بررسی تاثیر استرس زیره سیاه، املاح صفراوی و نمک بر بقا و پایداری باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ATCC4356)

پروا محمودی[1] ،ژاله خوشخو[1]*، افشین آخوند زاده [2]، پیمان مهستی شتربانی [3]، علی خنجری[2]

۱.گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی ، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲.گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳.گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
***نویسنده مسئول:** *Zh_khoshkhoo@iau-tnb.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۷

چکیده

زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در فرآیند تهیه تجاری و به‌کارگیری آن به‌عنوان باکتری پروبیوتیک مفید می‌باشد و هدف از این تحقیق بررسی اثر تنش‌های اسانس، نمک‌های معمولی و صفراوی روی زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس است. در ادامه اثر تنش‌های اسانس زیره سیاه (۰/۵ درصد)، نمک معمولی (۲ درصد) نمک صفراوی (۰/۱۵ درصد) در مقایسه با تیمار شاهد، روی جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس دوطرفه و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSD در نرم‌افزار SAS نسخه ۹ انجام گرفت. بعد از ۴ هفته در دمای ۴ درجه سلسیوس زنده‌مانی باکتری‌ها و pH در تمامی تیمارها به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود اما شدت کاهش در تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای تحت تنش کمتر بود ($p<۰/۰۵$). میزان اسیدیته نیز در تمامی تیمارها به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود و شدت افزایش در تیمارهای تحت تنش بیشتر از تیمار شاهد بود ($p<۰/۰۵$). استفاده از اسانس زیره سیاه به همراه نمک‌های معمولی و صفراوی در غلظت‌های کمتر از حداقل غلظت بازدارندگی، می‌تواند سبب زنده‌مانی باکتری‌ها تا پایان روز ۱۴ نگهداری به میزان توصیه شده در محصول گردد.

کلید واژه ها: استرس، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، زیره سیاه.

مقدمه

لاکتوباسیلوس‌ها اولین بار در سال ۱۹۰۰ شناسایی شدند و دارای ویژگی های بی هوازی اختیاری و میله ای شکل اند، گرم مثبت اند، غیر اسپورزا، کاتالاز منفی، اکسیداز منفی و بدون فلاژل هستند، از محصولات مختلف لبنی قابل استخراج هستند، سیتوزین و گوانین (G + C) معمولا ۵۱-۳۲ درصد از DNA این باکتری ها را شامل می‌شود. تا حدی نیازمند اکسیژن هستند. در حالت هموفرمانتیو، گلوکز را به اسیدلاکتیک تبدیل می‌کند، و در حالت هتروفرمانتیو، گلوکز را به اسید لاکتیک، CO_2، اتانول و یا اسید استیک تبدیل می کند. مقاوم به شرایط اسیدی هستند، بهینه pH رشد آن ها ۶-۵/۵ می‌باشد. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با یا بدون حضور اکسیژن و همچنین در محیط اسیدی با pH برابر ۴-۵ قادر به رشد می‌باشد. لاکتوباسیلوس‌ها جزء دسته‌ای از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک سودمند زنده اطلاق می‌شود که در صورت مصرف به میزان کافی، باعث افزایش سطح سلامت مصرف‌کننده می‌شوند. از مهم‌ترین اثرات مواد غذایی پروبیوتیک می‌توان به بهبود عملکرد سیستم گوارش و حفظ تعادل سیستم‌های متابولیک بدن اشاره نمود. خواص مفید ذکر شده در صورتی بروز می‌کند که حداقل ۱۰۵-۱۰۶ باکتری پروبیوتیک در یک گرم یا یک میلی‌متر ماده غذایی وارد روده شود (Tharmaraj et

