(مقاله پژوهشی)

مطالعه‌تغییرات بارمیکروبی‌انکپسوله وآزادآب‌میوه‌های سین‌بیوتیک صنعتی به‌روش RSM-D-Optimal با کرت خردشده

محمدیارحسینی[1*]، محمد علیزاده[2]، محمود رضازادباری[2]

۱-استادیار،گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۱/۰۵ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۲/۲۶

DOI: 10.30495/jfst.2022.1955557.1787

چکیده

در سال‌های اخیر مصرف‌کنندگان علاوه بر در نظر گرفتن ویژگی‌های تغذیه‌ای‌که به صورت متعارف از یک ماده غذایی مورد نظر است به خصوصیات سلامت بخش محصول نیز توجه ویژه‌ای دارند. در این پژوهش به بررسی تاثیر ۵ متغیر شامل اینولین، زمان نگهداری، نوع میوه(سیب، آلبالو)، نوع میکروب(لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی) و نوع پوشش (انکپسوله و آزاد) بر پاسخ کنترل کیفی بار میکروبی آبمیوه های انکپسوله و آزاد پرداخته شد. آنالیز واریانس داده ها در سطح ۵ درصد نشان داد که در تمامی نمودارها متغیرهای‌مستقل‌اثرات معنی‌دار(p) برمتغیروابسته در این پژوهش داشتند. نتایج نشان داد با در نظر گرفتن اینولین مقدار میکروارگانیسمها بیشتر می‌شود و در حضور و عدم حضور نوع میوه در شمارش‌کلی تغییرات چشمگیری ایجاد نمی‌شود ولی نوع میوه می‌تواند روی تعداد میکروارگانیسم‌ها تاثیر داشته باشد. تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در محیط بیش از لاکتوباسیلوس‌کازئی مشاهده شد. با در نظر گرفتن نوع میوه و افزایش زمان تخمیرکاهش میکروارگانیسم‌ها را داریم که مربوط به pH محیط این میوه‌ها است. با افزایش زمان نگهداری و با در نظرگرفتن انکپسولاسیون درمراحل اولیه‌کمتراز میکروارگانیسم‌های غیرانکپسوله می‌باشد و اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار است. با در نظرگرفتن نوع میوه، شمارش‌کلی در لاکتوباسیلوس‌کازئی بیش از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌باشد چون در مراحل اولیه، رشد لاکتوباسیلوس‌کازئی‌که pH رشد متعادل‌تری نسبت به اسیدوفیلوس دارد و در طول زمان با کاهش pH جمعیت آن ها کمتر می‌شود.

واژه های‌کلیدی: آب‌میوه، پروبیوتیک، پری بیوتیک، فیزیکوشیمیایی، شمارش کلی.

*مسئول مکاتبات: m.hosseini@ilam.ac.ir

۱-مقدمه

به کارگیری پروبیوتیک‌ها در پیشگیری از بیماری‌ها و بهبود وضعیت سلامتی انسان و دام پیشینه‌ای چندین هزار ساله دارد. پروبیوتیک‌ها یا مواد حیات بخش در مقابل آنتی‌بیوتیک قرار می‌گیرد. در سال‌های اخیر مصرف‌کنندگان علاوه بر در نظر گرفتن‌ویژگی‌های تغذیه‌ای که به صورت متعارف از یک ماده غذایی مورد نظر است به خصوصیات سلامت بخش محصول نیز توجه ویژه‌ای دارند. به طورعمده پروبیوتیک‌هایی که بیش از همه‌کانون تحقیقات قرارگرفته‌اند، باکتری های تولید کننده اسیدلاکتیک شامل گونه های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم هستند. سازوکارتأثیرپروبیوتیک‌ها دربدن انسان از طریق تعدیل pHروده، تولید ترکیبات مهارکننده رشد باکتری‌ها، رقابت برای جذب مواد غذایی و تقویت سیستم ایمنی میزبان بروز می‌کند(۲۴).ماده غذایی سین بیوتیک فرآورده‌های پروبیوتیک حاوی‌پری‌بیوتیک است‌که در بردارنده دست کم یک ویژگی سلامت بخش مشخص، افزون برخواص‌تغذیه‌ای پایه می باشد. غذاهای‌پروبیوتیک‌به‌دسته‌ای‌ازفرآورده‌های‌غذایی گفته‌می‌شود که شامل یک یا مخلوطی از کشت‌های باکتریایی زنده و مفید هستند که مصرف آن‌ها باعث ایجاد تعادل در فلور میکروبی روده و در نهایت سبب افزایش سلامتی انسان می‌شود (۱و۳۰). پری‌بیوتیک‌ها ترکیباتی هستند که در برابر آنزیم‌ها و ترکیبات ترشح‌شده در بزاق و روده‌کوچک هضم ناپذیر یا اندک هضم هستند تا دست نخورده یا با شکست جزیی در محیط روده در دسترس پروبیوتیک‌ها قرارگیرند و به‌عنوان‌منابع‌کربن یا انرژی، رشدویا فعالیت‌این‌میکروارگانیسم‌ها را به طور انتخابی تحریک کنند. از مهم‌ترین پری بیوتیک‌های طبیعی و ساختگی می‌توان به‌فروکتو-الیگوساکاریدها(FOSs) که ممکن است به صورت خطی یا شاخه دار باشند اشاره کرد و مهم ترین آن اینولین می‌باشد(۴).اینولین‌درطبیعت‌به‌صورت‌کربوهیدرات‌های‌ذخیره‌ای درگیاهان، یا به‌صورت‌پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی در برخی از میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شود. درجه پلیمریزاسیون اینولین با توجه به نوع‌گیاه و میکروارگانیسم از ۲ تا ۶۰ متغیر است، با افزایش طول زنجیره‌ی فروکتوزی از قابلیت انحلال و میزان شیرینی‌این‌ترکیبات‌کاسته‌می‌شود به طوری که ترکیبات اینولین بادرجه‌پلی‌مریزاسیون۸- ۲ که به اینولوالیگوساکاریدها معروفند دارای‌بالاترین‌قابلیت‌انحلال‌درآب و شیرینی معادل ۳۰٪ شیرینی ساکارز می‌باشند(۵و۳۱). آب میوه‌ها دارای مواد مغذی مفیدی مانند مواد معدنی، ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها می باشند و می‌توانند ماده ای مناسب برای کشت باکتری باشد. این مواد از پتانسیل‌بالابرای‌تبدیل‌شدن‌به‌محصولات‌پروبیوتیک برخوردارند زیرا فراورده ای سلامت بخش هستند و برخلاف فراورده های لبنی فاقد ترکیبات ناسازگار با بدن نظیرلاکتوز بوده و منجر به محروم‌شدن بخشی از جمعیت از مصرف آن نمی‌شوند(۷و۳۰).

