امکان کاهش رشد باسیلوس سرئوس در تمپه جو دوسر توسط تخمیر همزمان استارترهای مختلف اسید لاکتیک باکتری‌ها و رایزوپوس اولیگوسپوروس

زهره دیدار[a]*

[a] *استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، گروه علوم و صنایع غذایی، نیشابور، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۵/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۷/۲

چکیده

مقدمه: تمپه محصول تخمیری سویا توسط قارچ است. مصرف این محصول به خصوص از طرف افراد با تغذیه سبزیجات بسیار مورد توجه و استقبال قرار گرفته است. علت این امر ویژگیهای تغذیه ای این محصول است. تمپه منبع غنی از پروتئین است (۱۹٪) و جزء محدود غذاهای گیاهی است که حاوی ویتامین B۱۲ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تهیه تمپه با استفاده از تخمیر جو دوسر توسط رایزوپوس اولیگوسپوروس PTCC ۵۲۸۷ با جمعیت تقریبی 10^4 CFU/g صورت گرفت. اسیدیفیکاسیون بیولوژیکی توسط تلقیح گونه‌های استرپتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس و اسیدیفیکاسیون شیمیایی توسط افزودن میزان ۵ml/۱۰۰g سرکه صورت پذیرفت. باکتری باسیلوس سرئوس نیز که از تمپه ایزوله شده بود به میزان 10^5 CFU/g تلقیح گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تخمیر همزمان استارترهای اسید لاکتیک باکتری‌ها و کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس سبب کاهش رشد کپک می‌گردد (p<۱٪). بیشترین تأثیر مربوط به تمپه تلقیح شده با گونه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس و لاکتوکوکوس کرموریس و نیز اسیدی شده توسط سرکه است. بیشترین میزان ارگوسترول و طول هیف مربوط به نمونه اسیدی نشده بود.

نتیجه‌گیری: اسیدیفیکاسیون بیولوژیکی و شیمیایی سبب کاهش رشد باسیلوس سرئوس نسبت به نمونه اسیدی نشده می‌گردد. بیشترین کاهش رشد این باکتری در نمونه‌های تهیه شده توسط استارتر لاکتوکوکوس لاکتیس و لاکتوکوکوس کرموریس و سرکه مشاهده گردید. در تمام تیمارها تمپه با کیفیت مناسب تهیه شد.

واژه‌های کلیدی: *اسید لاکتیک باکتری‌ها، باسیلوس سرئوس، تمپه، جو دوسر*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: z_didar57@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

افزایش جمعیت نیاز به تبدیل دانه‌های غلات و حبوبات به غذاهای مورد نیاز برای انسان را که در حال حاضر بیشتر به مصرف خوراک دام می‌رسد افزایش داده است. تبدیل گیاهان به غذای انسان انرژی کمتری نسبت به تولید گوشت نیاز دارد (تولید گوشت ۱۱ برابر انرژی بیشتر نسبت به تولید گیاهان نیاز دارد) (Pimentel *et al*., 2003). علاوه بر این، مصرف غذاهای گیاهی مانند دانه‌ها و حبوبات سبب کاهش هزینه‌ها می‌شود و برای سلامت انسان نیز مفید است (Marquart *et al*., 2003). تمپه یکی از غذاهای تخمیری سنتی است که در سرتاسر جهان مورد توجه قرار گرفته است. فواید مصرف تمپه سویا شامل میزان پروتئین بالا، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها و املاح، ایزوفلاون‌ها و فیبر آن است. گزارشاتی مبنی بر مصرف پروتئین سویا در کاهش خطر بیماری‌های قلبی (Krumhar & Carleton, 2005) پوکی استخوان (Messina, 2000)، سرطان (Badger, 2005)، ناراحتی‌های گوارشی و کاهش وزن منتشر شده است.

معمولا جهت تهیه تمپه از دانه‌های سویا به عنوان ماده خام استفاده می‌شود، اما برخی دیگر از سوبستراها را نیز می‌توان برای تهیه تمپه به کار برد.

