مقاله تحقیقی

اثر بازدارندگی عصاره چای ترش بر رشد ساکارومایسس سرویزیه و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در آب آلبالو

مهدی علی پور، مهناز هاشمی روان *، سیمین اسداللهی

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

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: m_hashemiravan@yahoo.com ، تلفن ۰۹۱۲۱۸۷۲۰۵۲

محل انجام تحقیق: دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، پارک علم و فن آوری، آزمایشگاه میزان سنجش پاسارگاد

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۳

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۲- شماره ۲- تابستان ۱۳۹۶

چکیده

آب میوه‌ها مواد غذایی حساس به فساد میکروبی می‌باشند و ساکارومایسس سرویزیه و لاکتوباسیلوس پلانتاروم از مهمترین باکتری‌های فساد آب‌میوه می‌باشند. در این تحقیق اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره چای ترش بر روی ساکارومایسس سرویزیه و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در آب آلبالو در طی سی روز نگهداری بررسی گردید. پس از استخراج عصاره چای ترش با اتانول ۷۰ درصد، آزمون‌های حداقل میزان کشندگی (MBC) و مهارکنندگی (MIC) بر روی عصاره استخراج شده انجام شد. تیمارهای آب آلبالو (حاوی ۲۰٪ کنسانتره آب آلبالو) با افزودن مقادیر ۲/۵، ۵، ۱۰ درصد عصاره چای ترش و تلقیح لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ساکارومایسس سرویزیه به میزان 10^7 CFU/ml تهیه گردید. اسیدیته، مواد جامد محلول، شمارش جمعیت ساکارومایسس سرویزیه، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ارزیابی حسی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری مینی تب ورژن ۹/۴ و در قالب آزمون معنی‌داری دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد برای ۸ تیمار در سه تکرار انجام شد. مقادیر MIC و MBC مقاومت بالاتر ساکارومایسس سرویزیه در مقایسه با لاکتوباسیلوس پلانتاروم در برابر عصاره چای ترش را نشان داد. اسیدیته افزایش یافت ($p<0/05$). میزان مواد جامد محلول و میزان جمعیت میکروبی آب آلبالو به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$). تیمار با ۱۰ درصد عصاره چای ترش، بالاترین میزان کاهش جمعیت میکروبی را نشان داد. همچنین نتایج آنالیز حسی نشان داد افزایش درصد استفاده از عصاره چای ترش به طور معنی‌داری میزان امتیازات عطر و بو، طعم و مزه و میزان امتیازات پذیرش کلی را کاهش داد ($p<0/05$).

واژه های کلیدی: آب آلبالو، عصاره چای ترش، ساکارومایسس سرویزیه، لاکتوباسیلوس پلانتاروم

مقدمه

باکتری‌ها و مخمرها از عوامل ایجاد کننده فساد در آب‌میوه‌ها می‌باشند. در این میان، باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مخمر ساکارومایسس سرویزیه از عوامل شایع در فساد آب‌میوه‌ها شناخته شده‌اند (۳). پژوهشگران تاکنون روش‌های مختلفی از جمله استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی را جهت ممانعت از فعالیت این میکروارگانیسم‌ها در آب‌میوه‌ها به‌کار گرفته‌اند (۴). در قرون گذشته، فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد قهوه‌ای شدن گیاهان و ادویه‌جات مطالعه شده، نتایج نشان داده است عصاره‌ها و روغن‌های آن‌ها قادرند فساد میکروبی را به تاخیر

انداخته و قهوه‌ای شدن آنزیمی را مهار کند (۵). امروزه نیز فواید زیاد استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی و مهارکننده‌ی واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی، به اثبات رسیده است (۶). با توجه به اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی مواد غذایی، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی رشد روز افزونی پیدا کرده‌است. خواص ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌ها شناخته شده است و رویکرد عموم مردم و همچنین سازمان‌های ملی و بین‌المللی مسئول در زمینه بهداشت مواد غذایی، استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مختلف به جای مواد شیمیایی است و این مساله منجر به تمایل بیشتر برای شناخت تأثیرات این ترکیبات شده است (۷). از جمله نگهدارنده‌های طبیعی، عصاره چای ترش به‌عنوان منبعی ازعصاره‌های ضد میکروبی می‌باشد ترکیبات پلی فنولی موجود در چای ترش شامل ترکیبات فوتوشیمیایی مانند فلاونوئیدها (آنتوسیانین‌ها) و تانین-ها (الاگیتانین‌ها و گالوتانین‌ها) می‌باشند (۸).

در سال ۲۰۱۲، سانتوز و همکاران تاثیرات استرس اکسیداتیو و همچنین اثرات ضدسرطانی و ضدباکتریایی عصاره چای ترش را مطالعه کرده‌اند (۸).

در سال ۱۳۹۴، طباطبایی‌نژاد و همکاران اثر انواع عصاره‌های چای ترش و آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی بر سویه‌های بالینی و استاندارد عامل عفونت در شرایط محیط کشت را بررسی کردند. نتایج حاصل نشان داد که عصاره‌های الکلی چای ترش بر رشد تمامی باکتری‌های مورد آزمون دارای اثر ضد میکروبی بودند و اثر ضد میکروبی آن بر باکتری گرم مثبت استافیلو کوکوس اورئوس حداکثر بود (۹).

در سال ۱۳۹۵، علیپور و همکاران اثرات ضدباکتریایی عصاره الکلی چای ترش را در مهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به تنهایی و توأم با نیسین در گوشت چرخ شده میگو وانامی را بررسی کردند. نتایج نشان داد، عصاره چای ترش و باکتریوسین نیسین به تنهایی دارای خاصیت مهارکنندگی بوده و می‌توان آن را به عنوان یک نگهدارنده طبیعی مواد غذایی به جای انواع شیمیایی و صنعتی آن معرفی کرد (۱۰).

در این تحقیق از عصاره طبیعی چای ترش به عنوان نگهدارنده طبیعی با هدف جایگزینی نگهدارنده‌های سنتزی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در این مطالعه، باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (PTCC۱۰۵۸) و مخمر ساکارومایسس سرویزیه (PTCC ۵۲۶۹) از سویه‌های خالص این میکروارگانیسم‌ها از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شده است.

