تولید میزان اسید گلوکورونیک بالا در نوشابه تخمیری کومبوچا تحت شرایط محیطی

فرانک بیگ محمدی [a*]، احمد کرباسی [b]، زهرا بیگ محمدی [c]

[a] عضو هیأت علمی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد صحنه

[b] دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

[c] کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه گرگان

چکیده

مقدمه: نوشابه کومبوچا فرآورده‌ای تخمیری است که از تخمیر چای شیرین توسط قارچ کومبوچا تولید می‌شود. یکی از ترکیبات مهم این نوشابه مغذی، که در سم‌زدایی از بدن و پیشگیری از سرطان موثر است، اسید گلوکورونیک می باشد. با توجه به اهمیت این ترکیب در نوشابه تخمیری مذکور هدف از این تحقیق بررسی تاثیر شرایط محیطی مانند pH ، دما، زمان و بستره قندی در میزان تولید اسیدگلوکورونیک نوشابه کومبوچا پایه‌گذاری گردید.

مواد و روش‌ها: پس از بررسی خالص بودن قارچ کومبوچا، نوشابه کومبوچا در شرایط محیطی مختلف یعنی pH در سه سطح ۴، ۵ و ۶، دما در سه سطح ۲۵، ۳۰ و $35^{o}C$، زمان در سه سطح ۳، ۵ و۷ روز و بستره‌های قندی گلوکز مایع، ملاس چغندرقند و ساکارز تهیه گردید. پس از اتمام مراحل تخمیر میزان اسید گلوکورونیک با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۸۰ نانومتر و در حضور معرف نفتورزورسینول اندازه‌گیری شد.

یافته ها: با استفاده از آزمون دانکن میانگین غلظت های اسیدگلوکورونیک مقایسه شد و نتیجه گرفته شد که بین غلظت اسیدگلوکورونیک حاصل از ساکارز با گلوکزمایع در سطح اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. با استفاده از برنامه آماری MATLAB شرایط بهینه برای رشد قارچ کومبوچا و تولید میزان بیشتر اسید گلوکورونیک در دمای $31^{o}C$ با قند ساکارز در pH=۶ به مدت ۷ روز تخمیر به میزان ۵/۴۴ میلی گرم در لیتر گزارش شد که بیش از مقدار گزارش شده توسط Blanc (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) در سال ۱۹۹۶ بود.

نتیجه گیری: در تخمیر نوشابه کومبوچا نوع بسته قندی ،pH ، زمان و دما همگی موثر هستند. نتایج نشان دادند که می توان از نوشابه کومبوچایی که تحت شرایط کنترل شده تخمیر می‌شود، به‌عنوان یک نوشیدنی سالم و مغذی استفاده نمود چراکه بالا بودن میزان اسید گلوکورونیک در نوشابه کومبوچا می‌تواند خاصیت درمانی به ویژه سم‌زدایی و ضد سرطان بودن آن را توجیه نماید.

واژه‌های کلیدی

اسید گلوکورونیک، نوشابه کومبوچا

* نویسنده مسئول مکاتبات

email: faranakbm@yahoo.com

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

نوشابه کومبوچا فرآورده تخمیری است که توسط قارچ کومبوچا به‌دست می‌آید. این نوشیدنی ساده و تقریبا ارزان قیمت ترکیبی از چای معمولی و شکر بوده، با استفاده از قارچ کومبوچا تخمیر شده و ساختار شیمیایی آن تغییر می کند. پژوهشگران معتقدند که نوشابه کومبوچا یک ماده غذایی مکمل به حساب می آید و مصرف آن سیستم دفاعی بدن را تقویت کرده و موجب جلوگیری از بیماری ها می‌شود. به اعتقاد محققان ۳۵ درصد سرطان مربوط به فاکتورهای رژیمی است و به‌دلیل این که نوشابه کومبوچا سبب بهبود سیستم گوارشی می شود، به عنوان یک فاکتورمثبت در درمان سرطان دستگاه گوارش شناخته شده است. اکثر مردم دنیا ادعا دارند که نوشابه کومبوچا سبب رهایی آن‌ها از دردهای فیزیکی می‌شود. نوشابه کومبوچا نام‌های بسیاری دارد که از این نام‌ها می‌توان به منشاء آن پی برد. در چین به نام Kargosok، در ژاپن و آلمان Kombucha، در برزیل Marine alga، در روسیه Tea kvass و در منچوری به نام Manchurian mushroom شناخته شده است. با توجه به این که نوشابه کومبوچا یک نوشیدنی مغذی و نشاط آور می باشد و تاکنون تنها منبع غذایی شناخته شده حاوی اسیدگلوکورونیک است و اسیدگلوکورونیک نقش مهمی در سم زدایی بدن توسط کبد دارد و با توجه به این مسئله که امروزه مردم در شرایط آلودگی شدید محیط زیست زندگی می‌کنند، غذاهای آلوده به مواد شیمیایی، الکل، توتون، مواد غذایی کنسروشده، غذاهای مانده، آب و گیاهانی که از طریق کودهای شیمیایی و مواد دیگر آلوده شده اند، بار سنگینی را به کبد تحمیل می‌کند. این در حالی است که بخشی از مواد دارویی، از جمله جیوه‌ای که در مواد دندانپزشکی وجود دارد بر دامنه مسمومیت‌های داخلی بدن می‌افزاید و به دلیل عدم توانایی کبد در تولید اسیدگلوکورونیک به اندازه کافی، آلودگی‌های ایجاد شده در بدن باعث بیماری‌های مختلف و مهلک می شود. علاوه بر آن اسیدگلوکورونیک موجود در این نوشیدنی که در اثر تخمیر ایجاد می‌شود برای ساخت پلی ساکاریدهای مهم مانند اسید هیالارونیک به کار می‌رود که وجود آن برای اتصال بافت ها مفید است (Hesseltine, 1965 ; Greenwalt, 1998).

