Archive of SID

تأثیر پروبیوتیک‌ها بر کاهش میزان پاتولین موجود در آب سیب سین‌بیوتیک

آلاله ذوقی[a]، کیانوش خسروی دارانی[*b]، سارا سهراب‌وندی[c]، حسین عطار[d]، سید ابوالحسن علوی[d]

[a] دانش آموخته دکتری گروه مهندسی شیمی، دانشکدهٔ فنی و مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] استاد گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[c] دانشیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[d] گروه مهندسی شیمی، دانشکدهٔ فنی و مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۵/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۵/۴

چکیده

مقدمه: پاتولین عمدتاً در شرایط نامطلوب جمع آوری در باغ‌های سیب و یا انبارداری نامناسب تولید می‌شود و نسبت به حرارت پاستوریزاسیون مقاوم است. برخی از گونه‌های پروبیوتیک قادر به ایجاد پیوند با پاتولین و درنتیجه حذف آن از آب سیب هستند. هدف از این تحقیق بررسی اثر افزودن پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC1643 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC1058 به آب سیب بر کاهش میزان پاتولین موجود در آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: هفت متغیر (نوع پروبیوتیک، میزان تلقیح، مقدار فروکتواولیگوساکارید، مقدار اینولین، غلظت پاتولین اولیهٔ آب سیب، مقدار اسید آسکوربیک و اسید سیتریک) در دو سطح تعریف شدند و از طراحی پلاکت- برمن جهت تعیین متغیرهای مؤثر روی کاهش غلظت پاتولین اولیه استفاده شد. نمونه‌های آب سیب تهیه شده پس از پاستوریزاسیون، تلقیح شده و به مدت ۴۲ روز در یخچال نگهداری شدند. در این مدت مقادیر pH، اسیدیته، قندهای احیاکننده، پاتولین و قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در بازه‌های زمانی روز اول (هفتهٔ صفر)، هفتهٔ اول، هفتهٔ دوم تا هفتهٔ ششم اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: متغیرهای غلظت فروکتواولیگوساکارید و اسید آسکوربیک افزوده شده به آب سیب پروبیوتیک، به عنوان متغیرهایی که به صورت معناداری بر کاهش غلظت پاتولین اولیهٔ آب سیب مؤثر هستند، تعیین شدند. با افزودن (cfu/ml) 10^8 *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ۸۵/۲۸٪ کاهش پاتولین اولیه و با افزودن (cfu/ml) 10^{10} *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ۹۱/۲۳٪ کاهش پاتولین اولیه مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC1643 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC1058 قادر به جذب پاتولین از آب سیب بودند ولی با تغییر شرایط محیطی، میزان جذب پاتولین آن‌ها نیز تغییر می‌کرد. بیشترین میزان کاهش پاتولین در روز اول پس از تلقیح پروبیوتیک صورت گرفت.

واژه‌های کلیدی: *آب سیب، پاتولین، پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، سم زدایی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: k.khosravi@sbmu.ac.ir; Kiankh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پاتولین، مایکوتوکسینی است که متابولیت ثانویهٔ تعدادی از کپک‌های مولد فساد نظیر آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم است. قارچ‌های مولد این سم در مواد غذایی مختلف حضور دارند که معمول‌ترین منابع پاتولین، سیب و فرآورده‌های آن هستند (بی نام، ۱۳۸۰). پاتولین عمدتاً در شرایط نامطلوب جمع آوری در باغ‌های سیب و یا در شرایط نامناسب انبارداری سیب تولید می‌شود. از عوامل مؤثر دیگر بر مقدار پاتولین آب سیب می‌توان به استفاده از سیب‌های زیر درختی، بارش باران و رطوبت هوا نیز اشاره کرد (شفقی اصل و مالوفی، ۱۳۸۷). پایداری پاتولین بدلیل pH پایین و وجود مقادیر کم گروه‌های سولفیدریل در آب سیب بالاست و همچنین به‌دلیل مقاوم بودن سم نسبت به دماهای بالا، در حرارت پاستوریزاسیون از بین نمی‌رود (فتحی آچاچلویی و همکاران، ۱۳۸۸).

پاتولین دارای خاصیت ایجاد ناهنجاری در جنین، ایجاد جهش و سرطان‌زایی است. این ترکیب سرطان‌زا، جهش‌زا و آسیب‌زا به جنین بوده و عوارض متعددی در جوندگان و انسان ایجاد می‌کند. این ماده تضعیف کنندهٔ سیستم ایمنی بوده و ضایعاتی نظیر ایجاد زخم، احتقان و ضایعات خونی به‌ویژه در دستگاه گوارش به‌وجود می‌آورد (بی نام، ۱۳۸۱).

استاندارد جهانی مقدار پاتولین در آب سیب برابر با ۵۰ppb است (بی نام، ۱۳۸۰). تحقیقات انجام گرفته در ۲۰ سال اخیر نشان داده که فرآورده‌های حاصل از سیب، به‌ویژه آب سیب در مناطقی از ایران از جمله استان یزد (اسدی و همکاران، ۱۳۸۱)، استان قزوین (حاج حسینی بابایی و همکاران، ۱۳۹۱)، استان آذربایجان غربی (Forouzan & Madadlou, 2014) و استان‌های شمال‌غرب کشور (فتحی آچاچلویی و همکاران، ۱۳۸۸) دارای پاتولین بیش از حد مجاز بودند. همچنین در چندین کشور دنیا مانند اسپانیا (Murillo *et al.*, 2009)، آرژانتین (Funes & Resnik, 2009)، چین (Yuan *et al.*, 2010)، عربستان (Al-Hazmi, 2010)، دانمارک و بلژیک (Cunha *et al.*, 2009) گزارش وجود پاتولین بیش از حد مجاز در برخی از نمونه‌های آب سیب داده شده است.

پروبیوتیک عبارت است از مکمل میکروبی که از طریق متعادل سازی میکروب‌های بومی طبیعی روده، اثرات مفیدی بر بدن میزبان اعمال می‌کند. مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها عبارت است از تولید ترکیبات مهار کننده باکتری‌ها، تعدیل pH روده، بلوک جایگاه‌های اتصال باکتری‌ها، رقابت برای جذب مواد غذایی و تقویت سیستم ایمنی. از جمله فواید پروبیوتیک‌ها می‌توان به درمان بیماری‌های التهابی روده، اسهال، عدم تحمل لاکتوز، عفونت ناشی از *هلیکوباکترپیلوری*، سندرم روده تحریک پذیر و بیماری روده‌ای ناشی از *کلوستریدیوم دیفیسیل* اشاره کرد (وجدانی و زالی، ۱۳۸۲). فرآورده‌های پروبیوتیکی باید عمر مناسب داشته و در زمان مصرف حاوی 10^{7}–10^{9} CFU/ml سلول‌های زنده پروبیوتیک بوده و غیر بیماری‌زا و غیر سمی نیز باشند.

اخیراً محققین نشان داده‌اند که برخی از گونه‌های پروبیوتیک قادر به ایجاد پیوند با پاتولین و درنتیجه حذف آن از آب‌میوه هستند. باکتری‌های پروبیوتیک دیواره‌ای شبیه به باکتری‌های گرم مثبت دارند و دیوارهٔ آن‌ها تشکیل شده از پپتیدوگلیکان، اسیدهای آلی (تیکوئیک و لیپوتیکوئیک اسید)، لایهٔ پروتئینی و برخی از پلی ساکاریدهای طبیعی. لایهٔ سطحی خارجی‌ترین پوشش سلولی باکتری‌ها بوده و اکثراً روی دیوارهٔ سلولی را می‌پوشاند. این لایه دارای آرایش دوبعدی بوده و از زیرواحدهای پروتئینی و یا گلیکوپروتئینی تشکیل شده است. پروتئین‌های لایهٔ سطحی پروبیوتیک‌ها با اندازه ۷۱–۲۵ کیلودالتون جزء کوچک‌ترین پروتئین‌های سطحی هستند (Zoghi *et al.*, 2014). پیوند بین پروبیوتیک–پاتولین نوعی جذب سطحی بوده و مستقل از متابولیسم باکتری است و هیچ‌گونه واکنش شیمیایی رخ نمی‌دهد. این فرآیند به کمک برخی از پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های دیوارهٔ سلولی پروبیوتیک‌ها صورت می‌گیرد. بنابراین پروبیوتیک‌های مرده نیز قادر به جذب پاتولین هستند (Dalie *et al.*, 2010). ترکیبات پپتیدوگلیکان، پلی ساکاریدها و به‌خصوص لایهٔ پروتئینی در جذب پاتولین نقش اساسی را ایفا می‌کنند. پایداری کمپلکس پروبیوتیک–پاتولین، بستگی به شرایط محیطی، ترکیب اسید آمینهٔ ساختار پپتیدوگلیکان، نوع پروبیوتیک و غلظت اولیهٔ پاتولین دارد (Shetty & Jespersen, 2006). از طرفی، پروبیوتیک‌هایی که قدرت جذب بالایی نسبت به سلول‌های روده‌ای از خود نشان داده‌اند، بعد از جذب پاتولین، این

www.SID.ir

Archive of SID

خاصیت خود را از دست داده و بدون هیچ‌گونه ضرری به سرعت از بدن دفع می‌شوند (اسدی و همکاران، ۱۳۸۱). مزیت استفاده از پروبیوتیک‌ها جهت کاهش پاتولین، حفظ ارزش غذایی آب سیب و مقرون به‌صرفه بودن است.

