Archive of SID

مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال یازدهم، شماره 3، پاییز 1395، صفحات 62-53

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک سویه‌های مختلف پروبیوتیک در نوشیدنی مالت طی دوره نگهداری یخچالی

رضا محمدی[1]، مریم ذبیح‌زاده[2]، زهره دلشادیان[3]، زهرا سرلک[4]، سید امیرمحمد مرتضویان[5]، محمدیار حسینی[6]

1- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات عوامل محیطی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
2- کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
3- گروه علوم تغذیه، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
4- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، مرکز تحقیقات تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
5- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیک: mortazvn@sbu.ac.ir
6 - گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران

تاریخ دریافت: 94/7/8 تاریخ پذیرش: 94/10/16

چکیده

سابقه و هدف: غنی‌سازی نوشیدنی‌ها با اجزای فراسودمند نظیر پروبیوتیک‌ها از پیشرفته‌ای اخیر در زمینه تولید آب میوه‌ها است در این پژوهش، اثر متغیرهای نوع کشت پروبیوتیک و همچنین مقدار pH اولیه نگهداری (4/3 و 4/8) بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک ماءالشعیر پروبیوتیک طی 21 روز نگهداری در 5°C مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک (*ل. اسیدوفیلوس*، *ل. کازئی*، *ل. روتری*، *ل. فرمنتوم* و *ل. پلنتاروم*) به نمونه‌های نوشیدنی مالت اضافه و سپس در pHهای مختلف (4,3 و 4,8) و به مدت 21 روز در دمای یخچال نگهداری شد. سپسpH ، اسیدیته، پتانسیل احیا قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در طی 7 روز مورد ارزیابی قرار گرفت. pH توسط دستگاه pH متر اندازه‌گیری شدند. مقدار اسیدیته قابل تیتر، بوسیله تیتراسیون با سود 0/1 نرمال محاسبه شد. شمارش پروبیوتیک‌ها در محیط MRS آگار انجام شد.

یافته‌ها: در هر دو pH اولیه، *ل. کازئی* و *ل. اسیدوفیلوس* نسبت به گونه‌های پروبیوتیک دیگر، بیشترین تغییرات را در خواص بیوشیمیایی طی 21 روز نگهداری یخچالی از خود نشان دادند. *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. پلنتاروم* در هر دو pH اولیه، بیشترین تغییرات بیوشیمیایی را در محدوده 7-0 روز نگهداری یخچالی از خود نشان دادند. این در حالی است که سایر گونه‌های پروبیوتیک تلقیح شده، فقط در pH اولیه 4/8 این ویژگی را داشتند. قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها طی 21 روز نگهداری یخچالی کاهش یافت ولی شدت این کاهش، در تیمارهای با pH اولیه 4,3 بیشتر از تیمارهای با pH اولیه 4,8 بود. *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. فرمنتوم* کمترین ماندگاری را نسبت به سایر پروبیوتیک‌ها در ماءالشعیر طی 21 روز نگهداری یخچالی داشتند. بیشترین قابلیت زیستی طی 21 روز نگهداری یخچالی در تیمارهای با pH اولیه 4/3، مربوط به *ل. روتری* و در تیمارهای با pH اولیه 4/8، مربوط به *ل. پلنتاروم* بود.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که مقدار pH اولیه و همچنین نوع گونه پروبیوتیک تلقیح شده در نوشیدنی مالت، در مقدار تغییرات بیوشیمیایی و قابلیت زیستی آن مؤثر بودند. بنابراین نوشیدنی مالت می‌تواند گزینه مناسبی برای رشد پروبیوتیک‌ها باشد.

واژگان کلیدی: بیوشیمیایی، پروبیوتیک، قابلیت زیستی، ماءالشعیر بدون الکل

• مقدمه

امروزه گرایش زیادی به مصرف مواد غذایی فراویژه یعنی غذاهای دارای ارزش دارویی و تغذیه‌ای ویژه علاوه بر خواص تغذیه‌ای پایه، به وجود آمده است. پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین بیوتیک‌ها و محصولات غنی شده تغذیه‌ای، همگی از جمله این مواد غذایی هستند. اداره غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد (FAO) و سازمان بهداشت

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:05 IRST on Sunday October 30th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:05 IRST on Sunday October 30th 2016

جهانی (WHO) پروبیوتیک را این گونه تعریف می‌کند: «پروبیوتیک‌ها میکرو ارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف کافی آنها سبب نمایان شدن اثرات سلامت بخش در بدن میزبان می‌شود» (1). در نتیجهٔ مصرف مواد غذایی فراویژه، جمعیت میکروب‌های ساکن روده از تعادل بهتری برخوردار می‌شوند که به موجب آن سلامت بیشتری را برای مصرف کنندگان به دنبال دارد. مصرف فرآورده‌های پروبیوتیک از روش‌های مناسب و مؤثر تنظیم فلور میکروبی روده است. ویژگی‌های سلامت بخشی مانند خواص ضد سرطان‌زایی، ضد جهش‌زایی، ضد عفونتی، تحریک سیستم ایمنی، کاهش دهندگی کلسترول سرم، افزایش ارزش تغذیه‌ای غذا، درمان انواع اسهال، عفونت‌های دستگاه گوارش و دستگاه ادراری تناسلی به این ریززنده‌ها نسبت داده می‌شود (6-2).

