تاثیر عصاره آبی و اتانولی موسیر بر *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در محیط آبگوشت TSB و ماست

سارا اشرفیان[1]، مجتبی بنیادیان[2*]، حمداله مشتاقی[2]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت موادغذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفیت موادغذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *boniadian@sku.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۶

چکیده

ماست یکی از محبوب‌ترین فرآورده‌های لبنی است که در سراسر دنیا به طور وسیعی مصرف می‌شود و با توجه به بالا بودن ارزش تغذیه‌ای وجود باکتری‌های مفید در آن مورد توجه فراوانی قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر عصاره های اتانولی و آبی موسیر بر باکتری‌های آغازگر ماست (*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*) می‌باشد. عصاره آبی و اتانولی موسیر به روش خیساندن استخراج گردید. سپس MIC و MBC عصاره ها برای باکتری‌های آغازگر ماست به روش میکرودایلوشن اندازه گیری شد. عصاره‌ها در غلظت‌های MIC به همراه سه درصد مایه ماست به شیر اضافه شدند. شیرهای تلقیح شده در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به pH=۴/۴ ، گرمخانه‌گذاری شده و سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. آزمون‌ها در روزهای یک، سه، هفت و ۱۴ شامل اندازه گیری pH، اسیدیته و شمارش باکتری‌های آغازگر روی نمونه ها انجام شد. نتایج نشان داد در روزهای مختلف، اسیدیته و pH گروه‌های عصاره نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف آماری معنی‌دار بودند (p <0/05). آزمون شمارش باکتری‌های آغازگر در روزهای یک، سه، هفت و ۱۴، گروه های تیمار نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف آماری معنی‌دار بودند (p <0/05). نتایج مطالعه نشان دهنده اثر مهار کننده بیشتر عصاره آبی موسیر بر باکتری‌های آغازگر ماست نسبت به عصاره اتانولی موسیر بود (p<0.05). بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد باکتری‌های آغازگر در ماست موسیر تا روز ۱۴ نگهداری در یخچال زنده و فعال بوده و می‌تولند اثرات پروبیوتیکی باکتری‌های آغازگر ماست را به مصرف کننده انتقال دهد.

کلید واژه ها: عصاره، موسیر، باکتری های آغازگر، ماست.

مقدمه

ماست یکی از مهم‌ترین فرآورده‌های تخمیری شیر می‌باشد و به سبب افزایش آگاهی مردم از منافع سلامت بخش ماست طی دهه‌های اخیر مصرف آن به طور چشم‌گیری افزایش پیدا کرده است. ماست در ایران، یکی از اقلام عمده در سبد غذایی مردم است به طوری که ایرانی‌ها با مصرف ۴۸ کیلوگرم ماست و دوغ در سال، پر مصرف‌ترین اقوام دنیا در مصرف ماست و دوغ هستند (بدری و همکاران، ۱۳۹۵). ماست به وسیله تخمیر لاکتوز شیر توسط دو باکتری آغازگر ماست *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* تولید می‌شود. در بین فرآورده های شیری تخمیری، ماست مهم‌ترین حامل باکتری‌های پروبیوتیک و عامل انتقال آن به مصرف کننده است. تخمیر اسیدی ماست موجب هیدرولیز جزئی پروتئین شیر و تشکیل پپتیدهای فعال زیستی و افزایش میزان ویتامین‌ها می‌شود (Oh et al., 2016). باکتری‌های پروبیوتیک باعث تخمیر لاکتوز و کاهش کلسترول و فشار خون می‌شوند. این باکتری‌ها قادر به تحریک سیستم ایمنی و تقویت پاسخ ایمنی بدن هستند و به گوارش و جذب مواد معدنی و ویتامین‌ها کمک می‌کنند. پروبیوتیک‌ها با مهار کردن باکتری‌های بیماریزا در روده، از عفونت‌های روده و حتی عفونت‌های تک یاخته ای مانند لیشمانیوزیز جلوگیری کرده و همچنین از بروز سرطان روده پیشگیری می‌کنند

