ارزیابی زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس و تاثیر آنها بر خواص فیزیکی شیمیایی آب سیب

رقیه سکوتی فر[۱]، فروغ شواخی[۲]، سلاله پروین نژاد[۳]، آیدا دادخواه[۴]

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاداسلامی ، ورامین ، ایران

۲- موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- دانش آموخته گروه صنایع غذایی ، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین ، ایران

۴- دانشجوی دکتری تخصصی ، گروه علوم و صنایع غذایی ، واحد سبزوار ، دانشگاه آزاد اسلامی ، سبزوار ، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۶/۱۷ تاریخ پذیرش:۹۶/۰۲/۱۷

چکیده

در این تحقیق اثر افزودن باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در سطوح ۱×۱۰^{۷}CFU/g، ۲×۱۰^{۷} CFU/g، ۴×۱۰^{۷} CFU/g بر ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی آب سیب در بازه زمانی صفر، ده، بیست و سی روز پس از تلقیح، گرمخانه‌گذاری (در دمای ۳۷°C) و سرد کردن (تا دمای ۵°C) بررسی شد. همچنین قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌های تلقیح شده در آب سیب در روزهای ذکر شده ارزیابی شد. نتایج با استفاده از آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی تجزیه و تحلیل و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد مقایسه شد. با افزایش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک تلقیحی، اسیدیته و مواد جامد محلول افزایش و pH به طور معنی داری کاهش یافت. تغییرات مقدار کدورت بسته به تعداد باکتری تلقیحی نسبت به شاهد متفاوت بود. از نظر نوع باکتری بین کدورت تیمارها اختلاف معنی داری وجود نداشت و با افزایش زمان نگهداری، مواد جامد محلول و اسیدیته آب سیب به‌طور معنی‌داری افزایش و pH و کدورت آب سیب کاهش یافت. طی مدت نگهداری جمعیت تمامی تیمارها بالاتر از $۱۰^{۶}$ CFU/g بود و تیمارهای با جمعیت تلقیحی بالاتر دارای تعداد سلول‌های پروبیوتیک بیشتری بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، آب سیب حاوی ۲×۱۰^{۷} CFU/g پروبیوتیک به‌عنوان بهترین تیمار مشخص شد.

واژه های کلیدی: آب سیب، بیفیدوباکتریوم لاکتیس، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، خواص فیزیکی‌شیمیایی

مسؤول مکاتبات:frshavakhi@yahoo.com

۱-مقدمه

در سال‌های اخیر انواع پروبیوتیک‌ها به‌دلیل فراسودمندی و کاهش بروز بیماری‌ها به‌ویژه برای کودکان بیمار مورد توجه و استقبال روزافزونی قرار گرفته‌اند (۶،۹ و ۵). پروبیوتیک‌ها، گروه خاصی از میکروارگانیسم‌های زنده هستند که با تاثیر بر فلور میکروبی بدن سبب اثرات مفید بر سلامتی میزبان می-شوند. آنها اکثراً متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلورمیکروبی روده‌ی انسان شامل گونه‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم همچنین برخی مخمرها و برخی سویه‌های اشرشیاکلی هستند (۱۸ و ۲۶). استفاده از پروبیوتیک‌ها در آب میوه می‌تواند جایگزین خوبی برای گروهی از مردم با نیازهای خاص نظیر گیاه‌خواری و افراد با واکنش‌های حساسیت به پروتئین‌های شیر باشد (۱۷). آب سیب نوشیدنی-ای پر مصرف، غنی از مواد مغذی، فاقد استارتر و مواد ناسازگار برای پروبیوتیک ها است و مقادیر قند بالای آن سبب رشد پروبیوتیک‌ها می‌شود (۱۲ و ۲۲). بیفیدوباکتریوم‌ها، باکتری‌های بی‌هوازی با pH بهینه رشد ۶/۵ تا ۷ و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس[1] میکروآئروفیل با بهینه رشد در pH ۵/۵ تا ۶ می‌باشد (۴ و ۱۳). از تاثیرات پروبیوتیک‌ها می توان به خواص ضدمیکروبی، افزایش ایمنی و فعالیت ضد سرطانی در بدن، بهبود قابلیت هضم شیر در افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز و کاهش کلسترول سرم اشاره کرد (۱۶). زنده-ماندن پروبیوتیک‌ها به عواملی مانند pH محصول، حضور سایرمیکروارگانیسم‌ها، دمای نگهداری و حضور ممانعت-کننده‌های میکروبی در سوبسترا بستگی دارد (۲). پروبیوتیک-ها نسبت به شرایط اسیدی محیط، حساس هستند (۱۲). در تحقیقات پیشین، امکان تولید آب هویج پروبیوتیک با استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (۳)، امکان رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس[2] در آب پرتقال و سیب به صورت آزاد و کپسوله (۱۹)، رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در آب پرتقال پروبیوتیک (۶)، امکان استفاده از چغندر قرمز به‌عنوان سوبسترای سویه‌های باکتری اسید لاکتیک برای تولید آب چغندر پروبیوتیک (۲۸) و تاثیر دمای نگهداری بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس آزاد و کپسوله شده در آب سیب بررسی شده است (۷). این تحقیق با هدف بررسی تاثیر سه متغیر جمعیت و نوع سویه‌های تلقیحی (بیفیدوباکتریوم لاکتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) و زمان نگهداری آب سیب بر قابلیت زنده مانی باکتری‌های مذکور و ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی آب سیب حاصله انجام شد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱- آماده سازی میکروارگانیسم‌ها

