اثرعصاره و فیبر ساقه نعناع بر زنده مانی باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس در ماست همزده به روش سطح پاسخ

محسن وظیفه دوست[1*]، امیر حسین الهامی راد[1]، مسعود شفافی زنوزیان[1]، محمد حسین حداد خداپرست[2]، محمد آرمین[3]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.
۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳. گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *imi_vazifedost@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۷

چکیده

امروزه گرایش به تولید غذاهای با اثرات سلامتی‌بخش، افزایش یافته است. نعناع یکی از گیاهانی است که اثرات سلامتی بخش آن ثابت شده است. افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به ماست خواص سلامتی‌بخش آن را افزایش می‌دهد. هدف از این مطالعه افزودن عصاره و فیبر ساقه نعناع به ماست همزده حاوی باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (BB-12) و بررسی زنده‌مانی این باکتری است. بدین منظور، از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر استفاده گردید. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که رابطه بین غلظت‌های مختلف فیبر و عصاره و زنده‌مانی باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در روزهای اول تا بیست و یکم معنی‌دار است ($P<0.01$). بهینه‌سازی، با استفاده از روش سطح پاسخ نشان داد که بیشترین زنده‌مانی باکتری بیفیدو *باکتریوم لاکتیس* زمانی حاصل می‌گردد که غلظت عصاره و فیبر به ترتیب ۰/۱ و ۱/۳ درصد باشد. در این شرایط مطلوبیت مدل برابر با ۰/۹۴ و تعداد باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در روز اول ۷/۱۱±۰/۰۰۵ log cfu/ml، روز هفتم ۶/۴۹±۰/۰۳۵ log cfu/ml، روز چهاردهم ۶/۲۴±۰/۰۵۵ log cfu/ml و روز بیست و یکم ۵/۴۱±۰/۱۷ log cfu/ml بود. از آنجایی که ماست تولید شده تحت شرایط بهینه حاوی حداقل 10^6 پرگنه باکتری در هر میلی‌لیتر بود، لذا محصول فوق فراسودمند نامیده شد.

واژگان کلیدی: *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*(BB-12)، نعناع، فیبر، عصاره، ماست.

مقدمه

امروزه به دلیل توجه بیشتر مردم به اثرات سلامتی بخش غذاها، تولید این گونه مواد غذایی بیشتر شده است. از جملهٔ این نوع مواد غذایی فراسودمند، می‌توان به گیاه نعناع اشاره کرد (کامکار و همکاران، ۱۳۸۸). عصاره نعناع حاوی ترکیبات فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی است (Vazifedoost et al., 2014). ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی انسان را در مقابل بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی و انواع سرطان‌ها محافظت می‌کنند (Namiki, 1990). نعناع همچنین حاوی فیبر است. فیبر اثر سودمندی در کاهش کلسترول خون داشته و موجب کاهش بیماری-های قلبی،عروقی و نارسایی‌های روده، بخصوص سرطان روده بزرگ می‌گردد و همچنین باعث تنظیم و کاهش سطح قند خون می‌شود (Parmar and Kar, 2007)، بنابراین بیماران دیابتی نیز در اثر مصرف فیبر به انسولین کمتری نیاز خواهند داشت (Elleuch et al., 2011; kim, 2000). جهت اثرات مثبت فیبر بر سلامتی انسان، مقدار دریافتی روزانه آن برای مردان ۳۸ گرم و برای زنان ۲۵ گرم توصیه شده است (Duxbury, 2004; Vahedi et al., 2008). این موضوع توجه به افزایش فیبر را در فرآورده‌های غذایی افزایش می‌دهد.

یکی از فرآورده‌های غذایی پرمصرف که می‌توان عصاره و فیبر نعناع را به آن اضافه کرد، ماست است. ماست

محصولی با سابقه طولانی و با اثراتی مطلوب بر مصرف‌کننده شناخته شده است، به‌طوری‌که بسیاری از مصرف‌کنندگان آن را به عنوان غذای سلامت‌بخش می‌شناسند (Bertazzoni et al., 2004). ماست پتانسیل انتقال باکتری‌های پروبیوتیک را دارد و افزودن باکتری‌های پروبیوتیک از جمله *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به ماست، خواص سلامتی‌بخش آن را افزایش می‌دهد (Heller, 2001). هم‌چنین اضافه کردن فیبر لیمو به شیرهای تخمیری موجب افزایش رشد پروبیوتیک‌ها می‌شود (Sendra et al., 2008) و چنین گزارش شده است که افزودن عصارهٔ نعناع به دوغ، در حد یک درصد، تاثیر مثبتی بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک داشته است (وثوق و همکاران، ۱۳۸۷). هدف از این مطالعه بررسی اثرعصاره و فیبر ساقهٔ نعناع بر زنده‌مانی باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در ماست همزده به روش سطح پاسخ بوده است.

