Archive of SID

بررسی خواص پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس ورمی فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از عسل و امکان تولید آب هلو و آب توت‌فرنگی پروبیوتیک

فاطمه امیدوار، **محمدرضا اسحاقی***، لیلا ناطقی

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین – پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۶

چکیده

استفاده از مکمل‌های پروبیوتیک در صنعت زنبورداری سبب افزایش سرعت رشد و بهبود ضریب تبدیل خوراک و بهبود مقاومت در مقابل بیماری و افزایش تولید عسل می‌شود. در این تحقیق پروبیوتیک‌های دو گونه باکتری *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از عسل معده زنبوران عسل، تحت آزمون‌های تشخیصی قرار گرفت. باکتری‌های پروبیوتیک مذکور در مقادیر 10^8 cfu/ml به صورت تکی و مخلوط به آبمیوه طبیعی هلو و توت‌فرنگی تلقیح شدند. آزمون‌های محصول عبارت بودند از ارزیابی اسیدیته و pH، ارزیابی درصد مواد جامد محلول (بریکس)، ارزیابی قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک، ارزیابی درصد قندهای احیاء و همچنین ارزیابی حسی، نتایج نشان داد با افزایش مدت زمان نگهداری و افزایش جمعیت پروبیوتیک، میزان اسیدیته افزایش و pH، بریکس و همچنین درصد قندهای احیاء به طور معنی‌داری ($p\leq0/05$) کاهش یافت. همچنین خصوصیات حسی تیمارها به طور معنی‌داری ($p\leq0/05$) با کاهش مقبولیت در طی زمان نگهداری و همچنین افزایش میزان جمعیت پروبیوتیک مواجه بود. با گذشت زمان قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در تمامی تیمارها کاهش یافت که کمترین کاهش در تیمارهای حاوی مخلوط دو نوع پروبیوتیک رخ داد. اگر چه تعداد باکتری‌های پروبیوتیک طی ۲۱ روز کاهش یافت ولی تعداد آن‌ها پس از ۲۱ روز نگهداری بالاتر از 10^6 cfu/ml بود بنابراین مطابق با استاندارد ملی کلیه آبمیوه‌ها بعنوان پروبیوتیک محسوب شدند. نتایج نشان داد تیمار حاوی آب هلو و دارای جمعیت 10^8 cfu/ml از مخلوط ۵۰ درصد *لاکتوباسیلوس باسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به عنوان تیمار بهینه انتخاب شد.

کلمات کلیدی: آب توت‌فرنگی، آب هلو، پروبیوتیک، عسل، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*

* eshaghi@iauvaramin.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پروبیوتیک‌ها نوعی مکمل غذایی هستند که از باکتری‌ها و قارچ‌های بالقوه مفید تشکیل شده‌اند. تفاوت پروبیوتیک‌ها با سایر ریززنده‌ها مربوط به خواص سلامت‌بخشی آنها نظیر خواص ضد سرطان‌زایی، ضد جهش‌زایی، ضد عفونتی، تحریک سیستم ایمنی، کاهش‌دهندگی کلسترول سرم، افزایش ارزش تغذیه‌ای غذا، درمان انواع اسهال، عفونت‌های دستگاه گوارش و دستگاه ادراری می‌باشد (۱ و ۲). در حال حاضر بیش از ۷۵ فرآورده لبنی محتوی پروبیوتیک‌ها در سراسر جهان تولید می‌شود اخیراً تقاضای مصرف‌کننده‌ها برای محصولات پروبیوتیکی که بر پایه لبنیات نباشند افزایش یافته است. این محصولات می‌توانند به عنوان یک محصول سلامتی‌بخش برای گیاهخوران و مصرف‌کنندگانی که به محصولات لبنی آلرژی دارند استفاده گردد (۲).

میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش زنبورعسل، شامل میکروارگانیسم‌های مختلف است. حضور جمعیت کثیری از این میکروارگانیسم‌ها به دلیل کمک به فرآیند هضم مواد غذایی، کمک به سنتز و جذب ویتامین‌ها و مواد معدنی، تجزیه پلی‌ساکاریدها و تحریک سیستم ایمنی برای میزبان ضروری است. جمعیت میکروفلور طبیعی روده تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر تغییرات جیره‌غذایی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان دستخوش تغییراتی می‌گردد. از آنجایی که امروزه در صنعت علوم دامی، به منظور افزایش بهره‌وری اقتصادی، زنبور، دام و طیور در سیستم‌های پرورشی متراکم با جمعیت‌های زیاد پرورش و نگهداری می‌شوند، تحت تأثیر عوامل گوناگون تنش‌زا قرار می‌گیرند. همانگونه که اشاره گردید، این عوامل به اختلال در تعادل میکروفلور روده و در نتیجه تضعیف مکانیسم‌های دفاعی بدن منجر می‌گردد و بدین‌ترتیب، عوامل بیماری‌زا فرصت فعالیت پیدا می‌کنند (۳). محققان از دستگاه گوارش زنبور عسل در شرایط آزمایشگاهی، *لاکتوباسیلوس بومبی*[1] با شباهت ۸۱ درصد به *لاکتوباسیلوس آلیمنتاریوس*[2] 0249DSM جداسازی نمودند و نتایج حاصله به این‌صورت بود که کیسه عسل زنبورهای عسل می‌تواند دارای گونه‌های مختلف از لاکتوباسیل‌ها باشد و حضور غالب لاکتوباسیل‌ها در دستگاه گوارش زنبور عسل جهت بهبود ایمنی و سلامت زنبور و همچنین تولید محصول عسل حاوی پروبیوتیک حائز اهمیت است (۴). مطالعات نشان داده *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم*[3]، *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*[4]، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس فارسیمینس*[5] از کیسه عسل زنبورعسل در مالزی جداسازی و شناسایی گردیدند. نتایج بدست آمده نشان داد که از مجموع باکتری‌ها سویه *لاکتوباسیلوس فارسیمینس* نسبت به شرایط اسیدی نیمه‌حساس و نسبت به شرایط قلیایی نمک صفراوی پایدار بود (۵). آبمیوه مایعی است که معمولا در گیاهان یافت می‌شود و حاوی ترکیب خاصی از مواد مغذی هستند که برای سلامتی سودمند هستند. برای افزایش زمان ماندگاری و داشتن رنگ و ظاهری ایده‌آل آبمیوه‌ها را پاستوریزه می‌کنند. اگر چه پاستوریزه کردن باعث جذابیت رنگ و سالم‌سازی آن‌ها از نظر بهداشتی می‌گردد ولی قرار دادن آن در معرض حرارت مقداری از مواد مغذی آن‌ها از جمله ویتامین ث را از بین می‌برد. به همین دلیل متخصصین تغذیه به دنبال راهکارهایی برای افزایش خواص تغذیه‌ای محصولات غذایی از جمله آبمیوه هستند (۶).

آبمیوه‌ها به دلیل داشتن ویتامین‌ها و مواد معدنی فراوان، مفید بودن برای سلامتی، حساسیت‌زا نبودن، نداشتن ترکیبات آلرژیک و جذاب بودن برای رده‌های وسیع سنی مصرف‌کنندگان می‌تواند محیط مناسبی برای باکتری‌هایی چون باکتری‌های اسید لاکتیک و *بیفیدوباکتریوم‌ها* باشد (۷). آبمیوه‌ها حاوی میزان بالایی از قندها هستند که می‌تواند رشد پروبیوتیک را تقویت کرده و به‌راحتی با استفاده از رفراکتومتر اندازه‌گیری شوند. از طرفی آبمیوه‌ها به دلیل داشتن شرایط خاصی چون pH پایین، زمان و دمای

1 *Lactobacillus bombi*
2 *Lactobacillus alimentarius*
3 *Lactobacillus plantarum*
4 *Lactobacillus pentosus*
5 *Lactobacillus farciminis*

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری، حضور میکروب‌های رقابت‌کننده، ترکیبات بازدارنده و ضدمیکروبی محدودیت‌هایی را در زمینه کاربرد پروبیوتیک‌ها دارند (۸). بنابراین باید از باکتری‌های پروبیوتیکی استفاده شود که توان زنده ماندن در شرایط اسیدی آبمیوه را داشته باشند (۹). هدف از انجام این تحقیق، شناسایی خواص پروبیوتیکی سویه و گونه‌های *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از معده زنبوران عسل و تعیین خصوصیات سم‌زدایی گونه‌های پروبیوتیکی شناسایی شده از زنبوران عسل و همچنین تعیین خصوصیات پروبیوتیکی این سویه‌ها و اضافه کردن آن‌ها به آبمیوه‌های هلو و توت‌فرنگی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[1] (HM027642) و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*[2] (M59259) جدا شده از عسل از موسسه تحقیقات علوم دامی کشور (کرج، ایران) تهیه شدند و *استافیلوکوکوس ارئوس* (ATCC6537) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. آب توت‌فرنگی طبیعی با بریکس ۹ و آب هلو طبیعی با بریکس ۱۸ (شرکت تکدانه، ایران) تهیه گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمون شامل: محیط کشت MRS AGAR، محیط کشت MRS BROTH، محیط کشت آگار خون‌دار، قرص رینگر، محلول بافر استاندارد ۴ و ۷، نیترازول سود ۰/۱ N، فنل فتالئین، اسیدآمینه ال آرژنین، نمک‌های صفراوی بایل اگزالات، کلریدریک اسید، پپسین و تریپسین، آب پپتونه، معرف نیسلر از شرکت مرک[3]، آلمان تهیه گردیدند.