all.,2004). عوامل زیادی از قبیل نوع باکتری، pH، اسیدیته محصول، فرایندهای وابسته به گرما (گرمخانه‌گذاری و دمای نگهداری) و محرک‌های رشد روی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک تأثیر می‌گذارند. جدا از این مورد، قابلیت بقای پروبیوتیک‌ها در فرآورده‌های تخمیری به‌دلیل پایین بودن pH و بالا بودن اسیدیته نیز بسیار اندک است (Varname et all.,1955: Kitazawa et all., 2001). در واقع یکی از مهم‌ترین عوامل در اثربخشی پروبیوتیک‌ها، تعداد سلول زنده در فراورده نهایی و همچنین دستگاه گوارش مصرف‌کننده است اما در طی فرایند تولید و نگهداری مواد غذایی، همچنین در حین فرایند گوارش به دلیل اعمال تنش‌هایی مانند گرما، سرما، فشار اسمزی، pH اسیدی معده و نمک‌های صفروای در روده کوچک تعداد سلول‌های زنده کاهش می‌یابد (Sahadeva et all., 2011). از این رو پژوهش‌های زیادی در رابطه با تأثیر تنش‌های مذکور روی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک (Yazid et all.,1999: Liong et al., 2005) و همچنین استراتژی‌های افزایش زنده‌مانی آن‌ها در برابر تنش‌های مذکور با استفاده از تکنیک‌هایی از قبیل استفاده از سویه‌های دارای ژنوم قوی‌تر، اعمال تنش‌های کمتر از حد کشندگی، فعال‌سازی ژن‌های ایجاد مقاومت در برابر تنش انجام شده است (Maragkoudakis et all., 2006). همچنین در همین رابطه جدیداً از اسانس‌های گیاهی به‌عنوان یک استراتژی جدید برای افزایش نرخ زنده‌مانی سویه‌های پروبیوتیکی در فرآورده‌های پروبیوتیک تخمیری از قبیبل ماست در کنار برآورده کردن انتظارات مصرف‌کننده در رابطه با خواص حسی محصول استفاده می‌شود (Shahdadi et all., 2015) به‌طوری که در سال‌های اخیر ترکیبات بسیاری از جمله اسانس پامچال (LEE et all.,2007)، چای سبز و سیاه (Jaziri et all.,2009) و نعناع فلفلی (Sarabi-Jamabet a;.,2009) به‌منظور بهبود خواص تغذیه‌ای، دارویی، حسی و افزایش دوره نگهداری به محصولات پروبیوتیک افزوده شده است. گزارش‌های ضد و نقضی در رابطه با تأثیر اسانس روی خواص حسی و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها وجود دارد به‌طوری که برخی از مطالعات حاکی از کاهش کیفیت حسی محصولات پروبیوتیک (Shahdadi et all.,2015: Moritz et all.,2015)، بهبود خواص حسی محصول (Shahdadi et all., 2015)، عدم تأثیر منفی بر فعالیت پروبیوتیک‌ها (Sarabi-Jamab et all.,2009: Najafi et all., 2007: Sutherland et all., 2009)، تأثیر منفی بر فعالیت و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها (Tamime et all., 2007) بوده است. از طرفی دیگر میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس‌های گیاهی علیه پروبیوتیک‌ها بالاست. در حالی که در غلظت‌های بسیار پایین‌تر، دارای اثرات ممانعت‌کنندگی (MBC) روی پاتوژن‌ها می‌باشد؛ بنابراین استفاده از اسانس‌ها در دوزهای پایین می‌تواند پاتوژن‌ها را بدون آسیب به پروبیوتیک‌ها از بین می‌برد. زنده‌مانی، سویه‌های پروبیوتیکی تجاری از قبیل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس هنگامی که در معرض نمک‌های معمولی و صفراوی و شرایط مختلف قرار می‌گیرند باید مورد ارزیابی و بررسی قرار گیرد (Del et all.,2006). با این حال در دو مطالعه جداگانه‌ای که توسط مارتاو و همکاران((۱۹۹۷ و لین و همکاران در سال(۲۰۰۶) انجام شد (Marteau et all., 1997: Lin et all.,2006)، نتایج بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بین مشاهدات حاصل از روش این‌ویتر و این‌ویو بود. از این‌رو تحقیق حاضر در شرایط این‌ویتر و با هدف (I) بررسی اثر اسانس زیره سیاه، نمک‌های معمولی و صفراوی روی زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، (Shahdadi et all., 2015) بررسی اثر متقابل اسانس و نمک‌های معمولی و صفراوی صورت جداگانه و تؤام بر روی زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس انجام شد.

مواد و روش‌کار

مقدار یک کیلوگرم زیره سیاه از بازار روز تهران خریداری گردید. نمونه ها قبل از اسانس گیری با آسیاب دستی (هاون) به شکل خرد شده درآمدند.

تهیه گیاه، اسانس و آنالیز آن

گیاه زیره سیاه در فصل تابستان از باغ گیاهشناسی ملی ایران جمع‌آوری و نام علمی آن توسط پژوهشکده گیاهان دارویی باغ گیاه شناسی ملی ایران تأیید شده بود. اسانس گیاه به روش تقطیر با بخار آب از دانه‌های گیاه تهیه شد و سپس توسط دستگاه رنگ‌نگاری متصل به طیف‌سنج جرمی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بدین‌منظور دستگاه ستون مویینه HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۳۲ میکرون مورد استفاده قرار گرفت. بدین جهت از برنامه دمایی ۶۰ تا ۲۶۵ درجه سلسیوس، با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سلسیوس در دقیقه و در نهایت نگهداری ستون در دمای ۲۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس و گاز حامل آن هلیوم بود که با سرعت یک میلی‌متر بر دقیقه از لوله عبور می‌کرد. در نهایت اجزای اسانس به‌ترتیب زمان استخراج برمبنای انرژی یونیزاسیون به کمک شناساگر FID با ظرفیت الکتریکی ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سلسیوس شناسایی شد (Shahdadi et all., 2015).

مواد مصرفی

باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ATCC4356) به‌صورت سوش خالص از کلکسیون میکروبی انستیتوپاستور ایران و مایه‌کشت تجارتی ماست با عنوان یوفلکس اکسپرس (حاوی استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس ولگاریس) از شرکت کریستین هانس دانمارک، محیط کشت‌های MRS براث و MRS آگار از شرکت مرک آلمان و نمک‌های معمولی و صفراوی از شرکت سیگمای آمریکا خریداری شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس زیره سیاه، نمک معمولی و صفراوی

به‌منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با چاهک ته‌گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس، نمک‌های معمولی و صفراوی به هر چاهک انتقال داده شد و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری نیز اضافه شد (غلظت نهایی باکتری در هر چاهک 5×10^5 cfu/ml) بود. محتویات هر چاهک به مدت دو دقیقه توسط Plate Reader مجهز به Shaker مخلوط شد. سپس جذب نوری با استفاده از Plate Reader در ساعت صفر و با طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از اتمام گرمخانه‌گذاری کدورت یا عدم کدورت در چاهک به صورت چشمی مشاهده و جذب نوری توسط Plate reader در طول موج ذکر شده قرائت گردید.

