دو فصلنامه
بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی
سال سوم، شماره ۱ و ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۳

بررسی قابلیت زیستی باکتری باسیلوس کواگولانس در فرایند تولید و مدت زمان نگهداری دو نوع گز معمولی و گز بدون قند

غزل دلیران فیروز[۱]، صبیحه السادات علیزاده*[۲] و محمد گوهریان[۳]

۱ دانشجوی کارشناسی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه شهید بهشتی تهران، ایران
[۲] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، هسته فناوری فراسکه وابسته شرکت گز سکه، اصفهان، ایران
[۳] رئیس مرکز علمی کاربردی عتیق

چکیده

سابقه و هدف: گز یکی از فرآورده های غذایی سنتی ایران است که به جهت پاره‌ای ویژگی‌ها، در عرصه محصولات غذایی جهان منحصر بفرد می‌باشد. در تولید گز از هیچ نوع مواد و افزودنی‌های سنتتیک غیر طبیعی استفاده نمی‌شود. این شیرینی در گروه‌های سنی مختلف محصولی پرطرفدار و پر مصرف است. غنی سازی این محصول با باکتری‌های پروبیوتیک ضمن افزایش ارزش تغذیه‌ای گز آن را به یک محصول فراسودمند تبدیل کرد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که از طریق حفظ تعادل فلور طبیعی بدن اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارند، این تحقیق با هدف بررسی پروبیوتیک کردن گز انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق میزان ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیک باسیلوس کواگولانس در دو نوع گز معمولی و گز بدون قند به روش شمارش در پلیت با محیط کشتMRS agar به مدت چهار ماه بررسی شد.

یافته‌ها: تعداد کلی باکتری‌ها بلافاصله پس از تولید نمونه برای دو گز معمولی وگز بدون قند به ترتیب $5/3x10^{6}$Cfu/g و $7/1x10^{6}$Cfu/g شمارش شد. همچنین تعداد کلی این باکتری پس از ۴ ماه ماندگاری از 10^{6} cfu/gکمتر نشد و این تعداد باکتری تقریبا ثابت ماند.

نتیجه‌گیری: تعداد کلی سویه باسیلوس کواگولانس در گز ثابت ماند. با توجه به نتایج به دست آمده این باکتری گزینه‌ی مناسبی برای غنی سازی گز و تبدیل ان به یک محصول فراسودمند محسوب می شود.

واژه‌های کلیدی: ایزومالت، باسیلوس کواگولانس، پروبیوتیک، گز

مقدمه

گز یکی از فرآورده‌های غذایی سنتی ایران است که به جهت پاره‌ای ویژگی‌ها، در عرصه محصولات غذایی جهان منحصر به فرد می‌باشد. در تولید گز از هیچ نوع مواد و افزودنی‌های سنتتیک غیر طبیعی استفاده نمی شود. افزودنی سنتی و معروف این محصول، صمغ طبیعی به نام گزانگبین می باشد که به علت کاهش چشمگیر برداشت آن درسال‌های اخیر با مان‌های مشابه مثل ترنجبین و شیر خشت جایگزین

* مسئول مکاتبات: Alizadeh.sabihe@yahoo.com

گردیده است. ترکیبات گز تفاوت مشخصی با سایر شیرینی‌ها و تنقلات مشابه دارد. در تهیه گز از انواع روغن، نشاسته و آرد استفاده نمی‌شود. گز از نظر مدت نگهداری نیز در جایگاه ویژه‌ای قرار دارد. کمتر محصول غذایی را بدون مواد سنتتیک نگهدارنده می‌توان ماه‌ها با حفظ کیفیت نگهداری نمود. همچنین در تولید گز از انواع مغزهای درختی مانند مغز پسته، بادام، گردو و فندق نیز استفاده می شود که باعث افزایش ارزش تغذیه ای گز نیز می شود.