تهیه عصاره چای ترش توسط اتانول ۷۰٪

برای تهیه عصاره به روش پرکولاسیون ۱۰۰ گرم چای ترش در ارلن مایر ریخته شد و ۲ لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، عصاره از کاغذ صافی عبور داده شد و تفاله باقی‌مانده فشرده گردید تا عصاره کاملا خارج شود. در ادامه رقیق کردن کنسانتره آلبالو با غلظت ٪۲۰ به منظور تهیه آب آلبالو صورت گرفت و در مرحله انتهایی افزودن عصاره چای ترش در سه غلظت ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد انجام گرفت (۱۱).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های فنولی با استفاده از روش رقت سازی در چاهک تعیین گردید. برای این منظور، از میکروپلیت استریل ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. محلول استوک عصاره‌ها در آب مقطر استریل تهیه گردیده و غلظت‌های مختلف عصاره (۴۰ تا ۰/۱۵۶ میلی گرم در میلی لیتر) با رقیق سازی محلول استوک با محیط کشت مولر هینتون براث و اکستراکت گلوکز کلرامفنیکول (YGC) براث تهیه شد. باکتری و مخمر مورد استفاده به مدت یک شبانه روز قبل از انجام آزمایش، به ترتیب روی محیط کشت های نوترینت آگار و (YGC) آگار در دو دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتیگراد کشت داده شد. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی cfu/ml ۱۰۸ × ۱/۵ از مک فارلند شماره ۰/۵ استفاده می‌شود. پس از پر کردن چاهک‌ها، میکروپلیت‌ها به مدت یک شبانه روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و پس از آن میزان کدورت توسط دستگاه الایزا ریدر (بیوتک اینسترمنت) در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت

شد. آزمایشات در ۳ تکرار و ۳ زمان مختلف انجام شد (۱).

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین MBC، از روش کشت خطی استفاده شد، به تمام لوله‌هایی که در آن‌ها هیچ گونه رشدی مشاهده نگردید، روی محیط کشت مولر هینتون آگار و (YGC) آگار کشت سطحی داده شد. پلیت باکتری‌ها را در دمای ۳۲ تا ۳۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید، پس از گذشت زمان گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی شدند (۱).

تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مخمر ساکارومایسس سرویزیه به آب آلبالو

از ذخیره‌ی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مخمر ساکارومایسس سرویزیه به صورت مجزا سوسپانسیون میکروبی با غلظت 10^7 cfu/ml در شرایط استریل تهیه شد. ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از هر میکروارگانیسم به صورت مجزا به ۱۹ میلی‌لیتر آب آلبالو حاوی عصاره چای ترش و همچنین نمونه شاهد تلقیح گردید. تمامی نمونه‌های آب آلبالو به مدت ۳۰ روز در دمای یخچال نگهداری شدند و نمونه برداری از آن‌ها در روزهای اول، دهم، بیستم و سی‌ام انجام شد (۱).

آزمون‌ها

آزمون اسیدیته

مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۲۶۸۵ انجام گردید. مقدار ۵ سی سی از نمونه صاف شده آب‌میوه با پیپت در یک ارلن ریخته شد و با سود ۰/۱ نرمال در مقابل بلو دو متیلن یا فنل فتالئین تا ایجاد رنگ صورتی پایدار در فنل فتالئین و رنگ آبی پایدار در بلو دو متیلن تیتر شد و به pH =۸/۱ رسانیده شد. نتیجه را بر حسب اسید عمده درصد گرم نمونه بیان شد (۱۲).

آزمون مواد جامد محلول

مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۲۶۸۵ با روش رفراکتومتری انجام گردید. ابتدا دستگاه با آب مقطر روی عدد صفر تنظیم شد. سپس چند قطره آب آلبالو با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد روی منشور رفراکتومتر که بر حسب ساکارز درجه بندی شده است قرار گرفت و پس از حذف پراکندگی نوری و ایجاد دو بخش مساوی روشن و تاریک در صفحه نمایانگر، غلظت مواد جامد محلول در آب بر حسب بریکس در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد خوانده شد و نتیجه بر حسب گرم درصد گرم نمونه بیان شد (۱۲).

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده در تحقیق.

ویژگی	مشخصه
آب آلبالوحاوی 10^7cfu/ml لاکتوباسیلوس پلانتاروم + ۲/۵ ٪ عصاره چای ترش	T1
آب آلبالوحاوی 10^7cfu/ml لاکتوباسیلوس پلانتاروم + ۵ ٪ عصاره چای ترش	T2
آب آلبالوحاوی 10^7cfu/ml لاکتوباسیلوس پلانتاروم + ۱۰ ٪ عصاره چای ترش	T3
آب آلبالوحاوی 10^7cfu/ml ساکارومایسس سرویزیه + ۲/۵ ٪ عصاره چای ترش	T4
آب آلبالوحاوی 10^7cfu/ml ساکارومایسس سرویزیه + ۵ ٪ عصاره چای ترش	T5
آب آلبالوحاوی 10^7cfu/ml ساکارومایسس سرویزیه + ۱۰ ٪ عصاره چای ترش	T6
آب آلبالو ۲۰٪+ 10^7 cfu/ml ساکارومایسس سرویزیه	T01
آب آلبالو ۲۰٪+ 10^7 cfu/ml لاکتوباسیلوس پلانتاروم	T02

کشت نمونه های تیمار جهت بررسی بقای لاکتوباسیلوس پلانتاروم

مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۳۴۱۴ انجام گردید. در این مرحله، مقدار ۲ میلی‌لیتر نمونه آب آلبالو(تیمارهای مورد استفاده در تحقیق) به دو پلیت سترون منتقل شد (به هر کدام ۱ میلی‌لیتر). سپس حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت لاکتوباسیلوس آگارکه دمای آن حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد بود، به هر پلیت اضافه گردید. محیط و نمونه به خوبی مخلوط شد و پلیت‌ها تا جامد شدن محیط بر روی سطح صاف و خنک قرار داده شدند. پس از جامد شدن محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۳ روز و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. کشت نمونه ها به صورت تکرار سه پلیتی انجام شد (۱۳).

کشت نمونه های تیمار جهت بررسی بقای ساکارومایسس سرویزیه

مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۰۸۹۹ انجام گردید. پس از تهیه پلیت‌های حاوی محیط کشت استریل Yeast mold broth،۱میلی‌لیتر نمونه آب آلبالو (تیمارهای مورد استفاده در تحقیق) به پلیت اضافه و سپس توسط یک میله شیشه‌ای در شرایط مح کشت پخش شد. نمونه‌ها به مدت ۵ روز و در دمای درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از پا زمان تعیین شده پلیت‌ها بررسی شد و میکروارگانی ها شمارش گردید (۱۴).

آزمون حسی

آزمون ارزیابی حسی توسط ۱۰نفر ارزیاب حس متخصص و بر اساس آزمون هدونیک پنج نقطه‌ای انج گرفت. امتیاز ۵ به نمونه عالی، امتیاز ۴ به نمونه خو امتیاز ۳ به نمونه متوسط، امتیاز ۲ به نمونه بد و امت ۱ به نمونه بسیار بد می‌باشد. جهت ارزیابی غلظت‌های مختلف عصاره بر ویژگی‌های ارگانولپتی آب آلبالو (شامل عطر، طعم) آبمیوه‌های حاوی عص چای ترش در غلظت‌های مذکور همراه با یک نم شاهد (نمونه فاقد عصاره) در شرایط یکسان توس ارزیاب‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است تیمارهای مورد استفاده برای ارزیابی حسی ف لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مخمر ساکارومایس سرویزیه بودند (۲).