شمارش باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

در فواصل روزهای اول، هفتم، چهاردهم، بیست و یکم و بیست و چهارم یک میلی‌لیتر نمونه را در نه میلی لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد هموژن نموده سپس رقت‌های بعدی در لوله های حاوی آب پپتونه ۰/۱ درصد تهیه شد. شمارش باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس براساس روش ارائه شده توسط شی هان و همکاران (۲۰۰۷) انجام گرفت. بدین منظور از محیط کشت MRS-bile agar استفاده گردید. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت در شرایط بی‌هوازی صورت گرفت.

اندازه‌گیری اسیدیته و pH

اسیدیته نمونه‌های به روش تیتراسیون و براساس درصد اسیدلاکتیک تعیین گردید. نمونه‌ها به وسیله NaOH یک نرمال در حضور فنول‌فتالین تیتر شده بودند. pH نمونه‌ها نیز به وسیله pH متر دیجیتال تعیین شده بود (Shahdadi et all., 2015).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

به‌منظور طراحی تیمارها از طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل استفاده شد، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش مقایسه میانگین LSD در نرم‌افزار SAS نسخه ۹ استفاده شد. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گردید و

سطح معنی‌داری برای کلیه تیمارها بـه صـورت P-Value کمتر از ۵ درصد گزارش شد ($p<۰/۰۵$).

نتایج

آنالیز اسانس

نتایج حاصل از آنالیز اسانس زیره سیاه توسط دستگاه گـاز کروماتوگراف متصـل بـه طیـف نگـار جرمـی (GC/MS) شامل درصد و نوع ترکیبات آن‌ها در جدول ۱ ارائـه شـده است. بر ایـن اسـاس ۱۲ ترکیـب تشـخیص داده شـد کـه معادل ۱۰۰ درصـد اسـانس بـود. اجـزای مهـم آن شـامل Carvone (۲۶/۰۳ درصـد)،-Propanal, 2-methyl-3-phenyl (۱۸/۵۹ درصد)، gamma.-Terpinene (۱۷/۴۳ درصـد) و Limonene (۱۲/۸۴ درصـد) بودنـد.

جدول ۱- نتایج تجزیه اسانس زیره سیاه

No	Name	درصدArea
1	.ALPHA.-PINENE	0.89
2	Sabinene	0.69
3	beta.-Pinene	1.79
4	.beta.-Myrcene	0.62
5	Cymene	9.62
6	Limonene	12.84
7	.gamma.-Terpinene	17.43
8	3-Cyclopentylcyclopentan-1-one	0.98
9	Propanal, 2-methyl-3-phenyl-	18.59
10	Carvone	26.03
11	1-Isopropylidene-3-n-butyl-2-cyclobutene	3.63
12	(R)-(+)-1-Phenyl-1-propanol	6.89

حداقل غلظت بازدارندگی

حدافل غلظت بازدارندگی اسانس زیره سیاه، نمک‌های معمولی و صفراوی به‌ترتیب ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام، ۴ و ۰/۳ درصد بدست آمد.

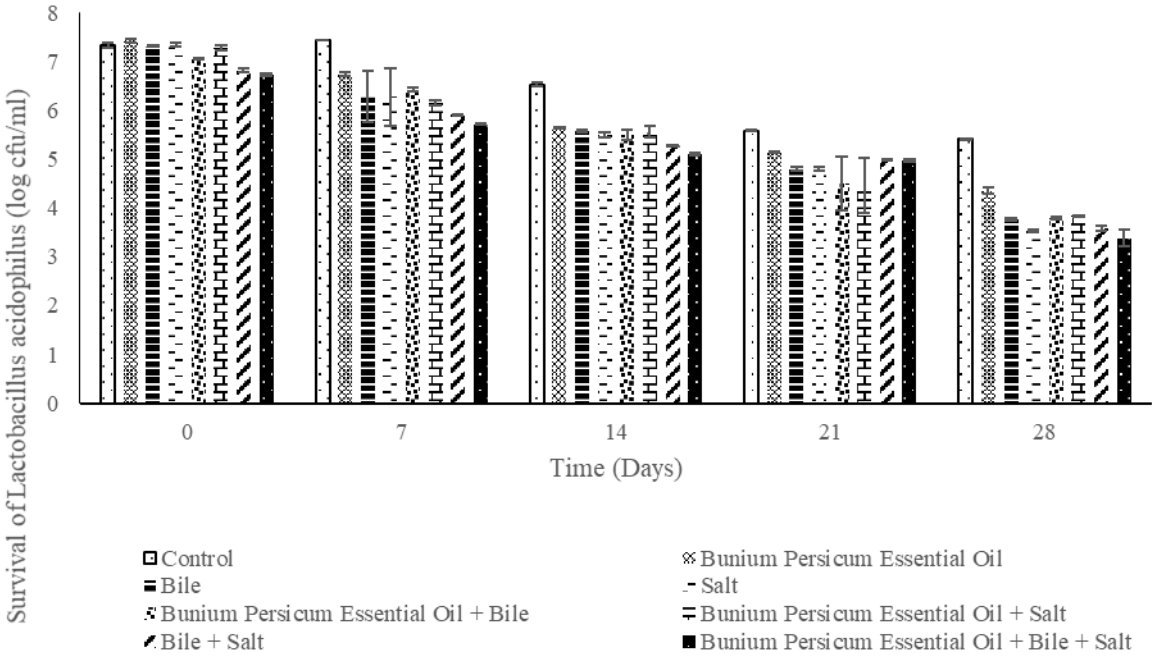
زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

