jabłońska-Ryś E, Sławińska A, Radzki W, Gustaw W. Evaluation of the potential use of probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v in lactic fermentation of button mushroom fruiting bodies. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*. 2016. 15, 399–407.
- Zhang K, Pu YY, Sun DW. Recent advances in quality preservation of postharvest mushrooms (*Agaricus bisporus*): A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2018 Aug 1; 78: 72-82.
- Jabłońska-Ryś E, Skrzypczak K, Sławińska A, Radzki W, Gustaw W. Lactic acid fermentation of edible mushrooms: Tradition, technology, current state of research: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019. 18(3), 655-669.
- Mathur H, Beresford TP, Cotter PD. Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients*. 2020. 12, 1679.
- Chen Z, Fang X, Wu W, Chen H, Han Y, Yang H, Gao H. Effects of Fermentation with *Lactiplantibacillus Plantarum* GDM1. 191 on the Umami Compounds in Shiitake Mushrooms (*Lentinus edodes*). *Food Chemistry*. 2021, 364, 130398.
- Kusuma W, A, Darmasiwi S. microbiological and chemical profiling of lacto- fermented shimej mushroom (*Hypsizygus* sp.) pickle juice using *Lactobacillus bulgaricus* as a starter culture. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2025.14(6), e11136.
- Rakhshankhah M, Zeyna F, Amiri S. Investigation of the possibility of button mushroom fermentation by *Lactobacillus plantarum* to extend the shelf life and characterization of final product. 2022. A thesis submitted to the Graduate Studies Office in partial fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science in Food Science and Technology, Urmia University.
- Liu Y, Xie X, Ibrahim SA, Khaskheli SG, Yang H, Wang Y, Huang W. Characterization of *Lactobacillus Pentosus* as a Starter Culture for the Fermentation of Edible Oyster Mushrooms (*Pleurotus* spp.). *LWT-Food Science and Technology*. 2016. 68, 21–26.
- Olfati J, Ramezani E, Razavipoor T. The Effect of Different Treatments on Storage life and Postharvest Quality of Button Mushroom (*Agaricus bisporus*). *Journal of Crop Production and Processing*. 2017. 7 (4) :135-147.
- Bari LR, Ghanbari A, Darvishzadeh R, Giglou MT, Baneh HD. Discernment of grape rootstocks base on their response to salt stress using selected characteristics in combination with chemometric tools. *Food chemistry*. 2021. 365, 130408.
- Najabi F, Rezazad Bari M, Almasi H, Amiri S. The effect of edible fox gum coating containing *Lactobacillus fermentum* bacteria on the quality characteristics of button mushroom. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*. 2024. 151, 21, 86- 108.
- Ghorbani A, Maghsoudloo Y, Aalami M, Ghorbani M, Sadeghi AR. Effect of cress seeds mucilage on shelf life of Button Mushroom. *Innovative Food Technologies*. 2016. 3(4), 89-96.
- Jabłońska-Ryś E, Sławińska A, Skrzypczak K, Goral K. Dynamics of Changes in pH and the Contents of Free Sugars, Organic Acids and LAB in Button Mushrooms during Controlled Lactic Fermentation. *Foods*. 2022. 11(11):1553.
- Salami F, Rashedi M, Mahdian Naser M. Use of *Lactobacillus plantarum* starter culture during green olive fermentation processing with

- aerated condition. *Journal of food science and technology (Iran)*. 2011. 8(29): 99-106.
21. Leal-Sánchez MV, Ruiz-Barba JL, Sánchez AH, Rejano L, Jiménez-Díaz R, Garrido A. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*. 2003. 20(4), 421-430.
22. Moon SH, Kim CR, Chang HC. Heterofermentative lactic acid bacteria as a starter culture to control kimchi fermentation. *LWT*. 2018. 88, 181-188.
23. Xia C, Tian Q, Kong L, Sun X, Shi J, Zeng X, Pan D. Metabolomics analysis for nitrite degradation by the metabolites of *Limosilactobacillus Fermentum* RC4. *Foods*. 2022. 11(7), 1-16.