در حال حاضر بیش از 75 فرآورده لبنی محتوی پروبیوتیک‌ها در سراسر جهان تولید می‌شود و نیز تلاش برای استفاده از ترکیبات پری بیوتیک در کنار پروبیوتیک‌ها آغاز شده است (2، 1). اخیراً تقاضای مصرف‌کننده‌ها برای محصولات پروبیوتیکی که برپایه لبنیات نباشند, افزایش یافته است و این محصولات می‌توانند به عنوان یک محصول سلامتی بخش برای گیاهخوران و مصرف‌کنندگانی که به محصولات لبنی آلرژی دارند استفاده گردد (3). مطالعات محدودی در رابطه با به‌کارگیری باکتری‌های پروبیوتیک در فرمولاسیون آب میوه جات در ایران صورت گرفته است لکن مشکلاتی نظیر وجود مقادیر قابل توجه چربی و حساسیت طیف وسیعی از مردم به لاکتوز موجود در شیر، به تدریج زمینه را برای انجام آزمایشات گوناگون بر روی فرآورده‌هایی غیر از لبنیات آماده کرده است(3). یکی از نوشیدنی‌هایی که به دو صورت دارای الکل و فاقد آن در سرتاسر دنیا مصرف می‌شود، ماءالشعیر و نوشیدنی مالت است. این نوشیدنی تاریخ چندهزار ساله دارد و در مصر باستان و بین‌النهرین مورد استفاده قرار می‌گرفته است، اما قدیمی‌ترین شواهد شیمیایی موجود از نوشیدنی مالت، به حدود 3500 سال قبل از میلاد از گدین تپه، واقع در سلسله جبال زاگرس در غرب ایران حکایت دارد. به تدریج این نوشیدنی الکلی در تمام دنیا رایج و در تمام کشورها تولید شد. پیش از انقلاب نوع الکلی ماءالشعیر در ایران تولید می‌شد. بعد از انقلاب تولید ماءالشعیر الکلی قطع شد و شرکت‌های داخلی سیستم‌های خود را تغییر داده و به تولید ماءالشعیر و نوشیدنی مالت پرداختند. مواد اولیه ماءالشعیر متداول را مالت جو، رازک و مخمر تشکیل می‌دهند. با توجه به خصوصیات تغذیه‌ای نوشیدنی مالت و هم‌چنین مطالب ذکر شده در بالا، نوشیدنی مالت می‌تواند محیط مناسبی برای انتقال پروبیوتیک‌ها باشد (7، 3) که در این مقاله به بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک سویه‌های مختلف پروبیوتیک در نوشیدنی مالت طی دوره نگهداری یخچالی می‌پردازیم.

• مواد و روش‌ها

آماده‌سازی پروبیوتیک‌ها برای کشت: پروبیوتیک‌های مورد تحقیق از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شدند. ابتدا کشت چهار منطقه‌ای مورب در پلیت حاوی MRS-Agar انجام گردید تا کلنی میکربی به دست آید. در شرایط دمایی 37 درجه سانتی‌گراد داخل جار حاوی co_2، برای گونه *لاکتوباسیلوس* ، تک کلنی‌ها را کشت انبوه داده و سپس رنگ‌آمیزی گرم کرده و به مشاهده باسیل‌های گرم مثبت پرداخته شد.

کشت گونه‌ها: ابتدا 5 ارلن محیط کشت که هر ارلن حاوی cc 100 محیط کشت MRS-Broth بود آماده‌سازی گردید. از هرگونه باکتری به طور جداگانه در کنار شعله به داخل هر ارلن وارد کرده، در داخل انکوباتور به مدت 24 ساعت قرار داده شد تا باکتری‌ها رشد نمایند. پس از گذشت 24 ساعت از تلقیح اولیه و اطمینان از رشد آنها, هم از طریق مشاهده با چشم غیر مسلح که رسوب باکتری در داخل محیط کشت نشانگر آن بود، جهت تأیید خلوص کشت از رنگ‌آمیزی و مشاهده لام توسط میکروسکوپ نوری استفاده گردید. سپس در شرایط استریل 10 mL از محیط کشت MRS-Broth توسط پیپت استریل به فالکون استریل منتقل گردید و به مدت 10 دقیقه با دور چرخش 3500 g سانتریفوژ برای هر یک از سوش‌های مورد تحقیق انجام شد. سپس مایع رویی شناور جدا گردید و بر روی رسوب (جسم باکتری) محلول رینگر استریل به منظور تهیه مایه تلقیح اضافه شد.

سپس با دستگاه اسپکتروفتور مقداری کمی از کدورت ایجاد شده به طور جداگانه به سل مخصوص اسپکتوفتومتر وارد گردید و پس از قرار دادن سل در داخل دستگاه میزان جذب نوری (OD) در طول موج 623 nm (که عموماً برای باکتری‌ها استفاده می‌گردد), برای هر یک از گونه‌های باکتری اندازه‌گیری و ثبت گردید.

تلقیح گونه‌های مورد تحقیق به نوشیدنی مالت: برای این منظور در زیر هود لامینار و در کنار شعله در شرایط کاملاً استریل تعداد 20 عدد یورین باتل (به تعداد سوش‌های مورد آزمون و در نظر گرفتن دوره‌های زمانی ارزیابی شاخص‌ها) که از قبل استریل شده بود قرار داده شد، سپس نوشیدنی مالت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:05 IRST on Sunday October 30th 2016

تهیه شده از شرکت بهنوش به میزان 100 mL به هر یک از یورین باتل‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد، مایه تلقیح تهیه شده از هر یک از سوش‌ها به هر یک از یورین باتل‌های حاوی نوشیدنی مالت با نسبت 7% تلقیح شد. سپس یورین باتل‌ها در دمای یخچالی 5 درجه سلسیوس مورد نگهداری قرار گرفت تا در دوره‌های زمانی مورد نظر (روز 0، 7، 14، 21) از نظر شاخص‌های (pH، اسیدیته قابل تیتر، پتانسیل احیا، قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌های *ل. اسیدوفیلوس، ل. کازئی، ل. فرمنتوم، ل. رئوتری، ل. پلنتاروم*) مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج کل باکتری‌های زنده در زمان‌های مختلف بر اساس روش کشت مخلوط بررسی و ثبت گردید.

روش‌های اندازه‌گیری شاخص‌ها

تعیین قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک: شمارش اختصاصی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک *ل. اسیدوفیلوس، ل. کازئی، ل. پلنتاروم، ل. فرمنتوم، ل. رئوتری*، با استفاده از محیط کشت MRS-Agar مطابق با روش مرتضویان و همکاران(4) انجام شدند.

ضریب نسبی قابلیت زیستی (VPI) پروبیوتیک‌ها از طریق رابطه زیر به دست آمد:

ضریب نسبی قابلیت زیستی= جمعیت نهایی (cfu/ml) / جمعیت اولیه (cfu/ml)

بنابراین هرچه مقدار VPI به 1 نزدیک‌تر باشد، نشان‌دهنده تغییرات کمتری در جمعیت پروبیوتیک‌ها خواهد بود.

