بررسی توانایی رشد *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* بر روی محیط کشت کنجاله کنجد

مرجان السادات موسوی[1]، محمد حجت الاسلامی [1،2]، زینب السادات ابراهیم زاده موسوی*[3]، حسین کیانی [3]، سید محمد علی جلالی[4]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی ادویه‌ای و عطری، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. آزمایشگاه فرایندهای زیستی و تشخیص سریع-گروه علوم و صنایع غذایی،پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۴. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *zinab.mosavi@ut.ac.ir*

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۳/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۴

چکیده

کنجاله روغن کنجد محصول جانبی حاصل از روغن‌کشی دانه کنجد بوده که به‌عنوان یکی از ضایعات کشت و صنعت قابل‌دسترس و فراوان و غنی از پروتئین باارزش تغذیه‌ای بالا و ارزان‌قیمت انتخاب‌شده است و می‌تواند به‌عنوان یک بستر ارزان‌قیمت جهت رشد میکروارگانیسم‌های مفید ازجمله پروبیوتیک‌ها استفاده شود. در این پژوهش رشد *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* با عنوان یک پروبیوتیک بر روی محیط کشت کنجاله کنجد در شرایط گرمخانه‌گذاری متفاوت ازنظر دستیابی به بهترین شمارش میکروبی باکتری پروبیوتیکی *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* مورد ارزیابی قرارگرفته‌است، خمیر کنجاله کنجد با pH اولیه ۶/۵ به‌عنوان محیط کشت استفاده شد و شرایط گرمخانه‌گذاری شامل شرایط هوازی در سه درجه حرارت ۳۰ و ۳۷ و ۴۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. نتایج نشان داد باکتری توانایی رشد بر روی بستر کنجاله کنجد را دارد و در انتهای تخمیر در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس جمعیت میکروبی به 10^8 CFU/ml افزایش یافت و هم‌چنین *لاکتو باسیلوس پلانتاروم*، pH همه‌ی نمونه‌های تخمیری را در همه دماها به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) کاهش داد و بیشترین میزان کاهش مربوط به دمای ۳۷ درجه سلسیوس بود که به حدود ۴/۸۵ رسید. هم‌چنین نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که ترکیب اسیدهای چرب محیط کشت کنجاله کنجد براثر رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دستخوش تغییرات شد. اسیدهای چرب (C15: 0)، (C15: 1)، (C16: 0)، (C16: 1)، (C18: 1t)، (C18: 1c)، (C21: 0) و (C24: 1) به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) افزایش یافتند. درحالی‌که اسیدهای چرب (C14:1)، (C17: 0)، (C18: 1c)، (C18: 2c)، (C20: 0)، (C18: 3n3)، (C20: 1)، (C22: 0) و (C24: 0) به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) کاهش یافتند. دراین بین تخمیر سبب تولید (C17:1) و (C22:1) شد و لینولئیک اسید مصرف شد. درمجموع می‌توان چنین نتیجه گرفت که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم توانایی رشد در محیط کشت ارزان‌قیمت و در دسترس کنجاله کنجد را دارا می‌باشد.*

کلید واژه‌ها: پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، محیط کشت کنجاله کنجد، اسید چرب.

مقدمه

محصولاتی که ادعا می‌شوند اثر فیزیولوژیکی خاصی در بدن دارند معمولاً غذاهای عملکردی نامیده می‌شود. به‌طورکلی غذاهای عملکردی به دودسته پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها تقسیم می‌شوند. پروبیوتیک‌ها شامل میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در مقادیر مناسب تأثیر مثبت بر سلامت میزبان می‌گذارند (Granato, et al., 2010). این باکتری‌ها می‌توانند در شرایط pH پائین دستگاه گوارش زنده مانده و با نابودی میکروارگانیسم‌های مضر داخل روده و هم‌چنین تعادل فلور میکروبی روده موجب حفظ سلامتی و افزایش میزان رشد در انسان و دام