(Zomorodi et al., 2010، امن زاده و همکاران.، ۱۳۸۵). گیاه موسیر (Allium Ascalonicum) گونه‌ای از خانواده بزرگ لاله‌سانان است، که گونه‌های مهم و شناخته شده‌ی دیگری از قبیل سیر، پیازها و تره فرنگی را در بر می‌گیرد. این گیاهان در سراسر دنیا کاربردهای غذایی و دارویی دارند و غنی از فلاونول‌ها و ترکیبات ارگانوسولفوری هستند. بررسی شیمیایی موسیر نشان می‌دهد که این گیاه حاوی فلاون‌ها و ترکیبات پلی فنلی مانند کورستین‌ها است که خاصیت ضداکسیدانی دارند. ترکیبات ارگانوسولفور موسیر عبارتند از: دی آلیل سولفید DADS و دی آلیل سولفید DAS، دی آلیل تری سولفید و دی آلیل تتراسولفید که خاصیت ضد میکروبی دارند (فرجی و همکاران، ۱۳۹۵). امروزه ماست‌های طعم دار بطور گسترده تولید و مورد استقبال مصرف کنندگان قرار گرفته است. یکی از انواع ماست طعم دار که در ایران از گذشته تولید و به فراوانی مصرف می‌شود، ماست موسیر است. با توجه به اینکه طبق استاندارد ملی ایران تا موقع مصرف باید باکتری‌های آغازگر در ماست زنده و فعال بوده و مصرف کنندگان از یک فرآورده پروبیوتیک بهره مند شوند، مطالعه حاضر طراحی تا اثر عصاره های آبی و اتانولی گیاه موسیر بر روی باکتری-های آغازگر در ماست موسیر مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

تهیه عصاره های آبی و اتانولی گیاه موسیر

گیاه موسیر تازه را از شهر همدان خریداری کرده و پس از خشک کردن در سایه توسط آسیاب برقی پودر گردید. سپس به نسبت چهار گرم به ۱۰۰ با الکل اتیلیک ۹۶ درصد برای تهیه عصاره اتانولی و آب مقطر یکبار تقطیر برای تهیه عصاره آبی مخلوط شد و به مدت ۴۸ ساعت به وسیله دستگاه شیکر (۸۰۰۰ دور در ساعت) پودر موسیر و حلال-ها (الکل اتیلیک ۹۶درصد و آب مقطر) مخلوط شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت مخلوط‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ به صورت جداگانه صاف شدند و با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تا زمانی که حلال هر یک جدا شود. سپس عصاره‌ی تغلیظ شده در ظرف پیرکس ریخته شد و در آون ۵۰ درجه سلیسیوس قرار داده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت با استفاده از تیغ تیز تراشیده و پودر به دست آمده در این مرحله را به نسبت ۲۵ درصد با آب مقطر مخلوط کرده و سانتریفوژ شد و سپس با استفاده از فیلتر سر سرنگ ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون استریل و در ظرف استریل کدر در دمای ۴ درجه سلیسیوس برای انجام آزمایشات بعدی نگهداری شد (سرشتی و همکاران، ۱۳۹۰).

تهیه باکتری‌های آغازگر

از استارتر تهیه شده از شرکت Maysa برای تولید ماست استفاده شد. آغازگر به محیط Tryptic Soy Broth (TSB) (مرک، آلمان) انتقال داده و بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس روی محیط Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (مرک، آلمان) کشت داده شدند. بعد از رشد کلنی‌ها بر اساس اندازه کلنی‌ها رنگ آمیزی شدند. کلنی‌های درشت متعلق به باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، و کلنی‌های کوچک‌تر متعلق به باکتری‌های *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* بودند. برای اطمینان از تشخیص باکتری‌ها، آزمایش رنگ آمیزی گرم انجام شد. سپس در محیط MRS به طور جداگانه کشت داده شدند و پلیت‌ها بعد از ۴۸ ساعت برای انجام آزمایش MIC در یخچال نگهداری شدند (حیدری و همکاران، ۱۳۹۵).

تعیین کمترین غلظت ممانعت از رشد (MIC) و تعیین کمترین غلظت کشندگی (MBC)

از میکروارگانیسم‌های جداشده در مرحله قبل یک کلنی در محیط TSB کشت داده شد و در گرمخانه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس نگهداری شد. غلظت-های مختلف از عصاره‌ها به لوله‌های درپیچ‌دار حاوی محیط کشت TSB اضافه گردید و پس از آن میکروارگانیسم‌های مورد نظر (در هر میلی‌لیتر 10^6 cfu/ml باکتری وجود دارد) به میکروپلیت ۹۶ خانه انتقال داده شدند. در هر چاهک ۱۰ میکرولیتر باکتری اضافه شد و ترکیب عصاره‌ها (بصورت جداگانه در دو میکروپلیت) و محیط کشت TSB به میزان

