بررسی امکان استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکئی* جدا شده از عسل در تهیه آب انار پروبیوتیک

نیلوفر قربانی[۱]، لیلا ناطقی [۲*]، ناصر تاج آبادی[۳]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا، گروه علوم و صنایع غذایی، ورامین-ایران

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

۳- بخش پژوهش های زنبورعسل، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

زنبورعسل به عنوان یک حشره مفید در طبیعت به واسطه گرده‌افشانی نقش مهمی ایفاء می‌کند. دستگاه گوارش زنبور عسل دارای ریزسازواره‌های همزیست است. در این بررسی پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کانکئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از عسل تهیه و پس از انجام آزمون‌های تشخیصی شامل مقاومت به اسید، مقاومت به نمک‌های صفراوی، مقاومت به شیره‌ی معده (پپسین، تریپسین)، عدم فعالیت همولیتیک، هیدرولیز ال‌آرژنین، به میزان CFU/ml $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ به صورت جداگانه و به صورت ترکیبی به آب انار اضافه گردیدند و آزمون‌های آب انار شامل اسیدیته، pH، ارزیابی درصد مواد جامد محلول (بریکس) و ارزیابی قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در بازه‌های زمانی روز صفرم، روز هفتم، روز چهاردهم و روز بیست‌و یکم بر روی آب انار انجام گردید. مطابق با نتایج هر دو ریزسازواره خاصیت پروبیوتیکی نشان دادند. نتایج آزمون‌های آب انار نشان داد با افزایش مدت زمان نگهداری و جمعیت پروبیوتیک، میزان اسیدیته افزایش و میزان pH و بریکس به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت. میزان زنده‌مانی تمامی باکتری-های پروبیوتیک موجود در نمونه‌های آب انار طی دوره نگهداری به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت بطوریکه پس از ۲۱ روز نگهداری بالاترین میزان زنده‌مانی در نمونه‌های آب انار تلقیح شده با جمعیت CFU/ml $۱۰^{۸}$ و نمونه‌های مخلوط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکئی* مشاهده گردید و نمونه مذکور بعنوان تیمار برتر انتخاب گردید.

کلید واژگان: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کانکئی*، عسل پروبیوتیک، آب انار پروبیوتیک

* مسئول مکاتبات: Leylanateghi@yahoo.com

۱- مقدمه

ریزسازواره‌های موجود در روده حشرات نقش مهمی در تغذیه حشرات بازی می‌کنند. میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش زنبور عسل شامل ریزسازواره‌های مفیدی است که به فرآیند هضم مواد غذایی، سنتز، جذب ویتامین‌ها و مواد معدنی و تجزیه پلی‌ساکاریدها به حشره کمک می‌نماید. بخشی اعظم ریزسازواره‌های موجود در عسل گونه‌های پروبیوتیکی متنوعی از جنس *لاکتوباسیلوس* هستند [۱]. پروبیوتیک‌ها عبارتند از ریزسازواره‌های زنده‌ای که با استقرار در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آنها اصلاح کنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت ریزسازواره‌های غیر مفید و پاتوژن‌ها شوند [۲]. میکروفلور طبیعی دستگاه‌گوارش زنبور عسل، شامل ریزسازواره‌های مختلف است. حضور جمعیت کثیری از این ریزسازواره‌ها به دلایل متعددی برای این میزبان نظیر کمک به فرایند هضم موادغذایی، کمک به سنتز و جذب ویتامین‌ها و موادمعدنی، تجزیه پلی‌ساکاریدها و تحریک سیستم ایمنی ضروری هستند. جمعیت میکروفلور طبیعی روده تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر تغییرات جیره‌غذایی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان و تراکم بالای افرادگله، دستخوش تغییراتی می‌گردد [۳]. امروزه به منظور دستیابی به سطوح بالای اقتصادی از سیستم‌های پرورشی متراکم با جمعیت‌های زیاد برای پرورش زنبور عسل استفاده می‌گردد بنابراین عوامل بیماریزا فرصت فعالیت بیشتری جهت ایجاد بیماری پیدا می‌کنند که حضور باکتریهای پروبیوتیک موجود در روده آن‌ها باعث افزایش مقاومت سیستم دفاعی بدن آن‌ها می‌گردد [۳].

