

## ارزیابی تاثیر درصد نمک، pH و دمای نگهداری بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس و لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و ویژگی‌های کیفی زیتون تخمیری به روش سطح پاسخ

عباس عابدفر<sup>۱</sup>، مریم ابراهیمی<sup>۱</sup>، علیرضا صادقی<sup>۲\*</sup>، علی اکبر غلامحسین پور<sup>۳</sup>

۱. پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران (نویسنده مسئول)\*

۴. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران

### چکیده

این پژوهش با هدف بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس و لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و همچنین بررسی خصوصیات کیفی زیتون تخمیری تولیدی، تحت تیمارهای نمک (۲ تا ۱۰٪)، pH (۳ تا ۴/۵) و دمای نگهداری (۴ تا ۳۷ °C) با استفاده از روش سطح پاسخ به اجرا درآمد تا با تعیین سطوح بهینه این تیمارها بتوان زیتون تخمیری پروبیوتیک با پذیرش کیفی مناسب تولید نمود. پس از اعمال تیمارهای مذکور، معنی‌داری تاثیر درصد نمک بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانٹاروم با افزایش دمای نگهداری و افزایش pH و همچنین معنی‌داری اثر متقابل افزایش دمای نگهداری با کاهش درصد نمک بر میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس در زیتون تخمیری در سطح ۵٪ تایید گردید. اثر متقابل افزایش درصد نمک با کاهش دمای نگهداری نیز بر میزان شاخص‌های رنگی زیتون تخمیری به شکل درجه دوم و در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. بر این اساس، رابطه زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک با تیمارهای فرآوری زیتون تخمیری و همچنین رابطه خصوصیات کیفی زیتون تولیدی با زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک تلقیح شده تحت تاثیر متغیرهای فرایند، محرز شد. لذا کنترل و ارزیابی اثرات متقابل این متغیرها در طی فرآوری زیتون تخمیری پروبیوتیک به منظور تولید محصول با کیفیت بالا ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: زیتون تخمیری، باکتری‌های پروبیوتیک، روش سطح پاسخ.

\* sadeghi.gau@gmail.com

## مقدمه

میوه زیتون (*Olea europaea*)، ماده حیاتی با ارزشی است که زمان برداشت و عرضه آن به بازار، محدود بوده و لذا توزیع آن به واسطه سرعت فسادپذیری بسیار مشکل می-باشد. لذا باید حتی الامکان، زیتون را به صورت فرآوری شده با رعایت موازین بهداشتی تهیه نمود. یکی از مهم‌ترین روش-های فرآوری زیتون، تخمیر آن می‌باشد که عوامل مختلفی از جمله زمان برداشت، مقدار قند موجود در میوه، شرایط و نحوه تلخی‌زدایی، دمای نگهداری، نوع تخمیر (طبیعی یا کنترل شده) و مقدار آغازگر میکروبی افزوده شده بر کیفیت محصول تولیدی با این روش موثرند. تخمیر زیتون با بقای جمعیت میکروبی به ویژه باکتری‌های اسید لاکتیک<sup>۱</sup> به عنوان میکروفلور طبیعی آن و همچنین تغییرات بیوشیمیایی نظیر تولید اسید لاکتیک و اسید استیک و متعاقباً بهبود ویژگی‌های حسی محصول ارتباط دارد (۱ و ۲). از آنجا که اثر بخشی غذاهای پروبیوتیک، مبتنی بر بقاء میکروارگانیسم‌های موجود و سپس لانه‌گزینی آن‌ها در دستگاه گوارش است لذا زنده‌مانی این میکروارگانیسم‌های سودمند در ماده غذایی طی تولید و نگهداری آن نیز از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۳ و ۴). عموماً میزان زنده‌مانی و جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در زیتون تخمیری در مقایسه با محصولات پروبیوتیک بر پایه شیر نظیر ماست‌های تخمیری به واسطه ساختار درونی و خصوصیات تغذیه‌ای آن بهتر حفظ می‌شود (۵ و ۶). از سوی دیگر، رویکرد جدید صنعت غذا در راستای تولید فراورده‌های تخمیری غیر لبنی با توزیع مناسب از باکتری‌های پروبیوتیک، سبب جلب توجه بیشتر محصولات فراسودمند و فراورده‌های فاقد کلسترول نظیر زیتون تخمیری شده است (۷ و ۸).

تا کنون پژوهش‌هایی در خصوص تلقیح باکتری‌های اسید لاکتیک به زیتون و بررسی تاثیر درصد نمک، pH و دما بر زنده‌مانی این میکروارگانیسم‌ها در فراورده‌های تخمیری غیر لبنی صورت گرفته است. به عنوان مثال، استفاده از

لاکتوباسیلوس پلانتروم<sup>۲</sup> به عنوان کشت آغازگر اختصاصی در فرآوری زیتون تخمیری با بهبود قابلیت کنترل فرایند تخمیر، سبب افزایش تولید اسید لاکتیک، افزایش اسیدیته در آب نمک زیتون و نهایتاً تولید زیتون سبز تخمیری با کیفیت بالا و ثابت شده است (۹). همچنین مشخص شده است که لاکتوباسیلوس پلانتروم نقش مهمی در تخمیر و فرآوری زیتون داشته و ضمن بقاء در آب نمک، در بهبود ویژگی‌های حسی محصول تولیدی نظیر رنگ، طعم و بافت آن نیز موثر است (۱۰).

با توجه به حضور طبیعی باکتری‌های اسید لاکتیک در زیتون و همچنین با توجه به نقش آن‌ها در مهار فعالیت میکروارگانیسم‌های ناخواسته، تجزیه اتوروپین<sup>۳</sup> و تلخی-زدایی از زیتون، مسلماً با افزایش جمعیت این باکتری‌ها طی تخمیر کنترل شده می‌توان ارزش پروبیوتیکی محصول تولیدی را نیز ارتقاء بخشید (۱۱). پژوهشگران با بررسی مدل-های اولیه جهت توصیف رشد پیچیدگی<sup>۴</sup> تحت تاثیر دما، خلطت نمک و pH به روش سطح پاسخ دریافتند که کاهش دما و افزایش نمک، سبب کاهش معنی‌دار رشد این مخمر شد و در مقابل، افزایش دما و کاهش pH به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) رشد پیچیدگی<sup>۴</sup> را افزایش داد (۱۲). علاوه بر این گزارش شده است که تلقیح همزمان لاکتوباسیلوس پنتوسوس<sup>۵</sup> و مخمر کاندیدا دینسیا<sup>۶</sup> در زیتون تخمیری با کاهش زنده‌مانی سویه‌های اتروپاکتریا<sup>۳</sup> سبب بهبود ماندگاری و افزایش خصوصیات حسی این محصولات نیز می‌گردد (۱۳). اخیراً نیز دو سویه لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس پنتوسوس به عنوان گونه‌های غالب در فرایند تخمیر زیتون معرفی شده و همچنین تغییرات pH دمای نگهداری، تغییرات درصد نمک و محتوی ترکیبات پلی‌فنلی و مغذی به عنوان مهم‌ترین عوامل تاثیر گذار بر کیفیت زیتون-های تخمیری مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۴).

روش سطح پاسخ (RSM)، مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و تجربی مفید برای بررسی تاثیر چند متغیر بر عملکرد

<sup>۱</sup> *Lactobacillus pentosus*

<sup>۲</sup> *Candida didenstia*

<sup>۱</sup> Lactic acid bacteria

<sup>۲</sup> *Lactobacillus plantarum*

<sup>۳</sup> Oleuropein

<sup>۴</sup> *Pichia anomala*

ارزیابی تاثیر درصد نمک، pH و دمای نگهداری بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

(۱۸)، تامین شد. برای تهیه آب نمک نیز از آب مقطر به همراه کلرید سدیم (۲٪ وزنی وزنی) استفاده گردید. سپس آب نمک مذکور درون لوله‌های فآلکون با یک نسبت ثابت حجمی، اترکلار گردیده و زیتون‌ها با یک نسبت وزنی ثابت در شرایط استریل به آن‌ها افزوده شد.

#### تهیه سوسپانسیون باکتری‌های پروبیوتیک جهت افزودن به زیتون تخمیری

پس از فعال‌سازی سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و لاکتوباسیلوس برویس در محیط کشت MRS Broth (گرمخانه‌گذاری به مدت ۴۸ h در دمای ۳۷ °C)، باکتری‌های مذکور با جمعیت نهایی  $10^8$  cfu/g (در مقایسه با لوله ۰/۵ مک فارلند) برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا سلول‌های تازه میکروبی، با ساتریفوز زیست‌توده تولیدی در ۵۰۰۰g (هانیل، کومی 514R<sup>۱</sup>، کره‌جنوبی)، ۴ °C و به مدت ۱۵ min از محیط کشت جدا گردید (۱۹). سپس هر کدام از سویه‌های پروبیوتیک فعال با تعداد  $10^8$  cfu در هر گرم زیتون در یک حجم مشخص آب نمک به نمونه‌های زیتون حاصل از اعمال متغیرهای مستقل مورد بررسی شامل دمای نگهداری (۴ تا ۳۷ °C)، نمک (۲ تا ۱۰٪) و pH (۴/۵ تا ۴/۵)، افزوده شد و به مدت یک ماه در شرایط مذکور نگهداری گردید.

#### بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

به منظور شمارش باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده در این پژوهش از کشت سطحی رقت‌های متوالی نمونه در محیط کشت MRS Agar و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۸ h استفاده گردید (۲۰).

#### ارزیابی خصوصیات رنگی محصول تولیدی

تجزیه و تحلیل رنگ پوسته خارجی زیتون تخمیری از طریق تعیین سه شاخص  $a^*$  و  $b^*$  صورت پذیرفت.

و کیفیت محصول و یا فرایند تحت بررسی با هدف مدل‌سازی و بهینه‌یابی فرایندهای پیچیده است. این روش، نه تنها تعامل بین متغیرهای مستقل را ارزیابی می‌کند بلکه برای تعیین اثرات متقابل آن‌ها به منظور کاهش تعداد آزمون و هزینه‌های کلی نیز کاملاً کارآمد می‌باشد (۱۵ و ۱۶). با توجه به اینکه تاکنون اثر همزمان عوامل موثر در فرآوری و نگهداری زیتون تخمیری و اثرات متقابل این عوامل در کشور مورد بررسی قرار نگرفته است این پژوهش با هدف ارزیابی تاثیر درصد نمک، pH و دمای نگهداری بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس<sup>۱</sup> و لاکتوباسیلوس پلانٹاروم در زیتون تخمیری و بررسی خصوصیات کیفی محصول تولیدی به روش سطح پاسخ به اجرا در آمد.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد خام

کسر زیتون بدون هسته مورد استفاده در این پژوهش با درصد نمک ۱/۹۹ و pH: ۴/۳۱ از یک برند تجاری معتبر و دارای ویژگی‌های منطبق با استاندارد ملی ایران (۱۷) تهیه گردید. سرم فیزیولوژی (٪ ۰/۸۵ کلرید سدیم - وزنی حجمی) جهت رقیق‌سازی و محیط کشت‌های مصرفی شامل MRS برات و MRS آگار از شرکت مرک<sup>۲</sup> آلمان تهیه شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش نیز از شرکت مرک آلمان تهیه گردیدند.

#### آماده‌سازی آب نمک و باکتری‌های پروبیوتیک

##### مورد استفاده

سویه‌های میکروبی (لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و لاکتوباسیلوس برویس) مورد استفاده در این پژوهش از تک پرگنه کشت خطی جدایه‌های لاکتیکی خمیرترش آرد کامل گندم که با توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) دارای پرایمر اختصاصی، تایید شناسایی گردیده و خصوصیات پروبیوتیکی آن‌ها نیز مورد تایید قرار گرفته بود

<sup>۱</sup> Combi

<sup>۱</sup> *Lactobacillus brevis*

<sup>۲</sup> Merck

<sup>۳</sup> Polymerase Chain Reaction

Design Expert نسخه ۹ صورت گرفت. پاسخ‌های مورد بررسی (۲) شامل زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پروبیس، زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانناروم، خصوصیات رنگی و پذیرش کلی محصول تولیدی تحت تاثیر سه متغیر مستقل دمای نگهداری ( $X_1$ )، درصد نمک ( $X_2$ ) و pH ( $X_3$ ) در سه سطح ارزیابی گردید. بر اساس آنالیز مذکور برای هر یک از پاسخ‌های مورد ارزیابی نیز یک مدل چند متغیره (معادله ۲) برای پیش‌بینی اثر متغیرها تعریف شد که در آن  $\beta_0$  ضریب ثابت،  $\beta_1$ ،  $\beta_2$ ،  $\beta_3$  ضرایب خطی،  $\beta_{11}$ ،  $\beta_{22}$ ،  $\beta_{33}$  اثرات مربعی و  $\beta_{12}$ ،  $\beta_{13}$ ،  $\beta_{23}$  اثرات متقابل می‌باشند (۲۴).

معادله (۲)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

نیسارهای اعمال شده در این پژوهش در جدول (۱) ارائه گردیده است.

## نتایج

### ارزیابی تناسب مدل‌های برازش شده

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش برای هر متغیر وابسته، مدلی تعریف گردید و سپس به منظور ارزیابی صحت مدل‌های برازش یافته، آزمون ضعیف برازش<sup>۱</sup> و همچنین مقادیر ضریب تغییرات<sup>۲</sup>، ضریب تبیین  $R^2$  (adj) و  $R^2$  و P value تعیین شدند. آزمون F نیز جهت تایید واریانس به دست آمده از مدل رگرسیونی با ارزیابی معنی‌داری آن نسبت به واریانس باقی مانده و همچنین بررسی تعیین عدم برازش مدل (خطای مدل) مورد استفاده قرار گرفت. مهمترین قسمت در جدول تحلیل آماری در بخش آنالیز واریانس، متغیر ضعیف برازش است که نشان دهنده مناسب یا نامناسب بودن مدل نیز می‌باشد.

شاخص  $L^*$  معرف میزان روشنی نمونه بوده و دامنه آن از صفر (سیاه خالص) تا ۱۰۰ (سفید خالص) متغیر می‌باشد. شاخص  $a^*$  میزان نزدیکی رنگ نمونه به رنگ‌های سبز و قرمز را نشان می‌دهد و دامنه آن از ۱۲۰- (سبز خالص) تا ۱۲۰+ (قرمز خالص) متغیر است. شاخص  $b^*$  نیز میزان نزدیکی رنگ نمونه به رنگ‌های آبی و زرد را نشان می‌دهد و دامنه آن از ۱۲۰- (آبی خالص) تا ۱۲۰+ (زرد خالص) متغیر می‌باشد. برای تعیین این شاخص‌ها، نمونه‌هایی از پوسته زیتون تهیه گردید و به وسیله اسکنر (مدل HP Scanjet G3010، آمریکا) با وضوح ۳۰۰ پیکسل تصویر برداری شد. سپس تصاویر مذکور در اختیار نرم افزار Image J (نسخه ۱/۴۵، ۲۰۱۳) قرار گرفت. در نهایت با فعال کردن فضای Lab در بخش Plugins شاخص‌های فوق محاسبه شد (۲۱). سپس بر اساس معادله ذیل (۱)، اختلاف کل رنگ (TCD)<sup>۱</sup> نیز بر اساس شاخص‌های به دست آمده از نمونه شاهد ( $L_0^*$ ،  $a_0^*$  و  $b_0^*$ ) تعیین گردید (۲۲).

معادله (۱)

$$TCD = \frac{1}{\sqrt{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2}}$$

### ارزیابی خصوصیات حسی محصول تولیدی

خصوصیات حسی نمونه‌های زیتون تولیدی از طریق آزمون چشایی بر اساس روش AOAC (۲۳) ارزیابی شد. نمونه‌های زیتون در اختیار ده ارزیاب آموزش دیده قرار گرفت و خصوصیات نمونه‌های تولیدی جهت تعیین میزان پذیرش کلی در قالب آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای (از ۵ برای بسیار خوب تا ۱ برای بسیار بد) تعیین گردید.

### آنالیز آماری نتایج

آنالیز نتایج به روش سطح پاسخ بر اساس طرح مکعب مرکزی با ۳ تکرار در نقطه مرکزی با استفاده از نرم افزار

<sup>۱</sup> Coefficient of variation

<sup>۱</sup> Total Color Difference

<sup>۲</sup> Lack of fit

## ارزیابی تاثیر درصد نمک، pH و دمای نگهداری بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

جدول (۱): تیمارهای اعمال شده در این پژوهش

| تیمار | دمای نگهداری (°C) | درصد نمک | pH   | تیمار | دمای نگهداری (°C) | درصد نمک | pH   |
|-------|-------------------|----------|------|-------|-------------------|----------|------|
| ۱     | ۲۰/۵              | ۶        | ۴/۵  | ۱۰    | ۴                 | ۶        | ۴/۷۵ |
| ۲     | ۲۰/۵              | ۶        | ۴/۷۵ | ۱۱    | ۲۰/۵              | ۲        | ۴/۷۵ |
| ۳     | ۴                 | ۲        | ۴/۵  | ۱۲    | ۴                 | ۲        | ۴    |
| ۴     | ۲۷                | ۶        | ۴/۷۵ | ۱۳    | ۲۷                | ۱۰       | ۴/۵  |
| ۵     | ۲۰/۵              | ۶        | ۴/۷۵ | ۱۴    | ۲۷                | ۲        | ۴/۵  |
| ۶     | ۲۰/۵              | ۶        | ۴    | ۱۵    | ۲۷                | ۲        | ۴    |
| ۷     | ۲۷                | ۱۰       | ۴    | ۱۶    | ۲۰/۵              | ۶        | ۴/۷۵ |
| ۸     | ۴                 | ۱۰       | ۴/۵  | ۱۷    | ۴                 | ۱۰       | ۴    |
| ۹     | ۲۰/۵              | ۱۰       | ۴/۷۵ |       |                   |          |      |

بوده و معیاری از درجه تناسب مدل برازش یافته می‌باشد (۲۶). ارزیابی تناسب تمامی مدل‌های حاصل از پاسخ‌های مذکور، تحت فعالیت دو باکتری *لاکتوباسیلوس پلاتناروم* و *لاکتوباسیلوس برویس* در جداول (۲ و ۳) به اختصار ذکر گردیده است.

