

# اثر بخشی عصاره الکلی گل سرخ بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در دوغ

بهروز اکبری آدرگانی<sup>۱\*</sup>، سمیرا اسدالهی فرد<sup>۲</sup>، امیر علی انوار<sup>۳</sup>، فائزه شیرخان<sup>۴</sup>

## چکیده

در این پژوهش اثر بخشی عصاره الکلی گل سرخ بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (Bb-12) در دوغ مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به نمونه‌های دوغ بدون عصاره الکلی گل سرخ (شاهد) و حاوی عصاره الکلی گل سرخ (در سطوح ۱٪ و ۲٪) تلقیح و دوغ‌های تولید شده طی مدت زمان چهار هفته نگهداری در یخچال در دمای ۴C<sup>o</sup> در طول یک هفته از نظر شمارش میکروبی، تغییرات pH، اسیدیته و بقا در دوران ماندگاری بررسی و خصوصیات ارگانولپتیک محصول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاکی از معنی‌دار بودن اختلاف درصد بقای باکتری La-5 و Bb-12 دوغ معمولی و دوغ‌های حاوی عصاره الکلی گل سرخ بود (p < ۰/۰۵). در خصوص طعم نتایج این بررسی نشان داد بین انواع دوغ از لحاظ طعم اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p < ۰/۰۵). بررسی خصوصیات ارگانولپتیک در دوغ‌های حاوی عصاره الکلی گل سرخ نشان داد طعم دوغ‌ها نسبت به دوغ‌های معمولی ارتقا یافت. طی مدت زمان نگهداری pH کاهش و اسیدیته افزایش جزئی داشت. بیشترین و کمترین میزان pH به ترتیب مربوط به نمونه حاوی ۱٪ و ۲٪ عصاره بود. همچنین بررسی اثر اصلی مقدار عصاره بر میزان اسیدیته نشان داد که بیشترین و کمترین میزان اسیدیته به ترتیب مربوط به نمونه حاوی ۲٪ و ۱٪ بود. بنابراین تولید و مصرف دوغ حاوی عصاره گل سرخ با حفظ ویژگی‌های ارگانولپتیک به همراه باکتری‌های پروبیوتیک به عنوان یک محصول غذایی عملگرا توصیه می‌شود.

**واژگان کلیدی:** لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم لاکتیس، عصاره الکلی گل سرخ، پروبیوتیک، زنده‌مانی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲۰

## مقدمه

امروزه با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان و تمایل به استفاده از غذاهای سالم، تولید و استفاده از غذاهای عملگرا رو به افزایش

است. پروبیوتیک‌ها (Probiotics) بعنوان یکی از نوظهورترین و محبوب‌ترین فرآورده‌های فراسودمند از اهمیت خاصی برخوردارند. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی در تعداد مناسب و کافی به کار گرفته شوند باعث ایجاد اثرات سلامت‌بخش بر بدن میزبان می‌شوند (۱). امروزه لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم‌ها بخش اعظم کشت‌های آغازگر پروبیوتیکی را تشکیل می‌دهند و به شکل گسترده‌ای از آن‌ها در تولید فرآورده‌های غذایی پروبیوتیکی استفاده می‌شود. این فرآورده‌ها اغلب از نوع لبنی هستند چرا که علاوه بر ارزش تغذیه‌ای، محیط مناسبی را برای رشد این میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کنند. دوغ یکی از نوشیدنی‌های بومی کشور ایران است که از نظر مصرف، پیشینه تاریخی طولانی دارد. دوغ به علت pH پایین و غنی بودن از مواد مغذی به خصوص در دمای محیط، مستعد آلودگی با کپک‌ها، مخمرها و بعضی از باکتری‌ها می‌باشد که موجب تغییر طعم و عطر محصول در طول زمان نگهداری می‌شود. این موضوع به عنوان یک چالش مهم در صنعت شیر و فرآورده‌های لبنی مطرح است. بنابراین استفاده از مواد طعم‌دهنده طبیعی و ضد میکروبی مناسب برای حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری دوغ همگام با بهبود طعم و افزایش بازارپسندی آن، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲).

\* استاد مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران (analytchemist@yahoo.com)

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳. گروه تخصصی بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. دانش آموخته کارشناسی ارشد صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

گل سرخ بر باکتری‌های پروبیوتیک دوغ انجام نشده است لذا در این مطالعه، عصاره گل سرخ به عنوان اسانس در فرمولاسیون دوغ پروبیوتیک بررسی می‌شود و امکان استفاده از عصاره الکلی گل سرخ در دوغ و چگونگی تاثیر این عصاره بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Acidophilus Lactobacillus*) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (*Bifidobacterium lactis*) طی مدت نگهداری در یخچال مورد نظر گرفته می‌شود. به طوری که هدف از این مطالعه تولید یک فرآورده جدید بر پایه دوغ با طعم گل سرخ می‌باشد تا علاوه بر ایجاد خصوصیات ارگانولپتیک جدید یک فرآورده پروبیوتیکی با ارزش غذایی بالا نیز تولید کند.