شاخص‌های شیمیایی

اندازه‌گیری pH: نمونه‌ها طی دوره نگهداری یخچالی با استفاده از pH متر اندازه‌گیری شد. سرعت متوسط افت pHطی دوره نگهداری از رابطه زیر محاسبه شد (4):

$$\text{سرعت متوسط افت (واحد/روز)} = \frac{\text{pH نهایی} - \text{pH اولیه}}{\text{زمان (روز)}}$$

سنجش اسیدیته قابل تیتر: برای اندازه‌گیری اسیدیته نمونه‌ها بر اسید لاکتیک، 20 نمونه با 20 آب مقطر مخلوط و با سود 0/1 نرمال در حضور معرف فنل فتالئین تیتر شد. مقدار این شاخص بر حسب درجه دورنیک از فرمول زیر محاسبه شد(4):

حجم سود مصرفی (میلی‌لیتر) x 9 = اسیدیته قابل تیتر (درجه دورنیک)

سرعت متوسط افزایش اسیدیته قابل تیتر در نمونه‌ها طی نگهداری یخچالی از رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{سرعت متوسط افزایش اسیدیته (درجه درنیک/زمان (روز))} = \frac{\text{اسیدیته قابل تیتر اولیه} - \text{اسیدیته قابل تیتر نهایی}}{\text{زمان (روز)}}$$

پتانسیل احیا: پتانسیل احیا در نمونه‌ها با استفاده از pH متر مجهز به الکترود بر حسب میلی ولت اندازه‌گیری شد.

سرعت متوسط افزایش پتانسیل احیا در نمونه‌ها طی دوره نگهداری از رابطه زیر محاسبه شد(4):

$$\text{سرعت متوسط افزایش پتانسیل احیا (میلی ولت/ روز)} = \frac{\text{پتانسیل احیا اولیه} - \text{پتانسیل احیا پایانی}}{\text{زمان (روز)}}$$

ارزیابی آماری: این پژوهش بر اساس طرح فاکتوریل کامل طراحی شد و کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد همچنین تحلیل واریانس دو طرفه و آزمون دانکن (در سطح معنی‌داری 0/05) برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها برای یافتن تفاوت معنی‌دار میان میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار $SPSS_{16}$ استفاده شد. تمامی نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

• یافته‌ها

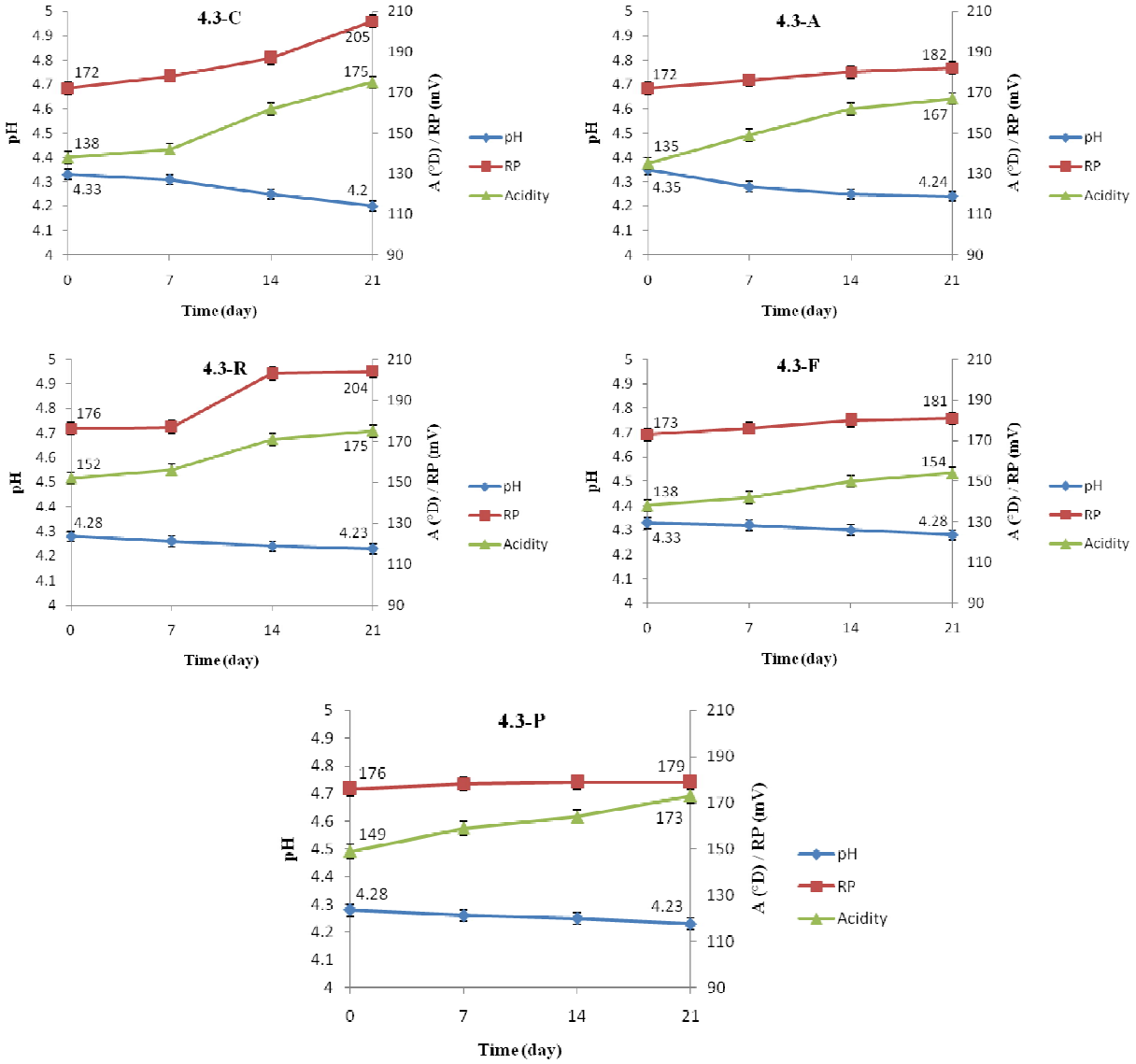
اثرات نوع کشت پروبیوتیک و مقدار pH اولیه بر شاخص‌های بیوشیمیایی طی نگهداری یخچالی: با توجه به شکل‌های 1، 2 و جدول 1 ، در همه تیمارها به جز تیمارهای شاهد (بدون پروبیوتیک)، تغییرات معنی‌داری در خواص بیوشیمیایی هر تیمار طی 21 روز نگهداری یخچالی (با اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی هر هفت روز) مشاهده شد (مقایسه خواص بیوشیمیایی در روز 21 با روز صفر در هر تیمار) ($p<0/05$). مطابق با شکل‌های 1 و 2 ، بیشترین میزان افت pH در بین همه تیمارها، به‌طور مشترک مربوط به سه تیمار A-4/8، C-4/8و P-4/8 بود و بیشترین مقدار افزایش پتانسیل احیا و افزایش اسیدیته قابل تیتر در پایان 21 روز نگهداری یخچالی، از بین همه تیمارها مربوط به تیمار C-4/3 بود. مطابق با جدول 1 ، بیشترین مقدار سرعت میانگین افت pH در بین همه تیمارها به‌طور مشترک مربوط به سه تیمار A-4/8، C-4/8و P-4/8بود و اختلاف کاملاً معنی‌داری بین سرعت میانگین افت pH این سه تیمار با تیمارهای دیگر وجود داشت ($p<0/05$). بیشترین مقدار سرعت میانگین افزایش اسیدیته قابل تیتر و سرعت میانگین افزایش پتانسیل احیا در بین همه تیمارها مربوط به تیمار C-4.3 بود و اختلاف معنی‌داری بین سرعت میانگین افزایش اسیدیته قابل تیتر و سرعت میانگین افزایش پتانسیل احیا این تیمار با تیمارهای

