(مقاله پژوهشی)

بررسی تاثیر استرس اسانس زیره‌ی سبز بر بقا و پایداری باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* درماست پروبیوتیک

نوشین مهاجری[۱]، پیمان مهستی شتربانی[۲*]، افشین آخوندزاده بستی[۳]، ژاله خوشخو[۱]، علی خنجری[۳]

۱-گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲-گروه کنترل کیفی و بهداشتی مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳-گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲

DOI: 10.30495/jfst.2022.1945128.1766

چکیده

یکی ازچالش‌های اصلی در استفاده از پروبیوتیک‌ها زنده و فعال نگه‌داشتن‌آن‌ها در حین‌فرآیند تولید و نگهداری مواد غذایی است. از این رو مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر استرس‌کمتر از حداقل غلظت بازدارندگی بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و برخی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست پروبیوتیک در طی دوره نگهداری دریخچال انجام شد. اسانس گیاه زیره سبز به روش تقطیر با بخار آب استخراج و ترکیب آن با دستگاه گاز کروماتوگرافی طیف سنج جرمی GC/MS تعیین شد. سپس اثر استرس اسانس زیره سبز به میزان۵۰ درصدMIC، به‌عنوان تیمار استرس در مقایسه با شاهد روی جمعیت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*، pH، اسیدیته و درصد آب‌اندازی در ماست‌های پروبیوتیک طی ۲۸ روز نگهداری در یخچال مورد ارزیابی قرارگرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌روش‌آنالیز واریانس Tukey در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ صورت‌گرفت. مطابق نتایج مربوط به ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس، بیشترین ترکیب را پروپانال- ۲متیل-۳- فنیل با ۲۴/۲ درصد تشکیل داده بود. همچنین نتایج مربوط به ماست نشان داد، تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس‌کازئی* وpH در هر دو تیمار طی دوره نگهداری کاهش یافته بود به‌طوری که شدت کاهش pH در تیمار تحت استرس در مقایسه با تیمار شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). اما تغییرات باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در دو تیمار اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند (P >۰/۰۵). مقدار اسیدیته و درصدآب‌اندازی طی دوره نگهداری برای هر دو تیمار افزایش یافته بود و شدت افزایش‌درتیمارتحت‌استرس‌بیشتر از شاهد بود (P <۰/۰۵). در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد اعمال استرس‌های کمتر از حداقل غلظت بازدارندگی باعث زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* به مقدار توصیه شده (10^{6} -10^{7}CFU/ ml) در ماست پروبیوتیک تا پایان دوره نگهداری شده بود.

واژه های کلیدی: استرس، *لاکتوباسیلوس کازئی*، ماست پروبیوتیک، زیره سبز.

*مسئول مکاتبات:Pmahasti@yahoo.com

۱- مقدمه

با ارتقاء دانش‌مصرف‌کنندگان از تاثیر تغذیه بر سلامت انسان انتظار می‌رود غذای مصرفی سالم باشد و حتی قادر به محافظت مصرف‌کنندگان در برابر برخی بیماری‌ها باشد. مواد غذایی فراویژه از خواص سلامت بخش ویژه‌ای فرای خواص‌تغذیه‌ای‌غذاهایی که‌مصرف‌عمومی‌یافته‌اند برخوردار است. فرآورده‌های حاوی باکتری‌های پروبیوتیک به عنوان یکی از نوظهورترین و محبوب‌ترین فرآورده‌های هدفمند از اهمیت خاصی‌دراین ارتباط برخوردارند، وجه تمایز بارز این‌فرآورده‌هاباسایرغذاهای‌هدفمند در این است که ترکیب موثر یا هدفمند در آنها را موجودات زنده تشکیل می‌دهند و اهمیت و محبوبیت این فرآورده‌ها ارزش سرمایه‌گذاری بیشتر پژوهشی در این زمینه را توجیه می‌نماید (۳، ۳۲).

