

بررسی زنده ماندن میکروب های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و شمارش آن ها در شیر و ماست پروبیوتیکی

محمد حسین مرحمتی زاده^{۱*}، سارا رضازاده^۲، نجمه نجف زاده^۳، آیداشهبازی^۳

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کارون- ایران.
۲- دانش آموز مهندسی صنایع غذایی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون- ایران.
۳- دانشجوی رست شناسی سلولی مولکولی گرایش میکرو بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون- ایران.
* نویسنده مسئول: Dr_mhmz@yahoo.com

Studying on survival Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum microbes and count them in probiotical milk and yoghurt
Marhamatizadeh, M.H.¹, Rezazadeh, S.², Najafzadeh, N.³, Shahbazi, A.³
¹ Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon- Iran.
² Graduated of Food Sciences, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon- Iran.
³ Graduated of biology Division of microbiology, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon- Iran.

Abstract
In this study in addition to produce probiotic products of milk and yogurt containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in combination and separately, we comtared them together. To the first sample Lactobacillus acidophilus had injected to the milk and to the second sample Bifidobacterium bifidum and tired one Lactobacillus acidophilus - Bifidobacterium bifidum added jointly as a starter and then they put in to the 38 degree incubation. When the pH idioss reached to 4.2 degree of Dourmic, the product put in to the refrigerator. In the second stage from the produced milk in the first stage the probiotic yogurt was made. And during the incubation and the being in the refrigerator, microbial activation was studied and counted directly. The results was that the microbes are alive after keeping them for 20 days, and the acion and movement of bacteria's showed that they are still alive and the amount of them in each gram unit was 1010 microbe, that was 3 log more then the minimum amount whited needed. *et. J. of Islamic. Azad. Univ., Garmsar Branch. 5, 1:47-51, 2009.*

Keywords: Probiotic, Lactobacillus acidophilus, Biphidobacterium biphidum.

چکیده

در این پژوهش ضمن تولید فرآورده های حاوی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به شکل جداگانه و مخلوط در شیر و ماست به بررسی و مقایسه آن ها با یکدیگر پرداختیم. به نمونه اول شیر، باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تلقیح شد، نمونه دوم باکتری بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و به نمونه سوم باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم به صورت مشترک به عنوان استارتر افزوده گردید و سپس به گرمخانه انتقال داده شد. پس از اینکه اسیدیته نمونه ها به ۴.۲ درجه دورنیک رسید، محصولات به یخچال انتقال داده شدند. در پاساژ دوم از شیر پروبیوتیکی تولید شده در مرحله اول ماست پروبیوتیکی تولید شد و در طی گرمخانه گذاری و طی نگهداری در یخچال زنده بودن باکتری ها در فرآورده مورد بررسی قرار گرفت و به صورت مستقیم شمارش گردید. نتیجه این تحقیق به این صورت بود که طی ۲۰ روز نگهداری فرآورده های پروبیوتیکی میکروب ها به صورت زنده باقی می ماند و حرکت باکتری ها در زیر میکروسکوپ نشان دهنده زنده بودن میکروب ها است و میزان آن ها در واحد گرم ۱۰ میکروب بود که از حداقل مورد نظر ۳ بلوگ بالاتر بود. سرعت رشد و میزان ماندگاری باکتری ها در نمونه های حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشتر از نمونه های حاوی باکتری بیفیدو باکتریوم بیفیدوم بود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ۱۳۸۸، دوره ۵، شماره ۱، ۵۱-۴۷.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، شمارش میکروبی.

مقدمه

پروبیوتیک ها که معنای «به خاطر زندگی» را دارند، قرن هاست که به عنوان اجزای طبیعی برای غذاهای بهبود دهنده سلامت مورد مصرف می باشند. نقش مثبت عدیده ای از باکتری ها در مبحث سلامت برای اولین بار توسط یک دانشمند روسی معروف به پدر ایمن شناسی نوین و برنده جایزه نوبل، به نام مچنیکوف، در اوایل قرن بیستم مطرح گردیده است او معتقد بود که:

" این امکان وجود دارد که فلور میکروبی روده را با تجویز



میکروب های شناخته شده مفید، در مقابل میکروب های مضر، تقویت و مورد حمایت قرار دهد" (۲).