مواد و روش کار

اسید نالیدیکسیک، لیتیوم کلراید، سولفات پاروموماسین و سولفات نئومایسین، از شرکت سیگما و سایر ترکیبات شیمیایی مورد نیاز، شامل: کربنات سدیم، اتانول، محیط کشت MRS[1] آگار و آب پپتونه در حد آزمایشگاهی از شرکت مرک و سوش خالص باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (BB-12) از شرکت کریستین هانسن دانمارک تهیه گردید.

تهیه و آماده‌سازی نمونه

گیاه نعناع از یک مزرعه در شهرستان نیشابور تهیه شد. پس از حذف قسمت‌های غیرخوراکی و شستشو با آب، سبزی‌ها در شرایط دور از نور آفتاب و با جریان ملایم هوا خشک و سپس توسط آسیاب برقی(تفال، فرانسه) به صورت پودر درآمد. پودر نعناع از یک الک با مش ۳۵ عبور داده شد و در محلی تاریک، سرد و خشک نگهداری گردید.

استخراج عصاره با روش خیساندن

۵ گرم پودر برگ گیاه نعناع به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر مخلوط گردید و سپس نمونه در حالی که به طور مداوم همزده می‌شد، در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۹ ساعت خیسانده شد. نمونه بلافاصله پس از مرحله خیساندن به داخل دستگاه اولتراسوند (Eurosonic® 4D، 220-230 V، 350 W، 50/60 Hz) منتقل و طی دو زمان مختلف: ۱۵ و ۳۰ دقیقه عمل اولتراسوند انجام گرفت و سپس با کمک کاغذ واتمن شماره ۱ صاف گردید (Vazifedoost et al., 2014). محلول صاف شده جهت آزمایش‌های بعدی به داخل یخچال منتقل شد.

استخراج فیبر ساقه نعناع

ساقهٔ نعناع پس از تهیّه به صورت قطعات ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متری برش خورد و سپس توسط یک خردکن(تفال، فرانسه) به صورت کاملاً ریز و خردشده درآمد. ساقهٔ تازهٔ نعناع به نسبت ۱:۱ با اتانول مخلوط و هموژن گردید و سپس در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۸۰ دقیقه خیسانده و همزمان مخلوط به آرامی همزده شد. پس از مدت زمان ذکرشده، باقیمانده فیبری به وسیله سانتریفوژ کردن، جدا و تحت دمای ۶۰ درجه در مدت زمان ۱۶ ساعت خشک گردید. جهت استفاده از فیبر به‌دست آمده در ماست آن را از یک مش ۰/۵ میلی‌متری عبور داده و فیبرهای با طول ۰/۵ میلی‌متری و کمتر مورد استفاده قرارگرفت (Sanz et al., 2008).

آماده‌سازی ماست همزده

شیر در دمای ۸۵ درجه سلسیوس، به مدت ۱۵ دقیقه، در حال همزدن آرام، در حمام آب گرم پاستوریزه شده و تا دمای ۴۳ درجه سلسیوس سرد گردید و مایه ماست (Freez-dried DVS) YC-380) شرکت کریستین هانسن دانمارک) اضافه و مخلوط شد. نمونه در گرم‌خانه، با دمای ۴۳ درجه سلسیوس، قرار داده شد تا pH به ۴/۶ برسد. پس از اضافه کردن باکتری

1. Man Rogosa Sharpe

پروبیوتیک ماست همزده شد و در ظروف ۲۵۰ گرمی تقسیم گردید و سپس غلظت‌های مختلف عصاره و فیبر که متغیرهای مستقل این مطالعه بودند، طبق جدول شماره ۱ به ظروف اضافه گردیدند و در نهایت نمونه‌ها در درجه حرارت یخچال جهت آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند. رشد و بقای باکتری پروبیوتیک به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد.

جدول ۱- نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آنها

فاکتور	کمینه	مرکزی	بیشینه
عصاره(٪)	۰/۱	۰/۵۵	۱
فیبر(٪)	۰/۳	۰/۸	۱/۳

آماده‌سازی محیط کشت

۶۲ گرم محیط کشت MRS آگار در یک لیتر آب مقطر حل شد و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس، به مدت ۱۵ دقیقه، اتوکلاو گردید. سپس محیط کشت تا دمای ۵۰ درجه سلسیوس سرد گردید و ۵۰ سی‌سی محلول NNLP[1] به آن اضافه شد(وثوق و همکاران، ۱۳۸۷).

آماده‌سازی محلول NNLP

۰/۰۳ گرم اسید نالیدیکسیک، ۰/۲ گرم سولفات نئومایسین، ۶ گرم لیتیوم کلراید و ۰/۲۵ گرم سولفات پارومومایسین وزن گردید و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این محلول از فیلتر سترون (۰/۴۵ میکرومتر) عبور داده شد و سپس به محیط کشت MRS آگار اضافه گردید (Dave and Shah, 1996).