www.SID.ir

Archive of SID

دیگر وجود داشت (p<0/05). مطابق با جدول 1 ، کمترین مقدار سرعت میانگین افت pH در بین همه تیمارها، به‌طور مشترک (بدون تفاوت معنی‌دار) مربوط به سه تیمار 4/3-F ، 4/3-R و 4/3-P بود و تفاوت کاملاً معنی‌داری در مقایسه بین این سه تیمار با تیمارهای دیگر وجود داشت (p<0/05). کمترین مقدار سرعت میانگین افزایش اسیدیته قابل تیتر در بین همه تیمارها مربوط به تیمار 4/8-A بود. اختلاف کاملاً معنی‌داری بین این تیمار با تیمارهای دیگر به جز تیمارهای 4/8-C و 4/8-P وجود داشت (p<0/05). اختلاف بین تیمار 4/8-A با تیمارهای 4/8-C و 4/8-P تفاوت معنی‌دار بود.

کمترین مقدار سرعت میانگین افزایش پتانسیل احیا در بین همه تیمارها مربوط به تیمار 4/3-P بود و تفاوت کاملاً معنی‌داری بین این تیمار با تیمارهای دیگر وجود داشت (p<0/05). همچنین مطابق با این جدول، از نظر مقدار اسیدیته قابل تیتر نهایی، تیمارهای 4/3-C ، 4/3-R و 4/3-P بیشترین مقدار و تیمارهای 4/3-F و 4/3-R کمترین مقدار را از خود نشان دادند. زمان اوج تخمیر در همه تیمارها به جز سه تیمار 4/3- C ، 4/3- F و 4/3- R در محدوده 7-0 روز بود. در حالی که زمان اوج تخمیر سه تیمار 4/3- C ، 4/3- F و 4/3- R در محدوده 14-7 روز بود.



شکل 1. تغییرات pH، اسیدیته قابل تیتر و پتانسیل احیا طی 21 روز نگهداری یخچالی (5°C) در تیمارهای با pH اولیه طبیعی (4/3) و تلقیح شده با سوش‌های پروبیوتیک (A=*ل. اسیدوفیلوس*، C=*ل. کازئی*، F=*ل. فرمنتوم*، R=*ل. روتری* و P=*ل. پلنتاروم*)

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:05 IRST on Sunday October 30th 2016