آب سیب یک نوشیدنی عمومی است و توسط عموم مردم به صورت کنسانتره نیز استفاده می‌شود. ۹۰ درصد میوه‌ها دارای اسید آسکوربیک و مقدار فنل بالا هستند. آب سیب به عنوان یک‌منبع‌خوب‌درتولیدآبمیوه استفاده می شود (۴). برای بررسی طیف زیاد آبمیوه ها آب آلبالو به عنوان آبمیوه اسیدی نیز در نظرگرفته‌شده‌است. متداولترین‌میکروارگانیسمهای‌مورد استفاده درمحصولات پروبیوتیک مربوط به گروه باکتری‌های لاکتیک اسید هستند که شامل نژادهای خاصی از جنس لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس‌هستند. کیونگ و همکاران(۲۰۰۶) آب کلم پروبیوتیک را با باکتریهای اسید لاکتیک مطالعه کردند و نتایج نشان داد که لاکتوباسیلوس‌کازئی در pH کم قادر به بقا نیست وزودتراز بین می‌رود (۱۹). دانا و همکاران(۲۰۰۷) در پژوهشی نشان دادند که آب کرفس پروبیوتیک ترش مزه می‌باشد و نیاز به‌اصلاحات‌دارد (۶). کراساکوپت و همکاران(۲۰۰۸)، آب میوه‌های پروبیوتیک را در مقیاس آزمایشگاهی بررسی کردند و نتایج نشان داد که کیفیت محصولات را می‌توان تا یک ماه حفظ نمود(۱۷و۱۸). در تحقیقی خلخالی و همکاران(۱۳۸۷)، نوشیدنی‌پروبیوتیکی ماء الشعیر را با چهار گونه لاکتوباسیلوس بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که ماءالشعیر در شرایطی که‌حاوی‌مخمرباشدبقا و ماندگاری چهار باکتری اسید لاکتیک بیشتر خواهد بود و این‌ماندگاری در شرایط دمایی‌اتمسفربهتر

است(۱۵).پورآگاهی‌وهمکاران (۱۳۸۹)، نوشیدنی‌های‌میوه ای را بر پایه لبنی‌بررسی کردند و نشان دادند که مصرف نوشیدنی حاوی پروبیوتیک به عنوان یک نوشیدنی سالم از طریق تثبیت فلورمیکروبی‌طبیعی‌روده، تعادل اعمال متابولیک و تقویت سیستم ایمنی در رژیم غذایی افراد مختلف به صورت عامل پشتیبان‌وراهکاری‌درمانی،مناسب‌وموثربه‌ویژه برای گیاهخواران، افراد مبتلا به آلرژی نسبت به تولیدات لبنی، افراد مبتلا به بیماری‌های گوارشی‌وغیرگوارشی ارزشمند و مطلوب محسوب می‌گردد (۲۸). پریرا و همکاران (۲۰۱۰) بر روی‌آب سیب تخمیرشده‌پروبیوتیک‌تحقیق کردندونشان‌دادندکه لاکتوباسیلوس کازئی‌دارای‌بیشترین‌رشددراین محصول می‌باشد(۲۷). همچنین ایاسه‌وهمکاران(۱۳۹۷)پژوهش‌هایی‌درموردآب‌هویج‌پروبیوتیک، دولت‌آبادی و همکاران(۲۰۱۶) در مورد بقای پروبیوتیک‌ها درآب پرتقال پاستوریزه، زندی و همکاران(۲۰۱۶) نوشیدنیهای ترکیبی- تخمیری پروبیوتیک بر پایه آب سیب، صباغ پور و همکاران(۱۴۰۰) آب آناناس پروبیوتک، هویج و چغندر قرمز، قضاوی و همکاران(۲۰۱۸) روی آب انار پروبیوتیک و بابایی وهمکاران(۲۰۱۸)وکینگ‌و همکاران(۲۰۰۶) تولید نوشیدنیهای پروبیوتیک آب گوجه انجام داده‌اند(۲و۳و۸و۱۰و۱۶و۳۹). از از آن جا که آب‌میوه فرآورده‌ای پرمصرف و پرطرفدار است و مصرف آن در بین سنین متغیر رایج است، در این مطالعه به تولید محصول جدیدی که در تولید صنعتی آبمیوه‌های سیب و آلبالو سین بیوتیک که حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک و ترکیبات پری بیوتیک می‌باشد، پرداخته شده است. هدف از انتخاب دو نوع آب‌میوه سیب و آلبالو، تفاوت چشمگیرpH بین آن‌ها است و نیز مرسوم بودن این آب میوه‌ها در بین عموم مردم جامعه می‌باشد. لازم به ذکر است که اکثر آب میوه‌ها در این دامنه pH قرار دارند.

۲-مواد و روشها

۲-۱-مواد

سویه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی ازمرکزملی‌ذخایرژنتیکی‌و زیستی ایران واقع درکرج خریداری شد.محیط کشت MRS،آلژینات‌سدیم،کلرید کلسیم،Tween80، کیتوزان، اسید استیک منجمد، سود، کاغذ واتمن شماره ۴ و بطری شیشه‌ای از شرکت فرآیندسازان خریداری شدند. مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این تحقیق با درجه خلوص بالا تهیه شد.

۲-۲-آماده‌سازی محیط کشت‌ها

لاکتوباسیلوس کازئی ولاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را هر کدام به‌طورجداگانه‌به‌داخل ۱۰ سی سی محیط کشت MRS broth تلقیح گردید.لاکتوباسیلوس کازئی‌رادردمای۳۷درجه سانتیگراد برای ۳ روز و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را برای ۲ روز تحت شرایط‌هوازی دردمای۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.سپس هر کدام‌ازمحیط کشت‌هارابه‌داخل۹۵ سی‌سی محیط کشت MRS broth منتقل‌شدوتحت‌شرایط بالا برای هرکدام انکوبه‌گذاری انجام‌گردید. بعد از پایان انکوبه‌گذاری برای استخراج سلولها، با سرعت ۱۵۰۰g برای ۱۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شد و دو بار با آب مقطرشسته شد. سوسپانسیون سلولی هر باکتری پروبیوتیک به دو بخش تقسیم گردید. یک بخش برای میکروانکپسولاسیون (۱۵ گرم از هر نمونه) و بخش دیگر برای سلول‌های آزاد (۱۵ گرم برای هر نمونه) در آب میوه صورت گرفت. قسمتی که‌برای‌سلول‌آزاد می‌باشد هر سلول را جداگانه درآب مقطر در دمای یخچال نگهداری شد(۲).