علاوه بر این، هرچه مقدار مطلق  $R^2$  بزرگتر و مقدار P کوچکتر باشد نیز میزان معنی‌داری بیشتر خواهد بود (۲۴) و (۲۵). بر این اساس، مدل خطی برای پیشگویی رفتار پاسخ‌ها، مدل مناسبی تعیین گردید البته در مورد صفت ارزیابی حسی، مدل درجه دوم، خصوصیات پذیرش کلی محصول تولیدی را به شکل مناسب‌تری توصیف نمود. در مدل‌های گزینش شده نیز آزمون عدم برازش برای تمام صفات اندازه‌گیری شده، معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ) که در واقع، مبنای تفسیر مناسب روند تغییر داده‌ها توسط مدل‌های انتخابی است. مقادیر ضریب تبیین نیز نشانگر تغییرات توصیف شده توسط مدل به تغییرات کل

جدول (۲): آنالیز ANOVA و تحلیل آمون ضعیف برازش مدل‌های چند متغیره برای هر پاسخ، تحت تاثیر تلفیح لاکتوباسیلوس پلانکتاروم

| Source             | DF | زنده‌مانی باکتری |                |         | شاخص رنگ    |                |         | پذیرش ملی   |                |         |
|--------------------|----|------------------|----------------|---------|-------------|----------------|---------|-------------|----------------|---------|
|                    |    | Coefficient      | Sum of squares | p-Value | Coefficient | Sum of squares | p-Value | Coefficient | Sum of squares | p-Value |
| Model              | 9  | ۷/۹۸             | ۸/۰۹           | ۰/۰۳۹   | ۶/۰۶        | ۱۰۹/۵۲         | ۰/۰۶۰۲  | ۲/۱۷        | ۱/۳۵           | ۰/۰۲۸۳  |
| Linear             |    |                  |                |         |             |                |         |             |                |         |
| X <sub>1</sub>     | ۱  | -۰/۱۷            | ۰/۲۸           | ۰/۳۶۲۶  | -۰/۸۸       | ۷/۷۱           | ۰/۰۳۳۱  | -۰/۰۲۰      | ۰/۰۰۳          | ۰/۰۳۰۲  |
| X <sub>2</sub>     | ۱  | -۰/۵۷            | ۳/۲۱           | ۰/۰۱۳۳  | ۰/۷۶        | ۵/۷۵           | ۰/۰۴۹۵  | -۰/۳۲       | ۱/۰۲           | ۰/۰۴۰۹  |
| X <sub>3</sub>     | ۱  | ۰/۴۲             | ۱/۷۷           | ۰/۰۴۵۲  | ۲/۱۲        | ۴۴/۹۷          | ۰/۰۲۲۱  | ۰/۰۱۲       | ۰/۰۰۸          | ۰/۰۲۸۲  |
| Quadratic          |    |                  |                |         |             |                |         |             |                |         |
| X <sub>11</sub>    | ۱  | ۰/۰۷۹            | ۰/۰۱۷          | ۰/۸۱۹۸  | -۰/۸۳       | ۱/۹۱           | ۰/۰۵۹۱  | ۰/۰۹۳       | ۰/۰۲۳          | ۰/۰۳۳۳  |
| X <sub>22</sub>    | ۱  | ۰/۱۴             | ۰/۰۵۳          | ۰/۰۴۹۸  | -۳/۶۰       | ۳۴/۶۵          | ۰/۰۲۸۸  | -۰/۰۵۶      | ۰/۰۰۸۵         | ۰/۰۸۲۵  |
| X <sub>33</sub>    | ۱  | ۰/۶۵             | ۱/۱۴           | ۰/۰۳۱۸  | ۲/۹۵        | ۲۳/۲۳          | ۰/۰۳۷۵  | -۰/۱۱       | ۰/۰۳۰          | ۰/۰۷۸۲  |
| Interaction        |    |                  |                |         |             |                |         |             |                |         |
| X <sub>12</sub>    | ۱  | -۰/۲۱            | ۰/۳۳           | ۰/۰۲۹۶  | ۰/۶۵        | ۱/۶۳           | ۰/۰۱۰۵  | -۰/۱۵       | ۰/۱۸           | ۰/۰۲۹۲  |
| X <sub>13</sub>    | ۱  | -۰/۱۸            | ۰/۲۷           | ۰/۰۳۶۰  | ۰/۰۲۲       | ۰/۳۹۵۰         | ۰/۰۹۰۵  | ۰/۰۵۰       | ۰/۰۲۰          | ۰/۰۹۷۴  |
| X <sub>23</sub>    | ۱  | ۰/۳۴             | ۰/۸۳           | ۰/۰۴۱۲  | ۰/۰۳۳       | ۰/۸۹۷          | ۰/۰۷۵۸  | -۰/۱۰۰      | ۰/۰۸۰          | ۰/۵۰۷۱  |
| Residual           | ۷  |                  | ۲/۰۹           |         |             | ۱۸۳/۹۳         |         |             | ۱/۱۵           |         |
| Lack of fit        | ۵  |                  | ۱/۱۵           | ۰/۷۷۳۱  |             | ۱۷۶/۸۵         | ۰/۰۸۱۸  |             | ۰/۸۳           | ۰/۵۵۸۹  |
| Pure error         | ۲  |                  | ۰/۹۳           |         |             | ۷/۰۸           |         |             | ۰/۳۲           |         |
| Total              | ۱۶ |                  | ۱۰/۱۸          |         |             | ۲۹۳/۴۵         |         |             | ۲/۵۰           |         |
| R <sup>2</sup>     |    | ۰/۸۹۵۰           |                |         | ۰/۶۷۲۲      |                |         | ۰/۷۴۱۴      |                |         |
| Adj-R <sup>2</sup> |    | ۰/۵۲۳۰           |                |         | ۰/۴۳۲۷      |                |         | ۰/۴۸۸۳      |                |         |
| CV                 |    | ۷/۰۹             |                |         | ۸/۸۶        |                |         | ۱۲/۷۹       |                |         |

## ارزیابی تاثیر درصد نمک، pH و دمای نگهداری بر زندهمانی باکتری های پروبیوتیک

جدول (۳): آنالیز ANOVA و تحلیل آمون ضعیف برازش مدل های چند متغیره برای هر پاسخ، تحت تاثیر تلقیح لاکتوباسیلوس برویس

