دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیستم- شماره ۱۰۶
شهریور ۱۳۹۲

دریافت: ۱۳۹۲/۴/۱
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۲/۷/۵
پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱۶

بررسی مقایسه‌ای شمارش سویه‌های لاکتوباسیلوس در طول زمان ماندگاری در چند نمونه ماست پروبیوتیک صنعتی

نویسندگان: احسان انصاریان[۱]، مریم کاظمی[۲]، محسن نعمتی*[۳]، افشین آخوندزاده بستی[٤]، طناز موسوی[٥]

۱. دکترای عمومی دامپزشکی گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ایران

۲. کارشناس ارشد گروه تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

۳. دانشیار گروه تغذیه، مراکز تحقیقات بیوشیمی تغذیه، سرطان و جراحی‌های آندوسکوپیک کم تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

٤. استاد گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران

۵. استادیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ایران

* نویسنده مسئول: محسن نعمتی **E-mail: NematyM@mums.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: لاکتوباسیوس‌ها از میکروارگانیسم‌های اصلی ماست پروبیوتیک هستند که برای اثربخشی بالینی باید از نظر تعداد و میزان بقا در زمان ماندگاری ماست در حد مطلوب حفظ‌شوند. هدف این مطالعه ارزیابی شمارش لاکتوباسیلوس‌ها در چند نمونه ماست پروبیوتیک از برندهای معمول لبنی در زمان ماندگاری بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی ۵۰ نمونه ماست پروبیوتیک (۱۰ نمونه از ۵ برند) تهیه و کدگذاری‌شد. پس از کشت سطحی، کلونی‌های تمامی سویه‌های لاکتوباسیلوس در ۲ نوبت (۱: روز میانی و ۲: روز پیش از پایان دوره ماندگاری) شمارش‌شد و در نوبت دوم، pH نمونه‌ها نیز اندازه‌گیری‌شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS آنالیزشد.

نتایج: میانگین شمارش لاکتوباسیلوس‌ها در ۴ برند ارزیابی‌شده در کشت نوبت ۲ کمتر از نوبت ۱ بود ($p \leq ۰/۰۰۲$). ماکزیمم لاکتوباسیلوس شمارش‌شده در تمامی نمونه‌ها کمتر از حداقل میزان توصیه‌شده‌بود ($۲/۹\times۱۰^{۵}$ vs. $۱۰^{۶}$ CFU/mL, $p < ۰/۰۰۰۱$). pH اندازه‌گیری‌شده در تمامی نمونه‌ها در پایان دوره نگهداری از pH مطلوب کمتر بود ($p < ۰/۰۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: کمتربودن میانگین شمارش کولونی‌های لاکتوباسیلوس در مدت ماندگاری و بالاتربودن اسیدیته نمونه‌ها در پایان دوره نگهداری در مقایسه با میزان مطلوب، خواص پروبیوتیک ماست‌های ارزیابی‌شده و احتمال اثربخشی بالینی آنها را به‌صورت جدی کاهش‌می‌دهد؛ علاوه‌بر آزمایش‌های کنترل کیفی منظم براساس پروتکل‌های کشوری استاندارد، انجام مطالعات گسترده‌تر در این زمینه پیشنهاد-می‌شود.

واژگان کلیدی: ماست، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، زمان ماندگاری

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و غیر-بیماری‌زای (۱) موجود در برخی از مواد غذایی‌اند که وقتی در مقادیر کافی به بدن، وارد شوند (۲) از طریق احیا و بازسازی فلور میکروبی دستگاه گوارش (۳) آثاری ارزشمند بر سلامت میزبان می‌گذارند (٤). پژوهش در زمینه پروبیوتیک‌ها از موضوع‌های روز علوم تغذیه و پزشکی به‌شمارمی‌رود. گرچه توافق نظر قطعی درزمینه ساختار عمل پروبیوتیک‌ها (۵) وجودندارد، عملکرد آنتی‌بیوتیکی آنها در زمان اتصال به اپیتلیوم روده کوچک و کولون، پیشگیری از تهاجم و عبور پاتوژن‌ها از سد روده‌ای، تعدیل مقاومت دفاعی لومن گوارشی از طریق کاهش سیتوکین‌های التهابی و تغییر پوشش سلولی روده از وضعیت پیش‌التهابی به ضدالتهابی ازجمله برجسته‌ترین نظریه‌های پیشنهادشده در این زمینه هستند (۵ و٦).

از مهم‌ترین اندیکاسیون‌های بالینی پروبیوتیک‌ها می‌توان به افزایش ایمنی و مقاومت دفاعی (۷)، کاهش بروز و تسریع درمان اسهال، تسریع بهبود و افزایش طول دوره کمون و کاهش مدت و دفعات عود بیماری‌های التهابی روده (۸)، بهبود عدم تحمل لاکتوز و آلرژی‌های غذایی (۹) و درمان اگزمای آتوپیک در نوزادان کودکان (۷) اشاره‌کرد.

غنی‌سازی غذاهای پرمصرف با میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مناسب و قابل‌اطمینان نظیر لبنیات، به‌ویژه ماست که از پرطرف‌دارترین آنها در ایران است (۱۰)، استقبال فزاینده متخصصان را به‌همراه‌داشته‌است. از مهم-ترین پروبیوتیک‌ها که استارتر روند تولید ماست نیز به-شمارمی‌آیند، بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس هستند که مصرف آنها به کاهش خطر بروز عفونت و بهبود تحمل گوارشی در بیماران بستری منجرشده‌است (۹ و ۱۱).