جدول ۲- کدبندی تیمارهای مورد استفاده در ارزیابی حسی.

کد بندی تیمارهای مورد استفاده در ارزیابی حسی	مشخصات تیمارهای مورد ارزیابی
A1	آب آلبالو دارای ۲/۵ درصد عصاره چای ترش
A2	آب آلبالو دارای ۵ درصد عصاره چای ترش
A3	آب آلبالو دارای ۱۰ درصد عصاره چای ترش
A4	آب آلبالو شاهد

نتایج حداقل غلظت کشندگی و غلظت مهارکنندگی چای ترش

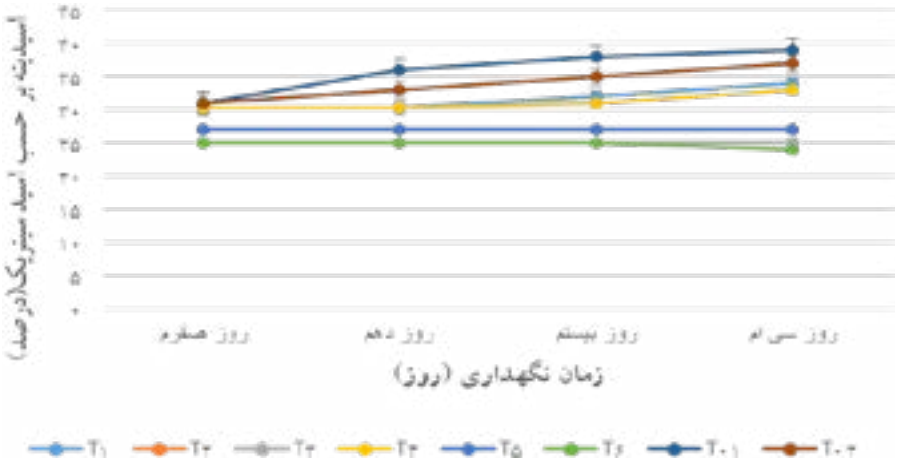
جدول ۳ نشان می‌دهد، کمترین میزان غلظت کشندگی و غلظت مهارکنندگی عصاره چای ترش متعلق به لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بالاترین میزان نیز متعلق به ساکارومایسس سرویزیه بود. از این ن اختلافات معنی‌داری بین آن‌ها وجود داشت.

جدول ۳- نتایج حداقل غلظت کشندگی و غلظت مهارکنندگی.

نوع باکتری	حداقل غلظت کشندگی	حداقل غلظت مهارکنندگی
ساکارومایسس سرویزیه	۲۵۰ پی پی ام	۵۰۰ پی پی ام
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۱۸۰ پی پی ام	۴۵۰ پی پی ام

نتایج اسیدیته

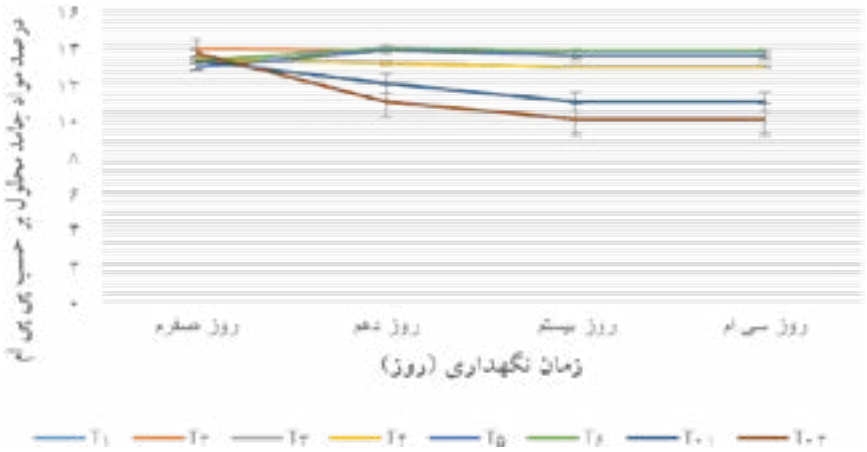
با توجه به نمودار ۱ زمان نگهداری اثر معنی‌داری بر روی میزان اسیدیته نشان داده است($p<۰/۰۵$). با افزایش مدت زمان نگهداری میزان اسیدیته به طور کلی افزایش یافته است ($p< ۰/۰۵$). همچنین با توجه به نمودار ۱ اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری بر روی شاخص اسیدیته اثر معنی‌داری داشته است ($p<۰/۰۵$). بالاترین میزان تغییرات اسیدیته در انتهای روز سی ام نگهداری متعلق به تیمار شاهد دارای لاکتوباسیلوس پلانتاروم (T02) و تیمار شاهد دارای مخمر ساکارومایسس سرویزیه (T01) بود. همچنین، تیمارهای با مقادیر ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ درصد عصاره چای ترش حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم (T1,T2,T3) و حاوی ساکارومایسس سرویزیه (T4,T5,T6) تا روز دهم نگهداری اختلافات معنی‌داری نشان نداده‌اند ($p<$ ۰/۰۵). بعد از روز دهم نگهداری، تیمارهای حاوی مقادیر بالاتر عصاره چای ترش دارای تغییرات اسیدیته کمتری نسبت به تیمار حاوی ۲/۵ درصد عصاره چای ترش (T1 و T4) بودند.



نمودار ۱- مقایسه میانگین اسیدیته بر اساس اثرات متقابل تیمار. * زمان نگهداری، T1= لاکتوباسیلوس پلانتاروم+ ۲/۵ درصد عصاره چای ترش، T2 =لاکتوباسیلوس پلانتاروم+ ۵ درصد عصاره چای ترَش، T3 = لاکتوباسیلوس پلانتاروم+ ۱۰ درصد عصاره چای ترش، T4 = ساکارومایسس سرویزیه+ ۲/۵ درصد عصاره چای ترش، T5 =ساکارومایسس سرویزیه+ ۵ درصد عصاره چای ترَش، T6 = ساکارومایسس سرویزیه+ ۱۰درصد عصاره چای ترش، T01= ساکارومایسس سرویزیه و فاقد عصاره چای ترش، T02= لاکتوباسیلوس پلانتاروم و فاقد عصاره چای ترش.