در قدیم این محصول فقط با روش‌های سنتی و با مان‌های طبیعی تولید شده است، اما اکنون همراه این مان‌ها، مواد دیگری مانند گلوکز، شکر، عسل و همچنین در نوع رژیمی و بدون قند آن ایزومالت و سوربیتول با روش های متفاوت صنعتی استفاده میشود. طبق تحقیقات انجام شده مشخص شده است که شیرینی و شکلات‌ها محیط مناسبی برای رشد و فعالیت باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک می‌باشد. پروبیوتیک‌ها میکروب‌های (باکتری و مخمر) زنده‌ای می‌باشند که با استقرار در بخش‌های مختلف بدن (اساسا روده)، عمدتا از طریق حفظ و بهبود توازن میکروبی روده، سبب ایجاد خواص سلامت‌بخش برای میزبان می‌شوند. مهمترین شاخص کیفی محصولات پروبیوتیک، قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در آن، یعنی کمینه تعداد سلول‌های زنده پروبیوتیک در هر ml یا gr از فرآورده‌های غذایی در لحظه مصرف حداقل 10^6 cfu است.

در حال حاضر گز به عنوان یک محصول پروبیوتیک با ارزش غذایی بالا، به عنوان محصول سنتی ایران در بسیاری از بازارهای جهان بهتر و بیشتر از قبل شناخته شده است.

در این تحقیق از باکتری باسیلوس کواگولانس استفاده شد. این باکتری تولید کننده اسپور است و نسبت به دماهای بالا مقاومت دارد. این مطالعه باهدف پروبیوتیک کردن گز با استفاده از باکتری باسیلوس کواگولانس، با بررسی منحنی رشد این باکتری‌ها انجام شد. همچنین ماندگاری این باکتری‌ها در گز از زمان تولید به مدت ٤ ماه بررسی شد.

روش‌ها:

مواد و دستگاه‌ها:

محیط‌کشت MRS[1] مواد مربوط به آزمون‌های شیمیایی از شرکت مرک آلمان و فلوکا آمریکا خریداری شد. نمونه گز در شرکت گز سکه اصفهان مطابق با استاندارد ۳۰۲۳ ملی ایران و با دو فرمولاسیون مطابق جدول شماره ۱ بر اساس پروانه ساخت کارخانه، در نظر گرفته شد. سایر دستگاه های مورد نیاز این تحقیق عبارت بودند از: اتوکلاو، انکوباتور، سانتریفوژ، ترازو، دستگاه بن ماری و جار بیهوازی.

جدول شماره ۱: فرمولاسیون گز معمولی و گز بدون قند

ترکیبات / نوع گز	گلوکز	شکر	سوربیتول	ایزومالت	مغز پسته	گلاب	سفیده تخم مرغ	عصاره استویا	آب
گز معمولی (درصد)	٤١	٢٣,٥	–	–	٢٥	١,٦	٠,٩	–	٨
گز بدون قند (درصد)	–	–	٤٠	٢٦	٢٥	١,٣	٠,٧	٠,٣	٦,٣

میکروارگانیسم‌ها:

کشت‌های اسپری درای شده تجاری شامل باکتری باسیلوس کواگولانس از شرکت تک ژن زیست تهران خریداری شد.

در این مطالعه چهار تیمار با سه تکرار بررسی شد.

مراحل انتخابی اضافه شدن باکتری‌ها با توجه به دمای تولید و توزیع یکنواخت باکتری‌ها در تمامی قسمتهای محصول در نظر گرفته شد.

دلیل انتخاب باکتری باسیلوس کواگولانس مطالعات انجام شده در مورد مقاومت این باکتری به علت اسپوردار بون در شرایط مختلف فیزیکی و شیمیایی بود.