فراورده‌های‌شیری‌پروبیوتیک‌باویژگیهای ارزشمند تغذیه ای ودرمانی از بحث برانگیزترین موضوعات حال حاضر عرصه تغذیه و پزشکی است و برای اینکه روند رو به رشد تولید و مصرف چنین محصولاتی موفقیت‌آمیز باشد لازم است فرآورده پروبیوتیک گونه پروبیوتیک موجود را طی زمان نگهداری در سطح تعریف شده‌ای حفظ نماید. امروزه بیش از ۹۰ فرآورده پروبیوتیک حاوی باکتریهای لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم درسرتاسر دنیا تولید می‌شود (۳، ۵). امروزه ماست پروبیوتیک محبوب ترین و پرمصرف ترین محصول پروبیوتیک در جهان است. بقای باکتری های پروبیوتیک در ماست و محصولات مشابه یک چالش مهم در هنگام نگهداری در محصولات پروبیوتیک است. حداقل غلظت قابل قبول سویه‌های پروبیوتیک برای اثرات مفید و درمانی باید حداقل 10^{7} - 10^{6} CFU/ml در محصول نهایی باشد (۷). *لاکتوباسیلوس کازئی* باکتری گرم مثبت، مزوفیل، هموفرمنتاتیو اجباری، میکروآئروفیل، کاتالاز منفی و فاقد اسپور بوده و ظرفیت بالایی در تولید اسید دارد (۱۵). مشکل اصلی در تولید، حفظ میزان بقای سویه های پروبیوتیک‌درطول‌دوره‌نگهداری‌محصول با توجه به اسیدیته بالا، استرس اکسیداتیو و کمبود مواد مغذی می‌باشد. دلایل اصلی کاهش زنده ماندن سویه های پروبیوتیک در معده، pH پایین و نمک های صفراوی در روده ها می باشد(۱۳). مطالعات‌زیادی‌در مورد زنده ماندن پروبیوتیک‌ها در شرایط اسیدی‌معده، نمک‌های صفراوی روده کوچک (۳۴). میزان بقای پروبیوتیک‌ها درطی‌دوره‌نگهداری‌درسرما مورد مطالعه قرارگرفته است (۲۹). روش‌های مختلف برای‌افزایش‌میزان بقای سویه‌های پروبیوتیک در حین نگهداری محصولات، شامل اعمال تنش‌کمترازحداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و ژن‌های القاکننده مقاومت اعمال شده است (۲۷). برخی از اسانس‌ها باعث بهبود زنده ماندن پروبیوتیک‌ها می‌شوند و برخی‌دیگرنیزممکن‌است‌باعث‌کاهش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها شوند(۱۰).دربسیاری‌ازموارد،زنده‌مانی‌باکتری‌های‌پروبیوتیک کافی‌نیست و لازم است با اعمال روش‌های مختلف، میزان زنده‌مانی‌باکتری‌های‌پروبیوتیک در ماست (به منظور افزایش مقاومت‌سلول‌های‌باکتریایی‌در برابر تنش‌ها) را ارزیابی نمود. ازاین‌رو، استفاده‌ازاسانس‌های‌گیاهی و سویه‌های پروبیوتیک درمحصولات‌لبنی‌یک‌استراتژی‌جدیدبرای‌غلبه بر باکتری‌های بیماری‌زاوتحریک‌پروبیوتیک‌هااست. زیره سبز (*Cuminum cyminum*)درنواحی‌وسیعی‌باآب‌وهوای‌مدیترانه‌ای‌می‌روید و از زمان‌های گذشته به عنوان ادویه و داروی طب سنتی شناخته شده است و غنی از اسانس‌گیاهی است و از دیرباز به طورگسترده‌ای به عنوان چاشنی و طعم‌دهنده در مواد غذایی استفاده شده است بیشترین ترکیبات اسانس دانه زیره سبزشامل‌پروپانال،کومین‌آلدهید، بنزالدهید، مشتقات منتون، گاماترپینن‌وپاراسیمن‌می‌باشندکه‌درمناطق مختلف جغرافیایی درصد آن‌ها متفاوت است (۱۷، ۳۱). هدف از این مطالعه بررسی اثر استرس کمتر از MIC اسانس‌زیره سبز بر روی زنده‌مانی‌پروبیوتیک‌*لاکتوباسیلوس کازئی* و تاثیر پروبیوتیک تحت استرس برخصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی ماست می‌باشد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-مواد اولیه

نمونه‌های بذر زیره سبز از رویشگاه طبیعی استان کرمان تهیه شد وبه‌تاییدگروه‌باغ‌گیاه‌شناسی ایران رسید. بعد از شناسایی، قسمت های زائد آن جدا و بلافاصله پس از شستشو خشک

گردید. سپس در آون تحت خلأ با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه خشک شد. توسط خردکن کاملا پودر شد و تا زمان انجام آزمایش در درجه حرارت ۲۵درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان تهیه شد و دارای درجه تجزیه ای بود.

۲-۲- استخراج و شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس

اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب[1] و با استفاده از دستگاه کلونجربه مدت۳-۴ ساعت برای هر نمونه، اسانس هر نمونه استخراج گردید. عصاره در محدوده بالای سولفات سدیم بدون آب خشک گردیده و درصد اجزای آن بر اساس وزن خشک دانه‌ها محاسبه گردید (۱۷). شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل مطالعه طیف های جرمی‌ومقایسه این طیف ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود درکتابخانه‌رایانه‌دستگاه GC/MS مدل HP-6890 (Hewlett Packard، آمریکا) صورت‌گرفت. تفکیک ترکیبات‌اسانس‌توسط‌روش‌کروماتوگرافی‌گازی مدل HP-6890 (Hewlett Packard، آمریکا)، نوع ستون، HP-5MSبه طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت فاز ساکن ۰/۳۲ میکرون انجام پذیرفت. دمای اولیه ستون ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه نگهداری شد و سپس‌افزایش‌دما تا ۲۵۰ درجه سانتیگراد، به صورت افزایش های ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه برنامه ریزی شد. تزریق و آشکارسازی هر دو در دمای۲۹۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.گاز حامل ستون، گاز هلیوم درصد ۹۹/۹۹۹ با شدت جریان ۱میلی لیتردردقیقه بود. همچنین انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، تجزیه‌گر جرمی‌کوادروپل و دمای تجزیه‌گر جرمی برابر با۱۵۰ درجه‌سانتی‌گراد بود. درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی‌آن در کروماتوگرام GC بدست آمد (۱۷).

۲-۳ آماده سازی با کتری *لاکتوباسیلوس کازئی*

لاکتوباسیلوس کازئی (ATCC 39392) به صورت کشت تازه ازکلکسیون میکروبی انستیتوپاستور تهران تهیه گردید و باروش‌کشت‌خطی و با به کارگیری محیط کشت اختصاصی آن‌کشت‌داده‌شد وپس‌از زمان‌مناسب‌انکوباسیون، باکتری‌ها درفاز رشدازانکوباتوربرداشته‌شده وجهت استفاده‌های بعدی در یخچال نگهداری شد. برای تهیه دوز تلقیح به روش جذب نوری و مطابق استاندارد نیم مک فارلند عمل شد: ابتدا یک لوپ از باکتری نگهداری شده روی محیط کشت تازه به محیط MRS Broth استریل انتقال داده و به مدت ۱۸ ساعت دردمای ۳۷ درجه سلسیوس‌گرمخانه‌گذاری شد. سپس‌از این‌کشت یک کشت مجدد ۱۸ ساعته انجام گردید. دستگاه اسپکتروفوتومتر روی طول موج۶۰۰ نانومتر تنظیم گردید و جذب نوری قبل از اضافه کردن باکتری به کووت حاوی ۴ سی‌سی MRS Broth استریل صفر گردید. حجم مناسبی ازکشت باکتریایی به‌کووتی که قبلا جذب نوری آن را در دستگاه اسپکتروفوتومتر صفرکرده بودیم انتقال داده شد و بعد از ورتکس سوسپانسیون، جذب نوری قرائت شد. با اضافه‌کردن‌سوسپانسیون‌باکتریایی با محیط MRS Broth استریل به‌کووت، جذب نوری سوسپانسیون باکتریایی روی عدد ۰/۱ تنظیم شد. در پایان زمانی که به استاندارد مورد نظررسیدیم، با انتقال ۶۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت به لوله حاوی ۶ میلی لیتر MRS Broth رقت 10^6 CFU/ml تهیه گردید (۲).