شوند. از عملکردهای این باکتری‌ها می‌توان به فعالیت ضد میکروبی، بهبود سوخت‌وساز بدن، کاهش کلسترول در سرم خون، تحریک سیستم ایمنی بدن، خواص آنتی موتاژن، خواص ضدسرطان، خواص ضداسهال، بهبود بیماری‌های التهاب روده و سرکوب هلیکوباکترها اشاره کرد (Ory, et al., 2004). *لاکتوباسیلوس‌ها* باکتری میله‌ای گرم مثبت و کاتالاز و اکسیداز منفی هستند (De Vries, et al., 2006). حضور این میکروارگانیسم در فلور میکروبی تعداد زیادی از فراورده‌های تخمیری لبنی و گوشتی نشان داده‌شده‌است . این باکتری به‌عنوان یک باکتری پروبیوتیک در دستگاه گوارش نیز بیان‌شده است. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین گونه‌ها از گستره باکتری‌های اسیدلاکتیک است که به دلیل توانایی بالای آن و سازگاری و انطباق با سویه‌های متفاوت بسیار حائز اهمیت است. از اثر سلامتی‌بخش اثبات‌شده مصرف فراورده‌های غذایی حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌توان به کاهش عفونت دستگاه گوارش و خطر بیماری التهاب روده‌ای و اثرات تحریک‌کننده سیستم ایمنی اشاره کرد مطالعات نشان داده که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به‌عنوان بازدارنده طبیعی در غذاهای فراوری‌شده زیستی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا و میکروارگانیسم‌های عامل فساد در طول انبارداری ممانعت کرده و طول عمر نگهداری محصول را افزایش می‌دهد. دانه کنجد دارای ۴۰ تا ۵۰ درصد روغن، ۲۰ تا ۲۵ درصد پروتئین، ۲۰ تا ۲۵ درصد کربوهیدرات و ۵ تا ۶ درصد خاکستر می‌باشد و کنجاله کنجد غنی از پروتئین، متیونین، کلسیم و فسفر و نیاسین است (El-Adawy,1997). دانه‌های کنجد تقریباً فاقد ترکیبات ضدتغذیه‌ای هستند اما گزارشاتی مبنی بر وجود چندین واکنش آلرژی وجود دارد، پاستور طی تحقیقاتی بیان کرد که مهم‌ترین ماده آلرژی در کنجد یک پروتئین با وزن مولکولی ۹۰۰۰ دالتون می‌باشد بررسی توالی اسیدهای آمینه در پروتئین آلرژیک نشان داد که ماده مذکور یک آلبومین 2s بوده و در گروه بازدارنده آلفا آمیلاز و تریپسین غلات قرار می‌گیرد (Khalid, et al., 2003) وجود اسید فیتیک هم در دانه کنجد گزارش‌شده‌است که در آب نامحلول است، یکی از فراورده‌های پروتئینی کنجد، کنجاله کنجد می‌باشد که حاوی کلسیم و منیزیم و پروتئین و مواد معدنی زیادی می‌باشد. کنجاله روغن کنجد محصول جانبی حاصل از روغن‌کشی دانه کنجد بوده که به‌عنوان یکی از ضایعات کشت و صنعت قابل‌دسترس و فراوان و غنی از پروتئین باارزش تغذیه‌ای بالا و ارزان‌قیمت انتخاب‌شده‌است و می‌تواند به‌عنوان یک بستر ارزان‌قیمت جهت رشد میکروارگانیسم‌ها استفاده شود (Parfene, et al., 2013; El-Saidy, et al., 2009). هدف از این پژوهش رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر محیط کشت ارزان‌قیمت کنجاله کنجد می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه مواد

در این تحقیق کنجاله کنجد با پرس سرد از شرکت روغن آسانه تهران و باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* *Lactobacillus plantarum* (DSMZ 20174) از مجموعه میکروبی دانشکده کشاورزی تهران و محیط‌های کشت MRS از شرکت (Quelab) کانادا و محلول‌ها از نمایندگی شرکت مرک آلمان در ایران تهیه شد.

آماده‌سازی و فعال‌سازی باکتری

جهت تهیه پیش کشت, باکتری *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* در محیط کشت MRS با pH:4.8 -6.4 رشد داده شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور MEMMERT مدل D-91126 قرارگرفته شد. ابتدا زیر هود میکروبی از ویال محتوی میکروارگانیسم به محیط MRS broth استریل شده موجود در لوله‌آزمایش تلقیح شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. در مرحله بعد میکروارگانیسم‌ها از محیط مایع MRS broth به محیط جامد MRS Agar منتقل شد و کشت خطی داده شد اطراف پلیت پارافیلم کشیده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار داده شد و بعدازاین مدت

باکتری‌ها خامه‌ای رنگ رشد یافته بر محیط جامد، باکتری‌های فعال‌شده بودند که در مراحل بعدی پژوهش مورداستفاده قرارگرفته شدند (Cano-Medina, et al., 2000).

آماده‌سازی بستر محیط کشت کنجاله کنجد

جهت کشت باکتری بر محیط کشت ابتدا کنجاله کنجد را به مدت ۱۲ ساعت در آب خیسانده و سپس با مقداری آب مقطر مخلوط و همگن شد سپس ۱۰۰ گرم از خمیر تولیدی در ارلن ریخته شد و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد و تا دمای ۳۵ درجه سلسیوس خنک شد.