| Source              | DF | زندهمانی باکتری |                |         | خاصیت رنگ   |                |         | پذیرش کلی   |                |         |
|---------------------|----|-----------------|----------------|---------|-------------|----------------|---------|-------------|----------------|---------|
|                     |    | Coefficient     | Sum of squares | p-Value | Coefficient | Sum of squares | p-Value | Coefficient | Sum of squares | p-Value |
| Model               | 9  | ۷/۷۱            | ۱/۳۳           | ۰/۳۳۷۶  | ۷/۰۲        | ۱۳۹/۱۲         | ۰/۰۵۱۷  | ۲/۹۶        | ۰/۶۹           | ۰/۰۴۰۹  |
| Linear              |    |                 |                |         |             |                |         |             |                |         |
| X <sub>1</sub>      | 1  | -۰/۱۵           | ۰/۲۳           | ۰/۶۸۲۲  | -۱/۸۰       | ۳۲/۳۲          | ۰/۰۵۰۴  | ۰/۰۴۰       | ۰/۰۱۶          | ۰/۰۴۱۴  |
| X <sub>2</sub>      | 1  | ۰/۱۴            | ۰/۱۹           | ۰/۰۲۶۷  | ۱/۱۴        | ۱۲/۹۰          | ۰/۰۷۲۷  | ۰/۱۱        | ۰/۱۲           | ۰/۰۲۱۷  |
| X <sub>3</sub>      | 1  | -۰/۱۴           | ۰/۱۹           | ۰/۱۲۰۲  | ۰/۸۹        | ۷/۹۱           | ۰/۱۱۲۷  | ۰/۰۴۰       | ۰/۰۱۶          | ۰/۰۸۴۲  |
| Quadratic           |    |                 |                |         |             |                |         |             |                |         |
| X <sub>11</sub>     | 1  | ۰/۰۵۶           | ۰/۰۸۲          | ۰/۰۳۳۴  | -۱/۳۸       | ۵/۱۲           | ۰/۰۹۶۲  | ۰/۱۲        | ۰/۰۴۱          | ۰/۰۴۸۸  |
| X <sub>22</sub>     | 1  | -۰/۰۱۴          | ۰/۰۲۶          | ۰/۰۷۳۵  | ۴/۳۶        | ۵/۸۷           | ۰/۱۲۳۸  | -۰/۰۲۶      | ۰/۰۱۸          | ۰/۰۳۹۰  |
| X <sub>33</sub>     | 1  | ۰/۰۹۴           | ۰/۰۲۴          | ۰/۳۱۹۸  | -۲/۹۸       | ۴۲/۵۴          | ۰/۲۵۳۸  | -۰/۰۷۶      | ۰/۰۱۵          | ۰/۱۸۸۹  |
| Interaction         |    |                 |                |         |             |                |         |             |                |         |
| X <sub>12</sub>     | 1  | -۰/۰۷۷          | ۰/۰۹۴          | ۰/۰۴۵۵  | ۰/۲۵        | ۰/۵۲           | ۰/۰۴۳۹  | -۰/۱۲       | ۰/۱۳           | ۰/۰۴۳۷  |
| X <sub>13</sub>     | 1  | ۰/۰۲۴           | ۰/۳۵           | ۰/۰۸۹۸  | -۰/۶۱       | ۲/۹۲           | ۰/۱۸۶۵  | ۰/۱۳        | ۰/۱۳           | ۰/۰۷۳۵  |
| X <sub>23</sub>     | 1  | -۰/۰۲۷          | ۰/۰۳۶          | ۰/۲۷۲۲  | -۰/۹۲       | ۶/۷۱           | ۰/۲۴۵۵  | ۰/۱۸        | ۰/۲۵           | ۰/۰۴۰۹  |
| Residual            | ۷  |                 | ۰/۱۷           |         |             | ۱۶۶/۴۴         |         |             | ۰/۶۲           |         |
| Lack of fit         | ۵  |                 | ۰/۱۶           | ۰/۵۰۴۱  |             | ۴۴/۳۳          | ۰/۹۱۰۵  |             | ۰/۵۴           | ۰/۲۹۰۹  |
| Pure error          | ۲  |                 | ۰/۰۱۲          |         |             | ۷۲/۰۹          |         |             | ۰/۰۸۰          |         |
| Total               | ۱۶ |                 | ۸/۱۴           |         |             | ۲۵۵/۵۶         |         |             | ۱/۳۲           |         |
| R <sup>2</sup>      |    | ۰/۶۹۱۰          |                |         | ۰/۷۳۳       |                |         | ۰/۸۲۶۶      |                |         |
| Adj- R <sup>2</sup> |    | ۰/۵۷۶۰          |                |         | ۰/۶۱۱۰      |                |         | ۰/۵۸۲۰      |                |         |
| CV                  |    | ۸/۳۳            |                |         | ۳/۴۲        |                |         | ۱۰/۰۴       |                |         |

## میزان زندهمانی لاکتوباسیلوس پلانتروم

نتایج حاصل از زندهمانی لاکتوباسیلوس پلانتروم در زیتون تخمیری تحت تیمارهای دمای نگهداری، درصد نمک و pH در جدول (۲) آورده شده است. بر این اساس، تاثیر متغیر مستقل دمای نگهداری به تنهایی بر زندهمانی لاکتوباسیلوس پلانتروم در سطح ۵٪ معنی دار نبود در حالی که تاثیر کاهش درصد نمک با افزایش دمای نگهداری بر میزان زندهمانی باکتری مذکور در زیتون تخمیری به شکل خطی و در سطح ۵٪ معنی دار بود (شکل ۱-الف). همچنین افزایش درصد نمک خصوصاً در pH های بالاتر سبب افزایش معنی دار جمعیت باکتری در زیتون تخمیری گردید (شکل ۱-ب). این در حالی

تجزیه و تحلیل جدول ANOVA حاصل از تلقیح جداگانه دو باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس برویس در پاسخ های مورد ارزیابی در این پژوهش، نشان داد که به ترتیب تاثیر متغیر درصد نمک با تلقیح لاکتوباسیلوس پلانتروم و تاثیر متغیر درجه حرارت با تلقیح لاکتوباسیلوس برویس در سطح ۵٪ معنی دار بوده و به عنوان تیمار مستقل تاثیر گذار در بین سایر تیمارها تعیین گردید. لازم به ذکر است که از نظر آماری، مدلی مناسب است که آزمون ضعیف برازش آن معنی دار نبوده و دارای بالاترین مقدار R<sup>2</sup> adjusted و R<sup>2</sup> predicted باشد.

pH ( $x_1x_3$ )، اثر متقابل درصد نمک با pH ( $x_2x_3$ ) و همچنین اثرات درجه دوم دمای نگهداری ( $x_1^2$ )، درصد نمک ( $x_2^2$ ) و pH ( $x_3^2$ ) بر میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلاتناروم در زیتون تخمیری با ضریب همبستگی  $R^2=0/89$  و ضریب تغییرات 7/09 به دست آمد که با ارزیابی ضعیف برازش، تناسب مدل مذکور نیز تأیید گردید.

معادله (۳)

$$\begin{aligned} &= \text{زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلاتناروم} \\ &7.96 - 0.17 X_1 - 0.57 X_2 + 0.42 X_3 - 0.21 X_1X_2 - 0.18 \\ &X_1X_3 + 0.34 X_2X_3 + 0.079 X_1^2 + 0.14 X_2^2 - 0.65 X_3^2 \end{aligned}$$

معادله (۴)

$$\begin{aligned} &= \text{زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس} \\ &9.15 - 0.017 X_1 - 0.34 X_2 - 0.92 X_3 - 0.011 X_1X_2 + \\ &0.019 X_1X_3 - 0.091 X_2X_3 + 0.002 X_1^2 - 0.08 X_2^2 + 0.16 \\ &X_3^2 \end{aligned}$$

### خصوصیات رنگی محصول تولیدی

آنالیز واریانس تغییرات کلی رنگ سطح زیتون تخمیری با اندازه‌گیری شاخص‌های رنگی اصلی ( $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$ ) پس از تلقیح باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتناروم در جدول (۲) نشان داده شده است. بر این اساس، تأثیر متغیر مستقل دمای نگهداری به تنهایی بر اختلاف کلی رنگ در زیتون تخمیری در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. علاوه بر این، اثر متقابل افزایش محدود درصد نمک با کاهش دمای نگهداری بر میزان شاخص‌های رنگی زیتون تخمیری به شکل درجه دوم و در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (شکل ۳-الف). همچنین تأثیر متغیر مستقل درصد نمک نیز به تنهایی بر اختلاف کلی رنگ در زیتون تخمیری در مدل خطی در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. اثر متقابل درصد نمک و pH نیز بر روی برآیند تغییرات کلی رنگ تأثیرگذار بود ولی تغییرات مذکور در سطح  $P>0/05$  معنی‌دار نبود. بیشترین مقدار تغییرات رنگ در زیتون تخمیری نیز با افزایش pH و کاهش درصد نمک مشاهده گردید (شکل ۳-ج) در حالی که تأثیر مستقل دمای نگهداری در تشدید رنگ زیتون، معنی‌دار نبود.

است که اثر متقابل کاهش دمای نگهداری با افزایش مقادیر pH سبب افزایش زنده‌مانی این باکتری شد ولی این افزایش در سطح ۵٪ معنی‌دار نبود (شکل ۱-ج). بر اساس نتایج جدول (۲)، معنی‌داری تأثیر درصد نمک بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلاتناروم با افزایش دمای نگهداری و همچنین افزایش pH در سطح  $P<0/05$  تأیید گردید. نهایتاً مدل چند متغیره درجه دوم معادله (۳) جهت پیش‌بینی اثر متغیرهای مستقل دمای نگهداری ( $x_1$ )، درصد نمک ( $x_2$ )، pH ( $x_3$ ) و همچنین اثر متقابل دمای نگهداری با درصد نمک ( $x_1x_2$ )، اثر متقابل دمای نگهداری با

### میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس

نتایج حاصل از زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس در زیتون تخمیری تحت تیمارهای دمای نگهداری، درصد نمک و pH در جدول (۳) آورده شده است. اثر متقابل افزایش دمای نگهداری با کاهش درصد نمک بر میزان زنده‌مانی باکتری مذکور در زیتون تخمیری به شکل درجه دوم و در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (شکل ۲-الف). همچنین کاهش درصد نمک خصوصاً در pH‌های بالاتر سبب افزایش جمعیت این باکتری در زیتون تخمیری شد در حالی که این افزایش از لحاظ آماری، معنی‌دار نبود (شکل ۲-ب). این در حالی است که اثر متقابل کاهش دما با افزایش مقادیر pH نیز سبب افزایش زنده‌مانی باکتری مذکور گردید که البته این افزایش در سطح ۵٪ معنی‌دار نبود (شکل ۲-ج).