پری‌بیوتیک‌ها اجزای غذایی غیر قابل هضم بوده که اثر مفیدی برای میزبان به‌وسیلهٔ تحریک رشد و یا فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌ها در روده دارند. این ترکیبات به عنوان منبع قندی (فروکتواولیگوساکارید و اینولین) و یا منبع نیتروژنی توسط پروبیوتیک‌ها مصرف می‌شوند. مطالعات نشان داده است که فروکتواولیگوساکاریدها که به عنوان مهم‌ترین پری‌بیوتیک هستند، به درمان یبوست کمک کرده و سبب کاهش چربی خون و کاهش تولید مواد سمی در روده می‌گردند. پری‌بیوتیک اینولین می‌تواند سبب بهبود جذب کلسیم شود. این اثر می‌تواند موجب افزایش املاح و کاهش خطر پوکی استخوان گردد (خسروی دارانی و کوشکی، ۱۳۸۷).

در حال حاضر تقاضا برای فرآورده‌های پروبیوتیک حاوی مواد پری‌بیوتیک به‌دلیل اثرات مفید ناشی از مصرف آن‌ها رو به افزایش است. سین‌بیوتیک یک فرآوردهٔ متشکل از پری‌بیوتیک و پروبیوتیک بوده که اثرات مفیدی به‌واسطهٔ بهبود بقاء و تکثیر میکروب‌های فلور روده، افزایش رشد یا فعال سازی متابولیسم باکتری‌ها در میزبان ایجاد می‌کند.

هدف از انجام این تحقیق، بررسی متغیرهای مؤثر در کاهش میزان پاتولین موجود در آب سیب (نوع پروبیوتیک، میزان تلقیح، مقدار فروکتواولیگوساکارید، مقدار اینولین، غلظت پاتولین اولیهٔ آب سیب، مقدار اسید آسکوربیک و میزان اسید سیتریک) به کمک پروبیوتیک‌ها است.

مواد و روش‌ها

ریزسازواره‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ATCC4356 (PTCC1643) و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC8014 (PTCC1058) از شرکت تک ژن و محیط کشت‌های مناسب (MRS broth و MRS agar) از شرکت لیوفیلچم[1] ایتالیا خریداری شدند. محیط‌کشت MRS broth طبق دستور روی بسته‌بندی، داخل لوله‌های آزمایش در دار تهیه و اتوکلاو شد. جهت آماده‌سازی سلول‌ها برای تلقیح، از هر ریزسازواره در شرایط استریل حدود ۲ گرم به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MRS broth استریل، اضافه گردید و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت.

مواد شیمیایی مورد نیاز جهت آنالیزهای شیمیایی از شرکت کارلو[2] فرانسه و سم پاتولین نیز از شرکت سیگما-آلدریچ هلند تهیه شد. پری‌بیوتیک‌های مورد استفاده (اینولین و فروکتواولیگوساکارید) از شرکت سنسوس[3] هلند خریداری شده و کنسانتره سیب جهت تهیه نمونه‌ها از کارخانه تکدانه تهیه گردید.

- طراحی پلاکت- برمن

این طراحی نیاز به آزمایش‌های محدود ولی مفید دارد. مفید بودن این طراحی درواقع به منظور معین کردن تأثیرات هر متغیر به‌طور مستقل روی سیستم است. یک بررسی برای انتخاب طراحی پلاکت-برمن، در فرآیندهای چند متغیره، نسبت تعداد آزمایشات به تعداد متغیرهای مورد مطالعه است. این طراحی برای مطالعهٔ K فاکتور مناسب است ((K=(N-1)/(L-1)). N برابر با تعداد آزمایش‌ها و L برابر با تعداد سطوح متغیرها خواهد بود. نوعی از این طراحی برای بررسی K فاکتور دو سطحی در N آزمایش مناسب است که در آن N مضربی از ۴ باشد (Khosravi Darani *et al.*, 2008). با داشتن هفت متغیر در دو سطح و درجه آزادی ۶، طبق طراحی با کمک این روش، نیاز به انجام ۸ آزمایش است (جدول ۱). بعد از انجام این ۸ آزمایش و به‌دست آمدن نتایج، جهت تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Design Expert (نسخهٔ ۹) و مدل Factorial main effect استفاده شد.

- تولید آب سیب سین‌بیوتیک

جهت تهیه آب سیب از کنسانتره سیب، مقدار ۲۰ گرم کنسانتره به ۱۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و به بریکس حدود ۱۱ رسید.

برای هر سری از آزمایش‌های مشخص شده در جدول ۱، پس از تهیهٔ آب سیب از کنسانترهٔ سیب، مقدار ۹۸ میلی‌لیتر به ظروف شیشه‌ای استریل دردار منتقل شد و با

[1] Liofilchem [2] Carlo [3] Sensus

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- طراحی آزمایش‌ها به روش پلاکت برمن جهت بررسی هفت متغیر مؤثر در کاهش میزان پاتولین آب سیب با استفاده از پروبیوتیک‌ها

شمارهٔ آزمایش	نوع پروبیوتیک	متغیرها: میزان تلقیح (cfu/ml)	فروکتواولیگو ساکارید	اینولین	پاتولین اولیه (میکروگرم بر لیتر)	آسکوربیک اسید (میلی‌گرم بر لیتر)	سیتریک اسید (گرم بر لیتر)
۱	*ل. پلانتاروم*	10^{8}	٪ ۲/۵	۰	۱۵۰	۲۰۰	۴
۲	*ل.اسیدوفیلوس*	10^{8}	۰	٪ ۲/۵	۱۱۰	۲۰۰	۴
۳	*ل.اسیدوفیلوس*	10^{10}	۰	۰	۱۵۰	۰	۴
۴	*ل.اسیدوفیلوس*	10^{10}	٪ ۲/۵	۰	۱۱۰	۲۰۰	۰
۵	*ل. پلانتاروم*	10^{10}	٪ ۲/۵	٪ ۲/۵	۱۱۰	۰	۴
۶	*ل.اسیدوفیلوس*	10^{8}	٪ ۲/۵	٪ ۲/۵	۱۵۰	۰	۰
۷	*ل. پلانتاروم*	10^{10}	۰	٪ ۲/۵	۱۵۰	۲۰۰	۰
۸	*ل. پلانتاروم*	10^{8}	۰	۰	۱۱۰	۰	۰

ل.: لاکتوباسیلوس

توجه به طراحی آزمایش‌ها، مقادیر پری‌بیوتیک، اسید آسکوربیک، اسید سیتریک و پاتولین به نمونه‌ها افزوده شد. سپس نمونه‌ها یکنواخت شده و در حمام آب با دمای ۹۰ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شدند. بعد از خنک شدن نمونه‌ها، مقدار مشخص پروبیوتیک در شرایط استریل به نمونه‌ها تلقیح شد. نمونه‌ها به یخچال ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۶ هفته منتقل شدند.

لازم به ذکر است که آزمایش‌ها با دو بار تکرار انجام شدند و نمونه‌گیری و سنجش (میزان اسیدیته، pH، پاتولین، قندهای احیاء کننده و قابلیت زیستی) در زمان‌های روز اول (هفتهٔ صفر)، هفتهٔ اول تا هفتهٔ ششم در طول مدت نگهداری محصول در یخچال صورت گرفت. اندازه‌گیری میزان اتانول موجود در نمونه‌ها نیز در انتهای زمان نگهداری (فقط نمونه‌های هفتهٔ ششم) انجام شد.

- آنالیزهای شیمیایی

اسیدیته به روش تیتراسیون و قندهای احیاکننده به روش لین و آینون اندازه گیری شدند. اندازه‌گیری pH نمونه‌ها با کمک دستگاه pH متر و اتانول با کمک دستگاه تقطیر دیجیتال طبق استاندارد ملی شمارهٔ ۲۶۸۵ انجام شد (بی‌نام، ۱۳۸۳).