کشت میکروبی

۱ سی سی ماست به ۹ سی سی محلول بافری آب پپتونه سترون اضافه شد و به صورت یکنواخت درآمد. سپس رقیق‌سازی به روش سریالی انجام گرفت. از هر رقت ۱ سی‌سی به داخل پلیت منتقل و محیط کشت روی آن ریخته شد. پلیت‌ها داخل جار بی‌هوازی قرار گرفتند و جار به داخل گرمخانه منتقل گردید و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به مدت ۷۲ ساعت، باقی ماند و سپس شمارش انجام شد (Dave and Shah, 1996).

روش آماری

در این تحقیق از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر (CCRD)[2] استفاده شد. تعداد نمونه‌های آزمایشی برابر ۱۳ عدد بود که در این میان ۵ آزمون تکرار در نقطه مرکزی در نظر گرفته شد و از این نقاط برای تعیین خطای آزمایش استفاده گردید و آزمون‌ها با استفاده از طرح مرکب مرکزی چرخش پذیر، روش سطح پاسخ، مطابق جدول شماره ۲ طراحی و سپس انجام شد. آنالیز رگرسیون با مدل درجه دوم ذیل انجام گرفت:

$$Y=\beta_{\circ}+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\beta_{11}X_1^2+\beta_{22}X_2^2+\beta_{12}X_1X_2$$

جدول ۲- طراحی آزمون‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ

تیمار	عصاره نعناع(٪)	فیبر ساقه نعناع(٪)
۱	۰/۱	۰/۳
۲	۰/۱	۱/۳
۳	۰/۵۵	۱/۳
۴	۰/۵۵	۰/۸
۵	۱	۱/۳
۶	۰/۵۵	۰/۸
۷	۰/۵۵	۰/۸
۸	۱	۰/۸
۹	۱	۰/۳
۱۰	۰/۵۵	۰/۳
۱۱	۰/۱	۰/۸
۱۲	۰/۵۵	۰/۸
۱۳	۰/۵۵	۰/۸

نتایج

رشد و بقای باکتری پروبیوتیک در روز اول

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که رابطهٔ بین رشد و بقای باکتری پروبیوتیک و غلظت‌های مختلف فیبر و عصاره در روز اول معنی دار بود ($P<0.01$) و R^2

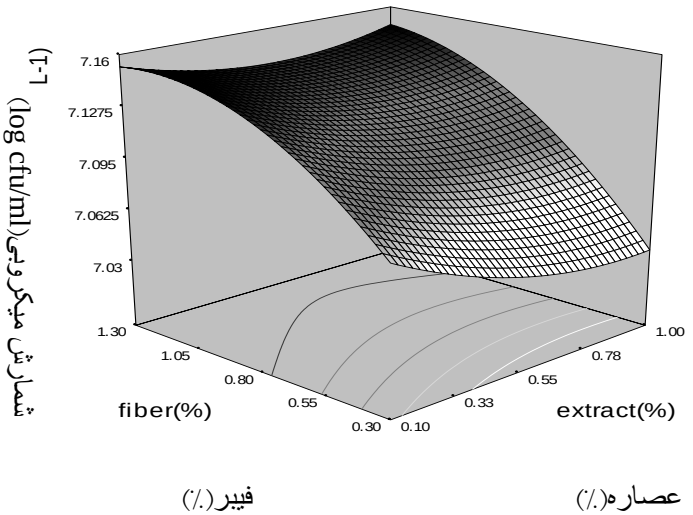
1. nalidixic acid, neomycin sulfate, lithium chloride, and paromomycin sulfate

2. central composite rotatable design

مساوی ۰/۹۸ بود. در بین روابط به دست‌آمده، روابط خطی فیبر، عصاره، اثر مدل، مربع عصاره و مربع فیبر در سطح $P<0.01$ و اثر متقابل فیبر و عصاره در سطح $P<0.05$ معنی‌دار بود (جدول ۳). همان طور که شکل ۱ نشان می‌دهد، با افزایش غلظت فیبر و کاهش غلظت عصاره بقای باکتری بیفیدوباکتریوم افزایش پیدا کرده است. بالاترین بقای باکتری در بالاترین غلظت فیبر و کمترین غلظت عصاره مشاهده می‌گردد.

