بررسی امکان تولید و ارزیابی ویژگی‌های کیفی ژله پروبیوتیک و سین‌بیوتیک دارای *باسیلوس کواگولانس*

الهام رجب‌پور نیکو[1]، ثمر منصوری‌پور[2*]، جواد حامدی[3]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳. پردیس علوم دانشگاه تهران، دانشکده زیست‌شناسی وقطب تبارزایی موجودات زنده، بخش زیست‌فناوری میکروبی، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *s_mansouripour@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۳

چکیده

در این پژوهش نمونه‌های ژله پروبیوتیک (دارای باکتری *باسیلوس کواگولانس*)، سین‌بیوتیک (دارای *باسیلوس کواگولانس* و ترکیب پری‌بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید)، به همراه شاهد (فاقد باکتری و ترکیب پری‌بیوتیک) تولید شدند و شش هفته در یخچال نگهداری شدند. ارزیابی پروبیوتیک‌ها به صورت هفتگی انجام شد. جهت تأیید ایمنی آزمون‌های میکروبی بررسی باکتری‌های *اشرشیاکلی، سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های لاکتیکی انجام شد. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های ژله شامل pH، بریکس و سینرسیس (آب‌اندازی) در طول شش هفته ارزیابی گردید. ویژگی‌های حسی نمونه‌ها با آزمون حسی بررسی شد. نتایج نشان داد که در طول شش هفته روند کاهشی پروبیوتیک‌ها در نمونه‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک وجود داشته است. نمونه‌های ژله ویژگی پروبیوتیک بودن را تا هفته ششم حفظ نمودند اما تا حدوداً بین هفته‌های چهارم و پنجم وضعیت مطلوب‌تر بود. ازنظر ایمنی در هیچ‌یک از نمونه‌ها میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش مشاهده نشد. نتایج بریکس نشان داد که از هفته پنجم روند کاهشی در نمونه‌های پروبیوتیک و سین-بیوتیک نسبت به شاهد مشهودتر بود که در هفته ششم معنادار نیز بوده است ($p<۰/۰۵$). pH نمونه‌ها تا قبل از هفته چهارم با یکدیگر اختلاف معناداری نداشته‌اند ($p>۰/۰۵$) اما بعد از آن نمونه‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک به طور معناداری نسبت به نمونه شاهد pHکمتری داشتند ($p<۰/۰۵$). در آزمون سینرسیس، در هیچ‌یک از نمونه‌ها سینرسیس مشاهده نشد. نتایج آزمون حسی بیانگر عدم تأثیر معنادار افزودن باکتری پروبیوتیک و ترکیب پری‌بیوتیک به نمونه‌های ژله، نسبت به شاهد بود ($p>۰/۰۵$). بنابراین با توجه به نتایج حاصل شده می‌توان ژله پروبیوتیک و سین‌بیوتیک با ویژگی‌های کیفی مناسب تولید نمود.

کلید واژه ها: ژله، پروبیوتیک، *باسیلوس کواگولانس*، پری‌بیوتیک،گالاکتوالیگوساکارید.

مقدمه

در سال‌های اخیر، بیشتر مصرف‌کنندگان نه‌تنها محصولات غذایی با ارزش غذایی بالا را ترجیح می‌دهند بلکه اعتقاد دارند که اثرات آن‌ها روی سلامتی بیشتر است. این ویژگی‌ها می‌تواند در گروه جدیدی از محصولات با عنوان غذاهای حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک یافت شود. در این میان ژله یکی از انواع مواد غذایی است که به‌عنوان دسر، طرفداران زیادی خصوصاً در بین کودکان دارد (Baker et al., 2004). با توجه به پرطرفدار بودن این محصول، بالاتر بردن ارزش غذایی آن می‌تواند حائز اهمیت باشد. ژله انواع مختلفی مانند ژله‌های آماده به مصرف، ژله دسر، ژله قنادی و ژله نوشیدنی دارد. ژله آماده به مصرف، فرآورده‌ای است که از مخلوط کردن مواد ژله‌کننده (کاراگینان، ژلاتین، پکتین، آگار و...)، شکر یا سایر شیرین‌کننده‌ها، حجم دهنده‌های مجاز خوراکی، رنگ، اسانس مجاز خوراکی و یا پودر عصاره طبیعی میوه‌ها،