- اندازه‌گیری پاتولین

اندازه‌گیری پاتولین به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به روش استاندارد ملی شمارهٔ ۷۴۳۸ انجام شد (بی‌نام، ۱۳۸۱). سم پاتولین با استفاده از اتیل استات از نمونه استخراج شده و با روش کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با استفاده از آشکارساز فرابنفش و با مقایسه زمان بازداری سم در نمونه و استاندارد مربوطه شناسایی می‌شود. درنتیجه جهت رسم منحنی کالیبراسیون غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر لیتر پاتولین تهیه شد و برای هر کدام سطح زیر پیک تعیین گردید. تعیین مقدار پاتولین با اندازه‌گیری سطح زیر منحنی در هر زمان بازداری پاتولین و مقایسه آن با منحنی کالیبراسیون مربوطه انجام شد.

ستون کروماتوگرافی مایع با فاز معکوس (۵mm × ۴/۶mm × ۲۵cm) مثل اکتادسیل سیلین (ODs) از جنس فولاد زنگ نزن پر شده با کربن هجده (C18)، با قطر ذرات ۵ میکرومتر، مجهز به فیلتر محافظ ۰/۵ میکرومتری بود. پیش ستون اکتادسیل سیلین (با قطر داخلی ۴/۳mm و فاز ثابت با اندازه ذرات ۵mm) است. از آشکارساز فرا بنفش دارای فیلتر با طول موج جذب ۲۷۶ نانومتر استفاده شد. فاز متحرک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا شامل ۷۰ میلی‌لیتر استونیتریل و ۹۳۰ میلی لیتر آب بود. فاز متحرک پس از تهیه، با کاغذ صافی صاف شده و با شدت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به دستگاه پمپ گردید.

- قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها

قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها به روش رقیق سازی سریالی و در محیط MRS agar تعیین شد (ذوالفقاری، ۱۳۸۸).

www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌ها

تغییرات قندهای احیاکنندهٔ نمونه‌ها در طول مدت نگهداری یخچالی در جدول ۲ آورده شده است. مقدار قندهای احیا کننده در هفتهٔ اول به صورت معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$) ولی در هفته‌های بعدی تقریباً ثابت بود ($P>۰/۰۵$).

مقادیر اسیدیته (جدول ۳) در طول مدت نگهداری برای تمام نمونه‌ها افزایش ($P>۰/۰۵$) و pH (جدول ۴) برای تمام نمونه‌ها کاهش یافت ($P>۰/۰۵$).

تغییرات قابلیت زیستی نمونه‌های آب سیب در طول مدت شش هفته نگهداری یخچالی در نمودار ۱ مشخص شده است. با توجه به نمودار، تعداد پروبیوتیک‌ها فقط در روز اول افزایش داشت ($P>۰/۰۵$) ولی در هفته‌های بعد تقریباً با شیب ثابتی کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها بین ۲ تا ۵ سیکل لگاریتمی در نمونه‌های مختلف، متفاوت بود. می‌توان ادعا کرد که تقریباً تا یک ماه محصول تولیدی ویژگی محصول پروبیوتیک را از لحاظ تعداد پروبیوتیک دارا است (به جز نمونه شماره ۱).

جدول ۲- میزان قندهای احیا کنندهٔ* نمونه‌های آب سیب سین بیوتیک در طول مدت شش هفته نگهداری یخچالی

شماره آزمایش	مقدار اولیه	هفتهٔ صفر	هفتهٔ اول	هفتهٔ دوم	هفتهٔ سوم	هفتهٔ چهارم	هفتهٔ پنجم	هفتهٔ ششم
۱	۱۳/۲۰±۰/۱۰^{a}	۱۳/۳۶±۰/۱۰^{a}	۱۰/۵۰±۰/۰۶^{b}	۱۰/۱۵±۰/۱۰^{b}	۱۰/۱۰±۰/۰۰^{b}	۹/۹۳±۰/۰۷^{b}	۹/۸۴±۰/۱۲^{b}	۹/۸۰±۰/۱۱^{b}
۲	۱۲/۱۳±۰/۱۵^{a}	۱۱/۱۹±۰/۵۲^{ab}	۸/۷۳±۰/۱۸^{bc}	۸/۶۰±۰/۱۲^{bc}	۸/۴۴±۰/۰۰^{bc}	۸/۳۸±۰/۰۰^{bc}	۸/۳۴±۰/۰۰^{bc}	۸/۳۴±۰/۰۰^{bc}
۳	۹/۹۶±۰/۳۱^{b}	۹/۵۳±۰/۰۷^{b}	۸/۰۴±۰/۰۸^{bc}	۷/۹۴±۰/۰۶^{c}	۷/۸۲±۰/۰۰^{c}	۷/۷۳±۰/۰۰^{c}	۷/۷۳±۰/۰۳^{c}	۷/۷۰±۰/۰۲^{c}
۴	۱۲/۴۲۳±۰/۰۸^{a}	۱۱/۴۳±۰/۴۳^{a}	۸/۳۲±۰/۴۸^{bc}	۸/۱۰±۰/۳۴^{bc}	۷/۹۳±۰/۲۳^{c}	۷/۷۸±۰/۱۰^{c}	۷/۷۲±۰/۱۰^{c}	۷/۶۶±۰/۰۷^{c}
۵	۱۱/۷۳±۰/۲۳^{a}	۱۱/۱۷±۰/۱۷^{ab}	۹/۳۰±۰/۰۴^{b}	۹/۲۶±۰/۰۴^{b}	۹/۲۲±۰/۰۰^{b}	۹/۱۰±۰/۰۰^{b}	۹/۰۲±۰/۰۰^{b}	۸/۹۸±۰/۰۰^{bc}
۶	۱۴/۸۷±۰/۱۴^{a}	۱۴/۰۸±۰/۴۰^{a}	۸/۵۴±۰/۲۶^{bc}	۸/۳۱±۰/۱۳^{bc}	۸/۲۱±۰/۰۹^{bc}	۸/۱۲±۰/۸۹^{bc}	۸/۰۱±۰/۰۵^{bc}	۷/۹۶±۰/۰۳
۷	۱۲/۱۳±۰/۳۰^{a}	۱۱/۳۹±۰/۴۰^{a}	۸/۱۴±۰/۱۱^{bc}	۸/۹۲±۰/۸۶^{bc}	۷/۹۶±۰/۰۳^{c}	۷/۸۲±۰/۰۰^{c}	۷/۸۰±۰/۰۴^{c}	۷/۷۶±۰/۰۳^{c}
۸	۱۱/۱۱±۰/۲۰^{ab}	۱۰/۷۵±۰/۲۵^{ab}	۷/۵۳±۰/۱۰^{c}	۷/۵۱±۰/۰۳^{c}	۷/۴۱±۰/۰۰^{c}	۷/۳۵±۰/۰۶^{c}	۷/۳۳±۰/۰۰^{c}	۷/۲۵±۰/۰۳^{c}

* واحد اندازه‌گیری قند برحسب گرم در ۱۰۰ گرم آب‌میوه است.

انحراف معیار (±SD) با اطمینان ۹۵٪ به‌دست آمد. حروف غیر مشابه نشانگر تفاوت معنی‌دار است.

آزمون‌های طراحی شدهٔ ۱ تا ۸ به روش پلاکت برمن مطابق با جدول ۱ هستند.