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس(ANOVA) مدل سطح پاسخ درجه دوم در روز اول

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۰/۰۱۵۴۷	۵	۰/۰۰۳۰۹۴	۱۰۳/۹۵۷۳	۰/۰۰۰۱
عصاره	۰/۰۰۰۸۱۶	۱	۰/۰۰۰۸۱۶	۲۷/۴۱۹۴	۰/۰۰۱۲
فیبر	۰/۰۱۲۷۳۴	۱	۰/۰۱۲۷۳۴	۴۲۷/۸۸۳	۰/۰۰۰۱
اثر متقابل فیبر و عصاره	۰/۰۰۰۳۵۷	۱	۰/۰۰۰۳۵۷	۱۱/۹۹۵۱۶	۰/۰۱۰۵
مربع عصاره	۰/۰۰۰۴۵۸	۱	۰/۰۰۰۴۵۸	۱۵/۴۰۵۵۲	۰/۰۰۵۷
مربع فیبر	۰/۰۰۱۵۱۱	۱	۰/۰۰۱۵۱۱	۵۰/۷۷۵۲۷	۰/۰۰۰۲
باقی‌مانده	۰/۰۰۰۲۰۸	۷	۰/۰۰۰۰۰۲۹۸		
خطای خالص	۰	۴	۰		



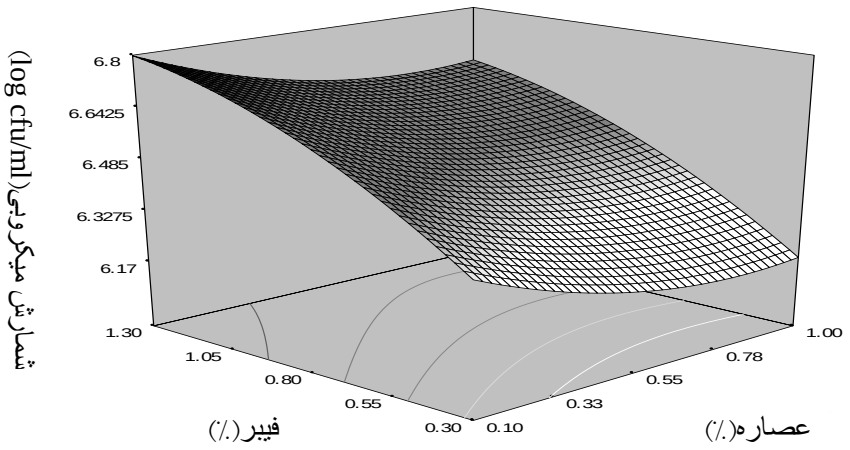
شکل ۱- اثر متقابل فیبر و عصاره بر روی تعداد باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در روز اول

رشد و بقای باکتری پروبیوتیک روز هفتم

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که رابطه بین رشد و بقای باکتری پروبیوتیک و غلظت‌های مختلف فیبر و عصاره در روز هفتم معنی‌دار بود ($P<0.01$) و R^2 مساوی ۰/۹۷ بود (جدول ۴). در بین روابط به دست آمده، روابط خطی فیبر، عصاره، اثر مدل و مربع عصاره در سطح $P<0.01$ معنی‌دار بودند. همچنین اثر متقابل فیبر و عصاره در سطح $p<0.05$ معنی‌دار بود. همان طور که شکل ۲ نشان می‌دهد، شبیه به روز اول بالاترین بقای باکتری پروبیوتیک در پائین‌ترین غلظت عصاره و بالاترین غلظت فیبر به دست آمد.

جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس(ANOVA) مدل سطح پاسخ درجه دوم در روز هفتم

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
اثر مدل	۰/۳۶	۵	۰/۰۷۱	۵۶/۱۷	۰/۰۰۰۱
عصاره	۰/۰۴۷	۱	۰/۰۴۷	۳۸/۲۳	۰/۰۰۰۵
فیبر	۰/۲۹	۱	۰/۲۹	۲۳۶/۷۸	۰/۰۰۰۱
اثر متقابل فیبر و عصاره	۰/۰۰۰۰۳۰۲	۱	۰/۰۰۰۰۳۰۲	۰/۰۲۵	۰/۸۷۹۵
مربع عصاره	۰/۰۱۴	۱	۰/۰۱۴	۱۱/۳۶	۰/۰۱۱۹
مربع فیبر	۰/۰۱۳	۱	۰/۰۱۳	۱۰/۴۶	۰/۰۱۴۴
باقی‌مانده	۰/۰۰۸۵	۷	۰/۰۰۱۲		
خطای خالص	۰/۰۰۲۳	۴	۰/۰۰۰۵۹		