۲-٤- تعیین حداقل بازدارندگی(MIC) اسانس زیره سبز

درمطالعه حاضرجهت تعیین‌حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن از پلیت ۹۶ خانه با چاهک ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر استفاده گردید. غلظت های متوالی اسانس زیره سبز شامل: (صفر کنترل) ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ ، ۵۰۰۰، ۷۵۰۰ و ۱۰۰۰۰ ppm). در محیط MRS Broth حاوی ۵ درصد DMSO تهیه گردید و جهت انتقال به پلیت۹۶ خانه به پلیت های معمولی منتقل گردیدسپس توسط مولتی چنل به هر چاهک ۲۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اسانس زیره سبز انتقال داده شد و ۲۰

1- Hydrodistilation

میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری لاکتوباسیلوس کازیی نیز اضافه شد، محتویات هر چاهک به مدت ۲ دقیقه با دستگاه شیکرمخلوط گردید. اطراف میکروپلیت ها توسط پارافیلم بسته شدسپس به‌مدت۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در جار بی‌هوازی همراه با گاز پک نوع A گرمخانه گذاری شدند و بعدازاتمام گرمخانه‌گذاری،کدورت‌یا عدم کدورت درچاهک‌ها به صورت چشمی مشاهده شد. حداقل غلظت بازدارنده برابر است با کمترین غلظتی که در چاهک مربوط به آن هیچ کدورتی مشاهده نگردد (۲).

۲-۵-آماده‌سازی و واردکردن تنش به‌باکتری قبل از افزودن به نمونه های ماست

به میزان ۵۰ در صد MIC (بر اساس نتایج میزان MIC برای اسانس ۱٪ بوده است) به‌باکتری‌استرس‌وارد شد. بدین منظور ۱ میلی لیتراسانس در ۱۰۰سی سی محیط کشت مولر هینتون حاوی ۵درصدDMSO (طبق استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد)، اضافه گردید. تیمارها بعد از آماده شدن ۲ساعت در دمای محیط نگهداری شد، سپس داخل فالکون ریخته و توسط‌سانتریفوژ قسمت‌رویی‌جداشده‌درنهایت‌ازترکیب های جدا شده 10^8 CFU/ml به نمونه های ماست اضافه شد.

۲-۶- تولید ماست پروبیوتیک

در این مطالعه از شیر پس‌چرخ[1] موجود درکارخانه پگاه استفاده شد و جهت تنظیم ماده‌خشک، ابتدا ماده خشک شیر اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ۱۰سی سی شیر، وزن گردید و داخل بوته چینی ریخته شد و به مدت ۳ ساعت داخل آون با ۱۰۲ درجه سلسیوس دما قرار داده شد، سپس با توجه به اینکه ماده خشک ماست حدود ۱۲ تا ۱۵ درصد می‌باشد، توسط‌شیرخشک‌مقدارآن به‌حدود ۱۲ تا ۱۵ درصد رسانده شد. در ادامه شیر در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه پاستوریزه گردید. پس از آن شیرتا دمای ۴۰ درجه سلسیوس‌سرد شد و استارتر ماست تلقیح شد و تا رسیدن pH به۴/۶ انکوباسیون گردید. بعد از طی مدت زمان انکوباسیون، ماست تا دمای ۴ درجه ی سلسیوس سرد شد. بعد ازآماده سازی ماست باکتری‌های پروبیوتیک شاهد و تحت استرس‌با (تراکم10^8 CFU/ml) به نمونه‌های ماست افزوده شد. نمونه های تولیدی به مدت ۲۸ روز در یخچال نگهداری گردید و طبق طرح آزمایشی در زمان های ۰ ، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز مورد آزمایش قرار گرفتند.

۲-۶-۱- شمارش باکتری *لاکتو باسیلوس کازئی*

شمارش باکتری‌های پروبیوتیک (لاکتو باسیلوس کازئی) بر اساس روش استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۳۲۵ (۱۹۹۲) انجام شد (۱۹).از محیط کشت MRS-Bile Agar استفاده گردید. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت با روش پور پلیت۲ انجام شد.

۲-۶-۲- تعیین pH

pH نمونه‌ها با استفاده از روش استاندارد ایران به شماره ۲۸۵۲ اندازه‌گیری‌شد. بعد از همگن‌کردن نمونه‌های ماست مقدار۱۰گرم از نمونه‌ها را در داخل بشر ریخته و توسط pH مترکه قبلاً با بافر۴ و۷ کالیبره شده بود، pH نمونه‌ها اندازه گیری شد (۱).

۲-۶-۳- اندازه‌گیری اسیدیته

مقدار۹گرم نمونه ماست به درون یک ارلن ۱۰۰ میلی لیتری ریخته‌شد، هم‌وزن با وزن‌نمونه‌آب فاقد CO_2 اضافه گردید، ۰/۵ میلی‌لیترفنل فتالیین افزوده شد و سپس با سود ۰/۱ نرمال تیتراسیون تا حصول رنگ صورتی‌که به مدت ۱۵ ثانیه ثابت بماند تیترگردید (۱).