بیفیدوباکتریوم لاکتیس (PTCC 1736) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC 1643) به صورت خالص و لیوفیلیزه از کلکسیون سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. فعال‌سازی آنها در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MRS[3] مایع (Merck، آلمان) در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. سپس نمونه حاصل در ۹۵ میلی لیتر محیط کشت MRS مایع تلقیح شد و در شرایط فوق تکثیر شد. توده سلولی حاصله به وسیله سانتریفوژ با دور g ۱۵۰۰ برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد جداسازی شده و در دو مرحله با محلول استریل ۰/۱ درصدآب پپتونه رقیق شد. شرایط بی‌هوازی برای باکتری‌ها با استفاده از جار بی‌هوازی و سیستم گازپک بی‌هوازی Anaerocult © (Merck، آلمان) فراهم شد (۱۱).

برای کنترل میزان تلقیح و امکان تخمین تعداد با داشتن دانسیته نوری نمونه، منحنی کالیبراسیون دانسیته نوری در برابر تعداد به دو روش اسپکتوفتومتر و میکروسکوپی رسم شد. لذا از لوله های آزمایش حاوی کشت به وسیله سرم فیزیولوژی سری رقت‌های در سه تکرار تهیه و دانسیته نوری لوله‌ها با

[1] Lactobacillus acidophilus
[2] Bifidobacterium lactis
[3] de Man, *Rogosa* and Sharpe

دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. برای شمارش تعداد باکتری‌های محیط کشت به کمک میکروسکوپ از روش شمارش صفحه‌ای سطحی استفاده شد (۵ و ۲۵).

۲-۲- تهیه آب سیب پروبیوتیک

آب سیب (مواد جامد محلول ۱۳/۸٪، pH ۳/۸۱، اسیدیته برحسب اسید مالیک ۰/۲۸٪، پروتئین ۰/۲۲٪، فیبر رژیمی ۰٪، ویتامینC ۳۰ mg/۱۰۰ml، چگالی نسبی در ۲۰°C، ۱/۰۵) مورد استفاده در این تحقیق از شرکت سن ایچ تهیه شد و سپس باکتری‌های بیفیدوباکتریوم لاکتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با درصدهای مختلف (مطابق جدول ۱) در فرمولاسیون آب سیب به کار برده شد. پس از رساندن نمونه‌ها به دمای تلقیح (۳۸°C)، باکتریهای پروبیوتیک (آغازگرها) تلقیح شد. در ادامه، نمونه‌ها در دمای ۳۷°C (دمای رشد بهینه) گرمخانه گذاری شد و پس از ۶ ساعت از گرمخانه خارج و تا دمای ۵°C سرد و در همین دما نگهداری شد (۷ و ۸).

جدول ۱- کدبندی تیمارهای تحقیق

ردیف	کد تیمار	توضیحات*
1	LA1	آب سیب حاوی 1×10^{7}CFU/g باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس
2	BL1	آب سیب حاوی 1×10^{7}CFU/g باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس
3	LA2	آب سیب حاوی 2×10^{7} CFU/g باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس
4	BL2	آب سیب حاوی 2×10^{7} CFU/g باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس
5	LA3	آب سیب حاوی 4×10^{7}CFU/g باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس
6	BL3	آب سیب حاوی 4×10^{7} CFU/g باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس
7	C	آب سیب شاهد بدون باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس

* حجم هر کدام از تیمارها ۱۰۰ میلی لیتر بود.

۲-۳- شمارش باکتری‌های پروبیوتیک

به منظور شمارش باکتری‌های پروبیوتیک، ۱۰ سی سی از آب سیب به ۹۰ میلی‌لیتر پپتون واتر استریل اضافه نموده و رقیق-سازی ده‌دهی انجام شد، سپس به‌صورت پورپلیت در محیط MRSآگار در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و تعداد سلول‌های زنده بعد از گرمخانه گذاری با استفاده از پرگنه‌شمار تعیین شد. جمعیت سلول‌های پروبیوتیک در نمونه آب سیب در روزهای صفر، دهم، بیستم و سی‌ام نگهداری شمارش شد (۱۱).