پروبیوتیک ها، نوعی مکمل غذایی هستند که از باکتری ها و قارچ های بالقوه مفید تشکیل شده اند. تفاوت پروبیوتیک با سایر ریززنده ها که ممکن است دارای خواص سلامت بخش برای میزبان باشند در این خاصیت نهفته است که اثرات سلامت بخش پروبیوتیک ها از طریق فعالیت زیستی آن ها در داخل بدن، پس از استقرار در بخش های مختلف ایجاد می شود (۲).

۳- مایه ماست موجود در بازار

پاساژ اول: کشت میکروب های پروبیوتیک در شیر

ابتدا ۴ ظرف یک لیتری تهیه شد و به هر ظرف مقدار یک لیتر شیر استریلیزه ۱/۵ درصد چربی افزوده شد. ظرف اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (فاقد باکتری پروبیوتیکی)، به ظرف دوم ۰/۶۶ گرم در لیتر طبق توصیه شرکت تولید کننده برای بدست آوردن ماده غذایی پروبیوتیکی حاوی بیش از ۱۰^۷ عدد میکروب لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گرم، به ظرف سوم ۰/۶۶ گرم در لیتر بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و به ظرف چهارم مخلوطی از هر دو باکتری فوق به نسبت های مساوی (هر کدام ۰/۳۳ گرم در لیتر) به عنوان استارتر به طور مستقیم به شیر افزوده و به هم زده شد و سپس در گرمخانه ۳۸ درجه سانتیگراد قرار داده و طی ساعات مختلف شمارش میکروبی انجام گرفته شد تا رسیدن به اسیدیتته ۴۲ درجه دورنیک (۵).

پاساژ دوم: تهیه ماست پروبیوتیک

به منظور تولید ماست حاوی پروبیوتیکی در این مرحله پس از تهیه ۴ ظرف مقدار یک لیتر شیر استریلیزه ۱/۵ درصد چربی و ۱۰ گرم مایه ماست افزوده گردید، ظرف اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (فاقد باکتری پروبیوتیک)، به ظرف دوم میزان ۱۰ گرم از نمونه ی شیر حاوی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، به ظرف سوم میزان ۱۰ گرم از نمونه ی شیر حاوی باکتری بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و به ظرف چهارم میزان ۱۰ گرم از مخلوط دو باکتری فوق افزوده شد.

سپس نمونه ها به گرمخانه ۳۸ درجه سانتیگراد انتقال داده شد و اسیدیتته طی ساعات متوالی اندازه گیری شد. زمانی که اسیدیتته ۹۰ درجه دورنیک رسید، ماست های تولید شده از گرمخانه خارج و به یخچال انتقال داده شد. پس از آن شمارش میکروبی طی ساعات مختلف صورت گرفت. شمارش میکروبی در طول گرمخانه گذاری به منظور تشخیص سرعت رشد باکتری ها انجام گرفت شمارش میکروبی در هر مرحله با استفاده از روش شمارش مستقیم انجام شد (۳).

در مرحله بعد به منظور شمارش میکروبی در محصول با دوز پایین تر میکروب، ۰/۳۳ گرم باکتری لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم به صورت مجزا استفاده شد. در نمونه مشترک از هر میکروب به میزان ۰/۱۶۵ گرم کشت داده شد.

لذا این فرآورده غذایی جزء غذاهای فرا ویژه یا هدفمند طبقه بندی می شوند. زیرا علاوه بر ارزش تغذیه ای، اثرات درمانی و سلامت بخشی چون مهار عفونت های دستگاه گوارش، کاهش سطح کلسترول خون، تقویت سیستم ایمنی، افزایش سطح تحمل لاکتوز و فعالیت ضد سرطانی بر خوردار می باشد (۷).

مصرف فرآورده های پروبیوتیک در مقایسه با سایر شیوه های دریافت پروبیوتیک ها هم چون کار گذاری موضعی یا مصرف خوراکی از طریق مکمل - خواری (مانند داروها) دست کم به سه دلیل از مقبولیت بیشتر نزد عموم برخوردار است؛ نخست آن که مردم کمتر به مصرف مواد دارویی تمایل نشان می دهند، دوم آن که جنبه حسی مصرف فرآورده های غذایی اثر حمایت کننده بر پروبیوتیک ها دارند. از این رو فن آوری تولید فرآورده های پروبیوتیک اهمیت بنیادین دارد (۴).