اگرچه شواهد بالینی متقنی درخصوص پایین‌ترین دوز میکروارگانیسم لازم برای اثربخشی معنی‌دار بالینی پروبیوتیک‌ها وجودندارد، عموم متخصصان بر این باورند که یک ماده غذایی پروبیوتیک باید دست‌کم حاوی چندین میلیون میکروارگانیسم باشد تا به جایگیری و کلونیزاسیون کافی در روده منجرشود (۱). اغلب منابع دوز قابل قبول برای اثربخشی بالینی لاکتوباسیلوس‌ها در ماست پروبیوتیک را معادل 10^{6}–10^{8} CFU[1]/mL (۸–٦ log) اعلام‌کرده‌اند؛ به‌عبارتی، حداقل تعداد قابل‌قبول آن در روز پیش از تاریخ انقضا معادل 10^{6} CFU/mL (۱۲ تا ١٤) بیان‌شده‌است؛ نتایج مطالعات پیشین نشان‌داده‌اند که تعداد باکتری‌های پروبیوتیک محصولات تجاری با میزان ادعاشده در برچسب تغذیه‌ای مغایرت‌داشته و کمتر از میزان ادعاشده بوده‌است (۱۵ تا ۱۸). براساس یافته‌های این مطالعات، میزان بیفیدوباکتریوم‌ها و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، طی نگهداری در یخچال به‌ویژه در محیط اسیدی (٤/۵ $pH \leq$) در پایان دوره ماندگاری ماست، به طرز معنی‌داری کاهش‌می‌یابد (۱۹ و ۲۰)؛ بنابراین رعایت استانداردهای تولید فراورده غذایی پروبیوتیک و افزودن حداقل دوز توصیه‌شده میکروارگانیسم پروبیوتیک برای حفظ تعداد آنها در طول زمان ماندگاری و اثربخشی لازم محصول، حائز اهمیت است (۱ و ۱۲ تا ۱۳). مطالعه حاضر با هدف بررسی کفایت تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس در چند نمونه از ماست‌های پروبیوتیک صنعتی در طول زمان ماندگاری و ارزیابی شدت اسیدیته محیط فعالیت لاکتوباسیلوس‌ها پیش از پایان دوره ماندگاری صورت-گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به شیوه مقطعی در سال ۱۳۸۹ و در طول نه ماه (آبان ۱۳۸۹ تا مرداد ۱۳۹۰) در شهر مشهد انجام-شد.

انتخاب، آماده‌سازی نمونه‌ها و معیارهای ورود و خروج از مطالعه

محل تهیه نمونه‌ها به‌صورت تصادفی از میان سوپر-مارکت‌های سطح شهر مشهد انتخاب‌شد. پنج نوع ماست پروبیوتیک تولیدشده توسط شناخته‌شده‌ترین

[1]- Colony Formed Unit

Archive of SID

www.SID.ir

کارخانجات تولید فراورده‌های لبنی انتخاب‌شدند. به‌منظور رعایت موازین اخلاقی از درج نام و مشخصات برند تجاری خودداری‌شد و برای ارجاع به نمونه‌ها از کدهای ریاضی استفاده‌شد.

برای ایجاد بیشترین مشابهت از نظر شرایط اولیه، نمونه‌ها با کمترین فاصله زمانی از تاریخ تولید (کمتر از ۲٤ ساعت) و با دوره ماندگاری مشابه تهیه‌شدند. برای بالابردن میزان اطمینان از پایداری و تعداد مناسب لاکتوباسیلوس‌ها، حفظ زنجیره سرد و حفظ پایداری پروبیوتیک‌ها، تمامی مراحل تهیه، جمع‌آوری و انتقال نمونه‌ها از سطح شهر و نگهداری آنها تا زمان انتقال به محل آزمایشگاه با استفاده از کامیونت‌های یخچال‌دار دارای مجوز و کد بهداشتی معتبر و در دمای کنترل‌شده ٤°C صورت‌گرفت.

در این مطالعه، برندهایی که در آنها، لاکتو باسیلوس‌ها به‌عنوان استارتر اصلی پروبیوتیک استفاده‌شده‌بود، به‌کاربرده‌شد و نمونه‌هایی که در آنها ماست با استفاده از ریزمغذی‌ها غنی شده‌بود و همچنین، انواع ماست‌های طعم‌دار و میوه‌ای از مطالعه خارج شدند؛ همچنین برای انتخاب و ورود نمونه‌ها به مطالعه، پنج برند معتبر و شناخته‌شده تولیدکننده ماست پروبیوتیک مورد استفاده قرارگرفتند و پیش از تهیه ده نمونه از هر-یک از برندها، در ابتدا پنج نفر داور از طریق ارزیابی حس بویایی و چشایی برگزیده شدند و نمونه‌های ماست را از طریق آزمون هدونیگ ۵ امتیازی با استناد به ویژگی‌های حسی (بو، طعم، بافت، مزه و پذیرش کلی) مورد داوری قراردادند که نمونه‌ها بیشترین مشابهت را از نظر یک‌دست‌بودن ویژگی‌های ظاهری و حسی در بدو ورود به مطالعه داشته‌باشند (۲۱)؛ همچنین نمونه‌هایی که در زمان تهیه و انتقال به آزمایشگاه در شرایط نگهداری با دمای بالاتر از ٤°C بودند از مطالعه خارج شدند.

حجم نمونه، متغیر های مطالعه و گروه‌ها

با استناد به محدودیت تنوع برندهای لبنی تولیدکننده ثابت محصولات پروبیوتیک در محل تحقیق (شهر مشهد)، مقالات مشابه (۱۸ و ۲۲) و نظرسنجی از استادان مربوط، پنج برند ماست به‌صورت آزمایشی (پایلوت) تعیین‌شدند و برای کسب برآورد قابل واقعی‌تر از تعداد لاکتوباسیلوس‌های موجود در هر نوع ماست، از هر برند انتخاب‌شده، ده نمونه جمع‌آوری‌شدند که در دو نوبت مورد ارزیابی قرارگرفتند؛ بدین ترتیب پنج گروه کلی از پنج برند ماست پروبیوتیک مجزا و در هر گروه، ده نمونه از هر برند داشتیم که در دو نوبت (روز میانی دوره نگهداری و روز پیش از تاریخ انقضا) از آنها کشت تهیه‌شد و دو متغیر اصلی مورد مطالعه که تعداد کلونی‌های تمامی سویه‌های لاکتوباسیلوس‌ها و میزان اسیدیته نمونه‌ها بود به‌ترتیب در دو نوبت و نوبت دوم کشت ارزیابی‌شدند.