۲-۴- ارزیابی ویژگی های فیزیکی‌شیمیایی

اندازه‌گیری مواد جامد محلول با استفاده ازراکتومتر(Garlzeiss Jena، آلمان) در دمای ۲۰ °C مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۳۶۵ انجام شد (۱۰).

کدورت نیز با استفاده از دستگاه کدورت سنج (مدل 210 AN Turbidity ، ACH امریکا) تعیین شد (۱۰). pH آب میوه‌ها بوسیله pH متر (Jenway، انگلستان) در طی نگهداری آنها پس از کالیبره کردن با بافر ۴ و ۷ ارزیابی شد (۱۰). اسیدیته قابل تیتراسیون با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال و فنل فتالئین به‌عنوان شناساگر و محاسبه بر حسب اسید مالیک انجام شد (۱۰).

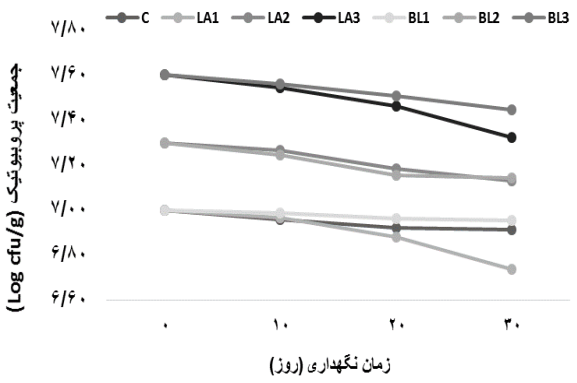
۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام آزمایش از فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی استفاده شد. متغیرهای مستقل نوع سویه‌های تلقیحی (بیفیدوباکتریوم لاکتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) و جمعیت آنها (۱×۱۰^{۷}CFU/g، ۲×۱۰^{۷} CFU/g، ۴×۱۰^{۷} CFU/g)و فواصل زمانی نگهداری (صفر، ده، بیست و سی روز پس از تولید) بودند. تعداد کل تیمارها با لحاظ کردن شاهد، ۷ مورد بود (جدول ۱) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد به کمک نرم افزارهای MSTATC و Excel 2010 انجام شد.

۳-نتایج و بحث

۳-۱- نتایج شمارش باکتری های پروبیوتیک آب سیب

بررسی نتایج تجزیه واریانس مشخص کرد که اثرات متقابل زمان در تیمار در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همان گونه که در (شکل ۱) نشان داده شده است با افزایش زمان نگهداری، جمعیت پروبیوتیک به طور معنی داری کاهش یافت ($p\leq۰/۰۱$) و با افزایش زمان در تیمارهای با جمعیت کمتر پروبیوتیک تلقیح شده، سرعت کاهش جمعیت پروبیوتیک کمتر بود. با این وجود تیمار دارای بیفیدوباکتریوم لاکتیس با جمعیت ۴×۱۰^{۷} CFU/g تلقیحی، دارای بالاترین جمعیت پروبیوتیک و تیمار دارای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با جمعیت ۱×۱۰^{۷} CFU/g دارای کمترین جمعیت پروبیوتیک در طی زمان نگهداری بود. با مقایسه میانگین جمعیت پروبیوتیک تیمارها در هر یک از زمان‌ها مورد سنجش، مشخص شد که تیمارهایی که درصد بالاتری از باکتری به آن-ها تلقیح شده بود دارای تعداد بالاتری از جمعیت پروبیوتیک بود. همچنین تفاوت معنی‌داری در جمعیت پروبیوتیک تیمارهای دارای تفاوت از نظر نوع باکتری تلقیح‌شده مشاهده شد ($p\leq۰/۰۱$). بطور کلی، تیمارهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای جمعیت کمتری از بیفیدوباکتریوم لاکتیس بود. بطورکلی، باکتری‌های پروبیوتیک به شرایط اسیدی حساس هستند (۱). به نظر می‌رسد یکی از دلایل کاهش جمعیت پروبیوتیک‌ها در آب سیب به دلیل حالت بیش از حد اسیدی آن باشد (۱۸). همچنین با توجه به اینکه با افزایش زمان نگهداری اسیدیته آب سیب افزایش و pH آن کاهش یافت، کاهش قابلیت زنده مانی پروبیوتیک‌ها نیز قابل انتظار بود. Ding و Shah گزارش کردند با افزایش زمان نگهداری نمونه‌های آب سیب و آب پرتقال حاوی سویه های مختلف پروبیوتیک آزاد تلقیحی، pH و جمعیت پروبیوتیک آن‌ها همانند این تحقیق کاهش یافت، اما پروبیوتیک‌های انکپسوله شده دارای مقاومت بیشتری به شرایط اسیدی بودند و کاهش جمعیت پروبیوتیک‌های انکپسوله در نمونه آب سیب و آب پرتقال حاوی آن‌ها کمتر از باکتری‌های پروبیوتیک آزاد بود (۱۸). وثوق و همکاران بیان کردند که تفاوت در خصوصیات هر سوش و شرایط خاص هر فرآورده حاوی آن، موجب می-شود که ویژگی‌های مقاومتی یک گونه باکتری یکسان نباشد. آنها گزارش کردند، قابلیت بقای بیفیدوباکتریوم لاکتیس بیشتر از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در نمونه‌های دوغ حاوی آن‌ها بود که این نتایج موافق با نتایج حاصل از این تحقیق بود (۱۴). در تحقیق Ding و Shah لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در هر دو نوع آب میوه (سیب و پرتقال) و بیفیدوباکتریوم لانگوم در آب سیب، قابلیت زنده‌مانی بیشتری نسبت به دیگر سویه ها از جمله بیفیدوباکتریوم لاکتیس (نوع Bi-04 و نوع Bi-07) نشان دادند که خلاف نتیجه حاصل از این تحقیق بود (۱۸).