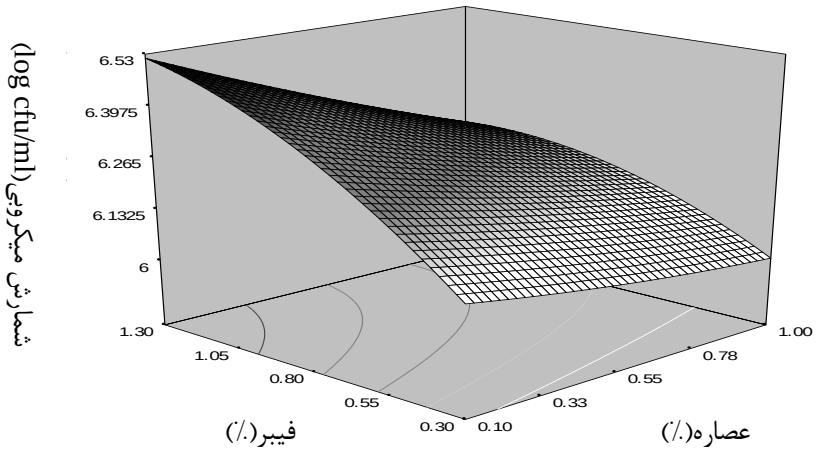
شکل ۲- اثر متقابل فیبر و عصاره بر روی تعداد باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در روز هفتم

رشد و بقای باکتری پروبیوتیک در روز چهاردهم

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که رابطه بین رشد و بقای باکتری پروبیوتیک و غلظت‌های مختلف فیبر و عصاره در روز چهاردهم معنی‌دار بود ($P<0.01$) و R^2 مساوی ۰/۹۴ بود(جدول ۵). در بین روابط به دست‌آمده، روابط خطی فیبر، عصاره، اثر مدل و اثر متقابل فیبر و عصاره در سطح $P<0.01$ معنی‌دار بودند. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، بیشترین زنده‌مانی باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در کمترین غلظت عصاره و بالاترین غلظت فیبر مشاهده می‌گردد.

جدول ۵- نتایج آنالیز واریانس(ANOVA) مدل سطح پاسخ درجه دوم در روز چهاردهم

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۰/۲۳	۵	۰/۰۴۶	۱۵/۱۸	۰/۰۰۱۲
عصاره	۰/۰۶۴	۱	۰/۰۶۴	۲۱/۲۱	۰/۰۰۲۵
فیبر	۰/۱۴	۱	۰/۱۴	۴۷/۲۲	۰/۰۰۰۲
اثر متقابل فیبر و عصاره	۰/۰۱۲	۱	۰/۰۱۲	۳/۸۴	۰/۰۹۰۹
مربع عصاره	۰/۰۰۰۳۲	۱	۰/۰۰۰۳۲	۰/۱۱	۰/۷۵۲۵
مربع فیبر	۰/۰۱۱	۱	۰/۰۱۱	۳/۴۹	۰/۱۰۴۱
باقی‌مانده	۰/۰۲۱	۷	۰/۰۰۳۰۱		
خطای خالص	۰/۰۱۶	۴	۰/۰۰۴		



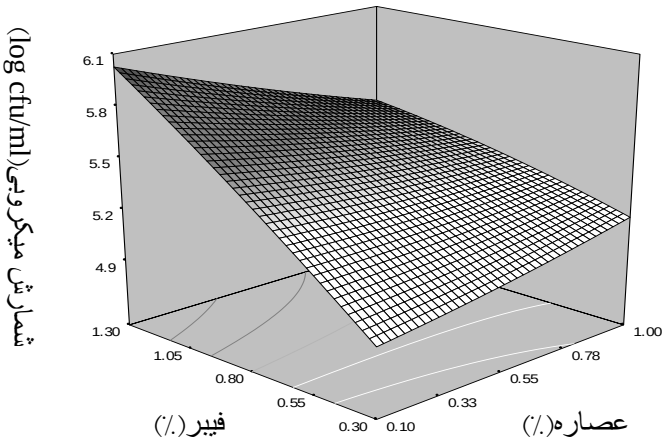
شکل ۳- اثر متقابل فیبر و عصاره بر روی تعداد باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در روز چهاردهم

رشد و بقای باکتری پروبیوتیک در روز بیست و یکم

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که رابطه بین رشد و بقای باکتری پروبیوتیک و غلظت‌های مختلف فیبر و عصاره در روز بیست و یکم معنی‌دار بود ($P<0.05$) و R^2 مساوی ۰/۷۸ بود. در بین روابط به دست‌آمده، روابط خطی فیبر، اثر مدل و اثر متقابل فیبر و عصاره در سطح $p<0.05$ معنی‌دار بودند (جدول ۶). همان طور که شکل ۴ نشان می‌دهد، هرچه غلظت عصاره کاهش و غلظت فیبر افزایش پیدا کرده است، زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک نیز بیشتر شده است.