## مواد و روش کار

### مواد شیمیایی و واکنشگرها

گیاه گل سرخ از مراکز و فروشگاه‌های معتبر و توزیع کننده گیاهان دارویی تهیه شد. نمونه گیاه گل سرخ با نمونه هرباریومی در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی مقایسه و از نظر نام علمی تایید شد. ابتدا گیاه گل سرخ تحت یک شستشوی ساده و آبکشی برای رفع گردوغبار احتمالی موجود در گیاه قرار گرفت. سپس کاسبرگ و گلبرگ گیاه در یک آون تحت خلاء در دمای ۵۵ درجه سلسیوس خشک شد و در یک آسیاب به پودر نرم تبدیل گردید و مواد بدست آمده از یک الک با مش ۸۰ عبور داده شد. ۲۰ گرم از کاسبرگ و گلبرگ تبدیل شده به پودر با ۱۰۰ میلی لیتر از محلول آلی اتانول و آب در دمای اتاق و در مکان مناسب تاریک و دور از نور به وسیله شیکر به مدت ۴۸ ساعت همزده شدند. ترکیب حاصل به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. باقی مانده مواد تحت شرایط یکسان با شرایط قبلی مجدداً عصاره گیری شدند. ماده صاف شده در یک تبخیرکننده چرخان تا زیر ۴۰ درجه سلسیوس تبخیر

توجه عموم به سلامت نگهدارنده‌های شیمیایی و عکس العمل منفی مصرف کنندگان به نگهدارنده‌های مصنوعی و شیمیایی، باعث افزایش تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی و در واقع نیاز به جایگزین‌های سالم و مؤثر برای تیمارها و نگهدارنده‌های شیمیایی بیشتر شده است. در این زمینه تمایل ویژه‌ای بر روی کاربرد بالقوه اسانس‌های گیاهی در فرآورده‌های لبنی پروبیوتیک متمرکز شده است. در ایران نیز مطالعات گسترده‌ای در استفاده از اسانس‌های گیاهی بدلیل خواستگاه آن در مصرف گیاهان دارویی و مواد معطر بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در فرآورده‌های لبنی صورت گرفته است. به عنوان مثال اثر عصاره نعناع بر قابلیت بقای باکتری پروبیوتیک در دوغ (۳)، اثر افزودن آلوئه ورا بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیکی اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم در شیر و ماست (۴)، اثر افزودن گیاه گلبر بر باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم (*Lactobacillus plantarum*) در دوغ (۵)، اثر افزودن گیاه درمنه بر ماست پروبیوتیک (۶)، اثر عصاره آبی ریحان و مرزه بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها (۷)، در تحقیقات پژوهشگران مورد بررسی قرار گرفته است. از اینرو با توجه به مطالعات گذشته، اهمیت توجه و استفاده از مواد معطر و اسانس‌های گیاهی در فرآورده‌های لبنی بیش از پیش مشخص می‌شود. یکی از گیاهان مورد استفاده و پرکاربرد در ایران گیاه گل سرخ است. گیاه گل سرخ با نام علمی (*Damascene Rosa*) متعلق به خانواده رزاسه (*Rosaceae*) و از جنس رزا (*Rosa*) می باشد که با نام گل محمدی شناخته می‌شود. از اسانس و آب حاصل از تقطیر آن (گلاب) به عنوان مواد خوشبوکننده در صنایع عطرسازی، دارویی و غذایی استفاده می‌شود (۸) گیاه گل سرخ به دلیل سابقه مصرف در بین ایرانیان کاملاً شناخته شده و پتانسیل مصرف خوبی در فرآورده‌های لبنی دارد. با این وجود علیرغم کاربردهای گسترده گل سرخ و عصاره آن در صنعت غذا، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثر اسانس

میلی‌لیتر بسته بندی شد و در دمای یخچال نگهداری شد. پس از تهیه دوغ، از سوسپانسیون میکروبی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس تحت شرایط استریل و زیر هود به ۳ بطری (که یک بطری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بطری دوم حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس و بطری سوم حاوی مخلوط دو باکتری) حاوی دوغ به صورت جداگانه وارد و دوغ پروبیوتیک مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۳۲۴ ساخته شد (۱۱) طی مدت زمان ۴ هفته نگهداری در یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس) به صورت هفتگی از نظر تغییرات در قابلیت بقا باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس، pH، اسیدیته و طعم مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انجام مراحل فوق عصاره گل سرخ که قبلاً با فیلتر استریل شده بود در سطوح ۱ و ۲ درصد حجمی-حجمی (به نمونه‌های دوغ حاوی میکروارگانسیم) اضافه شد. همچنین یک بطری برای نمونه شاهد دوغ بدون عصاره در نظر گرفته شد. سپس دوغ‌های تولیدی تحت شرایط استریل در بطری‌های پلی‌اتیلنی در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفتند.

#### آزمون میکروبی

قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در محیط کشت (MRS-Bile Agar) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در محیط کشت (MRS-NNLP) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس جهت شمارش تقریبی باکتری با روش شمارش صفحه‌ای انجام شد. باکتری‌های مورد نظر با واحد CFU (Colony Forming unit) در هر میلی‌لیتر یا هر گرم از دوغ بیان شد و روش اندازه‌گیری آن براساس روش Aerobic Plate Count با تکنیک روش شمارش صفحه‌ای کشت حلقوی (plate Pour) انجام شد.

شد عصاره‌ای که به دست آمد حرارت داده شد و به صورت پودر تیره رنگی حاصل و نگهداری گردید (۹).

#### تهیه و آماده‌سازی مایه تلقیح

باکتری‌های بیفیدوباکتریوم لاکتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به صورت خالص و لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. جهت فعال‌سازی، ویال‌های حاوی باکتری‌ها در شرایط استریل و زیر هود لامینار شکسته شد و محیط مغذی برین هارث اینفیوژن (BHI) به درون ویال وارد شد تا باکتری‌های لیوفیلیزه درون محیط حل شوند. سپس محیط حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس درون لوله‌ی ۱۵ میلی‌لیتر در محیط کشت برین هارث اینفیوژن تلقیح شد و در شرایط بی‌هوایی به مدت ۱ هفته در دمای اتاق قرار داده شد تا باکتری‌ها رشد و تکثیر پیدا کنند. همچنین محیط حاوی لاکتوباسیلوس به درون لوله‌های ۱۰ میلی‌لیتر وارد شده و به مدت ۱ هفته در دمای اتاق قرار داده شد تا باکتری‌ها رشد کنند. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی از محیط کشت فعال و روش استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد.

#### تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های دوغ و دوغ با اسانس گل سرخ

برای تهیه دوغ ابتدا از اجزای اصلی تشکیل‌دهنده دوغ یعنی ماست از نوع کم چرب تهیه شده از شرکت فرآورده‌های لبنی ایران، آب و نمک (۱ کیلوگرم ماست، ۱ لیتر آب) به همراه ۲۰ گرم نمک به وسیله مخلوط‌کن ترکیب شدند و دوغ به دست آمده، پس از کنترل و تنظیم ماده خشک مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۴۵۳ در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه پاستوریزه شد (۱۰) سپس دوغ پاستوریزه شده تا دمای ۴ درجه سلسیوس سرد گردید و تحت شرایط استریل در ۴ بطری استریل با حجم ۵۰۰

### آزمون شیمیایی

تغییرات pH و پتانسیل احیاء نمونه‌های دوغ با استفاده از دستگاه pH متر ساخت سوئیس (Mettler, Swiss) مدل MP.235 در دمای ۲۰ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد. اسیدیته کل بر حسب لاکتیک‌اسید با روش تیتراسیون در مجاورت شناساگر فنل‌فتالین با استفاده از سود ۰/۱ نرمال مطابق استاندارد ملی ایران بررسی شد (۱۲).

### آزمون حسی

برای بررسی ویژگی‌های حسی از ۱۰ نفر ارزیاب آموزش دیده استفاده شد. این محصول از لحاظ طعم، بو، بافت، قوام و قابلیت پذیرش کل توسط روش هدونیک ۷ نقطه‌ای با تکمیل پرسشنامه مورد ارزیابی قرار گرفت.

### تجزیه و تحلیل آماری

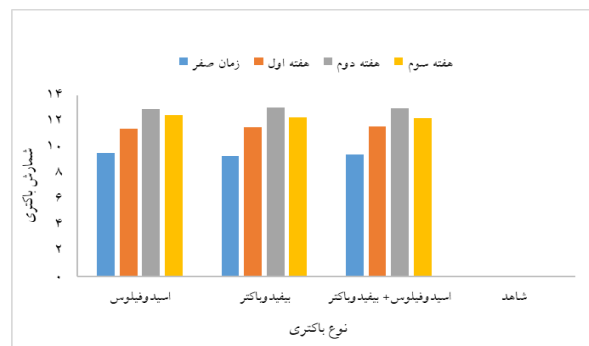
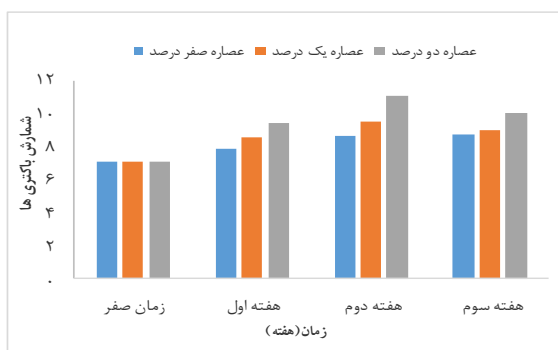
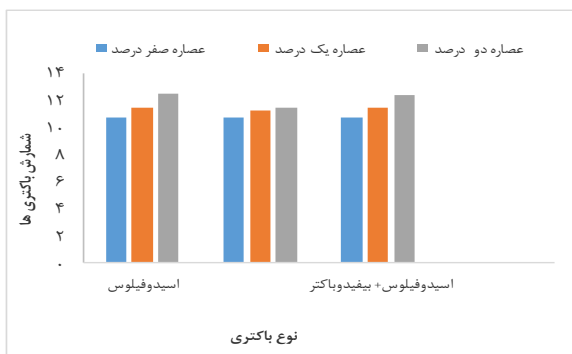
جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار اکسل و از آزمون آنالیز واریانس آماری (ANOVA) با احتساب سطح اطمینان ۹۵ درصد از نرم افزار IBM SPSS Statistics 23 استفاده شد

### نتایج

#### نتایج آزمون میکروبی

نتایج شمارش باکتری‌ها در طی زمان در نمودار ۱ نشان داده شده است.

در این نگاره مشخص است که تا هفته دوم میزان باکتری‌ها افزایش و بعد از آن کاهش یافته است بطوری که با افزایش زمان نگهداری، جمعیت پروبیوتیک‌ها بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد. لازم بذکر است میزان شمارش باکتری نمونه شاهد طی زمان صفر بوده است. همچنین در این نمودار اثر متقابل نوع باکتری و زمان قابل مشاهده است بطوریکه اثر افزودن دو نوع باکتری (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس) در طول دوره و زمان نگهداری بر روی میزان شمارش باکتری‌ها نشان می‌دهد که باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس بیشترین شمارش باکتری پروبیوتیک را در محصول پس از گذشت زمان در هفته دوم داشته است. اثر متقابل زمان و مقدار عصاره در نمودار ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در زمان صفر تعداد باکتری هر سه نمونه یکسان بوده است و با گذشت زمان میزان شمارش باکتری نمونه‌های حاوی ۲ درصد عصاره بیشتر شده است.