۱۰۰ میکرولیتر در غلظت‌های متفاوت به هر چاهک انتقال داده شد. در هر میکروپلیت سه چاهک به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. یکی از شاهدها محیط کشت بدون عصاره و باکتری و چاهک بعدی محیط کشت و باکتری جهت اطمینان از فعالیت میکروارگانیسم و چاهک دیگر حاوی محیط کشت و عصاره جهت اطمینان از استریل بودن عصاره قرار داده شد. میکروپلیت‌های دو میکروارگانیسم در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه-گذاری شدند. سپس از سمت چاهک شاهد رشد باکتری در محیط بررسی گردید. اولین چاهک حاوی غلظت عصاره که رشد باکتری مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) در نظر گرفته شد. برای تعیین کمترین غلظت کشندگی (MBC) از چاهک MIC و بعد از آن در محیط کشت TSA کشت داده شد. پلیت‌ها را در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه-گذاری و رشد کلنی‌ها بررسی شد. اولین غلظت پلیتی که رشد باکتری در آن مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت کشندگی عصاره (MBC) در نظر گرفته شد (Ebrahimi et al., 2019). ابتدا شیر خام از گاوداری دانشگاه شهرکرد که به آنتی بیوتیک آلوده نبود، خریداری شد. سپس شیر خام را در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه و تا دمای ۴۵ درجه سلیسیوس سرد شد.

آماده سازی و انجام آزمون‌ها در محیط ماست

بر اساس استاندارد شرکت سازنده استارتر، ۰/۰۳ گرم از باکتری‌های آغازگر به ۵۰۰ میلی‌لیتر شیر پاستوریزه شده اضافه گردید و به مدت دو ساعت در دمای ۴۲ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شد تا باکتری‌های آغازگر فعال شوند. دو لیتر شیر خام در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شد و تا ۴۵ درجه سلیسیوس خنک شد و در سه بشر ۸۰۰ میلی لیتر به صورت جداگانه ریخته و سه درصد مایه ماست تهیه شده در مرحله قبل اضافه و به مدت چهار ساعت در دمای ۴۲ درجه سلیسیوس گرمخانه‌گذاری شد تا لخته ماست تشکیل شود و به pH مناسب (۴/۵) برسد (حشمتی و همکاران، ۱۳۹۵). بعد از تعیین کمترین غلظت ممانعت از رشد و کمترین غلظت کشندگی (MIC و MBC) عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه موسیر در محیط کشت، به ماست تولید شده عصاره آبی و اتانولی موسیر در یک رقت کمتر از غلظت ممانعت از رشد (MIC) تلقیح شد. در ۱۲ بشر استریل شده، مقدار مشخصی ماست و عصاره مربوط به هر تیمار ریخته شد. بدین صورت که تلقیح ماست و عصاره در چهار بشر ۱۵۰ میلی‌لیتری برای انجام آزمایشات در چهار روز (یک، سه، هفت و ۱۴) ریخته شد. این روش برای تیمار شاهد و تیمار حاوی ماست و عصاره آبی و تیمار حاوی ماست و عصاره اتانولی به صورت جداگانه انجام شد. آزمون‌های میکروبی و شیمیایی در زمان‌های یک، سوم، هفتم، چهاردهم بررسی شد. آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. تیمارهای حاوی ماست و عصاره آبی یا اتانولی به خوبی همزده تا عصاره با ماست مخلوط شود.

ظروف حاوی ماست را در دمای شش درجه سلیسیوس نگه داری کرده و در روزهای یک، سه، هفت و چهارده از ماست برداشته شده و آزمون‌های میکروبی و شیمیایی انجام شد. آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد.

جدول ۱- میزان عصاره موسیر (الکلی و آبی) و میزان استرپتوکوکوس‌ترموفیلوس و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در گروه‌های مورد آزمون.