اسیدهای مجاز خوراکی و سایر مواد متشکه فرعی (پودر تخم مرغ، پودر کاکائو ،زعفران و...) پس ازفرآوری تهیه می‌شود (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۸). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به تعداد کافی به ماده غذایی اضافه شوند اثرات سلامتی‌بخش در میزبان به جای می‌گذارند (FAO and WHO, 2002). باسیلوس‌ها به دلیل توانایی زنده‌مانی در شرایط سخت حرارتی و اسیدی دستگاه گوارش، اهمیت ویژه‌ای دارند. این توانایی ویژه به دلیل داشتن اسپور است. *باسیلوس کوآگولانس*[1] باسیل گرم مثبت، اسپوردار و متحرک است. این باکتری، یک پروبیوتیک تولیدکننده اسپور است. به‌طورکلی اسپور، سلول را تا حد زیادی از اثرات حرارتی و فشار حفظ می‌کند (گنجوری و همکاران،۱۳۹۱). بنابراین پایداری و مقاومت اسپور این میکروارگانیسم، آن را به‌عنوان گزینه‌ای مناسب به‌منظور استفاده در محصولات غیر لبنی به ویژه موادی مانند ژله که دارای pH پایین و فراورش حرارتی در حین تولید می‌باشند قرار می‌دهد. البته مطالعات در ارتباط با پایداری *باسیلوس کوآگولانس* در طول فرآوری و نگهداری توسط محققان نشان داده است که این باکتری دارای خاصیت جذب رطوبت متوسط بوده و قابلیت زیستی آن تحت تأثیر فشارهای بالا و تغییرات pH قرار گرفته و کاهش می‌یابد (Bora et al., 2009). لازم به ذکر است که هیچ شواهدی برای جهش‌زا بودن و ژنوتوکسیک بودن این باکتری وجود ندارد (Endres et al., 2009).

پری‌بیوتیک‌ها مواد غذایی هستند که نمی‌توانند توسط سیستم گوارش انسان هضم شوند اما توسط میکروب‌های مفید روده‌ای متابولیزه می‌شوند. آن‌ها ترکیبات هضم‌ناپذیر یا هضم‌پذیر اندک در برابر آنزیم‌های گوارشی بدن انسان هستند که رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را به‌طور انتخابی تحریک می‌کنند. ترکیبات پری‌بیوتیک شامل اینولین، فروکتوالیگوساکارید، گالاکتوالیگوساکارید، لاکتولوز، نشاسته مقاوم و... می‌باشند. در صنایع غذایی، این ترکیبات می‌توانند جهت بهبود ارزش تغذیه‌ای محصول و یا اهداف فناورانه مورد استفاده قرار گیرند (Wang, 2009; حسینی و همکاران، ۱۳۹۶). گالاکتوالیگوساکاریدها ترکیبات غذایی غیرقابل‌هضم بر پایه کربوهیدرات هستند که دراثر فعالیت آنزیمی بتا-گالاکتوزیداز روی لاکتوز درطی واکنش ترانس گالاکتوزیلاسیون تولید می‌شوند. به عبارت دیگر اگر بتاگالاکتوزیداز به‌جای خاصیت هیدرولیز سوبسترا، به‌عنوان ترانسفراز عمل میکند و باعث تشکیل ترکیبات ارزشمندی به نام گالاکتوالیگوساکاریدها می‌شود (Gosling et al., 2010; Sangwan et al., 2011).

سین‌بیوتیک‌ها فرآورده‌هایی هستند که به‌طور توأم دارای پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها هستند، کاربرد توأم دو عامل یادشده با هدف ایجاد هم‌افزایی در اثرات سلامت بخش آن‌ها صورت می‌گیرد (Nabas et al., 2014). با استفاده از پروبیوتیک‌ها در ژله و مقایسه به کارگیری باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La5 به صورت آزاد و ریزپوشانی شده درون ژله مشخص شد که نوع ریزپوشانی شده با آلژینات و کیتوزان قابلیت زیستی بهتری در طول ماندگاری داشته است (Talebzadeh and Sharifan, 2016). در پژوهشی دیگر نیز قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در دو نوع ژله سین‌بیوتیک وپروبیوتیک بررسی شد و از فروکتوالیگوساکارید به‌عنوان ترکیب پری‌بیوتیک استفاده شد. نتایج نشان داده که نمونه سین‌بیوتیک حاوی چهار درصد فروکتوالیگوساکارید تنها نمونه‌ای بود که توانسته است در طی ۹۰ روز خاصیت سین‌بیوتیکی خود را حفظ کند (سبزی‌چی، ۱۳۹۳). در پژوهش های پیشین از *باسیلوس کوآگولانس* برای غنی سازی نان حجیم شده (گنجوری و همکاران،۱۳۹۱)، ماست کم چرب پروبیوتیک (ضیایی و همکاران، ۱۳۹۲)، دو نوع گز معمولی و بدون قند

1_ *Bacillus coagulans*

(دلیران‌فیروز و همکاران، ۱۳۹۳) و... استفاده شده است که نتایج موفقیت‌آمیزی حاصل شده است؛ اما تا به حال از باکتری *باسیلوس کوآگولانس* در ژله استفاده نشده است. در این مطالعه قابلیت زیستی *باکتری باسیلوس کواگولانس* پس از تولید و نگهداری نمونه‌های ژله پروبیوتیک و سین‌بیوتیک و همچنین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش‌کار