شکل ۱- مقایسه میانگین تاثیر متقابل زمان نگهداری در تیمار بر جمعیت پروبیوتیک آب سیب

۳-۲- مواد جامد محلول آب سیب

بررسی نتایج تجزیه واریانس نیز نشان داد که اثرات متقابل زمان در تیمار بر مقدار مواد جامد محلول تیمارهای آب سیب معنی‌دار بود. بررسی نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد که با افزایش هر دو مورد زمان نگهداری و جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در آب سیب حاوی باکتری-های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به بیفیدوباکتریوم لاکتیس، مواد جامد محلول با سرعت بیشتری افزایش یافته است. به نظر می‌رسد علت افزایش مواد جامد محلول با افزایش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک تلقیحی به توانایی باکتری‌های پروبیوتیک در متابولیزه کردن ترکیبات پکتینی و تبدیل آن‌ها به ترکیبات قندی مرتبط است. پروبیوتیک‌ها در بیشتر فرآورده‌های غیرلبنی، رشد و تکثیر محسوس ندارند که این امر می‌تواند به علت مغذی نبودن محیط پایه این فرآورده‌ها، عدم وجود فرآیند تخمیر در این نوع محصولات و پایین بودن pH در محصولاتی مانند آب سیب باشد. همچنین آب میوه‌ها احتمال دارد دارای مواد آنتی‌میکروبی طبیعی یا مواد افزودنی مانند رنگ دهنده ها و طعم دهنده باشند که می‌تواند موجب کاهش زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها شود (۷).

بررسی نتایج نشان داد که با افزایش جمعیت پروبیوتیک، افزایش مواد جامد محلول با شدت بیشتری انجام شده است که به دلیل افزایش سرعت متابولیز و تبدیل ترکیبات آلی به قند می‌باشد. همچنین در شرایط نامساعد نگهداری، بالارفتن دمای محصول به‌دلیل متابولیسم‌های سلولی، حضور اکسیژن در محصول به‌دلیل سمیت آن برای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم منجر به از دست رفتن بخش زیادی از سلول های پروبیوتیک با جمعیت بالا در طول مدت زمان نگهداری می‌شود. ضمنا اکثر سویه‌های بیفیدوباکتری‌ها به pH پایین‌تر از ۴/۶ حساس هستند که خود می‌تواند منجر به کاهش رشد، توقف یا ازبین‌رفتن این سلول‌ها شود (۲۰). در نتیجه این امکان وجود دارد که با کاهش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در طی زمان نگهداری مقدار قند های ساده مصرفی توسط آن ها کاهش یافته و در نتیجه مواد جامد محلول بیشتری در محیط موجود باشد (۲۴). در تحقیقی اشاره شده که مواد جامد محلول در آب‌میوه‌های مختلف حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس پاراکازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس بعد از ۶ هفته نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد، کاهش یافت که با نتایج حاصل از این تحقیق تناقض داشت و علت این کاهش احتمالا به دلیل مصرف قند توسط پروبیوتیک‌ها بود (۲۴). در تحقیقی درصد مواد جامد محلول نمونه های آب نیشکر و آب لیموی شیرین حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به نمونه های مشابه فاقد آن، پس از ۷ روز نگهداری به مقدار کمی کاهش یافت (۲۰).