پروبیوتیک عبارت است از مکمل میکروبی که از طریق متعادلسازی میکروب‌های بومی طبیعی روده اثرات مفید بر بدن میزبان اعمال می‌کند. بسیاری از گونه‌های پروبیوتیک به گروه بزرگی از باکتری‌ها به نام باکتری‌های اسیدلاکتیک تعلق دارند. این باکتری‌ها میکروب‌های بومی بدن انسان و دام بوده، اما به طور طبیعی در گیاهان نیز وجود دارند. پروبیوتیک‌ها تنها به عنوان ترکیب غذایی خورده نمی‌شود، بلکه از زمانیکه واژه پروبیوتیک دردهه ۱۹۹۱ توسط کوالد ابداع شده، لی‌لی و استیلول[1] درسال ۱۹۹۹ این واژه را برای باکتری‌های زنده و اسپورها به عنوان مکمل غذایی حیوانی به کار بردند که باید به بهبود استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط حیوانی کمک می‌کرد. باکتری‌های اسیدلاکتیک، گرم مثبت، میله‌ای و کوکسی شکل بدون اسپور هستند، مقاوم به هوا یا بی‌هوازی، اسیدوفیلیک یا اسیدوریک می‌باشند. این باکتری‌ها در انواع متنوعی از زیستگاه‌ها وجود دارند که دارای سوبستراهای کربوهیدرات‌ها مثل غشاهای موکوسی انسانی، حیوانی یا گیاهی هستند [٤]. منساه و همکارانش[2] درسال ۲۰۱۲ بیان کردند ریزسازواره‌های موجود در روده حشرات نقش مهمی را در تغذیه حشرات دارند [٥]. لاکتوباسیل برای ترمیم اکوسیستم میکروبی روده نقش مهمی دارد به این خاطر ترویج خواص گونه‌های لاکتوباسیلوس به طورگسترده‌ای به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود [٤]. آندرسون[3]و همکارانش درسال ۲۰۱۳ اکولوژی میکروبی را در کندوی زنبور عسل مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند تقریباً تمام یوکاریوت‌ها میزبان باکتری‌های مفید در لومن[4] روده‌ای خود هستند که به طور طبیعی بوده یا ازمحیط زیست دریافت می‌کنند. بنابراین شناسایی فنوتیپ‌های باکتری‌های مفید در زنبور عسل و کندو امری مهم است [٦].

میوهٔ انار یکی از معروف‌ترین میوه‌های بومی کشت‌شده در ایران است و در بسیاری از کشورها گرمسیری- نیمه گرمسیری رشد می‌کند. میزان تولید سالانه انار در ایران حدود ٦٧٠٠٠٠ تن در سال می‌باشد. با توجه به آنکه ایران کشور گرمسیری است و همچنین جمعیت جوانان در ایران زیاد است، مصرف آب میوه-جات در کشورمان بالا می‌باشد [۷]. آب انار تازه حاوی ٨٥/٤ ٪ آب، مقدار قابل توجهی مواد جامد محلول، قندهای احیاکننده،

1. Lilly & Stillwell
2. Mensah
3. Anderson
4. Lumen

آنتوسیانین، فنولیک‌ها، اسیدآسکوربیک، پروتئین و آنتی اکسیدان می‌باشد. آب انار دارای اثرات پری‌بیوتیک بوده و باعث رشد باکتری‌های مفید روده می‌شود. اثر پری‌بیوتیکی انار با پری‌بیوتیک‌هایی نظیر اینولین متفاوت است زیرا نه تنها باعث رشد باکتری‌های مفید مثل *لاکتوباسیلوس‌ها* می‌شود بلکه مانع رشد باکتری‌های بیماریزا می‌شود [۸]. با توجه به تمایل مصرف کنندگان به استفاده از نوشیدنی‌های پروبیوتیک بر پایه آب میوه و حضور اسیدیته نسبتا بالا در محصولات آبمیوه از جمله آب انار، ~~لذا~~ ارزیابی قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات مذکور ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق بررسی خواص پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1] و *لاکتوباسیلوس کانکئی*[2] جدا شده از عسل و امکان افزودن و زنده‌مانی آنها در آب انار بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکئی* جدا شده از عسل از موسسه تحقیقات علوم دامی کشور (کرج، ایران) تهیه شدند و آب انار طبیعی با بریکس ۱۵ از شرکت سن‌ایچ تهیه گردید.

استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC1431) از شرکت بهار افشان خریداری شد. محیط کشت‌های مورد استفاده شامل MRS Agar، محیط کشت آگار خون‌دار، اسید آمینه ال-آرژنین و MRS Broth از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. **نمک‌های صفراوی** بایل اگزالات، کلریدریک اسید، پپسین، تریپسین، آب پپتونه، سود، معرف نیسلر از شرکت مرک، آلمان خریداری شدند.

1. *Lactobacillus plantarum*
2. *Lactobacillus* ***kunkeei***

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- روش آماده‌سازی سویه‌ها

لاکتوباسیلوس کانکئی و *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* به منظور تهیه مایه تلقیح در محیط MRS broth کشت داده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری (طب آزما، ساخت ایران) شدند [۹].

۲-۲-۲- ارزیابی مقاومت به اسید

بررسی مقاومت ریزسازواره درشرایط اسیدی، مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹٤۵۹ با کشت ریزسازواره در محیط کشت مایع که pH آن کاهش داده شده پس از گرمخانه گذاری در دما و زمان مناسب و شمارش کلی انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با جمعیت 10^8 CFU/ml را در تعداد مناسب لوله های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MRS broth که اسیدیته آنها بوسیله اسید مناسب (استیک اسید گلاسیال یا کلریدریک اسید) در دو pH ٤ و ۲/۵ تنظیم شد، گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت ۳ تا ٤ ساعت از گرمخانه‌گذاری از محیط‌های کشت تلقیح شده یک میلی‌لیتر برداشته و در محیط کشت MRS agar[3] تلقیح کرده و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٤۸ ساعت شمارش گردیدند [۱۰].