۲-۳-میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها

قسمت‌جداشده‌هرسلول‌توسط‌سرنگ‌استریل‌برای میکروانکپسولاسیون (تقریبا ۱۵گرم برای هرنمونه)، باآب مقطرشسته شد و هر سلول در ۵ سی سی آب مقطر به صورت جداگانه ریخته و هر نمونه رابا۲۰سی‌سی‌سدیم‌آلژینات۲٪ کاملاً میکس شد. مخلوط‌های حاصل‌در۱۲۱درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید (توجه‌شودکه‌دونمونه‌کلریدکلسیم‌حاوی‌Tween80نیز استریل گردد). سپس سوسپانسیون‌های سلولی را با سرنگ استریل که حاوی قطر سوزن ۰/۱۱ میلیمتر می‌باشد، به داخل هر نمونه ۸۰ سی‌سی کلریدکلسیم ۰/۰۵ مولار استریل (محلول شامل۰/۱

درصدTween80) می‌باشد، تزریق‌گردید. بعد از نیم ساعت در دو نمونه حاوی کلرید کلسیم پدیده ژل صورت گرفت که دانه‌ها با آب‌مقطرشسته شدند و در آب مقطر در دمای ۴ درجه سانتیگراد به‌طورجداگانه نگهداری گردید.(دو نمونه ۱۵ گرمی درآب مقطر تهیه شد). ۰/۴ گرم‌کیتوزان را با ۹۰ سی سی آب مقطراسیدی‌شده(با۰/۴سی‌سی اسید استیک منجمد)حل گردید سپس آب مقطر اضافه شد تا به غلظت نهایی ۰/۴٪ رسید. pH را با اضافه‌کردن سود ۱ مولار به ۵/۷-۶ تنظیم شد. سپس این ترکیب باکاغذ واتمن شماره ۴ تا حجم ۱۰۰ سی سی فیلتر شد. از این‌محلول دو نمونه تهیه شد. سپس محلول‌های۱۰۰ سی سی را در۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. ۱۵گرم از دانه‌های (سلول‌ها) شسته شده مرحله قبل(در داخل آب۴درجه‌سانتیگراد)به محلول‌کیتوزان ریخته شد و به آرامی با سرعت ۱۰۰rpm به مدت ۴۰ دقیقه همزده شد تا پدیده پوشش‌دهی صورت گیرد. کیتوزان پوشش داده شده با دانه‌ها (سلول‌ها)باآب‌مقطر شسته شد و درآب مقطر۴ درجه سانتیگراد نگهداری‌گردید. این‌سلول‌های‌انکپسوله‌برای همان روز استفاده شد. یک سی‌سی‌ازدانه‌های انکپسولاسیون دو نمونه ای باکتری و یک سی‌سی از سوسپانسیون سلول آزاد دو نمونه باکتری به ۲۰۰ سی‌سی آب‌میوه تراپک که فرآیند پاستوریزاسیون را طی کرده بود اضافه‌گردید. (اگرکنسانتره‌خالص‌استفاده‌کنیم‌آب میوه‌بایدپاستوریزه‌شود،سپس‌آب‌میوه‌هادربطری‌های‌استریل(Can) نگهداری‌شوند و درب بندی گردند) و در دمای یخچال (۴°c) طبق زمان طرح، آزمایش گردید(۵).

۲-٤-تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات این‌پروژه با استفاده ازRSM-D-Optimal با کرت خردشده در قالب ۵۷ تیمار مطابق جدول۱ انجام شد و آنالیزآن با نرم افزار SAS 4.5 صورت گرفت.

جدول ۱- طرح آزمایشات برای تیمارهای مختلف

		Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
Plot type	Run Order	A:Inulin %	B:Time days	C:Fruit type	D:Microbe type	E:Capsulated
i14	1	0	0	Apple	L.c	Capsulated
i15	2	0	28	Sour cherry	L.a+L.c	Free
	3	0.35	28	Sour cherry	L.a	Capsulated
	4	0.35	28	Apple	L.c	Capsulated
wp caps	5	0.35	0	Apple	L.a	Capsulated
	6	0	14	Apple	L.a+L.c	Capsulated
	7	0	28	Sour cherry	L.c	Capsulated
i8	8	0.175	14	Sour cherry	L.a	Free
	9	0	28	Sour cherry	L.a+L.c	Free
wp l.c+l.a	10	0.2625	14	Apple	L.a+L.c	Capsulated
	11	0.0875	21	Apple	L.a+L.c	Free
i9	12	0.175	14	Sour cherry	L.c	Capsulated
i10	13	0.35	0	Apple	L.c	Free
i11	14	0.35	28	Apple	L.a+L.c	Free
i12	15	0	0	Sour cherry	L.a+L.c	Capsulated
i13	16	0.0875	21	Apple	L.c	Capsulated
	17	0.0875	7	Sour cherry	L.a+L.c	Free

	18	0.35	28	Sour cherry	L.c	Free
wp sour	19	0	28	Sour cherry	L.a	Free
	20	0.0875	21	Sour cherry	L.a+L.c	Capsulated
	21	0.35	28	Apple	L.a+L.c	Free
sp la+l.c	22	0.35	28	Sour cherry	L.a+L.c	Capsulated
i5	23	0.175	28	Apple	L.a	Free
i6	24	0.35	28	Sour cherry	L.a+L.c	Capsulated
	25	0.175	0	Apple	L.a+L.c	Free
sp free	26	0.35	0	Sour cherry	L.a	Free
	27	0.175	14	Apple	L.c	Free
i7	28	0.175	0	Sour cherry	L.a	Capsulated
	29	0.35	0	Sour cherry	L.a	Free
	30	0	28	Apple	L.c	Free
	31	0.35	0	Apple	L.c	Free
Wp Free	32	0	0	Sour cherry	L.c	Free
	33	0	28	Sour cherry	L.a	Free
	34	0.35	14	Apple	L.a	Free
i1	35	0.2625	14	Apple	L.a+L.c	Capsulated
i2	36	0.35	0	Sour cherry	L.c	Capsulated
i3	37	0	0	Apple	L.a	Free
	38	0.35	28	Sour cherry	L.c	Free
	39	0	0	Apple	L.c	Capsulated
Wp L.c	40	0.35	0	Sour cherry	L.c	Capsulated
	41	0	0	Sour cherry	L.c	Free
	42	0.35	28	Apple	L.c	Capsulated
	43	0	0	Apple	L.a	Free
spApple	44	0	28	Apple	L.c	Free
	45	0	28	Sour cherry	L.c	Capsulated
	46	0	28	Apple	L.a	Capsulated
wpCaps	47	0.35	0	Apple	L.a	Capsulated
	48	0	14	Sour cherry	L.a	Capsulated
	49	0	14	Sour cherry	L.a	Capsulated
	50	0.35	14	Sour cherry	L.a+L.c	Free
sp sour	51	0.35	28	Sour cherry	L.a	Capsulated
	52	0	28	Apple	L.a	Capsulated
wpApple	53	0.35	14	Apple	L.a	Free
	54	0.175	0	Apple	L.a+L.c	Free
	55	0	14	Apple	L.a+L.c	Capsulated
	56	0.35	14	Sour cherry	L.a+L.c	Free
	57	0	0	Sour cherry	L.a+L.c	Capsulated