آماده‌سازی مایه تلقیح

کشت *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* به منظور تهیه مایه تلقیح در محیط MRS broth کشت داده و به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد و شمارش سلول‌های زنده مایه تلقیح با استفاده از روش کشت استاندارد و همان نوع محیط کشت و گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C انجام شد (۵، ۱۰ و ۱۱).

آماده‌سازی مایه تلقیح

کشت *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* به منظور تهیه مایه تلقیح در محیط MRS broth کشت داده و به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد. شمارش سلول‌های زنده مایه تلقیح با استفاده از روش کشت استاندارد و همان نوع محیط کشت و گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C انجام شد (۱۱ و ۱۰، ۵).

روش تولید آبمیوه پروبیوتیک

در ابتدا دو گونه پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* به صورت جداگانه کشت داده شد و به‌طور جداگانه به آب هلو و آب توت‌فرنگی پاستوریزه شده مطابق جدول ۱ اضافه شد. غلظت باکتری‌ها هنگام تلقیح (10^8 cfu/ml) بوده و به مدت ۷۲ h در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد. سپس بلافاصله تمام تیمارها وارد یخچال ۴ °C شد و بعد از دو هفته آزمون‌های لازم روی آن‌ها انجام پذیرفت (۵)

جدول ۱. معرفی تیمارهای مورد استفاده در تحقیق

کد تیمار	نمونه
T1	آب هلو+*لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*
T2	آب توت‌فرنگی+*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*
T3	آب هلو+*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*
T4	آب توت‌فرنگی+*لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*
T5	آب هلو+*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* + *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*
T6	آب توت‌فرنگی+*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*+ *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*
TS	آب هلو (شاهد)
TP	آب توت‌فرنگی (شاهد)

1 *Lactobacillus fermentum*
2 *Lactobacillus vermiform*

3 Merck

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی خواص پروبیوتیک

مقاومت به اسید باکتری‌های اسیدلاکتیک

به منظور بررسی مقاومت باکتری‌های اسید لاکتیک به اسید، مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۴۵۹ در محیط کشت مایع که pH آن کاهش داده شده پس از گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب و شمارش کلی انجام شد. در ابتدا مقدار µl ۱۰۰ از باکتری‌های تازه کشت شده به این محیط‌ها منتقل و در دمای °C ۳۷ نگهداری و در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و h ۲۴ رشد باکتری‌ها از طریق خواندن جذب در طول موج nm ۶۲۰ بررسی شد. در ادامه مقدار µl ۱۰۰ از سوسپانسیون میکروبی با جمعیت 10^6 cfu/ml را در تعداد مناسب لوله‌های حاوی ml ۱۰ محیط کشت مایع MRS Broth که اسیدیته آن‌ها بوسیله اسید مناسب (استیک اسید گلاسیال یا کلریدریک اسید) در دو pH ۲/۵ و ۴ تنظیم شد، گرمخانه‌گذاری شد.

پس از گذشت ۳ تا h ۴ از گرمخانه‌گذاری از محیط‌های کشت تلقیح شده یک میلی‌لیتر برداشته و در محیط کشت MRS Agar تلقیح کرده و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای °C ۳۷ و به مدت h۴۸ شمارش گردیدند (۱۲).

مقاومت به نمک‌های صفراوی (بایل)

مقدار ml۱۰۰ از باکتری‌های تازه رشد کرده به محیط‌های MRS مایع حاوی ۰/۳ درصد نمک صفراوی استریل اضافه شد، سپس رشد باکتری‌ها در زمان۱، ۱۴ و h ۲۸ از طریق خواندن جذب در طول موج nm۶۲۰ مورد بررسی قرار گرفت. میزان بازدارندگی رشد با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (۱۳). براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۴۵۹ ضریب بازدارندگی کمتر از ۰/۴ درصد قابل قبول است (۱۲).

رابطه ۱:

$$\text{Cinh} = \frac{(\Delta T8 - T0\ Control - \Delta T8 - T0\ Teratment)}{\Delta T8 - T0\ Control}$$

مقاومت به شیره معده (پپسین، تریپسین)

بررسی مقاومت به شرایط اسیدی معده، با کشت ریزسازواره در محیط‌های کشت مایع شبیه‌سازی شده با معده، حاوی پپسین و تریپسین، کشت خطی بر روی محیط کشت MRS Agar، گرمخانه‌گذاری در دمای °C۳۷ و به مدت h ۴۸ و بررسی شد یا عدم رشد انجام شد. از سوسپانسیون میکروبی به میزان ۲ درصد در هر یک از محیط‌های اسید مصنوعی (پپسین و تریپسین) معده و محیط‌های کنترل تلقیح کرده و در دمای مناسب گرمخانه‌گذاری شد. در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و h۲۴ پس از گرمخانه‌گذاری، ml ۱ از هر محیط تلقیح شده برداشته و پس از تهیه رقت‌های مناسب با رقیق‌کننده آب پپتونه ۰/۱ درصد به روش پورپلیت در محیط کشت آگاردار مناسب کشت داده و در دمای °C ۳۷ گرمخانه‌گذاری شد و سپس جمعیت میکروبی شمارش شد (۱۲). شایان ذکر است براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۴۵۹ پس از انجام آزمایش تعداد باکتری شمارش شده نبایستی کمتر از 10^6 cfu/ml باشد (۱۲).

عدم فعالیت همولیتیک

بررسی لیز گلبول‌های قرمز خون گوسفندی با کشت میکروارگانیسم بر روی محیط کشت آگاردار حاوی خون گوسفند انجام شد. میکروارگانیسم ایزوله شده بر روی محیط کشت آگار خون‌دار (محیط پایه حاوی ۷ درصد خون گوسفندی دفیبرینه) به روش نقطه‌ای کشت شد. سپس پلیت‌ها به صورت وارونه در دمای °C ۳۷ و شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری گردید. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر وجود هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها بررسی شد. وجود هاله شفاف نشان‌دهنده واکنش مثبت و نوع بتا بود. از *استافیلوکوکوس اورئوس*[1] به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۲).

براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۴۵۹ جواب این آزمون بایستی منفی باشد (۱۲).

1 *Staphylococcus aureus*

www.SID.ir

Archive of SID

هیدرولیز ال-آرژنین

به‌منظور انجام تست هیدرولیز ال-آرژنین در باکتری‌های اسیدلاکتیک، ml ۱۰۰ از سوسپانسیون تهیه شده از کشت تازه باکتری را به محیط مایع حاوی ۰/۳ درصد اسیدآمینه ال-آرژنین منتقل کرده و به مدت h ۲۴ در دمای °C ۳۷ گرمخانه‌گذاری می‌کنیم. پس از پایان انکوباسیون شبانه ml ۱۰۰ از محیط کشت روی کاغذ صافی حاوی معرف نسلر قرار گرفت و تغییر رنگ بررسی شد. ایجاد رنگ نارنجی متمایل به قرمز نشان‌دهنده واکنش مثبت است. از *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. قابل ذکر است براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۴۵۹ جواب این آزمون بایستی منفی باشد (۱۲).

شمارش میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک

تعداد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک موجود در g ۱ از کشت میکروبی در محیط کشت MRS با تهیه رقت‌های مختلف از هر کدام از نمونه در سه تکرار انجام شد (۱۲). شایان ذکر است براساس استاندارد ملی‌ایران به شماره ۱۹۴۵۹ پس‌از انجام آزمایش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک شمارش شده نبایستی کمتر از 10^6 cfu/ml باشد (۱۲).

آزمون‌های فیزیکوشیمیایی آبمیوه

اندازه‌گیری pH

براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۵۰۷، میزان pH در طی دوره نگهداری، در فواصل زمانی روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری pH آبمیوه‌ها (آب هلو، توت‌فرنگی) در طی نگهداری از دستگاه pH متر (شرکت هوریبا، ژاپن) استفاده گردید. تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد (۱۵).

اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیتر

مقدار ml ۵ از نمونه کنسانتره رقیق و صاف‌شده با سود N۰/۱ در مجاورت فنل‌فتالئین تا ایجاد رنگ صورتی پایدار تیتر گردید. نتیجه برحسب اسید عمده در g ۱۰۰ نمونه بیان شد (۱۵).

اندازه‌گیری درصد مواد جامد محلول (بریکس)

چند قطره از محلول صاف شده و در مورد کنسانتره رقیق‌شده و صاف شده را روی منشور رفراکتومتر (شرکت مینا تجهیز، ایران) قرار داده و آن را کاملا یکنواخت پخش کرده و در غلظت °C ۲۰ قرائت شد. نتیجه برحسب گرم، در g ۱۰۰ ساکارز درجه بریکس بیان گردید. بریکس در فواصل نگهداری و در فواصل زمانی روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ اندازه‌گیری شد (۱۵).

سنجش میزان قندهای احیاءکننده

برای اندازه‌گیری قند کل از روش فهلینگ استفاده شد. در این روش با استفاده از اسیدکلریدریک ساکارز به قندهای احیاکننده هیدرولیز شده، سپس یون مس دو ظرفیتی محلول‌های فهلینگ در یک محیط قلیایی در اثر احیاء توسط قندهای احیاءکننده تبدیل به مس یک ظرفیتی گردید. در نهایت بر اساس میزان مواد محلول قند مصرفی جهت احیاء مس و تغییر رنگ محلول، مقدارکل قند احیاءکننده مطابق رابطه ۲ محاسبه شد (۱۵).

رابطه ۲

$$\text{قند احیاءکننده قبل از هیدرولیز} = \frac{F\times250\times100\times100}{W\times50\times1000\times V}$$

V، حجم مصرفی بورت، W، وزن نمونه (1g) و F عیار فهلینگ بود.

ارزیابی قابلیت زنده‌مانی باکتری‌ها

در نمونه‌های آبمیوه‌ها قابلیت زنده‌مانی باکتری‌ها با کشت دادن آبمیوه بر روی محیط RCM–agar Oxoid[1] به صورت بی‌هوازی در دمای °C ۳۷ صورت گرفت. بعد از کشت، کلنی‌های باکتری از پلیت‌ها جمع‌آوری شده و در °C ۷۰- در گلیسرول ۱۵ درصد به مدت نیم ساعت نگهداری شد تا شناسایی بیشتر انجام شود.

با کشت اختصاصی بر روی محیط‌های RCM آگار و Rogosa[2] در °C ۳۷ به مدت ۲ روز باکتری‌ها قابل تشخیص

1 Reinforced Clostridial Medium Agar

2 De Man, Rogosa and Sharpe Agar

www.SID.ir

Archive of SID

و شمارش بود (۱۶). بعد از h ۷۲ از تخمیر در °C ۳۰، نمونه‌ها در °C ۴ به مدت ۲۵ روز نگهداری شدند. نمونه‌ها در فواصل روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ نمونه‌برداری شده و قابلیت زنده‌مانی کشت‌های پروبیوتیک اندازه‌گیری و به صورت واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی برحسب تعداد کلنی شکل گرفته در هر میلی‌لیتر بیان گردید (۱۷).

ارزیابی حسی

ارزشیابی حسی به روش هیدونیک ۵ نقطه‌ای در فواصل زمانی روزهای صفرم، هفتم، چهاردهم و بیست‌ویکم بر روی نمونه‌ها انجام شد. ویژگی‌های حسی شامل رنگ ظاهری و طعم مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمون توسط ۱۰ نفر ارزیاب آموزش‌دیده جهت تعیین تیمار بهینه انجام شد. امتیازدهی به شیوه مقیاس ۵ نقطه‌ای شامل امتیازات ۰ تا ۵ (خیلی بد تا عالی) انجام گردید (۱۸).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمون‌ها، از طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال α برابر ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۴/۹ و برای رسم نمودارها از Excel (2007) استفاده شد.

نتایج

ارزیابی فعالیت پروبیوتیکی گونه‌های *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*

نتایج مربوط به بررسی خواص پروبیوتیکی گونه‌های *لاکتوباسیلوس ورمی فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از عسل در جدول ۲ نشان داده شده است. مطابق با نتایج جدول ۲، تعداد باکتری‌های زنده *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در مجاورت اسید و در pH برابر ۲/۵ به ترتیب برابر $۲/۱۴ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml و $۳/۵ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml و در pH برابر ۴ به ترتیب برابر $۳/۸ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml و $۲/۲۸ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml بود.

ارزیابی pH و اسیدیته نمونه‌های آب هلو و آب توت‌فرنگی حاوی *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* طی ۲۱ روز دوره نگهداری

نتایج حاصل از مقایسه میانگین pH و اسیدیته نمونه‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. میزان pH و اسیدیته در همه تیمارها با گذشت زمان به ترتیب کاهش و افزایش یافت که البته این کاهش از نظر آماری معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) بود. پس از ۲۱ روز نگهداری بیشترین میزان pH متعلق به تیمار T۵ (آب هلو، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) و کمترین pH نیز به تیمار T۴ (آب توت‌فرنگی و

جدول ۲. ارزیابی فعالیت گونه‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از عسل

ویژگی باکتری‌های مورد استفاده	*لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* (cfu/ml)	*لاکتوباسیلوس فرنتوم* (cfu/ml)	حد قابل قبول استاندارد ۱۹۴۵۹ (استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۱)
مقاومت به اسید: pH ۲/۵	$۲/۱۴\times۱۰^{۶}$	$۳/۵\times۱۰^{۶}$	پس از تیمار تعداد شمارش دوره کمتر از
pH ۴	$۳/۸\times۱۰^{۶}$	$۲۸/۲\times۱۰^{۶}$	$۱۰^{۶}$ cfu/ml نباشد.
مقاومت به نمک‌های صفراوی (بایل)	۰/۳۶۲	۰/۳۴۱	ضریب بازدارندگی کمتر از ۰/۴ درصد باشد.
مقاومت به شیره معده	$۳/۲۵\times۱۰^{۶}$	$۲/۸۱\times۱۰^{۶}$	پس از تیمار تعداد شمارش دوره کمتر از
(پپسین، تریپسین)	$۳/۰۱\times۱۰^{۶}$	$۳/۸۴\times۱۰^{۶}$	$۱۰^{۶}$ cfu/ml نباشد.
عدم فعالیت همولیتیک	منفی	منفی	منفی
هیدرولیزال – آرژنین	منفی	منفی	منفی
شمارش میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک	$۱۰^{۶}$	$۱۰^{۶}$	نباید کمتر از $۱۰^{۶}$ cfu/ml باشد

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. میانگین تغییرات pH آب هلو و آب توت‌فرنگی تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و شاهد طی ۲۱ روز نگهداری