۲-۲-۳- ارزیابی مقاومت به نمک‌های صفراوی (بایل)

اساس روش بررسی مقاومت و میزان کاهش رشد ریزسازواره در حضور نمک‌های صفراوی (بایل اگزالات) می‌باشد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با جمعیت 10^8 CFU/ml به ۱۰ میلی لیترمحیط کشت مایع MRS broth حاوی ۰/۳ درصد نمک صفراوی و محیط کشت مایع فاقد نمک صفراوی (بعنوان کنترل) اضافه شد. جذب نوری (OD[4]) محیط‌ها را قبل

3. De Man, Rogosa and Sharpe Agar
4. Optical Density

از گرمخانه‌گذاری در طول موج ٦٣٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (یونیکو، آمریکا) اندازه‌گیری شد. سپس محیط‌ها به مدت ٨ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری کرده، جذب نوری (OD) محیط‌ها پس از پایان گرمخانه‌گذاری در طول موج ٦٣٠ نانومتر اندازه‌گیری شد [١٠].

٢-٢-٤- ارزیابی 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 ٣٧ درجه سلسیوس وبه مدت ٤٨ ساعت و بررسی رشد یا عدم رشد انجام شد. از سوسپانسیون میکروبی به میزان ٢٪ در هر یک از محیط‌های اسید مصنوعی (پپسین و تریپسین) معده و محیط‌های کنترل تلقیح کرده و در دمای مناسب گرمخانه‌گذاری شد. در زمان‌های صفر، یک، ٢، ٣، ٤ و ٢٤ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری،یک سی‌سی از هر محیط تلقیح شده برداشته و پس از تهیه رقت‌های مناسب با رقیق کننده آب پپتونه ٠/١٪ به روش پورپلیت در محیط کشت آگاردار مناسب کشت داده و در دمای ٣٧درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شد و سپس جمعیت میکروبی شمارش شد [١٠].

٢-٢-٥- ارزیابی عدم فعالیت همولیتیک

اهمیت این آزمایش در بررسی عدم تجزیه کنندگی خون و در نتیجه عدم بیماری‌زایی توسط سویه جداسازی شده می‌باشد. برای این منظور بررسی لیز گلبول‌های قرمز خون گوسفندی با کشت ریزسازواره بر روی محیط کشت آگاردار حاوی خون گوسفند انجام شد. ریزسازواره ایزوله شده را بر روی محیط کشت آگار خون‌دار (محیط پایه حاوی ٧٪ خون گوسفندی دفیبرینه) به روش نقطه‌ای کشت شد. سپس پلیت‌ها بصورت وارونه در دمای ٣٧ درجه سلسیوس و بمدت ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر وجود هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها بررسی شد. وجود هاله شفاف نشان دهنده واکنش مثبت و همولیز نوع بتا بود. از *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [١٠].

٢-٢-٦- ارزیابی هیدرولیز ال – آرژنین

اهمیت این آزمایش در بررسی عدم تجزیه کنندگی آنزیم‌ها و در نتیجه عدم بیماری‌زایی توسط سویه جداسازی شده می‌باشد. بررسی هیدرولیز آرژنین توسط ریزسازواره با کشت در محیط آرژنین‌دار و تغییر رنگ توسط معرف نسلر انجام می‌شود. یک کلنی یا ١٠ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی را به محیط مایع حاوی ٠/٣ درصد اسید آمینه ال-آرژنین منتقل کرده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، ١٠٠ میکرولیتر از محیط کشت را روی کاغذ صافی حاوی معرف نسلر قرار داده و تغییررنگ را بررسی شد. ایجاد رنگ نارنجی متمایل به قرمز نشان دهنده واکنش مثبت است. از *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [١٠].

٢-٢-٧- تولید آب انار پروبیوتیک

آب انار با بریکس ١٥ پس از تهیه از شرکت سن‌ایچ، در دمای ٨٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ٥ دقیقه پاستوریزه گردید و سپس باکتری‌های کشت مذکور با غلظت‌های مطابق با جدول کدبندی تیمارهای تحقیق به عصاره آبمیوه انار تلقیح شد و بعد از قراردادن در انکوباتور (مدلPIF٢٦٠، ساخت انگلستان) در دمای ٣٧ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ٧٢ ساعت به منظور انجام تخمیر شمارش جمعیت میکروبی و ارزیابی زنده‌مانی جمعیت باکتری‌ها انجام گردید [٩].

Table 1 The introduction of treatments in this study

Batch	Adjunct starter culture	Code of the adjunct starter culture	Concentration (CFU/ml)
1	No adjunct starter culture	T	0
2	*Lactobacillus Kankei 100%*	T1	10^{7}
3	*Lactobacillus Kankei 100%*	T2	10^{8}
4	*Lactobacillus Plantarum 100%*	T3	10^{7}
5	*Lactobacillus Plantarum 100%*	T4	10^{8}
6	*Lactobacillus Plantarum 50%+Lactobacillus Kankei 50%*	T5	Totally 10^{7}
7	*Lactobacillus Plantarum 50%+Lactobacillus Kankei 50%*	T6	Totally 10^{8}

۲-۲-۸- اندازه‌گیری pH و اسیدیته قابل تیتر

pH و اسیدیته تیمارها در فواصل نگهداری در روزهای صفر، ۷، ۱۴و ۲۱ روز در سه تکرار اندازه گیری شدند. pH آب میوه‌ها در طی دوره نگهداری با استفاده از pH متر (مدل ۷۴۴، ساخت سوئیس) و اسیدیته توسط تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال اندازه گیری شد [۱۲-۱۱].