جدول ۳- میزان اسیدیتهٔ* نمونه‌های آب سیب سین بیوتیک در طول مدت شش هفته نگهداری یخچالی

شماره آزمایش	مقدار اولیه	هفتهٔ صفر	هفتهٔ اول	هفتهٔ دوم	هفتهٔ سوم	هفتهٔ چهارم	هفتهٔ پنجم	هفتهٔ ششم
۱	۰/۵۵±۰/۰۱^{a}	۰/۵۶±۰/۰۰^{a}	۰/۵۶±۰/۰۰^{a}	۰/۵۶±۰/۰۱^{a}	۰/۵۷±۰/۰۱^{a}	۰/۶۱±۰/۰۱^{a}	۰/۶۲±۰/۰۰^{a}	۰/۶۴±۰/۰۰^{a}
۲	۰/۵۶±۰/۰۱^{a}	۰/۵۷±۰/۰۱^{a}	۰/۵۷±۰/۰۱^{a}	۰/۵۸±۰/۰۰^{a}	۰/۵۸±۰/۰۱^{a}	۰/۵۹±۰/۰۱^{a}	۰/۵۹±۰/۰۳^{a}	۰/۶۱±۰/۰۱^{a}
۳	۰/۵۵±۰/۰۲^{a}	۰/۵۶±۰/۰۰^{a}	۰/۵۷±۰/۰۱^{a}	۰/۵۷±۰/۰۰^{a}	۰/۵۸±۰/۰۰^{a}	۰/۵۸±۰/۰۰^{a}	۰/۵۹±۰/۰۱^{a}	۰/۶۱±۰/۰۱^{a}
۴	۰/۲۱±۰/۰۱^{b}	۰/۲۲±۰/۰۱^{b}	۰/۲۳±۰/۰۱^{b}	۰/۲۳±۰/۰۰^{b}	۰/۲۳±۰/۰۰^{b}	۰/۲۴±۰/۰۰^{b}	۰/۲۴±۰/۰۰^{b}	۰/۲۵±۰/۰۰^{b}
۵	۰/۵۵±۰/۰۰^{a}	۰/۵۷±۰/۰۱^{a}	۰/۵۷±۰/۰۱^{a}	۰/۵۸±۰/۰۱^{a}	۰/۵۸±۰/۰۰^{a}	۰/۵۹±۰/۰۰^{a}	۰/۵۹±۰/۰۰^{a}	۰/۶۰±۰/۰۰^{a}
۶	۰/۲۰±۰/۰۱^{b}	۰/۲۰±۰/۰۱^{b}	۰/۲۱±۰/۰۰^{b}	۰/۲۱±۰/۰۱^{b}	۰/۲۲±۰/۰۰^{b}	۰/۲۲±۰/۰۱^{b}	۰/۲۲±۰/۰۱^{b}	۰/۲۳±۰/۰۱^{b}
۷	۰/۲۲±۰/۰۲^{b}	۰/۲۱±۰/۰۰^{b}	۰/۲۳±۰/۰۰^{b}	۰/۲۴±۰/۰۰^{b}	۰/۲۴±۰/۰۰^{b}	۰/۲۴±۰/۰۰^{b}	۰/۲۴±۰/۰۱^{b}	۰/۲۵±۰/۰۰^{b}
۸	۰/۱۹±۰/۰۱^{b}	۰/۲۱±۰/۰۰^{b}	۰/۲۲±۰/۰۱^{b}	۰/۲۲±۰/۰۰^{b}	۰/۲۲±۰/۰۰^{b}	۰/۲۳±۰/۰۱^{b}	۰/۲۳±۰/۰۱^{b}	۰/۲۴±۰/۰۱^{b}

* اندازه‌گیری اسیدیته بر حسب اسید سیتریک با واحد گرم در ۱۰۰ گرم آب‌میوه انجام شد.

انحراف معیار (±SD) با اطمینان ۹۵٪ به‌دست آمد. حروف غیر مشابه نشانگر تفاوت معنی دار است.

آزمون‌های طراحی شدهٔ ۱ تا ۸ به روش پلاکت برمن مطابق با جدول ۱ هستند.

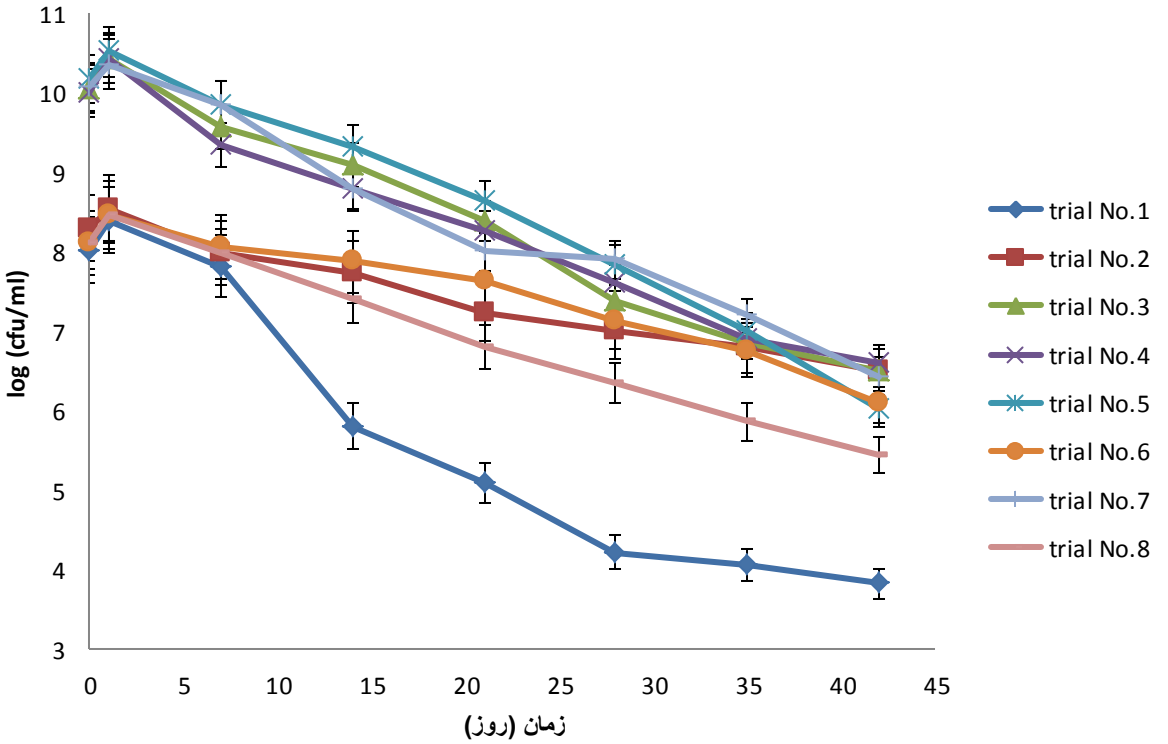
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- میزان pH نمونه‌های آب سیب سین بیوتیک در طول مدت شش هفته نگهداری یخچالی

شماره آزمایش	اولیه	هفته صفر	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
۱	۳/۱۸±۰/۰۱^{a}	۳/۱۷±۰/۰۱^{a}	۳/۱۶±۰/۰۰^{a}	۳/۱۶±۰/۰۱^{a}	۳/۱۵±۰/۰۱^{a}	۳/۱۵±۰/۰۱^{a}	۳/۱۴±۰/۰۱^{a}	۳/۱۲±۰/۰۱^{a}
۲	۳/۲۰±۰/۰۱^{a}	۳/۱۹±۰/۰۱^{a}	۳/۱۸±۰/۰۱^{a}	۳/۱۸±۰/۰۰^{a}	۳/۱۷±۰/۰۱^{a}	۳/۱۶±۰/۰۱^{a}	۳/۱۵±۰/۰۱^{a}	۳/۱۳±۰/۰۱^{a}
۳	۳/۲۱±۰/۰۰^{a}	۳/۲۰±۰/۰۱^{a}	۳/۱۹±۰/۰۲^{a}	۳/۱۸±۰/۰۰^{a}	۳/۱۸±۰/۰۱^{a}	۳/۱۷±۰/۰۱^{a}	۳/۱۶±۰/۰۰^{a}	۳/۱۴±۰/۰۱^{a}
۴	۳/۸۲±۰/۰۱^{b}	۳/۸۰±۰/۰۱^{b}	۳/۷۹±۰/۰۱^{b}	۳/۷۷±۰/۰۱^{b}	۳/۷۶±۰/۰۲^{b}	۳/۷۵±۰/۰۱^{b}	۳/۷۳±۰/۰۱^{b}	۳/۷۰±۰/۰۱^{b}
۵	۳/۱۷±۰/۰۰^{a}	۳/۱۶±۰/۰۱^{a}	۳/۱۵±۰/۰۱^{a}	۳/۱۵±۰/۰۱^{a}	۳/۱۴±۰/۰۰^{a}	۳/۱۳±۰/۰۱^{a}	۳/۱۲±۰/۰۱^{a}	۳/۱۱±۰/۰۱^{a}
۶	۳/۸۳±۰/۰۱^{b}	۳/۸۲±۰/۰۲^{b}	۳/۸۱±۰/۰۱^{b}	۳/۸۰±۰/۰۲^{b}	۳/۷۹±۰/۰۱^{b}	۳/۷۸±۰/۰۰^{b}	۳/۷۷±۰/۰۱^{b}	۳/۷۷±۰/۰۰^{b}
۷	۳/۷۶±۰/۰۱^{b}	۳/۷۵±۰/۰۱^{b}	۳/۷۳±۰/۰۱^{b}	۳/۷۲±۰/۰۱^{b}	۳/۷۱±۰/۰۱^{b}	۳/۷۰±۰/۰۱^{b}	۳/۶۹±۰/۰۱^{ab}	۳/۶۴±۰/۰۱^{ab}
۸	۳/۸۳±۰/۰۱^{b}	۳/۸۲±۰/۰۱^{b}	۳/۸۰±۰/۰۱^{b}	۳/۷۹±۰/۰۱^{b}	۳/۷۸±۰/۰۰^{b}	۳/۷۷±۰/۰۱^{b}	۳/۷۷±۰/۰۰^{b}	۳/۷۶±۰/۰۰^{b}

انحراف معیار (±SD) با اطمینان ۹۵٪به‌دست آمد. حروف غیر مشابه نشانگر تفاوت معنی دار است.
آزمون‌های طراحی شدهٔ ۱ تا ۸ به روش پلاکت برمن مطابق با جدول ۱ هستند.