تحقیقات بعدی در مورد نوشابه کومبوچا نشان داد که اثرات این نوشیدنی تخمیر شده بسیار بیشتر از چیزی است که شناخته شده است. پژوهش های انجام شده وجود مقدار زیادی اسیدگلوکورونیک در ترکیبات آن را نشان داد. این اسید در آزمایشگاه و به‌طور مصنوعی قابل تولید نیست، اما کبد یک انسان سالم قادر است آن را تولید کند. این اسید در بدن انسان به عنوان یک پادزهر عمل می‌کند و قادر است تاثیر تمام سمومی را که توسط میکروب های بیماری‌زا در بدن تولید می شود، را از میان ببرد و از طریق سیستم دفع آن‌ها را از بدن خارج سازد. وجود اسید گلوکورونیک در کومبوچا بیش از هر چیز دیگری مورد توجه سرطان‌شناسان قرار گرفته و سرطان‌شناسان روسی به مطالعه و تحقیق در این مورد پرداختند (Dufresne & Farnworth, 2000).

قارچ کومبوچا به صورت یک توده هم‌زیست از مخمر و باکتری بوده و جزء خانواده قارچ ها می باشد که به‌صورت یک صفحه مسطح، صاف و لزج است. با هر فرایند تخمیر یک لایه جدید بر روی این صفحه ایجاد می شود که قابل جدا شدن از لایه قبل می باشد. این قارچ ابتدا به صورت ورقه نازکی بر روی سطح چای قرار می گیرد و سپس ضخیم می شود. تاکنون میکروارگانیسم های زیر قارچ کومبوچا جدا شده اند. باکتری های *Acetobacter xylinoides, Bacterium glutanicum, Acetobacter aceti spp.xylinum, Acetobacter xylinum Acetobacter pasteurianus, aceti,* و مخمرهای *Zygosaccharomyces bailii, Berttanomyces Saccharomyces ludwigii bruxellensis, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Pishia, Candia krusei, Candida kefyer, Issatchenkia orientalisoccidentalis* از این توده زیستی تفکیک شده‌اند. دانشمندان معتقدند که علاوه بر میکروارگانیسم های فوق مخمرهای دیگری که هنوز شناخته نشده اند، نیز در قارچ کومبوچا وجود دارند. تاکنون ترکیبات زیادی از

ifrn.srbiau.ac.ir

نوشابه کومبوچا جدا شده اند که می‌توان به اسید استیک، اسید کربنیک، اسید فولیک، اسید گلوکونیک، اسید گلوکورونیک، اسید لاکتیک، اسید اگزالیک، اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید بوتیریک، اسید نوکلئیک، اتانول، آنتی بیوتیک، دی اکسید کربن، ویتامین ث، ویتامین های گروه B شامل B_1، B_2، B_6 و B_{12} اشاره کرد (Mayser *et al*., 1995؛ Sievers *et al*., 1996؛ Toeh *et al*., 2004).