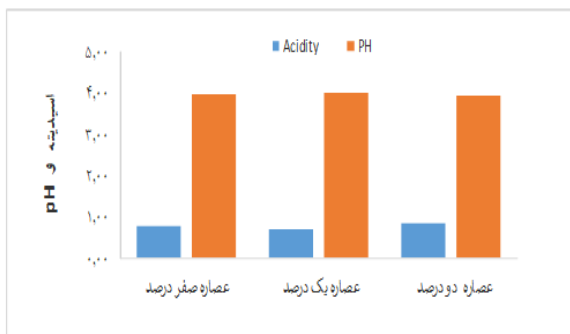


نمودار (۱)- اثر متقابل زمان و نوع باکتری‌ها

نمودار (۲)- اثر متقابل زمان و نوع باکتری با میزان عصاره گل سرخ

در جدول ۱ اثر اصلی نوع باکتری بر روی pH و اسیدیته نشان داده شده است. مطابق جدول بالاترین میزان pH پس از گذشت زمان نگهداری پس از هفته دوم مربوط به نمونه شاهد و نمونه حاوی هر دو باکتری بوده است. پایین‌ترین میزان pH هم مربوط به نمونه حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس و نمونه حاوی اسیدوفیلوس بوده است. در مورد اثر اصلی نوع باکتری بر روی اسیدیته مشاهده می‌شود بالاترین میزان اسیدیته نمونه حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس می‌باشد.

اثر میزان عصاره بر pH و اسیدیته در نمودار ۴ نشان داده شده است. در بررسی اثر مقدار عصاره بر میزان pH مشاهده شد که بالاترین میزان pH مربوط به نمونه حاوی ۱ درصد عصاره بوده و کمترین میزان pH مربوط به نمونه ۲ درصد عصاره بوده است. همچنین بررسی اثر اصلی مقدار عصاره بر میزان اسیدیته نشان می‌دهد که بالاترین میزان اسیدیته مربوط به نمونه حاوی ۲ و ۰ درصد عصاره بوده است و کمترین میزان اسیدیته مربوط به نمونه حاوی ۱ درصد عصاره می‌باشد.



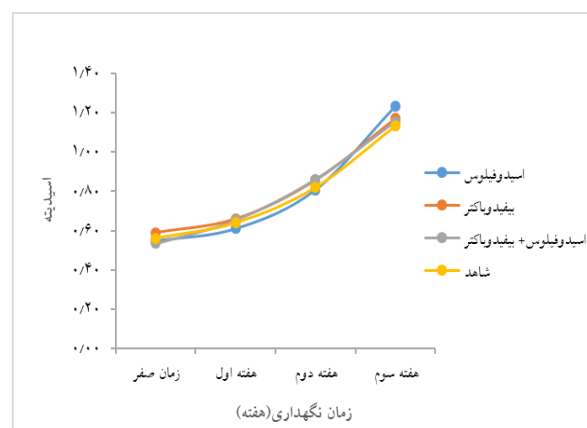
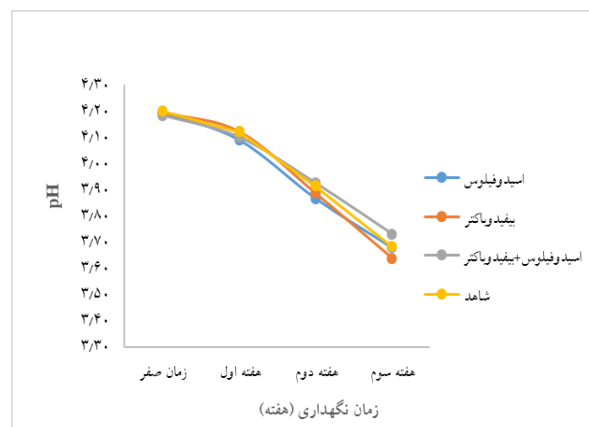
نمودار ۴- اثر میزان عصاره بر pH و اسیدیته

در جدول ۲ مقایسه میزان میانگین اسیدیته و pH تیمارها در روند تولید دوغ پروبیوتیک حاوی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم طی دوره گرمخانه‌گذاری نشان داده شده است. در این رابطه تغییرات pH و اسیدیته نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گل سرخ کمتر.

بعلاوه در بررسی عصاره و نوع باکتری مشاهده شد که باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس حاوی ۲ درصد عصاره دارای بیشترین مقادیر از نظر شمارش جمعیت پروبیوتیک‌ها را دارا می‌باشد.

### نتایج آزمون شیمیایی

نتایج حاصل از ارزیابی اسیدیته و pH دوغ پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم لاکتیس در طی



نمودار ۳- تغییر pH و اسیدیته نمونه‌ها در زمان نگهداری

همانطور که مشاهده می‌شود مقایسه میانگین جمعیت پروبیوتیک و افزایش مدت زمان نگهداری نشان می‌دهد که pH با گذشت زمان نگهداری کاهش داشته است و اسیدیته با گذشت زمان نگهداری افزایش یافته است.

جدول ۱- مقایسه میانگین تاثیر متقابل زمان نگهداری در تیمار بر حسب pH و اسیدیته

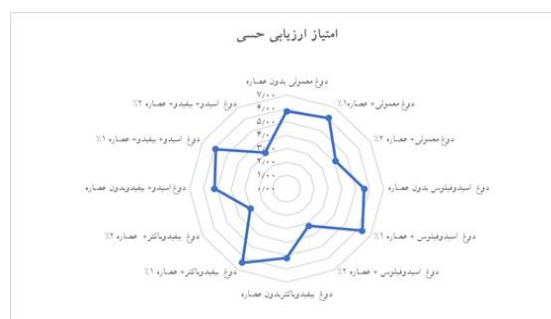
نوع	زمان	اسیدیته			pH		
		هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
اسیدوفیلوس	۰/۵۵	۰/۶۱	۰/۸۱	۱/۲۳	۰/۸۰	۴/۲۰	۴/۰۹
بیفیدوباکتر	۰/۵۹	۰/۶۶	۰/۸۶	۱/۱۷	۰/۸۲	۴/۲۰	۴/۱۲
اسیدوفیلوس + بیفیدوباکتر	۰/۵۴	۰/۶۵	۰/۸۶	۱/۱۵	۰/۸۰	۴/۱۹	۴/۱۰
شاهد	۰/۵۶	۰/۶۴	۰/۸۲	۱/۱۳	۰/۷۹	۴/۲۰	۴/۱۲