تیمار	pH				اسیدیته (سیتریک اسید)			
	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم
T1	۳/۹۰۰±۰/۰۷۰^{a}	۳/۷۹۰±۰/۰۱۲^{abc}	۳/۵۸۰±۰/۰۹۹^{abcdefgh}	۳/۴۵۰±۰/۰۱۸^{cdefghij}	۰/۰۴۶±۰/۰۰۵^{a}	۰/۰۳۵±۰/۰۰۴^{ab}	۰/۰۵۴±۰/۰۰۲^{cdefg}	۰/۰۷۳±۰/۰۱۵^{fghij}
T2	۳/۷۱۰±۰/۰۵۶^{abcde}	۳/۵۹۰±۰/۰۰۸^{abcdefgh}	۳/۴۵۵±۰/۰۳۵^{cdefghij}	۳/۳۶۰±۰/۰۱۷^{efghij}	۰/۰۵۲±۰/۰۱۱^{bcd}	۰/۰۳۹±۰/۰۰۲^{cdef}	۰/۰۵۷±۰/۰۰۴^{fghijk}	۰/۰۸۴±۰/۰۰۷^{ijk}
T3	۳/۹۰۰±۰/۰۷۰^{a}	۳/۷۵۰±۰/۰۱۷^{aAB}	۳/۵۲۰±۰/۱۱۳^{abcdefgh}	۳/۳۹۰±۰/۲۱^{adefghij}	۰/۰۵۱±۰/۰۰۷^{a}	۰/۰۴۸±۰/۰۰۵^{abc}	۰/۰۴۷±۰/۰۰۹^{efghi}	۰/۰۵۹±۰/۰۰۴^{hijk}
T4	۳/۷۱۰±۰/۰۱۴^{abcd}	۳/۴۵۰±۰/۰۷۰^{cdefghij}	۳/۳۲۰±۰/۰۴۲^{fghij}	۳/۱۲۰±۰/۱۷^{j}	۰/۰۶۱±۰/۰۰۲^{bcd}	۰/۰۵۲±۰/۰۰۴^{fghijk}	۰/۰۶۲±۰/۰۱۱^{kl}	۰/۰۷۶±۰/۰۰۵^{m}
T5	۳/۹۰۰±۰/۰۸۴^{a}	۳/۷۲۰±۰/۱۱۳^{abcd}	۳/۵۵۰±۰/۰۵۶^{abcdefgh}	۳/۶۵۵±۰/۳۴۶^{abccdef}	۰/۰۴۸±۰/۰۰۸^{a}	۰/۰۴۳±۰/۰۰۹^{abcd}	۰/۰۵۴±۰/۰۰۸^{defgh}	۰/۰۶۸±۰/۰۰۲^{ghijk}
T6	۳/۷۱۰±۰/۰۲۸^{abcde}	۳/۵۴۰±۰/۰۸۴^{bcdefgh}	۳/۳۸۰±۰/۰۲۸^{defghij}	۳/۲۹۰±۰/۰۶۰^{ghij}	۰/۰۵۷±۰/۰۰۴^{bcd}	۰/۰۴۵±۰/۰۰۷^{defghi}	۰/۰۶۰±۰/۰۰۷^{hijk}	۰/۰۷۷±۰/۰۰۴^{klm}
TS	۳/۸۲۰±۰/۰۲۱^{ab}	۳/۷۱۰±۰/۱۲۷^{abcde}	۰/۴۵۰±۰/۰۶۳^{cdefghij}	۳/۲۸۰±۰/۰۲۸^{hij}	۰/۰۳۵±۰/۰۰۹^{ab}	۰/۰۴۱±۰/۰۰۵^{bcd}	۰/۰۴۴±۰/۰۱۲^{fghijk}	۰/۰۴۹±۰/۰۱۱^{klm}
TP	۳/۶۴۰±۰/۰۰۹^{abcdefg}	۳/۵۱۰±۰/۰۵۶^{bcdefghi}	۳/۳۳۰±۰/۰۰۹^{fghij}	۳/۱۶۰±۰/۰۴۸^{ij}	۰/۰۵۰±۰/۰۱۰^{bcde}	۰/۰۵۴±۰/۰۰۸^{efghuj}	۰/۰۵۹±۰/۰۰۱^{jkl}	۰/۰۶۲±۰/۰۰۸^{lm}

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) در هرستون می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) در هرسطر می‌باشد.

T1: آب‌هلو + *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*، T2: آب‌توت‌فرنگی + *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، T3: آب هلو + *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، T4: آب توت فرنگی +*لاکتوباسیلوس ورمی فرم*، T5: آب هلو +*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* +*لاکتوباسیلوس ورمی فرم*، T6: آب توت فرنگی +*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* +*لاکتوباسیلوس ورمی فرم*

TS: آب هلو (شاهد)، TP: آب توت‌فرنگی (شاهد)

لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم) تعلق داشت. بیشترین میزان اسیدیته به ترتیب متعلق به تیمار T۲ (آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*)، T۶ (آب توت‌فرنگی، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) و T۴ (آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) بود در حالی که کمترین اسیدیته نیز به تیمارهای Ts (آب هلو شاهد) و T۳ (آب هلو و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) تعلق گرفت. مطابق با نتایج مذکور اسیدسازی محصول پروبیوتیک نسبت به شاهد، طی تولید و گرمخانه‌گذاری بیشتر بوده است.

ارزیابی مواد جامد محلول (بریکس) و قند احیاءکننده نمونه‌های آب هلو و آب توت‌فرنگی حاوی *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* طی ۲۱ روز دوره نگهداری

نتایج حاصل از مقایسه میانگین مواد جامد محلول (بریکس) نمونه‌ها و قند احیاءکننده نمونه‌ها در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد طی ۲۱ روز نگهداری، میزان مواد جامد محلول در تمامی تیمارها کاهش یافت. محدوده تغییرات بریکس در محدوده g/۱۰۰g ۶/۲۱۱ تا g/۱۰۰g ۹/۹۲۴ تغییر کرد که کمترین در تیمار Tp (آب توت‌فرنگی شاهد) در روز ۲۱ و بیشترین در T۳ (آب هلو و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) در روز صفر مشاهده شد. نتایج نشان داد میزان قند احیاء در تمامی تیمارها طی مدت زمان نگهداری، کاهش یافت. مطابق با نتایج میزان قند احیاءکننده نمونه‌های مورد آزمون در محدوده g/۱۰۰ml ۶ تا g/۱۰۰ml ۱۸ بود که کمترین مقدار آن در دو تیمار T۲ (آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) و T۴ (آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) در روز ۲۱ و بیشترین در تیمارهای T۱ (آب هلو و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*)، T۳ (آب هلو و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*)، T۵ (آب هلو و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) و Ts (آب هلو شاهد) در روز صفر مشاهده گردید.

ارزیابی قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها نمونه‌های آب هلو و آب توت‌فرنگی حاوی *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* طی ۲۱ روز دوره نگهداری

نتایج حاصل از مقایسه میانگین قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در جدول ۵ ارائه شده است. زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در تمامی تیمارها با گذشت زمان کاهش یافت. پس از ۲۱ روز نگهداری، بیشترین قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در تیمار T۵ (آب هلو، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) و کمترین قابلیت زنده‌مانی در تیمار T۴ (آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) مشاهده گردید. محدوده تغییرات قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در $۱۰^{۷}$ × ۵/۴۸ cfu/ml تا $۱۰^{۸}$ × ۸ cfu/ml بود که کمترین در تیمار T۴ (آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) در روز ۲۱ و بیشترین در تمامی تیمارهای روز صفر مشاهده گردید. بیشترین قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها به تیمارهای حاوی هلو به همراه ترکیبی از باکتری‌ها و پس از آن باکتری پروبیوتیک منفرد تعلق گرفت در حالی که کمترین میزان این پارامتر در تیمارهای حاوی توت‌فرنگی که حاوی باکتری‌های پروبیوتیک منفرد بودند اختصاص یافت.

ارزیابی رنگ ظاهری و طعم آب هلو و آب توت‌فرنگی حاوی *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* طی ۲۱ روز دوره نگهداری

نتایج حاصل از مقایسه میانگین رنگ ظاهری و طعم نمونه‌ها در جدول ۶ ارائه شده است. امتیاز رنگ ظاهری تیمارها در محدوده ۳/۵ تا ۵ بود که کمترین امتیاز در تیمارهای T۲

www.SID.ir

Archive of SID

(آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*)، T۴ (آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) و Tp (آب توت‌فرنگی شاهد) همگی در روز ۲۱ و بیشترین امتیاز رنگ ظاهری در تیمارهای روز صفر مشاهده گردید. امتیاز طعم در محدوده ۳/۵ تا ۵ بود. بیشترین امتیاز طعم پس از طی دوره نگهداری در تیمار T۶ (آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) و کمترین میزان آن در تیمارهای T۲ (آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*)، T۳ (آب هلو و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) و T۴ (آب توت‌فرنگی و *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*) مشاهده گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی خواص پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*

مطابق با استاندارد شماره ۱۹۴۵۹، نباید تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* شمارش شده کمتر از 10^6 cfu/ml باشد، بنابراین خاصیت پروبیوتیکی آن از لحاظ مقاومت به اسید تایید گردید.

همچنین مقاومت به نمک صفراوی باید کمتر از ۰/۴ باشد و مقاومت به شیره معده نیز نباید کمتر از 10^6 باشد که براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۴۵۹ این دو شاخص در محدوده استاندارد بودند. از طرفی عدم فعالیت همولیتیک و هیدرولیز ال- آرژنین باید منفی باشد که این دو پارامتر نیز در محدوده استاندارد بوده و مغایرتی با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۴۵۹، نداشتند (۱۲). بنابراین با توجه به آزمون‌های ارزیابی خصوصیات باکتری‌های پروبیوتیک به طور معنی‌داری ثابت گردید که گونه‌های پروبیوتیک جدا شده از عسل معده زنبوران عسل یعنی *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* دارای خصوصیات پروبیوتیکی بودند.