بررسی تجزیه واریانس بیانگر تأثیر معنی‌دار اثر متقابل تیمار و زمان نگهداری روی زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای چهار درجه سلسیوس بود ($p<۰/۰۵$؛ شکل ۱). همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده با افزایش زمان نگهداری، جمعیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تمامی نمونه ها کاهش یافته بود اما شدت کاهش در تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای تحت تنش کمتر بود ($p<۰/۰۵$). با مقایسه میانگین جمعیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تیمارها در هر یک از زمان‌های مورد بررسی مشخص شد که تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای تحت تنش، در تمامی روزهای نگهداری دارای تعداد بالاتری از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود ($p<۰/۰۵$).

در بین تیمارهای تحت تنش نیز زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تیمارهای تحت تنش با اسانس و تنش توأم اسانس زیره سیاه، نمک‌های معمولی و صفراوی به‌ترتیب بیشتر و کمتر بود ($p<۰/۰۵$). بین زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تیمارهای تحت تنش با نمک معمولی و صفراوی به تنهایی و در ترکیب با اسانس زیره سیاه در تمام روزهای نگهداری اختلاف معنادار آماری مشاهده نگردید ($p<۰/۰۵$).

همچنین تیمار تحت تنش تؤام با نمک‌های معمولی و صفراوی بعد از تیمار تحت تنش تؤام با اسانس، نمک‌های معمولی و صفراوی کمترین تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را به خود اختصاص داده بود ($p<۰/۰۵$). در پایان روز ۲۸ نگهداری تیمارهای شاهد (۵/۴۱±۰/۰۲ Log cfu/ml) و تیمار تحت تنش توام اسانس زیره سیاه، نمک‌های معمولی و صفراوی (Log

۳/۳۸±۰/۱۸cfu/ml) به‌ترتیب بیشترین و کمترین تعداد لاکتوباسیلوس‌ها را به خود اختصاص داده بودند ($p<۰/۰۵$).



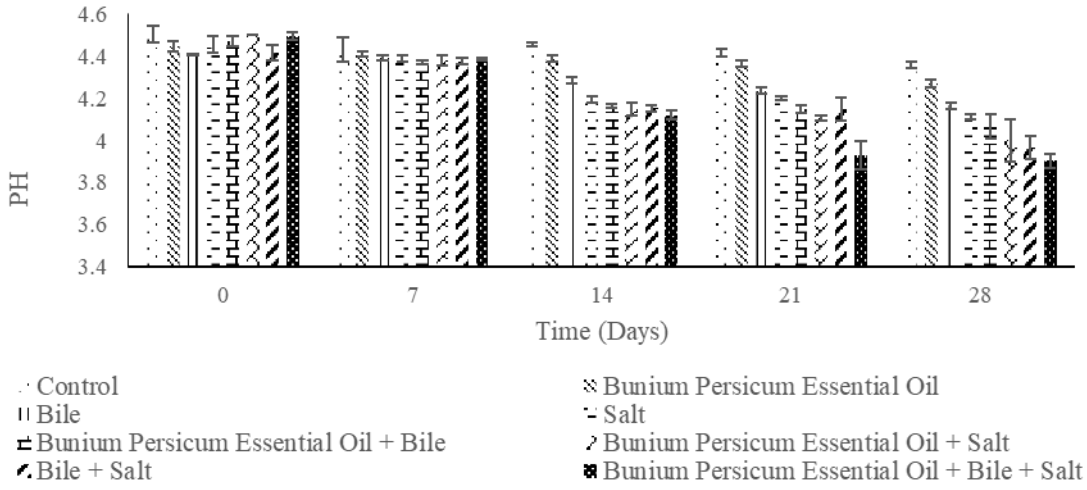
شکل ۱- اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

pH

نتایج حاصل از تجزیه واریانس بیانگر تأثیر معنی‌دار اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی تغییرات pH در طی دوره نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سلسیوس) بود ($p<۰/۰۵$). همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، با افزایش زمان نگهداری مقدار pH در کلیه تیمارها در طی دوره نگهداری کاهش یافته بود ($p<۰/۰۵$).