باکتری *باسیلوس کوآگولانس* به صورت لیوفیلیزه از شرکت تک ژن خریداری شد و سپس جهت تأیید گونه باکتری بسته بندی آن را زیر هود باز کرده و درون محیط نوترینت آگار به صورت سطحی کشت داده شد و پس از تشکیل کلنی، توسط رنگ آمیزی گرم تأیید شد. ژله مورد استفاده در این پژوهش از نوع آماده به مصرف بود که از یکی از کارخانجات داخلی تهیه شد. سپس سه نمونه ژله آماده شد: نمونه پروبیوتیک دارای باکتری *باسیلوس کوآگولانس* (J_1)، نمونه سین‌بیوتیک دارای *باسیلوس کوآگولانس* همراه با پری بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید (J_2) و نمونه شاهد (فاقد پروبیوتیک و پری‌بیوتیک) (J_3). به‌منظور تهیه نمونه‌ها ابتدا، شکر و آب و کاراگینان موجود در فرمولاسیون ژله با یکدیگر مخلوط شده (درنمونه سین‌بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید نیز اضافه شد) و تا دمای ۸۰ درجه سلسیوس به همراه هم زن حدود ۲۰-۱۵ دقیقه حرارت داده شدند. پس از تنظیم pH و در مرحله آخر حرارت دهی در دمای حدوداً ۶۰ درجه سلسیوس، سویه پروبیوتیک اضافه و پس از چند دقیقه اختلاط، بلافاصله ترکیب مواد به درون ظروف ژله ریخته شد. پس از درب‌بندی، نمونه‌ها در ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه شده و پس از سرد کردن تا دمای محیط به مدت شش هفته در یخچال نگهداری شدند (Talebzadeh and Sharifan, 2016).

آزمون میکروبی

برای شمارش باکتری *باسیلوس کوآگولانس* پس از تهیه رقت از نمونه‌ها، در محیط کشت MRS آگار کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و سپس شمارش شد (دلیران‌فیروز و همکاران، ۱۳۹۳). کشت میکروبی و بررسی قابلیت زیستی باکتری پروبیوتیک، با نمونه‌برداری از نمونه‌های ژله تهیه‌شده، به‌صورت هفتگی در دو تکرار انجام گرفت.

همچنین جهت تأیید ایمنی نمونه‌های ژله آزمون‌های میکروبی جداگانه‌ای انجام گرفت. برای کشت *اشرشیا-کلی* (*Escherichia coli*) ابتدا نمونه رقت سازی شد و سپس در محیط ویولت‌ردبایل‌آگار کشت سطحی داده و سپس در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. برای *سالمونلا* (*Salmonella*) پس از مرحله غنی‌سازی اولیه و انتخابی در مرحله بعد در محیط کشت اختصاصی سالمونلاشیگلاآگار کشت داده شد. برای *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) پس از رقت سازی در محیط مانیتول‌سالت‌آگار به‌صورت سطحی کشت داده شد. سپس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شد. جهت بررسی باکتری‌های لاکتیکی پس از تهیه رقت از نمونه‌ها، آن‌ها به محیط اورنج‌سرم‌آگار انتقال داده و کشت سطحی داده شدند (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۹۲).

آزمون های فیزیکوشیمیایی

آزمون pH با استفاده از دستگا pH متر و بریکس یا میزان مواد جامد محلول در آب با رفراکتومتر انجام شد (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۸). سینرسیس نمونه‌های ژله با استفاده از سانتریفیوژ با شرایط g ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط اندازه‌گیری گردید. وزن اولیه نمونه‌های ژله ثبت شد و پس از

آزمایش، سینرسیس به‌صورت زیر محاسبه گردید (حسینی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۴):

$$\text{درصد سینرسیس} = \frac{\text{وزن مایع جدا شده}}{\text{وزن ژله}} \times ۱۰۰$$

آزمون حسی

این آزمون به روش هدونیک پنج نقطه‌ای (امتیازی) توسط هفت نفر از ارزیابان حسی انجام شد. به هر یک از ارزیابان نمونه‌های با کد متفاوت داده شد و فاکتورهای مزه، بو، رنگ، بافت و پذیرش کلی در مورد نمونه‌ها مورد ارزیابی قرارگرفت (Talebzadeh and Sharifan, 2016).

تحلیل آماری

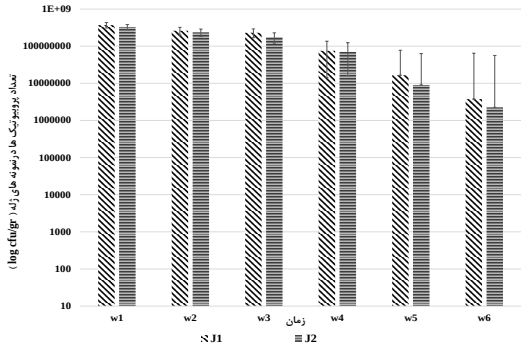
تجزیه و تحلیل نتایج آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار مینی تب ۱۶ در سطح احتمال خطای پنج درصد انجام شد.