جو دوسر (*Avena sativa*) دارای حدود ۱۱/۵٪ پروتئین، ۵/۵٪ روغن، ۴۸٪ کربوهیدرات، ۳۲٪ فیبر و ۳٪ خاکستر است. همچنین دارای املاحی مانند سدیم، پتاسیم، منیزیم، فسفر، آهن، مس، روی و منگنز است (بیشترین مقدار مربوط به پتاسیم، فسفر، منیزیم و کلسیم است). فیبر موجود در این محصول حائز اهمیت است زیرا فیبر محلول ترکیب مهمی در کاهش کلسترول محسوب می‌شود. بتاگلوکان موجود در این محصول نقش مهمی در کنترل دیابت دارد.

از رایجترین میکروارگانیسم‌های عامل فساد تمپه، باسیلوس سرئوس می‌باشد. باسیلوس سرئوس باسیل گرم مثبت، اسپورزا، هوازی بی‌هوازی اختیاری، معمولا متحرک و مقاوم به پنی سیلین می‌باشد. باسیلوس سرئوس یکی از علل مسمومیت غذایی می‌باشد. دو نوع بیماری در رابطه با مصرف موادغذایی آلوده به باسیلوس سرئوس نسبت داده می‌شود. نوع اول و شناخته شده تر آن با درد شکمی، اسهال و دوره نهفتگی ۴ تا ۶ ساعته مشخص می‌گردد و علائم آن ۱۲ تا ۲۴ ساعت بطول می‌انجامد. نوع دوم که با حملات حاد تهوع و استفراغ مشخص می‌گردد در زمان بین ۱ تا ۵ ساعت پس از مصرف غذای آلوده رخ می دهد. اسهال یک شکل رایج در این نوع بیماری نمی باشد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۲). اسیدیفیکاسیون بیوشیمیایی به کمک انواع خاص استارترهای خانواده اسید لاکتیک باکتری‌ها توسط محققین مختلف گزارش شده است (Nout *et al*., 1987; Feng *et al*., 2005) ولی با توجه به این که استفاده از سویه‌های باکتریایی خالص نیاز به چندین مرحله آماده‌سازی میکروارگانیسم قبل از تلقیح دارد، همچنین دسترسی به این سویه‌های باکتریایی محدود و عرضه آنها از طریق برخی موسسات پژوهشی خاص صورت می‌گیرد، در این تحقیق از استارترهایی که به طور تجاری در دسترس هستند و نیاز به مراحل آماده سازی مانند سویه‌های خالص باکتریایی ندارند، جهت اسیدیفیکاسیون بیوشیمیایی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

- استارترهای مورد استفاده

مواد شیمیایی مورد استفاده ساخت شرکت مرک آلمان[1] بود. جهت تعیین میزان ارگوسترول از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل ژنوی[2] ۶۳۰۵ استفاده شد. جودوسر (*Avena sativa*) از مرکز تحقیقات کشاورزی نیشابور تهیه شد. سه نوع استارتر نوع کارمینوکس[3] خریداری شد که ترکیب باکتری‌های روی برچسب این استارترها در جدول ۱ آمده است.

کپک رایزوپوس میکروپوروس زیر گونه اولیگوسپوروس نوع PTCC ۵۲۸۷ از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

- آماده سازی کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس

آماده سازی اسلنت از کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس نوع PTCC ۵۲۸۷ مطابق دستورالعمل الحاقی، صورت

[1] Merck [2] Jenway [3] Carminox

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱- استارترهای مورد استفاده در تهیه تمپه

استارتر ۱	*Streptococcus, homo and heterofermentative mesophilic.*
استارتر ۲	*Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus.*
استارتر ۳	*Lactococcus lactis sub sp lactis, Lactococcus lactis subsp cremoris.*

گرفت بدین صورت که آمپول لیوفیلیزه کپک تحت شرایط استریل شکسته شد و به داخل آن مقدار ۰/۱ میلی لیتر رینگر استریل اضافه گردید. با حل شدن کامل محتویات آمپول لیوفیلیزه در رینگر استریل به اسلنتی از محیط کشت PDA کل محتویات آن تخلیه شد. سپس به مدت ۷ روز در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد.