با مقایسه میانگین‌های توسط آزمون LSD در هر یک از زمان‌های مورد بررسی مشخص گردید که در تمامی روزهای نگهداری مقدار pH در تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای تحت تنش بیشتر بود ($p<۰/۰۵$). در بین تیمارهای تحت تنش نیز تیمار تحت تنش با اسانس زیره سیاه در مقایسه با سایر تیمارها در تمامی روزهای نگهداری از pH بیشتر برخوردار بود ($p<۰/۰۵$). بین تیمارهای تحت تنش با نمک‌های معمولی و صفراوی با یکدیگر و به صورت ترکیب با اسانس زیره سیاه به لحاظ مقدار pH به جز در روز ۲۸ نگهداری، در سایر روزها اختلاف معنادار آماری مشاهده نشده بود ($p<۰/۰۵$). همچنین تیمار تحت تنش تؤام با نمک‌های معمولی و صفراوی بعد از تیمار تحت تنش تؤام با اسانس زیره سیاه، نمک معمولی و صفراوی کمترین pH را در تمامی روزهای نگهداری به خود اختصاص داده بود.

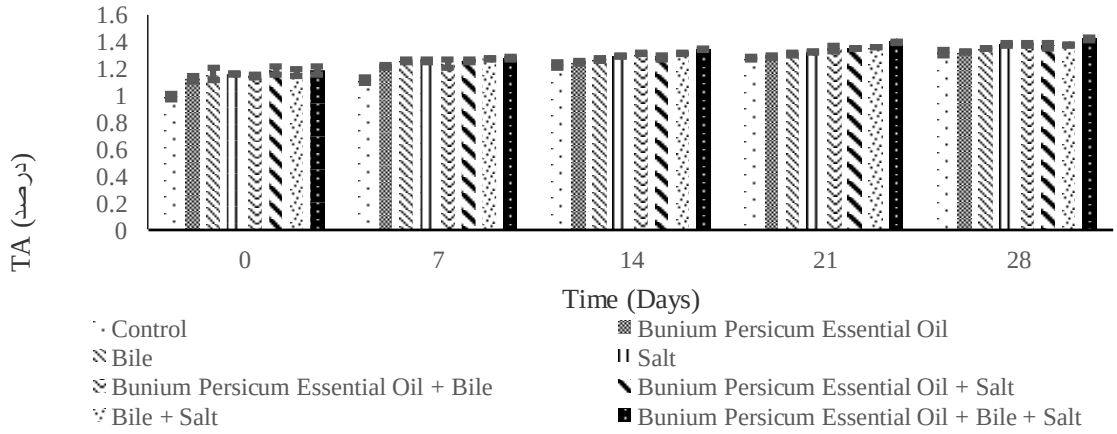
در پایان روز ۲۸ نگهداری کمترین (۳/۹۰±۰/۰۳) و بیشترین pH (۴/۳۶±۰/۰۱) به‌ترتیب مربوط به تیمارهای تحت تنش تؤام با اسانس زیره سیاه، نمک‌معمولی و صفراوی و تیمار شاهد بود ($p<۰/۰۵$).



شکل ۲- اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی pH

اسیدیته

اثر متقابل تیمار و زمان نگهداری روی تغییرات اسیدیته تیمارهای مورد مطالعه معنادار بود (p<۰/۰۵؛ شکل ۳). مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSD بیانگر این بود که با افزایش زمان نگهداری، مقدار اسیدیته در تمامی تیمارها افزایش یافته بود (p<۰/۰۵). مقدار اسیدیته در تیمار شاهد در تمامی روزهای نگهداری در مقایسه با تیمارهای تحت تنش کمتر بود (p<۰/۰۵). در بین تیمارهای تحت تنش، تیمار تحت تنش با اسانس زیره سیاه در مقایسه با سایر تیمارها از اسیدیته کمتری برخوردار بود (p<۰/۰۵). بین تیمارهای تحت تنش با نمک معمولی و صفراوی به جز در روز ۲۸ نگهداری، در سایر روزها اختلاف معنادار آماری مشاهده نشده بود (p>۰/۰۵). همچنین تیمارهای مذکور در ترکیب با اسانس زیره نیز تفاوت معنادار آماری مشاهده نشده بود (p<۰/۰۵). در پایان روز ۲۸ نگهداری تیمارهای شاهد و تحت تنش تؤام با اسانس زیره سیاه، نمک‌های معمولی و صفراوی به‌ترتیب کمترین (۱/۳۲±۰/۰۲) و بیشترین (۱/۴۳±۰/۰۱) مقدار اسیدیته را به خود اختصاص داده بودند (p<۰/۰۵).



شکل ۳- اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی اسیدیته

بحث

زنده‌مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طول دوره ذخیره‌سازی تا زمان مصرف یک عامل مهمی در زمینه تولیدات پروبیوتیکی است. طبق مطالعات متعددی که در این رابطه صورت گرفته است برای دستیابی به اثرات درمانی و مفید، تعداد پروبیوتیک‌های موجود در یک محصول در زمان مصرف حداقل باید ۱۰۵-۱۰۶ CFU/g