شمارش باکتری

جهت شمارش باکتری‌ها در نمونه از روش رقت‌سازی دهگانی و پورپلیت استفاده شد. ابتدا محلول سرم فیزیولوژی ۹/۰ درصد توسط کلرید سدیم خالص تهیه شد. سپس در لوله‌های آزمایش به میزان ۹ سی‌سی تقسیم و استریل شد. پس از استریل و خنک شدن لوله‌ها ۱ سی-سی از نمونه حاوی میکروارگانیسم محیط کشت اصلی به اولین لوله جهت دستیابی به رقت 10^{-1} اضافه شد این کار تا حاصل شدن رقت 10^{-8} تکرار گردید. سپس تحت شرایط استریل ۱۰۰۰ میکرولیتر از رقت موردنظر به داخل پلیت استریل منتقل شد و به میزان کافی محیط MRS جامد استریل به آن اضافه شد .پس از بسته شدن محیط کشت‌ها اطراف پلیت‌ها با پارافیلم پوشانده شد و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. تعداد کلنی‌های تشکیل‌شده در هر میلی‌لیتر نمونه توسط فرمول محاسبه شد.

تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر =تعدادکلنی×عکس فاکتور رقت

ازآنجایی‌که تعداد باکتری تلقیح‌شده یکی از مهم‌ترین متغیرهایی است که بر نتیجه این پژوهش اثر می‌گذارد تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد بدین منظور برای تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی مقداری از کشت جوان باکتری به لوله حاوی سرم فزیولوژی استریل منتقل شد و پس‌ازآن کدورت حاصله با کدورت استاندارد نیم مک فارلند مقایسه شد.

تلقیح باکتری به محیط کشت

برای تائید کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده مطابق با استاندارد نیم مک فارلند میزان 3×10^{-7} درصد تلقیح در پلیت‌های حاوی محیط کشت استریل کنجاله کنجد کشت داده شدند و سپس در انکوباتور ۳۰ و ۳۷ و ۴۴ به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند Harrigan and (Mccance, 1976).

منحنی رشد میکروبی طی تخمیر

به‌منظور رسم منحنی رشد میکروبی و بررسی تغییرات متغیرهای مورد بررسی نمونه‌برداری به مدت ۷۲ ساعت انجام گرفت.جهت رسم منحنی استاندارد رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از روش کدورت سنجی در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر استفاده شد. جهت رشد *لاکتو باسیلوس* ۵ سی‌سی از محیط کشت MRS مایع در لوله ریخته شد سپس از محیط کشت حاوی *لاکتوباسیلوس* با غلظت نیم مک فارلند به داخل لوله تلقیح کرده و کدورت به وجود آمده در ساعات صفر و ۲ و ۴ و ۶ و ۱۲و ۱۸و ۲۴ و ۳۰ و ۳۶ و ۴۸ و۶۰ و ۷۲ قرائت گردید (Jahandideh, 2012).

بررسی محیط کشت ازنظر میزان رشد قابل‌قبول وخصوصت مهارکنندگی (Performace Testing)

۱-آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity): سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰۰ در نرمال‌سالین یا آب‌مقطر استریل رقیق نموده و مقدار ۰/۰۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون رقیق‌شده به محیط کشت تلقیح شد. تعداد کلنی‌ها در هر پلیت (CFU/plate) 10^{3}-10^{4} بود (Rahmani, et al., 2019).

۲-آزمایش ظرفیت مهارکنندگی: سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰ در نرمال‌سالین یا آب‌مقطر استریل رقیق نموده و مقدار ۰/۰۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون رقیق‌شده به

محیط کشت تلقیح شد. تعداد کلنی‌ها در هر پلیت (CFU/plate) 10^4-10^5 بود (Rahmani, et al., 2019).

اندازه‌گیری pH

میزان تغییرات pH نمونه‌ها بعد از تلقیح در طول تخمیر کنجاله کنجد در زمان‌های صفر و ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از pH متر (Metrohm) مدل ۸۲۷ ساخت کشور سوئیس اندازه‌گیری شد.