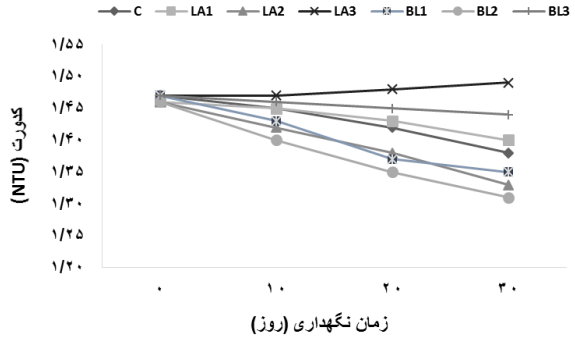
جدول ۲- مقایسه تاثیر متقابل زمان نگهداری در تیمار بر مواد جامد محلول آب سیب*

تیمار / روز	مواد جامد محلول (٪)						
	C	LA1	LA2	LA3	BL1	BL2	BL3
۰	۱۳/۸ aA	۱۳/۸۱ aA	۱۳/۸ aA	۱۳/۸۱ aA	۱۳/۸ aA	۱۳/۸۱ aA	۱۳/۸ aA
۱۰	۱۳/۸۶ abB	۱۳/۸۵ abB	۱۳/۸۷ bB	۱۳/۹ cB	۱۳/۸۳ aB	۱۳/۸۵ abB	۱۳/۸۵ abB
۲۰	۱۳/۸ aA	۱۳/۸۷ bB	۱۳/۹۳ dC	۱۳/۹۴ dC	۱۳/۸۵ bBC	۱۳/۸۶ bB	۱۳/۸۹ cC
۳۰	۱۳/۸ aA	۱۳/۹ cBC	۱۳/۹۷ deD	۱۳/۹۹ eD	۱۳/۸۷ bC	۱۳/۸۸ bC	۱۳/۹۲ cdD

* میانگین‌هایی که با حروف کوچک یکسان در یک ردیف مشخص شده‌اند تفاوت معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۱). میانگین هایی که با حروف بزرگ یکسان در یک ستون مشخص شده‌اند تفاوت معنی‌داری نشان نداد (p>۰/۰۱).

۳-۳- کدورت آب سیب

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل زمان نگهداری در تیمار بر کدورت تیمارهای آب سیب (شکل ۲) در سطح احتمال یک درصد، معنی دار بود و نشان داد که افزایش جمعیت پروبیوتیک و مدت زمان نگهداری باعث کاهش معنی دار میزان کدورت آب میوه در طی سی روز نگهداری شده است (p≤۰/۰۱). همچنین از نظر نوع باکتری پروبیوتیک (بیفیدوباکتریوم لاکتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس)، اختلاف معنی‌داری بین میانگین کدورت آب سیب ملاحظه نشد. تولید آب سیب شفاف و پایدار در صنایع نوشیدنی و آب میوه موضوع قابل توجهی است (۲۳). افزایش کدورت با افزایش جمعیت پروبیوتیک می‌تواند به دلیل نامساعد شدن شرایط لازم برای فعالیت سلول‌های پروبیوتیک، کمبود مواد مغذی، اکسیژن جهت فعالیت، متابولیسم سلولی و در نتیجه عدم کاهش متابولیت‌های پلی ساکاریدی به‌عنوان عامل ایجاد کدورت در آب میوه باشد. تحقیقات مختلفی در زمینه کاربرد باکتری‌های پروبیوتیک صورت گرفته است که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت نشان داده است. شیخ قاسمی و زمردی دریافتند که فعالیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به صورت آزاد سبب کاهش معنی‌دار شفافیت و افزایش کدورت در آب سیب شده است (۷). در تیمارهای باکتری‌های پروبیوتیک بخشی از مواد فنولی، نشاسته و ترکیبات پروتئینی که موجب ایجاد کدورت در آب سیب می‌شوند، توسط باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته، از این روی در مقادیر پایین‌تر باکتری‌های پروبیوتیک، میزان کدورت، کاهش معنی‌داری نشان داد، اما در مقادیر بالاتر، خود باکتری‌های پروبیوتیک احتمالا به دلیل کاهش میزان اکسیژن سلولی و سایر عوامل حیاتی از بین رفته، ته نشین گردیده و کدورت به‌طور معنی-داری افزایش یافت. کاهش تعداد باکتری‌های زنده در نتیجه فرآیند نگهداری، احتمالا به دلیل آسیب سلول‌ها و نهایتا مرگ آن‌ها می‌باشد. در عین حال فشارهای مکانیکی ناشی از تجمع باکتری‌ها در طی فرایند هم‌زدن و همچنین الحاق اکسیژن به داخل مخلوط ممکن است باعث کاهش بیشتر تعداد باکتری‌ها گردد. ضمناً، بقای باکتری‌ها در مقابل شرایط نامطلوب مانند سمیت اکسیژن، انجماد و نگهداری به حالت منجمد به گونه آن بستگی دارد که بر روی کدورت ترکیبات آب میوه نیز موثر است (۱۱).