بر اساس نتایج جدول (۳)، معنی‌دار بودن تأثیر درصد نمک بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس با دمای نگهداری در سطح  $P<0/05$  تأیید گردید. نهایتاً مدل چند متغیره درجه دوم معادله (۴) جهت پیش‌بینی اثر متغیرهای مستقل، اثرات متقابل و اثرات درجه دوم آن‌ها بر میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس در زیتون تخمیری با ضریب همبستگی  $R^2=0/69$  و ضریب تغییرات ۸/۳۳ به دست آمد.



ارزیابی تاثیر درصد نمک، pH و دمای نگهداری بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

معادله (۵)

= اختلاف کلی رنگ (پلاتاروم)

$$6.06 - 0.88 X_1 + 0.76 X_2 + 2.12 X_3 + 0.45 X_1 X_2 + - 3.60 X_2^2 + 2.95 0.022 X_1 X_3 - 0.033 X_2 X_3 - 0.84 X_1^2 X_3^2$$

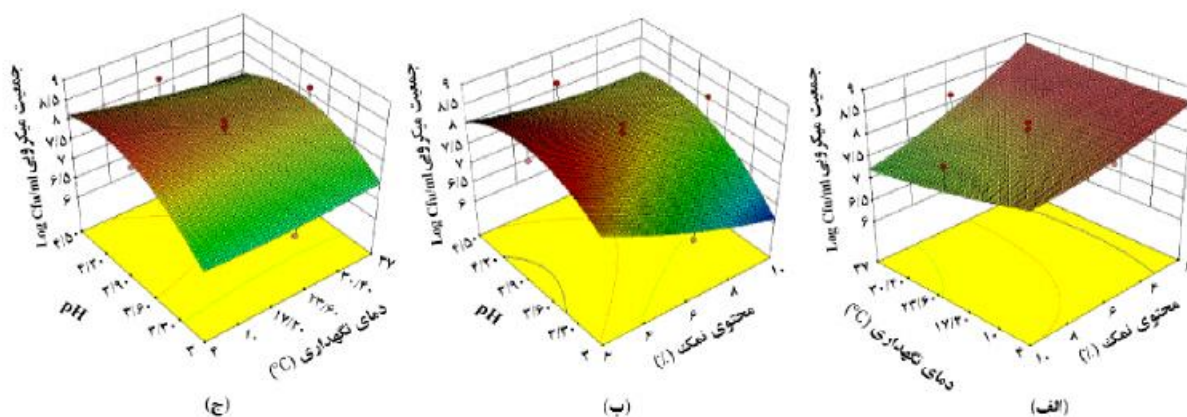
(شکل ۳-ب). بر این اساس، مدل چند متغیره درجه دوم معادله

(۵) جهت پیش‌بینی اثر متغیرهای مستقل، اثرات متقابل و اثرات

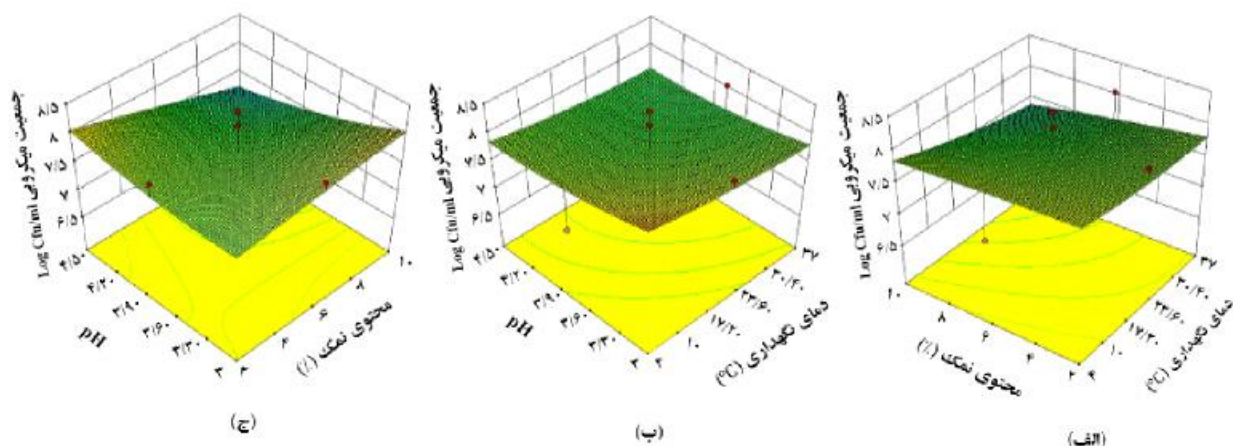
درجه دوم آنها بر اختلاف کلی رنگ زیتون تلقیح شده با

باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتاروم با ضریب همبستگی

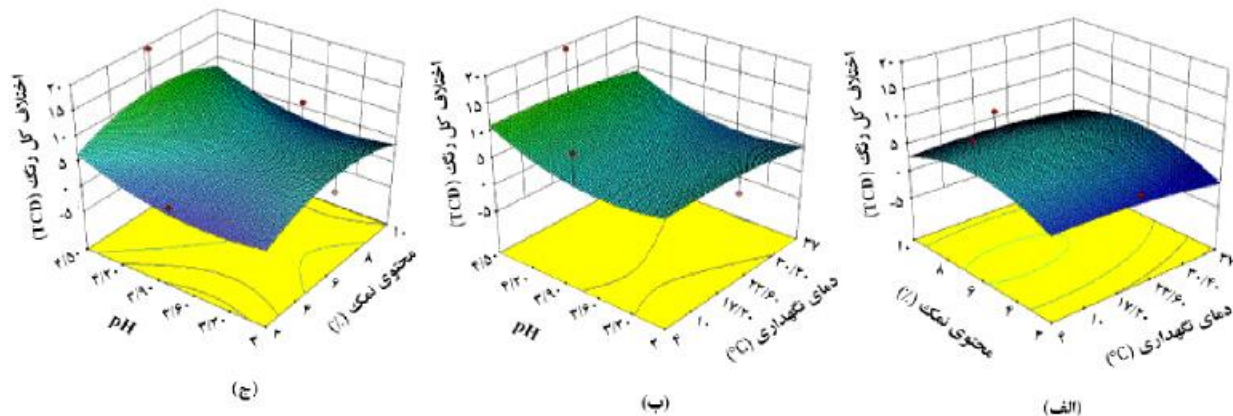
$R^2=0.77$  و ضریب تغییرات ۸/۸۶ به دست آمد.



شکل (۱): زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلاتاروم در زیتون تخمیری تحت تاثیر pH محتوی نمک و دمای نگهداری.



شکل (۲): زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پرویس در زیتون تخمیری تحت تاثیر pH محتوی نمک و دمای نگهداری.



شکل (۳): اختلاف کلی رنگ زیتون پس از تلقیح لاکتوباسیلوس پلانناروم تحت تاثیر pH محتوی نمک و دمای نگهداری.

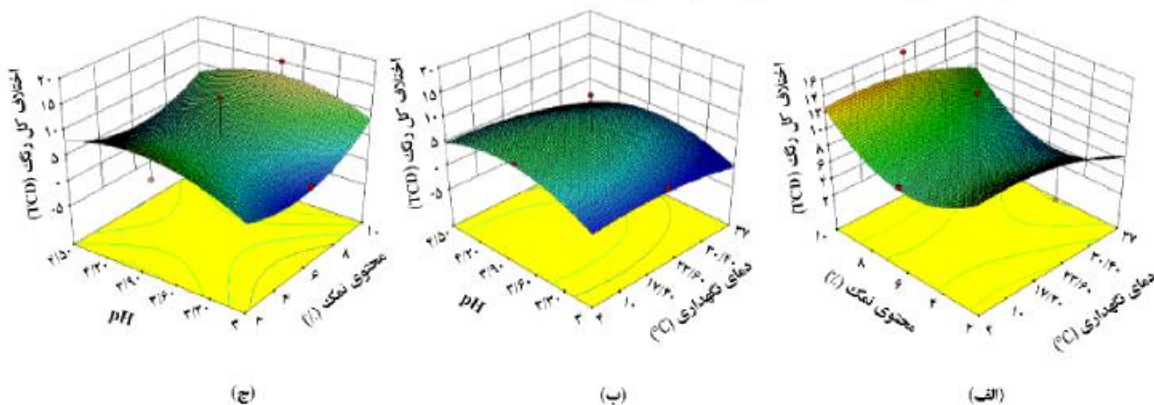
با افزایش درصد نمک و همچنین افزایش محدود pH در شاخص رنگی افزایش مشاهده گردید (شکل ۴-ج). بر این اساس، مدل چند متغیره درجه دوم معادله (۶) جهت پیش‌بینی اثر متغیرهای مستقل، اثرات متقابل و اثرات درجه دوم آن‌ها بر اختلاف کلی رنگ زیتون تلقیح شده با باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس با ضریب همبستگی  $R^2=0.74$  و ضریب تغییرات ۴/۴۲ به دست آمد.