(در یک تیمار) ابتدا مخلوط گلوکز و شکر به آب در حال جوش اضافه گردید تا خوب مخلوط شود و یک مایع به وجود آید. پس از آن به مایه ساده اجازه داده شد تا در درجه حرارت بالا و در اثر مخلوط شدن به غلظت مورد نیاز رسید. سپس مخلوط پودرسفیده تخم مرغ، آب و گلاب قبلاً با هم مخلوط شده‌اند به آن اضافه شد و مخلوط کردن ادامه یافت تا به اصطلاح گز رسید و نخ گز شکست. سپس باکتری باسیلوس کواگولانس قبل از افزودن مغز پسته به گز افزوده گردید. در این مرحله درجه حرارت گز حدود ۸۵ درجه سانتی گراد گزارش شد. سپس از چهار ناحیه پاتیل گزسازی در پلیت‌های استریل نمونه برداری شد. در تیمار سوم نیز مراحل تولید گز مانند تیمار اول انجام شد، با این تفاوت که در مایع اولیه ایزومالت و سوربیتول به عنوان قندهای الکلی جایگزین شکر و گلوکز شد. باکتری باسیلوس کوگولانس در مرحله مشابه تیمار اول به گز افزوده گردید. مراحل تولید گز در تیمار دوم و چهارم نیز مانند تیمار اول و سوم بود، با این تفاوت که باکتری‌ها در مرحله مخلوط کردن سفیده تخم مرغ افزوده شد. سپس از چهار ناحیه پاتیل گز سازی نمونه برداری انجام شد. همچنین به صورت تصادفی و طبق روش نمونه برداری به شماره استاندارد ملی ایران شماره ۵۱۹۷ از نمونه گزها پس از بسته‌بندی نیز نمونه برداری شد. نمونه‌های گز در شرایط دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به منظور بررسی قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک به مدت چهار ماه نگهداری شدند.

بررسی قابلیت زیستی باکتری‌های باسیلوس کواگولانس در گز معمولی و گز بدون قند

از هر دو نمونه گز معمولی و گز بدون قند در شرایط دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت چهار ماه، در فاصله های ۱۵روز یک بار ۱۰ گرم برداشته شد. از آن سری رقت تهیه و سپس به روش شمارش در پلیت روی محیط MRS agar انجام شد. پس از آن پلیت‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی گرما گذاری شدند. شرایط بی‌هوازی با استفاده از جار بی‌هوازی و گاز پک ایجاد شد. در نهایت پلیت‌هایی در نظر گرفته شد که حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی بودند. به منظور کاهش خطا هر آزمون با سه بار تکرار انجام شد(٦).

بررسی تاثیر باکتری باسیلوس کواگولانس به روی برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی گز معمولی و گز بدون قند

میزان رطوبت، خاکستر، قند کل ساکارز، درصد مغز مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۳۰۲۳– گز

بدون گزانگبین، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون، برای هر دو نمونه گز معمولی و گز بدون قند انجام شد(۱).

ارزیابی حسی: ویژگی‌های حسی شامل طعم، احساس دهانی و ظاهر مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمون توسط ۱۰ نفر ارزیاب انجام گرفت. هدف عدم تغییر ظاهر، طعم و احساس دهانی نمونه های گز بعد از افزودن باکتری باسیلوس کواگولانس بود.

یافته‌ها:

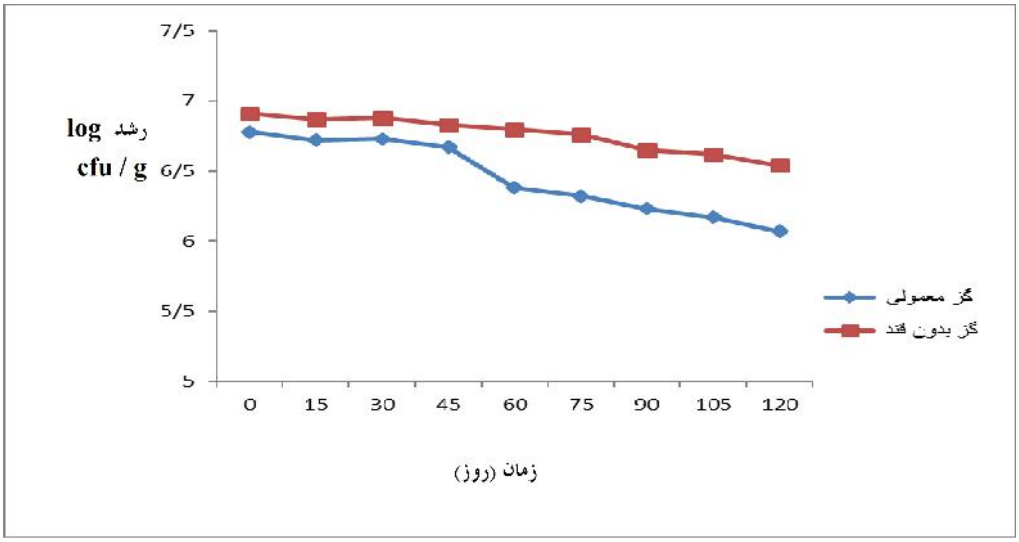
نتایج حاصل از آزمون های تخمیر قندی، کاتالاز مثبت و باسیل های گرم مثبت نشان داد که باکتری مورد استفاده باسیلوس کواگولانس بود.

در این تحقیق ابتدا قابلیت زیستی *باسیلوس کواگولانس* در نمونه هایی که باکتری‌ها به مرحله قبل از افزودن مغز افزوده گردید(تیمار اول و تیمار سوم)، بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده عدم تلقیح یکتواخت باکتری‌ها در گز بود. قابلیت زیستی باکتری باسیلوس کواگولانس در تیمار دوم و چهارم نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل تعداد کلی باکتری باسیلوس کواگولانس در نمونه گز معمولی و بدون قند به ترتیب $۵/۳x۱۰^{۶}$cfu/g و $۷/۱x۱۰^{۶}$cfu/g گزارش کرد.(جدول شماره ۲)

طبق شکل ۱ تعداد باکتری باسیلوس کواگولانس در نمونه های گز طی مدت چهار ماه نگهداری در هر دو نمونه ثابت ماند و این تعداد در ماه چهارم برای گز معمولی و گز بدون قند به ترتیب$۱/٤\times۱۰^{٦}$ و $۲/۲\times۱۰^{٦}$ cfu/g گزارش شد.

جدول شماره ۲: نتایج میزان رشد باکتری *باسیلوس کواگولانس* نمونه برداری از تیمارهای مختلف

تیمار/ نتایج	نمونه اول	نمونه دوم	نمونه سوم	نمونه چهارم
تیمار ۱	$۱/۲\times۱۰^{۹}$	$۲/۵\times۱۰^{٤}$	٤×۱۰^{۸}	$۲/۱\times۱۰^{۱}$
تیمار ۲	$۵/۳\times۱۰^{٦}$	$۲/۱\times۱۰^{٦}$	$٤/۵\times۱۰^{٦}$	$۲/۸\times۱۰^{٦}$
تیمار ۳	$۵/۵\times۱۰^{۲}$	$۱/٤\times۱۰^{۱}$	۰	$۳/۸\times۱۰^{۸}$
تیمار ٤	$۱/۵\times۱۰^{٦}$	$٦/۵\times۱۰^{٦}$	$٤/۳\times۱۰^{٦}$	$۱/۱\times۱۰^{٦}$



شکل ۱ – قابلیت زیستی باسیلوس کواگولانس در دو نمونه گز معمولی و گز بدون قند در طی چهار ماه نگهداری

نتایج اندازه‌گیری برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی

نتایج حاصل از آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی مطابق با جدول شماره ۲ نشان دهنده انطباق نمونه‌های گز با استاندارد ملی ایران شماره ۳۰۲۳- گز بدون گزانگبین- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون بود. همچنین میزان سوربیتول، ایزومالت و استویا در نمونه گز بدون قند به ترتیب ۵۱/۵، ٤٦/۵ و ۲ درصد گزارش شد.