شکل ۲- مقایسه میانگین تاثیر متقابل زمان نگهداری (روز) در تیمار بر کدورت آب سیب

۳-۴- pH آب سیب

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل زمان نگهداری در تیمار بر pH تیمارهای آب سیب در سطح احتمال یک درصد، معنی دار بود. با توجه به مقایسه میانگین تیمارها (جدول ۳)، با افزایش جمعیت پروبیوتیک و افزایش مدت زمان نگهداری، pH به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p\leq ۰/۰۱$). دلایل کاهش pH در قسمت ۳-۵ بیان شده است. در تحقیقی، از نژادهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتارم، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس دلبروکی برای تولید آب گوجه پروبیوتیک استفاده شد و نتایج نشان داد لاکتوباسیلوس پلانتاروم نسبت به سه سویه دیگر، قند را با سرعت بیشتری مصرف کرده در نتیجه اسید بیشتری در آب گوجه فرنگی تولید شد و موجب کاهش قابل توجه pH شد (۲۷). در تحقیق دیگری از چغندر به‌عنوان محیط مناسب رشد پروبیوتیک‌ها استفاده شده است. نتایج نشان داد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم نسبت به سایرگونه‌ها مقدار بیشتری اسید لاکتیک تولید کردند و توانستند پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۰ درجه سانتی گراد، pH آب چغندر را از ۶/۳ به کمتر از ۴/۵ کاهش دهند که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت (۲۸).

جدول ۳ - مقایسه میانگین تاثیر متقابل زمان نگهداری (روز) در تیمار بر pH آب سیب*

تیمار / روز	pH						
	C	LA1	LA2	LA3	BL1	BL2	BL3
۰	۳/۸^{aA}	۳/۸۱^{aB}	۳/۸۱^{aC}	۳/۸۲^{aB}	۳/۸^{aB}	۳/۷۹^{aB}	۳/۸^{aC}
۱۰	۳/۸^{eA}	۳/۷۱^{bcA}	۳/۶۸^{bB}	۳/۶۲^{aA}	۳/۷۸^{deAB}	۳/۷۱^{bcA}	۳/۷۵^{cB}
۲۰	۳/۸۱^{eA}	۳/۷^{bcA}	۳/۶۷^{bB}	۳/۶۱^{aA}	۳/۷۷^{dA}	۳/۷^{bcA}	۳/۷۴^{cB}
۳۰	۳/۸^{eA}	۳/۶۹^{cA}	۳/۶۵^{bA}	۳/۶^{aA}	۳/۷۶^{dA}	۳/۸^{eB}	۳/۶۹^{cA}

* میانگین‌هایی که با حروف کوچک یکسان در یک ردیف مشخص شده‌اند تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۱$). میانگین هایی که با حروف بزرگ یکسان در یک ستون مشخص شده‌اند تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p>۰/۰۱$).

۳-۵- نتایج اندازه‌گیری اسیدیته آب سیب

با تجزیه واریانس مشخص شد که اثرات متقابل زمان نگهداری در تیمار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود و با بررسی نمودار مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴)، ملاحظه گردید که با افزایش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک و زمان نگهداری، اسیدیته آب سیب به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p\leq ۰/۰۱$). دلایل متعددی برای افزایش اسیدیته و کاهش pH آب سیب با افزایش جمعیت پروبیوتیک تلقیحی به آن می تواند وجود داشته باشد، از آن جمله این که بیفیدوباکتریوم‌ها توسط آنزیم فروکتو۶-فسفات فسفوکتولاز می‌توانند از لاکتوز، اسید استیک و اسید لاکتیک تولید کنند که تجمع این ترکیبات اسیدی در محیط آب میوه بر روی اسیدیته و pH محصول تاثیرات معنی‌داری می تواند داشته باشد (۱). همچنین در طی زمان نگهداری به جهت تولید و تجمع بیشتر ترکیبات اسیدی، میزان اسیدیته تیمارها به طور معنی داری افزایش و pH آن کاهش می‌یابد. وثوق و همکاران نیز در تحقیق خود نتیجه گیری کردند که تولید اسید توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در نمونه‌های دوغ حاوی عرق نعناع در طی نگهداری در یخچال بیشتر از دوغ معمولی است که با نتایج این تحقیق نیز مطابقت داشت (۱۳). ضمنا بالاتر بودن میزان اسید تولیدی در تیمار آب میوه حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، از تیمار حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس به فیزیولوژی و متابولیسم سلولی باکتری ارتباط دارد.

جدول۴- مقایسه میانگین تاثیر متقابل زمان نگهداری (روز) در تیمار بر اسیدیته آب سیب*

تیمار / روز	اسیدیته (درصد اسید مالیک)						
	C	LA1	LA2	LA3	BL1	BL2	BL3
۰	۰/۲۸^{aA}	۰/۲۸^{aB}	۰/۲۸۱^{aA}	۰/۲۸۱^{aA}	۰/۲۸^{aA}	۰/۲۷۹^{aA}	۰/۲۸۱^{aA}
۱۰	۰/۲۸^{bA}	۰/۲۶۱^{aA}	۰/۳۵^{cB}	۰/۳۶۸^{eB}	۰/۳۵۸^{dB}	۰/۳۶^{dB}	۰/۳۶۶^{eB}
۲۰	۰/۲۸۱^{aA}	۰/۴۱۶^{bC}	۰/۴۱^{bC}	۰/۴۲^{cC}	۰/۴۱۸^{bcC}	۰/۴۲^{cC}	۰/۴۲۵^{cC}
۳۰	۰/۲۸۱^{aA}	۰/۵۴۴^{dD}	۰/۵۳^{dD}	۰/۵۵۴^{eD}	۰/۴۲^{bC}	۰/۴۲۵^{bcC}	۰/۴۲۹^{bcC}

* میانگین‌هایی که با حروف کوچک یکسان در یک ردیف مشخص شده‌اند تفاوت معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۱). میانگین هایی که با حروف بزرگ یکسان در یک ستون مشخص شده‌اند تفاوت معنی‌داری نشان نداد (p>۰/۰۱).