- شمارش تعداد کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس

شمارش به روش Schnurer (۱۹۹۳) صورت گرفت بدین صورت که پس از رقیق سازی، بر روی محیط آگار حاوی ۲ درصد عصاره مالت[1] به روش سطحی کشت گردید و در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد برای مدت ۳ روز گرمخانه گذاری گردید (Schnurer, 1993). هنگام تهیه تمپه، جمعیت کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس معادل 10^4 اسپور در هر گرم تلقیح شد.

- شمارش تعداد باکتری‌های استارترهای اسید لاکتیک باکتر مورد استفاده

جهت شمارش تعداد باکتری‌های استارترهای اسید لاکتیک باکتر مورد استفاده از محیط کشت اختصاصی MRS آگار استفاده شد. مدت زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت و دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود.

- مراحل آماده سازی تمپه جودوسر

مراحل مطابق روش Feng (۲۰۰۷) که در مورد جو انجام شده است، صورت گرفت. پس از پوست‌گیری سایشی، جودوسر پوست‌گیری شده، به مدت ۶ ساعت در آب حاوی ۰/۱۲ مول اسید لاکتیک و در دمای اتاق خیسانده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب حاوی ۰/۸٪ نمک طعام جوشانده شد. سپس مراحل آبگیری و سرد کردن تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. تلقیح استارتر (جمعیت تقریبی 10^4 CFU/g) همراه با کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس (جمعیت تقریبی 10^4CFU/g) انجام شد و سپس انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت در ظروف پلاستیکی صورت گرفت (نمونه شاهد) (Feng, 2007). در تیمارهای ۲، ۳ و ۴ به ترتیب از استارترهای ۱، ۲ و ۳ با جمعیت تقریبی 10^6 CFU/g تلقیح شد. در تیمار ۵ از سرکه به میزان ۵ml/۱۰۰g جهت اسیدفیکاسیون استفاده شد.

- تلقیح باسیلوس سرئوس به تمپه

ابتدا از تمپه از قبل تهیه شده، بر روی محیط کشتManitol Egg Yolk Polymixin Agar، باکتری باسیلوس سرئوس ایزوله گردید. ایزولاسیون باسیلوس سرئوس از نمونه تمپه شاهد مطابق روش کریم (۱۳۷۹) صورت گرفت. سپس به میزان10^5 CFU/g به نمونه‌های تمپه تلقیح گردید (Nout *et al*., 1987).

- تعیین رشد کپک

تعیین اندازه هیف

جهت تعیین میزان رشد کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس از فاکتور اندازه هیف استفاده شد. جهت رنگ‌آمیزی از روش Elwood (۲۰۰۷) و با استفاده از رنگ تریپتان بلو استفاده شد (Elwood *et al*., 2007). مشاهده میسلیوم‌ها و تعیین اندازه آنها توسط میکروسکوپ *Olympus* BX51 با بزرگنمایی۴۰۰X صورت گرفت.

- تعیین میزان ارگوسترول

اندازه گیری میزان ارگوسترول مطابق روش Bhosle (۲۰۱۱) و با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک صورت گرفت (Bhosle *et al*., 2011).

- تعیین میزان pH تمپه

میزان pH محصول مطابق روش Aderibigbe

[1] Malt Extract

Archive of SID
www.SID.ir

(۲۰۰۲) اندازه‌گیری شد (Aderibigbe and Adebayo, 2002).

- شمارش باکتری باسیلوس سرئوس

جهت شمارش باکتری باسیلوس سرئوس از محیط کشت جامد انتخابی Manitol Egg Yolk Polymixin Agar ساخت شرکت مرک آلمان به صورت خطی کشت داده شد. جهت تأیید تشخیص از سایر آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده گردید (کریم، ۱۳۷۹).

- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل آماری شدند. مقایسه میانگین به روش دانکن در سطح ۱ درصد انجام شد.