آماده‌سازی، نگهداری و کشت سویه‌های لاکتوباسیلوس

با توجه به ماهیت مطالعه، روش گردآوری اطلاعات به شیوه تجربی و ابزار گردآوری اطلاعات از طریق نمونه‌برداری و آزمایش‌های کیفی بود. با استناد به تاریخ تولید و تاریخ انقضا درج‌شده در روی بسته‌بندی محصول، زمان ماندگاری نمونه‌ها بین ١٤ تا ٢١ روز متغیر بوده و روز میانی دوره نگهداری نمونه‌ها روز وسط این بازه تعیین‌شد. تمامی نمونه‌ها از زمان تولید تا انقضا در یخچال یکسان و در برودت معادل با ٤°C-٢ (دمای اپتیمم حفظ و نگهداری لاکتوباسیوس‌ها در ماست پروبیوتیک) نگهداری‌شدند (۱۰ و ۱۸). تمامی آزمایش‌ها در محل آزمایشگاه ایران، واقع در محل بزرگراه آسیایی در شهر مشهد صورت‌گرفت. هر آزمایش سه بار تکرارشد و برای شمارش میکروبی تعداد باکتری‌های پروبیوتیک از روش رقت‌های متوالی استفاده‌شد. برای کشت لاکتوباسیلوس‌ها از محیط کشت MRS-bile agar medium (MRS agar: Quelab, Canada, and bile: Sigma–Aldrich, Inc., Reyde, USA) استفاده‌شد (۱۰، ۱۱ و ۱۸). نظر به عدم تداخل تغذیه‌ای نمک‌های صفراوی در رشد لاکتوباسیلوس‌ها، به‌منظور اصلاح محیط کشت و افتراق رشد لاکتوباسیلوس‌ها از نمک‌های

Archive of SID

www.SID.ir

صفراوی استفاده‌شد. نمونه ماست با حجم ۱ میلی‌لیتر با ۹ میلی‌لیتر از محلول استریل ۰/۱ درصد پپتون واتر که پیش‌تر به‌مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ^{o}C ۱۲۱ اتوکلاو قرارگرفته و به دمای محیط رسیده‌بود، رقیق‌سازی و همگن شد و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ^{o}C۲۵ گرمخانه‌گذاری‌شد؛ سپس از مایع شناور رویی رقت‌های 10^{-1}–10^{-9} تهیه‌شد و با محیط کشت جامد MRS agar کشت سطحی ٤ منطقه‌ای به‌صورت پورپلیت و مطابق با روش استاندارد صفحه‌ای انجام‌شد؛ سپس پلیت‌ها به‌منظور رشد لاکتوباسیلوس‌ها در شرایط میکروآئروفیلیک در جار بی‌هوازی حاوی گاز پک (Quelab, Canada) در دمای ^{o}C ۳۷ به‌مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری‌شدند؛ پس از آن، مشخصات میکروسکوپی ازقبیل قوام و اندازه و ماکروسکوپی پرگنه‌های تشکیل‌شده پس از رنگ‌آمیزی به روش گرم مورد بررسی قرارگرفت و شمارش تعداد کلونی‌های تمامی سویه‌های لاکتوباسیلوس براساس CFU/mL و به کمک دستگاه کلنی کانتر و براساس استاندارد شماره ۷۷۱٤ استاندارد ملی ایران انجام‌شد. برای ارزیابی شاخص pH، در نوبت دوم کشت اسیدیته نمونه‌ها با دستگاه pH متر (Metrohm 654 Digital pH meter, Herisau, Switzerland) و براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ اندازه‌گیری‌شد (۲۱).

طرح آماری و روش تجزیه‌و تحلیل داده‌ها

داده‌ها در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA) آنالیزشدند. تمامی نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان‌شده‌اند. پس از تأیید نرمال‌بودن داده‌ها توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف، برای بررسی اختلاف و مقایسه میانگین شمارش کلونی‌های لاکتوباسیلوس در هریک از پنج برند مورد ارزیابی با مقادیر توصیه‌شده، از آزمون t یک‌نمونه‌ای استفاده‌شد؛ همچنین برای مقایسه میانگین شمارش کلونی لاکتوباسیلوس به‌دست‌آمده در هریک از گروه‌ها در دو کشت اول و دوم، از آزمون t زوجی استفاده‌شد. برای مقایسه میانگین درجه اسیدیته نمونه‌ها در روز پیش از پایان دوره نگهداری با pH مطلوب از آزمون t یک‌نمونه‌ای استفاده‌شد؛ سطح معنی‌داری در تمامی آزمون‌ها معادل $p \leq ۰/۰۵$ بود و داده‌ها با حساب دامنه اطمینان ۹۵ درصد تجزیه‌وتحلیل‌شدند.