www.SID.ir

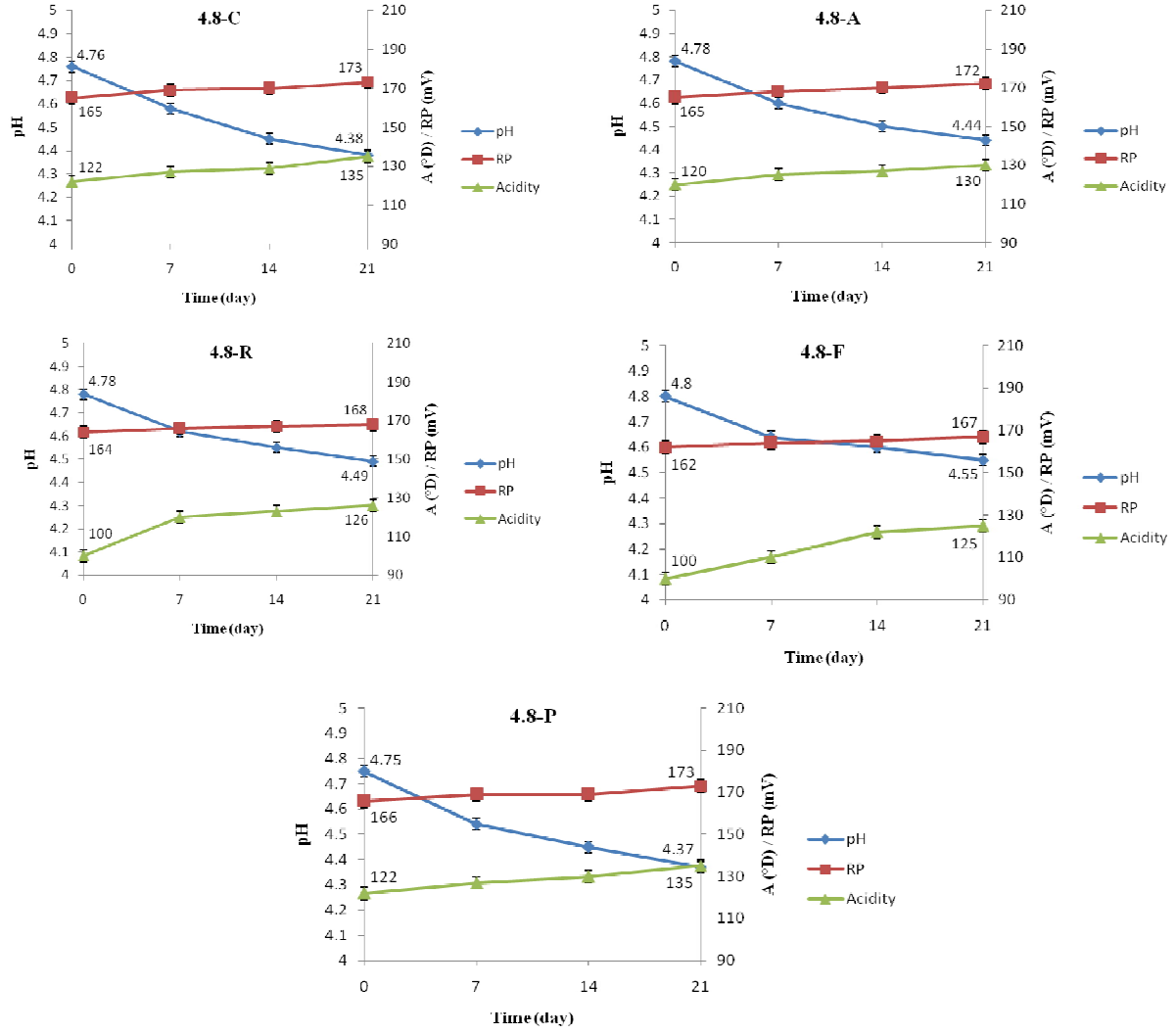
Archive of SID

جدول 1. مقایسه اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی تیمارهای مختلف در طی نگهداری یخچالی (5°C)*

شاخص‌ها تیمار**	سرعت میانگین افتpH (/1 روز)	سرعت میانگین افزایش اسیدیته قابل تیتر (درجه دورنیک/ روز)	سرعت میانگین افزایش پتانسیل احیا (میلی ولت/ روز)	زمان اوج تخمیر (روز)	اسیدیته قابل تیتر اولیه (درجه دورنیک) روز صفر	اسیدیته قابل تیتر نهایی (درجه دورنیک) روز 21
4,3-A	0/005^{c}	1/52^{b}	0/47^{c}	0-7	135^{b}	167^{b}
4,3-C	0/006^{c}	1/76^{a}	1/57^{a}	7-14	138^{b}	175^{a}
4,3-F	0/002^{d}	0/76^{e}	0/38^{d}	7-14	138^{b}	154^{c}
4,3-R	0/002^{d}	1/09^{cd}	1/33^{b}	7-14	152^{a}	175^{a}
4,3-P	0/002^{d}	1/14^{cd}	0/14^{f}	0-7	149^{a}	173^{a}
4,8-A	0/016^{a}	0/47^{f}	0/33^{d}	0-7	120^{c}	130^{d}
4,8-C	0/018^{a}	0/61^{ef}	0/38^{d}	0-7	122^{c}	135^{d}
4,8-F	0/011^{b}	1/19^{c}	0/23^{e}	0-7	100^{d}	125^{e}
4,8-R	0/013^{b}	1/23^{c}	0/19^{e}	0-7	100^{d}	126^{e}
4,8-P	0/018^{a}	0/61^{ef}	0/33^{d}	0-7	122^{c}	135^{d}

* میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوتند ($p<0.05$).

** 4/3= pH اولیه طبیعی، 4/8= pH اولیه افزایش یافته، A=*ل. اسیدوفیلوس*، C=*ل. کازئی*، F=*ل. فرمنتوم*، R=*ل. روتری* و P=*ل. پلنتاروم*



شکل 2. تغییرات pH، اسیدیته قابل تیتر و پتانسیل احیا طی 21 روز نگهداری یخچالی (5°C) در تیمارهای با pH اولیه افزایش یافته (4/8) و تلقیح شده با سوش‌های پروبیوتیک (A=*ل. اسیدوفیلوس*، C=*ل. کازئی*، F=*ل. فرمنتوم*، R=*ل. روتری* و P=*ل. پلنتاروم*)

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:05 IRST on Sunday October 30th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:05 IRST on Sunday October 30th 2016

بررسی قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها طی نگهداری یخچالی: با توجه به جدول‌های 2 و 3، در همه تیمارها تغییرات معنی‌داری در قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها طی 21 روز نگهداری یخچالی (با شمارش پروبیوتیک‌ها هر هفت روز) مشاهده شد ($p<0/05$). مطابق با جدول 2، با مقایسه همه تیمارها، اختلاف معنی‌داری در قابلیت زیستی تیمارها در روز صفر وجود نداشت ($p>0/05$). در روز 7 و همچنین 14 نگهداری یخچالی، بیشترین و کمترین قابلیت زیستی به ترتیب مربوط به تیمارهای 4/8-R و 4/3-P بود ($p<0/05$). در روز 21 نگهداری یخچالی تیمار 4/8-P بیشترین و دو تیمار 4/3-A و 4/3-F به‌طور مشترک (بدون تفاوت معنی‌دار) کمترین قابلیت زیستی را داشتند. همچنین با توجه به جدول 3 و با مقایسه VPI هر 7 روز در این تیمارها، بیشترین ضریب قابلیت زیستی در روز 7 نسبت به روز صفر و همچنین 14 نسبت به روز صفر مربوط به تیمار 4/8-R بود. بیشترین و کمترین ضریب قابلیت زیستی در روز 14 نسبت به روز 7، به ترتیب در تیمارهای 4/8-C و 4/3-A مشاهده شد. بیشترین ضریب قابلیت زیستی در روز 21 نسبت به روزهای صفر و 14 مربوط به تیمار 4/8-Pبود. کمترین ضریب قابلیت زیستی در روز 21 نسبت به روز صفر به‌طور مشترک در تیمارهای 4/3-A، 4/3-C ، 4/3- F ، 4/3-R و 4/3-P مشاهده شد و کمترین ضریب قابلیت زیستی در روز 21 نسبت به روز 14 مربوط به تیمار 4/3-F بود.

جدول2. مقایسه قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در تیمارهای مختلف در طی 21 روز نگهداری یخچالی (5°C)*

تیمار**	قابلیت زیستی (log cfu/mL)			
	روز صفر	روز 7	روز 14	روز 21
4/3-A	$8/01^{aA}$	$7/34^{dB}$	$5/39^{iC}$	$4/00^{gD}$
4/3-C	$8/00^{aA}$	$6/71^{fB}$	$5/95^{hC}$	$5/00^{fD}$
4/3-F	$8/02^{aA}$	$7/51^{cB}$	$6/54^{fC}$	$4/30^{gD}$
4/3-R	$8/03^{aA}$	$7/53^{cB}$	$6/36^{gC}$	$5/92^{eD}$
4/3-P	$8/02^{aA}$	$6/37^{gB}$	$5/07^{jC}$	$4/95^{fC}$
4/8-A	$8/00^{aA}$	$7/38^{dB}$	$7/14^{dC}$	$6/60^{dCD}$
4/8-C	$8/01^{aA}$	$7/50^{cC}$	$7/72^{cB}$	$7/49^{cC}$
4/8-F	$8/00^{aA}$	$7/21^{eB}$	$7/08^{deC}$	$6/60^{dD}$
4/8-R	$8/00^{aC}$	$8/32^{aA}$	$8/14^{aB}$	$7/62^{bD}$
4/8-P	$8/01^{aAB}$	$8/06^{bA}$	$7/96^{bB}$	$7/94^{aB}$

***** میانگین‌هایی که با حروف کوچک و بزرگ متفاوت نشان داده شده اند، به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار میان میانگین‌ها در ستون‌ها و سطرها هستند ($p<0/05$).