نتایج ارزیابی درصد مواد جامد محلول

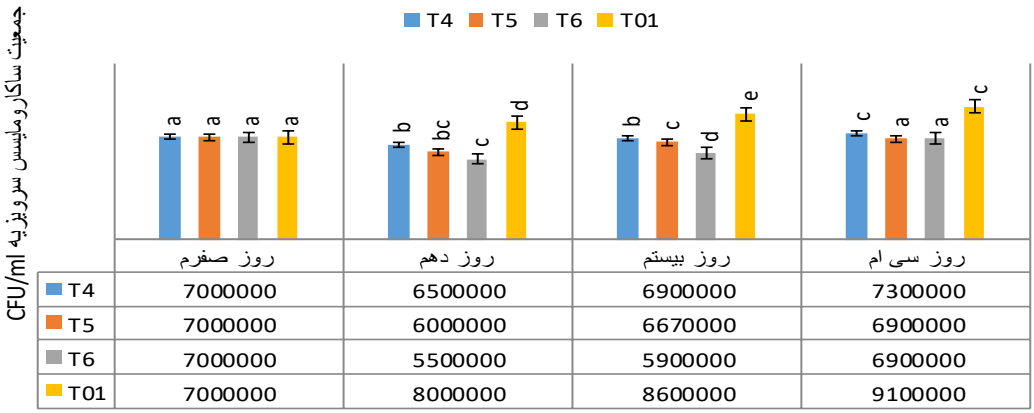
نتایج نمودار ۲ اختلافات معنی‌داری در میزان درصد مواد جامد محلول نشان داده است. با افزایش مدت زمان نگهداری، میزان درصد مواد جامد محلول به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p< ۰/۰۵$). با افزایش درصد عصاره چای ترش درکلیه تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد (T01,T02) و همچنین تیمار حاوی ۱۰ درصد عصاره (T3 و T6) میزان مواد جامد محلول کاهش پیدا کرده است ($p< ۰/۰۵$). اما در طی نگهداری به مدت ۳۰ روز میزان افت مواد جامد محلول در تیمار شاهد (T01,T02) و تیمار حاوی ۲/۵ درصد عصاره چای ترش (T1,T4) کمتر از تیمار حاوی ۱۰ درصد عصاره چای ترش (T3 و T6) بوده است ($p<۰/۰۵$).



نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد مواد جامد محلول بر اساس تیمار* زمان نگهداری، T1= لاکتوباسیلوس پلانتاروم+ ۲/۵ درصد عصاره چای ترش، T2 = لاکتوباسیلوس پلانتاروم+ ۵ درصد عصاره چای ترَش،T3 = لاکتوباسیلوس پلانتاروم+ ۱۰درصد عصاره چای ترش، T4 = ساکارومایسس سرویزیه+ ۲/۵ درصد عصاره چای ترش، T5 = ساکارومایسس سرویزیه+ ۵ درصد عصاره چای ترَش، T6 = ساکارومایسس سرویزیه+ ۱۰درصد عصاره چای ترش، T01 = ساکارومایسس سرویزیه و فاقد عصاره چای ترش، T02 = لاکتوباسیلوس پلانتاروم و فاقد عصاره چای ترش.

نتایج ارزیابی بقای ساکارومایسس سرویزیه

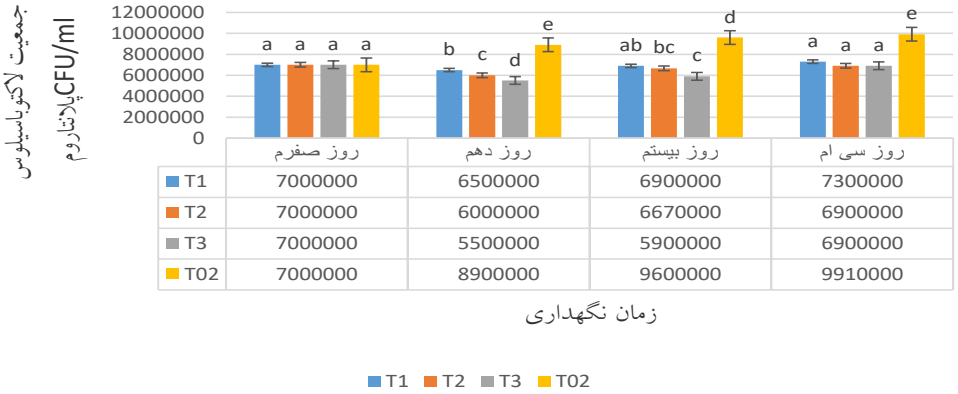
نتایج نمودار ۳ نشان می‌دهد که تاثیر عصاره چای ترش بر روی میزان بقای ساکارومایسس سرویزیه معنی‌دار بوده است (p< ۰/۰۵). با افزایش میزان عصاره چای ترش در آب آلبالو میزان بقای ساکارومایسس سرویزیه به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است (p< ۰/۰۵). به طوری که بالاترین میزان جمعیت ساکارومایسس سرویزیه متعلق به تیمار شاهد فاقد عصاره چای ترش (T01) و کمترین میزان بقای ساکارومایسس سرویزیه نیز در تیمار حاوی ۱۰ درصد عصاره چای ترش (T6) مشاهده گردید (p< ۰/۰۵). زمان نگهداری نیز تاثیرات معنی‌داری بر روی میزان جمعیت ساکارومایسس سرویزیه داشته است (p<۰/۰۵). با افزایش مدت زمان نگهداری میزان جمعیت ساکارومایسس سرویزیه از روز دهم به بعد به طور معنی‌داری افزایش یافته است (p< ۰/۰۵). در انتهای روز سی‌ام نگهداری میزان جمعیت ساکارومایسس سرویزیه به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است (p< ۰/۰۵). همچنین نمودار ۳ نشان داده است که در طی سی روز نگهداری در تیمارآب آلبالو حاوی ۱۰ درصد عصاره چای ترش (T6) میزان جمعیت مخمر ساکارومایسس سرویزیه کاهش داشته و همچنین در طی زمان نگهداری نیز کمترین میزان رشد را نسبت به سایر تیمارها و تیمار شاهد (T01) نشان داده است(p< ۰/۰۵).



نمودار ۳- مقایسه میانگین جمعیت ساکارومایسس سرویزیه بر اساس تیمار* زمان نگهداری، T4 = ساکارومایسس سرویزیه+ ۲/۵ درصد عصاره چای ترش، T5 = ساکارومایسس سرویزیه+ ۵ درصد عصاره چای ترَش، T6 = ساکارومایسس سرویزیه + ۱۰ درصد عصاره چای ترش، T01 = تیمارشاهد دارای ساکارومایسس سرویزیه و فاقد عصاره چای ترش.