جدول شماره ۳: ویژگی‌های فیزیکی وشیمیایی گز معمولی و گز بدون قند پس از غنی سازی با باکتری‌های پروبیوتیک

ویژگی‌ها / تیمار	رنگ و طعم	تردی	رطوبت	خاکستر	قند کل	ساکارز
تیمار ۱	سفید و شیرین	نرم بوده و چسبنده نبود	٦/۷۱	۰/۳٦	٦۷	۳۰
تیمار ۲	سفید و شیرین	نرم بوده و چسبنده نبود	٦/۷	۰/٤۲	٦۵	۲۹/۵
تیمار ۳	سفید و شیرین	نرم بوده و چسبنده نبود	۵/۷	۰/۳۹	۰	۰
تیمار ٤	سفید و شیرین	نرم بوده و چسبنده نبود	۵/٦	۰/۳۵	۰	۰

ویژگی حسی تیمارها:

ارزیابی حسی تیمارها نشان می‌دهد نوع باکتری اثری بر قابلیت پذیرش تیمارها در پایان دوره نگهداری نداشت. از لحاظ طعم، احساس دهانی و ظاهر تفاوتی بین دو نمونه گز پروبیوتیک شده و گز معمولی فاقد باکتری وجود نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری:

نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانس* بقا و ماندگاری خوبی در هر دو نمونه گز معمولی و بدون قند دارد، به طوری‌که تعداد کلی *باسیلوس کواگولانس*در بدو تولید نمونه‌های گز و همچنین مدت چهار ماه نگهداری گز در هر دو نمونه در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتیگراد)از تعداد $۱۰^{٦}$ cfu/g افت پیدا نکرد. مطابق شکل ۱ بقاء و ماندگاری باکتری *باسیلوس کواگولانس* در گز بدون قند بهتر است. این خاصیت را شاید بتوان به وجود ایزومالت وخواص پری بیوتیکی آن مرتبط دانست.

نتایج تحقیقات انجام شده توسط علیزاده و همکاران بر روی یک نمونه پشمک بر پایه شکر در واحد تحقیق و توسعه شرکت گزسکه نیز نشان دهنده بقاء باکتری باسیلوس کواگولانس در طی مدت چهار ماه نگهداری نمونه پشمک‌ها داشت(٤). تعداد کلی این باکتری در این مدت از $۱۰^{٦}$cfu/g کمتر گزارش نشد. این نتایج با نتایج تحقیقات علیزاده و همکاران سازگاری داشت به طوری‌که تعداد کلی باکتری *باسیلوس کواگولانس* را در مدت نگهداری پشمک پس از چهار ماه $۱۰^{٦}$ cfu/g گزارش کردند(۲).

همچنین بررسی‌های انجام شده در واحد تحقیق و توسعه شرکت گز سکه توسط علیزاده و همکاران بر روی یک نمونه پشمک سین بیوتیک با فرمول ایزومالت و استویا نشان‌دهنده بقاء خوب باکتری باسیلوس کواگولانس در مراحل تولید و پخت این

محصول تا پایان چهار ماه زمان نگهداری بود. به شکلی‌که باکتری‌ها در پایان چهار ماه 10^6 cfu/g شمارش شدند (۱۱). همچنین از لحاظ خواص حسی گز نیز مانند پشمک تغییری نداشت.

تحقیقات Possemier نشان داد که تعداد کلی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *بیفیدوباکتریوم لانگوم* در شکلات شیری و شکلات تیره با حدود 10^7 cfu/g در مدت نگهداری شکلات رسید. نتایج مطالعه هم نشان دهنده بقاء خوب *باسیلوس کواگولانس* در گز بود(۹).

در تحقیق دیگری که توسط گنجوری و همکاران بر غنی سازی نان‌های حجیم با باکتری *باسیلوس کواگولانس* انجام گرفت تعداد باکتری‌ها پس از پخت نان 10^6 cfu/g گزارش شد. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان دهنده مقاومت باکتری *باسیلوس کواگولانس* به دماهای بالای پخت گز و ثابت ماندن تعداد کلی 10^6cfu/g باکتری های *باسیلوس کواگولانس* در گز بود.