قابلیت زیستی پروبیوتیک ها در فرآورده های غذایی در درجه اول اهمیت قرار دارد و ارزش اساسی آن ها محسوب می شود، زیرا خواص سلامت بخش فرآورده به تعداد سلول های زنده در g یا ml فرآورده در هنگام مصرف و البته میزان مصرف در روز یا هفته وابسته است. در تمامی فرآورده های پروبیوتیک، شاخص BV یا ارزش زیستی به مفهوم تعداد سلول های زنده و فعال پروبیوتیک در گرم یا میلی لیتر فرآورده، ارزش اساسی آن ها را شامل می شود. شاخص BV باید به اندازه کافی بالا باشد تا پس از مصرف، با توجه به نوع فرآورده، تعداد کافی سلول های زنده پروبیوتیک به محیط روده راه یابند (۱، ۴).

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم باید زیست پذیری خود را در غذای حامل حفظ کنند تا به میزان "حداقل" در حین مصرف برسند. این ملاک بسیار اساسی و مهم برای تمام فرآورده هایی است که با ادعای سودمندی برای سلامتی فروخته می شوند. زیست پذیری باکتری های پروبیوتیک در طی زمان نگهداری طولانی در دمای یخچال راضی کننده نمی باشد (۱).

مواد و روش کار

۱- مایه لاکتیک حاوی باکتری لیوفیلیزه لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactibacillus acidophilus*) و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم (*Bifidobacterium bifidum*) به صورت کشت آغاز گر تک سویه تجاری از شرکت CHR Hansen

۲- شیر استریلیزه ۱/۵ درصد چربی



نتایج

جدول ۱ شمارش میکروبی پاساژ اول با دوز پایین را نشان می دهد.

اسیدیته شیر حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس ۵۲ درجه دورنیک و شیر حاوی بیفیدو باکتریوم بیفیدوم ۵۰ درجه دورنیک و شیر حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم ۵۰ درجه دورنیک بود.

شمارش میکروبی در زمان یخچال گذاری در جدول ۲ نشان داده شده است. جدول ۳ شمارش میکروبی پاساژ دوم با دوز ۰/۳۳ گرم در لیتر نشان می دهد.

جدول ۱ - شمارش میکروبی پاساژ اول با دوز ۰/۳۳ گرم در لیتر

زمان شمارش میکروب	۲ ساعت پس از افزودن استارتر	۵ ساعت پس از افزودن استارتر
L.a	7×10^6	11×10^6
B.b	5×10^6	5×10^6
L.a & B.b	7×10^6	4×10^6

اسیدیته لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس ۵۲ درجه دورنیک، بیفیدو باکتریوم بیفیدو ۵۰ درجه دورنیک و لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم ۵۰ درجه دورنیک بود.

در زمان یخچال گذاری شمارش میکروبی باز هم انجام گرفت و نتیجه آن:

جدول ۲ - شمارش میکروبی نمونه های پاساژ اول در یخچال

زمان شمارش میکروب	L.a	B.b	L.a & B.b
۱۸ ساعت پس از افزودن استارتر	9×10^6	7×10^6	7×10^6

جدول ۳ - شمارش میکروبی پاساژ دوم با دوز ۰/۳۳ گرم

میکروب در لیتر طی ۱۰ روز نگهداری

زمان (روز) میکروب	شاهد	L.a	B.b	L.a & B.b
۱	1×10^{11}	1×10^{11}	5×10^6	7×10^6
۳	1×10^{11}	2×10^{11}	4×10^6	5×10^6
۴	1×10^{11}	1×10^{11}	7×10^6	1×10^{11}
۷	1×10^{11}	2×10^{11}	1×10^{11}	1×10^{11}
۱۰	1×10^{11}	1×10^{11}	9×10^6	9×10^6

بحث و نتیجه گیری

در حال حاضر، ماست مقبول ترین و پر مصرف ترین فرآورده پروبیوتیک در جهان است. علت آن خواص حسی منحصر به فرد این فرآورده از یک سو و ارزش سلامت بخش آن از سوی دیگر است. به طور کلی، ماست به دلیل اسیدیته بالا و pH پایین، محیط مناسبی برای حفظ و انتقال پروبیوتیک ها به بدن نیست و در مقابل پنیر و سایر فرآورده های لبنی با pH بالاتر می توانند از نقطه نظر یاد شده موثر باشند. این موضوع به ویژه در مورد بیفیدو باکتریوم ها از اهمیت نخست بر خوردار است. با این وجود، مصرف زیاد ماست، این فرآورده را به مهم ترین و مرسوم ترین فرآورده لبنی مبدل ساخته است. از این رو تولید ماست پروبیوتیک با خواص کیفی بهینه از دیدگاه قابلیت زیستی، مدت زمان تخمیر (مدت زمان گرمخانه گذاری) خواص حسی و ارزش اقتصادی اهمیت فراوان دارد (۴،۶).