نتایج

نتایج آزمون میکروبی

قابلیت زیستی باکتری پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* بدون حضور ترکیب پری‌بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید و همراه با گالاکتوالیگوساکارید در طی شش هفته نگهداری نمونه‌های ژله بررسی شد که نتایج آن در نمودار ۱ نشان داده شده است. بر این اساس روند کاهشی پروبیوتیک‌ها در نمونه‌های ژله مشاهده شد و از هفته چهارم به بعد کاهش مشهودتری وجود داشته است ($p<۰/۰۵$). اما تفاوت معناداری بین نمونه پروبیوتیک و سین‌بیوتیک دیده نشد ($p>۰/۰۵$). تا چهار هفته وضعیت قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها مطلوب گزارش شد و بالاتر از $۱۰^۷$ CFU/g بود اما از هفته پنجم و ششم روند کاهشی به‌صورت مشهودتری دیده شد.

از نظر ایمنی، پس از کشت نمونه‌های ژله هیچ رشد و تشکیل کلنی برای باکتری *اشرشیاکلی*، *سالمونلا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های لاکتیکی دیده نشد. درنتیجه سالم بودن نمونه‌های ژله تأیید شد.



نمودار ۱- تغییرات جمعیت *باسیلوس کواگولانس* درنمونه‌های ژله پروبیوتیک و سین‌بیوتیک در شش هفته
نمونه ژله پروبیوتیک: J_1، نمونه ژله سین‌بیوتیک:J_2

نتایج آزمون فیزیکوشیمیایی

نتایج pH نمونه‌ها در جدول ۱ نشان داده‌شده است. با توجه به تحلیل آماری بین نتایج اختلاف معناداری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). همان‌طور که مشاهده می‌شود تا قبل از هفته چهارم نمونه‌ها اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند ($p>۰/۰۵$) اما از هفته چهارم به بعد تفاوت معنادار شده وpH نمونه‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک نسبت به شاهد اسیدی‌تر بوده است ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱- نتایج آزمون pH نمونه‌های ژله

	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
J1	۴/۱۳±۰/۰۱۴^a	۴/۱۲±۰/۰۲۱^a	۴/۱۲±۰/۰۰۷^a	۴/۰۹±۰/۰۰۷^{ab}	۴/۰۱±۰/۰۲۸^b	۳/۹±۰/۰۲۸^b
J2	۴/۱۶±۰/۰۱۴^a	۴/۱۳±۰/۰۰۷^a	۴/۱۲±۰/۰۰^a	۴/۰۸±۰/۰۱۴^b	۳/۹۷±۰/۰۲۱^b	۳/۸۹±۰/۰۲۸^b
J3	۴/۱۶±۰/۰۱۴^a	۴/۱۴± ۰/۰۱۴^a	۴/۱۳±۰/۰۰۷^a	۴/۱۳±۰/۰۰۷^a	۴/۱۲±۰/۰۱۴^a	۴/۱۱±۰/۰۰۷^a

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیارگزارش شده و مقادیر باحروف مشابه در هر ستون اختلاف معناداری بایکدیگر ندارند ($p>۰/۰۵$).
نمونه ژله شاهد (فاقد پروبیوتیک و پری‌بیوتیک): J_3، نمونه ژله سین‌بیوتیک: J_2، نمونه ژله پروبیوتیک دارای *باسیلوس کوآگولانس*: J_1

نتایج حاصل از ارزیابی بریکس نمونه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. از نظر آماری اختلاف معناداری بین نمونه‌ها وجود دارد ($p<۰/۰۵$). از هفته پنجم به بعد بریکس نمونه‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک نسبت به شاهد روند کاهشی مشهودتری داشته که در هفته ششم این کاهش معنادار نیز بوده است ($p<۰/۰۵$).

نتایج سینرسیس یا آب‌اندازی نمونه‌های ژله در حد صفرگزارش شد و هر سه نمونه دارای درصد بسیارکمی آب‌اندازی بودند.

جدول۲- نتایج درصد بریکس نمونه‌های ژله

نمونه	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
J1	۲۷±۰,۰۰^{a}	۲۶/۷۵±۰/۳۵ ^{a}	۲۶/۵±۰/۷۰۷^{a}	۲۵/۲۵±۰,۳۵^{a}	۲۲/۵±۰/۷۰۷^{a}	۲۰/۷۵±۰/۳۵^{b}
J2	۲۷±۰/۰۰۹^{a}	۲۶/۷۵±۰/۳۵ ^{a}	۲۶/۵±۰/۷۰۷^{a}	۲۵/۷۵±۰,۳۵^{a}	۲۳± ۱/۴۱^{a}	۲۱/۵±۰/۷۰۷^{b}
J3	۲۶/۵±۰/۷۰۷^{a}	۲۶/۲۵±۰/۳۵ ^{a}	۲۶/۵±۰/۰۰^{a}	۲۶/۲۵±۰,۳۵^{a}	۲۶/۵±۰/۷۰۷^{a}	۲۶/۲۵±۰/۳۵^{a}

نتایج به صورت میانگین ±انحراف معیارگزارش شده و مقادیر باحروف مشابه در هر ستون اختلاف معناداری بایکدیگر ندارند ($p>۰/۰۵$).