اسید گلوکورونیک که یکی از ترکیبات مهم نوشابه کومبوچا است به دلیل خاصیت سم‌زدایی اش از اهمیت بسیاری برخوردار است. این اسید در واقع UDP-glucuronic acid بوده که فرم فعال اسید گلوکورونیک است، با مواد سمی ترکیب شده و آن‌ها را در آب محلول ساخته و قدرت جداسازی آن‌ها را از بدن داراست. جذب مواد سمی توسط آنزیم UDP-glucuronyltransferase که در ارگان‌های اصلی بدن از جمله قلب، کلیه، غده فوق کلیوی و تیموس است، تسریع می‌شود.

اسید گلوکورونیک دارای سه عملکرد عمده در بدن است:

الف) سم زدایی از بدن از طریق ترکیب شدن وحذف آن‌ها

ب) انتقال هورمون و سایر مواد مهم از طریق ترکیب شدن با آن‌ها و آزاد کردن آن ها در محل موردنظر

ج) ترکیب واسطه در تولید ویتامین ث (Thomson, 2006 ; Dufresne& Farnworth, 2000)

کشت *Clostridum botulinum* در محیط حاوی نوشابه کومبوچا، سبب غیرفعال شدن باکتری می شود. برخی از ترکیبات چای سیاه و سبز از جمله کاتچین دارای خاصیت ضدباکتریایی بوده که تحت تاثیر تخمیر خاصیت آن تشدید می شود. کاتچین دارای خاصیت آنتی اکسیدان، ضدسرطان، ضد دیابت و ضد تصلب شرایین است و در محیطی که که حاوی اسید استیک و اسیدگلوکورونیک باشد خواص خود را بهتر اعمال می کند (Yokihiko & Watanabe, 1989).

در تجزیه نوشابه کومبوچا با HPLC و MS ترکیباتی مانند اسید سیتریک، اسید گلوکورونیک، اسید گلوکونیک، فروکتوز، اسید سوکسینیک، اسید ایتاکونیک، اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید پروپیونیک و اسید آسکوربیک از این نوشابه تخمیری جدا شد. همچنین با بررسی ساختمان میکروسکپی قارچ کومبوچا، میکروارگانیسم‌های *Acetobacter xylinum* و *Saccharomyces cerevisiae* ایزوله شد. ترکیب مخمر موجود در قارچ کومبوچا بسته به شرایط محیط متفاوت است (Steinkraus, 1996).

اسیدگلوکورونیک در واقع با سموم موجود در بدن ترکیب شده آن‌ها را به ترکیبات قابل حل در آب تبدیل کرده و سپس حذف می‌کند. این واکنش توسط آنزیم UDP-Glucuronyltransferas که در همه ارگان‌های بدن از جمله قلب، کلیه، غده فوق کلیوی و تیموس وجود دارد، تسریع می‌شود. آنزیم دیگری به‌نام گلوکورونیداز وجود دارد که عمل آن عکس آنزیم قبلی است، یعنی ترکیب اسید گلوکورونیک را می‌شکند. این واکنش توسط ساکارولاکتون کنترل می‌شود. با این عمل اسید گلوکورونیک آزاد شده دوباره جذب می‌شود و با مواد سمی ترکیب تشکیل می‌دهد (Blanc, 1996).

با توجه به این که اسید گلوکورونیک نقش بسیار مهمی در سوخت و ساز بدن به ویژه فعالیت کبد ایفا می‌کند، هرچه میزان اسید گلوکورونیک در نوشابه کومبوچا بیشتر باشد، ارزش غذایی و دارویی آن بیشتر است. در این تحقیق، تاثیر شرایط محیطی مانندpH، دما، بستره قندی و مدت زمان تخمیر به منظور بهینه سازی میزان تولید اسید گلوکورونیک بررسی شد.

مواد و روش‌ها

- بررسی خالص بودن قارچ کومبوچا

جهت تایید خالص بودن قارچ کومبوچا و عدم آلودگی آن به قارچ‌های مولد مایکوتوکسین، قارچ کومبوچا روی محیط کشت YGC آگار کشت داده شد. با در نظر گرفتن اسیدیته‌ای که این قارچ ایجاد می‌کند خوشبختانه مشکل آلودگی به باکتری های بیماری‌زا وجود ندارد. آلودگی به آسپرژیلوس می‌تواند بیشترین اثر سوء را داشته باشد. به همین دلیل از محیط کشت YGC آگار که محیط کشت عمومی برای رشد کپک و مخمر است به روش سطحی استفاده شد.