** 4/3= pH اولیه طبیعی، 4/8= pH اولیه افزایش یافته، A=*ل. اسیدوفیلوس*، C=*ل. کازئی*، F=*ل. فرمنتوم*، R=*ل. روتری* و P=*ل. پلنتاروم*

جدول3. مقایسه ضریب نسبی قابلیت زیستی (VPI) پروبیوتیک‌ها در تیمارهای مختلف در طی 21 روز نگهداری یخچالی (5°C)

تیمار*	VPI_7	VPI_{14}		VPI_{21}	
		روز صفر	روز 7	روز صفر	روز 14
4/3-A	0/21	0/00	0/01	0/00	0/04
4/3-C	0/05	0/00	0/17	0/00	0/11
4/3-F	0/30	0/03	0/10	0/00	0/00
4/3-R	0/31	0/02	0/06	0/00	0/36
4/3-P	0/02	0/00	0/05	0/00	0/75
4/8-A	0/24	0/13	0/57	0/04	0/28
4/8-C	0/30	0/51	1/66	0/30	0/58
4/8-F	0/16	0/12	0/74	0/04	0/33
4/8-R	2/09	1/38	0/66	0/41	0/30
4/8-P	1/12	0/89	0/79	0/85	0/95

* 4/3= pH اولیه طبیعی، 4/8= pH اولیه افزایش یافته، A=*ل. اسیدوفیلوس*، C=*ل. کازئی*، F=*ل. فرمنتوم*، R=*ل. روتری* و P=*ل. پلنتاروم*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:05 IRST on Sunday October 30th 2016

• بحث

اثرات نوع کشت پروبیوتیک و مقدار pH اولیه بر شاخص‌های بیوشیمیایی طی نگهداری یخچالی: مطابق با شکل 1 ، در همه تیمارها تغییرات معنی‌داری در خواص بیوشیمیایی هر تیمار طی 21 روز نگهداری یخچالی مشاهده شد (مقایسه خواص بیوشیمیایی در روز 21 با روز صفر در هر تیمار) ($p<0/05$). این در حالی است که نمونه شاهد (بدون افزودن پروبیوتیک) هیچ‌گونه تغییری در شاخص‌های بیوشیمیایی از خود نشان نداد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). بنابراین تنها عامل ایجاد تغییرات بیوشیمیایی در ماءالشعیر پروبیوتیک طی 21 روز نگهداری یخچالی، تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک تلقیح شده بوده و هیچ‌گونه آلودگی میکروبی (به‌عنوان مثال آلودگی حاصل از اسید لاکتیک باکتری‌ها) باعث ایجاد این تغییرات نبوده است. همچنین Wzorek و همکاران (5) تغییرات بیوشیمیایی باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک را به مدت 8 هفته در دمای 6°C در نوشیدنی مالت بررسی کرده و اعلام کردند که در دمای 6°C مقدار pH از 3/97 به 3/46 و مقدار اسیدیته از 0/14 به 0/27 g/100 ml رسید و این کاهش، pH را به تخمیر قندها در نوشیدنی مالت نسبت دادند. همچنین بعضی از محققین پیشنهاد داده‌اند که افت pH طی نگهداری یخچالی در نتیجه آنزیم‌هایی است که به وسیله استارترها طی تخمیر تولید می‌شوند. این کاهش pH را به پس اسید سازی طی نگهداری یخچالی در نتیجه آنزیم بتاگالاکتوزیداز که در دمای 0-5°C نیز فعال است، نسبت داده است. (6) . در این مطالعه امکان دارد علت کاهش pH طی 21 روز نگهداری یخچالی، خودکافت برخی از سلول‌های از پیش کشته شده پروبیوتیک‌ها به سبب شرایط نامناسب محیط باشد. این در حالی است که سهراب‌وندی و همکاران (1391) گزارش کردند که این خودکافت باکتری‌های پروبیوتیک سبب متلاشی شدن سلول‌ها و آزاد سازی اسیدهای آمینه، پپتیدها و پروتئین‌ها در محیط شده که در نهایت منجر به افزایش pH می‌شود (7).

تفاوت در مقدار اسید لاکتیک تولید شده توسط اسید لاکتیک باکتری‌ها به تفاوت آن‌ها در توانایی تخمیر قند بستگی دارد که این توانایی تخمیر، نه تنها در گونه‌های مختلف، بلکه در سوش‌های مختلف یک گونه نیز با یکدیگر متفاوت است. Moneta و Libudzis (8) گزارش کردند که *ل. اسیدوفیلوس* Ch-5 طی 24 ساعت تخمیر 0/6 درصد اسید لاکتیک ولی *ل. اسیدوفیلوس* A92 در همین مدت، 2/3 درصد اسید لاکتیک تولید می‌کنند. ثابت شده است که *ل. اسیدوفیلوس* می‌تواند در دمای یخچالی و در pHهای پایین محصولات لبنی تخمیری، با سرعت بسیار بیشتری از سایر گونه‌های پروبیوتیک باعث تخمیر قندها و تولید اسیدهای آلی در محیط شود (10، 9). همچنین Gilliland و Lara (11) اعلام کردند در دمای یخچالی حتی سوش هایی از *ل. اسیدوفیلوس* که قادر به تشکیل کلنی در محیط کشت شمارش نبودند، هنوز فعالیت بتاگالاکتوزیدازی خود را حفظ کرده بودند. در مورد *ل. کازئی*، در مقالات متعددی بر قدرت بالای تخمیر این گونه در دمای یخچالی اشاره شده است (13، 12، 10). ضمن این که خاصیت پروتئولیتیک این گونه، باعث رشد و بقای بیشتر این گونه نسبت به سایر گونه‌های پروبیوتیک و در پی آن تخمیر بیشتر قندها می‌شود (15 ،14). از جمله شرایط مساعد برای اکثر پروبیوتیک‌ها، محیط دارای اکسیژن مولکولی پایین می‌باشد. بر اساس تحقیقات Champagne و همکاران (16)، یکی از روش‌های اثر اکسیژن روی پروبیوتیک‌ها اثر مستقیم بر سلول است. بدین صورت که کشت‌های پروبیوتیک به اکسیژن بسیار حساس هستند و در حضور اکسیژن، قابلیت زیستی آن‌ها کاهش می‌یابد و احتمال تولید پراکسید هیدروژن داخل سلولی وجود دارد. همچنین تخمیر پروبیوتیک‌ها در اکثر تیمارها تا روز 7 نگهداری، باعث کاهش pH، افزایش اسیدیته و افزایش پتانسیل احیای محصول شده (شکل 1 و 2) که خود در نهایت عاملی نامطلوب و بازدارنده برای فعالیت بیوشیمیایی پروبیوتیک‌ها در ادامه دوره نگهداری شد. Luckow و همکاران (17) گزارش کردند که آب میوه‌هایی که pH آن‌ها خنثی شده بود، هیچ اثر بازدارنده‌ای روی رشد و فعالیت باکتری‌های آغازگر اسیدلاکتیک و پروبیوتیک‌ها نداشتند.