۳-نتایج و بحث

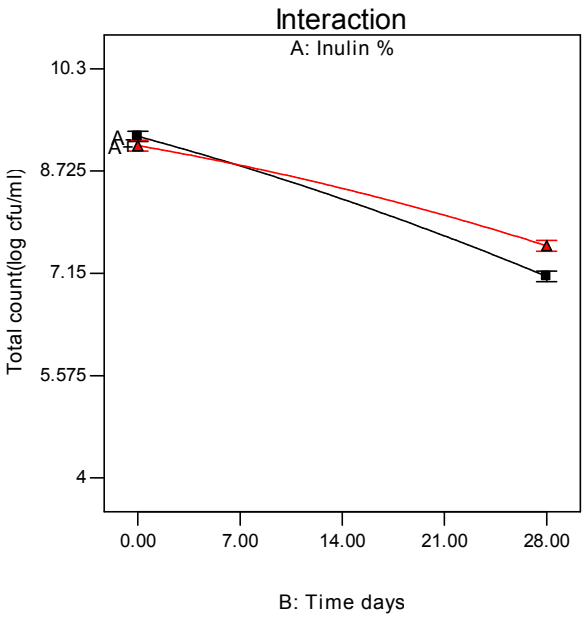
جدول۲ نتایج مربوط به تحلیل‌آماری تغییرات بار میکروبی آب میوه را نشان می‌دهد. نتایج حاکی از معنی‌دار بودن شاخص‌های مدل رگرسیونی مربوط به این پاسخ در سطح اطمینان ۵ درصد و معنی‌دار نبودن عدم برازش برای این شاخص را نشان می‌دهد. مقادیرضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح‌شده نشان می‌دهد مدل انتخابی برای این پژوهش به درستی لحاظ شده است.

جدول۲- نتایج آنالیز واریانس‌وضرایب مدل رگرسیون بار میکروبی

Source	Sum of Squares	df	Mean Sqares	F Value	p-value Prob > F
Model	134.5638	18	7.475764	294.1286	< 0.0001
A-Inulin %	0.13097	1	0.13097	5.152909	0.0297
B-Time days	35.60963	1	35.60963	1401.035	< 0.0001
C-Fruit type	6.696079	1	6.696079	263.4524	< 0.0001
D-Probiotic type	2.305071	2	1.152536	45.34568	< 0.0001
E-Capsulation	57.78156	1	57.78156	2273.374	< 0.0001
AB	0.706592	1	0.706592	27.80037	< 0.0001
AC	0.296509	1	0.296509	11.66592	0.0017
AD	3.272454	2	1.636227	64.37617	< 0.0001
AE	0.085072	1	0.085072	3.34708	0.0761
BC	4.607715	1	4.607715	181.2872	< 0.0001
BD	0.720667	2	0.360334	14.17707	< 0.0001
BE	8.116366	1	8.116366	319.3325	< 0.0001
CD	0.945889	2	0.472944	18.60765	< 0.0001
B^2	0.101075	1	0.101075	3.976738	0.0542
Residual	0.864166	34	0.025417		
Lack of Fit	0.654166	12	0.054514	5.710976	0.0002
Pure Error	0.21	22	0.009545		
Cor Total	135.4279	52			
R-Squared	0.993619				
Adj R-Squared	0.990241				

۳-۱-اثرات متقابل‌زمان نگهداری و درصد اینولین بر بار میکروبی آب‌میوه

شکل۱ تاثیر متقابل زمان نگهداری آب‌میوه و درصد اینولین را بر روی شمارش‌کلی نشان می‌دهد. با افزایش زمان نگهداری مقدارمیکروارگانیسم‌هاکمترمی‌شودکه‌نشان‌دهنده این است که درمحیط‌قندی‌زیادتری‌استفاده‌می‌شودوسوبسترای‌میکروارگانیسمها کم می‌شودکه‌برای‌میکروب‌های انکپسوله وآزاد روند یکسانی دارد. این‌نتیجه با تحقیقات هایسا[1] و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت داردکه‌افزودن‌اینولین‌با تحریک استارترها شروع می‌شود(۱۱).

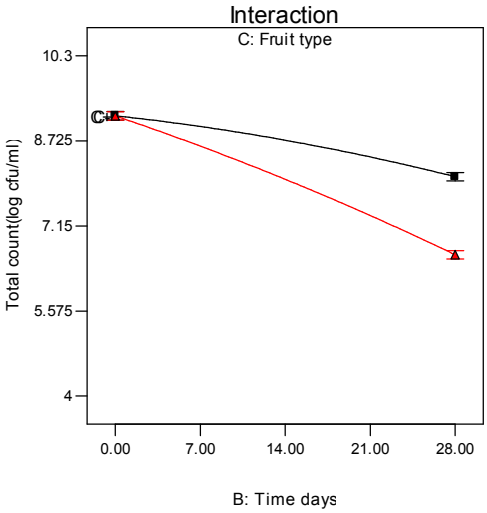


شکل ۱- اثرات‌متقابل زمان نگهداری و اینولین بر روی مقادیرشمارش‌کلی

1- Haissa

۳-۲-اثرات متقابل زمان نگهداری ونوع میوه بر بار میکروبی آبمیوه

شکل۲تاثیرمتقابل‌زمان‌نگهداری و نوع میوه را بر روی شمارش کلی نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن نوع میوه و افزایش زمان تخمیر، کاهش‌میکروارگانیسم‌ها راداریم که‌مربوط‌به pH محیط این‌میوه‌ها است که‌با کاهش pH محیط و کمبود مواد سوبسترا، تعداد سلول‌ها کم‌می‌شود. شیتا[1] و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که‌لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس‌به دلیل‌داشتن فعالیت پروتئولیتیکی رضایت‌بخش‌تری نسبت به‌دیگر باکتری‌های پروتئولیتیکی بعد از گذشت زمان کافی با تامین مواد نیتروژنی ازاد از طریق پروتئولیز پروتئین‌ها رشد مطلوب‌تری پیدا کرده و جمعیتش زیاد می‌شود(۳۴) یون[2] و همکاران (۲۰۰۶) توانایی ماندگاری سلول‌ها را به نژاد مورد استفاده، واکنش بین‌گونه‌های موجود، شرایط‌کشت، مقادیر اکسیژن، اسیدیته نهایی محصول و غلظت اسیدها را مرتبط دانستند(۳۸).