معادله (۶)

= اختلاف کلی رنگ (برویس)

$$7.02 - 1.80 X_1 + 1.14 X_2 + 0.89 X_3 + 0.25 X_1 X_2 - 0.61 X_1 X_3 - 0.92 X_2 X_3 - 1.38 X_1^2 - 4.36 X_2^2 - 3.98 X_3^2$$

تاثیر متغیرهای مورد بررسی بر شاخص تغییرات کلی رنگ زیتون پس از تلقیح باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس در جدول (۴) با بررسی عدم معنی‌داری در ارزیابی ضعف برازش مدل تعیین گردید. بر این اساس، تاثیر متغیر مستقل دمای نگهداری به تنهایی بر اختلاف کلی رنگ زیتون تخمیری در سطح ۵٪ معنی‌دار نبود ولی اثر متقابل افزایش درصد نمک با کاهش دمای نگهداری بر میزان شاخص‌های رنگی زیتون تخمیری با تلقیح لاکتوباسیلوس برویس به شکل درجه دوم و در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (شکل ۴-الف). تاثیر مستقل pH نیز بر این ویژگی، معنی‌دار نبود و با افزایش pH و کاهش دمای نگهداری در تشدید برآیند رنگ زیتون نقشی نداشت (شکل ۴-ب). علاوه بر این، اثر متقابل درصد نمک و pH نیز در سطح  $(P>0.05)$  معنی‌دار نبود ولی



شکل (۴): اختلاف کلی رنگ زیتون پس از تلقیح لاکتوباسیلوس برویس تحت تاثیر pH محتوی نمک و دمای نگهداری.

ارزیابی تاثیر درصد نمک، pH و دمای نگهداری بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

بررسی پذیرش کلی زیتون تولیدی با باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برویس نیز نشان داد که تاثیر متغیرهای مستقل دمای نگهداری و محتوی درصد نمک به تنهایی بر پذیرش کلی محصول در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۳). علاوه بر این، اثر متقابل افزایش درصد نمک با افزایش محدود دمای نگهداری بر میزان پذیرش کلی محصول تولیدی با لاکتوباسیلوس برویس به شکل درجه دوم و در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (شکل ۶-الف). همچنین اثر متقابل pH با دمای نگهداری، معنی‌دار نبود ( $P < 0.05$ )، ولی افزایش pH و افزایش دمای نگهداری در تشدید امتیاز پذیرش کلی موثر بود (شکل ۶-ب). علاوه بر این، اثر متقابل درصد نمک با pH نیز معنی‌دار نبود، اما با افزایش درصد نمک و افزایش محدود pH در شاخص پذیرش کلی محصول، افزایش مشاهده گردید (شکل ۶-ج). نهایتاً مدل چند متغیره درجه دوم معادله (۸) جهت پیش‌بینی اثر متغیرهای مستقل، اثرات متقابل و اثرات درجه دوم آن‌ها بر پذیرش کلی زیتون تلقیح شده با لاکتوباسیلوس برویس با ضریب همبستگی  $R^2 = 0.82$  و ضریب تغییرات ۱۰/۰۴ به دست آمد.

معادله (۸)

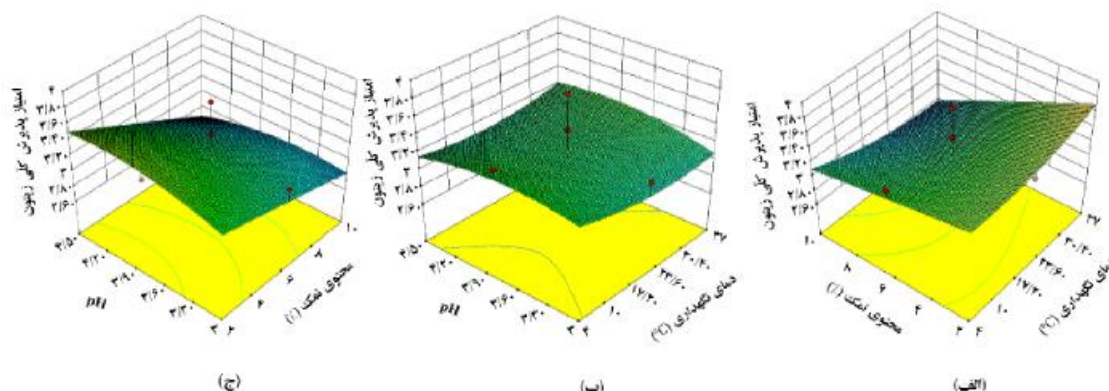
= ارزیابی پذیرش کلی (برویس)

$$2.96 + 0.04 X_1 + 0.11 X_2 + 0.04 X_3 - 0.13 X_1 X_2 + 0.12 X_1 X_3 + 0.17 X_2 X_3 + 0.12 X_1^2 - 0.026 X_2^2 - 0.076 X_3^2$$

معادله (۷)

= ارزیابی پذیرش کلی (پلانتاروم)

$$3.17 - 0.02 X_1 - 0.32 X_2 + 0.02 X_3 - 0.15 X_1 X_2 + 0.05 X_1 X_3 - 0.1 X_2 X_3 + 0.094 X_1^2 - 0.056 X_2^2 - 0.11 X_3^2$$

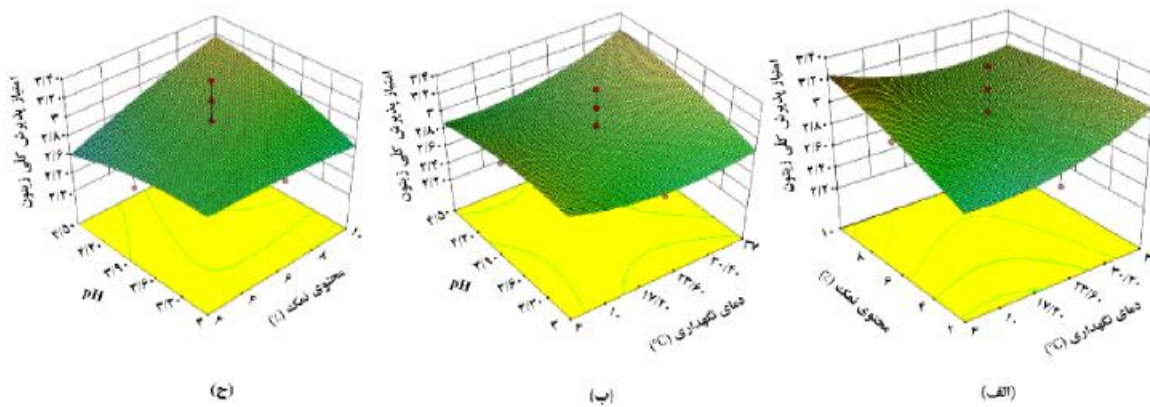


شکل (۵): ارزیابی پذیرش کلی زیتون تخمیری پس از تلقیح لاکتوباسیلوس پلانتاروم تحت تاثیر pH، محتوی نمک و دمای نگهداری.

**ارزیابی رابطه بین پاسخ‌های مورد مطالعه با متغیرهای مستقل**

نتایج همبستگی (روابط رگرسیونی) بین پاسخ‌های مورد بررسی تحت تاثیر متغیرهای مستقل دمای نگهداری، درصد نمک و pH در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین مقدار همبستگی بین پذیرش کلی زیتون تلقیح شده با لاکتوباسیلوس برویس و زنده‌مائی لاکتوباسیلوس برویس

(۰/۸۰۱۱) و همچنین کمترین مقدار همبستگی بین شاخص کلی رنگ زیتون تلقیح شده با لاکتوباسیلوس برویس و زنده‌مائی لاکتوباسیلوس پلانتروم (۰/۴۲۲۳) وجود داشت. به منظور ارزیابی صحت روابط همبستگی بین پاسخ‌های مورد بررسی نیز آزمون ضعف برازش، مقادیر  $R^2$  predicted و  $R^2$  adjusted در نهایت VIF کنترل گردید تا مطلوب‌ترین مدل متناسب با داده‌های پاسخ به دست آید.



شکل (۶): ارزیابی پذیرش کلی زیتون تخمیری پس از تلقیح لاکتوباسیلوس برویس تحت تاثیر pH محتوی نمک و دمای نگهداری.