یافته‌ها

- بررسی تغییرات pH در تیمارهای مختلف تمپه تولیدی

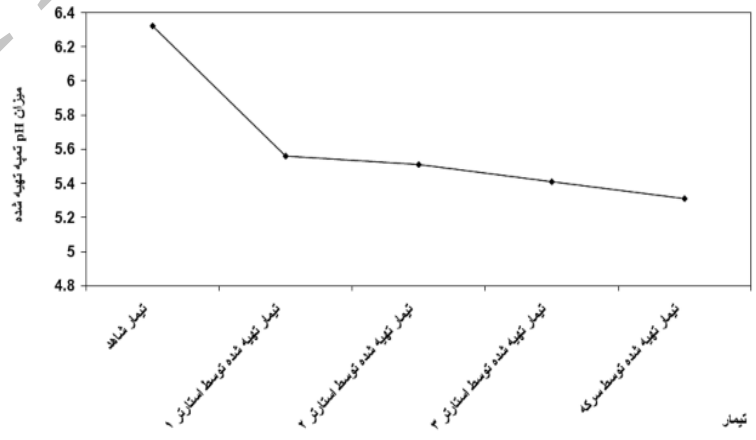
استارترهای اسید لاکتیک باکتری‌ها موجب کاهش میزان pH می‌گردند که بیشترین تأثیر مربوط به استارتر ۳ است (p< ۰/۰۱). تیمار تهیه شده توسط سرکه نیز دارای کمترین میزان pH است (نمودار ۱).

- بررسی میزان رشد کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس در تیمارهای مختلف تمپه تهیه شده

اندازه گیری طول هیف و میزان ارگوسترول دو فاکتور مهم در تعیین میزان رشد کپک است. در تمپه نیز به منظور تعیین میزان رشد کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس از این دو فاکتور استفاده می‌شود (Feng *at al.*, 2007). مطابق این تحقیق بیشترین میزان ارگوسترول و طول هیف مربوط به تیمار شاهد است (p<۰/۰۱). تلقیح اسید لاکتیک باکترها و اسیدیفیکاسیون توسط سرکه هر دو منجر به کاهش میزان رشد کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس می‌گردد. طول هیف در تیمار شاهد بیشترین مقدار و معادل ۱۱۰۷ میکرون اندازه‌گیری گردید. در سایر تیمارها طول هیف کاهش داشت و کمترین میزان طول هیف مربوط به تیمار تهیه شده توسط سرکه است (۹۵۶ میکرون). این نتایج نشان می‌دهد استفاده از استارترها و نیز اسید یفیکاسیون توسط سرکه سبب کاهش میزان رشد کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس می‌گردد (نمودار ۳). نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان ارگوسترول در تیمارهای مختلف تمپه تهیه شده نیز مؤید این مطلب است (نمودار ۲). ولی این کاهش به اندازه‌ای نیست که تمپه مناسبی از آن تهیه نگردد.

- بررسی میزان رشد باسیلوس سرئوس در تیمارهای مختلف تمپه تهیه شده

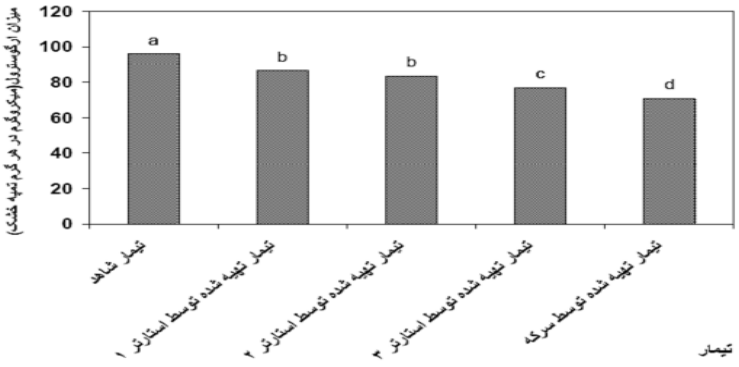
نمودار ۴ نشان دهنده کاهش جمعیت باسیلوس‌سرئوس در اثر اسیدیفیکاسیون بیولوژیکی در اثر تلقیح گونه‌های مختلف اسید لاکتیک باکتری‌ها و نیز اسیدیفیکاسیون شیمیایی توسط سرکه می‌باشد (p<۰/۰۱).