24. Esmaeilzadeh P, Darvishi S, Ebrahimi K, Mirahmadi F, Vaziri M. Consideration of lactic acid bacteria ability to reduce nitrite concentration in standard de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth-sodium nitrite medium during fermentation period. *World Applied Sciences Journal*. 2012. 18(3), 430-435
25. Mohammad Hassani J, Darvishi SH, Hosseini SE, Mirahmadi IF. The effect of inoculation of *Lactobacillus Plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* on the nitrite concentration of sauerkraut. *Journal of food technology and nutrition*. 2011. 8(4 (32)):29-36.
26. Carvalho DO, Guido LF. A review on the fate of phenolic compounds during malting and brewing: Technological strategies and beer styles. *Food Chemistry*. 2022. 15;372:131093.
27. Marsilio V, Lanza B, Pozzi N. 1996. Progress in table olive debittering: degradation in vitro of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of AOCS*. 1996. 73, 593-597.
28. Ayar-Sümer EN, Verheust Y, Özçelik B, Raes K. Impact of Lactic Acid Bacteria Fermentation Based on Biotransformation of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Mushrooms. *Foods*. 2024; 13(11):1616.
29. Keykhosravi K, Jebelli Javan A, Parsaiemehr M. Effect of malic acid on bioactive components and antioxidant properties of sliced button mushroom (*Agaricus bisporus*) during storage. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. 2016. 9(4), 287-294.
30. Yang X, Hu W, Xiu Z, Jiang A, Yang X, Saren G, Ji Y, Guan Y, Feng K. Effect of salt concentration on microbial communities, physicochemical properties and metabolite profile during spontaneous fermentation of Chinese northeast sauerkraut. *Journal of Applied Microbiology*. 2020. 129(6), 1458-1471.
31. Mirmohammadi R, Zamindar N, Razavi SH. Mirmohammadi, M.; Paidari, S. Investigation of the possibility of fermentation of red grape juice and rice flour by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Food Science and Nutrition*. 2021. 9, 5370-5378.
32. Franco W, Pérez-Díaz IM, Johanningsmeier SD, McFeeters RF. Characteristics of spoilage-associated secondary cucumber fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. 78(4), 1273-1284.
33. Tkacz K, Chmielewska J, Turkiewicz IP, Nowicka P, Wojdyło A. Dynamics of changes in organic acids, sugars and phenolic compounds and antioxidant activity of sea buckthorn and sea buckthorn-apple juices during malolactic fermentation. *Food Chem*. 2020, 332, 127382.
34. Gąsecka M, Magdziak Z, Siwulski M, Mleczek M. Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*. *Eur. Food Res. Technol*. 2018, 244, 259-268.
35. Akpogheli PO, Edo GI, Kasar KA, Zainulabdeen K, Yousif E, Mohammed AA, Agbo JJ. Impact of different nitrogen sources, initial pH and varying inoculum size on the fermentation potential of *Saccharomyces cerevisiae* on wort obtained from sorghum substrate. *Food Materials Research*. 2024. 4(1), e021
36. Riesute R, Salomskiene J, Moreno DS, Gustiene S. Effect of yeasts on food quality and safety and possibilities of their inhibition. *Trends in Food Science and Technology*. 2021. 108, 1-10
37. Alan Y, Yildiz N. Effects of *Lactobacillus* used as the starter culture on naturally fermented pickled cabbage. *Food Science and Technology*. 2021. 42 (8).
38. Behera SS, Ray RC, Zdolec N. *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *Biomed Res Int*. 2018. 28; 9361614.
39. Brennan M, Le Port G, Gormley R. Post-harvest treatment with citric acid or hydrogen peroxide to extend the shelf life of fresh sliced mushrooms. *LWT-Food Science and Technology*. 2000. 33(4), 285-289.
40. Aday MS. Application of electrolyzed water for improving postharvest quality of mushroom. *LWT Food Science and Technology*. 2016. 68, 44-51.