نتایج ارزیابی بقای لاکتوباسیلوس پلانتاروم

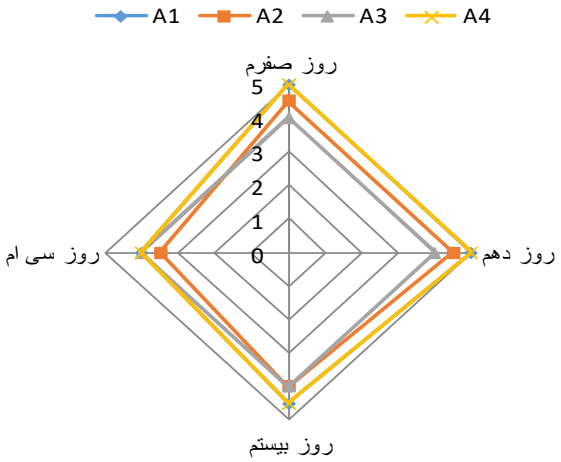
نتایج نمودار ۴ نشان می‌دهد که تاثیر تیمار بر جمعیت لاکتوباسیلوس پلانتاروم معنی‌دار بوده است (p< ۰/۰۵). همچنین، اختلافات معنی‌داری بین هریک از تیمارها و تیمار شاهد (T02) وجود داشته است (p<۰/۰۵). بالاترین میزان جمعیت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در تیمار شاهد فاقد عصاره چای ترش (T02) مشاهده شد و کمترین آن نیز در تیمار حاوی ۱۰ درصد عصاره چای ترش (T3) مشاهده گردید (p<۰/۰۵). یک روند کاهشی در جمعیت لاکتوباسیلوس پلانتاروم با افزایش مدت زمان نگهداری وجود داشت (p<۰/۰۵). بررسی نتایج ارزیابی شمارش جمعیت باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم حاکی از افزایش میزان مرگ سلولی با افزایش میزان غلظت عصاره چای ترش بود.



نمودار ۴- مقایسه میانگین جمعیت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر اساس تیمار* زمان نگهداری، T4 = ساکارومایسس سرویزیه + ۲/۵ درصد عصاره چای ترش، T5 = ساکارومایسس سرویزیه + ۵ درصد عصاره چای ترَش، T6 = ساکارومایسس سرویزیه + ۱۰درصد عصاره چای ترش، T01 = تیمارشاهد دارای ساکارومایسس سرویزیه و فاقد عصاره چای ترش.

نتایج ارزیابی عطر و بو

بررسی نتایج ارزیابی عطر و بو در نمودار ۵ اختلافات معنی‌داری بین شاخص عطر و بو در تیمارهای آب آلبالو نشان داد (p<۰/۰۵). افزایش درصد عصاره چای ترش به طور معنی‌داری میزان امتیازات عطر و بو را کاهش داد (p<۰/۰۵). بالاترین امتیاز عطر و بو متعلق به تیمار شاهد (A4) و کمترین آن به تیمار حاوی ۱۰ درصد عصاره چای ترش (A3) تعلق داشت (p<۰/۰۵). اما در طی مدت زمان نگهداری تیمارهای شاهد (A4) و سپس تیمارهای با مقادیر کمتر عصاره چای ترش دارای مطلوبیت عطر و بوی کمتری نسبت به تیمار حاوی ۱۰ درصد عصاره چای ترش (A3) بودند (p<۰/۰۵).



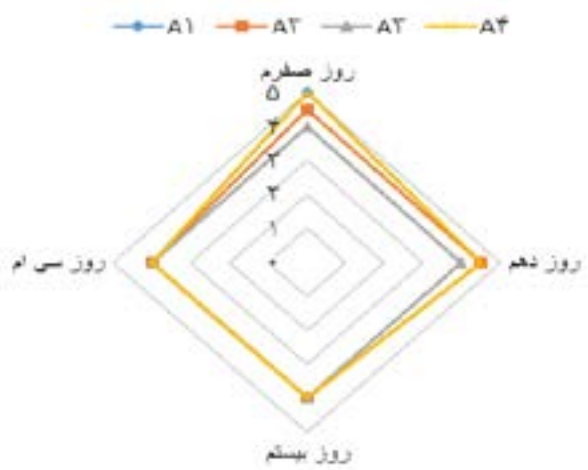
نمودار ۵- مقایسه میانگین عطر و بو، A1 = آب آلبالو دارای ۲/۵ درصد عصاره چای ترش، A2 = آب آلبالو دارای ۵ درصد عصاره چای ترش، A3 = آب آلبالو دارای ۱۰ درصد عصاره چای ترش، A4 = آب آلبالو شاهد.

نتایج ارزیابی طعم و مزه

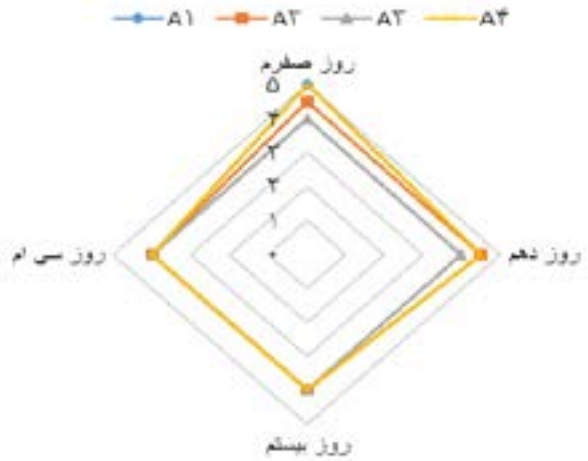
بررسی نتایج ارزیابی طعم و مزه در نمودار ۶ اختلافات معنی‌داری بین شاخص طعم و مزه در تیمارهای آب آلبالو نشان داد (p< ۰/۰۵). افزایش درصد استفاده از عصاره چای ترش به طور معنی‌داری میزان امتیازات طعم و مزه را کاهش داد (p< ۰/۰۵). بالاترین امتیاز طعم و مزه متعلق به تیمار شاهد (A4) و کمترین آن نیز به تیمار دارای ۱۰ درصد عصاره چای ترش (A3) تعلق داشت (p<۰/۰۵). اما در طی مدت زمان نگهداری تیمارهای شاهد (A4) و سپس تیمارهای با مقادیر کمتر عصاره چای ترش دارای مطلوبیت طعم و مزه کمتری نسبت به تیمار حاوی ۱۰ درصد عصاره چای ترش (A3) بودند (p<۰/۰۵).

نتایج ارزیابی پذیرش کلی

بررسی نتایج ارزیابی پذیرش کلی در نمودار ۷ نشان داد که اختلافات معنی‌داری بین شاخص پذیرش کلی تیمارهای آب آلبالو وجود داشت (p< ۰/۰۵) . افزایش درصد استفاده از عصاره چای ترش در مقادیر بالای ۲/۵ درصد به طور معنی‌داری میزان امتیازات پذیرش کلی را کاهش داد (p<۰/۰۵). بالاترین امتیاز پذیرش کلی متعلق به تیمار شاهد (A4) و کمترین آن نیز به تیمار حاوی ۱۰ درصد عصاره چای ترش (A3) تعلق داشت (p< ۰/۰۵) . اما در طی مدت زمان نگهداری تیمار شاهد (A4) و سپس تیمارهای با مقادیر کمتر عصاره چای ترش دارای مطلوبیت طعم و مزه بیشتری از تیمار حاوی ۱۰ درصد عصاره چای ترش بودند (p<۰/۰۵). با افزایش مدت زمان نگهداری از امتیازات پذیرش کلی در کلیه تیمارها کاسته شد (p< ۰/۰۵).



نمودار ۶- مقایسه میانگین طعم و مزه، A1 = آب آلبالو دارای ۲/۵ درصد عصاره چای ترش، A2 = آب آلبالو دارای ۵ درصد عصاره چای ترش، A3 = آب آلبالو دارای ۱۰ درصد عصاره چای ترش، A4 = آب آلبالو شاهد.