استخراج چربی و صابونی‌کردن آن و جداسازی اسیدهای چرب به‌وسیله دستگاه HPLC

جهت استخراج و جداسازی روغن ابتدا ۵ گرم نمونه با ۱۰۰ میلی‌لیتر مخلوط کلروفرم-متانول به نسبت حجمی (۲:۱) با یکدیگر مخلوط شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. بعد از این مرحله محلول دو بار با کاغذ صافی صاف شد و سپس ۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر به آن اضافه و به‌شدت هم زده شد مجدداً به مدت ۵ دقیقه درون سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ rpm قرار داده شد پس‌ازاین مرحله دولایه تشکیل شد که لایه رویی حاوی آب و متانول و لایه زیرین حاوی کلروفرم و اسید چرب بود لایه رویی جدا و لایه زیرین توسط تبخیرکننده دورانی مدل IKA*RV10 تغلیظ شد برای آنالیز چربی استخراج‌شده با کروموتوگرافی گازی، ابتدا چربی استخراج‌شده متیله شد برای این کار ۰/۵ میلی‌لیتر سود متانوله ۱ نرمال به چربی استخراج‌شده اضافه و یک دقیقه ورتکس شد. سپس مخلوط ۱۵ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس‌ازآن یک میلی‌لیتر تری فلوراید بور حاوی ۱۴ درصد متانول افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به‌آرامی تکان داده شد. در ادامه ۲ سی‌سی هگزان افزوده شد و پس از یک دقیقه ورتکس کردن با سرعت ۱۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس فاز رویی برداشته شد و ۵ سی‌سی آب مقطر به آن اضافه شد و پس از ورتکس کردن با سرعت ۱۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. شستشو با آب یک‌بار دیگر تکرار شد سپس فاز آلی برداشته شد مقدار کمی سولفات سدیم بدون آب به آن افزوده و پس از هم زدن با کاغذ صافی صاف شد. دو تا چهار میکرولیتر از محلول متیل استر اسیدهای چرب به تزریق‌گاه کروموتوگرافی گاز مایع تزریق شد. نام ستون موئینه مورداستفاده Dikmacap-2330، طول ستون مورداستفاده ۶۰ متر و قطر داخلی ۲۵ میلی‌متر بود دمای محل تزریق و آشکارساز به روی ۲۵۰ و ۲۶۰ درجه سلسیوس تنظیم گردید گاز هیدروژن با خلوص ۹۹۹/۹۹ درصد و با جریان ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل استفاده شد دمای اولیه ۶۰ درجه سلسیوس تعیین شد و ۲ دقیقه در همان دما باقی ماند سپس با گرادیان ۱۰ درجه سلسیوس در دقیقه سپس با گرادیان ۵ درجه سلسیوس در دقیقه به دمای ۲۴۰ درجه سلسیوس رسیده و ۷دقیقه در همان دما باقی ماند تا زمان کافی برای خروج همه‌ی اسیدهای چرب از ستون وجود داشته باشد (Harrigan and McCance, 1976). شناسایی اسیدهای چرب با مقایسه زمان بازدارندگی استاندارد خالص اسیدهای چرب تعیین گردید و نتایج به‌صورت درصد اعلام شد.

تجزیه‌وتحلیل آمار

برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها حاصل از آزمون کیفی، نتایج با نرم‌افزار SPSS و بر اساس طرح کاملاً تصادفی بررسی شدند. از نرم‌افزار اکسل برای رسم نمودارها استفاده گردید. مقایسه میانگین با استفاده از روش حداقل تفاوت معنی‌دار صورت گرفت (تمامی نتایج با سه تکرار انجام شد).

نتایج

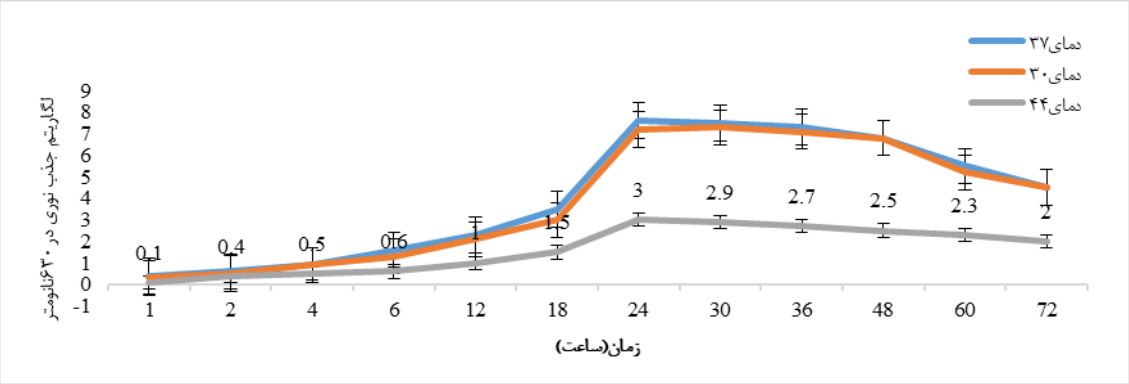
منحنی رشد میکروبی طی تخمیر

منحنی رشد باکتری پروبیوتیک تلقیح شده بر روی محیط کشت کنجاله کنجد طی ۷۲ ساعت تخمیر در دمای ۳۰ و ۳۷ و ۴۴ درجه سلسیوس، در شکل ۱ آمده است. همان‌طور که منحنی رشد نشان می‌دهد، در ابتدای فرایند تخمیر جمعیت باکتری‌ها افزایش چندانی نداشت، اما پس از گذشت چند ساعت از شروع تخمیر و تطابق‌پذیری میکروارگانیسم‌ها با محیط رشد جدید، جمعیت سلول‌ها