رابطه(۱)

$$\text{درصد اسیدیته} = \frac{N \times 0/009 \times 100}{V}$$

N= میلی‌لیتر حجم سود مصرفی

V= حجم نمونه (۱۰ میلی‌لیتر)

1-Skim Milk

2 -Pour Palet

۲-٦-٤- آب‌اندازی (سینرزیس)

اساس این روش اندازه گیری میزان آب‌اندازی[1] وظرفیت نگهداری آب[2] درنمونه‌هامی‌باشد.دراین روش حدود ۳۰گرم ازنمونه‌های ماست درلوله‌های سانتریفوژ توزین شدندودردستگاه سانتریفوژ به مدت ۱۰دقیقه‌دردمای۴ درجه‌سلسیوس و با سرعت g ۲۲۲ سانتریفوژ گردیدند. سپس مایع‌رویی جدا و توزین شد. از نسبت‌وزن‌آن به وزن ماست اولیه درصد آب‌اندازی گزارش شد (۲۲).

۲-٦-٥- ارزیابی‌حسی

ارزیابی حسی نمونه‌های ماست تولیدی توسط ۱۰ پنلیست آموزش‌دیده، انجام شد. ارزیابی‌حسی بر پایه ۵ امتیاز بود (۱ بدترین‌و۵ بهترین). نمونه‌ها به طور تصادفی از یخچال خارج و مدت‌یک ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شدند تا هم‌دمای محیط گردند. سپس به مقدار ۵ گرم از هر نمونه توزین شد و داخل ظروف پلاستیکی‌سفید قرارگرفتند وکدگذاری شدند از ارزیاب‌ها خواسته شد تا نمونه‌ها را از نظرعطر، طعم، بافت، قوام و پذیرش‌کلی مورد ارزیابی قرار دهند. آن‌ها برای شست و شوی دهان خود بین نمونه‌ها از آب استفاده کردند. فرم‌های‌تکمیل‌شده شامل ارزیابی کلی مصرف‌کننده به صورت یک ارزش‌عددی درآورده شد و نتیجه تجزیه واریانس گردید.

۲-۷- ارزیابی‌آماری

به این منظورتجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها از طریق آزمون Tukey درسطح معناداری ۰/۰۵درصد ، با استفاده از نرم‌افزارSPSSانجام‌شده‌ونمودارهای‌مربوطه توسط Excell رسم گردید.متغیرهای‌مستقل‌دراین پژوهش شامل درصدهای مختلف‌ازاسانس‌زیره‌سبز، زمان نگهداری و متغیرهای وابسته شامل حداقل غلظت بازدارندگی، PH، اسیدیته، سینرزیس، رشد باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج آزمون GC/MS اسانس زیره سبز

اجزای مختلف اسانس زیره سبز توسط دستگاه رنک نگار گازی متصل به طیف‌سنج جرمی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بر این اساس ۱۵ ترکیب شناسایی شد که جمعاً ۱۰۰ درصدترکیبات‌اسانس‌راتشکیل‌می‌داند. بیشترین جزء اسانس را پروپانال- ۲متیل-۳- فنیل با ۲۴/۲ درصد تشکیل داده بود. پس‌ازآن گاما ترپینن، فنیل اتانیدول و ۲- بتا-ترپینن به‌ترتیب با ۱۸/۹۴، ۱۸/۸۹و۱۲/۵۹درصد بیشترین مقدار را بین اجزای اسانس‌دارا بودند(جدول۱).Haghiroalsadat و همکاران (۲۰۱۱) نیز بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس زیره سبز بومی استان یزد را پروپانول ۲۶/۱۹٪، بنز متانول ۲۵/۴٪، فنیل بتانول ۱۶/۴۹٪ وگاما ترپنین ۱۳/۰۴٪ اعلام نمودند(۱۷). نتایج حاصل از بررسی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس بذر زیره سبز استان‌کرمان تقریباً با اسانس زیره سبز یزد در مطالعه آن‌ها هم‌خوانی داشت، به طور کلی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های گیاهی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش، زمان برداشت گیاه، شرایط محیطی و فصلی، روش خشک کردن و استخراج اسانس، عصاره‌گیری از اندام‌های مختلف و درنهایت تفاوت ژنتیکی گیاه می تواند تغییر کند (۹).

1-*Synersis*
2-Water Holding Capacity (WHC)

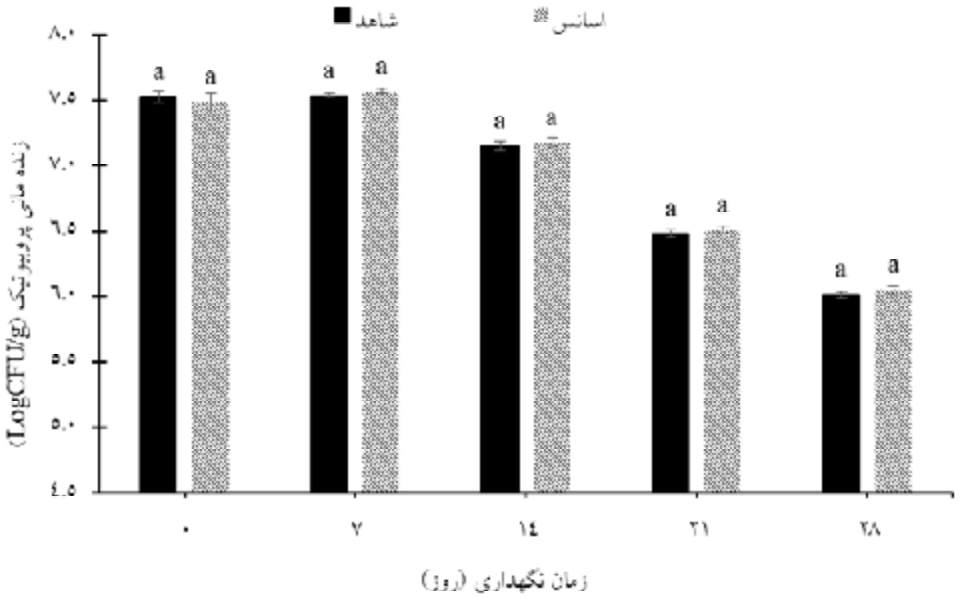
جدول۱- مقادیر ترکیبات تشکیل دهنده اسانس زیره سبز