۴-نتیجه گیری

با افزایش میزان باکتری‌های پروبیوتیک تلقیحی به تیمارهای آب سیب، جمعیت پروبیوتیک باقی‌مانده، مواد جامد محلول و اسیدیته آب سیب بیشتر و pH آن کمتر گردید. میزان کدورت آب سیب به‌طور معنی‌داری در تیمارهای با جمعیت ۲×۱۰^{۷}CFU/g و ۴×۱۰^{۷}CFU/g به ترتیب کاهش و افزایش یافت. با افزایش زمان نگهداری، به‌طور معنی‌داری میزان مواد جامد محلول و اسیدیته آب سیب افزایش و میزان جمعیت پروبیوتیک باقی مانده، کدورت و pH آن کاهش یافت. از نظر مواد جامد محلول، کدورت، pH و اسیدیته اثر متقابل زمان و تیمار ، معنی‌دار بود و با افزایش هر دو متغیر مستقل، مقدار کدورت و pH آب سیب کاهش و مقدار مواد جامد محلول و اسیدیته آن افزایش یافت. در ضمن، با افزایش زمان نگهداری و کاهش جمعیت پروبیوتیک تلقیحی، میزان جمعیت پروبیوتیک باقی مانده در تیمارهای آب سیب به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به‌طور کلی بیفیدوباکتریوم لاکتیس دارای قابلیت زنده-مانی بالاتری در طول دوره نگهداری نسبت به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود. در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده، با-وجود جمعیت پروبیوتیک باقی مانده بیشتر در تیمارهای با جمعیت ۴×۱۰^{۷}CFU/g تلقیحی، بهترین تیمارها، آب سیب حاوی ۲×۱۰^{۷} CFU/g باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس و حاوی ۲×۱۰^{۷} CFU/g لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به‌دلیل شفافیت بیشتر شناخته شد.

۶- منابع

۱. ابراهیم زادگان، س.، زمردی، ش.، حجت الاسلامی، م. و خسروشاهی اصل، ا. ۱۳۹۲. ماندگاری بیفیدوباکتریوم لاکتیس (LAFTI-B94) آزاد و کپسوله شده و تاثیر آن بر خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی و حسی دوغ ایرانی . مجله نوآوری در علوم و صنایع غذایی، سال پنجم، شماره چهارم، ۱۱۴-۱۰۵.

۲. اکبرپور، ح. ۱۳۹۲. پروبیوتیک و پری بیوتیک و فواید آن در تغذیه، پایان نامه کارشناسی ارشد رشته تغذیه دام، دانشگاه کشاورزی ساری.

۳. امیدی، ب.، فاضلی، م.، آموزگار، م. و مرتضوی، پ. ۱۳۹۰. بررسی اثر ضد دیابتی آب هویج زرد ایرانی پروبیوتیکه شده توسط لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس، مجله پاتوبیولوژی مقایسه ای، علمی-پژوهشی، سال هشتم، شماره ۱، صفحه ۴۰۲-۳۹۵.

۴. انصاری پور، ا.، خمیری، م.، کاشانی نژاد، م. و میرزایی، ح. ۱۳۸۸. بررسی بقای لاکتوباسیلوس بیفیدوم در پنیر سفید آب نمکی ایران، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد شانزدهم،شماره دوم، صفحه ۲.

۵. خان بگی دوگاهه، م.، توفیقی، آ.، خسروی دارانی، ک.، دادگرم، مرتضویان س.ا. م . و احمدی، ن. ۱۳۹۱. اثر عصاره پوست انار بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در آب انار. فصلنامه علمی -پژوهشی علوم تغذیه و صنایع غذایی، جلد ۷ شماره ۵، ۱۷-۲۴.

۶. سیدین، ش.، هاشمی روان، م و نوربخش، ف. ۱۳۹۱. بررسی رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در آب پرتقال پروبیوتیک، کتابچه مقالات دومین سمینار ملی امنیت غذایی، صفحه ۱۴.

۷. 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، ۱۴۳-۱۵۴.

۸. طهماسبی، ا. ۱۳۷۸. ارزش سلامتی آب میوه. انتشارات نشر دانشگاه، چاپ سوم، ۸۴-۳۲.