جدول ۲- مقایسه میانگین  $\pm$  انحراف معیار اسیدیته و pH تیمارها در تولید دوغ پروبیوتیک با اسانس گل سرخ در طی زمان نگهداری

نوع تیمار	اسیدیته	pH
اسیدوفیلوس فاقد عصاره	$۰/۸۲ \pm ۰/۲۳$	$۳/۹۹ \pm ۰/۲۵$
اسیدوفیلوس ۱ درصد عصاره	$۰/۷۵ \pm ۰/۲۵$	$۳/۷۶ \pm ۰/۲۶$
اسیدوفیلوس ۲ درصد عصاره	$۰/۷۹ \pm ۰/۲۲$	$۳/۹۹ \pm ۰/۱۲$
بیفیدوباکتر فاقد عصاره	$۰/۸۹ \pm ۰/۳۱$	$۴/۰۵ \pm ۰/۱۲$
بیفیدوباکتر ۱ درصد عصاره	$۰/۷۹ \pm ۰/۲۳$	$۳/۸۷ \pm ۰/۲۴$
بیفیدوباکتر ۲ درصد عصاره	$۰/۸۹ \pm ۰/۲۴$	$۳/۸۱ \pm ۰/۲۷$
شاهد فاقد عصاره	$۰/۸۶ \pm ۰/۲۲$	$۳/۹۹ \pm ۰/۲۳$
شاهد ۱ درصد عصاره	$۰/۷۶ \pm ۰/۲۶$	$۳/۹۴ \pm ۰/۱۹$
شاهد ۲ درصد عصاره	$۰/۹۵ \pm ۰/۲۵$	$۳/۸۴ \pm ۰/۲۲$

### نتایج آزمون حسی

اثر افزودن دو نوع باکتری، درصد عصاره و زمان نگهداری از نمونه شاهد (فاقد عصاره) می باشد بر روی امتیاز طعم از نظر ارزیابها در نمودار ۵ از نظر ارزیابها ارائه شده است. مطابق شکل بالاترین امتیاز مربوط به نمونه حاوی اسیدوفیلوس با ۱ درصد عصاره، بیفیدوباکتریوم حاوی ۱ درصد عصاره و شاهد حاوی ۱ درصد عصاره بود و کمترین امتیاز مربوط به نمونه بیفیدوباکتریوم لاکتیس دارای ۲ درصد عصاره می باشد.



نمودار (۵)- نتایج ارزیابی حسی نمونه های دوغ حاوی عصاره الکلی گل سرخ و دوغ معمولی

## بحث

بیفیدوباکتریوم لاکتیس) در طول دوره و زمان نگهداری بر روی میزان شمارش باکتری‌ها مشاهده شد که باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس بیشترین شمارش باکتری پروبیوتیک را در محصول پس از گذشت زمان داشت که این نتیجه با پژوهش محققین که در طی دوره نگهداری بر میزان قابلیت زیستی بیفیدوباکتریوم افزوده می‌شد همخوانی دارد بطوریکه این افزایش جمعیت بیفیدوباکتریوم طی دوره نگهداری یخچالی به جهت مقاوم شدن نسبت به شرایط محیطی توجیه شده است (۱۳) و بیشترین کاهش pH در هفته سوم در نمونه حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس می‌باشد که این نتیجه با پژوهشی که مطابق آن تا ۱۴ روز قابلیت زیستی بیفیدوباکتریوم افزایش و پس از آن کاهش یافت همخوانی دارد و علت آن را می‌توان به استات تولیدی توسط بیفیدوباکتریوم مرتبط دانست که با داشتن خاصیت بافری مانع افت سریع pH می‌شود (۱۶) نتایج استفاده از اسانس گیاهی گل سرخ در دوغ نشان از معنی‌دار بودن اختلاف درصد بقای باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس بین دوغ معمولی و دوغ‌های حاوی عصاره الکلی گل سرخ بود ( $p \leq 0/05$ ). بررسی مقایسه میانگین‌ها بوسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن ( $\alpha = 0/05$ ) نشان داد که درصد بقای باکتری در دوغ حاوی درصد عصاره الکلی گل سرخ بیشتر از دوغ حاوی درصد عصاره الکلی گل سرخ و دوغ شاهد است و بین دوغ حاوی ۱ درصد عصاره و دوغ حاوی ۲ درصد عصاره اختلاف معنی‌دار وجود دارد ( $p \leq 0/05$ ). و بین انواع باکتری نیز اختلاف معنی‌دار می‌باشد و بالاترین میزان تأثیر را غلظت ۲ درصد عصاره بر باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس داشت. به طوریکه غلظت اسانس بر روی میزان زنده‌مانی باکتری اثر مثبتی نشان داد و در این زمینه نتیجه مشابهی بین مطالعه حاضر با مطالعات دیگر حاصل شد بگونه‌ای که در پژوهشی اثرات مثبتی از افزودن عصاره مالت، نعناع و دارچین بر رشد