شماره	ترکیبات	درصد
۱	ALPHA.-PINENE	۱/۱۲
۲	Sabinene	۰/۷٤
۳	2-.BETA.-PINENE	۱۲/۵۹
٤	.beta.-Myrcene	۰/۹۳
۵	l-Phellandrene	۱/۱۰
٦	Cymene	٦/۹۱
۷	Limonene	۱/۷۳
۸	.gamma.-Terpinene	۱۸/۹٤
۹	(E)-4-(CYCLOHEX-1'-ENYL)BUT-2-EN-1-OL	۱/۸۸
۱۰	Propanal, 2-methyl-3-phenyl-	۲٤/۲۲
۱۱	2-Caren-10-al	۸/۸۰
۱۲	Phenylethanediol	۱۸/۸۹
۱۳	gamma.-Cadinene	۰/۵۷
۱٤	trans-.beta.-Farnesene	۰/۷۲
۱۵	Carotol	۰/۸٦

۳-۲-زنده‌مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی درماست پروبیوتیک طی زمان نگهداری

میزان حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس‌ها بر علیه پروبیوتیک‌ها بالاست، درحالی که در غلظت‌های پایین‌تر از MIC، دارای اثر ممانعت‌کنندگی روی پاتوژن‌ها می‌باشند. بنابراین استفاده از اسانس‌ها در دوز پایین‌تر از MIC، پاتوژن‌ها را بدون آسیب به‌پروبیوتیک‌ها ازبین‌می‌برد (۲۸). یکی از مهمترین چالش‌ها دررابطه‌بااستفاده‌ازپروبیوتیک‌در فرآورده‌های لبنی تخمیری، میزان زنده‌مانی آن‌ها در حین تولید و نگهداری ماده غذایی وهمچنین‌عبورازدستگاه گوارش‌می‌باشد.زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک درماست و سایر محصولات مشابه در طول دوره ذخیره‌سازی تا مصرف یک عامل مهمی در زمینه تولیدات پروبیوتیکی است. طبق مطالعات متعددی که در این رابطه صورت‌گرفته است برای دستیابی به اثرات درمانی و مفید، تعدادپروبیوتیک‌های‌موجوددریک‌محصول در زمان مصرف حداقل باید 10^{6} -10^{7}CFU/ ml در محصول نهایی باشد (۷، ۱۶) از این‌رو هر دو تیمار تا پایان روز ۲۸ نگهداری (نمودار ۱) دارای حداقل مقدار تعریف شده بودند. طی ۷ روز اول نگهداری، جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی در هر دوتیمارافزایش‌یافته‌بود($p<۰/۰۵$).افزایش جمعیت‌باکتری‌های لاکتوباسیلوس‌درماست‌پروبیوتیک طی ۷ روز اول نگهداری ممکن‌است مرتبط با دسترسی‌بیشترموادمغذی باشد که سبب تحریک و بهبودرشد باکتری‌های‌لاکتوباسیلوس‌کازئی شده بود (۲۸). قابلیت‌زیستی‌و بقا پروبیوتیک ها در فرآورده های غذایی‌در درجه اول اهمیت قرار دارد. در فرآورده‌های لبنی تخمیری، فاکتورهایی‌نظیر گونه‌مورد استفاده، شرایط کشت، اسیدیته نهایی، مواد جامد شیر، مواد مغذی موجود، اکسیژن محلول (به ویژه برای بیفیدوباکتریوم)، سطح تلقیح و درجه حرارت آن و زمان تخمیر از مهم ترین عوامل موثر بر بقا پروبیوتیک ها می باشند(۲۵) . اسانس‌های گیاهی قادرند به غشا سیتوپلاسمیک باکتری آسیب بزنند و سلول را در تنظیم

فشاراسمزی دچار مشکل کنند، لذا این موضوع حیاتی است که باکتری بتواند یکپارچگی و عملکرد غشا سلولی خود را حفظ کند. در شرایط استرس فسفولیپید های غشا قادرند که ساختار زنجیره شان را با تغییر نسبت اشباع به غیر اشباع، شاخه دار به بدون شاخه، نوع شاخه های اسید چرب و طول زنجیره آسیل تغییر دهند. بیشتر تحقیقات صورت گرفته در رابطه با نحوه پاسخ سلول به استرس اسانس نیز تمرکزبرتغییرات‌لیپیدی‌غشادارندکه‌می‌تواند ناشی از شناخت اسانس‌هابه‌عنوان‌عوامل‌فعال‌غشایی‌باشد.تغییردر فسفولیپیدها، پروفایل‌پروتیینی‌سلول‌ها،سیستم افلاکس و یا بیان مولکول‌ها ژن‌های‌مربوط به‌استرس نیز مکانیسم‌هایی هستندکه‌درمورد پاسخ‌به‌استرس‌اسانس‌های‌گیاهی‌موردتوجه‌بوده‌اند و می‌تواند بر عملکردفیزیولوژیک میکروارگانیسم تاثیر بگذارند (۱۲).