اثرات نوع کشت پروبیوتیک و مقدار pH اولیه بر قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها طی نگهداری یخچالی: مطابق با جدول 2، قابلیت زیستی همه تیمارها در روز صفر با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. که همین موضوع، تأییدی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:05 IRST on Sunday October 30th 2016

بر قابل مقایسه بودن این شاخص در همه تیمارها طی نگهداری یخچالی است. در همه تیمارها تغییرات معنی‌داری در قابلیت زیستی هر تیمار طی 21 روز نگهداری یخچالی مشاهده شد (مقایسه قابلیت زیستی طی 21 روز نگهداری یخچالی در هر تیمار)، به طوری که جمعیت نهایی پروبیوتیک-ها در پایان دوره نگهداری یخچالی در تمامی تیمارها به‌طور معنی‌داری کمتر از روز صفر بود (p<0/05)، با توجه به جدول 3 ، ضریب نسبی قابلیت زیستی (VPI) روز 21 نسبت به روز صفر در همه تیمارهای با pH اولیه 4/3، صفر بود درحالی‌که VPI تیمارهای با pH اولیه 4/8، کمتر از یک و بیشتر از تیمارهای با pH اولیه 4/3 بود. بنابراین قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در محیط ماءالشعیر به‌طور کلی طی دوره نگهداری یخچالی کاهش یافت ولی شدت این کاهش، در تیمارهای با pH اولیه 4/3 بیشتر از تیمارهای با pH اولیه 4/8 بود. علاوه بر pH اولیه، مقدار سرعت افت pH طی نگهداری یخچالی و مقدار pH نهایی نیز بر قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها مؤثر است. به طوری که با توجه به جدول‌های 2 و 3، کمترین قابلیت زیستی طی 21 روز نگهداری یخچالی در هر دو pH اولیه (4/3 و 4/8) به‌طور مشترک در *ل. اسیدوفیلوس* و *ل. فرمنتوم* مشاهده شد. بنابراین این دو گونه پروبیوتیک، کمترین ماندگاری را نسبت به سایر پروبیوتیک‌ها در ماءالشعیر طی 21 روز نگهداری یخچالی داشتند. حساسیت پروبیوتیک‌ها به عوامل نامساعد محیطی ماءالشعیر، تاکنون در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است. مطالعات نشان داده است که pH پایین فرآورده‌های تخمیری از مهم‌ترین عوامل مؤثر در افت قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها است (4، 18). ماءالشعیر دارای انواع ترکیبات گوناگون با خواص ضد باکتری همچون ترکیبات فنلی، مشتقات رازک و انواع اسیدهای آلی است (19) که ممکن است سبب افزایش افت قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها طی نگهداری یخچالی شوند. دلیل دیگر برای کاهش بارز قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک در ماءالشعیر می‌تواند مجاور سازی ناگهانی سلول‌ها با شرایط خطر زای محیط پس از تلقیح باشد که احتمالاً باعث وارد آمدن شوک تنش به آن‌ها می‌شود. مشخص شده است که در شیر تخمیری با pH پایین (4/2 یا 4/0)، قابلیت زیستی سلول‌های پروبیوتیک که پیش از تخمیر به محیط شیر افزوده می‌شوند به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از شرایطی است که این باکتری‌ها پس از اتمام تخمیر تلقیح می‌شوند. علت آن است که در شرایط نخست، پروبیوتیک‌ها از قابلیت بیشتر در سازگار شدن به محیط تخمیری برخوردار می‌شوند (20).

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که در همه تیمارها تغییرات معنی‌داری در خواص بیوشیمیایی هر تیمار طی 21 روز نگهداری یخچالی مشاهده شد (مقایسه خواص بیوشیمیایی در روز 21 با روز صفر در هر تیمار) (p<0/05). این در حالی است که نمونه شاهد (بدون افزودن پروبیوتیک) هیچ‌گونه تغییری در شاخص‌های بیوشیمیایی از خود نشان نداد. بنابراین تنها عامل ایجاد تغییرات بیوشیمیایی در ماء-الشعیر پروبیوتیک طی 21 روز نگهداری یخچالی، تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک تلقیح شده بوده و هیچ‌گونه آلودگی میکروبی (به‌عنوان مثال آلودگی حاصل از اسید لاکتیک باکتری‌ها) باعث ایجاد این تغییرات نبوده است. مقدار pH اولیه و همچنین نوع گونه پروبیوتیک تلقیح شده، به دلیل تفاوت در قدرت تخمیر گونه‌های مختلف پروبیوتیک در دمای یخچالی، در مقدار تغییرات بیوشیمیایی مؤثر بودند. به طوری که در هر دو pH اولیه، *ل. کازئی* و *ل. اسیدوفیلوس* نسبت به گونه‌های پروبیوتیک دیگر، بیشترین تغییرات را در خواص بیوشیمیایی طی 21 روز نگهداری یخچالی از خود نشان دادند. با درنظر گرفتن حداقل جمعیت رضایت‌بخش پروبیوتیک‌ها (10^7cfu/ml)، تیمارهای 4/8-C، 4/8-R و 4/8-P تا پایان 21 روز نگهداری در دمای یخچالی برای مصرف به‌عنوان حامل باکتری‌های پروبیوتیک، مناسب بودند. همچنین تیمارهای 4/8-A و 4/8-F فقط تا 14 روز و تیمارهای 4/3-A، 4/3-F و 4/3-R فقط تا 7 روز قابلیت نگهداری یخچالی را داشتند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:05 IRST on Sunday October 30th 2016