ifrn.srbiau.ac.ir

- تهیه نوشابه کومبوچا در شرایط محیطی مختلف

در تمامی آزمایشات مقدار قند ثابت و به میزان ده درصد مورد استفاده قرارگرفت. با توجه به میزان مواد جامد محلول در آب (بریکس) گلوکزمایع که ۳۷/۲ درصد بوده، برای تهیه نوشابه کومبوچا ۲۶۸/۶ گرم از گلوکز مایع، با توجه به میزان مواد جامد محلول در آب ملاس چغندر قند که ۴۰/۶ بود ۲۴۶/۳ گرم و از ساکارز ۱۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه نوشابه کومبوچا در شرایط کاملا سترون به یک لیتر آب در حال جوش به میزان مورد نیاز از بستره قندی اضافه شد. بعد از این که مخلوط ۵ دقیقه جوشید، ظرف را از روی شعله برداشته و ۱۰ گرم چای سیاه گلستان به آن اضافه کرده و فرصت داده تا چای دم بکشد. پس از دم کشیدن و جدا کردن تفاله با استفاده از اسید سیتریک pH در سه سطح ۴، ۵ و ۶ تنظیم شد در شرایط کاملا سترون قارچ کومبوچا به آن اضافه شد. درب ظرف با پارچه کتانی استریل پوشیده شد تا هوا برای تنفس قارچ وارد ظرف شود. این مایع در محیطی تاریک در سه سطح دمای ^{o}C ۲۵، ۳۰، ۳۵ در سه سطح زمانی ۳، ۵ و ۷ روز نگهداری شد (Rodrigues *et al*., 2006).

- روش اندازه‌گیری اسید گلوکورونیک

بعد از اتمام مراحل تخمیر میزان اسید گلوکورونیک به روش زیر اندازه‌گیری شد:

۲ میلی لیتر نوشابه کومبوچا با ۲ میلی لیتر معرف نفتورزوسینول و ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ در لوله آزمایش ریخته شد. برای تهیه بافر از ۲ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. درب لوله‌ها بسته شد و در حمام آب جوش به مدت ۳۰ دقیقه و پس از آن در حمام آب ^{o}C ۰ به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد. سپس ۱۰ میلی لیتر استات اتیل به آن اضافه شد و بمدت ۳۰ ثانیه شدیدا بهم زده شد. لایه استات اتیل جدا شده و میزان جذب نمونه ها با اسپکتروفتومتر JENWAY مدل 6405 UV/VIS در طول موج ۵۸۰ نانومتر اندازه گیری شد (Inoue & Miyawak, 1975; Fishman & Green, 1955; Nir, 1964)

- منحنی استاندارد گلوکورونیک

غلظت‌های ۵ تا ۵۰ میلی‌گرم از اسید گلورونیک استاندارد تهیه شده، جذب آن در ۵۸۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و سپس منحنی استاندارد آن رسم شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

از طرح کاملا تصادفی برای تجزیه و تحلیل استفاده شد و برای این منظور نرم افزار آماری SPSS و روش آماری Backward استفاده شد و برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد.

یافته‌ها

با کشت قارچ کومبوچا در محیط کشت YGC آگار پرگنه های سفیدرنگ و ریزی تشکیل شد که مربوط به مخمر و باکتری ها بود و رشد هیچ گونه کپکی مشاهده نشد. همچنین بررسی میکروسکپی موید وجود باکتری و مخمر بود. برخی از مخمرها جوانه دار بود که مربوط به تکثیر قارچ کومبوچا و تشکیل یک لایه جدید بر روی لایه قبلی می‌باشد.

در جدول های ۱، ۲ و ۳ نتایج حاصل از میزان غلظت اسید گلوکورونیک در محیط های حاوی گلوکز مایع در pHهای چهار، پنج و شش و در جداول ۴، ۵ و ۶ نتایج حاصل از میزان غلظت اسید گلوکورونیک در محیط های حاوی ساکارز در pHهای ۴، ۵ و ۶ در روزهای سوم، پنجم و هفتم بر حسب میلی گرم بر لیتر نشان داده شده است. نتایج حاصل از نمونه تیمار حاوی قند ملاس نشان داد احتمالا این ماده دارای ترکیباتی بوده که از رشد باکتری و مخمر موجود در این قارچ جلوگیری کرده و سبب کاهش رشد آن می‌شود. بنابراین نمونه‌هایی که حاوی قند ملاس بودند تخمیری در آن‌ها صورت نگرفته بود، یا تخمیر آن خیلی کم بود و مورد قبول واقع نشد. از طرفی چون قند ملاس تیره بود در اسپکتروفتومتری مشکل ایجاد کرد بنابراین آزمایش با دو قند ساکارز و گلوکز مایع ادامه یافت.