تیمار	میزان عصاره و باکتریهای آغازگر تلقیح شده
تیمار شماره ۱ (شاهد)	۵۰۰ میلی‌لیتر شیر پاستوریزه + ۳ درصد استارتر
تیمار شماره ۲	۵۰۰ میلی‌لیتر شیر پاستوریزه + ۳ درصد استارتر + ۱۲۴میکرولیتر عصاره آبی (۰/۰۳درصد)
تیمار شماره ۳	۵۰۰ میلی‌لیتر شیر پاستوریزه + ۳درصد استارتر + ۶۰ میکرولیتر عصاره اتانولی (۰/۰۱۵درصد)

شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک

در روزهای یک، سه، هفت و چهارده از هر کدام از تیمارها، با استفاده از سرنگ یک میلی‌لیتر از ماست برداشته و در لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته و به همین ترتیب تا رقت 10^{-5} رقت‌های متوالی ده تایی انجام شد. سپس از هر رقت یک میلی‌لیتر در هر پلیت ریخته و محیط کشت MRS که طبق روش تهیه روی بسته بندی محیط کشت آماده شد، خنک شده و درون پلیت‌ها ریخته و به صورت 8 همزده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه شد و سپس کلنی‌های رشد کرده شمارش شدند. با توجه به واحدهای تشکیل دهنده کلنی (Cfu) و رقت مورد استفاده، تعداد میکروارگانیسم در واحد حجم (ml) محاسبه شد (غفاری و همکاران، ۱۳۹۶).

اندازه‌گیری اسیدیته

برای انجام آزمون اسیدیته ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر ماست و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در بشر تمیز ریخته و به آن دو تا سه قطره معرف فنل فتالئین اضافه شد و با سود ۰/۱ نرمال تا ظهور و ثبیت رنگ صورتی ملایم تیتر گردید. مقدار سود مصرفی را در ۰/۹ ضرب کرده تا مقدار اسدیته بر حسب گرم در لیتر ماست بدست آید (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۶).

اندازه گیری pH

برای این منظور ۱۰ میلی‌لیتر از ماست در بشر تمیز و خشک ریخته و توسط دستگاه pH متر الکتریکی مقدار pH اندازه گیری شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۶).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده از آزمون های شیمیایی و میکروبی با استفاده از نرم افزار آماری Sigma stat 4 توسط آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p < ۰/۰۵$) انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) دو عصاره آبی و اتانولی گیاه موسیر بر دو میکروارگانیسم *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* نشان داد که هر دو باکتری آغازگر ماست به یک میزان نسبت به عصاره آبی و عصاره اتانولی موسیر حساسیت دارند. حداقل غلظت ممانعت از رشد عصاره آبی برای باکتری‌های آغازگر ماست ۱۲۴ mg/ml و حداقل غلظت ممانعت از رشد عصاره اتانولی برای باکتری‌های آغازگر ماست ۶۰mg/ml و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی برای باکتری‌های استارتر ماست ۱۴۰mg/ml و حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی در باکتری‌های آغازگر ماست ۸۰mg/ml

باکتری‌های آغازگر شد. ($p<0/05$)، (جدول ۲). همچنین عصاره اتانولی موسیر باعث کاهش رشد باکتری های آغازگر ماست در روزهای یک تا ۱۴ شد که نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار می‌باشد. ($p<0/05$)، (جدول ۲).

جدول ۲- تاثیر عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه موسیر در یک رقت کمتر از MIC بر رشد باکتری‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس، (log cfu/ml)

زمان (روز)	کنترل	عصاره آبی	عصاره اتانولی
۱	۴/۵۳۳±۰/۰۴ ^{a}	۲/۹۷۷±۰/۰۲ ^{b}	۳/۱۹۳±۰/۰۸ ^{c}
۳	۶/۷۴±۰/۰۴ ^{a}	۶/۱۵۷±۰/۰۶ ^{b}	۶/۳۱۳±۰/۰۳ ^{c}
۷	۶/۱۸±۰/۰۵ ^{a}	۵/۳۸۷±۰/۰۹ ^{b}	۵/۷۲۷±۰/۰۴ ^{c}
۱۴	۶/۱۳۳±۰/۰۳ ^{a}	۴/۶۱۳±۰/۰۷ ^{b}	۵/۲۲۰±۰/۰۷ ^{c}

حروف کوچک غیر مشابه در هر سطر نشانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد (p <0/05).

همانگونه که در جدول ۳ مشخص است pH گروه کنترل در روزهای یک، سه، هفت و ۱۴ کمتر از دو گروه تیمار است . نتایج آزمون آماری نشان داد که بین گروه عصاره آبی و گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد (p <0/05). ولی اختلاف معنی‌داری در میزان تغییرات pH گروه کنترل و گروه عصاره اتانولی موسیر تا روز هفت مشاهده نشد. (p >0/05) ولی در روز ۱۴ این اختلاف معنی‌دار بود (p <0/05). همچنین نتایج نشان داد بین pH گروه عصاره آبی موسیر و گروه اتانولی موسیر اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. (p >0/05)، (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه موسیر در یک رقت کمتر از MIC **بر** pH ماست.