نمودار ۱- تغییرات قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در نمونه‌های آب سیب سین بیوتیک در طول مدت شش هفته نگهداری یخچالی

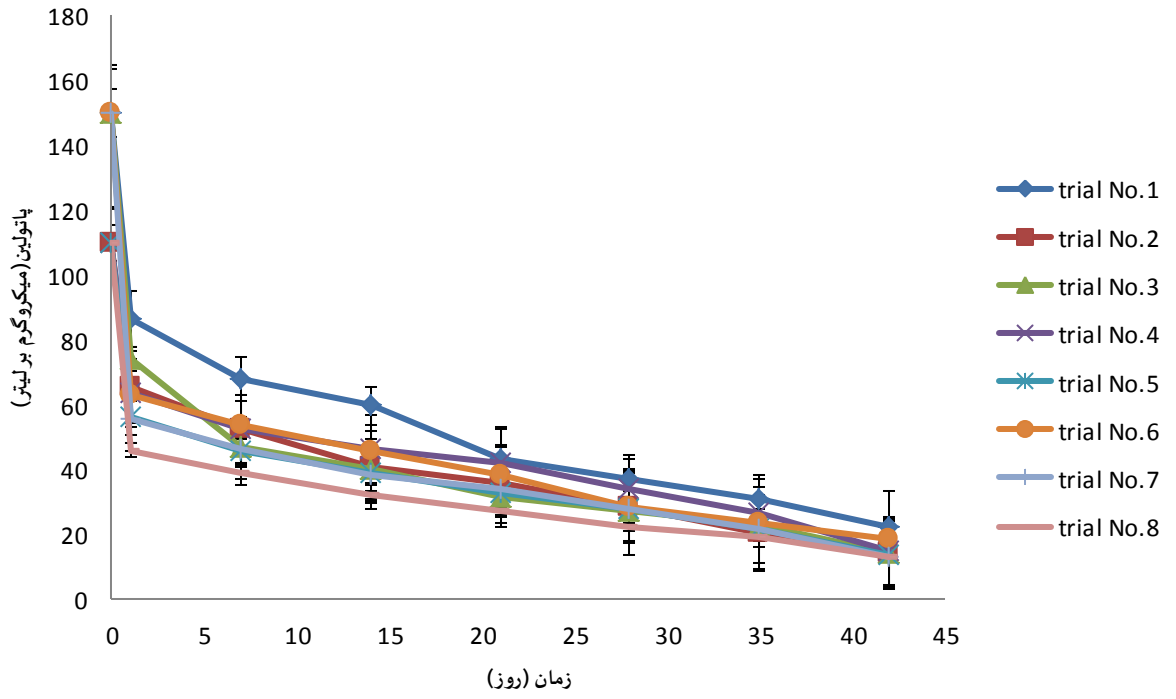
آزمون‌های طراحی شدهٔ ۱ تا ۸ به روش پلاکت برمن: آزمون ۱: 10^{8} cfu/ml *ل. پلانتاروم*، ۲/۵٪ فروکتواولیگوساکارید ، ۱۳۰ µg/L پاتولین، ۲۰۰ mg/L اسید آسکوربیک و ۴ g/L اسید سیتریک؛ آزمون ۲: 10^{8} cfu/ml *ل. اسیدوفیلوس*، ۲/۵٪ اینولین، ۹۰ µg/L پاتولین، ۲۰۰ mg/L اسید آسکوربیک و ۴ g/L اسید سیتریک؛ آزمون ۳: 10^{10} cfu/ml *ل. اسیدوفیلوس*، ۱۳۰ µg/L پاتولین و ۴ g/L اسید سیتریک؛ آزمون ۴: 10^{10} cfu/ml *ل. اسیدوفیلوس*، ۲/۵٪ فروکتواولیگوساکارید ، ۹۰ µg/L پاتولین و ۲۰۰ mg/L اسید آسکوربیک؛ آزمون ۵: 10^{10} cfu/ml *ل. پلانتاروم*، ۲/۵٪ فروکتواولیگوساکارید ، ۲/۵٪ اینولین، ۹۰ µg/L پاتولین و ۴ g/L اسید سیتریک؛ آزمون ۶: 10^{8} cfu/ml *ل. اسیدوفیلوس*، ۲/۵٪ فروکتواولیگوساکارید ، ۲/۵٪ اینولین، ۱۳۰ µg/L پاتولین؛ آزمون ۷: 10^{10} cfu/ml *ل. پلانتاروم*، ۲/۵٪ اینولین، ۱۳۰ µg/L پاتولین و ۲۰۰ mg/L اسید آسکوربیک؛ آزمون ۸: 10^{8} cfu/ml *ل. پلانتاروم*، ۹۰ µg/L پاتولین.

www.SID.ir

Archive of SID

تغییرات میزان پاتولین نمونه‌ها در طول مدت نگهداری یخچالی نیز در نمودار ۲ بیان شده است. غلظت پاتولین در روز اول کاهش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) پیدا کرد و کاهش پاتولین تا روز آخر با شیب ملایمی ادامه داشت ($P>۰/۰۵$). یعنی بیشترین میزان جذب پاتولین توسط پروبیوتیک‌ها در همان روز اول صورت می‌گیرد، که می‌تواند به دلیل تولید مقدار مناسبی از پروتئین‌های لایهٔ سطحی توسط پروبیوتیک‌ها در روز اول قرارگیری در محیط آب سیب باشد. لازم به یادآوری است که پاتولین جذب پروتئین‌های لایهٔ سطحی پروبیوتیک‌ها می‌شود، بنابراین تولید هرچه بیشتر این لایه منجر به جذب بیشتر پاتولین خواهد شد. بیشترین و کمترین درصد کاهش پاتولین پس از ۶ هفته نگهداری یخچالی، به ترتیب در آزمایش‌های شمارهٔ ۷ (۹۱/۲۳٪) و شمارهٔ ۱ (۸۵/۲۸٪) مشاهده شد.

مقدار اتانول مجاز در آب سیب برابر است با ۰/۱۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب سیب (استاندارد ملی شمارهٔ ۲۶۸۵). با اندازه‌گیری اتانول نمونه‌ها بعد از ۶ هفته نگهداری در یخچال (جدول ۵)، مشخص شد در نمونه‌های شمارهٔ ۱ و ۲ و ۳ و ۴ و ۶ مقدار الکل بیش از حد مجاز است. می‌توان نتیجه گرفت در تمامی نمونه‌های حاوی *ل. اسیدوفیلوس* الکل بیشتری تولید شده است (به جز شمارهٔ ۱). در مورد نمونهٔ شمارهٔ ۱ می‌توان به این نتیجه رسید که *ل. پلانتاروم* درمحیط خیلی اسیدی (وجود اسید سیتریک و اسید آسکوربیک) و حضور ۲/۵ درصد FOS بیش از حد مجاز الکل تولید می‌کند.