or ml از محصول نهایی باشد و CFU/g or ml ۱۰۸ در دستگاه گوارش باشد Azizkhani et all., 2018: Cruz et all., 2012). در مطالعه حاضر جمعیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بعد از چهار هفته از ذخیره‌سازی در دمای چهار درجه سلسیوس به‌طور قابل توجهی کاهش یافته بود به‌طوری که در تیمار شاهد مقدار باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از مقدار log ۷/۳±۰/۰۵cfu/ml در روز صفر به log ۵/۴±۰/۰۲ cfu/ml در روز ۲۸ نگهداری رسیده بود در حالی که در تیمارهای تحت تنش در پایان روز ۲۸ نگهداری، جمعیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تمامی تیمارها به زیر log ۵cfu/ml رسیده بود. در تیمار شاهد تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس طی هفت روز اول نگهداری افزایش یافته بود اما به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$). افزایش جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس طی هفت روز اول نگهداری در ماست پروبیوتیک در پژوهش‌های زیادی به اثبات رسیده است (Sarabi-Jamab et all.,2009: Azizkhani et all., 2018). در روز اول نگهداری بین تیمار شاهد و سایر تیمارها (به جز تیمارهای تحت تنش توام نمک معمولی و صفراوی و اسانس زیره سیاه توام با نمک‌های معمولی و صفراوی) اختلاف معنادار آماری مشاهده نشده بود. این موضوع می‌تواند به دلیل مقاومت این باکتری به pH بیشتر از چهار باشد و در همه تیمارها در هفته اول نگهداری pH بالای چهار بوده است.

به دلیل مقاومت باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به شرایط اسیدی تا محدوده pH ۴/۰۵±۰/۰۵ نه تنها مرگ و میر در این باکتری به وقوع نمی‌پیوندد بلکه ممکن است رشد این باکتری مشاهده گردد. این نتیجه مطابق با تحقیقات گذشته بود که توقف رشد اسیدوفیلوس‌ها را در pH برابر با ۴ و اسیدیته بیشتر از ۰/۶ درصد دانسته‌اند (Shah et all., 2000). کاهش جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در طی دور نگهداری ممکن است مرتبط به تجمع اسیدهای آلی در نتیجه رشد و تخمیر باشد (Azizkhani et all.,2018) به‌طوری که دونکود و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که کاهش pH محیط و تجمع اسیدهای آلی طی زمان نگهداری از عوامل مؤثر بر کاهش قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند. البته زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک علاوه بر pH و اسیدیته تحت تأثیر عواملی مانند پتانسیل اکسیداسیون و احیا نیز می‌باشد به‌طوری که افزایش پتانسیل اکسیداسیون و احیا و نیز افزایش غلظت هیدروژن پراکسید حاصل از فعالیت متابولیکی باکتری‌ها از عوامل کاهش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در ماست در طی زمان نگهداری می‌باشد (Donkor et all., 2006). در تمام روزهای نگهداری جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تیمار شاهد بیشتر از تیمارهای تحت تنش بود. در بین تیمارهای واجد تنش، جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تیمار تحت تنش با اسانس زیره سیاه در تمامی روزهای نگهداری بیشتر از سایر تیمارها بود ($p<۰/۰۵$).

بالاتر بودن زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تیمار تحت تنش با اسانس زیره سیاه در مقایسه با سایر تیمارهای واجد تنش ممکن است به ترکیبات فنولی موجود در اسانس گیاه زیره سیاه مرتبط باشد که نقش تحریک‌کنندگی داشته و باعث بهبود رشد باکتری‌های آغاز گر ماست و باکتری‌های پروبیوتیک شده است Marhamatizadeh et all., 2013: Oh NS et all., 2016) لازم به ذکر است که همگام با کاهش مقدار اکسیژن محلول در محیط فرآورده قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها افزایش می‌یابد. در همین راستا ترکیبات فنولی موجود در عصاره و اسانس گیاهان دارویی که به عنوان مهارکننده اکسیژن شناخته می‌شوند، منجر به کاهش پتانسیل اکسیداسیون و احیا در محیط رشد باکتری می‌گرددند و موجب رشد باکتری‌های پروبیوتیک در غیاب اکسیژن می‌شوند (Marhamatizadeh et all., 2013) همچنین کاهش زنده‌مانی لاکتوباسیلوس‌ها در ماست‌های پروبیوتیک در طی دوره نگهداری تحت تأثیر