نمودار ۷- مقایسه میانگین پذیرش کلی، A1 = آب آلبالو دارای ۲/۵ درصد عصاره چای ترش، A2 = آب آلبالو دارای ۵ درصد عصاره چای ترش، A3 = آب آلبالو دارای ۱۰ درصد عصاره چای ترش، A4 = آب آلبالو شاهد.

بحث

تحلیل نتایج حداقل غلظت کشندگی و غلظت مهار کنندگی عصاره چای ترش

بررسی نتایج جدول ۳ نشان داد که حداقل غلظت کشندگی و غلظت مهارکنندگی برای ساکارومایسس سرویزیه و لاکتوباسیلوس پلانتاروم اختلافات معنی‌داری با یکدیگر نشان دادند ($p< ۰/۰۵$) که علت این اختلاف به حساس بودن باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به تغییرات محیطی می‌باشد. همچنین باکتری‌ها نسبت به مخمرها به میزان بیشتری به کمبود دسترسی منابع قندی ناشی از تغییرات اسیدیته و متابولیزه شدن قند حساس می‌باشند. از این رو نسبت به مخمرها کمتر قادر به تطبیق با محیط اطراف خود می‌باشند. از این نظر اختلافات معنی‌داری بین آن‌ها وجود داشت.

تحلیل نتایج ارزیابی اسیدیته

بررسی نتایج نمودار ۱ نشان داد که استفاده از عصاره چای ترش به طور معنی‌داری میزان اسیدیته را افزایش داده است ($p<۰/۰۵$). یکی از دلایل این تغییرات ترکیبات عصاره چای ترش می‌باشد که حاوی

ترکیباتی مانند گالیک اسید، الاژیک اسید، کافئیک اسید، کامفرول، لوتئین، کوئرستین، اسیدهای چرب و ایندول‌ها می‌باشد (۱۳) که بر روی افزایش اسیدیته تیمارها تاثیرات معنی‌داری دارد($p<۰/۰۵$) و بدیهی است که با افزایش میزان غلظت این ترکیبات در آب‌میوه، میزان اسیدیته تیمارهای آب آلبالو نیز به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p<۰/۰۵$). چای ترش دارای ترکیبات اسید سیتریک و ویتامین ث بوده که عامل اصلی افزایش اسیدیته آب آلبالو می‌باشد. همچنین با افزایش غلظت عصاره چای ترش در فرمولاسیون آب آلبالو میزان اسیدیته نیز به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است ($p<۰/۰۵$). با افزایش غلظت چای ترش میزان ترکیبات پلی‌فنولی مانند تین فلانوئید، هیبیستین، سابدارتین ، اسید گالاکتورونیک و همچنین دلفی نیدین ۳- مونوگلوکوزید، سیانیدین ۳- مونوگلوکوزید و دلفی نیدین به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). تخمیر ترکیبات قندی موجود در آب آلبالو مانند اسید سیتریک و اسید گالیک در طی زمان نگهداری باعث افزایش اسیدیته کلی در تیمارهای آب آلبالو گردید ($p<۰/۰۵$). بنظر می‌رسد که حضور میکروارگانیسم‌های موجود در آب آلبالو به طور معنی‌داری میزان اسیدیته آب‌میوه را در طی زمان نگهداری افزایش داده است ($p<۰/۰۵$). تیمارهای دارای مقادیر بیشتر عصاره چای ترش به دلیل ممانعت از رشد باکتری‌ها از افزایش اسیدیته ناشی از متابولیزه کردن میکروارگانیسم‌ها به طور موثرتری جلوگیری می‌نماید. در این راستا تحقیقات مشابهی نیز وجود داشت.

در تحقیق انجام شده توسط Yoon و همکاران (۲۰۰۴) نژادهای لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم، لاکتوباسیلوس‌کازئی و لاکتوباسیلوس‌دلبروکی برای تولید آب گوجه پروبیوتیک استفاده گردید و نتایج نشان داد لاکتوباسیلوس پلانتاروم نسبت به سایر گونه‌ها، قند را با سرعت بیشتری مصرف و در نتیجه اسید بیشتری تولید گردید که موجب افزایش قابل توجه اسیدیته گردید که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (۱۵).

تحلیل نتایج ارزیابی درصد مواد جامد مواد محلول

بر طبق نمودار ۳، نتایج نشان داد که تغییرات درصد مواد جامد مواد محلول به ترکیبات عصاره چای ترش بستگی دارد. با افزایش درصد ترکیبات عصاره چای ترش به جهت افزایش درصد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و اسیدی موجود در عصاره اتانولی چای ترش، درصد مواد جامد محلول به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p< ۰/۰۵$). همچنین با افزایش حضور لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ساکارومایسس سرویزیه به جهت توانایی در متابولیزه کردن ترکیبات پکتینی و پروتئینی و تبدیل آن‌ها به ترکیبات قندی موجبات کاهش تدریجی درصد مواد جامد محلول در طی مدت زمان نگهداری فراهم گردید. با افزایش درصد غلظت عصاره چای ترش و بالارفتن میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در فرمولاسیون آب‌میوه، جمعیت لاکتوباسیلوس پلانتاروم به طور معنی‌داری کاهش داشته است ($p< ۰/۰۵$) و درصد مواد جامد محلول موجود در آب‌میوه به طور معنی‌داری کاهش نشان داده است ($p< ۰/۰۵$). جمعیت میکروبی بالاتر در تیمارهای با مقادیر ۲/۵ درصد عصاره چای ترش باعث بالا بودن درصد مواد جامد محلول نسبت به تیمارهای ۵ و ۱۰ درصد عصاره چای ترش بود و با افزایش درصد ترکیبات عصاره چای ترش و افزایش میزان کشندگی ترکیبات موجود در آب‌میوه میزان درصد مواد جامد محلول در تیمار ۱۰درصد عصاره چای ترش (T3,T6) نسبت به تیمار شاهد (T01,T02) و تیمار ۲/۵ درصد عصاره چای ترش (T1,T4) کاهش یافته است ($p< ۰/۰۵$). Yang و همکاران (۲۰۰۴) نیز در بررسی اثرات آب تمشک بر روی میزان مهار رشد باکتری‌های پاتوژن مواد غذایی دریافتند که ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در آب تمشک در کاهش جمعیت لاکتوباسیلوس و همچنین درصد مواد جامد محلول موجود در آب‌میوه موثرند که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت (۱۶).

نتایج ارزیابی ساکارومایسس سرویزیه

پلی فنل‌های چای ترش با تولید پراکسید هیدروژن به صورت پراکسیدان عمل کرده و از این طریق اثر مهاری خود را بر رشد میکروارگانیسم‌ها اعمال می‌کنند.