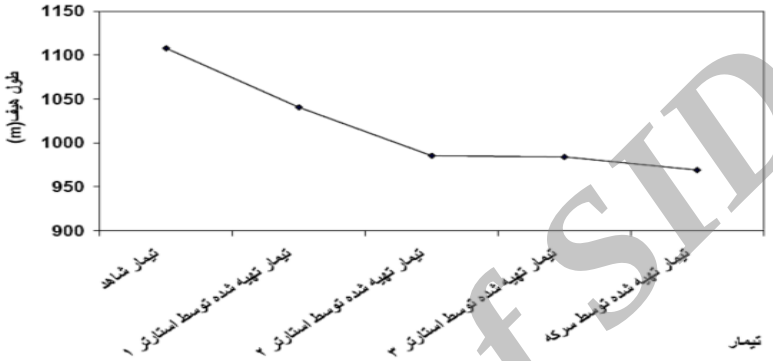
نمودار ۱- میزان pH در تیمارهای مختلف تمپه

Archive of SID

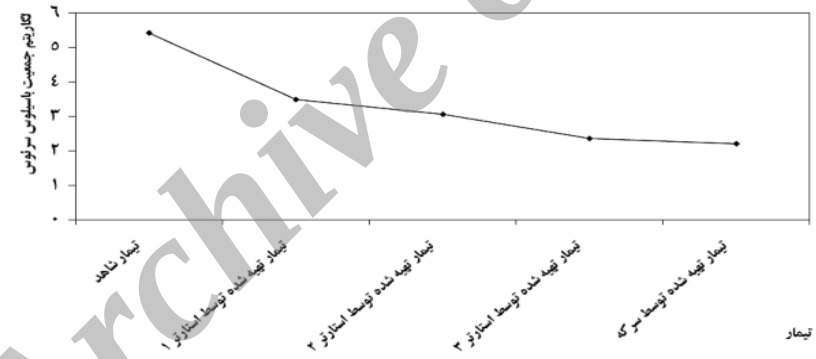
www.SID.ir



نمودار ۲- میزان ارگوسترول در تیمارهای مختلف تمپه



نمودار ۳- میزان طول هیف در تیمارهای مختلف تمپه



نمودار ٤- جمعیت باسیلوس سرئوس در تیمارهای مختلف تمپه

بحث

مطابق این تحقیق، تلقیح اسید لاکتیک باکتری‌های مختلف سبب کاهش میزان pH در تمپه می‌گردد و تأثیر استارترهای مختلف در این زمینه با یکدیگر متفاوت است به طوری که بیشترین کاهش میزان pH مربوط به نمونه تلقیح شده توسط استارتر *lactococcus lactis sub sp lactis, lactococcus lactis subsp cremoris* می‌باشد. کاهش میزان pH در اثر به کار بردن گونه‌های مختلف اسید لاکتیک باکتری‌ها در گزارش Feng (۲۰۰۵) در تمپه تهیه شده توسط جو نیز تأیید شده است (Feng *et al*., 2005). تأثیر گونه‌های مختلف اسید لاکتیک باکتری‌ها بر روی کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس و در نتیجه تولید تمپه متفاوت است. Nout (۱۹۸۷) در گزارش خود عنوان نموده است لاکتوباسیلوس قادر به کاهش میزان pH آب خیسانیدن تا میزان کمتر از ۴/۵ می‌گردد و تمپه با کیفیت عالی حاصل می‌شود. پدیوکوکوس نیز باعث کاهش میزان pH می‌گردد ولی از رشد رایزوپوس اولیگوسپوروس نیز جلوگیری می‌کند و در نتیجه تمپه شکل نمی‌گیرد (Nout *et al*, 1987). کاهش میزان رشد کپک رایزوپوس اولیگوسپوروس نیز در اثر تلقیح اسید لاکتیک باکتری‌ها به تمپه قابل مشاهده است به طوری که طول هیف و میزان ارگوسترول در نمونه

Archive of SID

www.SID.ir

اسیدی نشده (تیمار شاهد) بیشترین مقدار است و با اسیدیفیکاسیون توسط تلقیح اسید لاکتیک باکتری‌ها و نیز اسیدیفیکاسیون شیمیایی توسط سرکه از مقدار این فاکتورها کاسته می‌شود. رشد باسیلوس سرئوس نیز در این تیمارها کاهش می‌یابد. کاهش میزان pH و افزایش اسیدیته عامل مهمی در کاهش رشد باسیلوس سرئوس در گزارشات مختلف اعلام شده است (Nout *et al*., 1987). قابلیت تولید باکتریوسین توسط اسید لاکتیک باکتری‌ها نیز از جمله عوامل بازدارنده رشد این گونه باکتریایی است (میر حسینی و همکاران، ۱۳۸۶).