زمان (روز)	کنترل	عصاره آبی	عصاره اتانولی
۱	۴/۵۵±۰/۰۲ ^{a}	۴/۵۶±۰/۰۱ ^{b}	۴/۵۳±۰/۰۳ ^{ab}
۳	۴/۵۳±۰/۰۱ ^{a}	۴/۵۳±۰/۰۲ ^{b}	۴/۵±۰/۰۱ ^{ab}
۷	۴/۳۹±۰/۰۱ ^{a}	۴/۵۱±۰/۰۱ ^{b}	۴/۴۱±۰/۰۲ ^{ab}
۱۴	۴/۲±۰/۰۱ ^{a}	۴/۴۷±۰/۰۳ ^{b}	۴/۳۹±۰/۰۲ ^{b}

حروف کوچک غیر مشابه در هر سطر نشانگر وجود اختلاف آماری معنی دار است (p <0/05).

نتایج جدول۴ بیانگر اثر عصاره‌های اتانولی و آبی موسیر بر تغییرات اسیدیته ماست در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ می‌باشد. در گروه کنترل، اسیدیته از روز ۱ تا ۱۴ افزایش داشته است که نسبت به گروه‌های تیمار عصاره دارای اختلاف معنی دار است (p <0/05). مقدار اسیدیته بین گروه تیمار عصاره آبی و گروه تیمار عصاره اتانولی تا روز ۷ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (p>0/05) ولی در روز ۱۴ اختلاف معنی‌دار بود (p <0/05) . (جدول ۴)

جدول۴- تاثیر عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه موسیر در یک رقت کمتر از MIC بر اسیدیته ماست (g/l)

زمان (روز)	کنترل	عصاره آبی	عصاره اتانولی
۱	۷/۶۹±۰/۰۱ ^{a}	۷/۳۸±۰/۰۲ ^{b}	۷/۴۱±۰/۰۱ ^{ab}
۳	۸/۲۵±۰/۰۱ ^{a}	۷/۸۶±۰/۰۱ ^{b}	۸±۰/۰۲ ^{ab}
۷	۸/۴۴±۰/۰۲ ^{a}	۸/۱۰±۰/۰۱ ^{b}	۸/۳۲±۰/۰۱ ^{ab}
۱۴	۹/۷۹±۰/۰۱ ^{a}	۸/۲۵±۰/۰۲ ^{b}	۸/۵۳±۰/۰۲ ^{b}

حروف کوچک غیر مشابه در هر سطر نشانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد (p <0/05).

بحث

در این مطالعه تاثیر عصاره آبی و اتانولی گیاه موسیر بر باکتری‌های آغازگر ماست (*لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*) بر مبنای ارزیابی سه شاخص pH، اسیدیته و شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک، مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده روند تغییرات pH نمونه‌های تحت آزمون از روز اول تا چهاردهم روند کاهشی داشته ولی این روند در گروه حاوی عصاره آبی و اتانولی موسیر نسبت به گروه کنترل کندتر بود. به عبارت دیگر روند اسیدی شدن در ماست حاوی عصاره آبی کندتر بود، که نشان از تاثیر عصاره‌های مذکور بر سرعت و روند رشد باکتری‌های آغازگر در این فراورده دارد. از طرفی این اتفاق می تواند روند کهنه شدن ماست موسیر را کند کرده و ماندگاری این فراورده را افزایش دهد. تغییرات اسیدیته نیز نشان داد که میزان تولید اسید لاکتیک در ماست حاوی عصاره‌های گیاه موسیر کمتر از گروه کنترل است.

میکایلت و همکاران به بررسی اثر عصاره‌های گیاهی در افزایش زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در ماست پروبیوتیک پرداختند و به نتایجی مشابه با مطالعه حاضر رسیدند. نتایج نشان داد که در طول دوره نگهداری تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در ماست حاوی عصاره‌های گیاهی به طور قابل توجهی در ۲۹ روز نگهداری کاهش پیدا کرد (Michaelet et al., 2010).