ماست پروبیوتیک به لحاظ ظاهری شبیه به ماست معمولی است اما هر گرم از آن حداقل دارای ۱۰ باکتری پروبیوتیک زنده غیر از باکتری های بولگاریس و ترموفیلوس موجود در ماست معمولی است. از نظر تغذیه ای مصرف آن سبب پاسخگوئی به نیازهای مربوط به اسید آمینه و اسیدهای چرب اساسی مورد نیاز بدن می شود. ضمناً فعالیت باکتری های پروبیوتیک سبب افزایش دسترسی بیولوژیک بدن به یون ها شده که از این طریق کلسیم، آهن، منیزیم، مس، سدیم و... بهتر جذب می شوند. ماست پروبیوتیک از نظر انواع ویتامین ها مثل ویتامین C، A، ریوفلاوین، تیامین، بیوتین، اسید فولیک، توکوفرول و... بسیار غنی تر از شیر و ماست معمولی است (۲).

تغییرات حاصله در شیر و ماست، حاوی باکتری های لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم از نظر شاخص های اسیدیته، و قابلیت زیستی باکتری های پروبیوتیکی برای رسیدن به اسیدیته ۴۲ درجه دورنیک (شیر) و ۹۰ درجه دورنیک (ماست) در گرمخانه ۳۸ درجه سانتیگراد در زمان تولید و طی مدت زمان ماندگاری در یخچال ثبت گردید. اعداد اسیدیته بر حسب درجه دورنیک در ساعات اولیه تقریباً ثابت بودند که به علت شروع نشدن فعالیت پروبیوتیک ها ارزیابی گردید.

در طی تولید شیر پروبیوتیکی با دوز پایین باکتری های لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و مخلوط لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم به شیر ۱/۵ درصد چربی، رشد باکتری های لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس با



تخمیر (بالا بودن زمان گرمخانه گذاری) نسبت به ماست معمولی و رضایت بخش نبودن خواص حسی فرآورده نهایی در مقایسه با ماست معمولی (۱).

حداقل میزان باکتری در فرآورده های پروبیوتیک ^{۱۰} است در حالی که در این مطالعه میزان باکتری ^{۱۰} میکروب بود و در نمونه حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ^{۱۰} رسید، بنابراین خواص مورد نظر میکروب های پروبیوتیکی را در مصرف کننده به وجود می آورند.

به طور کلی رشد بیفیدو باکتر به عنوان گونه منفرد در محیط شیر به دلیل نقصان پروتئوکافتی بسیار کند است (۱).

مدینا و همکاران در ۱۹۹۵ گزارش کرده اند که میزان افت بیفیدو باکتریوم ها در کشت های مخلوط پروبیوتیک بیشتر از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس است (۹).

اصطلاح (پروبیوتیک ها) زمانی که آن ها را به عنوان فاکتورهای پیش برنده رشد شناختند، برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ توسط Lilly و Stillwell به کار برده شد. برخلاف آنتی بیوتیک ها، پروبیوتیک ها به عنوان فاکتورهای مشتق شده ی میکروبی، باعث تحریک رشد سایر میکروارگانیسم ها می شوند (۲).

کایلاساپاتی (Kailasapathy) و ریبا (Rybka) در سال ۱۹۹۷ پیشنهاد نمودند که پروبیوتیک باید قبل و یا همزمان با مایه به ترکیب غذایی افزوده گردد. اگر پروبیوتیک بعد از تخمیر اضافه گردد هیچ گونه رشدی مشاهده نمی گردد. این موضوع نیز تا حدودی اهمیت سرعت بالای رشد پروبیوتیک در مرحله ابتدایی گرمخانه گذاری را نشان می دهد؛ زیرا مایه ماست دارای سرعت رشد بالایی است و به سرعت بر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس غلبه می نماید، مگر اینکه در طول پاساژ مرحله اول، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به محیط عادت کرده و رشد و فعالیت مناسب خود را پیدا نموده باشد و توانایی رقابت یا همزیستی با مایه ماست را پیدا کرده باشد (۸).