جدول ۶- نتایج آنالیز واریانس(ANOVA) مدل سطح پاسخ درجه دوم در روز بیست و یکم

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۰/۹۹	۵	۰/۲	۷/۱	۰/۰۱۱۵
عصاره	۰/۰۲۶	۱	۰/۰۲۶	۰/۹۴	۰/۳۶۳۷
فیبر	۰/۸۱	۱	۰/۸۱	۲۹/۰۴	۰/۰۰۱
اثر متقابل فیبر و عصاره	۰/۱۵	۱	۰/۱۵	۵/۴۱	۰/۰۵۲۹
مربع عصاره	۰/۰۰۰۹۱	۱	۰/۰۰۰۹۱	۰/۰۳۳	۰/۸۶۱۶
مربع فیبر	۰/۰۰۲۷	۱	۰/۰۰۲۷	۰/۰۹۷	۰/۷۶۴۹
باقی‌مانده	۰/۲	۷	۰/۰۲۸		
خطای خالص	۰/۰۶۹	۴	۰/۰۱۷		



شکل ۴- اثر متقابل فیبر و عصاره بر روی تعداد باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در روز بیست و یکم

بهینه‌سازی

بهینه‌سازی مدل نشان می‌دهد که مناسبترین رشدو بقای باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم در روزهای مورد مطالعه، زمانی مشاهده می‌شود که غلظت عصاره ۰/۱ درصد و فیبر ۱/۳ درصد باشد. در این شرایط مطلوبیت مدل برابر با ۰/۹۴ است. تحت این شرایط تعداد باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در روز اول ۷/۱۱±۰/۰۰۵ log cfu/ml ، روز هفتم ۶/۴۹±۰/۰۳۵ log cfu/ml، روز چهاردهم ۶/۲۴±۰/۰۵۵ cfu/ml log و روز بیست و یکم ۵/۴۱±۰/۱۷ log cfu/ml بود.

بحث

در این تحقیق عصارهٔ نعناع و فیبر ساقهٔ نعناع در غلظت‌های مختلف به ماست همزده حاوی باکتری پروبیوتیک اضافه گردید و زنده‌مانی باکتری درمدت بیست و یک روز نگهداری ماست به فواصل هر هفت روز مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که ملاحظه گردید در مدت بیست و یک روز نگهداری ماست با افزایش فیبر و کاهش عصاره، زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بیشتر شد.

مطالعات نشان داده است که عوامل متعددی بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در ماست موثّرند که از جمله آنها می‌توان به: pH، اسیدیته، غلظت اسیدهای لاکتیک و استیک، دمای انبارداری و غلظت اکسیژن

اشاره کرد که در بین این عوامل یکی از فاکتورهای مهم در کاهش قابلیت زیستی سلولی، کاهش pH و افزایش اسیدیته در طی نگهداری محصول و انباشته شدن اسیدهای آلی در اثر تخمیر می‌باشد (Lankaputhra and Shah, 1998). با توجه به اینکه فیبر قادر به تعدیل اسیدیته است (Chantaro et al., 2007)، بنابراین در نمونه‌های حاوی فیبر بیشتر میزان زنده‌مانی باکتری بیفیدوباکتریوم بیشتر بوده است. از طرف دیگر به علت آنکه فیبر جزو ترکیبات پری‌بیوتیک محسوب شده، حضور ترکیبات پری‌بیوتیکی به دلیل تحریک رشد و فعالیت پروبیوتیک‌ها، از مهمترین دلایل بقای بیشتر باکتری‌ها است. پری‌بیوتیک‌ها، از جمله، ممکن است برخی از مواد مغذی مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها را تامین نموده، یا شرایط نامطلوب و منفی محیطی، از جمله: آسیب‌های اسیدی را تعدیل کنند (Lourens-Hattingh and Viljoen ., 2001). در همین راستا هنگامی که پری‌بیوتیک رافتیلوز به نسبت ۱/۵ درصد وزنی- حجمی به ماست اضافه می‌گردد، قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها از جمله: *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدوباکتریوم* در طول ۴ هفته نگهداری، در دمای ۴ درجه سلسیوس، ۱/۴ سیکل لگاریتمی افزایش می‌یابد (Capela et al., 2006).