۲-۲-۹- اندازه‌گیری درصد قند (بریکس)

بریکس در فواصل نگهداری در فواصل زمانی روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری بریکس از رفراکتومتر (مدل آتاگوATC-20، ساخت ژاپن) استفاده شد [۱۳].

۲-۲-۱۰- ارزیابی قابلیت زنده‌مانی باکتری‌ها

قابلیت زنده‌مانی باکتری‌ها با کشت دادن نمونه‌های آبمیوه (تیمار و کنترل) بر روی محیط RCM–agar, Oxoid به صورت بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. بعد از کشت، کلنی‌های باکتری از پلیت‌ها جمع آوری شده و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد در گلیسرول ۱۵ درصد به مدت نیم ساعت نگهداری شدند تا شناسایی بیشتر انجام شود سپس با کشت اختصاصی بر روی محیط‌های RCM[1] آگار و Rogosa[2] در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز باکتری‌ها قابل تشخیص و شمارش بودند. نمونه‌ها در فواصل صفر، ۷، ۱۴، ۲۱ روز نمونه‌برداری شده و قابلیت زنده‌مانی کشت های پروبیوتیک اندازه‌گیری شد و به صورت واحدهای تشکیل دهنده کلنی CFU/ml بیان شدند [۱۴].

۲-۲-۱۱- طرح آماری

تجزیه و تحلیل اطلاعات در قالب طرح کاملا تصادفی[3] و با استفاده از نرم‌افزار۱۴/۲ Minitab انجام شد و در صورت معنی‌دار بودن، میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شدند. شکلها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۰ رسم گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج ارزیابی فعالیت پروبیوتیکی سویه‌های پروبیوتیک

بررسی نتایج ارزیابی فعالیت پروبیوتیکی سویه‌های پروبیوتیک مطابق با جدول ۲ می‌باشد. مطابق با نتایج مندرج در استاندارد ملی ۱۹۴۵۹ این دو باکتری دارای خصوصیات پروبیوتیکی بودند [۱۰].

1. Reinforced Clostridial Medium Agar
2. De Man, *Rogosa* and Sharpe *Agar*
3. CRD

Table 2: The result of probiotics activity of *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Kankei*

Properties	*Lactobacillus Plantarum*	*Lactobacillus kankei*	Acceptable standard values
Resistance to Acid	10^6 CFU/ml	10^6 CFU/ml	Not less than10^6 CFU/ml
Resistance to bail salts	0.3	0.33	Equal or less than 0.4
Resistance to Gastric juice (Trypsin and pepsin)	10^6 CFU/ml	10^6 CFU/ml	Not less than10^6 CFU/ml
Non hemolytic activity	Negative	Negative	Negative
L- Arginine hydrolysis	Negative	Negative	Negative

۳-۲- نتایج ارزیابی اسیدیته و pH

نتایج تغییرات pH در شکل ۱ گزارش شده است. با توجه به شکل ۱ روند تغییرات pH طی زمان نگهداری، با افزایش زمان نگهداری و افزایش جمعیت باکتریایی میزان pH تیمارها به طور معنی‌داری کاهش یافت(p<۰/۰۵). به طوری‌که کمترین میزان pH در انتهای روز بیست و یکم نگهداری متعلق به تیمارهای تلقیح شده با جمعیت CFU/ml ۸ ۱۰ بود. بالاترین میزان pH متعلق به تیمار شاهد در روز صفرم نگهداری بود. نتایج تغییرات اسیدیته در شکل ۲ گزارش شده است. با توجه به شکل ۲ اختلافات معنی‌داری بین میزان اسیدیته در روز صفرم و هفتم نگهداری وجود نداشت (p<۰/۰۵). با افزایش زمان نگهداری و افزایش میزان جمعیت باکتریایی در طی دوره نگهداری میزان اسیدیته قابل تیتر به طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵). اما در مخلوط باکتری‌ها، میزان اسیدیته قابل تیتر به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای آب انار دارای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکئی* بود (p<۰/۰۵). یکی از دلایل مشاهده این تغییرات، ترکیبات موثره موجود در انار مانند گالیک اسید، الاژیک اسید، کافئیک اسید، کامفرول، لوتئین، کوئرستین، اسیدهای چرب و ایندول ها می‌باشد [۱۵]. ترکیبات مذکور توسط باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکئی* به عنوان منبع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در نتیجه تولید اسیداستیک و اسید لاکتیک در آب انار می‌کنند که با کاهش pH و افزایش اسیدیته همراه بود. با افزایش زمان نگهداری میزان غلظت این ترکیبات اسیدی افزوده شده و همچنین به دلیل تغییرات شیمیایی آب انار ناشی از اکسیداسیون در طی دوره نگهداری نیز از میزان pH تیمارها به طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) کاسته شد. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با دکربوکسیله کردن اسید سوربیک و تبدیل آن به ۱ و۳- پنتادی‌ان و همچنین تولید دی‌اکسیدکربن و اتانول طی فرآیند تخمیر می‌گردد و همچنین قادر به متابولیزه کردن ترکیبات قندی و تولید ترکیبات اسیدی مانند سوکسینیک اسید می‌باشد که باعث کاهش میزان pH گردیده است [۱۶]. همچنین تولید متابولیت‌های اسیدی از تخمیر ترکیبات قندی موجود در محیط توسط این باکتری اسید دوست (*لاکتوباسیلوس کانکئی*) به طور معنی‌داری باعث کاهش میزان pH گردیده است. در تحقیق *یون*[1] و همکاران [۱۷] نژادهای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* برای تولید آب گوجه پروبیوتیک استفاده شدند نتایج نشان داد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نسبت به سایرگونه‌ها، قند را با سرعت بیشتری مصرف و در نتیجه اسید بیشتری در آب گوجه فرنگی تولید می‌شود و نیز موجب کاهش قابل توجه pH گردیده است که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت.