نتایج

متوسط شمارش کلونی‌های لاکتوباسیلوس در نمونه‌ها در روز میانی دوره نگهداری و روز پیش از تاریخ انقضا در جدول ۱ و میانگین pH نمونه‌ها در هر یک از پنج برند ماست پروبیوتیک مورد ارزیابی در پایان دوره نگهداری در جدول ۲ نشان‌داده‌شده‌است. تمامی داده‌های نمایش‌داده‌شده در جدول‌ها برای تقریب نزدیک‌تر به میزان واقعی کلونی‌ها به‌صورت میانگین آماری از ده کشت متمایز و مجزا ارائه‌شده که برای هر-یک از دو نوبت اول و دوم کشت لاکتوباسیلوس جداگانه محاسبه‌شده‌است. براساس داده‌های جدول ۱، بیشترین تعداد لاکتوباسیلوس‌ها $۲/۹\times۱۰^{۵}$ CFU/mL (نمونه شماره ٤، کشت اول و پس از انجام تخمیر) و کمترین تعداد کلونی $۱/۵\times۱۰^{٤}$ CFU/mL (نمونه شماره ۱ در کشت دوم) بود. میانگین تعداد کلونی لاکتوباسیلوس شمارش‌شده در چهار برند از پنج برند ارزیابی‌شده، در کشت نوبت دوم به‌طور معنی‌داری کمتر از نوبت اول بود ($p \leq ۰/۰۰۲$) میزان متوسط کلونی‌ها در نوبت دوم کشت تا $۱/۵\times۱۰^{٤}$ CFU/mL تقلیل‌یافت؛ این مسئله، نشانگر کاهش شدید و قابل‌توجه جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در طول نگهداری یخچالی بوده-است که با نتایج مطالعات مشابه پیشین در این زمینه همسو است (۱۹ و۲۰). براساس جدول ۱ کاهش جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها در نمونه ٤ از سایر نمونه‌ها، بارزتر است. به‌رغم آنکه از منظر صنایع غذایی و علوم تغذیه باکتری پروبیوتیک برای اثربخشی و حفظ خواص درمانی باید در طول دوره ماندگاری میزان زنده‌مانی قابل‌قبول ($۱۰^{٦}$ CFU/mL) داشته، همچنین قادر به رشد و افزایش تعداد کلونی‌ها باشد، در این مطالعه، میزان باکتری‌های لاکتوباسیلوس برخلاف انتظار کاهش‌یافت

Archive of SID

www.SID.ir

که می‌توان آن را با عدم توانایی رقابت لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک با سایر میکروارگانیسم‌های ماست و کاهش سازگاری و تحمل لاکتوباسیلوس‌ها در ماست پروبیوتیک مرتبط‌دانست (شکل‌های ۱ و۲)؛ این مهم در بخش بعدی به‌صورت گسترده‌تر ارزیابی‌شده‌است؛ همچنین مقایسه متوسط کلونی‌های شمارش‌شده با میزان مطلوب با استفاده از آزمون t یک‌نمونه‌ای نشان‌داد که میزان کلونی‌های لاکتو باسیلوس‌ها در تمامی نمونه‌های مورد ارزیابی در مقایسه با حداقل توصیه‌شده به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($p <$ ۰/۰۰۰۱) و هیچ‌یک از نمونه‌های مطالعه، دارای حداقل میزان مطلوب این میکروارگانیسم پروبیوتیک نبودند.

همان‌طورکه داده‌های جدول ۲ نشان‌می‌دهند، آزمون t یک‌نمونه‌ای که در این مطالعه برای مقایسه میزان اسیدیته هریک از نمونه‌ها در پایان دوره نگهداری با حداقل اسیدیته توصیه‌شده برای رشد و بقای میکروبی باکتری‌های لاکتوباسیلوس به‌کارگرفته‌شد، نتایجی مشابه را درخصوص pH نمونه‌ها با حداقل pH مطلوب نشان‌داد ($p <$ ۰/۰۰۰۱) (جدول ۲)؛ براساس داده‌های این جدول، بالاترین pH ثبت‌شده معادل ٤/۲ واحد و به‌طور معنی‌داری از حداقل pH توصیه‌شده برای ماست پروبیوتیک (٤/٥) کمتر بود و در نمونه ٤ تا حد ۳/۵ واحد، کاهش نشان‌داد؛ یافته‌های این مطالعه نشان‌داد که اسیدیته تمامی نمونه‌ها در پایان دوره نگهداری از میزان مطلوب به‌طوری قابل‌توجه بالاتر است و به‌عبارت‌دیگر میزان ترش‌شدن ماست‌ها در پایان دوره نگهداری بیشتر از حداقل مطوب ارزیابی‌شد.

جدول ۱. متوسط شمارش کولونی‌های لاکتوباسیلوس در نمونه‌های ماست پروبیوتیک در دو نوبت کشت (روز میانی دوره نگهداری و روز پیش از تاریخ انقضا)

گروه ها (بر اساس برند ماست)	شمارش لاکتوباسیلوس در کشت اول[b,c] (روز میانی دوره نگهداری)	شمارش لاکتوباسیلوس در کشت دوم[b,c] (روز پیش از تاریخ انقضا)	p Value[d]
۱[a]	$(۲/۸\times۱۰^{۵}) \pm (۴\times۱۰^{۴})$	$(۱/۵\times۱۰^{۴}) \pm (۲\times۱۰^{۴})$	۰/۶۹
۲[a]	$(۱/۴\times۱۰^{۵}) \pm (۳\times۱۰^{۴})$	$(۲/۲\times۱۰^{۵}) \pm (۲\times۱۰^{۴})$	<۰/۰۰۰۱
۳[a]	$(۲/۱\times۱۰^{۵}) \pm (۳\times۱۰^{۴})$	$(۳/۷\times۱۰^{۴}) \pm (۶\times۱۰^{۳})$	<۰/۰۰۰۱
۴[a]	$(۲/۹\times۱۰^{۵}) \pm (۳\times۱۰^{۴})$	$(۱/۹\times۱۰^{۵}) \pm (۵\times۱۰^{۳})$	<۰/۰۰۰۱
۵[a]	$(۱/۵\times۱۰^{۴}) \pm (۳\times۱۰^{۴})$	$(۱/۵\times۱۰^{۴}) \pm (۷\times۱۰^{۳})$	۰/۰۰۲