در مطالعه‌ای دیگر، افزودن فیبر مرکبات به شیرهای تخمیری غنی شده با پروبیوتیک، قابلیت زیستی و رشد آنها را افزایش داده است که شاید دلیل آن تبدیل سریع لاکتوز به اسید لاکتیک، تاثیر متقابل اجزای شیر (به طور عمده پروتئین‌ها)، تثبیت شبکه پروتئینی و جلوگیری از انتقال آب آزاد باشد (Sendra et al., 2010). باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در نمونه‌های ماست حاوی فیبر هویج در مقایسه با نمونه‌های بدون فیبر زنده‌مانی بیشتری نشان داده است (توحیدزاده و همکاران، ۱۳۹۱). هم چنین در بررسی تاثیر افزودن فیبر حاصل از ضایعات چغندرقند در مقادیر ۰، ۱/۵، ۰/۷ و ۲ درصد بر خصوصیات رئولوژیکی، فیزیکوشیمیایی و قابلیت زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* درماست منجمد، در مدت ۶۰ روز، مشخص گردید که با افزایش میزان فیبر، زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* افزایش یافته است (مهدیان و همکاران، ۱۳۹۳). در مطالعه مشابهی که از فیبرهای جو و گندم در ماست جهت بررسی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* استفاده شده بود، نیز اعلام شد که با وجود کاهش pH در مدت نگهداری، استفاده از فیبر گندم و جو باعث افزایش رشد و بقای باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، در مدت ۲۱ روز، نگهداری ماست گردید (توکلی فدیهه، ۱۳۹۲). در مطالعه حاضر هم در نمونه‌هایی که حاوی فیبر بیشتری بوده‌اند، زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک هم بیشتر بوده است. از طرفی عصاره نعناع، در غلظت بالا، تاثیر منفی بر رشد و بقای باکتری دارد؛ که دلیل آن وجود ترکیبات ضد میکروب مثل منتول است (Sing et al., 2011). گزارش‌های متعدد حاکی از آن است که با افزایش میزان عصاره نعناع در ماست و دوغ، رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* کاهش و با کاهش میزان عصاره، زنده‌مانی افزایش نشان داده است (وثوق و همکاران، ۱۳۸۷ ؛ Amirdivani et al., 2011). در مطالعه حاضر نیز در غلظت ۰/۱ درصد، زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک افزایش داشته است؛ در حالیکه با افزایش بیشتر عصاره، میزان زنده‌مانی کاهش یافته است، که نتیجه به دست‌آمده با مطالعات فوق‌الذکر، همخوانی نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

اثر متقابل فیبر و عصاره نعناع بر روی زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در ماست همزده معنی‌دار بود ($p< 0.01$). در ماست حاوی ۰/۱ درصد عصاره و ۱/۳ درصد فیبر بالاترین زنده‌مانی باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به دست آمد. به طوری که بعد از ۲۱ روز نگهداری ماست، تنها یک سیکل لگاریتمی کاهش در

تعداد باکتری‌ها مشاهده شد و تعداد باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به میزان 10^6 پرگنه در هر میلی‌لیتر، از ماست حفظ گردید. به همین دلیل ماست تولید شده فراسودمند نامیده شد.

منابع

۱. توحیدزاده، مینا.، زمردی، شهین.، الهامی‌راد، امیرحسین و خسروشاهی‌اصل، اصغر. (۱۳۹۲). تاثیر فیبر هویج در زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی و کیفیت ماست میوه‌ای زردآلو با استفاده از روش سطح پاسخ. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی، سال ششم، شماره اول، صفحه ۱۱۳-۱۲۲.

۲. توکلی فدیهه، مریم. (۱۳۹۲). بررسی تاثیر افزودن فیبرهای گندم و جو بر ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی و زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست، نشریه مجله‌ی نوآوری در علوم و فناوری غذایی، ویژه‌نامه دومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی، صفحه ۷۵-۸۵ .

۳. کامکار، ابوالفضل.، جبلی‌جوان، اشکان.، جمشیدی، رضا. (۱۳۸۸). ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و اسانس نعناع ایرانی، نشریه دامپزشکی و آزمایشگاه، سال اول، شماره اول، صفحه ۶۹-۷۷.

۴. مهدیان، الهام.، میلانی، الناز.، گاراژیان، رضا.، حلاجان، سمیه. (۱۳۹۳). بررسی اثر افزودن فیبر حاصل از ضایعات چغندر قند بر خصوصیات رئولوژیکی، فیزیکو شیمیایی و زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست منجمد پروبیوتیک، نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی، سال ششم، شماره‌ی سوم، صفحه ۴۷-۵۸.

۵. وثوق، امیرصالح.، خمیری، مرتضی.، کاشانی‌نژاد، مهدی.، جعفری، سیدمهدی. (۱۳۸۷). اثر عرق نعناع بر قابلیت بقاء باکتری‌های پروبیوتیک در نوشیدنی سنتی ایرانی(دوغ)، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، سال شانزدهم، شماره اول، صفحه ۱۵۶-۱۶۴.