مهمترین شاخص کیفی محصولات قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در فرآورده‌های غذایی است (۱۳). مطابق مطالعه حاضر در بررسی قابلیت زنده‌مانی باکتری در طول دوره و زمان نگهداری تفاوت معنی‌داری در تعداد باکتری‌ها در هفته دوم و سوم مشاهده شد بطوریکه پس از افزودن باکتری‌ها تا هفته دوم میزان باکتری‌ها افزایش و بعد از آن جمعیت پروبیوتیک‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین از آنجایی که pH پایین و اسیدیته بالای فرآورده‌های تخمیری از مهم‌ترین عوامل موثر بر قابلیت زیستی هستند (۱۳) میانگین جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در طول مدت زمان نگهداری با این فاکتورها مورد بررسی قرار گرفت بطوری که در طی دوره نگهداری تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس نسبت به تعداد اولیه افزایش داشت. همچنین pH طی مدت زمان نگهداری کاهش و اسیدیته افزایش داشت. در این راستا از آنجایی که با گذشت زمان و ادامه تخمیر پس از افزایش تعداد باکتری، اسیدسازی، کاهش pH، تولید پراکسید هیدروژن و باکتریوسین طی تخمیر و دوره نگهداری بر رشد و قابلیت باکتری‌ها اثر سوء می‌گذارد (۱۴، ۱۵) لذا با گذشت زمان pH نهایی تخمیر پایین می‌رود و این بر بقا و فعالیت سویه‌ها اثر کاهندگی دارد و این به جهت کثندگی اسیدهای آلی در pH پایین می‌باشد که باعث مهار فعالیت متابولیسم و کاهش زنده‌مانی باکتری می‌شود (۱۰، ۱۳). حتی برخی پژوهشگران کاهش در میزان pH طی دوره نگهداری در فرآورده‌های تخمیری شیر را به مصرف کربوهیدرات‌های باقیمانده (لاکتوز) بوسیله میکروارگانیسم‌ها و تولید اسیدلاکتیک، مقدار کمی CO<sub>2</sub> و فرمیک اسید نسبت داده‌اند (۲). در این زمینه نتایج مشابهی در خصوص کاهش تعداد باکتری در زمان نگهداری وجود دارد (۱۰). در بررسی افزودن دو نوع باکتری (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و

طول مدت زمان نگهداری شد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که تولید اسید توسط میکروارگانیسم های پروبیوتیک در نمونه های دوغ حاوی عصاره الکلی گل سرخ در طی دوره نگهداری در یخچال بیشتر از دوغ معمولی بوده است که علت آن مطابق برخی منابع، افزایش اسیدیته بدلیل تولید و تجمع بیشتر ترکیبات اسیدی می باشد (۲۱، ۲۲) و این افزایش اسیدیته در اثر افزودن عصاره یا اسانس باعث افزایش فعالیت پروتئولیتیکی باکتری های لاکتوباسیل و رهاسازی اسیدهای آمینه ای آزاد می گردد (۲۳) همچنین علت آن را می توان به وجود ترکیبات مغذی در محیط و تولید اسیدلاکتیک و اسید استیک مرتبط دانست (۱۶) لذا کاهش pH محیط و تجمع اسیدهای آلی طی رشد و تخمیر از عوامل کاهش قابلیت زندهمانی باکتری ها می باشد (۲۴) بنابراین اثر متقابل اسانس بر اسیدیته و تعداد باکتری باعث کاهش pH و افزایش اسیدیته گردید بدین جهت با بررسی مطالعات سایر محققین می توان نتیجه گرفت باتوجه به اینکه بقای باکتری پروبیوتیک در اسیدیته کمتر افزایش می یابد، اسانس گل سرخ در این زمینه موثر بوده و اسانس گل سرخ از افزایش زیاد اسیدیته و کاهش سریع pH جلوگیری کرده است. ویژگی های حسی یا ارگانولپتیک یکی از مهمترین عوامل موثر در گرایش مصرف کنندگان به محصولات غذایی به خصوص دوغ می باشد. از اینرو مطابق ارزیابی حسی انجام شده در این تحقیق مشاهده شد دوغ های حاوی ۱ درصد عصاره الکلی گل سرخ امتیاز بالاتری را نسبت به دوغ معمولی کسب کردند. تجزیه و تحلیل داده های حاصل از ارزیابی طعم نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف طعم در سطح  $(p \leq 0/05)$  در دوغ های تولیدی بود. همچنین مقایسه میانگین از آزمون های چند دامنه ای دانکن ( $\alpha = 0/05$ ) نشان داد که بین غلظت ۱ و ۲ درصد عصاره اختلاف معنی داری وجود دارد. از آنجایی که در مطالعات پیشین اثر مثبت عصاره های گیاهی بر طعم فرآورده های لبنی به علاقه مردم ایران در استفاده از

لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس و مخلوط هر دو باکتری مشاهده شد (۴) که در بررسی این اثرگذاری، می توان یکی از علل مثبت اثر ادویه جات و عصاره های گیاهی بر رشد و بقای باکتری های آغازگر لاکتیکی را به غلظت بالای یون های فلزی به خصوص منیزیم و منگنز نسبت داد. شایان ذکر است این عناصر در رشد و بقای لاکتوباسیلوس ها نقش مهمی را ایفا می کنند (۱۷) با این حال در مقایسه نتایج، عدم مشابهت با برخی مطالعات قبلی نیز مشاهده شد بطوریکه افزودن اسانس در دوغ محلی ترکیه تعداد باکتری را کاهش داد (۱۸) یا در مطالعه ای دیگری اسانس زیره سبز و پونه کوهی در غلظت های بالا باعث جلوگیری از رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلاتناروم شد (۱۹) لذا تفاوت در این موارد را می توان به نوع باکتری، نوع محصول و حتی نوع اسانس نیز نسبت داد زیرا مطابق نظر محققین نوع عصاره گیری و بستر عصاره هم می تواند بر میزان رشد باکتری های پروبیوتیک موثر باشد (۲۰) بنابراین در مطالعه حاضر دلیل افزایش معنی دار تعداد باکتری ها در نمونه های حاوی عصاره می تواند ترکیبات شیمیایی عصاره باشد به طوریکه در نمونه های حاوی ۲ درصد عصاره با گذشت زمان تعداد باکتری ها افزایش یافت و این مسئله می تواند ناشی از اثر متقابل محیط های غذایی در اثربخشی اسانس ها و مقاومت میکروارگانیسم ها طی قرارگیری در معرض ترکیبات متفاوت باشد. هرچند تحقیقات نه چندان زیادی در مورد بقای باکتری در طی مدت زمان باکتری و اثر اسانس در نوشیدنی زیستی دوغ وجود دارد ولی تحقیقات موجود حاکی از اثرگذاری اسانس بر تعداد باکتری ها می باشد (۵).