به‌صورت لگاریتمی افزایش یافت به‌طوری‌که، جمعیت باکتری‌ها در محدوده ۱۰ الی ۱۲ ساعت پس از شروع تخمیر وارد فاز لگاریتمی می‌شود و تعداد باکتری‌ها از ۴×۱۰^{۷} CFU/ml به ۳/۴ ×۱۰^{۸} CFU/ml در دمای ۳۰ و ۴ ×۱۰^{۷}CFU/ml به ۳/۹ ×۱۰^{۸} CFU/ml افزایش یافت و میزان جذب در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر و از ۰/۳ به ۷/۳ در دمای ۳۰ درجه سلسیوس وحدود ۰/۴ به حدود ۷/۵ در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رسید .این در حالی است که رشد در دمای ۴۴ درجه سلسیوس با سرعت کمتری افزایش یافت و از ۴ ×۱۰^{۷}CFU/ml به ۵/۴ ×۱۰^{۷}CFU/ml رسید و هم‌چنین میزان جذب در بالاترین میزان خود به ۳ رسید و اما بعدازاین بازه زمانی باکتری وارد فاز سکون شده و تعداد آن‌ها بعد از تقریباً ۴۸ ساعت تخمیر ثابت ماند.

تغییرات pH طی تخمیر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط کشت کنجاله کنجد

روند تغییرات pH محیط کشت توسط باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در جدول ۱ آمده است. در مورد تغییرات به وجود آمده در محیط کشت کنجاله کنجد همان‌طور که در جدول مشخص است pH محیط کشت در دمای ۳۰ و ۳۷ و ۴۴ درجه سلسیوس بعد از ۴۸ ساعت گذشتن از تخمیر از مقدار اولیه ۵/۸۵، ۶/۰۵ ، ۹۵/ ۵ به ترتیب به ۵ و ۴/۸۵ و ۵/۵ رسیدند. هم‌چنین pH ظرفیت مغذی بودن و مهارکنندگی به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) کاهش یافت و به ترتیب از ۵/۶۴ و ۵/۸۸ در ابتدا تخمیر به ۵/۴ و ۵/۵ در انتهای تخمیر رسیدند.



شکل۱- سینتیک رشد لاکتوباسیلوس در دمای ۳۰ و ۳۷ و ۴۴ درجه سلسیوس طی ۷۲ ساعت

جدول۱- بررسی pH قبل از تلقیح باکتری، بلافاصله بعد از تلقیح باکتری و۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بعد از رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم با شرایط متفاوت دمایی ۳۰، ۳۷ و ۴۴ درجه سلسیوس و شاهد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

دما	pH در لحظه صفر	pH بعد از ۲۴ ساعت	pH بعداز ۴۸ ساعت
شاهد	ns ۶/۰۵	nsع/۰۲	nsع/۰۲
۳۰	**۵/۹۵	**۵/۱	**۵
۳۷	ns ۶/۰۵	**۵	**۴/۸۵
۴۴	**۵/۹۰	**۵/۱	**۵/۲

ns نداشتن تفاوت معنی‌دار و** تفاوت معنی‌دار در هر ستون در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

بررسی تغییرات پروفایل اسیدهای چرب محیط کشت کنجاله بعد از رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

در جدول ۲ تغییرات اسیدهای چرب تولیدشده و مصرف‌شده نشان داده‌شده است. تغییرات مصرف و تولید اسیدهای چرب توسط دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد همان‌طور که مشاهده می‌شود ترکیب اسیدهای چرب براثر رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم دستخوش تغییرات شد. (C15: 0)، (C15: 1)، (C16: 0)، (C16: 1)، (C18:)

(1t)، (C18: 1c)، (C21: 0) و (C24: 1) به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش یافتند.
درحالی‌که اسیدهای چرب (C14:1)، (C17: 0)، (C18: 1c)، (C18: 2c)، (C20: 0)، (C18: 3n3)، (C20: 1)، (C22: 0) و (C24: 0) به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافتند. دراین‌بین تخمیر سبب تولید (C17:1) و (C22:1) شد و لینولئیک اسید مصرف شد.