نمونه ژله شاهد (فاقد پروبیوتیک و پری‌بیوتیک): J_3، نمونه ژله سین‌بیوتیک: J_2، نمونه ژله پروبیوتیک دارای *باسیلوس کوآگولانس*: J_1

نتایج آزمون حسی

نتایج مربوط به ارزیابی حسی ژله طی مدت نگهداری در جدول ۳ نشان داده‌شده است. باوجود اختلافات جزئی بین نمونه‌ها از نظر مزه، رنگ، بو و بافت، اختلاف معناداری بین آنها دیده نمی‌شود ($p>۰/۰۵$). در موردپذیرش کلی با اینکه درواقع نمونه J_1 (پروبیوتیک) امتیاز کمتری نسبت به سایر نمونه‌ها دارد، ولی درنهایت با توجه به تحلیل آماری اختلاف بین نمونه‌ها ازنظر پذیرش کلی نیز معنادار نیست ($p>۰/۰۵$). بنابراین تولید نمونه‌های ژله پروبیوتیک و سین‌بیوتیک تأثیر معناداری روی ویژگی‌های حسی محصول نداشته است.

جدول ۳- نتایج آزمون حسی نمونه‌های ژله

	رنگ	بو	مزه	بافت	نمونه کلی پذیرش
J1	۴/۰۰±۱/۰۰^{a}	۳/۵۷±۰/۵۳ ^{a}	۳/۸۵±۰/۶۹ ^{a}	۳/۵۷± ۰/۹۷^{a}	۳/۷۱±۰/۹۵ ^{a}
J2	۴/۸۵±۰/۳۷^{a}	۴/۲۸± ۰/۹۵ ^{a}	۴/۱۴±۰/۶۹ ^{a}	۴/۴۲± ۰/۵۳^{a}	۴/۲۸±۰/۴۸ ^{a}
J3	۴/۱۴±۰/۸۹ ^{a}	۴/۰۰±۰/۵۷^{a}	۳/۷۱±۰/۷۵^{a}	۳/۸۵± ۰/۸۹ ^{a}	۴/۰۰±۰/۸۱ ^{a}

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیارگزارش شده و مقادیر باحروف مشابه در هر ستون اختلاف معناداری بایکدیگر ندارند ($p>۰/۰۵$).

نمونه ژله شاهد (فاقد پروبیوتیک و پری‌بیوتیک): J_3، نمونه ژله سین‌بیوتیک: J_2، نمونه ژله پروبیوتیک دارای *باسیلوس کوآگولانس*: J_1

بحث

از آن‌جایی که باکتری خریداری شده به صورت ریز-پوشانی شده بود، نقل و انتقالات مواد مغذی و تبادلات با محیط اطراف کاهش پیداکرده و باعث شد که تفاوت بین نمونه‌ها معنادار نباشد ($p>۰/۰۵$). بنابراین حضور گالاکتوالیگوساکارید در نمونه سین‌بیوتیک نتوانسته میزان پروبیوتیک‌ها را افزایش دهد. از هفته پنجم و ششم روند کاهشی پروبیوتیک‌ها به‌صورت مشهودتری دیده شد. دلیل آن ممکن است به علت تجزیه شدن کپسول‌ها و رها شدن باکتری‌های پروبیوتیک در محیط اسیدی باشد (Talebzadeh and Sharifan, 2016). حداقل میزان پروبیوتیک در محصولات غذایی برای ایجاد اثرات سلامتی‌بخش در برخی ازمنابع CFU/g $۱۰^{۶}$ بیان‌شده است (دلیران‌فیروز و همکاران،۱۳۹۳؛ Talebzadeh and Sharifan, 2016). البته برخی دیگر این میزان را CFU/g $۱۰^{۷}$ و

10^8 CFU/g درمحصول غذایی ذکر نموده‌اند (Vasiljevic et al., 2008). بنابراین می‌توان ادعا کرد که نمونه‌های ژله، ویژگی پروبیوتیک بودن خودشان را تا هفته ششم حفظ نموده‌اند. اما بهترین زمان مصرف آن‌ها می‌تواند حدوداً هفته‌های چهارم و پنجم باشد. غنی‌سازی نان‌های حجیم‌شده با *باسیلوس کوآگولانس* توسط گنجوری و همکاران (۱۳۹۱) انجام شده است و نتایج نشان داده که پس از پخت نان تعداد باکتری از 10^8 سلول در هر گرم به 10^6سلول کاهش یافته است. پس از نگهداری باکتری‌ها به مدت یک هفته در یخچال نیز مشخص شد که به‌طور میانگین10^5 سلول در هر گرم از نان، زنده باقی‌مانده است. (گنجوری و همکاران، ۱۳۹۱). با بررسی قابلیت زیستی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ژله‌های میوه‌ای سین‌بیوتیک حاوی چهار درصد فروکتوالیگوساکارید، دو درصد فروکتوالیگوساکارید و نمونه پروبیوتیک نیز روند کاهشی مشاهده شد. نمونه شاهد و دو درصد فروکتوالیگوساکارید تا۶۰ روز حداقل میزان لازم باکتری پروبیوتیک که 10^6 CFU/g است را داشتند و نمونه سین‌بیوتیک چهار درصد فروکتوالیگوساکارید ، طی ۹۰ روز خاصیت سین‌بیوتیک خود را حفظ نمود (سبزی‌چی، ۱۳۹۳). طالب‌زاده و شریفان (۲۰۱۶) با بررسی استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ژله مشاهده کردند که قابلیت زیستی باکتری در طول مدت نگهداری کاهش یافت. میزان باکتری‌های آزاد درون نمونه ژله در روز ۳۰، 10^5 CFU/gگزارش شد؛ در حالی‌که در نمونه‌های ژله حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده، 10^7-10^8 CFU/g بود (Talebzadeh and Sharifan, 2016).