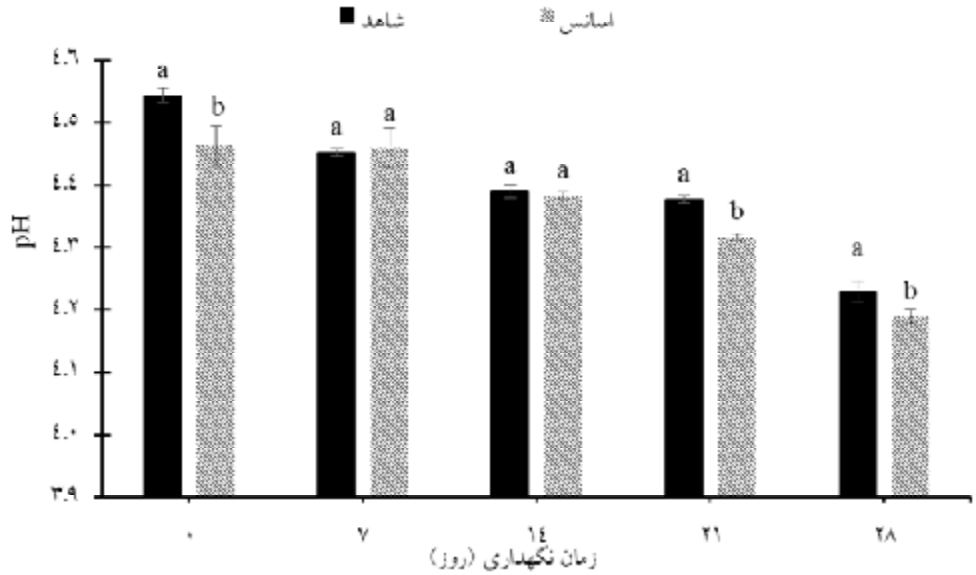
نمودار ۱- اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی*

مکانیسم‌های زنده‌مانی‌که باکتری‌ها در مواجهه با استرس بروزمی‌دهند به عنوان پاسخ به استرس شناخته می‌شوند. یکی از مکانیسم‌های زنده‌مانی پاسخ تطابقی است که در آن سلول‌هایی‌که با یک استرس متوسط مواجه شده‌اند، نسبت به همان استرس با دوز شدیدتر مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. پاسخ تطابقی‌به یک استرس‌شامل بیان پروتئین‌های جدید و یا پروتئین‌های موجود در سلول در سطوح بالاتر می‌شود به‌طوری‌که‌موتانت‌هایی‌که فاقد این پروتئین‌ها بودند به استرس بسیار حساس بوده و قادر به بروز پاسخ تطابقی به استرس نبودند. عملکرد این پروتئین‌ها شامل جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین‌ها، دیفولد کردن پروتئین‌های دناتوره و یا حذف پروتئین‌های دناتوره قبل از آسیب رساندن به سلول می‌باشد. با این وجود هنوزجزئیات فیزیولوزیک پاسخ تطابقی و مکانیسم دقیق تشخیص تغییرات در محیط روشن نیست (۱۱). افزایش‌پتانسیل اکسیداسیون و احیا و نیز افزایش غلظت‌هیدروژن‌پراکسیدحاصل‌ازفعالیت‌متابولیکی باکتری‌ها، از عوامل کاهش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در ماست طی زمان نگهداری می‌باشد. روی هم رفته با افزایش زمان نگهداری، جمعیت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* در هر دو تیماربه‌طور معنی‌داری‌کاهش یافته بود ($P <$ ۰/۰۵). اما مقادیرزنده‌مانی‌دردو تیمار اختلاف معنی داری باهم نداشتند ($P>$۰/۰۵). کاهش‌جمعیت‌باکتری‌های‌پروبیوتیک با افزایش زمان نگهداری در ماست پروبیوتیک در مطالعات متعددی اثبات شده است. قابلیت زیستی پایین باکتری‌های پروبیوتیک در ماست اساساً مربوط به pH پایین ماست و کاهش بیشترpH درطی‌نگهداری می‌باشد (۳۵). مطابق نتایج

در پایان روز ۲۸ نگهداریpH تمامی نمونه‌های مورد مطالعه به زیر۴/۳ رسیده بود. گزارش شده است کهpH ماست کمتر از۴/۳ زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک را تحت تأثیر قرارمی‌دهد(۲۳). در واقع میزان pH در طول مدت ذخیره‌سازی محصول،کاهش(افزایش اسیدیته) پیدا می‌کندکه تحت عنوان اسیدی‌شدن بیش از حدگفته می‌شود که علت آن فعال ماندن‌آنزیم بتاگالاکتوزیداز در دمای ۵-۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در این مواقع ممکن است pH حتی به زیر ۴/۲ برسد و باعث‌جداشدن سرم ماست شده و زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک به دلیل افزایش یون‌های هیدروژن در مقایسه با یون‌های لاکتات تحت‌تأثیرقراربگیرد (۲۱).همچنین‌مطالعات‌دیگری‌کاهش‌زنده‌مانی‌لاکتوباسیلوس‌های را در ماست طی دوره نگهداری گزارش کرده‌اند به طوری که در مطالعه Hekmat و همکاران(۲۰۰۹) زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس رئوتری* در ماست پس‌از طی۳ هفته از ۴/۵به ۱ لگاریتمCFU در میلی‌لیتر رسید (۱۸).