جدول۲- ترکیب اسیدهای چرب کنجاله کنجد قبل و بعد رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

بعد ازفرایند رشد	قبل از فرایند رشد	اسید جرب	نام اسید چرب
1.546 ns	1.546	C12:0	لوریک اسید
1.560ns	1.560	C14:0	میرستیک اسید
0.130-**	0.470	C14:1	میریستولنیک اسید
0.995+**	0.262	C15:0	پنتادکانوئیک اسید
0.403+**	0.286	C15:1	-
20.557+**	18.567	C16:0	پالمیتیک اسید
0.356+**	0.211	C16:1	پالمیتولئیک اسید
0.125-**	0.220	C17:0	هپتادکانوئیک اسید
0.019+	ND	C17:1	هپتادسنوئیک اسید
10.813-**	13.352	C18:0	استئاریک اسید
0.678+**	0.344	C18:1t	الایدیک اسید
31.015+**	27.112	C18:1c	اولئیک اسید
0.126-**	0.229	C18:1c	-
0.366+**	0.099	C18:1c	-
0.164+ns	0.125	C18:2t	لینوالادیک اسید
ND-	0.165	C18:2t	-
29.709-**	30.412	C18:2c	لینولئیک اسید
0.370-**	0.681	C20:0	ایکوزانوئیک اسید
0.049-**	0.133	C20:1	ایکوزنوئیک اسید
0.270+**	0.126	C21:0	هنیکوسیلیک اسید
0.234-**	0.513	C22:0	بهنیک اسید
0.129-**	0.556	C24:0	لیگنوسریک اسید
0.168+**	0.068	C24:1	نرونیک اسید
0.166+**	ND	C22:1	اوریک اسید

ns نداشتن تفاوت معنی‌دار و** تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج حاصل نشان داد که بیشترین رشد، در زمان ۱۸ تا ۲۴ ساعت بود. همان‌طور که منحنی رشد نشان می‌دهد، در ابتدا فرایند تخمیر جمعیت باکتری‌ها افزایش چندانی نداشت. اما پس از گذشت ۶ تا ۸ ساعت از شروع تخمیر و تطابق‌پذیری میکروارگانیسم‌ها با محیط جدید، جمعیت میکروارگانیسم‌ها افزایش یافت. به‌طوری‌که با افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌ها بعد از بازه زمانی، باکتری در

محدوده ۱۸ تا ۲۴ ساعت پس از شروع تخمیر وارد فاز لگاریتمی شد. نتایج نشان داد این باکتری در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس در ۲۴ ساعت اولیه به‌خوبی رشد کردند و کدورت حاصل از رشد بعد از ۲۴ ساعت قابل‌رؤیت بود. علت رشد آهسته باکتری در ساعات اولیه می‌تواند به علت کمبود فعالیت پروتئولیتیکی آن‌ها باشد (Damin, et al., 2008) و پروتئین‌های کنجد در حین تخمیر می‌توانند به‌طور مؤثر هیدرولیز شده و به پلی پپتیدها و پپتون‌ها مانند نیتروژن محلول تبدیل شود (Park, et al., 2012) از بین رفتن قدرت زنده‌مانی باکتری، بعد از تخمیر را می‌توان به کاهش میزان مواد مغذی و کم شدن رطوبت بستر نسبت داد (Li, et al., 2018). پیزارو و همکاران در سال ۲۰۱۵ شروع و پایان تخمیر برای باکتری پروبیوتیکی را ۸-۴۸ ساعت بیان کردند که این مقایسه از نتیجه این تحقیق حمایت کرد. هم‌چنین می‌توان دلیل پایان تخمیر را طبق گزارش تجادرو و همکاران در سال ۲۰۱۴ ورود میکروارگانیسم‌ها به فاز مرگ در اثر تجمع مواد اسیدی و کاهش منابع ازت و کربن نسبت داد. به‌طورکلی، بعد از کشت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با افزایش زمان تخمیر، کاهش pH روی می‌دهد که خود می‌تواند عاملی در کاهش رشد باکتری نیز بوده و تقریباً به‌طور عمده بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت هیچ رشدی صورت نگرفته و حتی بعضی از باکتری ها از بین می‌روند. به‌عبارت‌دیگر می‌توان دلیل از بین رفتن قدرت زنده ماندن باکتری را به دلیل کاهش میزان مواد مغذی و هم‌چنین کم شدن رطوبت بستر بعد از کشت نسبت داد. زیرا عدم تأمین نیازهای غذایی شدید میکروارگانیسم‌ها و رطوبت کمتر می‌تواند مانع پیشرفت رشد باشد (Daniel et al., 2017).