گلوزاک و همکاران در مطالعه‌ای با هدف بررسی پایداری و زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در ماست غنی شده با عسل به نتیجه ای متفاوت رسیدند. افزودن کنسانتره پروتئین آب پنیر و عسل عمل تخمیر را تسریع کرده و رشد باکتری‌های اسید لاکتیک را در مدت ۲۱ روز ذخیره سازی بهبود بخشید، اما مقدار عسل تأثیر قابل توجهی بر روی زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک نداشت. علاوه بر آن، افزودن عسل به همراه کنسانتره آب پنیر تولید بیش از حد لاکتیک اسید را تأیید ننمود، که به طور مشخص پایداری ماست را در طی مدت ۲۱ روز ذخیره سازی تحت تأثیر قرار داد (Glusac et al., 2015). در مطالعه دیگر امکان تولید ماست سین‌بیوتیک حاوی عصاره نعناع مورد بررسی قرار گرفت و به نتایج مشابهی که نشان می‌دهد عصاره الکلی نعناع، اینولین، و باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به طور موثری باعث بهبود خواص ماست سین‌بیوتیک می‌شود (Sarmad., 2020).

پرمالاتا و همکاران در سال ۲۰۱۷ به تاثیر چای سبز، سفید و سیاه بر باکتری‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در ماست در طول نگهداری در یخچال پرداختند. آن‌ها در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که هر سه نوع ماست چای مانند عصاره موسیر که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت، سطح بالایی از *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* را حفظ کردند و این امر می‌تواند فوائد سلامتی بخش را

برای مصرف روزانه به مصرف کنندگان تضمین کند (Premalatha et al., 2017).

موریتز و همکاران در سال ۲۰۱۲ به تاثیر انواع روغن‌های فرار بر *L.rhamnosus* بر آغازگرهای محصولات تخمیری شیر پرداختند و به این نتیجه متفاوتی رسیدند که اگر چه استفاده از اسانس دارچین در ماست، تخمیر کشت آغازگر را غیر ممکن می‌سازد اما موجب مرگ *L.rhamnosus* نمی‌شود (Moritz et al., 2012)، در صورتی که در مطالعه حاضر نه تنها عصاره های موسیر از روند تخمیر در ماست ممانعت نکردند بلکه تا روز ۱۴ باکتری‌های آغازگر در این فراورده زنده و فعال بودند. نتایج مطالعه اسمیت و همکاران (۲۰۱۴) نیز با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد، بطوریکه نتایج مطالعه آنها نشان داد که ادویه‌های هل، دارچین و جوزهندی بر روی جمعیت باکتری‌های آغازگر در طول ۴ هفته نگهداری ماست در یخچال تاثیری نداشت (Smith et al., 2014). همچنین غفاری و همکاران در سال ۱۳۹۶ به مطالعه اثر عصاره آبی- الکلی میوه عناب بر کیفیت ماست پروبیوتیک و قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در آن پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان از غلظت ۰/۶ گرم در لیتر عصاره عناب به همراه باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در روند تولید ماست پروبیوتیک به عنوان یک فرآورده فراسودمند جدید استفاده نمود (غفاری و همکاران.، ۱۳۹۷).

اثر پری‌بیوتیکی سبوس جو و برنج بر روی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست کم چرب توسط حشمتی و همکاران (۱۳۹۵) مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که سبوس جو و سبوس برنج اثر پری‌بیوتیکی بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست کم‌چرب دارند و می‌توان با افزودن آن به ماست کم‌چرب حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، محصولی فرا سودمند به جامعه ارائه داد و از کاهش تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست کم‌چرب در طول دوره نگهداری جلوگیری کرد (حشمتی و همکاران.، ۱۳۹۵).

خصوصیات ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه موسیر روی باکتری‌های عامل مسمومیت‌های غذایی مانند *کلستردیوم بوتولینوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در کشک مایع نیز نشان داد که با افزایش مدت زمان نگهداری کشک، میزان pH کاهش قابل توجهی داشته است که نشانگر تاثیر کم عصاره این گیاه روی باکتری‌های آغازگر در کشک است. همچنین نتایج نشان داد که بر خلاف تاثیر کم عصاره گیاه موسیر بر روی باکتری‌های آغازگر در کشک، عصاره این گیاه می‌تواند موجب کاهش جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلستردیوم بوتولینوم* شده و از بروز مسمومیت غذایی در مصرف کنند پیشگیری کند (فرجی و همکاران، ۱۳۹۶).