References

1. Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Rezae K, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. In J Dairy Tech 2007; 60(2): 23-27.
2. Mortazavian AM, Sohrabvandi S. Probiotic products. In: Mortazavian AM, editor. Probiotics and food probiotic products based on dairy probiotic products. 1st ed. Tehran: Eta Publication; 2006: 330-72 [in Persian].
3. Obuzor GU, Ajaezi NE. Nutritional content of popular malt drinks produced in Nigeria .African J Food Sci 2010; 4(9): 585 – 590 .
4. Mortazavian MA, Khosrokhavar R, Rastgar H .effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of Doogh (Iranian fermented milk drink) Ital. J. Food Sci 2010; 1(22): 98-104.
5. Wzorek W, Bonin S, Koskowska J. Attempt to obtain beverage containing viable lactic acid bacteria and estimation of their survival ability at the selected temperature. Technol Alimentaria 2003; 2(2): 47-56.
6. Kailasapathy, K. Survival of free and encapsulated probioyic bacteria and their effect on the sensory properties of yogurt. LWT 2006, 39: 1221-1227
7. Sohrabvandi S ,Malganji Sh , Eivani MJ ,Khosravi-Darani KViability of Lactobacillus acidophilusand Bifidobacterium lactisin Ma-al-Shaeer during refrigerated storage. Iranian J Nutri Sci Food TechnolVol. 2013;7(5): 87-94.
8. Moneta J., Libudzisz Z., 2000. Przydatnosc bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju lactobacillus jako komponentow szcze pionek I preparatow probiotyc znych. Materialy szkoly letniej. Bakterie fermentacji mlekowej-klasyfikaja, metabolism, genetyka, wykorzystanie
9. Shah NP, Lankaputhra WEV, Britz ML, Kyle WSA.. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*in commercial yoghurt during refrigerated storage. Int Dairy J,1995; 5: 515-521.
10. Nighswonger AD, Brashears, MM, Gilliland, SE. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in Fermented Milk Products During Refrigerated Storage. J Dairy Sci, 1996;79:212-219
11. Gilliland SE, Lara RC. Influence of Storage at Freezing and Subsequent Refrigeration Temperatures on 3-Galactosidase Activity of *Lactobacillus acidophilus*. Appl Environ Microbiol, 1998; 898-902.
12. Ana Lúcia FP,Tatiane CM, Sueli R. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. Food Res Int, 2011; 44:1276–1283.
13. Tatdao P, FrankS.. Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage J func foods. 2009; 311 –318.
14. Hegazi FZ, Abo-Elnaga IG. Proteolytic activity of crude cell-free extract of *Lactobacillus casei* and Lactobacillus plantarum. Nahrung,1987; 3:225-232.
15. Singh J, Ranganathan B.. Activation of proteolytic activity of *lactobacillus casei* by nitrosoguanidine. Folia Microbiol, 1978;23:82-83.
16. Champagne CP, Gardner NJ, Roy D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2005;45:61-84.
17. Luckow T, Sheehan V, Fitzgerald G, Delahunty C. Exposure, health information and flavor- masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. Appetite,2006; 47: 315-323.
18. Tamime AY, Saarela M, Korslund Sondergaarda A, Mistry VV, Shah NP. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In: Tamime A, editor. Probiotic Dairy Products. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005:p. 39-63.
19. Hardwick WA, editor. Handbook of Brewing. New York: Marcel Dekker 1995. p. 551-86.
20. Nogueira LC, Silva F, Ferreira IM, Trugo LC. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. J Chromatog 2005; 1065(2): 207-10.

www.SID.ir

Archive of SID

Study on the Biochemical and Microbiological Characteristics of Several Probiotic Strains in Non-Alcoholic Beer during Storage Period

*Mohammadi R[1], Zabihzadeh M[2] , Delshadian Z[3], Sarlak Z[3], Mortazavian A.M[*5], Hosseini M[6]*

1-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Research Center for Environmental Determinants of Health (RCEDH), Faculty of Public Health, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

2- Students' Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Nutrition, School of Health and Nutrition, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

4- Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

*5- *Corresponding author: Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: mortazvn@sbmu.ac.ir*

6- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Ilam, Ilam, Iran

Received 30 Sept, 2015 **Accepted 6 Jan, 2016**

Background and Objectives: In this research, the effects of addition of different probiotic strains (*L. acidophilus, L. casei*, *L. reuteri, L. fermentum* or *L. plantarum*) as well as initial pH values (4.3 or 4.8) on the biochemical and microbiological characteristics of non-alcoholic beer drink were studied during 21 days in the refrigerated storage (5°C).

Materials and Methods: Probiotics identification and incubation were done with gram staining and MRS-broth medium, respectively. pH and redox potential values were measured by pH-meter. Titrable acidity value was determined by titration with 0.1 N NaOH. Probiotic bacteria were enumerated using MRS-agar medium.

Results: The highest biochemical changes were observed in treatments with *L. casei* and *L. acidophilus*. The second 7-day interval showed the highest amount of biochemical changes in the treatments with initial pH of 4.3 along with *L. casei*, *L. fermentum* and *L. reuteri* throughout the 21 days of storage; however, other species showed such characteristics only at pH=4.8. The viability of probiotic strains in all treatments, especially in those with initial pH of 4.3, decreased dramatically during the refrigerated storage. *L. acidophilus* and *L. fermentum* showed the lowest viability during refrigerated storage. While the highest viability belonged to *L. reueri* in the treatments with initial pH of 4.3 and to *L. plantarum* in those with pH=4.8.

Conclusion: The results showed that different initial pH values as well as different types of inoculated probiotic strains in non-alcoholic beer drink had effects on the amount of the biochemical changes and the viability of probiotic strains in non-alcoholic beer drink; therefore, non-alcoholic beer drink can be a good choice for growth of probiotic.

Keywords: Biochemical, Non-alcoholic beer, Probiotic, Viability

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:05 IRST on Sunday October 30th 2016

www.SID.ir