در همه نمونه‌ها pH بعد از۲۴ ساعت و ۴۸ساعت از فرآیند کاهش یافت و در نمونه شاهد تغییری در pH مشاهده نشد. با توجه به فعالیت باکتری‌ها در طول فرایند کربوهیدرات‌ها مصرف‌شده و اسید تولید می‌شود که این مسئله منجر به کاهش pH می‌گردد. رشد باکتری به دلیل استفاده از قندهای احیاکننده محیط و تولید اسید می‌باشد که این مسئله می‌تواند باعث کاهش pH و باقی ماندن کمتر قندهای احیا شود. pH نمونه‌ها قبل از فرایند حدوداً ۶ بود که پس از ۲۴ ساعت توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تا نزدیک ۵ کاهش یافت و بعد از ۴۸ ساعت به زیر ۵ کاهش یافت این کاهش pH ناشی از تولید اسیدهای آلی در دوره رشد لگاریتمی (Doelle, 1982) است. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (هتروفرمنتاتیو اختیاری) سریع‌تر از گونه‌های اجباری سبب کاهش pH می‌گردد ولی بعد از۲۰ ساعت تخمیر میزان pH نهایی با نژاد هتروفرمانتاتیو اجباری بالاتر بود بنابراین خصوصیات اسیدی‌کردن طی فرآیند بسته به گونه و نژاد باکتری اسیدلاکتیکی دارد (Ronka, et al., 2003). تغییرات کاهشی pH در این تحقیق با مطالعات رودریگرز در سال ۲۰۱۷ و ماریو در سال ۲۰۱۸ در دانه سویا با استفاده از باکتری‌های لاکتیکی هم‌سو بود.

همان‌گونه که ذکر شد رشد *لاکتوباسیلوس* در محیط کشت کنجاله کنجد سبب تغییر در ترکیب اسید چرب شد، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نشان داد که توان بالقوه‌ای درافزایش معنی‌دار اسیدهای چرب غیراشباع کنجاله کنجد مانند اسیدهای اولئیک و لینولنیک را دارد، که اولئیک بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد. تولید و مصرف اسیدهای چرب را می‌توان به رشد و جمعیت میکروب *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نسبت داد و با اسیدیته بیشتر محیط کشت کنجاله کنجد بعد از تخمیر توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم مطابقت دارد. در پژوهشی توسط هاشمی و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی تخمیر لیموشیرین توسط باکتری‌های پروبیوتیک پرداختند و نتایج مشابهی به‌دست‌آمده است (Hashemi, et al., 2017).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش *لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم* توانایی رشد در محیط کشت کنجاله کنجد به‌عنوان بستر طبیعی و ارزان

و قابل‌دسترس را داشت. نتایج نشان داد که فرایند تخمیر و حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک است نقش مهمی در تغییرات پروفایل اسیدهای چرب کنجاله کنجد دارد و می‌توان آن را به‌عنوان یک محصول فراسودمند و سین‌بیوتیک در نظر گرفت درمجموع با در نظر گرفتن جنبه‌های سلامتی بخش، پروبیوتیکی سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و با تجزیه، تحلیل تمام نتایج کنجاله کنجد به‌عنوان حامل مواد غذایی گیاهی برای کشت، به‌عنوان بستری طبیعی، ارزان و قابل‌دسترس برای تولید این ماده فراسودمند معرفی شد.

منابع

1. Cano-Medina A., Jiménez-Islas H., Dendooven L., Patiño Herrera R., González-Alatorre G. and Escamilla-Silva E.M. 2000. Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. Int. Food Res. J. 446684-605.
2. Damin M.R., Minowa E., Alcantara M.R. and Oliveira M.N. 2008. Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. J. Texture Stud. 39:40–55.
3. Daniel M.L., Gómez C., Renes E., Fresno J.M., Tornadijo M.E., Ross R.P., Catherine S. May 2017. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods.
4. De Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezema M. and De Vosa W.M. 2006. *Lactobacillus plantarum* survival، functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. Int. Dairy J. 16(9):1018-1028.
5. Doelle H.W. 1982. The existence of two separate constitutive enzymes for glucose and fructose in Zymomonas mobilis. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15:20–24.
6. El-Adawy T.A. 1997. Effect of sesame seed protein supplementation on the nutritional, physical, chemical and sensory properties of wheat flour bread. Food Chem. 20:5.
7. El-Saidy D., Mahmoud S.H., Garhy M. and Tonsy H. 2009. Nutrition evaluation of sesame seed meal, Sesamum indicum (L.) as alternative protein source in diets of juvenile mono-sex Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Egypt. J. Aquat. Biol. Fish. 13:93-106.
8. Rahmani F., Rezaeian-Doloei R. and Alimoradi, L. 2019. Evaluation of Phytochemical Composition of Mentha pulegium L. Essential Oil and Its Antibacterial Activity against Several Pathogenic Bacteria. 8162-8163.
9. Granato D., Branco G.F., Nazzaro F., Cruz A.G. and Faria J.A.F. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food: Development trends، concepts and products. Institute of FoodTechnologists. Compr. Rev. Food Sci. F. 9:292-302.
10. Harrigan W.F. and Mccance M.E. 1976. *Laboratory Method in food and dairy microbiology*. London Academic Press Inc.
11. Harrigan W.F. and McCance M.F. 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology* (Revised Edition). Abb. London-New York-San Francisco Academic Press.
12. Hashemi S.M.B., et al., 2017. Fermentation of sarshir (kaymak) by lactiacid bacteria: antibacterial activity, antioxidant properties, lipid and protein oxidation and fatty acid profile. 97(13):4595 -4603.
13. Jahandideh F. 2012. The investigation of production of a functional beverage based on Echium amoenum Extract by selected lactic acid bacteria, in Food Science and Engineering. Karaj: University of Tehran.
14. Khalid E.K., Babiker E.E. and Tinay A.H. 2003. Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. Food Chem.85:36.