jfn.srbiau.ac.ir

جدول ۱- غلظت اسید گلوکورونیک با گلوکز مایع در pH=٤ در زمان‌های متفاوت

غلظت اسیدگلوکورونیک (mg/L)	زمان (روز)	دما (^{o}C)
۷ /۶	۳	۳۵
۱۵ /۴	۳	۳۰
۱۰ /۹	۳	۲۵
۲۱ /۷	۵	۳۵
۲۰ /۵	۵	۳۰
۲۴ /۰	۵	۲۵
۲۲ /۰	۷	۳۵
۲۳ /۵	۷	۳۰
۳۸ /۹	۷	۲۵

جدول ۲- غلظت اسید گلوکورونیک با گلوکزمایع در pH =۵ در زمان‌های متفاوت

غلظت اسیدگلوکورونیک (mg/L)	زمان (روز)	دما (^{o}C)
۱۹ /۱	۳	۳۵
۱۲ /۵	۳	۳۰
۱۱ /۲	۳	۲۵
۲۲ /۱	۵	۳۵
۱۳ /۹	۵	۳۰
۱۵ /۵	۵	۲۵
۲۷ /۰	۷	۳۵
۱۴ /۵	۷	۳۰
۱۷ /۹	۷	۲۵

بحث

- میزان تولید اسیدگلوکورونیک با گلوکز مایع در pH =٤ در زمان‌های متفاوت

همان‌طور که جدول ۱ نشان می‌دهد با افزایش زمان غلظت اسیدگلوکورونیک افزایش یافته است. فاکتورهای موثر در غلظت اسیدگلوکورونیک مجذور زمان و تاثیر متقابل مجذور زمان در دما بودند. مجذور زمان تاثیر معنی داری بر غلظت اسیدگلوکورونیک داشت، بنابراین تاثیر زمان هم معنی‌دار بود. در تاثیر متقابل بین مجذور زمان و دما رفتار پیچیده‌ای مشاهده شد. بدین ترتیب با ثابت نگه‌داشتن زمان اگر دما افزایش یابد، غلظت اسیدگلوکورونیک ابتدا افزایش و سپس کاهش می‌یابد. ضریب F مشخص کرد که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p=۰/۰۰۵) معنی‌دار است و به احتمال بیش از ۹۵ درصد بین فاکتورهای فوق با غلظت اسیدگلوکورونیک رابطه معنی‌دار وجود دارد. ضریب همبستگی یا R^2 مشخص کرد که بین فاکتورهای فوق و غلظت اسیدگلوکورونیک همبستگی۸۳۲/ ۰ وجود دارد.

- میزان تولید اسیدگلوکورونیک با گلوکزمایع در pH= ۵ در زمان‌های متفاوت

همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد زمان به تنهایی تاثیر معنی‌داری در غلظت اسیدگلوکورونیک نداشته و تاثیر دما نیز معنی‌دار بود. با افزایش دما غلظت اسیدگلوکورونیک ابتدا با شیب ملایم و سپس با شیب تندی افزایش می‌یابد. فاکتورهای دما، مجذور دما و تاثیر متقابل مجذور دما و زمان تاثیر معنی‌داری در غلظت اسیدگلوکورونیک داشتند. در تاثیر متقابل بین مجذور دما و زمان رفتار پیچیده ای مشاهده شد. بدین ترتیب که در زمان ثابت با افزایش دما، غلظت اسیدگلوکورونیک افزایش یافت.

jfn.srbiau.ac.ir

جدول ۳- غلظت اسید گلوکورونیک با گلوکز مایع در pH=٦ در زمان‌های متفاوت

غلظت اسیدگلوکورونیک (mg/L)	زمان (روز)	دما (^oC)
۱۴ /۶	۳	۳۵
۸ /۵	۳	۳۰
۱۴ /۲	۳	۲۵
۱۷ /۰	۵	۳۵
۲۱ /۲	۵	۳۰
۲۶ /۱	۵	۲۵
۲۸ /۶	۷	۳۵
۲۶ /۰	۷	۳۰
۲۶ /۱	۷	۲۵

جدول ٤- غلظت اسید گلوکورونیک با ساکارز در pH=٤ در زمان‌های متفاوت

غلظت اسید گلوکورونیک (mg/L)	زمان (روز)	دما (^oC)
۱۸ /۸	۳	۳۵
۴۲ /۴	۳	۳۰
۱۷ /۰	۳	۲۵
۲۳ /۷۰	۵	۳۵
۴۳ /۳	۵	۳۰
۱۸ /۷	۵	۲۵
۲۷ /۹	۷	۳۵
۴۴/۰	۷	۳۰
۲۲ /۵	۷	۲۵

ضریب F مشخص کرد که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p=۰/۰۰۱) رگرسیون معنی دار است و به احتمال بیش از ۹۵ درصد بین فاکتورهای فوق با غلظت اسیدگلوکورونیک رابطه معنی‌دار وجود دارد. ضریب همبستگی یا R^2 مشخص کرد که بین فاکتورهای فوق و غلظت اسیدگلوکورونیک همبستگی۹۴۴/ ۰ وجود دارد.