نتیجه گیری

استفاده همزمان از اسید لاکتیک باکتری‌ها یا اسیدیفیکاسیون توسط سرکه در حین تهیه تمپه جودوسر سبب کاهش رشد باسیلوس سرئوس که باکتری مهم در فساد این محصول است، می‌گردد. بیشترین تأثیر مربوط به تلقیح توسط گونه‌های *lactococcus lactis sub sp lactis, lactococcus lactis subsp cremoris* می‌باشد.

سپاسگزاری

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور که بودجه انجام این پژوهش را تأمین نمودند.

منابع

بی‌نام. (۱۳۷۲). موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. روش جدا کردن، شمارش و شناسایی باسیلوس سرئوس. استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۴، تجدید نظر اول.

کریم، گ. (۱۳۷۹). آزمون‌های میکروبی مواد غذایی، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، ۵۷–۸۰ ص.

میرحسینی، م.، نحوی، ا.، کرمانشاهی، ر.، توسلی، م. (۱۳۸۶). بررسی اثر باکتری تولید کننده باکتریوسین روی لیستریا مونوسایتوژنز و باسیلوس سرئوس. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. شماره ۶۰ (۱۱۲–۱۱۵).

Aderibigbe, E. Y. & Adebayo, C. O. (2002). Fermentative utilization of soybean in Nigeria. I: Laboratory production of tempeh. *NISEB Journal.*, 2: 31-35.

Badger, T. M., Martin Ronis, J. J., Rosalia Simmen, C. M. & Simmen Vattem, F. A. (2005). Soy Protein Isolate and Protection against Cancer. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(2): 146S-149S.

Bhosle, S. R., Sandhya, G., Sonawane, H. B. & Vaidya, J. G. (2011). Ergosterol content of several wood decaying fungi using a modified method. *International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*. 2(7): 916-918.

Ellwood, S., Kamphuis, L., Pfaff, T., Oliver, R., Samac, D. & Foster-Hartnett, B. D. (2007). Inoculation and growth with foliar pathogenic fungi. Medicago truncatula handbook. Version March 2007.pp: 1-14.

Feng, X. M., Eriksson, A. R. B. & Schnürer, J. (2005). Growth of lactic acid bacteria and Rhizopus oligosporus during barley tempeh fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 104 (3), 249-256.

Feng, X. M., Olsson, J., Swanberg, M. & Ronnow, D. (2007). Image analysis for monitoring the barley tempeh fermentation process. *Journal of Applied Microbiology*. 130:1113-1121.

Krumhar, N. & Carleton, K. (2005). Method for treatment of inflammation and pain in mammals. United States Patent, 424/601.

Marquart, L., Wiemer, K. L., Jones, J. M. & Jacob, B. (2003). Whole grain health claims in the USA and other efforts to increase whole-grain consumption. *Proceedings of the Nutrition Society* 62: 151-159.

Messina, M. & Messina, V. (2000). Soy foods, soybean isoflavones and bone health: a brief overview. *Journal of Renal Nutrition*., 10: 63-68.

Nout, M. J. R., de Dreu, M. A. & Zuurbier, A. M. (1987). Ecology of controlled soyabean acidification for tempeh manufacture. *Food Microbiology*. 4 (2): 165–172.

Nout, M. J. R., Beernink, G., Bonants, V. & Laarhoven, T. M. G. (1987). Growth of Bacillus cereus in soyabean tempeh. *International Journal of Food Microbiology*.4(4): 293–301.

Pimentel, D. & Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 660S-663S.

Schnurer, J. (1993). Comparison of Methods for Estimating the Biomass of Three Food-Born Fungi with Different Growth Patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2): 552-555.

Archive of SID

www.SID.ir