در خصوص اثر افزودن عصاره بر pH و اسیدیته، تفاوت معنی داری در نمونه های حاوی عصاره و نمونه های فاقد عصاره مشاهده شد به گونه ای که مطابق نتایج تحقیق استفاده از اسانس گل سرخ باعث کاهش pH و افزایش اسیدیته در



که تعداد سلول‌های زنده باکتری‌های پروبیوتیک در تمام نمونه‌ها با گذشت زمان به طور معنی‌داری کاهش یافت ولی با افزایش مقدار عصاره میزان شمارش باکتری‌ها افزایش یافت. مدت زمان انقضای دوغ پروبیوتیک حاوی عصاره گل سرخ مطابق سازمان خواروبار کشاورزی ۲۵ روز در نظر گرفته شد تا پس از این مدت تعداد میکروارگانیسم‌های زنده و فعال آن از حد پیشنهاد شده  $10^6$  cfu/gr پایین‌تر نشود. با توجه به نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف گیاه گل سرخ بر خواص کیفی و حسی دوغ پروبیوتیک، غلظت ۱ درصد حاوی باکتری اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم به عنوان غلظت مناسب پیشنهاد می‌شود. از آنجا که گل سرخ محصولی ارزان و در دسترس است، سهم کمی در هزینه‌های تولید دوغ دارد و از طرف دیگر دوغ حاوی عصاره الکلی گل سرخ امتیاز بیشتری را نسبت به دوغ معمولی از نظر پذیرش حسی کسب کرده است و سبب بهبود طعم و عطر دوغ نیز شده از اینرو به نظر می‌رسد استفاده از آن در فرمولاسیون دوغ پروبیوتیک و افزایش زنده‌مانی این باکتری‌ها با افزودن گیاه گل سرخ در جهت ارتقای سطح سلامت جامعه بسیار حائز اهمیت است لذا تولید و مصرف آن به عنوان یک محصول عملگرا با ارزش غذایی بالا توصیه می‌شود.

### فهرست منابع

1. Hotel ACP, Cordoba A. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Prevention. 2001; 5(1):1-10.
2. Yousefi, A.R., Seyfi Hachesou, J., Sheikhloie Bonab, H. and Hatami, M. Effect of *Heracleum persicum* (Golpar) essential oil on some microbial, chemical and sensory characteristics of heat treated Dough. Food Hygiene. 2017; 8,1(29):11-24. [In Persian]

مواد گیاهی معطر به غذا و نوشیدنی‌های طعم‌دار نسبت داده شده است (۲) و دوغ به عنوان یک فرآورده تخمیری سنتی ایرانی که دارای خصوصیات طبیعی است شناخته شده است (۲۵) لذا لزوم بهبود طعم آن همراه اسانس‌های سنتی ایرانی احساس می‌شود. بنابراین در تحقیق حاضر از آنجایی که بالاترین امتیاز مربوط به نمونه حاوی اسیدوفیلوس با ۱ درصد عصاره، بیفیدوباکتریوم حاوی ۱ درصد عصاره و شاهد حاوی ۱ درصد عصاره و کمترین امتیاز مربوط به نمونه بیفیدوباکتریوم لاکتیس دارای ۲ درصد عصاره می‌باشد می‌توان دریافت که نوع باکتری و غلظت اسانس هم در ارزیابی حسی موثر می‌باشد. با این حال نتایج حاضر مبنی بر تأثیر نوع باکتری در ویژگی‌های حسی با نتایج پژوهشی در خصوص اثر نوع باکتری پروبیوتیک بکار گرفته شده در ویژگی‌های حسی و بویژه احساس دهانی همخوانی نداشت (۲۶) لذا می‌توان علت این تفاوت را علاوه بر نوع باکتری به نوع محصول اولیه بیان کرد. از منظری دیگر دلیل روند کاهش امتیاز ارزیابی حسی با گذشت زمان می‌تواند با افزایش اسیدیته و کاهش pH در نمونه‌های دوغ مرتبط باشد بطوریکه مطابق تحقیق حاضر کمترین pH و بالاترین اسیدیته مربوط به نمونه حاوی ۲ درصد عصاره می‌باشد به صورتی که افزایش میزان اسانس یا عصاره می‌تواند در تحریک باکتری‌ها موثر باشد و در همین راستا منجر به افزایش اسیدیته شده و بر روی طعم اثر می‌گذارد (۲۲) همچنین با توجه به وجود نگهدارنده‌های بنزوات و سوربات در فرآورده‌های لبنی بخصوص دوغ و اثرات مضرری که این ترکیبات دارند توصیه می‌شود برنامه‌های کاربردی بیشتر برای استفاده از اسانس‌های گیاهی و طبیعی بجای نگهدارنده‌های مصنوعی طراحی گردد (۲۷).