- میزان تولید اسیدگلوکورونیک با گلوکز مایع در pH =٦ در زمان‌های متفاوت

همان‌طور که جدول ۳ نشان می‌دهد غلظت اسیدگلوکورونیک تحت تاثیر هر دو فاکتور دما وزمان و تاثیر متقابل آن‌ها قرار گرفت. تاثیر زمان به مراتب بیشتر از دما می‌باشد و تاثیر افزایش زمان در افزایش میزان اسیدگلوکورونیک در مقایسه با افزایش دما در این جدول به خوبی دیده می‌شود.

فاکتورهای دما، زمان و تاثیر متقابل مجذور زمان بر دما و تاثیر متقابل مجذور دما بر زمان تاثیر معنی‌داری بر غلظت اسیدگلوکورونیک داشتند. با افزایش زمان غلظت اسیدگلوکورونیک افزایش یافت. در تاثیر متقابل بین دما و زمان رفتار پیچیده ای مشاهده شد. در زمان ثابت با افزایش دما، غلظت اسید گلوکورونیک افزایش یافت و در دمای ثابت با افزایش زمان، غلظت اسیدگلوکورونیک ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. ضریب F مشخص کرد که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p=۰/۰۳۵) رگرسیون معنی‌دار است و به احتمال بیش از ۹۵ درصد بین فاکتورهای فوق با غلظت اسیدگلوکورونیک رابطه معنی‌دار وجود دارد. ضریب همبستگی یا R^2 مشخص کرد که بین فاکتورهای دما، زمان وتاثیر متقابل آن ها با غلظت اسیدگلوکورونیک همبستگی۹۸۸/ ۰ وجود دارد.

jfn.srbiau.ac.ir

جدول ۵ – غلظت اسید گلوکورونیک با ساکارز در pH=۵ در زمان‌های متفاوت

غلظت اسید گلوکورونیک (mg/L)	زمان (روز)	دما (^oC)
۲۲ /۷	۳	۳۵
۲۰ /۸	۳	۳۰
۲۲ /۳	۳	۲۵
۲۴ /۳	۵	۳۵
۲۴ /۲	۵	۳۰
۲۳ /۹	۵	۲۵
۲۵ /۸	۷	۳۵
۲۵ /۳	۷	۳۰
۲۹ /۴	۷	۲۵

جدول ٦– غلظت اسید گلوکورونیک با ساکارز در pH=٦ در زمان‌های متفاوت

غلظت اسید گلوکورونیک (mg/L)	زمان (روز)	دما (^oC)
۱۸	۳	۳۵
۳۰ /۸	۳	۳۰
۱۹ /۳	۳	۲۵
۳۹ /۵	۵	۳۵
۳۶ /۰	۵	۳۰
۲۷ /۷	۵	۲۵
۴۳ /۶	۷	۳۵
۳۸ /۴	۷	۳۰
۲۹ /۹	۷	۲۵

– میزان تولید اسید گلوکورونیک با ساکارز در pH=٤ در زمان‌های متفاوت

همان‌طور که جدول ۴ نشان می‌دهد زمان تاثیر معنی‌داری بر غلظت اسیدگلوکورونیک نداشته و تاثیر دما معنی‌دار بوده و باعث افزایش غلظت اسیدگلوکورونیک شد. در تاثیر متقابل بین دما و زمان در زمان ثابت، با افزایش دما غلظت اسیدگلوکورونیک ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. دما و تاثیر متقابل بین مجذور دما و زمان تاثیر معنی‌داری در غلظت اسیدگلوکورونیک داشتند. با افزایش دما، غلظت اسیدگلوکورونیک افزایش یافت. در تاثیر متقابل بین مجذور دما و زمان رفتار پیچیده‌ای مشاهده شد. بدین ترتیب در دمای ثابت با افزایش دما، غلظت اسیدگلوکورونیک ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. ضریب F مشخص کرد که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p=۰/۰۰۰$) معنی‌دار است و ضریب همبستگی یا R^2 مشخص کرد که بین فاکتورهای T و T^2.t و غلظت اسیدگلوکورونیک همبستگی۹۸۹/ ۰ وجود دارد.