مصرف H_2O_2 توسط ساکارومایسس سرویزیه باعث تغییر سنتز اسیدهای چرب و کل پروتئین موجود در غشای پلاسما می‌شود (۱۷). مطالعات نشان داده است که مصرف H_2O_2 در مقادیر پایین باعث ایجاد استرس در ساکارومایسس سرویزیه و اثرات منفی بر روی سنتز ترکیبات پروتئینی ضروری می‌شود (۱۸) که نهایتا به مرگ سلولی و کاهش جمعیت باکتریایی با افزایش غلظت عصاره چای ترش در طی نگهداری منجر شد. همچنین با افزایش مدت زمان نگهداری به دلیل کاهش منابع قندی موجود از میزان جمعیت ساکارومایسس سرویزیه کاسته شد.

نتایج ارزیابی لاکتوباسیلوس پلانتاروم

پژوهشگران، غلظت و ویژگی‌های ساختاری ترکیبات فنلی از جمله نوع، تعداد و موقعیت گروه‌های استخلافی در حلقه بنزن، نوع و مکانیسم عمل این ترکیبات در عصاره‌های گیاهی را از عوامل موثر در فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها دانسته اند (۱۹). ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره چای ترش توسط باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم به مولکول‌های کوچکتری با فعالیت ضد میکروبی کمتر از جمله گالیک اسید تجزیه می‌گردد که این گالیک اسید اثرات ممانعت کنندگی بر روی فعالیت لاکتوباسیلوس پلانتاروم دارد. البته گالیک اسید در ترکیبات عصاره آلبالو نیز وجود دارد. همچنین با افزایش غلظت ترکیبات پلی فنولی عصاره چای ترش در مقادیر ۱۰ درصد (T3)، میزان زنده مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p< ۰/۰۵$). همچنین این احتمال وجود دارد که در طی سی روز نگهداری میزان ترکیبات پلی فنولی افزایش یابد که این امر می‌تواند ناشی از هیدرولیز پیوندهای بین ترکیبات فنولیک با سایر ترکیبات به ویژه پروتئین‌ها باشد.

مردانی قهفرخی (۱۳۹۳) اثر ضد میکروبی عصاره-های فنولی برگ گیاه گل مغربی بر عوامل فساد در آب سیب را در مقادیر ۰/۵ ، ۰/۳ و ۰/۱ بررسی نمودند و دریافتند که جمعیت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در حضور ترکیبات پلی فنولی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (۱).

نتایج ارزیابی طعم و مزه

با توجه به نتایج ارزیابی طعم و مزه اختلافات معنی‌داری بر اساس نوع طعم در غلظت‌های پایین عصاره چای ترش وجود نداشت و ارزیاب‌ها اختلافات معنی داری را با تیمار شاهد (A4) تشخیص ندادند ($p< ۰/۰۵$) اما در مقادیر بالاتر عصاره چای ترش به جهت افزایش میزان اسید سیتریک و اسید گالیک موجود درآب آلبالو و افزایش اسیدیته، امتیازات ارزیاب-ها به طور معنی‌داری نیز کاهش یافت($p< ۰/۰۵$) و در طی دوره نگهداری نیز به جهت رشد میکروفلورهای طبیعی موجود در آب آلبالو در طی دوره نگهداری امتیازات طعم و مزه به طور معنی‌داری با افت مواجه گردید ($p< ۰/۰۵$). به عنوان مثال ساکارومایسس سرویزیه با دکربوکسیله کردن اسید سوربیک و تبدیل آن به ۱ و ۳ پنتا دی ان و همچنین تولید دی اکسید کربن و اتانول طی فرآیند تخمیر باعث ایجاد عطر و طعم نامطلوبی در تیمارهای آب‌میوه گردید. لاکتوباسیلوس پلانتاروم نیز تاثیر بسزایی در ایجاد طعم نامطلوب آب‌میوه دارد. به عنوان مثال این باکتری ضمن تولید دی استیل به عنوان یک متابولیت فرار باعث تغییر طعم آب‌میوه گردید. پژوهشگران تاکنون روش-های مختلفی از جمله استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی را جهت ممانعت از فعالیت این میکروارگانیسم‌ها در آب‌میوه ها به کار گرفته‌اند. همچنین باکتری‌های لاکتیکی به دلیل تغییرات متابولیکی در طی زمان نگهداری و تولید ترکیبات خارج سلولی مانند دی اکسید گوگرد و ترکیبات سولفیدی می‌توانند موجب بد طعمی محصول گردند. Molva و Baysal (۲۰۱۵) اثرات مخلوط آب سیب – آب انار را بر روی خصوصیات رشد سلول‌های رویشی و اسپورهای "الیسایکلوباسیلوس اسیدتریستریس DSM ۳۹۲۲ " بر مخلوط‌های آب‌میوه با مقادیر۱۰ ،۲۰ و ۴۰ درصد بررسی نمودند و تولید ترکیبات دی سولفیدی را در آب‌میوه مورد تایید قرار دادند (۲۰).

نتایج ارزیابی عطر و بو

بررسی نتایج ارزیابی عطر و بو نشان داد که بین شاخص‌های عطر و بوی تیمارها تا مقادیر ۵ درصد عصاره چای ترش اختلافات معنی‌داری وجود نداشت

(p< ۰/۰۵). اما در مقادیر ۱۰ درصد عصاره چای ترش، به جهت افزایش میزان غلظت ترکیبات عطر و بو موجود در عصاره باعث افزایش ترکیبات عامل عطر و بو در آب آلبالو شد که امتیازات ارزیاب‌ها نیز با اندکی کاهش مواجه گردید اما تغییرات عطر و بو در طی زمان نگهداری ناشی از عطر و بو و ترکیبات آروماتیک آب-میوه نبود، بلکه ترکیبات اسیدی ناشی از تخمیر باعث ایجاد عطر و بوی اسیدی و دی سولفیدی ناشی از متابولیزم باکتری‌ها در محصول گردید که به نوبه خود در طی زمان نگهداری باعث کاهش امتیازات عطر و بو در تیمارها گردید.

بررسی نتایج ارزیابی عطر و بو در نمودار ۵ نشان داد که جمعیت باکتری‌های لاکتیک بر روی میزان عطر و بوی محصول اثر معنی‌داری داشت (p< ۰/۰۵) که دلایل متعددی می‌تواند برای این تغییرات وجود داشته باشد. متابولیسم باکتری‌های لاکتیکی ممکن است به تولید ترکیباتی که اثرات حسی نامطلوبی روی آروما و طعم محصولات می‌گذارند، منجر شود. طعم بعضی از محصولات پروبیوتیک به صورت اسیدی ، تلخ یا تند و تیز می‌باشد که بر روی خواص حسی محصول تاثیر می‌گذارد. Filipa و Gibbs (۲۰۰۱) نیز در بررسی تحقیقات خود با عنوان حضور اسپورهای آلیسایکلو باســـیلوس در آب‌میوه در طی فرآیند پاستوریزاسیون نیز دریافتند که ترکیبات دی سولفیدی در طی فرآیند تولید می شود که باعث ایجاد عطر و بو نامطلوب می-شود (۲۱).