pH و اسیدیته نوشیدنی‌های پروبیوتیک

pH و اسیدیته طی دوره نگهداری در تمامی تیمارهای مورد بررسی کاهش یافت علت کاهش pH و افزایش اسیدیته طی دوره نگهداری را می‌توان در مصرف قند توسط باکتری‌های پروبیوتیک بخصوص با گذشت زمان و تولید اسید دانست. با توجه به نتایج به‌دست آمده، میزان کاهش pH و افزایش اسیدیته به گونه پروبیوتیک مورد استفاده بستگی دارد که این مورد مربوط به سرعت بالاتر رشد گونه در تخمیر لاکتیکی می‌باشد. هوپرت[1] و همکاران، به این نتیجه رسیدند که پروبیوتیک‌ها برای رشد به قند نیاز دارند که منجر به تولید اسید بیشتر و افزایش اسیدیته می‌گردد (۱۹). چارالامپوپولوس و لکاکول[2]، pH آبمیوه‌های انار و لیمو پروبیوتیک حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را طی مدت زمان ماندگاری بررسی کردند. نتایج نشان داد که pH آب انار از ۳/۲۵ به ۳/۲۱ و pH آب لیمو از ۲/۵۲ به ۲/۵۱ رسید که این نتایج حاکی از تغییرات بسیار جزیی pH آبمیوه‌ها در طی این زمان نگهداری داشت (۲۰). پاک‌بین و همکاران، بر روی تخمیر نوشیدنی توت‌فرنگی با استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک (*لاکتوباسیلوس دلبروکی*[3] C3، *لاکتوباسیلوس کازئی* A4 و *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* D7) پرداختند که هر سه سوش باکتری باعث افزایش معنادار اسیدیته گردید، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۲۱). نتایج نشان داد در تمام طول دوره نگهداری، بیشترین pH و کمترین میزان اسیدیته آبمیوه‌های پروبیوتیک متعلق به تیمارهای حاوی آب هلو و کمترین pH و بیشترین اسیدیته متعلق به تیمارهای حاوی آب توت‌فرنگی بود که این می‌تواند مربوط به pH اولیه آب هلو (۳/۸۲) باشد که بیشتر از pH اولیه آب توت‌فرنگی (۳/۶۴) بوده است. پریرا[4] و همکاران، نوشیدنی پروبیوتیکی آب سیب گونه Cashew تخمیر شده با باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*[5] را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که *لاکتوباسیلوس کازئی* باعث کاهش pH از ۴/۲۸ به ۳/۷۹ در پایان ۴۲ روز نگهداری در ۴ °C گردید که با نتایج این تحقیق مطابقت

1 Hoppert
2 Charalampopoulos and Nualkaekul
3 *Lactobacillus delbrueckii*
4 Pereira
5 *Lactobacillus casei*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۴. ارزیابی میانگین تغییرات مواد جامد محلول (بریکس) و قند احیاکننده آب هلو و آب توت‌فرنگی تلقیح شده با*لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و شاهد طی ۲۱ روز نگهداری

تیمار	مواد جامد محلول (بریکس)				قند احیاءکننده			
	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم
T1	۹/۹۲۰±۰/۱۷۰^{a}	۹/۷۴۵±۰/۱۵۵^{ab}	۹/۲۳۱±۰/۰۲۱^{abcd}	۸/۶۸۷±۰/۰۸۹^{cdefg}	۱۸/۰۰۰±۱/۴۱۴^{a}	۱۸/۰۰۰±۱/۱۳۱^{a}	۱۶/۰۰۰±۰/۱۸۴^{abc}	۱۴/۰۰۰±۱/۰۷۵^{cd}
T2	۷/۸۷۴±۰/۲۱۲^{fghij}	۷/۵۱۴±۰/۱۴^{ijkl}	۷/۱۱۲±۰/۰۱۷^{klm}	۶/۷۵۳±۰/۰۲۸^{klmn}	۹/۰۰۰±۰/۷۰۷^{fg}	۹/۰۰۰±۰/۶۳۶^{fg}	۶/۹۳۵±۰/۳۶۱^{gh}	۶/۰۰۰±۰/۲۴۰^{h}
T3	۹/۹۲۴±۰/۲۴۰^{a}	۹/۶۸۴±۰/۰۲۹^{ab}	۹/۱۸۱±۰/۳۷۴^{abc}	۸/۷۲۹±۰/۰۲۶^{cdef}	۱۸/۰۰۰±۰/۹۹۰^{a}	۱۸/۰۰۰±۰/۲۹۷^{a}	۱۶/۰۰۰±۱/۱۳۱^{abc}	۱۴/۰۰۰±۰/۲۶۹^{cd}
T4	۷/۸۵۴±۰/۱۹۸^{ghij}	۷/۶۳۸±۰/۰۸۹^{hij}	۷/۱۲۵±۰/۰۳۵^{jklm}	۶/۷۱۱±۰/۰۱۴^{mn}	۹/۰۰۰±۰/۴۲۴^{fg}	۹/۰۰۰±۱/۰۶۱^{fg}	۷/۰۰۰±۰/۵۹۴^{gh}	۶/۰۰۰±۰/۲۴۰^{h}
T5	۸/۴۱۵±۰/۳۵۴^{defg}	۸/۱۹۷±۰/۰۸۲^{hij}	۷/۷۵۴±۰/۰۲۸^{hij}	۷/۲۱۷±۰/۰۲۴^{jklm}	۱۸/۰۰۰±۰/۵۶۶^{a}	۱۴/۰۰۰±۰/۴۳۸^{cd}	۱۲/۰۰۰±۰/۳۲۵^{de}	۱۰/۰۰۰±۰/۷۵۰^{ef}
T6	۷/۷۶۲±۰/۲۶۹^{hij}	۷/۵۵۷±۰/۱۰۵^{hijkl}	۷/۰۴۵±۰/۰۵۲^{jklmn}	۶/۵۱۶±۰/۰۲۲^{mn}	۹/۰۰۰±۰/۵۳۷^{fg}	۹/۰۰۰±۰/۲۵۵^{fg}	۷/۰۰۰±۰/۲۲۶^{gh}	۸/۰۰۰±۰/۳۱۱^{fgh}
TS	۹/۱۳۰±۰/۲۱۲^{abcde}	۸/۸۹۰±۰/۰۰۹^{bcde}	۸/۲۸۶±۰/۰۳۸^{efghi}	۷/۶۰۱±۰/۰۳۲^{hijk}	۱۸/۰۰۰±۱/۲۷۳^{a}	۱۸/۰۰۰±۰/۶۰۸^{a}	۱۷/۰۰۰±۰/۸۲۰^{ab}	۱۵/۰۰۰±۰/۶۰۸^{bc}
TP	۷/۴۱۷±۰/۳۸۲^{jkl}	۷/۲۰۹±۰/۰۶۰^{jklm}	۶/۷۴۶±۰/۰۶۷^{klmn}	۶/۲۱۱±۰/۰۳۱^{n}	۹/۵۰۰±۰/۲۱۲^{efg}	۹/۰۰۰±۰/۲۱۲^{fg}	۸/۰۰۰±۰/۱۵۶^{fgh}	۷/۰۰۰±۰/۲۹۷^{gh}

حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار ($p\leq۰/۰۵$) در هرستون می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار (p≤۰/۰۵) در هرسطر می‌باشد.

T1: آب‌هلو + *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*، T2: آب‌توت‌فرنگی + *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، T3: آب هلو + *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، T4: آب‌توت فرنگی +*لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*، T5: آب هلو +*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* +*لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*، T6: آب توت‌فرنگی +*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* +*لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*

TS: آب هلو (شاهد)، TP: آب توت‌فرنگی (شاهد)

جدول۵. ارزیابی میانگین تغییرات قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها (cfu/ml) آب هلو و آب توت‌فرنگی تلقیح شده با*لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و شاهد طی ۲۱ روز نگهداری

تیمار	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم
T1	$۸\times۱۰^{۸}\pm ۰^{a}$	$۸/۸۷\times۱۰^{۷}\pm۳/۴\times۱۰^{۶bc}$	$۷/۶۶\times۱۰^{۷}\pm۱/۹\times۱۰^{۶e}$	$۶/۷۹\times۱۰^{۷}\pm۹/۲\times۱۰^{۵g}$
T2	$۸\times۱۰^{۸}\pm ۰^{a}$	$۷/۶۶\times۱۰^{۷}\pm۱/۶\times۱۰^{۶e}$	$۶/۸۵\times۱۰^{۷}\pm۱/۳\times۱۰^{۶g}$	$۵/۸۹\times۱۰^{۷}\pm۶/۷\times۱۰^{۵hi}$
T3	$۸\times۱۰^{۸}\pm ۰^{a}$	$۸/۶۵\times۱۰^{۷}\pm۱/۸\times۱۰^{۶bc}$	$۷/۱۹\times۱۰^{۷}\pm۱/۱۰\times۱۰^{۶fg}$	$۶/۱۴\times۱۰^{۷}\pm۵/۵\times۱۰^{۵h}$
T4	$۸\times۱۰^{۸}\pm ۰^{a}$	$۷/۶۱\times۱۰^{۷}\pm۱/۱\times۱۰^{۶ef}$	$۶/۸۷\times۱۰^{۷}\pm۱/۳۱\times۱۰^{۶g}$	$۵/۴۸\times۱۰^{۷}\pm۴/۸\times۱۰^{۵i}$
T5	$۸\times۱۰^{۸}\pm ۰^{a}$	$۹/۸۹\times۱۰^{۷}\pm۹/۵\times۱۰^{۶cd}$	$۸/۹۷\times۱۰^{۷}\pm۱/۷۸\times۱۰^{۶b}$	$۷/۹۹\times۱۰^{۷}\pm۵/۹\times۱۰^{۵de}$
T6	$۸\times۱۰^{۸}\pm ۰^{a}$	$۸/۴۵\times۱۰^{۷}\pm۹/۵\times۱۰^{۵cd}$	$۸/۱۴\times۱۰^{۷}\pm۱/۳۱\times۱۰^{۶d}$	$۷/۵۷\times۱۰^{۷}\pm۸/۰۶\times۱۰^{۵ef}$
TS	$۰/۰\pm۰/۰^{j}$	$۰/۰\pm۰/۰^{j}$	$۰/۰\pm۰/۰^{j}$	$۰/۰\pm۰/۰^{j}$
TP	$۰/۰\pm۰/۰^{j}$	$۰/۰\pm۰/۰^{j}$	$۰/۰\pm۰/۰^{j}$	$۰/۰\pm۰/۰^{j}$

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیارنشان داده شده است .

حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار (p≤۰/۰۵) در هرستون می‌باشد.

T1: آب‌هلو + *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم*، T2: آب‌توت‌فرنگی+ *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، T3: آب هلو+ *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، T4: آب توت‌فرنگی+ *لاکتوباسیلوس ورمی فرم*، T5: آب هلو +*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* +*لاکتوباسیلوس ورمی فرم*، T6: آب توت‌فرنگی +*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*+*لاکتوباسیلوس ورمی فرم*

TS: آب هلو (شاهد)، TP: آب توت‌فرنگی (شاهد)

داشت (۲۲). براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۳۷ (نوشیدنی میوه‌ای (بدون گاز)- ویژگی ها)، محدوده pH محصول نهایی بایستی ۴-۲ باشد و با توجه به اینکه محدوده pH همه نمونه های این تحقیق در این محدوده است، لذا نتایج pH نوشیدنی‌های پروبیوتیک تولید شده در این مطالعه، منطبق بر استاندارد ملی ایران بود (۲۳).

ارزیابی مواد جامد محلول (بریکس) و قند احیاءکننده در نوشیدنی‌های پروبیوتیک

نتایج ارزیابی بریکس نشان داد طی ۲۱ روز نگهداری، میزان مواد جامد محلول در تمامی تیمارها کاهش یافت. در توجیه آن اینگونه می‌توان بیان نمود که با توجه به اینکه بریکس شامل مواد جامد محلول در آب است و قندهای موجود در آبمیوه جزئی از بریکس محسوب می‌شوند، با انجام عمل تخمیر توسط باکتری و تبدیل شدن قندها به اسیدهای آلی (اسید لاکتیک) و یک سری ترکیبات فرار، کاهش در مقدار قند و در نهایت کاهش بریکس اتفاق افتاد. امیرخمیریان و همکاران، در پژوهشی که به بررسی نوشیدنی پروبیوتیک پرتقالی تولید شده بر پایه تراوه پرداختند مشاهده نمودند که از نظر بریکس و ماده خشک در طی زمان نگهداری در نوشیدنی‌های بهینه پروبیوتیک و غیرپروبیوتیک اختلاف معنی‌داری مشخص نگردید (۲۴). باکوچه[1] و همکاران، در نتایج مشابهی تغییر چندانی در مقادیر ماده خشک و بریکس نوشیدنی گلابی خاردار تهیه شده بر پایه آب پنیر پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۴ °C مشاهده ننمودند (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر جاورسکا[2] و همکاران،

1 Baccouche

2 Jaworska

www.SID.ir

Archive of SID

نیز ثبات در ماده خشک و بریکس را در نکتار انگور فرنگی سیاه پس از ۱۲ ماه نگهداری گزارش نمودند (۲۶). قربانی و همکاران، در بررسی امکان استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوبا سیلوس کانکئی*[1] جدا شده از عسل در تهیه آب انار پروبیوتیک مشاهده نمودند که با افزایش مدت زمان نگهداری و جمعیت پروبیوتیک، میزان اسیدیته افزایش و میزان pH و بریکس به طور معنی‌داری کاهش یافت (۲۷). نتایج نشان داد میزان بریکس در نمونه های حاوی آب هلو بالاتر از نمونه های حاوی آب توت‌فرنگی بود که علت آن بالاتر بودن مواد جامد محلول اولیه آب‌هلو (۹/۱۳۰) در مقایسه با آب توت‌فرنگی (۷/۴۱۷) بوده است.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین قند احیاءکننده نمونه‌ها در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد میزان قند احیاء در تمامی تیمارها طی مدت زمان نگهداری، کاهش یافت. علت آن مصرف قند توسط پروبیوتیک‌ها در طی زمان است که البته به نوع باکتری نیز بستگی دارد. موسوی و همکاران، آب انار را بوسیله ۴ گونه *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* تخمیر کردند و میزان قند گلوکز را نیز بررسی نمودند. نتایج نشان داد که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* در ساعت‌های اولیه تخمیر pH را به سرعت افزایش داده و مصرف قند نیز در آن‌ها بیشتر از ۲ گونه دیگر بوده است (۲۸). وانگ[2] و همکاران، گزارش کردند که گلوکز یک منبع انرژی عالی برای لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها می‌باشد (۲۹). کون[3] و همکاران، تخمیر آب هویج توسط گونه‌های *بیفیدوباکتریوم (بیفیدوباکتریوم لاکتیس BB-12*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم B7.1*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم B3.2*) را مورد بررسی قرار دادند. در طی تخمیر مقدار قندهای گلوکز و ساکارز بطور معنی‌داری کاهش یافت در حالی‌که در مقدار فروکتوز تغییر چندانی حاصل نشد (۳۰). ساو[4] و همکاران، تخمیر میوه‌های گرمسیری شامل خربزه، هندوانه و گلابی چینی به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوبا سیلوس دلبروکی* و *لاکتوبا سیلوس بولگاریکوس*) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که گلوکز به خوبی مصرف و اسید لاکتیک تولید میگردد و فروکتوز در طول تخمیر استفاده نمی شود (۳۱). بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۳۷ (نوشیدنی میوه‌ای (بدون گاز)- ویژگی‌ها)، محدوده قند گلوکز افزوده شده به محصول نهایی بایستی حداکثر ۸۰ درصد بریکس باشد و با توجه به اینکه میزان افزوده شده قند گلوکز به همه نمونه‌های این تحقیق پایین‌تر از ۸۰ درصد بریکس بود، لذا نتایج قند گلوکز نوشیدنی‌های پروبیوتیک تولید شده در این مطالعه، منطبق بر استاندارد ملی ایران بود (۲۳).

ارزیابی قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس ورمی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در نوشیدنی‌های پروبیوتیک

بنا به تعریف فرآورده‌های پروبیوتیک، فعالیت متابولیک و زیستی باکتری های پروبیوتیک در تمامی مراحل تولید، نگهداری و هضم ماده‌غذایی در دستگاه گوارش مصرف‌کننده باید حفظ گردد. همچنین جمعیت مورد نیاز باکتری‌های پروبیوتیک در فرآورده نهایی غذایی جهت ایجاد اثرات مفید سلامت‌بخش بایستی 10^{6}cfu/g - 10^{7} باشد (۳۲). کارآیی پروبیوتیک ها در ماده‌غذایی، بستگی به تعداد اولیه پروبیوتیک‌های زنده، دمای نگهداری، نوع بسته‌بندی در طول نگهداری، مدت زمان نگهداری محصول و نوع ماده غذایی دارد (۳۳). به‌طورکلی، بقای سلولی به نژادهای مورد استفاده، برهمکنش مابین گونه‌های موجود، شرایط محیط کشت، محتوای اکسیژن، اسیدیته نهایی محصول و غلظت اسید لاکتیک و اسید استیک بستگی دارد (۳۴).

زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در تمامی تیمارها با گذشت زمان کاهش یافت. علت کاهش زنده مانی

1 *Lactobacillus kunkeei*
2 Wang
3 Kun
4 Saw

www.SID.ir

Archive of SID

پروبیوتیک‌ها طی دوره نگهداری در تیمارهای این تحقیق را می‌توان به کاهش pH و افزایش اسیدیته در نمونه‌ها نسبت داد. پس از ۲۱ روز نگهداری، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده در تمامی تیمارها تا پایان مدت نگهداری بیشتر از 10^6 بوده است بنابراین تمامی آبمیوه‌های تولیدی در این پژوهش تا پایان مدت زمان نگهداری، عملگرا و فراسودمند بودند. توتونچی و همکاران، با استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* ۴۳۱ با سطح تلقیح اولیه 10^8 cfu/ml به تولید آب انگور قرمز ارگانیک پروبیوتیک پرداختند و نتیجه گرفتند که اگر چه بقای سلولی این باکتری‌ها در آب انگور قرمز تخمیر شده به تدریج در طی نگهداری سرد در ۴ °C کاهش می یابد، اما شمارش سلول های زنده باکتری زنده *لاکتوبا سیلوس کازئی* ۴۳۱ حتی پس از ۴ هفته نگهداری در ۴ °C از 10^6 cfu/ml بالاتر بود (۳۵). فازلی[1] و همکاران، به بررسی فعالیت آنتاگونیستی آب هندوانه پروبیوتیک حاوی سویه‌های لاکتوباسیل بر علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* پرداختند و مشاهده نمودند که لاکتوباسیلوس‌ها در دمای ۴ °C به مدت زیادی زنده می‌مانند. به ویژه *لاکتوباسیلوس کازئی* که نسبت به سویه‌های دیگر استفاده شده (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) زنده‌مانی بیشتری داشت (۳۶). در حالی که در آب کلم *لاکتوباسیلوس کازئی* بعد از دو هفته نگهداری در یخچال از بین رفت که دلیل آن را pH پایین و میزان بالای اسید ذکر شد (۳۷). نتایج این تحقیق نشان داد آب هلو در مقایسه با آب توت‌فرنگی و مخلوطی از پروبیوتیک‌ها در مقایسه با استفاده از آن‌ها بصورت منفرد، شرایط مساعدتری برای زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها می‌باشد. علت بالاتر بودن رشد پروبیوتیک ها در آب هلو نسبت به آب توت‌فرنگی را می‌توان در مقادیر بالاتر قند احیاءکننده در آن نسبت داد بطوری که شواهد نشان داده‌اند که افزودن تک قندی‌ها (منوساکاریدها) و دو قندی‌ها (دی‌ساکاریدها) به محیط پایه فرآورده‌های تخمیری پروبیوتیک سبب تشدید رشد برخی از پروبیوتیک‌ها می‌شود. افزایش قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها به احیاءکننده بودن قند وابسته است. علت اثر تحریک‌کنندگی قندهای احیاءکننده بر پروبیوتیک‌ها وجود پمپ پروتونی ATP-آز در غشای لاکتوباسیلوس‌ها است که در محیط‌های اسیدی، یون هیدروژن را از درون سلول به بیرون آن جابجا می‌کند (۳۸). لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک در این شرایط با مصرف این قندها فعالیت پمپ پروتونی را حفظ می‌کنند. باکتری‌ها با قرار داشتن در مرحله رشد در مقایسه با مرحله لگاریتمی رشد نیاز کمتری به ATP و انرژی دارند. بر این اساس، نیاز باکتری‌های لاکتیک به ترکیبات قندی در حین تخمیر بیشتر از دوران نگهداری یخچالی است (۳۹). آبمیوه ها حاوی مواد مغذی مانند ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و پلی‌فنول‌ها بوده و اغلب به دلیل دارا بودن ترکیبات مهارکننده اکسیژن مثل آسکوربیک اسید می‌توانند شرایط بی‌هوازی را تقویت کنند و همچنین دارای قند فراوانی بوده که همه این عوامل، رشد پروبیوتیک‌ها را تحریک می‌کنند.

ارزیابی رنگ ظاهری و طعم نوشیدنی‌های پروبیوتیک

امتیاز رنگ ظاهری و طعم نوشیدنی‌های پروبیوتیک اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند. که علت این تفاوت می‌تواند مربوط به نوع آبمیوه، نوع باکتری پروبیوتیک موجود در آبمیوه و نحوه فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک در آبمیوه طی دوره نگهداری باشد. شیخ‌قاسمی و زمردی، به بررسی خواص حسی آب سیب حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد و کپسوله شده پرداختند و مشاهده نمودند که افزودن *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به آب سیب موجب کاهش میزان شفافیت و افزایش کدورت آب سیب شد ولی تاثیر منفی بر رنگ و طعم، خواص فیزیکوشیمیایی و حسی نمونه‌ها نداشت و افراد مایل به استفاده از آب سیب پروبیوتیک به شکل آزاد و کپسوله شده بودند (۴۱).

نتایج این پژوهش نشان داد از آنجا که pH اولیه آب هلو بیشتر از pH اولیه آب توت‌فرنگی مشاهده شد، در تمام

1 Fazeli

www.SID.ir

Archive of SID

طول دوره نگهداری، بیشترین pH و کمترین اسیدیته متعلق به تیمارهای حاوی آب هلو و کمترین pH و بیشترین اسیدیته متعلق به تیمارهای حاوی آب توت‌فرنگی بود. با گذشت زمان نیز از میزان pH کاسته و اسیدیته افزایش یافت. در تمامی روزها، تیمارهای حاوی آب هلو دارای بیشترین و تیمارهای حاوی آب توت‌فرنگی دارای کمترین میزان مواد جامد محلول، قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها و قند احیاءکننده بودند. همچنین تیمارهای آب هلو حاوی یک نوع باکتری پروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد و ترکیب دو نوع باکتری پروبیوتیک دارای بیشترین میزان مواد جامد محلول بودند. بیشترین قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها به تیمارهای حاوی آب هلو به همراه ترکیبی از باکتری‌ها و پس از آن باکتری پروبیوتیک منفرد تعلق گرفت در حالی‌که کمترین میزان این پارامتر در تیمارهای حاوی توت‌فرنگی که حاوی باکتری‌های پروبیوتیک منفرد بودند اختصاص یافت. در تمامی تیمارها با گذشت زمان قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها کاهش می‌یابد که البته در تمامی تیمارها بیشتر از 10^6 بوده و محصول تا پایان مدت زمان نگهداری، عملگرا و فراسودمند است. میزان کاهش قند احیاءکننده در تیمار T5 (آب‌هلو، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی فرم*) از همه تیمارها بصورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود که نشان‌دهنده مصرف زیاد قندهای احیاکننده در صورت استفاده از ترکیب باکتری‌های پروبیوتیک بوده که منطبق بر قابلیت زنده‌مانی این باکتری‌ها است. در مورد امتیاز رنگ، تیمار آب هلو حاوی دو گونه پروبیوتیک بصورت همزمان بالاترین و پس از آن سایر تیمارهای آب هلو بالاترین امتیاز و تیمارهای حاوی آب توت‌فرنگی حاوی گونه پروبیوتیک بصورت تک کمترین امتیاز رنگ را بخود اختصاص دادند. بالاترین امتیاز طعم را تیمارهای حاوی ترکیب دو باکتری پروبیوتیک بخود اختصاص داد ند وکمترین آن مربوط به دو تیمار آب توت فرنگی حاوی دو باکتری که بصورت مجزا استفاده شده بودند تعلق گرفت. با گذشت زمان نیز از امتیاز رنگ و طعم کاسته گردید. در نهایت تیمار T5 (آب‌هلو، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی فرم*) که بالاترین خواص حسی (رنگ و طعم) و بیشترین قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را بخود اختصاص داد و بالاترین میزان مصرف قند احیاءکننده را دارا بود و از نظر مواد جامد محلول و اسیدیته و pH رتبه خوبی داشت به عنوان تیمار برتر انتخاب و معرفی گردید. از آنجایی که استفاده همزمان *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس ورمی فرم* جدا شده از عسل در فرمولاسیون نوشیدنی، خواص پروبیوتیکی و حسی مطلوبی را نشان داد بنابراین استفاده از دو باکتری مذکور به صورت همزمان در سایر محصولات غذایی نیز پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1. Majeed M, Prakash L. Probiotics for health & wellbeing. Sabinsa Corporation. 2007:1-12.

۲. محمدی ر.، ذبیح زاده م.، دلشادیان ز.، سرلک ز.، مرتضویان س ا م.، یار حسینی م.. بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک سویه‌های مختلف پروبیوتیک در نوشیدنی مالت طی دوره نگهداری یخچالی، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۳۹۵؛ ۳: ۵۳-۶۲.

3. Kasahara R, Nakamura J, Koizumi Y, Mitsui A, Sasaki M, editors. Age dependent Changes in intestinal microflora of honeybee. IUSSI XV Congress Proceedings; 2006.

4. Killer J, Votavova A, Valterová I, Vlkova E, Rada V, Hroncova Z. Lactobacillus bombi sp. nov., from the digestive tract of laboratoryreared bumblebee queens (Bombus terrestris). International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2014;64(Pt 8):2611-7.

5. Tajabadi N, Mardan M, Saari N, Mustafa S, Bahreini R, Manap MYA. Identification of Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus and Lactobacillus fermentum from honey stomach of honeybee. Brazilian Journal of Microbiology. 2013;44(3):717–22.