در ارتباط با نتایج pH نظر می‌رسد که تا قبل از هفته چهارم به دلیل وجود پوشش (کپسول) در باکتری پروبیوتیک که ریزپوشانی بود، اختلاف معناداری بین نمونه‌ها مشاهده نشده است ($p>0/05$). زیرا وجود پوشش نقل و انتقالات را بین سلول باکتری و محیط اطراف کاهش می‌دهد. ولی از هفته چهارم به بعد باگذشت زمان و آسیب به پوشش باکتری‌ها و افزایش سرعت نقل و انتقال مواد مغذی باعث شده که درواقع قند بیشتری مصرف شود وpH کاهش بیشتری یابد. در مطالعه‌ای که توسط طالب‌زاده و شریفان (۲۰۱۶) انجام شد، به‌جز نمونه حاوی باکتری‌های آزاد که تفاوت معناداری ازلحاظ تغییرات pH با سایر نمونه‌ها داشت ($p<0/05$)، هیچ‌گونه تغییر معنادار pH در طول مدت نگهداری نمونه‌های ژله ریزپوشانی شده با کلسیم آلژینات و همچنین ریزپوشانی شده با کلسیم آلژینات پوشیده شده با کیتوزان مشاهده نشد ($p>0/05$) (Talebzadeh and Sharifan, 2016). در پژوهشی دیگر با بررسی pH آبمیوه‌های حاوی اینولین مشخص شد که کاهش pH برای *لاکتوباسیلوس کازئی* ریز-پوشانی شده کمتر از نوع آزاد بود؛ زیرا سرعت انتقال و فعالیت متابولیکی پروبیوتیک‌ها در سلول‌های ریز-پوشانی شده کاهش می‌یابد و کاهش pH محیط توسط باکتری‌ها در زمان طولانی‌تری نسبت به نوع آزاد صورت می‌گیرد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۶). بررسی تغییرات pH توسط باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ژله میوه‌ای نیز نشان داد که میزان pH با افزودن ترکیبات پری‌بیوتیک به ژله کاهش یافت (سبزی‌چی، ۱۳۹۳).

روند کاهشی بریکس نمونه‌های پروبیوتیک و سین‌بیوتیک نسبت به شاهد با گذشت زمان بیشتر و از هفته ششم معنادار نیز بود ($p<0/05$). آسیب دیدن غشا کپسول باکتری باعث شده است به میزان بیشتری با محیط تبادل پیدا کند و قند موجود در محیط را مصرف کرده است که این اتفاقات باگذشت زمان بیشتر شده و درنتیجه بریکس کاهش یافته است. در پژوهشی دیگر روند کاهش بریکس در نمونه‌های کچاپ دارای پروبیوتیک آزاد سریع‌تر از ریزپوشانی شده مشاهده شدکه دلیل آن احتمالاً کاهش انتقالات و فعالیت

متابولیکی در نمونه‌های ریزپوشانی شده است (منصوری‌پور و همکاران، ۱۳۹۴).

نتایج سینرسیس حاکی از پایداری تمام نمونه‌های ژله است. عدم افزایش سینرسیس به معنای قابلیت نگهداری آب داخل بافت ژله است (حسینی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۴). دلیل آب‌اندازی بسیار کم نمونه‌ها، ظرفیت بالا در نگهداری آب به‌ویژه در سرعت‌های بالای سانتریفیوژ است که می‌تواند به علت استفاده از صمغ یا هیدروکلوئید در فرمولاسیون نمونه‌های ژله باشد که در مورد هر سه نمونه یکسان است. بنابراین افزودن پروبیوتیک و گالاکتوالیگوساکارید به نمونه‌ها در واقع تأثیری در بافت محصول و آب‌اندازی نداشته است.