تحلیل نتایج پذیرش کلی

بررسی نتایج پذیرش کلی نشان داد که استفاده از عصاره چای ترش به میزان ۱۰ درصد اگرچه به طور معنی‌داری باعث کاهش قابلیت زنده مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مخمر ساکارومایسس سرویزیه گردید. اما به جهت کاهش امتیازات ارزیابی حسی، مقبولیت کلی ارزیاب‌ها را کسب ننمود. نهایتا ارزیاب‌ها به تیمارهای حاوی ۵ درصد (A2) و ۲/۵ درصد (A1) عصاره چای ترش بالاترین امتیاز را دادند. در تیمار حاوی ۱۰درصد (A3) عصاره چای ترش به جهت کاهش میزان pH و افت طعم، میزان مقبولیت به طور معنی داری کاهش یافت (p< ۰/۰۵).

در این تحقیق اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره چای ترش بر روی ساکارومایسس سرویزیه PTCC۵۲۶۹ و لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC۱۰۵۸ در آب آلبالو در طی سی روز نگهداری بررسی شد. نتایج مقادیر MIC و MBC عصاره چای ترش برای ساکارومایسس سرویزیه به ترتیب ۵۰۰ ppm و ppm ۲۰۰ و برای لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱۸۰ ppm و ۲۵۰ ppm نشان داد که حاکی از مقاومت بالاتر ساکارومایسس سرویزیه در مقایسه با لاکتوباسیلوس پلانتاروم در برابر عصاره چای ترش بود. مقدار اسیدیته افزایش یافت که ناشی از افزایش میزان عصاره و همچنین زمان نگهداری بود. همچنین در اثر استفاده از عصاره چای ترش به طور معنی‌داری میزان جمعیت میکروبی آب آلبالو کاهش یافت (p<۰/۰۵). در این میان تیمار با ۱۰ درصد عصاره چای ترش، بالاترین میزان کاهش جمعیت میکروبی را نشان داد. افزایش درصد استفاده از عصاره چای ترش به طور معنی‌داری میزان امتیازات عطر و بو، طعم و مزه و میزان امتیازات پذیرش کلی را کاهش داد.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی و آزمایشگاه واحد ورامین قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

۱. مردانی قهفرخی، و.، اعلمی، م.، عربشاهی دلویی، س.، صادقی ماهونک، ع.، ۱۳۹۳. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره های فنولی برگ گیاه گل مغربی (*Oenothera biennis*) بر عوامل فساد در آب سیب نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران. جلد ۱۰. شماره ۱. ۳۸-۴۵.

۲. میرموسوی، ا.، زمردی، ش.، محمدی ثانی، ع.، احمدزاده قویدل، ر.، ۱۳۹۱. بررسی تاثیر فیبر پرتقال بر خواص فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی ماست میوه ای توت فرنگی به روش سطح پاسخ، مجله نوآوری در علوم و فناوری غذایی، سال پنجم، شماره اول، ص ۳۳-۲۳.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils-a review. Food Chem Toxicol 46: 446-475.

Mardani ghahfarokhi, V., Alami, M., Arabshahi delobi, S., 1393. The antibacterial effect of phenolic extracts of leaf evening primrose (Oenothera biennis) on the causes of corruption in apple juice. Journal of Food Science and Technology Iran 10: 38-45.

Erkan, A. C., Clark, G. R., 2012. Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. Analytica Chimica Acta 732: 186-193.

Eissa, H. A., Ramadan, M. T., Ali, H. S., 2008. Effect of natural extracts from the fruits of doum palm, carob and licorice on thequality and safety of apple slices. Journal of Agricultural Science Mansoura University 33: 6609-6623.

Bart, M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiolobiogy Reverse 12: 564-582.

Palmar, N., Basaran-Akgul, J. J., Churey, P., Basaran, R. W., 2004. Inactivation of different strains of Escherichia coli O157:H7 in various apple ciders treated with dimethyl dicarbonate (DMDC) and sulfur dioxide (SO2) as an alternative method. Food Microbiology 26: 8-15.

Santos, E. V., Martinez, A. O., Munizaga, G. T., Reyes, J. E., and Won, M. P., 2012. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing onphysicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. Innov Food Sci Emerg 13: 13-22.

). Tabatabaie Yazdi, F., Mortazavi, A., Alizadeh Behbahani, B., Vasie, A., Moradi, S., Tabatabaie Yazdi, F., Jafarian, F., 2015. Comparison of extracts of hibiscus and choice of antibiotics based on clinical and standard strains in in vitro infection. Journal of Infectious Diseases and Tropical Infectious Disease Association 69: 31-40.

1. Alipour Eskandani, M., Rahnama, M., Saadati, M., Noori Jangi, A., Sargazi, S., 1395. The effect of nisin and alcoholic extracts of hibiscus population 1113ATCC *Staphylococcus aureus* noculated in minced fillet of Vanamydr shrimp. Thesis. Zabol University - School of Veterinary Medicine.

2. Javadian, F., Spehri, Z., Amraie, M., Kiani, Z., Shahraki Mojahed, M., Shahi, Z., Pourghasemi, S., 1393. Antimicrobial effect of ethanol extract of the leaves of hibiscus (Hibiscus Sabdariffa) against Klebsiella pneumoniae resistant to various antibiotics. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 22: 565-570.

13. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Iranian national standard. Fruit juices-test methods, the national standard, 1386.
14. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Iranian national standard. Drink, juice and its products microbial characteristics and test methods, 1385.
15. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Iranian national standard. Microbiology of food and feed Trap comprehensive method for counting yeasts and molds, 1387.
16. Yoon, H., Hewes, D., Salaheen, S., Federman, C., Biswas, D., 2014. Effects of black berry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of Lactobacillus, Food Control 37: 15-20.
17. Yang, G., Ballistreri, A., Continella, A., Gentile, M., Amenta, S., Fabroni, P., 2014. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (Prunus avium L.) cultivars grown in Italy, Food Chemistry 140: 630-638.
18. Matis Barclay, M., Ginic-Markovic, M. R., Johnston, P., Cooper, N., 2007. Observation of the keto tautomer of d-fructose in D2O using 1H NMR spectroscopy. Carbohydrate Research 347: 136-141.
19. Costa, C. H., Crisosto, G. M., Crisosto, P., 2002. Consumer acceptance of 'Brooks' and 'Bing' cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color Postharvest. Biology and Technology 28: 159-167.
20. Cueva, M. A., Chauvin, M. D., Whiting, C. F., 2010. The influence of harvest time on sensory properties and consumer acceptance of sweet cherries. Hort Technology 19: 748-754.
21. Molva, C., 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 Microbilog 200: 52-56
22. Filipa, G., 2011. Alicyclobacillus acidoterrestris spores in fruit products and design of pasteurization processes. Trends in Food Science & Technology 12 (2): 68.