نمودار ۲- تغییرات میزان پاتولین نمونه‌های آب سیب سین بیوتیک در طول مدت شش هفته نگهداری یخچالی

آزمون‌های طراحی شدهٔ ۱ تا ۸ به روش پلاکت برمن: آزمون ۱: $۱۰^{۸}$ cfu/ml *ل. پلانتاروم*، ۲/۵٪ فروکتواولیگوساکارید ، µg/L ۱۳۰ پاتولین، mg/L ۲۰۰ اسید آسکوربیک و g/L ۴ اسید سیتریک؛ آزمون ۲: $۱۰^{۸}$ cfu/ml *ل. اسیدوفیلوس*، ۲/۵٪ اینولین، µg/L ۹۰ پاتولین، mg/L ۲۰۰ اسید آسکوربیک و g/L ۴ اسید سیتریک؛ آزمون ۳: $۱۰^{۱۰}$ cfu/ml *ل. اسیدوفیلوس*، µg/L ۱۳۰ پاتولین و g/L ۴ اسید سیتریک؛ آزمون ۴: $۱۰^{۱۰}$ cfu/ml *ل. اسیدوفیلوس*، ۲/۵٪ فروکتواولیگوساکارید ، µg/L ۹۰ پاتولین و mg/L ۲۰۰ اسید آسکوربیک؛ آزمون ۵: $۱۰^{۱۰}$ cfu/ml *ل. پلانتاروم*، ۲/۵٪ فروکتواولیگوساکارید ، ۲/۵٪ اینولین، µg/L ۹۰ پاتولین و g/L ۴ اسید سیتریک؛ آزمون ۶: $۱۰^{۸}$ cfu/ml *ل. اسیدوفیلوس*، ۲/۵٪ فروکتواولیگوساکارید ، ۲/۵٪ اینولین، µg/L ۱۳۰ پاتولین؛ آزمون ۷: $۱۰^{۱۰}$ cfu/ml *ل. پلانتاروم*، ۲/۵٪ اینولین، µg/L ۱۳۰ پاتولین و mg/L ۲۰۰ اسید آسکوربیک؛ آزمون ۸: $۱۰^{۸}$ cfu/ml *ل. پلانتاروم*، µg/L ۹۰ پاتولین.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- مقادیر اتانول نمونه‌های آب سیب سین بیوتیک بعد از شش هفته نگهداری یخچالی

شماره آزمایش	اتانول (گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)
۱	۱/۴۶±۰/۰۷
۲	۰/۲۸±۰/۰۸
۳	۰/۳۳±۰/۱۱
۴	۰/۴۴±۰/۰۶
۵	۰/۱۵±۰/۰۵
۶	۰/۶۸±۰/۰۲
۷	۰/۱۳±۰/۰۲
۸	۰/۰۸±۰/۰۶

انحراف معیار (±SD) با اطمینان ۹۵٪ به‌دست آمد.
آزمون‌های طراحی شدهٔ ۱ تا ۸ به روش پلاکت برمن مطابق با جدول ۱ هستند

تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به اندازه‌گیری پاتولین آزمایش‌های انجام شده در طول مدت نگهداری نمونه‌ها در یخچال به کمک نرم افزار Design Expert (نسخهٔ ۹) انجام شد و به‌منظور تسهیل در بررسی آنالیزهای به‌دست آمده از نرم‌افزار، متغیرهای مهم هر هفته به ترتیب اهمیت و همچنین متغیرهایی که در هر هفته در سطح منفی عملکرد بهتری داشتند، در جدول ۶ آورده شده‌اند. همان‌گونه که در جدول مشاهده می‌شود، متغیر فروکتواولیگوساکارید از هفتهٔ اول تا پنجم مؤثرترین متغیر بود. متغیر اسید آسکوربیک در هفتهٔ اول تا پنجم بعد از فروکتواولیگوساکارید ، مؤثرترین متغیر بود. مقدار پاتولین اولیه و غلظت اسید سیتریک فقط تا هفتهٔ دوم روی کاهش میزان پاتولین تأثیرگذار بوده‌اند. زیرا با وجود غلظت بالای پاتولین، در روز اول میزان جذب نیز بالا خواهد بود، در نتیجه این متغیر در هفته‌های بعدی تأثیر چندانی روی افزایش جذب نخواهد گذاشت. همچنین غلظت اسید سیتریک نیز در روز اول روی افزایش تولید پروتئین لایهٔ سطحی تأثیر گذارتر است (در مقایسه با روزهای بعدی نگهداری یخچالی). در هفتهٔ ششم هیچ متغیری روی افزایش درصد جذب پاتولین تأثیری نداشت، زیرا بیشترین جذب در همان روز اول صورت می‌گیرد.

بحث

همانگونه که ذکر شد، بیشترین میزان جذب پاتولین توسط پروبیوتیک‌ها در روز اول انجام می‌شود که با نتیجهٔ تحقیق Peltonen و همکاران (۲۰۰۱) منطبق است. آن‌ها اظهار داشتند ۷۳ درصد از جذب افلاتوکسین توسط پروبیوتیک‌ها طی ۷۲ ساعت پس از تلقیح صورت می‌گیرد. از طرف دیگر Topcu و همکاران (۲۰۱۰) بیان کرده‌اند

جدول ٦- نتایج حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به اندازه‌گیری پاتولین آزمایش‌های انجام شده مطابق طراحی پلاکت- برمن در طول مدت نگهداری نمونه‌ها در یخچال به کمک نرم افزار Design Expert (نسخهٔ ۹)

	هفته صفر	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
متغیرهای مؤثر*	اسید سیتریک پاتولین	فروکتواولیگو ساکارید اسید آسکوربیک پاتولین اسید سیتریک تلقیح	فروکتواولیگو ساکارید اسید آسکوربیک پاتولین اسید سیتریک	فروکتواولیگو ساکارید اسیدآسکوربیک	فروکتواولیگو ساکارید اسیدآسکوربیک	فروکتواولیگو ساکارید اسیدآسکوربیک	-----
متغیرهایی که در سطح منفی** تأثیر بیشتری روی کاهش پاتولین دارند	اینولین تلقیح	اینولین تلقیح	اینولین تلقیح	اینولین تلقیح	اینولین	اینولین تلقیح پروبیوتیک	اینولین تلقیح

* متغیرهای مؤثر در سطح اطمینان ۹۵٪ به ترتیب اهمیت، از بالا به پایین آورده شده‌اند.
** سطح پایین متغیرها با توجه به جدول ۱

www.SID.ir

Archive of SID

که جذب پاتولین توسط پروبیوتیک‌ها با افزایش زمان گرم‌خانه‌گذاری افزایش می‌یابد. علت ادامهٔ جذب پاتولین تا انتهای زمان نگهداری می‌تواند به دلیل حرکت پروبیوتیک‌ها و قرار گرفتن سایت‌های خالی آن‌ها در اختیار پاتولین‌های باقی‌مانده، باشد.

در نمونهٔ شمارهٔ ۱ کمترین مقدار پاتولین جذب شده، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که وجود هر دو اسید با هم، روی تولید پروتئین لایهٔ سطحی توسط *ل. پلانتاروم* تأثیر منفی دارد. به‌طور کلی *ل. اسیدوفیلوس* در محیط اسیدی هم جذب بالاتری داشته و هم زنده‌مانی بهتر، درحالی‌که *ل. پلانتاروم* تحمل محیط اسیدی را ندارد. این نتیجه بر خلاف نتایج به‌دست آمده در سال ۲۰۱۱ است. طبق گفتهٔ آن‌ها افزایش غلظت اسید سیتریک باعث افزایش بقاء *ل. پلانتاروم* در آب پرتقال و آب آناناس می‌شود (Nualkaekul & Charalampopoulos, 2011). این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت سوش‌ها و یا تفاوت نوع آب‌میوه باشد. نمونه‌هایی که مقدار اولیهٔ پاتولین آن‌ها بالاتر بود، میزان جذب پاتولین بیشتری هم داشتند. یعنی در آزمایش‌های شمارهٔ ۳، ۴، ۵ و ۷ نسبت به آزمایش‌های شمارهٔ ۱، ۲، ۶ و ۸، جذب پاتولین بیشتری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) زیرا وقتی غلظت پاتولین در محیط بالاتر باشد، جذب آن توسط لایهٔ سطحی آسان‌تر خواهد بود. این نتیجه با نتایج تحقیقات گذشته تطابق داشت (Fuchs *et al.*, 2008; Zoghi *et al.*, 2017).

با توجه به جدول ۶ افزودن ۲/۵٪ فروکتواولیگوساکارید می‌تواند به افزایش جذب پاتولین توسط پروبیوتیک کمک کند، که احتمالا به دلیل مصرف این پری‌بیوتیک توسط پروبیوتیک‌ها و تولید مناسب لایهٔ سطحی پروتئینی است. متغیر اسید آسکوربیک در هفتهٔ اول تا پنجم بعد از فروکتواولیگوساکارید ، مؤثرترین متغیر بود. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ انجام شد، وجود اسید آسکوربیک در آب سیب آلوده به پاتولین بعد از ۳۴ روز توانست تا حد قابل ملاحظه‌ای میزان پاتولین اولیه را کاهش دهد (Drusch *et al.*, 2007). علت این کاهش می‌تواند به دلیل ترکیب رادیکال‌های آزاد مثل هیدروکسیل و آسکوربات باشد. اکسیداسیون اسید آسکوربیک می‌تواند منجر به تولید شکل رادیکال آزاد آسکوربات شود.