با توجه به اینکه طبق استاندارد ملی ایران تا موقع مصرف باید باکتری‌های آغازگر در ماست زنده و فعال باشند تا مصرف کنندگان از یک فرآورده پروبیوتیک بهره مند شوند (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۲)، نتایج این مطالعه نیز نشان داد که باکتری‌های آغازگر ماست علی رغم اینکه در گروه-های تیمار عصاره موسیر نسبت به گروه کنترل، رشد کمتری داشتند ولی تا روز ۱۴ نگهداری همچنان زنده و فعال بودند. نتایج سایر مطالعات نیز نشانگر این است که هر چند عصاره گیاهان خواص ضد میکروبی دارند ولی موجب کاهش شدید باکتری‌های مولد اسید لاکتیک در ماست نمی‌شوند (بدری و همکاران.، ۱۳۹۵، مرحمتی زاده و همکاران.، ۱۳۸۸).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این مطالعه عصاره آبی موسیر اثر مهار کننده رشد بیشتری بر روی باکتری‌های آغازگر ماست (*لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*) نسبت به عصاره اتانولی این گیاه دارد. با این حال هر دو باکتری آغازگر در ماست موسیر تا روز ۱۴ نگهداری در یخچال زنده و فعال بودند که می‌تواند اثرات پروبیوتیکی ماست موسیر را به مصرف کننده انتقال دهند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از کارشناس محترم آزمایشگاه گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد؛ جناب آقای مهندس خسروی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱. امن زاده، یعقوب.، ایزددوست، محمد.، سلطان‌پور، علی.، محامی، محمود. (۱۳۸۵). تاثیر مهارکنندگی عصاره آبی الکلی موسیر بر روی رشد *لیشمانیا اینفانتوم* در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه گیاهان دارویی، شماره۲۰، صفحه ۵۲-۴۸.

۲. بدری، مهدیه.، علیزاده، آیناز. (۱۳۹۵). رشد و زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست همزده کم چرب حاوی بتاگلوکان جو. مجله بهداشت موادغذایی، شماره۳، صفحه ۶۶-۵۵.

۳. حشمتی، علی.، حسنی، صابر.، ساری، عباسعلی. (۱۳۹۵). کرمی مصطفی. بررسی اثر پری‌بیوتیکی سبوس جو و برنج بر روی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست کم چرب. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، شماره۲، صفحه ۱۱۲-۱۰۵.

۴. حیدری، محبوبه.، جهادی، مهشید.، فاضل، محمد.، قاسمی پرو. (۱۳۹۵). بررسی تاثیر افزودن پودر دانه‌ی تاج‌خروس (*Amaranthus cruentus*)، بر ویژگی‌های کیفی ماست چکیده. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، شماره۶۵، صفحه ۲۸۵-۲۷۱.

۵. سرشتی، منیژه.، یوسفی، دارانی.، زبردست، نزهت.، رفیعیان، محمود.، منوچهری نائینی، کوروش.، یوسفی، حسینعلی. (۱۳۹۰). تاثیر عصاره آبی و اتانولی سرشاخه‌های هوایی گیاه چای کوهی بر *تریکوموناس واژینالیس* در محیط کشت. فصلنامه گیاهان دارویی، شماره ۴۱، صفحه ۱۶۸-۱۵۹.

۶. غفاری، سحر.، اژدری، عطاله.، شریف زاده، غلامرضا. (۱۳۹۷). مطالعه اثر عصاره آبی-الکلی میوه عناب بر کیفیت ماست پروبیوتیک و قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در آن. مجله علوم غذایی و تغذیه، شماره ۱، صفحه ۹۸-۸۹.

۷. فرجی، مسعود.، فرهودی، مهدی.، روزیه نصیرایی، لیلا. (۱۳۹۶). خصوصیات ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه موسیر بر باکتری کلستردیوم بوتولینوم و استافیلوکوکوس اورئوس در کشک مایع و ارزیابی خواص حسی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، شماره ۴، صفحه ۸۲-۷۳.

۸. مرحمتی زاده، محمدحسین.، رفعت جو، رضا.، فرخی، علیرضا.، کارمند، محمدرضا.، رضازاده، سارا. (۱۳۸۸). مطالعه تاثیر عصاره سویا بر افزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در شیر و ماست پروبیوتیک. پژوهش های نوین دامپزشکی، شماره ۱، صفحه ۲۸-۲۳.