1. Yoon *et al.*,2004

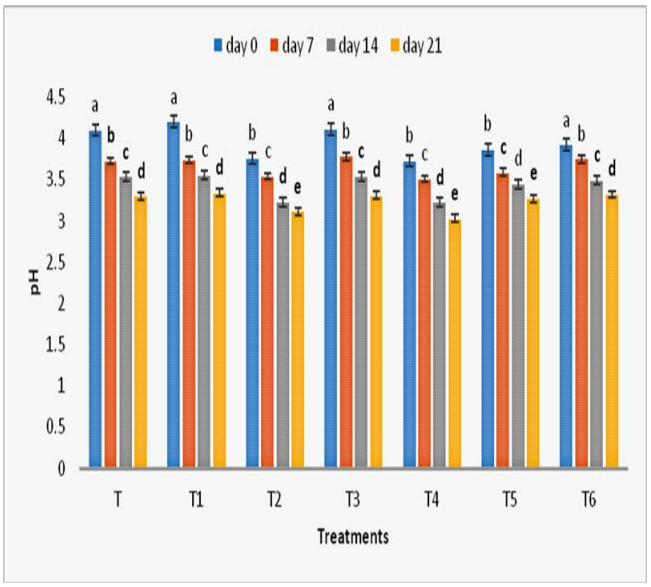

Fig 1 Evaluation of pH of probiotic pomegranate juice during storage time

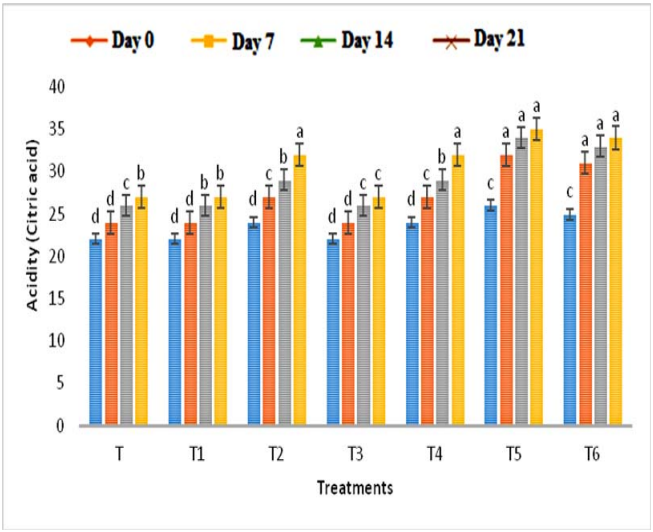

Fig 2 Evaluation of Acidity (Citric acid) of probiotic pomegranate juice during storage time

۳-۳- نتایج ارزیابی مواد جامد محلول (بریکس)

همچنین با توجه به شکل ۳ روند تغییرات بریکس طی زمان نگهداری اختلافات معنی‌داری بین میانگین درصد مواد جامد تیمارهای آب انار با افزایش میزان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکئی* در طی بیست و یک روز نگهداری وجود داشت ($p<۰/۰۵$). اختلاف معنی‌داری بین میزان بریکس تیمارها بر اساس نوع باکتری وجود نداشت ($p<۰/۰۵$). به نظر می‌رسد که تغییرات ترکیبات بریکس به جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک بستگی دارد. با افزایش میزان باکتری‌های پروبیوتیکی به جهت افزایش میزان استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و اسیدی موجود در آب انار درجه بریکس به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($p<۰/۰۵$). زیرا تنها منبع مغذی موجود در آب انار ترکیبات قندی آن بوده و ترکیبات تانن توسط باکتری‌های پروبیوتیک قابل استفاده نمی‌باشد. همچنین با توجه به افزایش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک (تیمارهای T2 وT4 و T6) و همچنین افزایش مدت زمان نگهداری، میزان بریکس آب انار به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد($p<۰/۰۵$). همچنین با افزایش حضور باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و همچنین *لاکتوباسیلوس کانکئی* به جهت توانایی در متابولیزه کردن ترکیبات پکتینی و پروتئینی و تبدیل آن ها به ترکیبات قندی میزان بریکس تیمارهای آب انار به طور معنی داری کاهش یافت. بنابراین کاهش تدریجی بریکس در طی مدت زمان نگهداری به جهت افزایش سرعت متابولیز و تبدیل ترکیبات آلی به قند نیز می‌باشد. نوالکائکول[1] و همکاران (۲۰۱۲)، در بررسی اثرات *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تلقیح شده به پودر میوه فوری دریافتند که میزان بریکس آبمیوه نقش مهمی در میزان بقای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* طی دوره نگهداری داشته است و زنده مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* طی دوره نگهداری به طور معنی‌داری کاهش یافته است که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت [۱۸]. مولوا و بایسال[2] (۲۰۱۵) اثرات مخلوط آب سیب- آب انار را بر روی خصوصیات رشد بر روی سلول‌های پروبیوتیک بررسی نمودند و دریافتند که میزان بریکس مخلوط با افزایش مدت زمان نگهداری و افزایش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($p<۰/۰۵$) که با نتایج تحقیقات حاضر نیز مطابقت داشت [۱۹].