۹. مرتضویان، ا. م. و سهراب وندی، س. ۱۳۸۵، مروری بر پروبیوتیک ها و فرآورده های غذایی پروبیوتیک، انتشارات اتا، تهران.

۱۰. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۹ . آب سیب- ویژگی ها. استانداردهای ملی ایران، شماره ۳۶۵، تجدیدنظر چهارم.

۱۱. مهدیان، ا.، میلانی، ا.، کاراژیان، ر. و حلاجان، س. ۱۳۹۳. بررسی اثر افزودن فیبر حاصل از ضایعات چغندر قند بر خصوصیات رئولوژیکی ، فیزیکوشیمیایی و قابلیت زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست منجمد پروبیوتیک، نشریه ی نوآوری در علوم و فنّاوری غذایی ، سال ششم ، شماره ی سوم ، ۴۸-۳۹.

۱۲. نعمت الهی، آ.، سهراب وندی، س.، مرتضویان فارسانی، ا. و باریکی، ا. ۱۳۹۱.کاربرد میوه و سبزی به عنوان محیط پایه برای تولید نوشیدنی‌های پروبیوتیک غیر لبنی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی، سال هفتم، شماره ۴، ۸۱- ۷۳.

۱۳. نعیمی، ه.، مرتضوی، س.ع.، میلانی، ا. وکوچکی، آ.۱۳۹۲. تاثیر افزودن اینولین و فرآیند ریزپوشانی بر میزان زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در طول دوره نگهداری ماست بستنی سین بیوتیک. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۴۰، دوره ۱۰، ۳۶-۲۷.

۱۴. وثوق ، ا. ص.، خمیری، م.، کاشانی نژاد، م.، جعفری، س. م. ۱۳۸۸. ماندگاری بیفیدوباکتریوم لاکتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در دوغ حاوی عصاره کاکوتی. مجله نوآوری در علوم و فناوری غذایی، جلد ۶، شماره ۴، ۹-۱.

۱۵. وثوق، ا. ص.، خمیری م.، کاشانی نژاد، م . و جعفری، س. م. ۱۳۸۸. اثر عرق نعناع بر قابلیت بقای باکتری های پروبیوتیک در نوشیدنی سنتی ایرانی (دوغ). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۶، ۱۶۴-۱۵۶.

16. Baron, M. D. O., Luc De Schepper.M. D. and Gerald Domingue.M. D. 1989.Friendly bacteria -lactobacillus acidophilus & bifido bacterium, Journal of Horticultural Science and Biotechnology Isafruit, Special Issue: 68-74.
17. Bratu, M., Manea. L., Avram, D. and Nicolescu, C. 2013. Fermentation of vegetable juices by lactobacillus acidophilus LA5, lactic acid bacteria-R&D for food, Health and Livestock Purpose, INTECH, Chapter7, pp. 173-191.
18. Buruleanu, L., Nicolescu, C. L., Avram, D., Bratu, M. G. and Manea, I. 2009. Survival of probiotic bacteria during lactic acid fermentation of vegetable juices. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. 15(1): 132-139.
19. Ding, W. K. and Shah, N. P. 2008. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. International Food Research Journal 15(2): 219-232.
20. Khatoon, N., Gupta, R. K. 2015. Probiotics Beverages of Sweet Lime and Sugarcane juices and its Physiochemical,

Microbiological & Shelflif Studies. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 4(3): 25-34

21. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. International Dairy Journal, 13: 3-13.
22. Maghsoudlou, Y. and Ghorbani, M. 2003. Fruit processing. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Publication, PP.316.
23. Kumar, B., Sreedharamurthy, M. and Sarathi Reddy, O. 2013. Physico-chemical analysis of fresh and probioticated fruit juices with lactobacillus casei, International Journal of Applied Sciencces Biotechnology, 1(3): 127-131.
24. Shah, N. P., Ding, W. K., Fallourd, M. J. and Leyer, G. 2010. Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants, Journal of Food Science 75: M278-82.
25. Tootoonchi, P., Hesari, J., Moradi, M. and Mehrnoosh, F. 2015. Survival of encapsulated latobacillus acidophilus la5, and Lactobacillus casei 431 encapsulated in orange juice stored in refrigerator temperature. International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences, 4(8): 268-276.
26. Ying, D., Schwander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C. and Augustin, M. A. 2013. Microencapsulated Lactobacillus rhamnosus GG in whey protein and resistant starch matrices in fruit juice. Journal of Functional Food, 5: 98 –105.
27. Yoon, K. Y., Woodams, E. E. and Hang, Y. D. 2004. Probiotection of tomato juice by lactic acid bacteria. The Journal of Microbiology, 42(4):315-318.
28. Yoon, K. Y., Woodams, E. E. and Hang, Y. D. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. Lebensm.-Wiss. u.-Technol, 37: 73-75.