ویژگی‌های حسی محصول نقش تعیین‌کننده‌ای در پذیرش آن توسط مصرف‌کننده دارند. به‌این‌ترتیب که حتی اگر آن فرآورده ویژگی فراسودمند و سلامتی‌بخش داشته باشد، درصورتی‌که ویژگی‌های حسی مناسبی مانند مزه، رنگ، بو و بافت نداشته باشد، درنهایت موردپذیرش مصرف‌کننده نخواهد بود. در پژوهش حاضر توجه به نتایج حاصل‌شده در رابطه با فاکتورهای حسی و همچنین پذیرش کلی، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزودن باکتری پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* به نمونه‌های ژله و نگهداری آن‌ها به مدت شش هفته در دمای یخچال و همچنین افزودن ترکیب پری‌بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید باعث تغییر معنادار ویژگی‌های حسی محصول و پذیرش مصرف‌کننده نشده است. در مطالعه دیگر که گنجوری و همکاران (۱۳۹۱) انجام دادند، نمونه نان حجیم‌شده غنی‌سازی شده با باکتری *باسیلوس کوآگولانس* را با نمونه شاهد فاقد باکتری مقایسه کردند. کیفیت نمونه غنی‌سازی شده از هر لحاظ بالاتر و مطلوب‌تر از نمونه شاهد بود (گنجوری و همکاران،۱۳۹۱). تورگت و کاکماکسی (۲۰۱۸) نیز اعلام نمودند که با افزودن باکتری‌های پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست توت‌فرنگی تأثیر چشمگیری روی بافت، طعم و پذیرش-کلی مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$) (Turgut and Cakmakci, 2018). همچنین در آزمون حسی ژله‌های میوه‌ای پروبیوتیک حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تفاوت معناداری در بافت، طعم و پذیرش‌کلی در نمونه‌های سین‌بیوتیک مشاهده نشد (سبزی‌چی، ۱۳۹۳).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که قابلیت زیستی باکتری پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* طی شش هفته در حد استاندارد در نمونه‌های ژله حفظ شد البته بهترین زمان مصرف نمونه‌ها می‌تواند حدوداً هفته چهارم و پنجم باشد. تفاوت معناداری نیز بین نمونه پروبیوتیک و سین‌بیوتیک دیده نشد ($p>۰/۰۵$). همچنین تمام نمونه‌ها از نظر ویژگی فیزیکوشیمیایی و حسی قابل قبول بودند. براساس نتایج حاصل شده می‌توان ژله پروبیوتیک و سین‌بیوتیک را با افزودن باکتری *باسیلوس کوآگولانس* و گالاکتوالیگوساکارید به عنوان محصول غذایی فراسودمند با ویژگی‌های کیفی مناسب تولید نمود. بنابراین با توجه به افزایش چشمگیر پژوهش‌ها در ارتباط با محصولات غیر لبنی پروبیوتیک و پرطرفدار بودن ژله به ویژه در میان کودکان، امید است که در آینده زمینه تولید صنعتی این نوع از ژله‌های فراسودمند نیز فراهم گردد.

منابع

۱. حسینی، محمدیار.، زادباری، محمودرضا و علیزاده، محمد. ۱۳۹۶. تولید آبمیوه سین‌بیوتیک: بررسی تاثیرpH، بریکس ،اندیس فرمالین و رئولوژی. مجله علوم و صنایع غذایی. شماره ۶۳، دوره ۱۴، صفحات ۸۱-۷۳.

۲. حسینی‌نژاد، مرضیه.، محتشمی، مریم.، کمالی، سارا و الهی، محمد. ۱۳۹۴. بهینه‌سازی فرمولاسیون پودر

ژله میوه‌ای کم کالری با استفاده ازشیرین کننده‌های سوکروز و ایزومالت. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، جلد ۴، شماره۱. صفحات ۷۴-۶۵.

۳. سازمان ملی استاندارد ایران. ۱۳۸۸. فراورده‌های ژله‌ای، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. استاندارد شماره ۲۶۸۲.

۴. سازمان ملی استاندارد ایران. ۱۳۹۲. میکروبیولوژی دسر و فرآورده‌های ژله‌ای –ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. استاندارد شماره ۱۷۹۸۳.

۵. سبزی‌چی، علی. ۱۳۹۳. تولید ژله میوه‌ای سین-بیوتیک با استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و فروکتوالیگوساکارید. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم کشاورزی.

۶. دلیران‌فیروز، غزل.، علیزاده، صبیحه‌السادات و گوهریان، محمد. ۱۳۹۳. بررسی قابلیت زیستی باکتری *باسیلوس کوآگولانس* در فرآیند تولید و مدت زمان نگهداری دو نوع گز معمولی وگز بدون قند. دو فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی. سال سوم، شماره ۱و۲، صفحات ۱۵-۹.

۷. ضیایی، اسماعیل.، اسکندری، محمد هادی.، امانی، الهه و شاد، احسان. ۱۳۹۲. تولید ماست پروبیوتیک کم چرب با استفاده از باکتری *باسیلوس کواگولانس* و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی آن. بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران. شیراز، ۹-۷ آبان ۹۲.