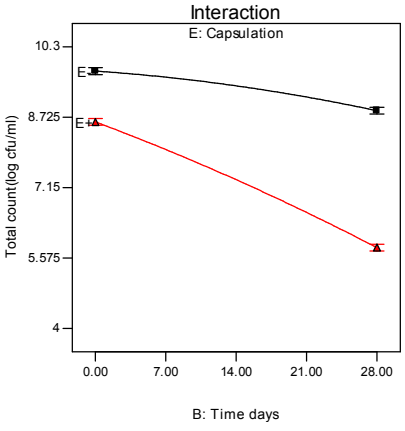
شکل۲- اثرات متقابل زمان نگهداری و نوع میوه برشمارش‌کلی

1- Shihata

2- Yoon

۳-۳- اثرات متقابل زمان نگهداری و انکپسولاسیون بر بار میکروبی آبمیوه

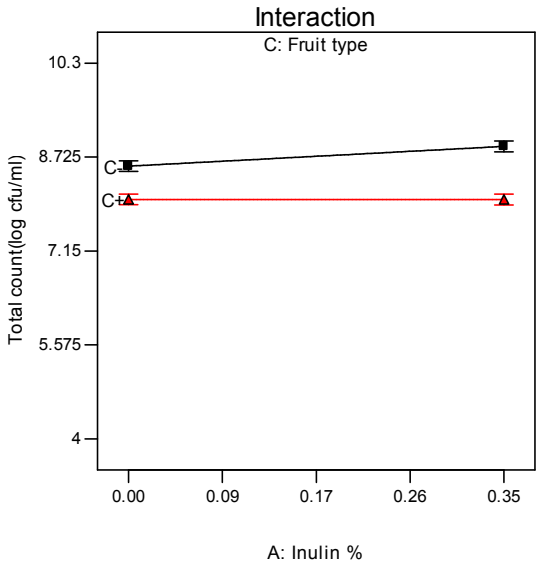
شکل۳ تاثیر متقابل زمان نگهداری و انکپسولاسیون را بر روی شمارش کلی نشان می‌دهد. با افزایش زمان نگهداری و با در نظرگرفتن انکپسولاسیون در مراحل اولیه رشد میکروارگانیسم‌های انکپسوله کمتر از میکروارگانیسم‌های غیر انکپسوله می باشد که علت آن تکثیر و رشد سریع میکروارگانیسم‌های آزاد در محیطی است که با آن سازگار هستند و اختلاف بین آن‌ها معنی دار است. منحنی نشان می‌دهد که محصول از سلامتی بخشی برخوردار است طوری که بایستی تعداد سلول در هر گرم یا میلی لیتر برابر $۱۰^{۶}$-$۱۰^{۷}$ سلول در محلول داشته باشیم. در آبمیوه‌ها سطح میکروب باید بالاتر از مقدار تضمینی باشد تا بیشترین سود را در بدن داشته باشد که سطح بحرانی آن را عموماً $۱۰^{۶}$ در نظر گرفته اند. پاتل و همکاران(۲۰۱۷) در گزارشی نشان دادند در دو دمای نگهداری ۲۵ و ۵ درجه سانتیگراد در تمام تیمارهای آزادوانکپسوله‌درطول ۶۰ روزنگهداری تعداد میکروارگانیسم ها به‌طورمعنی‌داری کاهش یافت(۲۵). حسینی و همکاران(۱۳۹۶) ثابت کردند زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در محیط‌های اسیدی پایین است(۱۲). همچنین حسین پور و همکاران ۲۰۱۹ در پژوهشی مشخص کردند که آب‌میوه‌ها ممکن است دارای مواد آنتی‌میکروبی طبیعی یا موادافزودنی همچون رنگ دهنده‌ها و طعم دهنده باشند که می‌تواند موجب کاهش زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها شوند (۱۳). از بین‌رفتن لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در طول نگهداری می‌تواند مربوط به پایین بودن pH آب‌سیب(pH=۳/۸۳)و ترکیبات آب میوه باشد. وقتی که سلول‌ها در محیطی با pH پایین قرار میگیرند، برای حفظ pH درون‌سلولی خود، نیاز به مصرف انرژی بالایی دارند. لذا سایر وظایف اصلی سلولی تحت تاثیر استرس کمبود ATP قرارگرفته و سلولها نمی‌توانند زنده بمانند(۱۲). اویواریس و همکاران(۲۰۱۹)و پاتل و همکاران(۲۰۱۷) انکپسولاسیون سلول‌های باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم با ترکیب صمغ‌ها رابررسی کردند و نشان دادند که انکپسولاسیون نقش حفاظت-کنندگی بیشتر و به تبع تأثیر مثبت بیشتری روی زنده‌مانی آن‌ها در مقایسه با کاربرد هر یک از صمغ ها به تنهایی دارد. نتایج حاصله دلالت بر مقاومت بالاتر سلول های باکتریایی انکپسوله شده‌درشرایط‌اسیدی آب‌آناناس‌در مقایسه با انواع نوع آزاددارد و کاهش جمعیت پروبیوتیک‌های انکپسوله‌شده کمتر از باکتری های پروبیوتیک آزادبود که به خصوص در تیمارهای ترکیبی، تحت تأثیراثرهم‌افزایی صمغ‌ها رخ‌داد. درواقع لایه پوششی ایجاد شده توسط ترکیب پلی‌ساکاریدهای کیتوزان+کتیراباداشتن ساختاری فیزیکی‌وچندکاتیونی علاوه بر استحکام ساختار انکپسولاسیون، نقش‌محافظتی برای آن‌ها ایفا کرده و زنده‌مانی و مقاومت باکتری‌های پروبیوتیکی رادربرابرشرایط‌اسیدی آب‌میوه/دستگاه گوارش افزایش می‌دهند(۱۲و۲۵).