– میزان تولید اسیدگلوکورونیک با ساکارز در pH =۵ در زمان‌های متفاوت

همان‌طور که جدول ۵ نشان می‌دهد با افزایش زمان غلظت اسیدگلوکورونیک افزایش یافت. افزایش زمان نقش مهمی در افزایش غلظت اسیدگلوکورونیک دارد تنها فاکتور موثر و معنی‌دار در غلظت اسیدگلوکورونیک مجذور زمان بود. بنابراین زمان نیز تاثیر معنی دار و موثری در غلظت

jftn.srbiau.ac.ir

اسیدگلوکورونیک دارد. ضریب F مشخص کرد که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p=۰/۰۰۳) رگرسیون معنی‌دار است و ضریب همبستگی یا R^2 مشخص کرد که بین فاکتور زمان و غلظت اسیدگلوکورونیک همبستگی۰/۷۴۱ وجود دارد.

- میزان تولید اسیدگلوکورونیک با ساکارز در pH= ٦ در زمان‌های متفاوت

همان‌طور که جدول ۶ نشان می‌دهد غلظت اسیدگلوکورونیک تحت تاثیر متقابل زمان و دما قرار گرفته و هر دو با هم در افزایش غلظت اسیدگلوکورونیک موثرند. مطابق شکل غلظت اسیدگلوکورونیک تحت تاثیر هردو فاکتور زمان و دما قرار گرفته است. فاکتور موثر و معنی‌دار در غلظت اسیدگلوکورونیک حاصلضرب مجذور دما یا فاکتور $T^2.t$ است. بدین ترتیب که در دمای ثابت با افزایش زمان غلظت اسیدگلوکورونیک نیز افزایش یافت. ضریب F مشخص می‌کند که رگرسیون در سطح اطمینان ۹۵ درصد(p=۰/۰۰۵) رگرسیون معنی دار است و ضریب همبستگی یا R^2 مشخص می کند که بین فاکتور $T^2.t$ با غلظت اسیدگلوکورونیک همبستگی۰/۷۰۲ وجود دارد.

- بررسی رشد قارچ کومبوچا با ملاس چغندرقند

قند ملاس احتمالا دارای ترکیباتی بوده که از رشد باکتری و مخمر موجود در این قارچ جلوگیری کرده و سبب کاهش رشد آن می شود. بنابراین نمونه‌هایی که حاوی قند ملاس بودند تخمیری در آن‌ها صورت نگرفته بود، یا تخمیر آن خیلی کم بود و مورد قبول واقع نشد. از طرفی چون قند ملاس تیره بود در اسپکتروفتومتری مشکل ایجاد کرد بنابراین آزمایش با دو قند ساکارز و گلوکز مایع ادامه یافت. این نتیجه مشابه نتیجه سیورز بود (Sievers *et al*., 1996). وی از عسل به جای ساکارز استفاده کرد و مشاهده کرد که یا اصلا تخمیری صورت نگرفته یا مدت زمان تخمیر طولانی شد. وی دلیل این امر را روغن های فرار و ترکیبات فنلی دانست که در عسل وجود داشته و اثر بازدارندگی بر رشد باکتری موجود در قارچ دارد. با توجه به این‌که ملاس چغندرقند یک ترکیب ناخالص بوده و فقط ۴۰/۶ درصد آن ساکارز است، احتمالا ترکیبات ناخالص موجود در آن اثر بازدارندگی بر رشد باکتری دارد.

نتیجه‌گیری

با بررسی عوامل موثر بر فرایند تخمیر، روند پیشرفت فرایند و تولید متابولیت ها می توان عوامل موثر در کنترل فرایند را مشخص کرد که در تخمیر نوشابه کومبوجا نوع بستره قندی ،pH ، زمان و دما همگی موثر هستند. با استفاده از آزمون دانکن میانگین غلظت‌های اسیدگلوکورونیک مقایسه شد و نتیجه گرفته شد که بین غلظت اسیدگلوکورونیک حاصل از ساکارز با گلوکزمایع در سطح اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. سپس با استفاده از برنامه آماری MATLAB بهترین شرایط بهینه برای رشد قارچ کومبوچا و افزایش میزان اسیدگلوکورونیک آن در دمای^{o}C۳۱ و pH= ۶ با قند ساکارز به میزان ۴۴/۵ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد. این مقدار بیشتر از آن چیزی بود که توسط Blanc بدست آمد (Blanc, 1996). وی نوشابه کومبوچای تولید شده در دمای محیط با قند ساکارز به میزان ده درصد با همان pH چای شیرین به مدت ۷ روز را با HPLC تجزیه کرد و میزان کمتر از ۲۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدگلوکورونیک به دست آورد. بالا بودن میزان اسید گلوکورونیک در نوشابه کومبوجا می‌تواند خاصیت درمانی به ویژه سم‌زدایی و ضد سرطان بودن آن را توجیه کند.