جدول (۴): بررسی روابط رگرسیونی بین پاسخ‌های ارزیابی شده در این پژوهش

| متغیرها                              | زنده‌مائی لاکتوباسیلوس پلانتروم | زنده‌مائی لاکتوباسیلوس برویس | شاخص کلی رنگ (لاکتوباسیلوس برویس) | شاخص کلی رنگ (پلانتروم) | پذیرش کلی (لاکتوباسیلوس برویس) | پذیرش کلی (پلانتروم) |
|--------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------|
| زنده‌مائی لاکتوباسیلوس پلانتروم      | ۱                               |                              |                                   |                         |                                |                      |
| زنده‌مائی لاکتوباسیلوس برویس         | ۰/۷۷۹۰                          | ۱                            |                                   |                         |                                |                      |
| شاخص کلی رنگ (لاکتوباسیلوس پلانتروم) | ۰/۶۲۰۳                          | ۰/۵۳۱۱                       | ۱                                 |                         |                                |                      |
| شاخص کلی رنگ (لاکتوباسیلوس برویس)    | ۰/۴۲۲۳                          | ۰/۷۳۷۶                       | ۰/۵۰۲۲                            | ۱                       |                                |                      |
| پذیرش کلی (لاکتوباسیلوس پلانتروم)    | ۰/۷۶۸۳                          | ۰/۵۲۱۲                       | ۰/۷۸۳۸                            | ۰/۷۳۹۲                  | ۱                              |                      |
| پذیرش کلی (لاکتوباسیلوس برویس)       | ۰/۵۱۸۱                          | ۰/۸۰۱۱                       | ۰/۶۸۱۴                            | ۰/۷۱۱۱                  | ۰/۷۳۹۲                         | ۱                    |

ارزیابی تاثیر درصد نمک، pH و دمای نگهداری بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

## بحث و نتیجه‌گیری

زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در طی فرآوری و نگهداری فرآورده‌های پروبیوتیک تا قبل از مصرف این محصولات از اهمیت زیادی برخوردار بوده و به جز اثربخشی فرآورده بر ویژگی‌های کیفی محصول تولیدی نیز موثر است (۳). با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش نیز معنی‌داری تاثیر درصد نمک بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانٹاروم با افزایش دمای نگهداری و همچنین افزایش pH در زیتون تخمیری تایید گردید. همچنین اثر متقابل افزایش دمای نگهداری با کاهش درصد نمک بر میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس به شکل درجه دوم و در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. علاوه بر این، مدل چند متغیره درجه دوم جهت پیش‌بینی اثر متغیرهای مستقل، اثرات متقابل و اثرات درجه دوم آنها بر زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و لاکتوباسیلوس برویس و همچنین شاخص‌های کیفی زیتون تلقیح شده با باکتری‌های پروبیوتیک مذکور با ضریب همبستگی مناسبی به دست آمد.

پژوهشگران با بررسی تاثیر لاکتوباسیلوس پلانٹاروم در فرآوری زیتون تخمیری، ضمن پایش بقاء باکتری مذکور در آب نمک و با توجه به نقش آن در مهار فعالیت میکروارگانیسم‌های ناخواسته، همچنین تجزیه الترویین و تلخی‌زدایی از زیتون دریافتند که با افزایش جمعیت این باکتری‌ها طی تخمیر کنترل شده می‌توان ارزش پروبیوتیکی محصول تولیدی و همچنین ویژگی‌های حسی آن نظیر رنگ، طعم و بافت را ارتقاء بخشید (۱۰). براساس نتایج سلامی و همکاران نیز تغییرات خلطت نمک در فرآوری زیتون تخمیری به دلیل تاثیر بر تبادل یونی بین میوه زیتون و آب نمک و همچنین به موازات کاهش pH به واسطه مصرف ترکیبات قندی آزاد شده از میوه توسط باکتری و افزایش تولید اسید در طی تخمیر، به شکل معنی‌داری بر پایداری و زنده‌مانی

لاکتوباسیلوس پلانٹاروم تلقیح شده به زیتون موثر بود (۹). کویتشانا<sup>۱</sup> و همکاران نیز نشان دادند که لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و لاکتوباسیلوس برویس جدا شده از زیتون تخمیری، قابلیت تحمل به خلطت بالای نمک ۵/۲٪ و کاهش دمای نگهداری تا ۹°C را داشتند. علاوه بر این، افزایش دمای نگهداری با کاهش درصد نمک بر میزان زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس برویس در زیتون تخمیری به شکل درجه دوم و در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (۲).

دی‌یلز<sup>۲</sup> و همکاران نیز گزارش کردند که هنگام استفاده از سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازلی<sup>۳</sup> IMPC2.1<sup>۳</sup> به عنوان کشت آغازگر در فرآوری زیتون تخمیری با کاهش خلطت آب نمک از ۸٪ تا ۴٪ و افزایش دمای نگهداری از ۴ تا ۲۵°C، سویه پروبیوتیک مذکور در سطح زیتون تخمیری غالب گردید و کاهش pH آب نمک در انتهای تخمیر نیز در بقای این باکتری پروبیوتیک در سطح  $P < 0.05$  موثر بود (۶). این نتایج با نتایج حاصل از پژوهش حاضر که تاثیر کاهش درصد نمک با افزایش دمای نگهداری بر میزان زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در زیتون تخمیری به شکل خطی و در سطح ۵٪ معنی‌دار بود، مطابقت داشت.

در مورد شاخص رنگی پوسته زیتون، نتایج حاصل از پژوهش جهانبخشیان و همدی (۱۳۸۷) بر روی ویژگی‌های کیفی و خصوصیات کلی رنگ پوسته زیتون نشان داد که در زیتون‌های فرایند شده، افزایش دما و زمان نگهداری به طور معنی‌داری سبب کاهش میزان رنگ سبز (فاکتور a<sup>\*</sup>)، افزایش رنگ زرد (فاکتور b<sup>\*</sup>)، کاهش میزان روشنایی (فاکتور L<sup>\*</sup>) و در نهایت سبب کاهش اختلاف کلی رنگ در پوسته زیتون می‌گردد (۲۷) که نتایج مذکور نیز با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت داشت. در پژوهش سلامی و همکاران، تلقیح لاکتوباسیلوس پلانٹاروم به زیتون‌های تخمیری در تمام تیمارهای مورد بررسی، بافت، مزه و پذیرش کلی محصول

<sup>3</sup> *Lactobacillus paracasei*

<sup>1</sup> Quintana

<sup>2</sup> De Bellis

حتی در بین سوره‌های مختلف یک گونه نیز کاملا متفاوت است. عواملی نظیر اثر محافظتی ماتریکس ماده غذایی و اثر فعالیت هیدرولیزی املاح موجود نیز در افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به نمک تأثیرگذار هستند. مسلماً فعالیت متابولیکی این باکتری‌ها نیز بر خصوصیات کیفی فرآورده پروبیوتیک تولیدی تأثیر خواهد گذاشت (۵ و ۳۱).

رویکرد جدید صنعت غذا در راستای تولید فرآورده‌های تخمیری غیر لبنی با توزیع مناسب از باکتری‌های پروبیوتیک، سبب جلب توجه بیشتر به محصولات فراسودمند و فرآورده‌های فاقد کلسترول نظیر زیتون تخمیری شده است. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس برویس در زیتون، تحت تأثیر متغیرهای فرآوری نظیر دمای نگهداری، درصد نمک و pH قرار می‌گیرد که راهکار مناسب ارزیابی اثرات متقابل این متغیرها استفاده از روش‌هایی همچون سطح پاسخ می‌باشد. علاوه بر این، شاخص کلی رنگ و پذیرش کلی زیتون تولیدی نیز با زنده‌مانی این باکتری‌های پروبیوتیک تحت تأثیر متغیرهای فرایند ارتباط دارد و لازمه تولید محصول با کیفیت بالا از زیتون تخمیری پروبیوتیک، کنترل و ارزیابی اثرات متقابل این متغیرها است. از نتایج پژوهش حاضر و تلقیح باکتری‌های پروبیوتیک، تحت تیمارهای مورد مطالعه در این پژوهش می‌توان برای تولید زیتون تخمیری پروبیوتیک در فرآوری صنعتی استفاده نمود.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسئولین شرکت دانش بنیان "زیست فناوران غذای فرا سودمند" مستقر در مرکز رشد واحدهای فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که تامین هزینه‌های اجرای این پژوهش را بر عهده داشتند، قدردانی می‌گردد.

نهایی را به طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای تلقیح نشده با این کشت آغازگر بهبود بخشید (۹). طبق پژوهش‌های فرناندز دیز<sup>۱</sup> با افزایش فعالیت سوره‌های پروبیوتیک در زیتون تخمیری، سرعت مصرف قند احیاکننده افزایش یافته و در نهایت تأثیر مستقیمی بر روی ارزیابی‌های حسی محصول تولیدی می‌گذارد (۲۸). به طور کلی، رشد سوره‌های تولیدکننده اسید (لاکتیک و استیک) در زیتون تخمیری از سایر میوه‌ها کمتر است زیرا نفوذ قند از بافت زیتون، کندتر صورت می‌گیرد البته در میوه‌های رسیده عموماً رشد سوره لاکتیکی به دلیل قابلیت نفوذ پوسته میوه نسبت به مواد مغذی تسهیل می‌شود (۲۸ و ۲۹). گارسیا گارسیا<sup>۲</sup> و کورتانا نیز دریافتند که تخمیر زیتون در حضور سوره‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس برویس در آب نمک، با تولید اسید لاکتیک و اسید استیک و افزایش اسیدیته قابل تیر، منجر به ایجاد آرومای ملایم و مناسب و همچنین افزایش پذیرش کلی محصول می‌گردد (۳۰).