کاهش قندهای احیا کننده در طول مدت نگهداری یخچالی آب میوه یا آب سبزیجات پروبیوتیک در تحقیقات دیگری نیز گزارش شده است. در تحقیقی که توسط Pakbin و همکاران (۲۰۱۴) روی تولید آب هلوی پروبیوتیک صورت گرفت، نشان داده شد که *ل. پلانتاروم* در مقایسه با *ل. دلبروکی* و *ل. کازئی*، قند احیاکنندهٔ بسیار کمتری در طول مدت نگهداری (۴ هفته) مصرف کرده و بیشترین مصرف نیز در ۲۴ ساعت اول رخ داده است، که با تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین Nosrati و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که میزان گلوکز در آب هویج و آب گوجه فرنگی پروبیوتیک حاوی *ل. کازئی* و *ل. پلانتاروم* در طول مدت نگهداری یخچالی به مدت ۴ هفته، کاهش می‌یابد زیرا گلوکز مهم‌ترین منبع کربوهیدرات برای لاکتوباسیلوس‌ها است. در تحقیق مشابهی که روی آب چغندر پروبیوتیک محتوی بیفیدوباکتریوم انجام شد، نیز نتیجهٔ مشابهی گزارش شده است که اظهار داشتند کاهش قند کل با افزایش اسیدیته همراه بوده است زیرا باکتری‌های پروبیوتیک با مصرف قند، اسیدهای آلی مثل اسید لاکتیک و اسید استیک تولید می‌کنند (Muraro *et al.*, 2007). در پژوهش دیگری نشان داده شده که *ل. پلانتاروم* با متابولیز اسید سیتریک و قندهای احیاکننده، اسید استیک تولید می‌کند (Palles *et al.*, 1998). Ding و Shah (۲۰۰۸) از هشت گونهٔ مختلف باکتری پروبیوتیک به منظور تولید آب سیب پروبیوتیک استفاده کرده و اظهار داشتند که همهٔ گونه‌های بکار گرفته شده با مصرف قندهای احیاکننده در مدت ۶ هفته نگهداری یخچالی، به مقدار مشابه و حدود ۰/۱۵ میلی‌گرم بر لیتر اسید مالیک تولید کردند.

افزایش اسیدیته و کاهش pH در طول مدت نگهداری آب میوه‌های پروبیوتیک در یخچال، با تحقیقات گذشته مطابقت دارد (شیخ قاسمی و زمردی، ۱۳۹۳). محققین دیگری در سال ۲۰۱۱ نیز گزارش کردند که در آب میوه‌های پرتقال، گریپ فروت، آناناس، انار و لیمو حاوی ل. *پلانتاروم*، در طول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ هفته اسیدیته افزایش یافت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Nualkaekul & Charalampopoulos, 2011). Tsen و همکاران (2003) روی تولید اسید لاکتیک توسط *ل. اسیدوفیلوس* در پورهٔ موز تحقیق کرده و اظهار داشتند که *ل.*

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدوفیلوس با مصرف قندهای احیاکننده مثل فروکتوز و گلوکز به عنوان منبع کربن، اسید لاکتیک تولید می‌کنند. Shah و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که در آب میوه‌های پروبیوتیک حاوی *ل. رامنوسوس*، *ل. پاراکازئی* و *ل. لاکتیس* در طول نگهداری به مدت ۶ هفته، pH از ۳/۸ به ۳/۳ کاهش یافت. علت افزایش اسیدیته در اثر فعالیت پروبیوتیک‌ها در آب سیب است که در اثر مصرف قندها، اسید لاکتیک و اسید استیک تولید شده و موجب افزایش اسیدیته و کاهش pH نمونه‌ها گردیده است.

اثر نگهداری یخچالی روی بقای پروبیوتیک‌ها توسط پژوهشگران زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است و کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها در آب میوه‌های مختلف گزارش شده است. ثابت شده است که زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در محیط‌های اسیدی کم است (Sheehan *et al.*, 2007)، همچنین آب میوه‌ها ممکن است دارای مواد ضدمیکروبی طبیعی یا مواد افزودنی همچون رنگ‌های افزودنی و طعم‌دهنده‌ها باشند که می‌تواند موجب کاهش زنده‌مانی ریزسازواره‌ها شود (Vinderola *et al.*, 2002). بنابراین، از بین رفتن پروبیوتیک‌ها در طول زمان نگهداری می‌تواند مربوط به پایین بودن pH آب سیب و ترکیبات آب‌میوه باشد (به خصوص در نمونهٔ شمارهٔ ۱ که بیشترین کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها مشاهده شد). وقتی که ریزسازواره‌ها در محیطی با pH پایین قرار می‌گیرند، برای حفظ pH درون سلولی خود، نیاز به مصرف انرژی بالایی دارند. لذا سایر وظایف اصلی سلولی تحت تاثیر استرس کمبود ATP قرار گرفته و ریزسازواره‌ها نمی‌توانند زنده بمانند (Shabala *et al.*, 2006).

Ding و Shah (۲۰۰۸) نشان دادند که تعداد پروبیوتیک‌ها در طول ۴ هفته نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد در آب پرتقال به طور سریع کاهش یافتند. آن‌ها همچنین گزارش کردند که بعد از ۶ هفته نگهداری یخچالی نمونه‌ها، تعداد پروبیوتیک‌ها در آب‌میوه حدود ۳ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. Nosrati و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی که روی آب هویج و آب گوجه فرنگی انجام دادند، کاهش حدود ۲ سیکل لگاریتمی را در تعداد باکتری‌های *ل. کازئی* و *ل. پلانتاروم* بعد از دو هفته نگهداری یخچالی گزارش کردند. در تحقیق دیگری نیز گزارش شده است که در طول نگهداری آب آناناس و کیوی تعداد *ل. اسیدوفیلوس* و در آب سیب سبز نیز تعداد *لاکتوکوکوس لاکتیس* به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Vinderola *et al.*, 2002) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارند.

نتیجه‌گیری

از بین هفت متغیر مؤثر در کاهش غلظت پاتولین موجود در آب سیب (نوع پروبیوتیک، میزان تلقیح، مقدار فروکتواولیگوساکارید، مقدار اینولین، غلظت پاتولین اولیهٔ آب سیب، مقدار اسید آسکوربیک و اسید سیتریک) به کمک طراحی پلاکت- برمن، متغیرهای غلظت فروکتواولیگوساکارید و اسید آسکوربیک در آب سیب پروبیوتیک، به عنوان متغیرهای مؤثرتر مشخص شدند. به طور کلی هر دو نوع پروبیوتیک استفاده شده در این تحقیق قادر به جذب پاتولین از آب سیب بودند.

مقدار پاتولین در روز اول نگهداری یخچالی، کاهش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) پیدا کرد و کاهش پاتولین تا روز آخر با شیب ملایمی ادامه داشت ($P>۰/۰۵$). یعنی بیشترین میزان جذب پاتولین توسط پروبیوتیک‌ها در همان روز اول صورت می‌گیرد. همچنین نمونه‌هایی که مقدار اولیهٔ پاتولین آن‌ها بالاتر بود، درصد کاهش پاتولین بیشتری ($P<۰/۰۵$) هم داشتند. بنابراین می‌توان ادعا کرد در صورت تولید این فرآورده در کارخانجات صنعتی، بعد از روز اول آمادهٔ مصرف است و در صورت ماندگاری فرآورده در فروشگاه‌ها تا شش هفته، میزان پاتولین به حداقل مقدار خود خواهد رسید.

از آنجا که روش طراحی پلاکت- برمن معمولاً به عنوان یک روش غربالگری بکار می‌رود، برای بررسی بیشتر این متغیرها و تعیین سطوح بهینهٔ آنها نیاز به روش‌های دقیق‌تری مانند طراحی مرکب مرکزی است.

سپاسگزاری

با تشکر از گروه تحقیقات صنایع غذایی انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

منابع

اسدی، ی.، محبوب، س.، غیور، م. و قائم مقامی، ج. (۱۳۸۱). اندازه گیری میزان پاتولین در آب سیب‌های

www.SID.ir

Archive of SID

کارخانه‌ای موجود در مغازه‌های شهرستان مرند به روش HPLC. هفتمین کنگرهٔ تغذیهٔ ایران. دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکدهٔ بهداشت و تغذیه.

بی‌نام. (۱۳۸۰). بیشینهٔ رواداری مایکوتوکسین‌ها. استاندارد ملی ایران، شماره ۵۹۲۵، چاپ اول.