1. Nualkaekul
2. Molva & Baysal

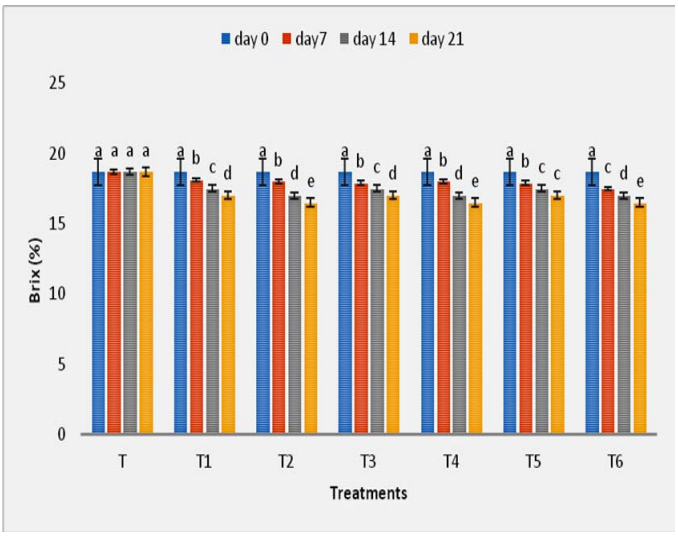

Fig 3 Evaluation Brix (%) of probiotic pomegranate juice during storage time

۳-٤- نتایج ارزیابی قابلیت زنده‌مانی باکتری‌ها

نتایج بقای باکتری‌های پروبیوتیک در شکل ٤ گزارش شده است. با توجه به شکل ٤ نیز ملاحظه گردید که اختلافات معنی‌داری بین میزان جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک بر اساس اختلاف در تیمار وجود دارد (p<۰/۰۵). بالاترین میزان جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک متعلق به تیمار حاوی مخلوط *لاکتوباسیلوس کانکئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (T6) و کمترین آن نیز به تیمار حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسلوس کانکئی* به صورت ۱۰۰ درصد (تیمارهای T1 , T3) تعلق داشت (*p*<۰/۰۵). بررسی نتایج ارزیابی قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک نشان داد که در طی زمان نگهداری میزان جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک به طور معنی‌داری (*p*<۰/۰۵) کاهش یافت بطوریکه پایین‌ترین و بالاترین میزان جمعیت باکتری‌ها پس از ۲۱ روز نگه‌داری متعلق تیمار T3و T6 بود. یکی از دلایل کاهش زنده‌مانی طی دوره نگهداری می‌تواند مربوط به کاهش منابع غذایی برای باکتری‌های پروبیوتیک طی دوره نگهداری باشد از طرفی دیگر میزان قابلیت زنده‌مانی به جهت افزایش انباشته شدن ترکیبات سمی و دی سولفیدی ناشی از حضور باکتری‌های پروبیوتیک در آب انار و همچنین کاهش توان سلولی جهت تکثیر آن‌ها طی دوره نگهداری کاهش می‌یابد. همچنین به دلیل تغییرات اسیدیته، pH و همچنین ترکیبات آنتی اکسیدان موجود در خود آب انار با تغییرات در چرخه پیروات و اکسیده نمودن NADPH+ در فرآیند متابولیکی باکتری‌ها اختلال معنی‌داری ایجاد می‌کنند و نهایتا قادر به متابولیز ترکیبات قندی نبوده و باعث مرگ سلولی می‌گردند. همچنین تانن‌های موجود در ترکیبات آب انار به طور معنی‌داری برمتابولیسم سلولی باکتری‌های پروبیوتیک تاثیرات معنی‌داری داشته و در غلظت‌های بالا باعث مرگ سلولی می‌شوند. نهایتا تغییرات محیطی در طی بیست و یک روز نگهداری باعث افت نسبی جمعیت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکئی* می‌شوند. در تیمارهای دارای مخلوط پروبیوتیک به صورت ۵۰ درصد (تیمار T5 و T6) به دلیل اثر همزیستی باکتری‌های پروبیوتیک و تولید ترکیبات مورد نیاز و ویتامین‌های گروه ب در محیط باعث تقویت رشد و بقای یکدیگر می‌شوند. تعداد سلول‌ها در تیمارهای دارای جمعیت ۱۰۰ درصد *لاکتوباسیلوس کانکئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با سه سیکل لگاریتمی کاهش در انتهای روز بیست و یک مواجه بود که به دلیل افزایش ترکیبات مضره ناشی از متابولیسم باکتری و همچنین، تغییرات فعالیت آبی، اسیدیته، پتانسیل اکسیداسیون و احیاء (Eh) ناشی از ترکیبات آنتی اکسیدانی آب انار و همچنین به جهت کاهش نسبی فشار اکسیژن در طی دوره نگهداری میزان جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. آب انار حاوی آب، اسیدهای آلی، قند، پکتین، تانین (پونیکالاگین، اسیدهای الاژیک و گالیک اسید)، فلاونوئیدهای (کاتچول، کاتچین‌ها و اپی‌گالوکاتچین‌ها) و آنتوسیانین‌ها (۳-گلوکوزیدها و ۳و۵-دی‌گلوکوزیدهای دلفینیدین، سیانیدین و پلارگونئیدین) می‌باشد که به عنوان منبع مغذی جهت رشد و فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک عمل می‌کند. در تیمارهای دارای جمعیت باکتری‌ها با مقادیر CFU/ml ۸ ۱۰ اثر تقویتی ناشی از جمعیت اولیه بالاتر ریزسازواره‌ها باعث تقویت و افزایش میزان زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکئی* می‌شود. وانگ[1] و همکاران (۲۰۰۳)، نیز در بررسی استفاده از مخلوط پروبیوتیک‌ها در تهیه و فرمولاسیون ماست پروبیوتیک دریافتند که استفاده از مخلوط پروبیوتیک به جهت اثرات تقویتی و سینرژیستی باکتری‌های