۹. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۶). انواع ماست طعم‌دار، ویژگی‌ها و روش آزمون. استاندارد شماره ۹۶۱۶، چاپ اول.

۱۰. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۲). انواع ماست طعم‌دار، ویژگی‌ها و روش آزمون استاندارد شماره ۴۰۴۶،چاپ اول .

11. Ebrahimi, A., Babaaie, A., Boniadian, M., and Lotfalian, S. 2019. Antibacterial and Ciprofloxacin-potentiation activities of *Cinnamomum zeylanicum* extracts against some pathogenic bacteria. J Medical Lab. 13: 6-10.

12. Glusac, J., Stijepic, M., Durdevic, D., Milanovic, S., Kanuric, K., and Vukic, V. 2015. Growth and viability of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus and Streptococcus thermophiles* in traditional yogurt enriched by honey and whey protein concentrate. Iranian J of Vet Res. 10: 260-249.

13. Moritz, VL. Mores, R., Margarida, JS. And Ary, F. 2012. Inhibitory effect of essential oils against *lactobacillus rhamnosus* and starter

culture in fermented milk during its shelf-life period. Brazilian J of Microbiol. 3: 242-264.
14. Oh, N.S., Lee, J.Y., Joung, J.Y., Kim, K.S., Shin, Y.K. and Lee, K.W. 2016. Microbiological characterization and functionality of set-type yogurt fermented with potential prebiotic substrates Cudraniatricuspidata and morus alba L. leaf extracts. J Dairy Sci. 99: 1-12.
15. Premalatha, M., Amal, B.S, and Salihin Baba, A. 2017. Comparison of the effect of green, white and black tea on *Streptococcus thermophilus* and Lactobacillus spp. in yogurt during refrigerated storage. J Asso Arab Uni Basic Appl Sci. 4: 26-30.
16. Sarmad, G. 2020. The possibility of producing symbiotic yogurt containing mint extracts. Eurasian J Bio Sci. 14: 2339-2345.
17. Smith, S. C., Illupapalayam, V. V., and Gamlath, S., 2014. Consumer acceptability and antioxidant potential of probiotic yogurt with spices. LWT- Food Sci Technol. 55: 255–262.
18. Zomorodi, SH., Khosroshahi Asl, A., Razavirouhani, M., Tajik, H., and Miraghaii, S. 2010. The effect of *Lactobacillus casei* as a source of additional culturing both free and encapsulated on the pattern of proteolysis and lipolysis in Iranian Feta cheese. Res food technol. 20(3): 117-133.

Effects of Shallots (*Allium stipitatum*) aqueous and ethanolic extracts on the *Streptococcus thermophiles* and *Lactobacillus bulgaricus* in TSB medium and yogurt

Ashrafian S[1], Bonyadian M[2*], Moshtaghi H[2]

1. Graduated in MSc of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

[*]Corresponding author: *boniadian@sku.ac.ir*

Received: 15 April 2021 Accepted: 17 July 2021

Abstract

Yogurt is one of the most popular dairy products is widely consumed around the world, due to its high nutritional value and the presence of beneficial bacteria. This study aimed to investigate the effect of ethanolic and aqueous extracts of shallot on the survival of yogurt starter (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*). Aqueous and ethanolic extracts of shallots were extracted by the soaking method. The MIC and MBC of the extracts were obtained for starter bacteria by the microdilution method. Extracts were added to milk at concentrations obtained in the MIC along with a 3 percent yogurt starter. The inoculated milk was incubated at 45 ° C until pH = 4.5. The yogurts were cooled and stored at 4 °C. On days 1, 3, 7, and 14, pH, acidity, and LAB count tests were performed on yogurt. The results showed that on days 1, 3, 7, and 14, the acidity and pH of the extracts groups were significantly different from the control group (p <0.05). Also, the LAB count on days 1, 3, 7, and 14, in the extract groups was significantly different from the control group (p <0.05). The results also showed that the inhibitory effect of aqueous extract on starter bacteria was more than ethanolic extract of shallot (p <0.05). In conclusion, the results revealed that the starter bacteria in yogurt in presence of Shallot extracts were alive and active until day 14 during refrigeration, which can transmit the probiotic effects of yogurt and shallots to the consumer.

Keywords: Extract, Shallot, Starter, Yogurt.

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 © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.