به طور کلی نتایج حاصل از مطالعه حاضر، مبنی بر اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گیاه سرخ بر ویژگی‌های کیفی و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در دوغ نشان داد

3. Vosough A, Khomeyri M, Kashaninezhad M, Seyed M. Effects of mint extract on the viability of probiotic bacteria in a native Iranian dairy drink (doogh). *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*. 2009;16(1):156-64. [In Persian]
4. Houshang J, Hossein MM, Mohaddese Y, Zahra KJ, Elham R. Studing the influence of aloevera on the growth of the lactobacillus acidophilus and bifidobacterium bifidum probiotic bacterias in producing probiotic milk and yogurt. *Unique Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*. 2014;02(02):16-20.
5. Jahanfar, S., Beik, M.M. and Sharifan, A.. The Effect Heracleum persicum Essence on Plantarum Lactobacillus in Probiotic Diluted Yoghurt. *Journal of Applied Microbiology in Food Industry*. 2016; 2(3): 75–84. [In Persian]
6. Akbari S, Azhdari A, Sharifzadeh GR. Study on effect of Artemisia sieberi hydro-alcoholic extract on the survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis in probiotic yoghurt. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 2017;24(1):50-61. [In Persian]
7. Mousani Z, Pourahmad R, Eshaghi M. Effect of basil and sour aqueous extract on the Lactobacillus paracaei life and physicochemical properties of probiotic yogurt. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 2018;10(4): 55-64.[In Persian].
8. Kudori MR, Rahmani G, Tabaei-Aghdaei SR, Darvishi Zeinabadi D, Khoshroo SMR. Sharifi yazdi. Variation in flower yield and mprphological characteristics of Damask Rose. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. 2015;5(12):208-216.
9. Meimandi K, Yaghoobi M. M. Effects of aqueous and ethanolic extract of Rosa damascena Mill L. against human gastric cancer cells. (Rosa damascena mill L.) *Journal of cellular and molcular research (Iranian journal of biology)*. 2015; 28(2): 299-309. [In Persian]
10. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Doogh Specifications and test method, 2stedition. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI No. 12453.
11. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Probiotic Doogh –Specifications and test methods, 1stedition. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI No. 11324.
12. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Fermented milks-Determination of titrable acidity- Potentiometric method, 1stedition. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2014;ISIRI No. 5222.
13. Ahmadi E, Rouhi M, Mortazavian A, Khosravi-Darani K, Shandnush M. Viability of two Iranian isolated species of bifidobacteria in Doogh. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2013;7(5):1-10. [In Persian]
14. Ramezani, R., Fadaei Noghani, V. and Judaki, H. The effect of shallot on probiotic bacteria viability and some physicochemical and overall acceptability of low-fat stirred yogurt. *Journal of Food Microbiology*. 2019; 5(4):37-54. [In Persian]
15. Dini, A., Ebrahimzadeh, M.S.M.A. and Sedaghat, N., Razavi, S. H., Amini, E. The effect of type of starter culture, incubation temperature and final pH on the quality and rheological properties of probiotic acidic dairy drink (Probiotic Doogh). *Journal of Applied Microbiology in Food Industry*. 2016; 2(3):32-49. [In Persian]
16. Ghorbani A, Pourahmad R, FallahPour M, Mazaheri asadi M. Study of Physicochemical, Rheological and Microbiological Characteristics of Soy Probiotic Yoghurt During 21-Days of Storage. *Food Technology & Nutrition*. 2014; 11 (1): 43-48. [In Persian]
17. Bayoumi S. Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufactureof yoghurt. *Chemie*,

- Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel. 1992;14(1-2):21-26.
18. Simsek B, Sagdic O, Ozcelik S. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 during the storage of Ayran produced with different spices. *Journal of food engineering*. 2007;78(2):676-680.
19. Kivanç M, Akgül A, Doğan A. Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. *International journal of food microbiology*. 1991;13(1):81-85.
20. Mandal A, Das K, Nandi D. In vitro bioactivity study of bark extract of *Terminalia arjuna* on probiotics, commercially available probiotic formulation. *Int J Phytopharmacol*. 2010;1(2):109-113.
21. Swakhi F, Far R, Nejad S, Dadkhah A. Evaluation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on the physical properties of apple juice. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 2017; 9(4):31-40.
22. Shahdadi F, Mirzaie H, Kashaninejad M, Khomeiri M, Ziaifar AM, Akbarian A. Effects of various essential oils on chemical and sensory characteristics and activity of probiotic bacteria in drinking yoghurt. *Agricultural Communications*. 2015;3(1):16-21.
23. Sendra E, Fayos P, Lario Y, Fernandez-Lopez J, Sayas-Barbera E, Perez-Alvarez JA. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food microbiology*. 2008;25(1):13-21.
24. Donkor O, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah N. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*. 2006;16(10):1181-1189.
25. Iranmanesh M, Ezzatpanah H, Akbari-Adergani B, Karimi Torshizi MA. SPME/GC-MS characterization of volatile compounds of Iranian traditional dried Kashk. *International Journal of Food Properties*. 2018;21(1):1067-1079.
26. Sadaghdar Y, Mortazavian AM, Ehsani MR. Survival and activity of 5 probiotic lactobacilli strains in 2 types of flavored fermented milk. *Food Science and Biotechnology*. 2012;21(1):151-7.
27. Salehi S, Khodadadi I, Akbari-Adergani B, Shekarchi M, Karami Z. Surveillance of sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in dairy products produced in Hamedan province, north west of Iran. *International Food Research Journal*. 2017;24(3):1056-1060.