شکل ۳- اثرات متقابل‌گذر زمان و انکپسولاسیون بر روی مقادیرشمارش کلی

۳-٤-اثرات متقابل درصد اینولین ونوع میوه بر بار میکروبی آبمیوه

شکل۴تاثیرمتقابل درصد اینولین و نوع میوه را بر روی شمارش کلی‌نشان‌می‌دهد. باو بدون در نظر گرفتن نوع میوه در شمارش کلی‌تغییرات چشمگیری ایجاد نمی‌شود ولی نوع میوه می‌تواند روی تعداد میکروارگانیسم‌ها تاثیر داشته باشد و معنی‌دار است که احتمالاً در محیط میوه‌ها به علت وجود اسیدهای مختلف تعدادمیکروارگانیسم‌ها کاهش می‌یابد.پینگ[1] وهمکاران(۲۰۰۷) نشان دادند که میکروارگانیسم‌ها مهم‌ترین منبع تولید اینولیناز هستندودرحضوریون‌های Na^{+}،K^{+}،Ca^{+2}،بهترفعالیت‌دارند ولی درحضور Mg^{+2}و Ag^{+}فعالیت کمی‌دارند(۲۶)تاداشی[2] وهمکاران (۲۰۰۳) در مطالعه ای نشان دادند که برخی از باکتری‌ها هستند که‌ساکارزرا به مواد قابل مفید مثل اینولین تبدیل می کنند(۳۷).

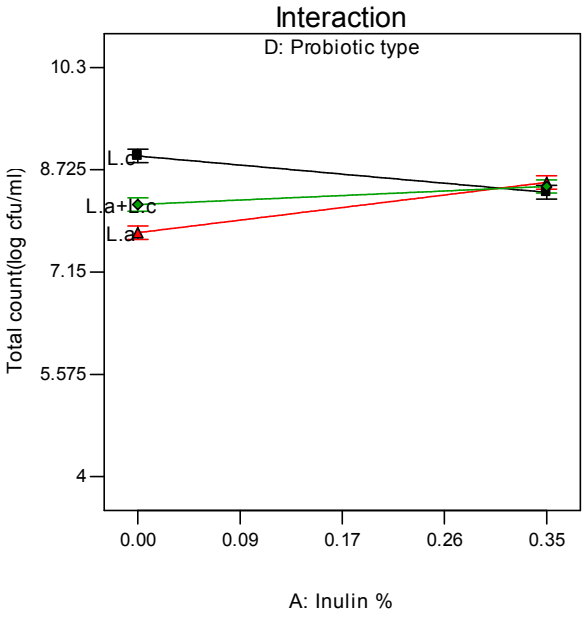


شکل ٤- اثرات متقابل اینولین و نوع میوه بر روی مقادیرشمارش کلی

1- Ping
2- Tadashi

۳-۵-اثرات متقابل درصد اینولین ونوع پروبیوتیک بر بار میکروبی آبمیوه

شکل۵ تاثیرمتقابل درصد اینولین و نوع پروبیوتیک را بر روی شمارش کلی نشان می دهد. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس چون با رشد خود باعث افزایش مقدار اسید در محیط می شود پس لذا از قند بیشتری استفاده می‌کند که این نتایج با نتایج سایر تحقیقات مطابقت دارد(۲۴)، ولی لاکتوباسیلوس کازئی تحمل pH اسیدی نسبت به اسیدوفیلوس کمتر است و کاهش مقدار میکروارگانیسم‌ها را داریم. مجموع این دو میکروارگانیسم نیز حالت‌حدواسط‌رابه دنبال دارد. این روند با مطالعه کراسکوپت[1] وهمکاران(۲۰۰۷)مطابقت‌دارد بدین صورت که لاکتوباسیلوس کازئی‌بقای‌ان بهتراز لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس است که علت آن‌ویژگی‌های‌سازگاری‌آن‌است‌که‌درمقابل‌ترکیبات‌مهارکننده درآب‌میوه‌ها است (۱۵ و ۱۶). مارشال[2] و همکاران(۱۹۹۷) در مطالعه‌ای نشان دادند که با افزایش غلظت پری بیوتیک، رشد و فعالیت پروبیوتیک آزاد افزایش یافته و طبیعتاً منجر به افزایش اسیدیته می گردد(۲۲).

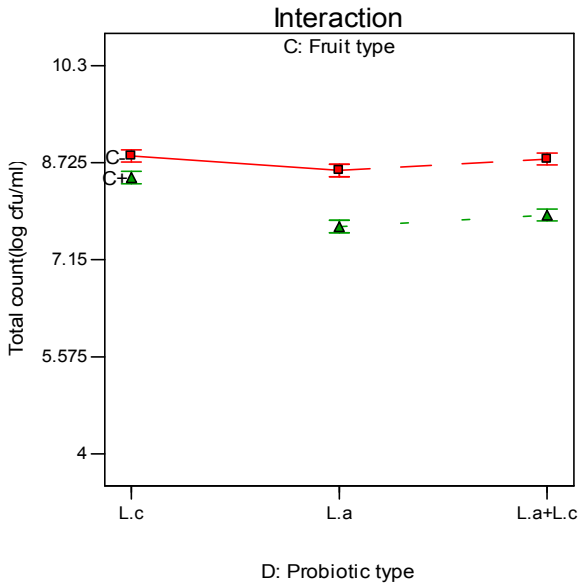


شکل۵- اثرات متقابل‌درصد اینولین و نوع پروبیوتیک بر روی مقادیر شمارش‌کلی

1- Krasakoopt
2- Marshal

۳-٦-۱اثرات متقابل نوع پروبیوتیک ونوع میوه بر بار میکروبی آب میوه

شکل۶ تاثیر متقابل نوع پروبیوتیک و نوع میوه را بر روی شمارش کلی نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن نوع میوه، شمارش کلی در لاکتوباسیلوس کازئی بیش از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌باشد چون در مراحل اولیه، رشد لاکتوباسیلوس کازئی که pH رشد متعادل‌تری نسبت به‌اسیدوفیلوس دارد و در طول زمان باکاهش pH جمعیت آن‌ها کمتر می‌شود. موراروو همکاران (۲۰۰۷) نشان‌دادند که برای داشتن ۱۰[۷] میکروارگانیسم در محیط بایستی ۲۸روززمان‌درنظربگیریم(۶).در پژوهشی گادوارد[۱] و همکاران (۲۰۰۳) وکیلا ساپتی[۲] و همکاران (۲۰۰۶) اعلام نمودند که میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها زنده‌مانی آن‌ها را در ماست افزایش‌داده و آن را یک حامل مناسب برای پروبیوتیک‌ها قرار می‌دهد. شواهدوتحقیقات بسیاری وجود داردکه نشان‌می دهند که میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها برای محافظت ازآن‌ها یک روش مناسب است که امکان استفاده از آن‌ها را در غذاهای اسیدی نظیر ماست فراهم می‌سازد(۱۰و۱۴).