۶. جیرانی خامنه، م.، مقصودلو، یحیی.، بررسی اثر کیتوزان بر برخی ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی آب پرتقال، بهداشت مواد غذایی، ۱۳۹۱؛ ۲(۴): ۳۴-۵۲.

7. Vuyst L, Falony G, Leroy G. Probiotics in fermented sausages. Meat Science. 2008;80 (1):75–8.

8. Cruz AG, Antunes AEC, Sousa ALOP, Faria JAF, Saad SMI. Ice-cream as a probiotic food carrier. Food Research International. 2009;42(9):1233-9.

www.SID.ir

Archive of SID

9. Shah NP, Ravula R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. Australian Journal of Dairy Technology. 2000;55(3):139-44.

10. Tajabadi N, Mardan M, Shahaimi M, Manap MYA. Isolation and identification of Entercoccus sp from honey stomach of honeybee based on biochemical and 16s RNA sequencing analysis. International journal of probiotic and perbiotic. 2011;6(2):95-100.

11. Tajabadi N, Mardan M, Shahaimi M, Manap MYA, Feizabadi F, Nateghi L, et al. A novel lactic bacterium isolated from honey. Journal of Food Agriculture and Environment. 2012;10(2):263-7.

۱۲. استاندارد ملی ایران. ۱۳۹۲. استاندارد شماره ۱۹۴۵۹. میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک- ویژگی‌ها و روشهای آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

13. Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. In vitro adherence properties of Lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli. International Journal of Food Microbiology. 2001;67(3):207-16.

14. Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. Periodontology. 2009;51(1):141-51.

۱۵. استاندارد ملی ایران. ۱۳۸۱. استاندارد شماره ۳۷۳. فرآورده‌های میوه و سبزی تعیین اسیدیته- روش آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران .

16. Tamminen M, Salminen S, OuwehandAC. Fermentation of Carrot Juice by Probiotics: Viability and Preservation of Adhesion. International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. 2013;2(1):10-5.

17. Shu XZ, Zhu KJ. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. International Journal of Pharmacology. 2002;233(1-2):217–25.

18. Luckow T, Sheehan V, Fitzgerald G, Delahunty C. Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. Appetite. 2006;47(3):315-23.

19. Hoppert K, Zahn S, Jänecke L, Mai R, Hoffmann S, Rohm H. Consumer acceptance of regular and reduced-sugar yogurt enriched with different types of dietary fiber. International Dairy Journal. 2013;28(1):1–7.

20. Charalampopoulos D, Nualkaekul S. Survival of Lactobacillus plantarum in model solutions and fruit juices. International Journal of Food Microbiology. 2011;146(2):111–7.

۲۱. پاک بین، ب؛ هادی نژاد، م؛ صادقی، س. تولید نوشیدنی پروبیوتیک توت‌فرنگی به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک. مجموعه مقالات همایش ملی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان، ۱۳۹۰؛ ۱-۴.

22. Pereira ALF, Maciel TC, Rodrigues S. Probitic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus casei. Journal of Food Research International. 2011;44(5):1276-83.

۲۳. استاندارد ملی ایران. ۱۳۸۶. استاندارد شماره ۲۸۳۷. نوشیدنی‌های میوه‌ای بدون گاز ویژگی‌ها. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۲۴. امیرخمیریان، ر؛ جوینده، ح؛ حصاری، ج؛ برزگر، ح. بهینه‌سازی و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی نوشیدنی پروبیوتیک پرتقالی تولید شده بر پایه تراوه. مجله علوم و صنایع غذایی، ۱۳۹۶؛ ۱۴(۶۵): ۱۸۵-۱۹۷.

25. Baccouche A, Ennouri M, Felfoul I, Attia H. A physical stability study of whey-based prickly pear beverages. Food Hydrocolloids. 2013;33(2):234-44.

26. Jaworska G, Pogon K, Klimek M, Gwozdz E. Quality changes of blackcurrant nectar under different storage conditions. Journal of Life Sciences Research. 2014;1(1):16-20.

۲۷. قربانی، ن؛ ناطقی، ل؛ تاج‌آبادی، ن. بررسی امکان استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکنی* جدا شده از عسل در تهیه آب انار پروبیوتیک. مجله علوم و صنایع غذایی، ۱۳۹۷. دوره ۱۵، شماره ۷۶، ص ۱۳-۲۳.

۲۸. موسوی، ز. تولید نوشیدنی سلامت بر پایه انار. ۱۳۸۸. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، رشته علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران.

29. Wang YC, Yu RC, Yang HY, Chou CC. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. Food Microbiology. 2003;20(3):333–8.

30. Kun S, Rezessy-Szabo JM, Nguyen QD, Hoschke A. Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected Bifidobacterium strains. Journal of Process Biochemistry. 2008;43(8):816-21.

31. Saw LK, Chen S, Wong SH, Tan SA, Goh KKT. Fermentation of tropical fruit juices by Lactic acid

www.SID.ir

Archive of SID

bacteria. 12th Asean Food Conference; Bangkok, Thailand2011.

32. Talwalkar A, Miller CW, Kailasapathy K, Nguyen MH. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. International Journal of Food Science and Technololgy. 2004;39(6):605-11.

33. Adams MR, Mrteau P. On the safety of lactic acid bacteria from food. International Journal of Food Microbiology. 1995;27(2-3):263-4.

34. Dickerman JM, Liberman S. Studies on the chemical nature of an antibiotic present in water extracts of cabbage. Journal of Food Science. 1952;17(1-6):438-41.

۳۵. توتونچی، پ؛ حصاری، ج؛ مرادی، م. تولید آب انگور قرمز ارگانیک با استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* ۴۳۱. مجموعه مقالات بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه شیراز، ۱۳۹۲؛ ۱-۴. .

36. Fazeli MR, Amirmozafari N, Nejad RG, Jamalifar H. Antagonistic Action of Watermelon Juice Probioticated Using different Strains of Lactobacilli against Salmonella typhimurium. Iranian Journal of Public Health. 2007;36(4):70-3.

37. Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. Bioresource Technology. 2006;97(12):1427–30.

38. Sanders JW, Venema G, Kok J. Environmental stress responses in Lactococcus lactis. Fems Microbiology Reviews. 1999;23(4):483-501.

39. Helland MH, Wicklund T, Narvhus JA. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. International Journal of Food Microbiology. 2004;91(3):305-13.

۴۰. شکرگزار، س؛ قبادی‌دانا، م؛ سلامی، م. بررسی امکان استفاده از نکتار پرتقال- انبه به عنوان حامل پروبیوتیک. فصلنامه علمی پژوهشی میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی. ۱۳۹۵؛ ۲(۱): ۱۵-۲۴.

۴۱. شیخ‌قاسمی، ش؛ زمردی، ش. تاثیر دمای نگهداری بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد و کپسوله شده در آب سیب. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۱۳۹۳؛ ۲۴(۱): ۱۴۳-۱۵۴.

www.SID.ir

Archive of SID

The study of probiotic properties of *Lactobacillus vermiform* and *Lactobacillua fermentom* isolated from honey and possibility of production probiotic peach juice and strawberry juice

Fateme Omidvar, **Mohammadreza Eshaghi***, Leila Nateghi

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin – Pishva Branch, Varamin, Iran.

Abstract

The use of probiotic supplements in the beekeeping industry can increase the growth rate and improve the feed conversion ratio and improve resistance to the disease and increase the production of honey. In this study, probiotics of two species of *Lactobacillus vermiform* and *Lactobacillus fermentum* isolated from honey bee stomach, under the diagnostic tests. The mentioned probiotic bacteria in quantities 10^8 cfu/ml as individually and mixed inoculated into natural peach and strawberries juice. The product tests included acidity acidity and pH assessment, soluble solids content (Brix), viability assessment of probiotic bacteria, evaluation of sugary regeneration, as well as sensory evaluation. The results showed that increasing the duration of maintenance and increasing the probiotic population increased acidity, pH, brix and also the percentage of reducing sugars significantly ($p\leq0.05$) deacreased. Also sensory properties of the treatments were significantly associated with decreasing acceptability during storage and also increasing the probiotic population ($p\leq0.05$). Over time, survival of probiotics was reduced in all treatments that the least reduction was observed in treatments contain mixing of two types of probiotics. Althought the number of probiotic bacteria during 21 days decreased but their number after 21 days of storage was higher than 10^6 cfu/ ml, so they were considered as probiotics in accordance with national standard for jouices. The results showed that the tratment contains peach juice with a population of 10^8 cfu/ml from the 50% mixture of *Lactobacillus vermiform* and *Lactobacillus fermentum* was selected as the optimal treatment.

Keywords: : Honey of bee stomach, *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus vermiform,* Probiotic peach juice, Probiotic strawberry juice

* eshaghi@iauvaramin.ac.ir

www.SID.ir