منابع

- ۱- خسروی دارانی، ک. کوشکی، م (۱۳۸۷) پروبیوتیک هادر شیرو فرآورده های آن، انتشارات مرز دانش، چاپ اول، صفحه ۱۲-۱۳.
- ۲- شاکری، م. (۱۳۸۲) استفاده از پساب کره شیرین در تولید ماست پروبیوتیک، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.

توجه به تعداد میکروب های شمارش شده بالاتر از بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و مخلوط حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم بود.

آمار نشان می دهند که به طور کلی میزان افت بیفیدو باکتریوم ها در مقایسه با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و سایر پروبیوتیک های اسید لاکتیک بیشتر و میزان رشد و تکثیر آن در فرآورده کمتر است. این موضوع را می توان به حساسیت بیشتر این جنس نسبت به اکسیژن، اسیدیته بالا و PH پایین، نیاز به مکمل های رشد یعنی ازت آلی کوچک مولکول و ویتامین ها و نیاز به پتانسیل احیای پایین نسبت داد (۴).

از شیر های حاوی باکتری های پروبیوتیک نگهداری شده در یخچال ماست درست شد. پس از آن شمارش میکروبی طی ساعات مختلف صورت گرفت. شمارش میکروبی در طول گرمخانه گذاری به منظور تشخیص سرعت رشد باکتری ها انجام گرفت که در این میان لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشترین میزان میکروب و پس از آن مخلوط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم و سپس بیفیدو باکتریوم بیفیدوم بیشترین میزان میکروب ها را در چند روز متوالی دارا بودند. حرکت باکتری ها در زیر میکروسکوپ نشان دهنده زنده بودن میکروب ها حتی بعد از ۲۰ روز ماندگاری در محصول بود که در نمونه حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشترین فعالیت را دارا بود.

به رغم پیشرفت های چشمگیر در زمینه پروبیوتیک ها و تولید فرآورده های پروبیوتیک، هنوز خط - معیاری واحد و جهانی در مورد این فرآورده ها وجود ندارد. با این وجود برخی از کشورها نظیر ژاپن دارای خط - معیاری مشخص و جدی در این ارتباط هستند (۱۰). تعداد سلول های زنده پروبیوتیک در هر گرم یا میلی لیتر از فرآورده در لحظه مصرف، ارزش اساسی فرآورده های پروبیوتیک را شامل می شود؛ از این رو که تعیین کننده کارایی این محصولات است. شاخص یاد شده ارزش زیستی (BV^۴) فرآورده و کمینه آن بر خورداری فرآورده از اثرات دارویی ادعا شده کمینه ارزش زیستی (MBV^۵) نامیده می شود. مهمترین پیشنهاد و خط - معیار در ارتباط با شاخص MBV فرآورده های پروبیوتیک توسط IDF^۷، ^{۱۰} است.

مشکلات تولید ماست پروبیوتیک را می توان در سه دسته تقسیم بندی کرد؛ از دست رفتن قابلیت زیستی یا بقا پروبیوتیک ها در مرحله تولید و نگهداری، پایین بودن سرعت



- ۳- فرخنده، ع. (۱۳۷۷) روش های آزمایش شیرو فرآورده های آن، چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۲۶۶-۲۷۰.
- ۴- مرتضویان، ا.م. سهراب وندی، س. (۱۳۸۵) پروبیوتیک و فرآورده های غذایی پروبیوتیک، انتشارات انا، چاپ اول، صفحه ۲۰۲-۱۵۲.
- ۵- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸۵) شیرو فرآورده های آن. تعیین اسیدیته و pH- روش آزمون، استاندارد ملی شماره ۹۹۸۵.

6. Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, R. P. (1999) Yogurt as probiotic carrier food. *Journal of Dairy Science*, **82**: 1379.
7. Gomes, A. M. P., Malkata, F.X. (1999) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 10-139.
8. Kailasapathy, K. Rybka, S. (1997) L.acidophilus and Bifidobacterium ssp-their therapeutic potential and survival yoghurt. *Aust.J. Dairy Technol*, **52**: 28-35.
9. Medina, L. M., Jordano, R. (1995) Growth and metabolism of selected strains of probiotics bacteria in milk. *Journal of Food protection*, 58-70.
10. Modler, H. W., McKeller, R. C., Yaguchi, M. (1990) Role of microorganisms in food production and preservation, Candidan Institute of Food Science and Technology, 23-29.