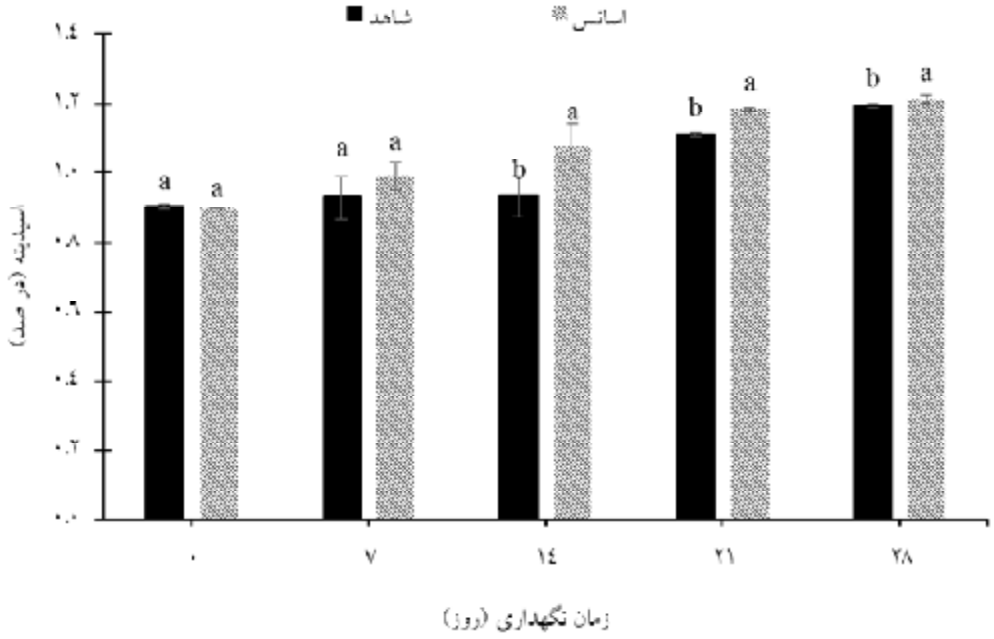
۳-۳-بررسی‌تغییراتpH واسیدیته در ماست پروبیوتیک طی زمان نگهداری

یافته‌های‌بدست‌آمده‌ازpH(نمودار۲) ماست‌های پروبیوتیک در طی دوره نگهداری بیانگرکاهش pH برای هر دو تیمار بود به‌طوری که شدت کاهش در تیمار شاهد در مقایسه با تیمار تحت استرس‌کمتر بود ($p<۰/۰۵$). pH هر دو تیمار درروزصفربه‌طورتقریبی۴/۴بودکه‌درپایان روز ۲۸ نگهداری مقدارآن برای شاهد به ۴/۲۳ و تیمار تحت استرس اسانس زیره سبز به ۴/۱۹ رسیده بود. پژوهش‌های زیادی کاهش pH ماست پروبیوتیک در طی دوره نگهداری را گزارش کرده‌اند (۲۰، ۲۴). علت‌کاهشpH را می‌توان به فعالیت باکتری‌های لاکتیکی‌وتولیداسیدهای‌آلی توسط آن‌ها مرتبط دانست (۲۶). یکی دیگر از دلایل کاهش pH در طول دوره نگهداری به ادامه فرآیند تخمیر لاکتور توسط باکتری‌های استارتر ماست و استارتر پروبیوتیک و تولید و تجمع اسید مرتبط می‌باشد (۴). بهترینpH ماست تجاری ۴/۵ است. این pH باعث افزایش مدت ماندگاری ماست، حفظ طعم ملایم و ظاهر مطلوب ماست می‌شود. pH نامطلوب (کمتر از۴) باعث می‌شود باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس تولید میزان زیادی اسید لاکتیک، استالدهید و محصولات جانبی پروتئولیتیک کند (۳۰).



نمودار۲- اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی pH

تغییر در اسیدیته یک فاکتور مهم و تأثیرگذار بر مدت ماندگاری و پذیرش ماست است. با گذشت زمان و در طول دوره نگهداری، میزان اسیدیته (نمودار۳) در تمامی نمونه‌های ماست روند افزایشی داشت اما در نمونه شاهد در مقایسه با نمونه‌های تحت استرس قرار گرفته با اسانس زیره سبز شدت افزایش کمتر بود ($P < ۰/۰۵$). همان‌طور که در بالا اشاره شد باکتری‌های اسیدلاکتیک و تولید اسیدهای آلی توسط آن‌ها مسؤل افزایش اسیدیته در طی دوره نگهداری می‌باشند (۲۶). افزایش اسیدیته در ماست‌های پروبیوتیک در طی دوره نگهداری توسط محققان زیادی گزارش شده است به‌طوری که Lee و همکاران (2007) گزارش کردند که با نگهداری ماست کم‌چرب حاوی اسانس پامچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۸روز، در تمامی نمونه‌ها اسیدیته افزایش و pH کاهش یافته بود (۲۴). در طی تولید و نگهداری ماست، کاتابولیسم لاکتوز توسط باکتری‌های آغازگر، موجب تولید اسید لاکتیک و افزایش اسیدیته می‌شود. تولید اسیدلاکتیک در ماست به علت ایجاد طعم و مزه خاص و ناپایداری مسیل کازئین و تبدیل کمپلکس فسفات کلسیم کلوئیدی به فسفات کلسیم محلول و خارج شدن کلسیم از مسیل و کوآگوله‌شدن کازئین در pH ۴/۷-۴/۶ و تشکیل ژله ماست اهمیت زیادی دارد (۳۳). افزایش اسیدیته در طول زمان نگهداری ماست را می‌توان به تولید اسید در اثر تخمیر لاکتوز توسط فعالیت باکتری‌های آغازگر ماست نسبت داد. همچنین برخی محققین علت کاهش pH در ماست در طی نگهداری درسرما را فعالیت متابولیکی ثانویه ماست گزارش کردند (۸).