1. Wang

پروبیوتیک میزان بقاء و زنده‌مانی را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد که با یافته های تحقیق حاضر مطابقت داشت [۲۰] .

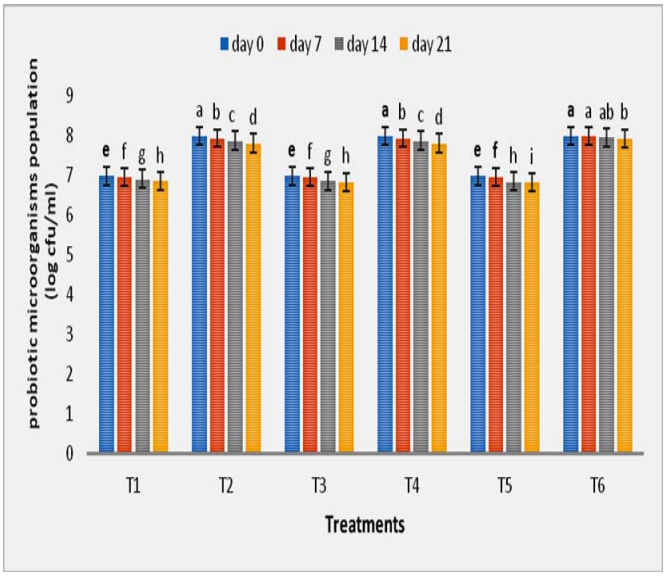

Fig4 Evaluation of probiotic microorganisms' population (log cfu/ml) of pomegranate juice during storage time

٤- نتیجه گیری کلی

این تحقیق با هدف بررسی خواص پروبیوتیکی و استفاده از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکئی* جدا شده از عسل در تهیه آب انار پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد هر دو باکتری دارای خواص پروبیوتیکی مطلوب مطابق با استاندارد بودند. همان‌گونه که نتایج نشان داد نمونه‌های آب انار تلقیح شده با مقادیر CFU/ml ۸ ۱۰ از باکتری‌های پروبیوتیک در انتهای دوره نگهداری دارای میزان بقای بالاتری نسبت به تیمارهای آب انار با جمعیت CFU/ml ۷ ۱۰ بودند. استفاده از مخلوط باکتریهای پروبیوتیک باعث افزایش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک طی دوره نگهداری گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کانکئی* قابلیت زنده‌مانی در آب انار را دارند و می‌توان از آن‌ها برای افزایش خواص تغذیه‌ای آب انار استفاده نمود.

۵- منابع

[1] Hoseinabadi, M., Dehghan Banadaky, M. and Zali, A. (2013). The effect of feding of bacterial probiotic in milk or starter on growth performance, health, blod and rumen parameters of suckling calves. *Research on Animal Production*, 4(8): 57-69 (In Persian).

[2] Aboutalebi, H., Heydari Nasrabadi, M., Tajabadi Ebrahimi, M., Shabani, M. and Zahedi, F. (2011). The healing effect of *lactobacillus plantarum* isolated from Iranian traditional cheese on acetic acid induced gastric ulcer in rats. *Journal of Iran University of Medical Sciences*, 17(77): 7-16 (In Persian).

[3] Lak, M., Kasra Kermanshahi, R. and Qaisari, A.A. (2008). The effect of citric acid and probiotic on gastrointestinal tract microflora. *Journal of Isfahan University of Science (Sciences)*, 35(6): 27-36 (In Persian).