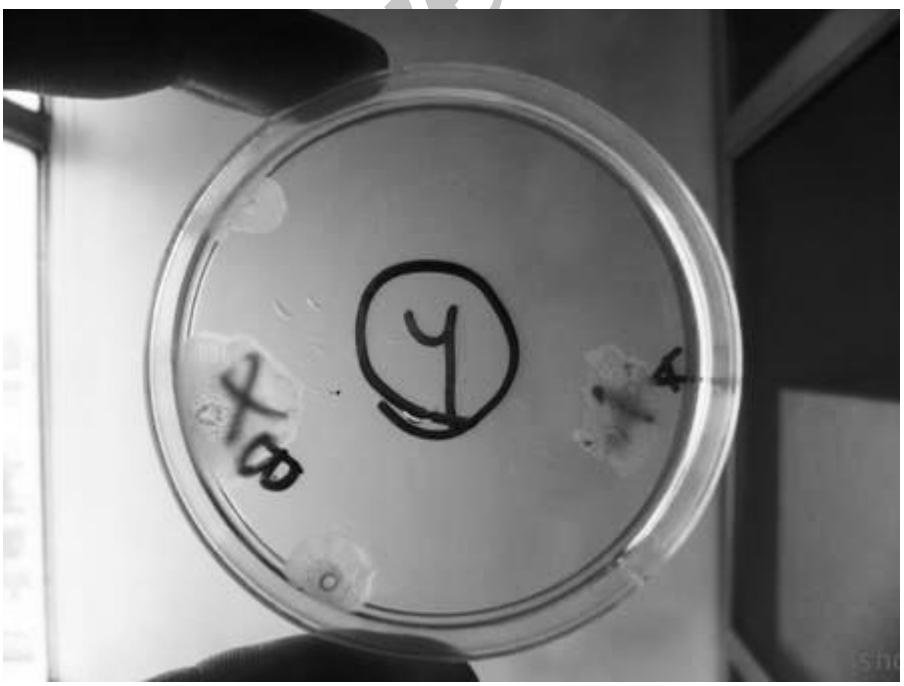
جدول ۲. میانگین pH نمونه‌های ماست پروبیوتیک ارزیابی‌شده در پایان دوره نگهداری

گروه‌ها (براساس برند ماست)	pH[b] (واحد)	p Value[c]
۱[a]	۴/۲ ±۰	<۰/۰۰۰۱
۲[a]	۴/۲ ±۰	<۰/۰۰۰۱
۳[a]	۴/۲ ±۰	<۰/۰۰۰۱
۴[a]	۳/۵ ±۰	<۰/۰۰۰۱
۵[a]	۳/۹ ±۱	<۰/۰۰۰۱

Archive of SID

www.SID.ir

شکل۱. کلونی‌های رنگ‌آمیزی‌شده لاکتوباسیلوس در یک نمونه تصادفی در روز میانی دوره نگهداری (کشت اول)



شکل ۲. کلونی‌های رنگ‌آمیزی‌شده لاکتوباسیلوس در یک نمونه تصادفی در روز پیش از پایان دوره نگهداری (کشت دوم)

www.SID.ir

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان‌دادند که هیچ‌یک از نمونه‌های مورد آزمون در روز میانی دوره نگهداری و روز پیش از تاریخ انقضا دارای کم‌ترین میزان لاکتوباسیلوس توصیه‌شده برای ماست پروبیوتیک نبود؛ همچنین pH نمونه‌ها در پایان دوره ماندگاری، کمتر از حداقل مطلوب ارزیابی‌شد.

تأثیر مفید باکتری‌های پروبیوتیک در محصول‌های لبنی انکارناپذیر است اما بایدتوجه‌داشت مطالعاتی که تأثیر مفید ماست‌های پروبیوتیکی موجود در بازار را گزارش‌کرده‌اند با این فرض صورت‌گرفته‌اند که محصول‌های موجود در بازار از لحاظ تعداد باکتری‌های مفید در حد استاندارد بوده و حداقل زیست دسترسی پروبیوتیک (MBV[1]) را که یک شاخص کمی مهم برای ارزیابی درجه اثربخشی و تأثیرگذاری فراورده پروبیوتیک به‌شمارمی‌آید، دارند (۲۲).

تعداد مطالعات صورت‌گرفته در ایران که به ارزیابی میزان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در غذاهای غنی-شده و چالش‌های مرتبط با آن پرداخته‌باشند، محدود است؛ براساس اطلاعات پژوهشگران می‌توان به یک مورد مطالعه‌ای مشابه انجام‌شده در ایران اشاره‌کرد که با جداسازی، خالص‌سازی باکتری‌های اسید لاکتیک ماست محلی و مقایسه آنها با ماست‌های پروبیوتیک تجاری به روش رنگ‌آمیزی گرم و کشت روی محیط کشت MRS agarو بهره‌گیری از اثر جلوگیری‌کنندگی رشد با انتشار در آگار بر ۵ سویه استاندارد منتخب گرم مثبت و منفی، نشان‌داد که قدرت ضدمیکروبی باکتری‌های لاکتوباسیلوس در ماست‌های محلی به‌عنوان سوش‌های پروبیوتیکی بومی در مقایسه با سه سوش استاندارد صنعتی بالاتر بود؛ در این مطالعه، توان ضدمیکروبی ماست پروبیوتیک با شاخص میزان تولید باکتریوسین در فاز لگاریتمی رشد در محیط با pH خنثی به‌منظور حذف اثر تولید اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ارزیابی‌شد و نتایج نشان‌دادند که سوش-های بومی، لاکتوسین بیشتری داشتند (۱۸)؛ این یافته با نتایج مطالعه حاضر که با روش مبتنی‌بر رنگ‌آمیزی گرم و شمارش مستقیم کلونی‌ها صورت‌گرفت همخوانی‌دارد. نتایج مطالعه‌ای مشابه که با روش همسان با مطالعه حاضر و هدف کنترل کیفی محصول‌های پروبیوتیک تجاری با آنالیزهای میکروبیولوژیکی به مقایسه و شمارش کلونی پروبیوتیک‌ها در هجده قلم ماده غذایی صنعتی پروبیوتیک انتخاب‌شده به‌صورت تصادفی در آمریکا پرداخت، نشان‌دهنده کیفیت بهتر محصول‌های پروبیوتیکی این بازار از نظر دوز پروبیوتیک‌ها در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر بود و تنها در هفت مورد (۳۹ درصد) میان محتوای ماده پروبیوتیک و میزان ادعا شده تفاوت وجودداشت (۱). از ساختارهای ارائه‌شده تبیین تفاوت‌های مشاهده‌شده میان محتوای پروبیوتیکی درج-شده در برچسب اطلاعات تغذیه‌ای محصول‌ها با میزان شمارش‌شده می‌توان به آثار آنتاگونیستی فرایندهای غذایی و بسته‌بندی متداول در صنعت غذا روی میزان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها اشاره‌کرد که در جای خود جالب توجه، جدید و قابل‌ارزیابی در مطالعات آتی است. نتایج مطالعه‌ای مشابه در آفریقای جنوبی با هدف شمارش میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک‌ها در نه ماده غذایی صنعتی و مقایسه شمارش کلونی‌های پروبیوتیک مورد نظر با میزان ادعاشده در برچسب محصول نشان‌داد که تنها سه قلم از مواد غذایی ارزیابی‌شده حاوی میزان ادعاشده میکروارگانیسم پروبیوتیک در برچسب محصول بودند (۱۵). این مطالعه به روش کشت میکروبی و با استفاده از تهیه رقت‌های متعدد تا میزان ۱۰ برابر صورت‌گرفت و میزان کلونی‌های تشکیل‌شده از لاکتوباسیلوس، بیفدوباکتریوم و استرپتوکوکسی پس از انکوباسیون ۲٤ ساعته در شرایط بی‌هوازی و ۷٤ ساعته در شرایط میکروآئروفیلیک برحسب CFU/g در هر محصول شمارش‌شد؛ باوجوداین افتراق میکروارگانیسم‌ها به روش غیرکشتی و با روش Denaturating Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