پژوهش حاضر نشان داد که گز با ارزش غذایی بالایی که به واسطه وجود انواع مغزهای درختی و سفیده تخم مرغ دارد و همچنین پرمصرف بودن این محصول سنتی بین همه گروه‌های سنی و همچنین رشد و بقاء خوب باکتری پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانس*، می تواند حامل خوبی برای غنی سازی با باکتری‌های پروبیوتیک و رسیدن این باکتری ها به دستگاه گوارش می‌باشد محسوب شود.

منابع:

۱- استاندارد ملی ایران به شماره ۳۰۲۳، گز بدون گزانگبین، ویژگی‌ها و روش های آزمون

۲- صراف، س.، علیزاده.، کاظمی نیا. ر.، ۱۳۹۰. گزارش روند از ارائه ایده تا تولید گز پروبیوتیک در واحد تحقیق و توسعه شرکت گز سکه. ص. ۱-۲۷.

۳- علیزاده،ص. ا،بهمن ۸۸، بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم بر کینتیک رشد و اثر ضد باکتریال لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از خمیر ترش نان‌های سنتی ایران، پایان نامه کارشناسی ارشد، صفحات ۳۰-۴۰.

٤- صبیحه السادات علیزاده، رویا کاطمی نیا، محمد گوهریان. ۱۳۹۱. بررسی رشد و پایداری باکتری باسیلوس کواگولانس در پشمک بدون قند و پشمک معمولی. دومین همایش ملی پروبیوتیک و غذاهای فراسودمند، تهران، ایران.

۵- محمدی، ر.، روحی لنگرودی، م.، مرتضویان، س. ا. م.، سلیمانی، م.، صبوری، صمد. ۱۳۹۱.مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. سال اثر نسبت شیر گاو به شیر سویا و نوع کشت آغازگر تجاری بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، میکروبی و حسی دوغ سویای پروبیوتیک.سال هفتم. شماره ۵. ص ۵۲۲-۵۱۱.

6- Anal, A.K., Singh, H.,(2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science andTechnology18, 240-251.

7- Alizadeh. SA., Kazeminia. R., Goharian. M., Study Viability of Bacillus coagulans (Lactobacillus Sporogenese) in cotton candy and sugar free cotton candy.)(2013). 2th National Congress of Probiotic and Functional Food. P-399.

8- Fazeli. MR., Amirmozafari. N., Golbooinejad. R., Jamalifar. H. (2007). Antagonistic action of watermelon Juice probioticated using different strain of Lactobacilli against Salmonella

Typhimurium. Iranian J PublHalth. 36 (4):70-73.

9- Ganjoori. M., Mehrabian. S., Akhavan A. Enrichment Breads, using of potential probiotic bacillus (Bacillus coagulans).(2013.), 2th National Congress of Probiotic and Functional Food. P- 367.

10- J.R. Endres, A. Clewell, K.A. Jade, T. Farber, J.Hauswirth, A.G. Schauss.(2009).safety assessment of proprietary preparation of novel probiotic, bacillus coagulans, as a food ingredient. Food and Chemical Toxicology. 47. 1231-1238.

11- Mortazavian AM, Sohrabvandi S, Probiotic and food probiotic product: based on dairy probiotic product. Tehran: Eta Publication 2006. P 54-150.

12- Possemiers,S., Marzorati,M.,Verstraete, W., Van de Wiele,T.(2010). Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. International Journal of Food Microbiology. 141 97–103.

13- Sarles, W.B., Hammer, B.W., 1932. Observation on Bacillus coagulans. J. Bacteriol. 23,301-314.

14- Sarraf . S., Sadeghy, H., Shirzad, M.(2012). Idea till Production Of Functional SynbioticNougaz. 13th Iranian pharmaceutical Science Congress. P-183.