[4] Lilly, D.M. and Stillwell, RH. (1965). Probiotic: growth promotings factors produced by microorganism, *Science*, 12:147(3659), 747-478.

[5] Mensah, P., Drasar, BS., Harrison, TJ., Tomkins, AM. (1991). Fermented cereal gruels: towards a solution of the weanling's dilemma, *food and nutrition bulletin*, 13(1), 50-57.

[6] Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M. and Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (Apls mellifera). Public Library of Science, 8(12), e83125.

[7] Hoseini, M., Mahmudzadeh, Y., Alizadeh, M. (2015). Production of synbiotic fruit juice, pH measurements, brix and viscosity, First national conference on advances in biological and agricultural sciences, Tehran, Zabol University. In Persian.

[8] Aviram, M., Dornfeld, L., Kaplan, M., Coleman, R., Gaitini, D., Nitecki, S. Hofman, A., Rosenblat M., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Hayek, T. and Fuhrman, B. (2013). Pomegranate juice favonoids inhibit LDL oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans.

Drugs under Experimental and Clinical Research journal, 28, 49-62.

[9] Clifford, M., Gibson, G., Henglong, H.U. and Rodig- Penman, A. (2006). Prebiotic use of fruits and fruit juices in the promotion of beneficial gut microflora. *European PatentSpecific*, Patent NO: US20090022849. 1-12.

[10] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2012). Probiotic microorganisms-Specifications and test methods. Iranian National Standard No. 19459 (In Persian).

[11] Institute of Standards and Industrial Research of Iran (1997). pH measurements in products and bread. Iranian National Standard No. 4044 (In Persian).

[12] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2000). Determination of acidity in fruit and vegetable products, Test method, Iranian National Standard No. 373, 31-39 (In Persian).

[13] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2006). Fruit juice, Test method, Iranian National Standard No. 2685 (In Persian).

[14] Collins, D.M. and Gibson, G.R. (1999). Probiotics and synbiotics approaches for modulating the microbial ecology. Clinical nutrition, 69: 1052-1057.

[15] Mirjalili, S.A. (2014). A review of biochemical compounds and medicinal properties of pomegranate. *Journal of Medicinal Plants*, 14(56): 23-39 (In Persian).

[16] Chishonlm, D.H. and Picha, D.H. (1986). Effect of storage temperature on sugar and organic acid contents of watermelon. *Journal of hort science*, 2(4): 1031-1033.

[17] Yoon, H., Hewes, D., Salaheen, S., Federman, C. and Biswas, D. (2004). Effects of blackberry juice on growth inhibition of food borne pathogens and growth promotion of Lactobacillus. *Food Control*, 37: 15-20.

[18] Nualkaekul, S., Deepika, G. and Charalampopoulos, D. (2012). Survival of freeze dried Lactobacillus plantarum in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. *Food Research International*, 48: 627–633.

[19] Molva, C. and Baysal, A.H. (2015). Effects of pomegranate and pomegranate – apple blend juices on the growth characteristics of alicyclobacillus acidoterrestris DSM 3922 type strain vegetative cells and spores. *International journal of Food Microbilogy*, 200: 52-56.

[20] Wang, J.Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Miyaji, K.., Enomoto, K., Sakoda, T., Iwatsuki, K. and Enomoto, T. (2007). Clinical efficacy of probiotic *bifidobacterium longum* for the treatment of symptoms of Japanese cedar pollen allergy in subjects evaluated in an environmental exposure unit. *Allergology International*, 56 (1): 67–75.

Investigating the possibility of using *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus kunkeei* isolated from honey in the preparation of probiotic pomegranate juice

Ghorbani, N. [1], Nateghi, L. [2*], Tajabadi, N. [3]

1. MSC Student, Department of Food Science and Technology, Varamin Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
3. Department of Honey Bee, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Bee plays an important role as a useful insect in nature due to pollination. The gastrointestinal tract of the bee has coexist microorganisms. In this study, probiotics *Lactobacillus Kankei* and *Lactobacillus plantarum* isolated from honey were prepared and after diagnostic tests including acid resistance, bile salts resistance, gastric juice resistance (pepsin, trypsin), lack of hemolytic activity, hydrolysis of L–arginine were added at the rate of 10^7 and 10^8 CFU/ml to pomegranate juice individually and in combination and pomegranate juice tests including acidity, pH, evaluation of soluble solids content (Brix) and evaluation of viability of probiotic bacterial in days zero, day seven, day fourteen and twenty one days was conducted on pomegranate juice. According to the results both microorganisms exhibited probiotic properties.The results of pomegranate juice tests showed that with increasing the storage time and probiotic population, the rate of acidity increased and the rate of pH and brix significantly ($p<0.05$) decreased. The viability of all probiotic bacteria in pomegranate samples significantly ($p<0.05$) decreased during the storage time, so that after 21 days of storage, the highest survival rate was observed in pomegranate samples inoculated with population of 10^8 CFU/ml and mixed samples of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus Kankei* and mentioned sample was selected as superior treatment.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus keneki*, probiotic honey, probiotic pomegranate juice

* Corresponding Author E-Mail Address: Leylanateghi@yahoo.com