6. Allgeyer, L.C., Miller, M.J., and Lee, S.Y. 2010. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. J Dairy Sci. 93: 4471- 4479
7. Amirdivani, S.H., and Salihin Baba, A. 2011. Change in yogurt fermentation characteristic and antioxidant potential and in vivo inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. Food Sci Technol. 44:1458-1464.
8. Bertazzoni, M., Benini, A., Marzoho, M., Sbarbati, A., Ruzzenete, O., Ferrario, R.,Hendriks, H., and Dellaglio, F. 2004. Assesment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. Int Dairy J. 14: 723-736.
9. Capela, P.,Hay, T.K.C., and Shah, N.P. 2006. Effect of cryprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of prebiotic organisms in yogurt and freeze-dried yogurt. Food Res Int. 39: 203-211.
10. Chantaro, P., Devahastin, S., and Chiewchan, N. 2007. Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. Trends Food Sci Technol. 10: 3-8.
11. Dave, R.I., and Shah, N.P. 1996. Evaluation of media for selective enumeration of Streptococcus thermophilus, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria.J. Dairy Sci. 79:1529-1536.
12. Duxbury, D. 2004. Dietary fiber: still no accepted definition. Food Technol. 58:70–71.
13. Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker. C., and Attia, H. 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterization, technological functionality and commercial applications: A review. Food Chem. 124: 411–421.
14. Heller, K.J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. Am. J. Clin. Nutr. 73:374-9.

15. Lankaputhra, W. E. V. and Shah, N. P. 1998. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and organic acids. Mutat. Res. 39: 169-182.
16. Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B.C. 2001.Yoghurt as probiotic carrier food. Review article. Int. Dairy J. 11:1-17.
17. Namiki, M. 1990. Antioxidants, antimutagens in food, Crit. Rev. Food Sci. Nutr.6: 273-300.
18. Parmar, H.S. and Kar, A. 2007. Protective role of citrus sinensis, musa paradisiaca, and punica granatum peels against diet-induced atherosclerosis and thyroid dysfunctions in rats. Nutr. Res. 27:710–718.
19. Sanz, T.,Salvador, A., Jimenez, A., and Fiszman, S.M.2008.Yogurt enrichment with functional asparagus fibre, Effect of fibre extraction method on rheological properties, colour, and sensory acceptance. Eur. Food Res Technol. 227:1515-1521.
20. Sendra, E., Kuri, V., Ferna'ndez-Lo'pez, J., Sayas-Barbera'a, E., Navarro, C., and Pe'rez-Alvarez, J. A. 2010. Viscoelastic properties of orange fiber enriched yoghurt as a function of fiber dose, size and thermal treatment. Food Sci Technol. 43: 708-714.
21. Singh, R., Shushni, A.M., Belkheir, A. 2011. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. Arabian J Chem. 22: 1-7.
22. Vahedi, N., Mazaheri Tehrani, M., and Shahidi, F. 2008. Optimizing of fruit yoghurt formulation and evaluating its quality during storage. Am.-Eurasian J Agric Environ Sci. 3: 922-927.
23. Vazifedoost, M., Elhamirad, A.H., Shafafi-Zenoozian, M., Haddad-Khodaparast, M.H., Armin, M. 2014. Effect of Ultrasound-assisted maceration on the extract of phenolic compounds and antioxidant activity from Iranian mint (*Mentha piperita* L.). Int J Biosci. 5(8): 207-214.
24. Vian, M.A., Fernandez, X., Visinoni, F., Chemat, F.2008. Microwave hydro diffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. J. Chromatogr. A.1190: 14-17.

The effect of extract and fiber of mint stalk on viability of *Bifidobacterium Lactis* bacteria in stirred yogurt using the response surface method

Vazifedoost M[1*], Elhami Rad AH[1], Shafafi Zenoozian M[1], Haddad Khodaparast MH[2], Armin M[3]

1. Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Department of Agronomy, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

* **Corresponding author:** *imi_vazifedost@yahoo.com*

Received: 2015.06.09 Accepted: 2016.04.26

Abstract

In today's world, there is a growing tendency towards producing healthy and nutritious food. Mint is a genus of plants that its healthy and nutritious effects have been proved. Adding probiotic bacteria to yogurt increases its nutritious benefits. This study aims at adding the extract and fiber of mint stalk to stirred yogurt containing *Bifidobacterium Lactis* bacteria (BB-12) as well as examining the viability of this bacterium. To do so, the response surface methodology and the central composite rotatable design were employed. The findings obtained from the analysis showed that there was a significant relationship between different concentrations of fiber and extract, and the viability of *B. Lactis* bacteria in the first day to the 21st day ($P<0.01$). Having applied the response surface method, the optimization depicted that the maximum viability of *B. Lactis* bacteria is only achieved when the concentration of extract and fiber are 0.1 and 1.3 percent, respectively. In these conditions, the utility of the model equals 0.94 and the number of *B. Lactis* bacteria is 7.11±0.005 log cfu/ml in the first day, 6.49± 0.035 log cfu/ml in the 7th day, 6.24 ± 0.055 log cfu/ml in the 14th day, and 5.41±0.17 log cfu/ml in the 21st. Since the produced yogurt under the condition of optimization contained at least 10^6 colony of bacteria per milliliter, the said product was called functional.

Keywords: *Bifidobacterium Lactis* (BB-12), Mint, Fiber, Extract, Yogurt.