بکارگیری اسانس‌ها در مطالعات مختلفی اثبات شده است (Shahdadi et all., 2015: Azizkhani et all., 2018: Bayoumi et all.,1992) منجمله در پژوهشی سرابی و نیازمند (۲۰۰۹) اثر اسانس کاکوتی و نعناع فلفلی را بر فعالیت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به‌عنوان باکتری آغاز گر در ماست پروبیوتیک بررسی و مشاهده کردند که تعداد این باکتری‌ها در طول دوره نگهداری در تمام نمونه‌ها کاهش یافته بود. یکی از مهمترین معیارها در انتخاب باکتری‌های اسیدلاکتیک برای استفاده به عنوان پروبیوتیک، مقاومت در برابر نمک‌های معمولی و صفراوی است که یکی از نیازهای مهم و ضروری برای افزایش فعالیت متابولیکی این باکتری‌ها در روده کوچک است (Šušković et all.,2000: Havenaar et all.,1992). در پژوهش حاضر در تیمار تحت تنش با ۰/۱۵ درصد نمک صفرا تا پایان روز ۱۴ نگهداری جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس برابر با cfu/ml ۵/۶ ±۰/۰۱ بود که در محدوده cfu/ml ۱۰۵-۱۰۶ تعریف شده برای مواد غذایی بود. مقاومت بعضی از سویه‌ها به نمک صفراوی با فعالیت هیدرولازی نمک صفراوی مرتبط است، بدین صورت که هیدرولیز نمک صفراوی منجر به کاهش سمیت و اثرات جانبی نمک صفراوی می‌شود (Amraii et all.,2014). از روز ۱۴ نگهداری به بعد، جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به کمتر از مقدار مجاز تعریف شده رسیده بود زیرا پس از قرار گرفتن باکتری‌ها در معرض نمک‌های صفراوی، اختلالات هومئوستازی سلولی اتفاق می‌افتد. تجزیه‌ی غشای لیپیدی و پروتئین‌های غشای سلولی، باعث نشت محتویات باکتریایی و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (Sahadeva et all.,2011: Amraii et all.,2014) . در واقع نمک‌های صفراوی از طریق به‌هم ریختن ساختمان دیواره سلولی باعث مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌شوند. بنابراین مقاومت به نمک‌های صفراوی یکی از ضروری‌ترین ویژگی‌های پروبیوتیک‌ها می‌باشد که زنده‌مانی و فعالیت آن‌ها را در روده کوچک حفظ می‌نماید. پروبیوتیک‌ها نیز با تولید آنزیم‌های آبکافت‌کننده نمک‌های صفراوی اثرات آن‌ها را خنثی می‌کنند (Succi et all.,2005). یکی دیگر از مهم‌ترین چالش‌ها در مورد تولید صنعتی فرآورده‌های پروبیوتیکی، کاهش زیستی میکروارگانیسم‌ها تحت تأثیر درجات مختلف نمک‌زنی در طی دوره تولید و نگهداری می‌باشد. براساس نتایج حاصل زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تیمار تحت تنش با نمک معمولی در مقایسه با تیمار شاهد در تمامی روزهای نگهداری کمتر بود ($p<۰/۰۵$). مطابق نتایج جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس در تیمار تحت تنش با نمک معمولی (۱/۵ درصد سدیم کلرید) تا پایان روز ۱۴ (۰۱/± ۵/۴۹ cfu/ml) در محدوده مجاز تعریف شده (۱۰۵cfu/ml-۱۰۶) بود و از روی ۱۴ تا ۲۸ نگهداری جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به زیر۵Log cuf/ml رسیده بود. کاهش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک تحت تأثیر نمک معمولی طی دوره نگهداری در محصولات لبنی تأیید شده است (۴۱, ۴۲). در مطالعه‌ای در همین راستا، تأثیر غلظت‌های ۰-۵ درصد نمک طعام (NaCL) روی زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس طی دوره نگهداری (یک ساعت و یک هفته) بیانگر این بود که با افزایش غلظت نمک طعام، جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس کاهش یافته بود(Gandhi et all., 2015) که این یافته‌ها تأییدی بر نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر بود. در واقع نمک با تحت تأثیر قرار دادن رشد میکروارگانیسم‌ها در نتیجه تولید اسیدلاکتیک روی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک مؤثر است (Madadlouet all.,2007) تا تغییر pH (Fortin et all.,2011).

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر اولین گزارش در رابطه با اثر تنش اسانس، نمک‌های معمولی و صفراوی به صورت جداگانه و توأم روی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در طی دوره نگهداری در یخچال بود. براساس یافته‌های بدست آمده

نرخ بقاء باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در محصول تخمیری حامل باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با استفاده از تیمارهای اعمال شده به میزان کمتر از حداقل غلظت بازدارندگی، سبب حفظ و نگهداری باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به مقدار توصیه شده در محصول (۱۰۶log cfu/ml-۱۰۵) تا پایان روز ۱۴ نگهداری شده بود. بنابراین ۰/۵ درصد اسانس زیره سیاه (۵۰ درصد MIC) به همراه ۲ درصد نمک معمولی (۵۰ درصد MIC) محیط خوبی برای نگهداری و انتقال لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از محصولات پروبیوتیک به مصرف‌کننده می‌باشد.

منابع

1. Amraii HN, Abtahi H, Jafari P, Mohajerani HR, Fakhroleslam MR, Akbari NJJjom. In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from traditional dairy products. 2014;7(6).
2. Azizkhani M, Parsaeimehr MJIFRJ. Probiotics survival, antioxidant activity and sensory properties of yogurt flavored with herbal essential oils. 2018;25(3):921-7.
3. Bayoumi SJCMTL. Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of yoghurt. 1992;14(1):21-6
4. Chambers DH, ALLISON AMA, CHAMBERS IV EJJoSS. Training effects on performance of descriptive panelists. 2004;19(6):486-99.
5. Cruz AG, Cadena RS, Faria JA, Bolini HM, Dantas C, Ferreira MM, et al. PARAFAC: Adjustment for modeling consumer study covering probiotic and conventional yogurt. 2012;45(1):211-5.
6. Del Piano M, Morelli L, Strozzi G, Allesina S, Barba M, Deidda F, et al. Probiotics: from research to consumer. 2006;38:S248-S55.
7. Donkor O, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NJIDJ. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. 2006;16(10):1181-9.
8. Fortin M-H, Champagne CP, St-Gelais D, Britten M, Fustier P, Lacroix MJIdj. Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production. 2011;21(2):75-82
9. Gandhi A, Shah NPJFm .Effect of salt on cell viability and membrane integrity of Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum as observed by flow cytometry. 2015;49:197-202.
10. Havenaar R, Ten Brink B, Huis JH. Selection of strains for probiotic use. Probiotics: Springer; 1992. p. 209-24.
11. Jaziri I, Slama MB, Mhadhbi H, Urdaci MC, Hamdi MJFC. Effect of green and black teas (Camellia sinensis L.) on the characteristic microflora of yogurt during fermentation and refrigerated storage. 2009;112(3):614-20.
12. Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto TJJoam. Enhancement of bile tolerance in lactococci by Tween 80. 2002;92(1):41-6.
13. Kitazawa H, Ueha S, Itoh S, Watanabe H, Konno K, Kawai Y, et al. AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic Lactobacillus gasseri. 2001;65(3):149-62.
14. LEE SJ, HWANG JH, Lee S, Ahn J, KWAK HSJIjodt. Property changes and cholesterol-lowering effects in evening primrose oil-enriched and cholesterol-reduced yogurt. 2007;60(1):22-30.
15. Liong MT, Shah NPJB, microflora. Acid and bile tolerance and the cholesterol removal ability of bifidobacteria strains. 2005;24(1):1-10.
16. Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou EJIDJ. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. 2006;16(3):189-99.