استفاده توام از pH اسیدی به همراه نمک در فرآوری زیتون تخمیری به عنوان یک هاردل شناخته شده، نقش مهمی در سلامت میکروبی این محصول و تولید یک فرآورده با کیفیت ایفا می‌نماید. البته علاوه بر pH و محتوی نمک، کنترل دمای نگهداری نیز عموماً باید در فرآوری زیتون تخمیری مدنظر قرار گیرد. مسلماً زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در چنین شرایطی، اطمینان از تولید فرآورده پروبیوتیک را طی تنش‌های رخ داده در حین فرآوری آن تضمین خواهد نمود که خود مستلزم ارزیابی تأثیر توام این عوامل (pH محتوی نمک و دمای نگهداری) بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک و همچنین خصوصیات کیفی فرآورده تولیدی است. مقاومت بالایی بعضی از این باکتری‌ها نسبت به pH پایین می‌تواند به علت تولید ترکیباتی مانند پلی‌ساکاریدها باشد که از اثر اسید بر روی غشای سلولی آنها ممانعت می‌کند. توانایی مقاومت و تحمل نمک نیز نه تنها به گونه باکتری بستگی داشته که

<sup>2</sup> Garcia Garcia

<sup>1</sup> Fernandez Diez

12. Arroyo FN, Garrido Fernandez A. Evaluation of primary models to describe the growth of *Pichia anomala* and study of temperature, NaCl, and pH effects on its biological parameters by response surface methodology. *Journal of Food Protection*, 2005; 68(3): 562-570.
13. Hurtado S, Cuellar M, Guillermo-Wann C, Velasco P. Empirically defining validation, sense of belonging, and navigational actions for students in diverse institutions: The diverse learning environments survey. In 50th annual forum for the association for institutional research. 2010; May 31, Chicago, USA. 44.
14. Hurtado A, Reguant C, Bordons A, Rozes N. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*, 2012; 31(1): 1-8.
- ۱۵- میلانی، حسینی ف، زائرزاده، ا، گلی موحد غ، توکلی ا. بهینه‌سازی شرایط استخراج اینولین از ریشه بابا آدم به کمک روش سطح پاسخ (RSM). فصلنامه گیاهان دارویی. ۱۳۹۱؛ ۱ (A): ۱۴۹-۱۵۸.
16. Ngoc HO, Minh UT, Tran LT, Dinh AQ, Nguyen AT. Response surface optimization of ethanolic extraction of antioxidant from artichoke leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2014; 39(6): 1036-1044.
- ۱۷- استاندارد ملی ایران. فرآوری زیتون تخمیری و روش‌های آزمون. ۱۳۷۱؛ شماره استاندارد ۹۸۷.
- ۱۸- صادقی ع، ابراهیمی م. جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌های غالب در خمیرترش آرد کامل گندم. مجله دنیای میکروب‌ها، ۱۳۹۵؛ ۲ (۲۷): ۱۴۴-۱۳۳.
19. Dalbello F, Clarke CI, Ryan LAM, Ulmer H, Schober TJ, Strom K, Sjogren J, van Sinderen D, Schmurer J, Arendt EK. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science*, 2007; 45(3): 309-318.
20. Lavermicocca P, Valerio F, Lonigro SL, De Angelis M, Morelli L, Callegari ML, Visconti A. Study of adhesion and survival of *lactobacilli* and *bifidobacteria* on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005; 71(8): 4233-4240.
21. Sun DW, Zheng C, Zheng L. Recent developments and applications of image features for food quality evaluation and inspection. *Journal of*

## منابع

- ۱- میرنظامی خسیابری س.ح. خواص درمانی زیتون. ۱۳۷۷؛ تهران. انتشارات دانش نگار. چاپ اول، ۱۴۷ ص.
2. Quintana MD, Garcia PG, Fernandez AG. Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 1999; 51(2): 133-143.
3. Saxelin M, Grenov B, Svensson U, Fonden R, Reniero R, Mattila-Sandholm T. The technology of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 1999; 10(12): 387-392.
4. Hating AL, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 2001; 11(2): 1-17.
5. Panagou EZ, Schillinger U, Franz CM, Nychas GJE. Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 2008; 25(2): 348-358.
6. De Bellis P, Valerio F, Sisto A, Lonigro SL, Lavermicocca P. Probiotic table olives: microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant. *International Journal of Food Microbiology*, 2010; 140(1): 6-13.
7. Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella SS, Webb C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2002; 79(1): 131-141.
8. Sabatini N. Recent patents concerning organoleptic and healthy properties of table olives. *Recent Patents on Chemical Engineering*, 2009; 2(1): 37-42.
- ۹- سلامی ف، راشدی م، مهدیان ناصر ح. استفاده از لاکتوباسیلوس پلانٹاروم به عنوان کشت آغازگر در پروسه تخمیر زیتون سبز با شرایط هوادهی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۱۳۹۰؛ ۸ (۲۸): ۹۹-۱۰۶.
10. Lavermicocca P, Valerio F, Lonigro SL, Baruzzi F, Morea M, Gobetti M. Olive fermentations using lactic acid bacteria isolated from olive phylloplane and olive brines. 4th international symposium on olive growing. 2002; September 25-30, Valenzano, Italy. 621-624.
11. Cardinal MJ, Mghrons J. *Lactococcus Lactis* strain producing inhibitory activity against *Listeria*. *Food Biotechnology*, 2000; 11(6): 129-146.

- ۲۷- جهانبخشیان ن، همدی ن. اثر دما و زمان فرایند حرارتی بر خواص کیفی کنسرو زیتون سبز. هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی. پژوهشکده علوم و صنایع غذایی ۲۴-۲۵ مهرماه ۱۳۸۷، مشهد.
28. Fernandez Diez MJ. Olives. In: Reed G. Food and feed production with microorganisms. 1<sup>st</sup> ed. 1983; Vom Handler, Germany. Bewertungen Deerfield Beach, 379-397.
29. Bobillo M, Marshall VM. Effect of salt and culture aeration on lactate and acetate production by *Lactobacillus plantarum*. Food Microbiology, 1991; 8(2): 153-160.
30. Garcia Garcia P, Quintana MC. Fermentation de aceitunas negras maduras en salmuera. Grasas Aceites, 1985; 36(1): 14-20 [in Spanish].
31. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 2000; 84(3): 197-215.
- Food Science and Technology, 2006; 17(12): 642-655.
22. Dadali G, Demirhan E, Ozbek B. Color change kinetics of spinach undergoing microwave drying. Drying Technology, 2007; 25(10): 1713-1723.
23. AOAC Method. Association of official analytical chemists. 17th ed. 2003; Arlington, Virginia.
24. Myers RH, Montgomery DC. Process and product optimization using designed experiments. In: Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM, editors. Response surface methodology. 2<sup>nd</sup> ed. 2002; New York, Wiley Pub Inc; 51-83.
25. Atkinson GM, Boore DM. Empirical ground-motion relations for subduction-zone earthquakes and their application to cascadia and other regions. Bulletin of the Seismological Society of America, 2003; 93(4): 1703-1729.
26. Gharibzadeh SMT, Razavi SH, Mousavi SM. Developing an emulsion model system containing canthaxanthin biosynthesized by *Dietzia natronolimnsea* HS-1. International Journal of Biological Macromolecules, 2012; 51(4): 618-626.



ارزیابی تاثیر درصد نمک، pH و دمای نگهداری بر زندهمانی باکتری‌های پروبیوتیک

## Evaluating the effect of salt percentage, pH and storage temperature on survival of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* probiotic bacteria and qualitative properties of fermented olive by response surface methodology

Abbas Abedfar<sup>1</sup>, Maryam Ebrahimi<sup>2</sup>, Allreza Sadeghi<sup>\*3</sup>, Aliakbar Gholamhosseinpour<sup>4</sup>

1. Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran (\*Corresponding author)
4. Department of Food Science and Technology, Jahrom University, Jahrom, Iran

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* probiotic bacteria and also investigating the qualitative characteristics of fermented olive, under influence of salt percentage (2-10), pH (3-4.5) and preservation temperature (4-37 °C), by response surface methodology for determination the optimum level of mentioned treatments in processing of probiotic fermented olive with high acceptability. After implementation of these treatments, significant effect ( $P<0.05$ ) of salt percentage on survival of *L. plantarum* by increasing of preservation temperature and pH was clarified. Interaction of preservation temperature increasing by salt percentage decreasing on survival of *L. brevis* was also significant ( $P<0.05$ ) in second order model. Interaction of salt percentage increasing by preservation temperature decreasing on color properties of fermented olive was significant ( $P<0.05$ ) in second order model, too. By considering the results of this study, correlation between survival of probiotic bacteria and processing variables was observed. Furthermore, qualitative properties of fermented olive was correlated with survival of inoculated probiotic bacteria under influence of processing parameters and so on, for production high quality probiotic fermented olive, control of interaction of these variables during of processing is necessary.

**Keywords:** Fermented olive, Probiotic bacteria, Response surface methodology.

---

\* Sadeghi.gau@gmail.com