سپاسگزاری

از تمامی کارکنان بخش علوم و صنایع غذایی و مسئولین پژوهشی و آموزشی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز که در تامین امکانات لازم و مراحل اجرایی این پژوهش همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Akerstrand, K. (1996). Fungi that are not just fungi. Var Foeda, 43 (3), 32. (Abs).

Blanc, P. J. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. Biotechnology Letters, 18 (2),139-142.

Dufresne, C. & Farnworth, E. (2000).

jftn.srbiau.ac.ir

Tea, Kombucha., and health: a review: Food Research International, 33, 409-421.

Fishman, W. H. & Green, S. (1955). Microanalysis of glucuronide glucuronic acid as applied to β-glucuronidase and glucuronic acid studies, J. Biological Chemistry, 512-527.

Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H. & Ledford, R. A. (1998). Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. J. Food Science and Technology, 31(3), 291-296.

Hesseltine, C. W. (1965). A millennium of fungi, food and fermentation. Mycologica, 57, 149-197.

Inoue, S. & Miyawak, M. (1975). Quntitative analysis of iduronic acid and glucuronic acid in sulfated galatosaminoglycuronans gas chromatography. Analytical Biochemistry, 65, 167-174.

Mayser, P., Fromme, S. & Gruenddr, K. (1995). The yeast of spectrum of tea fungus kombucha. Mycoses, 34 (7), 289-295.

Nir, I. (1964). Determination of glucuronic acid by naphthoresorcinol. Analytical Biochemistry, 8, 20-23.

Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A. & Oliveria, R. (2006). Low cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. Biochemical Engineering Journal, 32, 135-142.

Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler, S. U. & Teaber, M. (1996). Microbiology and fermentation of balance in a kombucha beverage obtained from tea fungus fermentation. Systematic and Applied Microbiology, 18 (4), 590-594.

Steinkraus, K. H. (1996). Indigenous Fermented Food. Tea Fungus/kombucha. Marcel Dekker Inc. New York. 493-496.

Thomson, S. (2006). Kombucha green tea symbiont: a scientific health literature review. *http;// www.gaiaresearch.co.za/kombucha.html.*

Toeh, A. L., Heard, G. & Cox, J. (2004). Yeast ecology of kombucha fermentation. J. Food Micribiology, 95 (2), 119 -126.

Yokihiko, H. & Watanabe, M. (1989). Antibacterial activity of tea polyphenols against *Clostridium botulinum.* J. Japanese Society of Food Science and Technology, 36 (12), 951-955.

jftn.srbiau.ac.ir

Production of High Glucuronic Acid Level in Kombucha Beverage under the Specific Environmental Condition

F. Beigmohammadi [a*], A. Karbasi [b], Z. Beigmohammadi [c]

[a] Academic Member of the Food Science and Technology Department, Sahneh Branch, Islamic Azad university, Iran.

[b] Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

[c] M. Sc. of Food Science and Technology, Gorgan University, Iran.

Food Technology & Nutrition / Spring 2010 / Vol. 7 / No. 2

Abstract

Introduction: Kombucha beverage is a fermentation product produced by kombucha mushroom in sweet tea. One of the most important ingredient in this beverage that plays a critical role in detoxification of the body and preventation of cancer, is glucuronic acid. In this research, the effect of environmental conditions such as pH, time,temperature and sugar substrate, in production of this beverage and its glucuronic acid content were studied.
Material & Methods: Three levels of pH 4, 5 and 6;temperature 25, 30 and 35 ^{o}C;time 3, 5 and 7 days and different sugar substrates, corn syrup, molasses and sucrose were applied. Glucuronic acid content was measured spectrophotometrically in the presence of naphthoresorcinol.
Results: Optimum conditions for growth of kombucha mushroom and production of high level of glucuronic acid (44.5 mg/l) were reported using MATLAB programming to be 31 ^{o}C with sucrose on pH=6.
Conclusion: The results show that if kombucha beverage is fermented in controlled condition, it might be regarded as a healthy and nutrient beverage.

Keywords: *Glucuronic Acid, Kombucha Beverage.*

**Corresponding Author: faranakbm@yahoo.com*

علوم غذایی و تغذیه / بهار ۱۳۸۹ / سال هفتم/شماره ۲

ifn.srbiau.ac.ir