شکل ٦- تاثیر متقابل نوع پروبیوتیک و نوع میوه بر روی مقادیر شمارش کلی

1 . Godward
2 . Kailasapathy

لاریش[1] و همکاران(۱۹۹۴) گزارش دادند که یکی از عوامل موثر در فعالیتهای متابولیکی باکتریهای انکپسوله، اندازه لایه آلژینات است که با افزایش اندازه لایه آلژینات آزاد سازی متابولیتهای حاصل از باکتریهای داخل کپسول و جذب مواد مغذی کمترصورت می‌گیرد(۲۰). سولتانا[2] و همکاران(۲۰۰۰) با شمارش میکروبی پروبیوتیکها نشان دادند که پروبیوتیکهای داخل کپسول‌هازنده‌هستندو فرآیند انکپسولاسیون باعث کاهش آن‌ها نمی شود(۳۵). نبسنی[3] و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که لاکتوباسیلوس کازئی در دماهای کمتر بیشتر فعالیت دارند تنش‌های‌مکانیکی‌درزمان مخلوط کردن سوسپانسیون میکروبی می‌تواند به کاهش تعداد سلولهای باکتریایی منجر شود(۲۳). پینگ[4] و همکاران (۲۰۰۷) گزارش‌دادندکه استفاده از گلوکز، فروکتو الیگوساکاریدها و اینولین در محیط کشت RCM (Reinforcel clostridium) سرعت رشد لاکتوباسیلوس کازئی‌را تقویت‌می‌کند.. همچنین نشان دادند استفاده از اینولین نه تنها باعث افزایش میزان رشد بیفیدوباکتریوم‌ها می شود بلکه زمانیکه اینولین با شیر حل می شود حالتی مثل چربی پیدا می کند و می‌تواند به عنوان نگهدارنده در فرمولاسیون بستنی مورد استفاده قرار گیرد. در تحقیقی دیگر نشان دادند زمانی که pH و فراورده‌های پروبیوتیکی به حدود ۴/۱ تا ۴/۴ برسد در این حالت‌میزان‌رشدسویه‌لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس‌و بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم به علت تولید متابولیت اسیدی‌وکاهش‌شدیدpHبه‌طور معنی‌داری کاهش‌می یابد(۲۶). سزار[5] و همکاران (۱۹۹۹) در مطالعه ای نشان دادند که پوشش دادن میکروب‌ها با آلژینات و دانه‌های کیتوزان می‌تواند میکروارگانیسمها را در برابر اسید و فلانوئیدها در آب میوه ها محافظت نماید. کوانگ[6] و همکاران (۱۹۹۹) در مطالعه‌ای نشان دادند که کیتوزان پوشش داده شده با آلژینات به صورت خنثی‌می‌باشدکه‌در مقابل آنزیمهای داخلی(کیتوزاناز، تریپسین، کیموتریپسین و لیزوزیم) مقاوم هستند(۲۹). با گذشت زمان به دلیل تولید متابولیتهای مهار کننده از جمله انواع اسیدهای آلی، کاهش شدید pH رخ می‌دهد که این روند باعث کاهش میزان رشد صعودی سویه پروبیوتیک می شود. در مطالعه‌ای طباطبایی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که اینولین موجب تحریک رشد و فعالیت باکتری‌های آغازگر ماست و همچنین باکتری پروبیوتیک می گردد(۳۶).

٤-نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق با توجه به جنبه صنعتی و اقتصادی نشان داد که می‌توان معرفی آب‌میوه سین بیوتیک به عنوان یک محصول جدید با فرهنگ سازی جامعه برای زمان مصرف آن مثل گروه لبنیات برنامه ریزی کرد و حداکثر زمان انقضا با توجه به آنالیز فیزیکوشیمیایی و حسی را یک ماه در نظر گرفت. همچنین نمونه هایی را که حاوی میکروارگانیسم های انکپسوله می‌باشند زمان نگهداری و خواص ارگانولپتیکی بهتری نسبت به بقیه را دارا می باشد. همچنین در میوه‌های اسیدی این زمان کمتر می‌شود که از روز بیست و یکم به بعد آنالیز فیزیکوشیمیایی آبمیوه تغییرات محسوسی می یابد.

٥- منابع

1. Aspri, M., Papademas, P. and Tsaltas, D., 2020. Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products. *Fermentation*, pp.6-30.

2. Ayaseh, A., Taban, H. and Yari Khosroshahi, A., 2017. Production of probiotic carrot juice with using of Lactococcus lactis. *Journal of Food Industry Research*,27(4),pp.183-191[In Persian].

3. Babaei, M., Hashemiravan, M. and Pourahmad, R. 2018. Production of probiotic beverage based on tomato juice and mixture of sweet pepper, celery and coriander juices. *Journal of Food Science and Technology*,47(5), pp.331-341[In Persian].