[1] -Minimum Biologival Value

Archive of SID

www.SID.ir

صورت‌گرفت که در قیاس با مطالعه ما خطایی کمتر و داشته، به تجهیزاتی پیچیده‌تر نیازمند است.

تفاوت‌های دیده‌شده در نتایج این مطالعات را می‌توان به آثار منفی روش‌های فراوری مواد غذایی صنعتی در ازبین‌بردن و کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک و کاهش کیفیت و تأثیرگذاری فراورده پروبیوتیک نسبت‌داد؛ کمتربودن شمارش پروبیوتیک‌ها در این مطالعات با عواملی دیگر ازقبیل «ناکافی‌بودن مقدار و درجه خلوص میکروارگانیسم پروبیوتیک افزوده‌شده به ماده غذایی، عدم تناسب سویه میکروبی استفاده‌شده با غذای مورد نظر برای غنی‌سازی، عدم رعایت دمای نگهداری بهینه، عدم توجه به راهنماهای تدوین‌شده بین‌المللی ازسوی کارخانجات تولیدکننده مواد غذایی و اهمال در کنترل کیفیت خط تولید فراورده‌های پروبیوتیک» مرتبط است (۱، ۱۰ و ۲۳)؛ ازطرفی نتایج مطالعات مشابه نشانگر کاهش احتمال زنده‌ماندن و فعالیت لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها در ماست پروبیوتیک در محیط‌های اسیدی ($pH \leq ٤/٥$) در طول دوره نگهداری یخچالی است که با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه ما همسویی‌دارد (۲۰).

مطالعه‌ای مشابه که در اروپا و با استفاده از روش PCR به‌عنوان جایگزین روش‌های سنتی شمارش با کلونی کانتر برای جداسازی و تخلیص میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک انجام‌شد نتایجی ضد و نقیض را گزارش‌کرد؛ به‌نحوی‌که از ده قلم ماده غذایی پروبیوتیک تجاری، ۳ قلم فاقد و ٤ قلم حاوی میزان کمتری از میکروارگانیسم پروبیوتیک در قیاس با میزان ادعاشده بودند (١٦)؛ درعین‌حال با توجه به اینکه مطالعه بالا با روشی متفاوت و جدیدتر در قیاس با روش کلونی کانتر و رنگ‌آمیزی گرم که در مطالعه ما مورد استفاده قرارگرفته‌است، نتایج به‌دست‌آمده به‌طور عینی قابل‌استناد یا تطبیق نیست؛ توجه به این نکته و در-نظرگرفتن تفاوت‌های موجود در روش نمونه‌گیری و تفاوت در ترکیب‌های اولیه ماست در این مطالعات با مطالعه ما ازجمله مسائلی مهم است که بر نتایج به‌دست-آمده تأثیرگذار است (۱۵ و ٢٤)؛ ازسوی‌دیگر در مطالعات صورت‌گرفته به تأثیرهای دما، شرایط نگهداری و عدم پایداری استارتر بر میزان میکروارگانیسم پروبیوتیک در دوره نگهداری اشاره‌شده‌است؛ ازجمله آنها می‌توان به نتایج مطالعه *روتار*[1] و همکاران اشاره‌کرد که در سه دوره (ابتدای دوره نگهداری، روز میانی و روز پایان دوره نگهداری) شمارش کلونی‌های باکتری‌های اسید لاکتیک به روش مرسوم کلونی کانتر را مقایسه‌کرد و نشان‌داد نه‌تنها تعداد کلونی‌ها با گذشت زمان در طول دوره نگهداری ماست پروبیوتیک در حد مطلوب ($١٠^{٧}$CFU/gr) حفظ‌نشد، بلکه درانتهای دوره به-طور قابل‌ملاحظه‌ای ($١٠^{٤}$CFU/gr) کاهش‌یافت (٢٤)؛ همچنین *شارل*[2] و همکاران، اثر منفی نگهداری ماست پروبیوتیک در دمای اتاق را در مقایسه با دمای $٤^{o}C$ بر تعداد کلونی برخی گونه‌های لاکتوباسیلوس ازقبیل لاکتوباسیلوس جانسونی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست پروبیوتیک اعلام‌کرده، پس از کشت نمونه‌های نگهداری‌شده در دمای یخچال و دمای اتاق با استفاده از محیط کشت Man-Rogosa-Sharpe agar و شمارش به روش میکروسکوپی نشان‌دادند که در مقایسه با نمونه نگهدای‌شده در سرما، پس از ٦ ساعت نگهداری در دمای اتاق، تنها ۵۳/۸ درصد و پس از ٢٤ ساعت، ۲۵ درصد از باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس زنده-ماندند (۲۵)؛ نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعات، مؤید اهمیت حفظ زنجیره سرد در حفظ و نگهداری محتوای کیفیت محصول پروبیوتیک هستند.