15. Li W.S., Yeong H.C., Felix S.H., Jin-Cheng H. and Yu-Hiang Y. 2018. Optimization of Mixed Solid- state Fermentation of Soybean Meal by *La; ctobacillus* Species and *Clostridium butyricum*. Pol. J. Microbiol. 67(3):297.
16. Mortazavian, A.M. and Sohrab Vandi S. 2015. A review of probiotics and probiotic food products, Tehran, Eta Publications.
17. Ory I., Romero L.E. and Cantero D. 2004. Operation in continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production Journal of Food Engineering. Journal of Food Engineering. 39:4.
18. Parfene G., Horincar V., Tyagi A.K., Malik A. and Bahrim G. 2013. Production of medium chain satturated fatty acids with enhanced antimicrobial activity from crude coconutfat by solid state cultivation of Yarrowia lipolytica. Food Chem. 136:1345–1349.
19. Park M.J., General T. and Lee S.P. 2012. Physicochemical properties of roasted soybean flour bioconverted by solid-state fermentation using Bacillus *Lactobacillus plantarum*. Prev Nutr Food Sci. 17(1):36.
20. Raimondi S., Amaretti A., Leonardi A., Quartieri A., Gozzoli C. and Rossi M. 2016 .Conjugated Linoleic Acid Production by Bifidobacteria: Screening, Kinetic, and Composition. *BioMed Research International*. 8654317.
21. Ronka E., Malinen E., Saarela M., Koski M. R., Aarnikunnas J. and Palva A. 2003. Probiotic and milk technological properties of Lactobacillus brevis. Int. J. Food Microbiol. 83:63– 74.
22. Terána V., LunaPizarrob P., Zacaríasc M.F., Vinderolac G., Medinaad R. and Van Nieuwenhovea. 2015 Production of conjugated dienoic Yarrowia lipolytica. Food Chemistry and trienoic fatty acids by lactic acid bacteria and bifidobacterial, 136, 1345–1349.

Investigating the growth ability of *Lactobacillus plantarum* on sesame meal multure medium

Al-Sadat Mousavi M[1], Hojjatoleslamy M [1,2], Ebrahimzadeh Mousavi Z[3*], Kiani H[3], Jalali S.M.A[4,]

1.Department of Food Science and Technology, Faculty of agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2.Medicinal, spicy and aromatic plants research center, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3.Bioprocess and Biodetection Laboratory, Department of Food science and Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

4.Department of animal sciences, Faculty of Agriculture and Veterinary medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

[*]**Corresponding author:** *zinab.mosavi@ut.ac.ir*

Received: 18 June 2022 Accepted: 26 September 2023

Abstract

Sesame oil meal is a protein-rich by-product obtained from sesame seed oil extraction, which is seen as one of the cultivation wastes with high nutritional value and cheap price and is abundantly accessible in the agriculture industry. This product can also be used as a cheap substrate for the growth of Beneficial microorganisms including probiotics. This research examines the growth of *Lactobacillus Plantarum* As a probiotic in the sesame meal culture media under different incubation conditions to achieve the best microbial count of probiotic bacterium of *Lactobacillus Plantarum*. Sesame meal paste with an initial pH of 6.5 was used as the culture medium, with incubation conditions including aerobic conditions under three temperature rates of 30, 37 and 44°C for 48 hours. The findings revealed that the bacterium could grow in the sesame meal medium, increasing the microbial population to 10^8cfu/g at the end of fermentation under 30 and 37°C. Also, *Lactobacillus Plantarum* significantly reduced the pH of all fermented samples under all temperatures (p<0/05), with the pH decreasing by most around 4.85 at 37°C. The findings also suggested that the combination of fatty acids of the sesame meal culture medium changed due to *Lactobacillus Plantarum* growth. Fatty acids (C15:0), (C15:1), (C16:0), (C16:1), (C18:1t), (C18:1c), (C21:0) and (C24:1) increased significantly (p<0.05), whereas fatty acids (C14:1), (C17:0), (C18:1c), (C18:2c), (C20:0), (C18:3n3), (C20:1), (C22: 0) and (C24: 0) decreased significantly (p<0/05). In the meantime, fermentation helped produce (C17:1) and (C22:1) and consume linoleic acid. In sum, sesame meal can serve as a nutrient and cost-saving medium to grow *Lactobacillus Plantarum*.

Keywords: Probiotic, *Lactobacillus Plantarum*, Sesame Meal, Fatty Acid.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2023 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.