بی‌نام. (۱۳۸۱). اندازه‌گیری پاتولین به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا. استاندارد ملی ایران، شماره ۷۴۳۸، چاپ اول.

بی نام. (۱۳۸۳). آب‌میوه‌ها و روشهای آزمون. استاندارد ملی ایران، شماره ۲۶۸۵، تجدید نظر اول.

حاج حسینی بابایی، ا.، پرویز، م.، رحمانی، ک. و قحربیگی، پ. (۱۳۹۱). مقدار مایکوتوکسین پاتولین در آبمیوه‌های عرضه شده در سطح بازار استان قزوین. اولین همایش ملی بهداشت کشاورزی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

خسروی دارانی، ک. و کوشکی، م. ر. (۱۳۸۷). پروبیوتیک‌ها در شیر و فرآورده‌های آن. انتشارات مرز دانش.

ذوالفقاری، ه. س. (۱۳۸۸). تأثیر پروبیوتیک‌ها بر میزان غلظت مایکوتوکسین پاتولین در آب سیب آلوده. پایان نامهٔ کارشناس ارشد رشتهٔ بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

شفقی اصل، س.ک. و مالوفی، ن. (۱۳۸۷). بررسی بازیافت پاتولین آب سیب در روش HPLC بوسیلهٔ مواد مختلف. هجدهمین کنگرهٔ ملی علوم و صنایع غذایی. پارک علم و فناوری خراسان، مشهد.

شیخ قاسمی، ش. و زمردی، ش. (۱۳۹۳). تاثیر دمای نگهداری بر زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد و کپسوله شده در آب سیب. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، جلد ۲۴، شماره ۱، صفحات ۱۴۳-۱۵۴.

فتحی آچاچلویی، ب.، آزادمرد دمیرچی، ص.، حصاری، ج. و نعمتی، م. (۱۳۸۸). مقدار مایکوتوکسین پاتولین در آبمیوه‌های تولیدی چند کارخانهٔ آبمیوه سازی شمالغرب کشور. مجلهٔ پژوهش‌های صنایع غذایی، جلد ۱۹، شماره ۱، صفحات ۱۲-۱.

وجدانی، ر. و زالی، م. ر. (۱۳۸۲). پروبیوتیک‌ها و مکانیسم اثر آن‌ها در پیشگیری و درمان بیماری‌های انسان. مجلهٔ پژوهش در پزشکی، سال ۲۷، شماره ۴، صفحات ۳۳۰-۳۱۹.

Al- Hazmi, N. A. (2010). Determination of patulin and ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Science, 17, 353-359.

Cunha, S. C., Faria, M. A. & Fernandes, J. O. (2009). Determination of patulin in apple and quince products by GC-MS using C5-7 patulin as internal standard. Food Chemistry, 115, 352-259.

Dalie, D. K. D., Deschamps, A. M. & Richard, F. (2010). Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. Food Control, 21, 370-380.

Ding, W. K. & Shah, N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. International Food Research Journal, 15, 219-232.

Drusch, S., Kopka, S. & Kaeding, J. (2007). Stability of patulin in a juice – like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. Food Chemistry, 100, 192-197.

Forouzan, Sh. & Madadlou, A. (2014). Incidence of patulin in apple juices produced in west Azerbayjan province, Iran. Journal of Agriculture and Science of Technology, 16, 1613-1622.

Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M. & Knasmuller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by Lactic acid bacteria. Food and Chemical Toxicology, 46, 1398-1407.

Funes, G. J. & Resnik, S. L. (2009). Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. Food Control, 20 (3), 277-280.

Khosravi Darani, K., Zoghi, A., Alavi, S. A. & Fatemi, S. S. A. (2008). Application of Plackett Burman design for citric acid production from pretreated and untreated wheat straw. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 27 (1), 91-104.

Moraru, D., Blanca, I. & Segal, R. (2007). Probiotic vegetable juices. Food Technology, 4, 87-91.

Murillo, M., Amezqueta, S., Gonzalez, E. & Cerain A. L. (2009). Occurrence of patulin

www.SID.ir

Archive of SID

and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. Food Chemistry, 113, 420-423.

Nosrati, R., Hashemiravan, M. & Talebi, M. (2014). Fermentation of vegetables juice by probiotic bacteria. International Journal of Biosciences, 4 (3), 171-180.

Nualkaekul, S., Salmeron, I. & Charalampopoulos, D. (2011). Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. Food Chemistry, 129, 1037-1044.

Pakbin, B., Razavi, S. H., Mahmoudi, R. & Gajarbeygi, P. (2014). Producing Probiotic Peach Juice. Biotechnology Health Science, 1(3), 24-29.

Palles, T., Beresford, T., Condon, S. & Cogan, T. M. (1998). Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Microbiology, 85 (1), 147-154.

Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J. & Salminen, S. (2001). Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of Dairy Science, 84, 2152-2156.

Shabala, L., McMeekin, T., Budde, B. B. & Siegumfeldt, H. (2006). Listeria innocua and *Lactobacillus delbrueckii* subsp bulgaricus employ different strategies to cope with acid stress. International Journal of Food Microbiology, 110, 1-7.

Shah, N. P., Ding, W. K., Fallourd, M. J. & Leyer, G. 2010. Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. Journal of Food Science, 75, 278-282.

Sheehan, V. M., Ross, P. & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance andthe technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8, 279-284.

Shetty, P. H. & Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. Trends Food Science and Technology, 17, 48-55.

Topcu, A., Bulat, T., Wishah, R. & Boyaci, I. H. (2010). Detoxification of aflatoxin B1 and patulin by *Entrococcus faecium* strains. International Journal of Food Microbiology, 139, 202-205.

Tsen, J. H., Lin, Y. P. & King, V. A. E. (2003). Banana purees fermentation by *Lactobacillus acidophilus* immobilized in Ca-alginate. Journal of General Application and Microbiology, 49 (6), 357-361.

Vinderola, C. G., Costa, G. A., Regenhardt, S. & Reinheimer, J. A. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. International Dairy Journal, 12, 579-589.

Yuan, Y., Zhuang, H., Zhang, T. & Liu, J. (2010). Patulin content in apple products marketed in northeast China. Food Control, 21, 1488-1491.

Zoghi, A., Khosravi-Darani, K. & Sohrabvandi, S. (2014). Surface Binding of Toxins and Heavy Metals by Probiotics. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 14, 84-98.

Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., Sohrabvandi, S., Attar, H. & Alavi, A. (2017). Effect of probiotics on patulin removal from synbiotic apple juice. Journal of the Science of Food and Agriculture, 97 (8), 2601-2609.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Probiotics on Patulin Content Reduction of Synbiotic Apple Juice

A. Zoghi [a], K. Khosravi-Darani [b*], S. Sohrabvandi [c], H. Attar [d], S. A. Alavi [d]

[a] Ph. D. Student of the Department of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Professor of the Department of Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[c] Associate Professor of the Research Department of Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[d] Department of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 16 August 2017 Accepted: 26 July 2018

Abstract

Introduction: Patulin is commonly produced in apples in unsuitable postharvest or storage conditions and has pasteurization temperature resistance. Some probiotic strains are capable of binding with patulin and remove it from apple juice. The aim of this study is to investigate the effect of adding *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643 and *Lactobacillus plantarum* PTCC1058 on reduction of patulin content in apple juice.

Materials and Methods: Seven variables (probiotic strain, inoculum size, fructooligosaccharide content, inulin concentration, patulin content, ascorbic acid and citric acid concentration) were defined in two levels and Plackett-Burman design was used to evaluate the impact of variables on efficiency of patulin removal. Apple juice samples were pasteurized and were then inoculated and kept in the refrigerator for 42 days. The pH value, titratable acidity, reducing sugars, patulin content and viability of probiotics were analyzed on the first day (week 0) and every week during refrigerated storage.

Results: Fructooligosaccharide content and ascorbic acid concentration were determined as more effective variables on patulin removal from apple juice. Inserting 10^8 and 10^{10} cfu/ml *Lactobacillus plantarum* to apple juice can reduce 85.23% and 91.23% of initial patulin content, respectively.

Conclusion: Both *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643 and *Lactobacillus plantarum* PTCC1058 have the capacity of PAT removal from apple juice, but percent of removal depends on environment conditions. The highest percent of patulin removal caused during one day after inoculation of probiotic strains.

Keywords: *Apple Juice, Decontamination, Patulin, Probiotic, Prebiotic.*

* Corresponding Author: k.khosravi@sbmu.ac.ir; kiankh@yahoo.com

www.SID.ir