نتایج مطالعه‌ای مشابه در استرالیا که با متدکشت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک توسط کشت پورپلیت در محیط کشت MRS agar و شمارش کلونی‌ها به روش میکروسکوپی صورت‌گرفت، مؤید اثر منفی نگهداری ماست پروبیوتیک در دمای $٦^{o}C$-٤ بر میزان زنده‌مانی و تعداد کلونی‌های بیفیدوباکتریوم در مقایسه با نگهداری

[1]- Rotar

[2]- Scharl

Archive of SID

www.SID.ir

در دمای ٤°C بود. ساختار احتمالی برای این یافته را می‌توان به کاهش pH ماست بر اثر نگهداری در دماهای بالاتر از دمای یخچال نسبت‌داد که به افزایش اسیدیته و کاهش احتمال زنده‌مانی و رشد بیفیدو باکتریوم‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها می‌انجامد (۱۷)؛ نکته جالب توجه در این مطالعه، اهتمام پژوهشگران به تهیه ماست پروبیوتیک از شیر هموژنیزه و پاستوریزه در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاه توسط استارترهای صنعتی بود که احتمال مخدوش‌کنندگی تفاوت‌های احتمالی موجود در معیارهای زمینه‌ای ازقبیل نوع مواد اولیه تولید ماست را کاهش‌می‌دهد و توجه به این نکته از مسائل حائز اهمیت در مطالعات آتی درزمینه ارزیابی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در فراورده‌های غذایی غنی‌شده با این میکروارگانیسم‌هاست.

مطالعه حاضر، تنها با هدف شمارش اختصاصی تمامی سویه‌های لاکتوباسیلوس‌ها صورت‌گرفت و دلیل عمده عدم شمارش سایر باکتری‌ها، استناد به احتمال بازدارندگی پروبیوتیک‌ها بر رشد و نمو یکدیگر و شمارش اختصاصی استارتر پروبیوتیکی مهم ماست (لاکتوباسیلوس‌ها) بود؛ درعین‌حال، عدم شمارش بیفیدوباکتریوم‌ها را می‌توان از محدودیت‌های اصلی مطالعه حاضر برشمرد. پیشنهادمی‌شود پیش از افزودن استارتر پربیوتیکی به ماست، پیش از فرایند پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون هم انجام‌شود تا تعداد میکروارگانیسم‌های رقیب و ممانعت‌کننده از رشد لاکتوباسیلوس کاهش‌یابد و همچنین در ارزیابی میکروارگانیسم‌ها، در شرایط کنترل‌شده، تعداد بیفیدوباکتریوم‌ها نیز ارزیابی‌شود؛ از دیگر محدودیت‌های این مطالعه، عدم شمارش کلونی‌های لاکتوباسیلوس‌ها در زمان خروج از خط تولید و همچنین میسرنشدن شمارش لاکتوباسیلوس‌ها در چهار مقطع زمانی در حالت مطلوب (در دفعات منقسم از بدو تولید تا پایان دوره نگهداری در فواصل یکسان) با توجه به محدودیت‌های بودجه پژوهشی بود. تعداد محدود برندهای مورد مطالعه، انجام آزمایش به‌صورت تک-مرکزی (یک شهر) و نیاز به کنترل بیشتر در شرایط نگهداری (مانند شرایط نگهداری در یخچال مراکز فروش لبنیات پربیوتیک و شرایط تولید و افزودن استارترها در کارخانه) از دیگر محدودیت‌های مطالعه حاضر بود که پیشنهادمی‌شود در طراحی و اجرای مطالعات گسترده آتی مورد توجه قرارگیرند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان‌دادند که میزان لاکتوباسیلوس ماست‌های صنعتی عرضه‌شده در بازار که از میکروارگانیسم‌های اصلی ماست پروبیوتیک به‌شمار-می‌روند از حداقل میزان قابل‌قبول توصیه‌شده (10^6CFU/mL) کمتر است و درنتیجه، این فراورده‌ها فاقد ویژگی‌های سلامت‌بخش خود براساس ادعای صورت-گرفته تولیدکنندگان آنها (که روی محصول نیز درج‌شده و به‌طور عمده از طریق حفظ و بهبود توازن فلور میکروبی روده میان میکروارگانیسم‌های سودمند و زیان-بخش صورت‌می‌گیرد) هستند. عواملی متعدد وجوددارند که از رشد و بقای میکرواگانیسم‌های پروبیوتیک و تأثیرگذاری درمانی مطلوب فراورده‌های پروبیوتیک آنها جلوگیری‌می‌کنند که ازجمله مهم‌ترین آنها عدم افزودن کافی استارتر اولیه میکروارگانیسم پروبیوتیک و اهمال در حفظ پایداری ژنتیکی و فیزیکی آنها از زمان تولید و نگهداری تا مرحله فروش و زمان ورود به روده مصرف‌کننده است؛ رفع این موانع به تحقیق‌های بیشتر در قالب کارآزمایی‌های بالینی کنترل‌شده و انسانی گسترده و نظارت منظم و راهبردی بر عملکرد تولید-کنندگان مواد غذایی پروبیوتیک صنعتی نیازمند است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه براساس پایان‌نامه دانشجویی *احسان انصاریان* در مقطع دکترای عمومی دامپزشکی با طرح و بودجه مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار با کد ۱۰۰۷ در سال ۱۳۸۹ انجام‌شد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Williams NT. Probiotics. Am J Health-Syst Pharm. 2010;67(6):449-58.
2. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and immunity. J Gastroenterol. 2009;44(1):26-46.
3. Morrow LE, Gogineni V, Malesker MA. Probiotic, prebiotic, and synbiotic use in critically ill patients. Curr Opin Crit Care. 2012;18(2):186.
4. Wallace TC, Guarner F, Madsen K, et al. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. Nutr Rev. 2011;69(7):392-403.
5. Brenner DM, Moeller MJ, Chey WD, Schoenfeld PS. The utility of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. Am J Gastroenterol. 2009;104(4):1033-49.
6. Scully P, McKernan DP, Keohane J, et al. Plasma cytokine profiles in females with irritable bowel syndrome and extra-intestinal co-morbidity. Am J Gastroenterol. 2010;105(10):2235-43.
7. Borchers A, Selmi C, Meyers F, Keen C, Gershwin ME. Probiotics and immunity. J Gastroenterol. 2009;44(1):26-46.
8. Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, et al. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. Gut. 2010;59(3):325-32.
9. Ezendam J, van Loveren H. Probiotics: Immunomodulation and Evaluation of Safety and Efficacy. Nutr Rev. 2006;64(1):1-14.
10. Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Rezaei K, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. Int J Dairy Technol. 2007;60(2):123-7.
11. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, et al. Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria. Clin Infec Dis. 2003;36(6):775-80.
12. Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. Immunol Cell Biol. 2000;78(1):80-8.
13. Larsen CN, Nielsen S, Kaestel P, et al. Dose-response study of probiotic bacteria Bifidobacterium animalis subsp lactis BB-12 and Lactobacillus paracasei subsp paracasei CRL-341 in healthy young adults. Eur J Clin Nutr. 2006;60(11):1284-93.
14. Ng EW, Yeung M, Tong PS. Effects of yogurt starter cultures on the survival of Lactobacillus acidophilus. Int J Food Microbiol. 2011;145(1):169-75.
15. Elliott E, Teversham K. An evaluation of nine probiotics available in South Africa, August 2003. SAMJ 2008;94(2):121.
16. Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. J Food Microbiol. 2004;97(2):147-56.
17. Dave RI, Shah NP. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. INT DAIRY J. 1997;7(1):31-41.
18. Khanafari A, Akhavan Sepahi A, Esmaeilzadeh M . Estimation of Lactocin productibility potential produced by probiotic strains in local yogurts Lactacins. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2009;4(1):67-78.
19. Taheri P, Ehsani M, Khosravi-Darani K. Effects of Lactobacillus acidophilus La-5 on microbiological characteristics, sensory attributes and phase separation of Iranian Doogh drink during refrigerated storage. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2009;4(3):15-24.
20. Vinderola CG, Bailo N, Reinheimer JA. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. Food Res Int. 2000;33(2):97-102.
21. Shakeri M.A.S, Beiraghi-Tousi SH, Mortazavi S.A.A.GH. Effect of WPC and Casein Hydrolysate Supplementations on Physicochemical and Sensory Properties of Bioyogurt. IJFST. 2006;3(2):1-10.
22. Mortazavian A, Sohrabvandi S. Probiotics and food probiotic products. Tehran: Eta Publication. 2006:131-69. (in persian)
23. Granato D ,Branco GF, Cruz AG, Faria JAF, Shah NP. Probiotic dairy products as functional foods. Compr Rev Food Sci Food Safety. 2010;9(5):455-70.
24. Rotar MA, Semeniuc C, Apostu S, et al. Researches concerning microbiological evolution of lactic acid bacteria to yoghurt storage during shelf-life. J Agroaliment Proc Technol. 2007;13:1.
25. Scharl M, Geisel S, Vavricka SR, Rogler G. Dying in yoghurt: the number of living bacteria in probiotic yoghurt decreases under exposure to room temperature. Digest. 2011;83(1-2):13-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Daneshvar