4. Betoret, E., Betoret., N., Vidal, D. and Fito, P., 2011 .Functional foods development: Trends

1- Larish
2- Sultana
3- Nebseny
4- Ping
5-Sezar
6- Quong

and Technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 22, pp.498-508.
5. Bornet, F. R. J., Brouns. F, Tashiro. F. and Duvillier.V., 2002. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestive and Liver Disease,* 34(2), pp.111-120..
6. Dana. M, Moraru .M, Bleoanca. I . and Segal, R., 2007. Probiotic vegetable juices. *Food Technology*, pp. 87 – 91.
7. Dogahe, K. H., Darani K. K., Tofighi, A., Dadgar, M. and Mortazavian, A. M., 2015. Effectof process variables on survival of bacteria in probiotics enriched pomegranate juice. *British Biotechnology Journal*, 5(1), pp.37-50.
8. Dowlatabadi, M., Mokhtarian, M., Mortazavi, S.A. and Elhami Rad, A.H., 2016. Investigation of multilayer encapsulation by method of external gelation on the survival of probiotic bacteria undergoing orange juice pasteurization. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 11(3), pp. 93- 102[In Persian].
9. Ghazavi, N., Moshtaghi, H., Bonyadian, M. and Abedi, R., 2018. Using Lactobacillus acidophilus in production of probiotic pomegranate juice. *Journal of Food Science and Technology*, 77(15), pp.99-107 [In Persian].
10. Godward .G. and Kailasapathy. K., 2003. Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in yoghurt.*Milk Science International*, 58, pp.396-399.
11. Haissa. R.C., Flavia .C.A ., Buriti. Inor. A. and Susana. M. I. S., 2008. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic. *Food Science and Technology*,41, pp. 1037-1046.
12. Hosseini, M., Rezazad Bari, M. And Alizadeh Khaledabad, M., 2017. Production of synbiotic juice: study on the effect pH, Brix, Formalin index and Rheological. *Journal of Food Science and Technology*, 63(14), pp.73-81[In Persian].
13. Hosseinpour, A., Shahsavari, S. and Mahmoudi, R., 2019. Chemical, sensory and survival properties of Lactobacillus Plantarum in peach juice. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences*,23(4), pp.342-351[In Persian].
14. Kailasapathy. K., 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*,39, pp.1221-1227.
15. Khalkhali, S., Fazeli, M. R., Nourozi, J. and Salehi, M., 2009. Investigation of probiotic enrichment of beer drink using four species of Lactobacillus. *Microbiological knowledge*, pp. 59-63.
16. King .V.A, Huang Hui. and Tsen. Jen., 2006. Fermentation of tomato juice by cell immobilized lactobacillus acidphilus. *Original Article*, pp. 1-6.
17. Krasaekoopt. W. And Chea. P., 2007. Probiotication of fruit juices. *Faculty of Biotechnology*, 57.
18. Krasaekoopt. W, Pianjareonlap. R. and kittisuriyanont.K., 2008. Probiotic Fruit Juices. *Biotechnology*.
19. Kyung .Y.Y, Woodams.E.E. and Hang.Y.D., 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97, pp. 1427-1430.
20. Larisch. B.C, Poncelet. D, Champagne. C.P. and Neufeld. R.J., 1994. Microencapsulation of Lactococcus lactis subspp cremoris. *J. Microencapsulation.* 2, pp. 189-195.
21. livares, A., Soto, C., Caballero, E. and Altamirano, C., 2019. Survival of microencapsulated Lactobacillus casei (prepared by vibration technology) in fruit juice during cold storage. *Electronic Journal of Biotechnology*, 42, pp.42–48.
22. Marshal .VM .and Tamime, AY., 1997. Starter culture employed in the manufacture of biofermented milks. *International Dairy*, 50, pp.9-35.
23. Nebesny .E, Zyzelewicz. D, Motyl. I. and Libudzisz .Z., 2006. Dark chocolates supplemented with lactobacillus strains. *Eur Food Res Technol*, 225, pp.33-42.
24. Nguyen, B.T., Bujna, E., Fekete, N., Tran, A.T.M., Rezessy-Szabo, J.M., Prasad, R. and Nguyen, Q. D., 2019. Probiotic beverage from pineapple juice fermented with Lactobacillus and Bifidobacterium strains. *Frontiers in Nutrition*, 9, pp. 6-54.
25.Patel, A. R., 2017. Probiotic fruit and vegetable juices- recent advances and future perspective. *International Food Research Journal*, 24(5), pp.1850-1857.
26. Pereira. A , Maciel. T. and Rodrigues .S., 2011. Probiotic beverage from cashew apple

from chitosan treated alginate beads. *Journal Microencap*,16(6), pp.687-696.
34. Shihata. A. and shah. N. P., 2000. Proteolytic profiles of yoghurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*,10, pp. 401-408.
35. Sultana, K., Godward .G., Reynolds . A. R., Peiris, P. and Kailasapathy, .K., 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, pp.47-62.
36. Tabatabaei, F. and Mortazavian. A., 2008 Influence of lactulose on the survival of probiotic strains in yoghurt. *World Applied Science Journal*, 3(1), pp.88-90.
37. Tadashi, Wada., Masao, Ohguchi. And Yoshio. I., 2003. A novel enzyme of bacillus That produces inulin from sucrose. *Biochem*, 97(6), pp.1327-1334.
38. Yoon, K.Y., 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97, pp. 1427-1430.
39.Zandi, M., Hashemiravan, M. and Berenjy, S.H., 2016. Production of probiotic fermented mixture of carrot, beet and apple juices. *Journal of Paramedical Sciences*, 7(3), pp.17-23[In Persian].
juice fermented with lactobacillus casei. *Food Technology Department*, pp. 44-60.
27. Ping .S, Andres. H., Hazel. M., 2007. Selective prebiotics support the growth of probiotic mono-culture in vitro. *Food Microbiology*,13, pp.134-139.
28. Pouragahi, S. and Fazeli, MR., 2009. Evaluation of probiotic enrichment of dairy-based fruit drinks under fermentation and non-fermentation conditions using the probiotic microorganism Lactobacillus fermentum. *Microbiological knowledge*, pp. 40-55.
29. Quong .D, Yeo J.N . and Neufeld. R.J., 1999. Stability of chitosan and poly-L-Lysin embranes coating DNA-alginate beads when exposed to hydrolytic enzymes. *Journal Microencapsulation*, 16(1), pp.73-82.
30. Rezaei, R., 2011. The effect of inulin and some gums on physicochemical, sensory and viability properties of probiotics in frozen yogurt. Food Science *Thesis, Gorgan University*.
31. Roberfroid. M. B., 2005. Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr*,93(1), pp. 13-25.
32. Sabbaghpour Langaroudi, S., Nouri, L. and Azizi, M. H., 2021. Production of probiotic pineapple juice with encapsulation of Lactobacillus plantarum by chitosan and tragacanth gums. *JFST*, 118(18), pp. 1-12.
33. Sezar, A. D. And Akbuga, J., 1999. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug

(Original Research Paper)

Study of Changes in Encapsulated and Free Microbial Load of Industrial Synbiotic Juices by Method RSM-D-Optimal with Split Plot

Mohammadyar Hosseini[1*], Mohammad Alizadeh[2], Mahmoud Rezazad Bari[3]

1-Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Ilam University, Ilam, Iran.
2- professor, Department of Food Science and Technology, Urmia University, Urmia, Iran.

Received:25/03/2022 Accepted:16/05/2022

Abstract

In recent years, consumers in addition to considering the nutritional characteristics that are normally a desired food, also pay special attention to the health characteristics of the product. In this study, the effect of 5 variables including inulin, storage time, type of fruit (apple, cherry), type of microbe (Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei) and type of coating (encapsulated and free) on the quality control of total count were discussed. Analysis of variance of data at 5% level showed that in all graphs, independent variables had significant effects (p) on the dependent variable in this study. The results showed that by considering inulin, the amount of microorganisms increases and in the presence or absence of fruit type, there are no significant changes in the overall count, but fruit type can affect the number of microorganisms. The number of Lactobacillus acidophilus was observed in the environment more than Lactobacillus casei. By considering the type of fruit and increasing the fermentation time, we have a decrease in microorganisms, which is related to the pH of the environment of these fruits. With increasing storage time and considering encapsulation in the early stages, it is less than non-encapsulated microorganisms and the difference between them is significant. Considering the type of fruit, the total count in Lactobacillus casei is more than Lactobacillus acidophilus because in the early stages, the growth of Lactobacillus casei, which has a more balanced pH growth than acidophilus, decreases over time as the pH decreases.

Keywords: Juices, Probiotics, Prebiotics, Physicochemical, Total Count

[*]Corresponding Author: m.hosseini@ilam.ac.ir