17. Marhamatizadeh MH, Ehsandoost E, Gholami P, Mohaghegh MDJIJFAS. Effect of olive leaf extract on growth and viability of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum for production of probiotic milk and yoghurt. 2013;2:572-8.
18. Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis JJJoDS. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. 1997;80(6):1031-7.
19. Morelli LJCIiIM. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. 2000;1(2):59-67.
20. Moritz CMF, Rall VLM, Saeki MJ, Fernandes Junior AJAS-t. Assessment of antimicrobial activity of cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) essential oil combined with EDTA and polyethylene glycol in yogurt. 2015:99-104.
21. Najafi KRH ,Bagher M, Shahram BTJWASJ. Effect of essential oil and extract of Ziziphora clinopodioides on yoghurt starter culture activity. 2007;2(3):194-7.
22. Oh NS, Lee JY, Joung JY, Kim KS, Shin YK, Lee K-W, et al. Microbiological characterization and functionality of set-type yogurt fermented with potential prebiotic substrates Cudrania tricuspidata and Morus alba L .leaf extracts. 2016;99(8):6014-25.
23. Sahadeva R, Leong S ,Chua K, Tan C, Chan H, Tong E, et al. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. 2011;18(4).
24. Sarabi-Jamab M, Niazmand RJAEJAES. Effect of essential oil of Mentha piperita and Ziziphora clinopodioides on Lactobacillus acidophilus activity as bioyoghurt starter culture. 2009;6(2):129-31.
25. Shahdadi F, Mirzaie H, Kashaninejad M , Khomeiri M, Ziaiifar AM, Akbarian AJAC. Effects of various essential oils on chemical and sensory characteristics and activity of probiotic bacteria in drinking yoghurt. 2015;3(1):16-21.
26. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E, Grazia L, Pacifico S, et al. Bile salt and acid tolerance of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. 2005;244(1):129-37.
27. Šušković J, Kos B, Matošić S, Besendorfer VJWJoM, Biotechnology. The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. 2000;16(7):673-8.
28. Tamime AY, Thomas LV. Probiotic dairy products: Wiley Online Library; 2005.
29. Tharmaraj N, Shah NPJIDJ. Survival of Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium animalis and Propionibacterium in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. 2004;14(12):1055-66
30. Yazid A, Shuhaimi M, Ali A, Ghazali M, Normah J, Fatimah A, et al. Survival of bifidobacteria in simulated gastric pH and growth in the presence of bile. 1999;7(2):185-90.

Effect of *Bunium Persicum* Essential Oil, NaCl, Bile Salts and their Combinations on viability of *Lactobacillus-acidophilus (ATCC4356)*

Mahmmodi P[1], Khoshkhoo J [1*], Akhondzadeh Basti A[2],Mahasti Shotorbani P[3], Khanjari A[2]

1.Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3. Department of Food Quality Control and Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[*]**corresponding author***:** *zh_khoshkhoo@iau-tnb.ac.ir*

Received: 12 November 2020 Accepted: 15 February 2021

Abstract

The viability of Lactobacillus acidophilus in the commercial preparation process and its usage as probiotic Bactria is useful and the main propose of this paper is to study the effect of Bunium persicum essential oil (BEO) stress, NaCl, bile salts and their combinations on the viability of Lactobacillus acidophilus Bactria. In continue, the effect of BEO stress (0.5 percent), Nacl (2 percent), bile salt (0.15 percent) in compare with the treatment instance, was studied on Lactobacillus acidophilus population in the refrigerator. Data analyses process was done with the two-way ANOVA and comparing the means by LSD method in SAS software version 9. The conclusions have been out coming from three-time tests and P<0/05 has been considered in all test steps. After 4 weeks of 4-Celsius degree temperature condition, the viability of Bactria and pH decreased but the amount of degradation in treatment sample was less than this index in the stressed samples. (P< 0.05) also, the amount of acidity raised in all sample and this increase in stressed samples was more than a treatment sample (p< 0.05). as a conclusion usage of BEO with NaCl and bile salt in the densities below of MIC, can lead to the viability of Bactria till the end of 14th-day maintenance in the probiotic product .

Key words: Stress, *L. acidophilus*, Bunium Persicum.

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 © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University