Medicine

A comparative study of total colony count of the lactobacilli strains during the shelf-life in some samples of commercial probiotic yoghurts

Ehsan Ansarian[1], Maryam Kazemi[2], Mohsen Nematy[3], Afshin Akhondzadeh Basti[4], Tannaz Mousavi[5]

1. School of Veterinary Medicine, Garmsar Azad University, Iran.
2. Department of Nutrition, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
3. Associate Professor - Department of Nutrition, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4. Professor - School of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor - School of Veterinary Medicine, Garmsar Azad University, Iran.

E-mail: NematyM@mums.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Lactobacilli are one of the major microorganisms in the probiotic yoghurt. The therapeutic potentials of these microorganisms are due to their variations and rates of survival during the shelf life of probiotic yoghurt. This study aimed to assess the total colony counts of lactobacillus strains in some examples of typical commercial probiotic yoghurt.

Materials and Methods: In this cross-sectional survey, 50 samples of probiotic yoghurts (10 samples derived from 5 dairy brands) were collected and coded. The variations of all lactobacilli strains were counted after the preparation of surface cultures in 2 stages (1: Mid–day of shelf-life, and 2: 1 day before the expiration date of yoghurt); additionally, the pH of all samples was measured in the latter stage. Data were analyzed using the SPSS program.

Results: The average lactobacilli colony count was lower in the second culture as compared to the first one in 4 out of 5 probiotic yoghurt brands ($p \leq 0.002$). Amongst all estimated samples, the highest number of colony counts was less than the minimum recommended dose (2.9×10^5 vs. 10^6, $p<0.0001$). The mean pH of samples was significantly lower than the optimum pH at the end of the shelf life ($p<0.0001$).

Conclusion: Underrated total colony counts of lactobacilli strains during shelf life, and increased acidity of samples at the end of storage period would exacerbate the potential efficacy and clinical merits of evaluated commercial probiotic yoghurts. Implementing regular quality controls in accordance with national standardized protocols, as well as further extended research are warranted.

Key words: Yoghurt, Probiotic, Lactobacilli, Shelf life

Scientific-Research Journal of Shahed University Twenteeth Year, No.106
August, September 2013

Received: 2013/6/19
Last revised: 2013/9/27
Accepted: 2013/10/8

www.SID.ir