۸.گنجوری، مهشید.، مهرابیان، صدقیه و اخوان‌سپهی، عباس. ۱۳۹۱. غنی‌سازی نان‌های حجیم با باسیلوس-های بالقوه پروبیوتیک (*باسیلوس کوآگولانس*). مجله زیست فناوری دانشگاه تربیت‌مدرس، دوره ۳ ،شماره ۱، صفحات ۴۶-۳۷.

۹.منصوری‌پور، ثمر.، میزانی، مریم.، رسولی، سوسن.، شریفان، انوشه و گرامی، عباس. ۱۳۹۴. بررسی زنده-مانی و تأثیر *Lactobacillus acidophilus LA-5* و *Lactobacillus casei 431* بر ویژ گی‌های سس کچاپ پروبیوتیک. سومین همایش ملی پروبیوتیک و غذاهای فراسودمند. تهران، ۲۰-۱۸ بهمن ۹۴.

10. Baker, R.A., Berry, N., Hui, Y.H. and Barrett, D.M. 2004. Fruit preserves and jams. pp. 113-126. In: Barrett, D.M, Somogyi, L., Ramaswamy, H. (ed), Processing fruits: science and technology. Second Edition, CRC Press.

11. Bora, P.S., Puri, V. and Bansal, A.K. 2009. Physicochemical Properties and Excipient Compatibility studies of Probiotic *Bacillus coagulans* Spores. Sci. Pharm.77: 625-637.

12. Turgut, T. and Cakmakci, S. 2018. Probiotic Strawberry Yogurts: Microbiological, Chemical and Sensory Properties. Probiotics Antimicrob. Proteins. 10(1):64-70.

13. Endres, J.R., Clewell, A., Jade, K.A., Farber, T., Hauswirth, J. and Schauss, A.G. 2009. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. Food Chem Toxicol. 47(6):1231-8.

14. Food and Agriculture Organization and World Health Organization. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotic in Food: Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, FAO/WHO, London

15. Gosling, A., Stevens, G.W., Barber, A.R, kentish, S.E. and Gras, S.L. 2010. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. Food Chem. 121(2):307-318.

16. Nabas, Z., Haddadin, M.S.Y., Haddadin, J. and Nazer, I.K. 2014.Chemical Composition of Royal Jelly and Effects of Synbiotic with Two Different Locally Isolated Probiotic Strains on Antioxidant Activities. Pol. J. Food Nutr. Sci. 64(3): 171-180.

17. Sangwan, V., Tomar, S.K, Singh, R.R.B., Singh, A.K., Ali, B. and Ali, B. 2011. Galactooligosaccharides: Novel

Components of Designer Foods. J. Food Sci. 76(4):103-11.
18. Talebzadeh, S. and Sharifian, A. 2016. Developing Probiotic Jelly Desserts with *Lactobacillus Acidophilus*. J. Food Process. Preserv. 41(1):1-12.
19. Vasiljevic, T. and Shah, N.P .2008. Probiotics from Metchnikoff to bioactives. Int Dairy J. 18(7): 714-728.
20. Wang, Y. 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology. Food Res Int. 42:8–12.

Feasibility study of producing and evaluation the quality properties of probiotic and synbiotic jelly containing *Bacillus coagulans*

Rajabpour Nikoo E[1], Mansouripour S[2*], Hamedi J[3]

1. MSc Graduated of Microbiology, Department of microbiology, Faculty of Advance Sciences & Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran.

***Corresponding author**: *s_mansouripour@yahoo.com*

Received: 25 August 2019 Accepted: 24 November 2019

Abstract

In this research, jelly samples including probiotic (containing *Bacillus coagulans*), synbiotic (containing *B.coagulans* and galactooligosaccharide) and control (without probiotic and prebiotic) were produced and kept in the refrigerator for six weeks. Survival of probiotics was evaluated weekly. In order to confirm the safety, microbial tests including *E.coli*, *Salmonella*, *S.aureus* and lactic acid bacteria were carried out. Physicochemical properties of jelly samples including pH, brix and syneresis were considered for six weeks. Sensory evaluation was performed by taste panel assessment. The results showed that there was a decreasing trend of probiotics in probiotic and synbiotic jelly samples within six weeks. The samples kept their probiotic property until sixth week but it was more desirable almost until the fourth and fifth weeks. In safety microbial tests, no growth of the tested microorganisms was observed. Brix test results showed that the trend of brix reduction in probiotic and synbiotic samples was more evident than control from fifth week. This difference was also significant in the sixth week (p<0.05). The pH of the samples did not show significant difference before the fourth week (p>0.05). But after that, the pH of probiotic and synbiotic samples was significantly less than the control (p<0.05). According to the syneresis test, no syneresis was observed in the samples. The results of taste panel showed no significant differences compared to control by adding probiotic or prebiotic to jelly samples (p<0.05). Therefore, according to the results of this research, probiotic and synbiotic jellies can be produced with proper quality characteristics.

Keywords: Jelly, Probiotic, *Bacillus coagulans*, Prebiotic, Galactooligosaccharide.