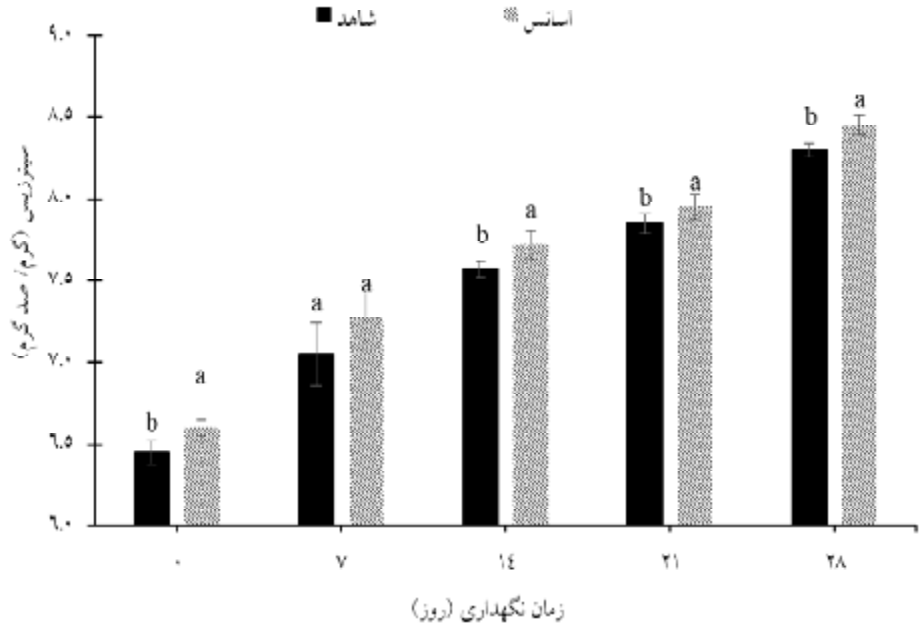
نمودار۳- اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی اسیدیته

۳-٤-بررسی تغییرات آب اندازی در ماست پروبیوتیک طی زمان نگهداری

آب‌اندازی یکی از ویژگی‌های نامطلوب ماست است که در نتیجه بازآرایی شبکه ژلی اتفاق می‌افتد و سبب افزایش تعداد اتصالات ذرات شده و بنابراین شبکه تمایل به چروکیدگی پیدا کرده و مایع داخلی به خارج مترشح می‌شود (۳۶).

فاکتورهایی نظیر محتوای چربی، ویژگی‌های باکتری‌های آغازگر و پروبیوتیک، مقدار ماده‌خشک بدون چربی، تولید اگزوپلی‌ساکاریدها، افزودن فیبرها و پایدارکننده‌ها، دمای تخمیر و pH فرآورده از مهمترین عوامل مؤثر بر آب‌اندازی ماست‌می‌باشد(۳۶). یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر بیانگر افزایش درصد آب‌اندازی (نمودار۴) در هر دو تیمار طی

دوره نگهداری بود به‌طوری که در پایان روز ۲۸ نگهداری تیمار شاهد (۸/۳) و تیمار تحت استرس اسانس زیره سبز (۸/۴۵) بوده است. افزایش آب‌اندازی در ماست‌های پروبیوتیک در طی دوره نگهداری ممکن است به دلیل فعالیت میکروارگانیسم‌های موجود در مایه کشت و تأثیر بر زنجیره‌های بلند بیوپلیمرها باشد که می‌تواند عامل مهمی در کاهش نرمی و افزایش آب‌اندازی نمونه‌ها در طی نگهداری باشد (۲۱). بنابرمطالعات انجام شده توسط Mortazavian و همکاران (۲۰۰۷) نیز مشخص شد که میزان آب‌اندازی در نمونه‌های ماست پروبیوتیک نگهداری شده دردمای ۴ درجه سانتیگراد طی دوره نگهداری افزایش می‌یابد (۲۹). که با یافته‌های به دست آمده از تحقیق حاضر همسؤ بود. گستردگی‌فضاهای خالی ناشی از فعالیت باکتریایی از قبیل تولید اسیدلاکتیک، پروتئولیز یا آزادسازی دی‌اکسید کربن ممکن است با میزان آب‌اندازی بیشتر در تیمار تحت استرس در مقایسه با تیمار شاهد در ارتباط باشد (۱۴).

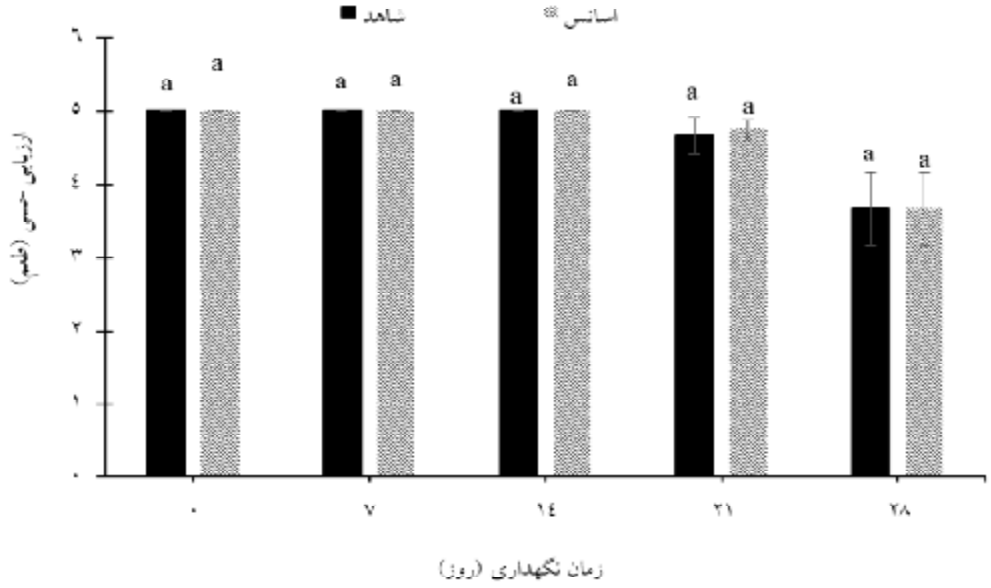


نمودار٤-اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی آب اندازی

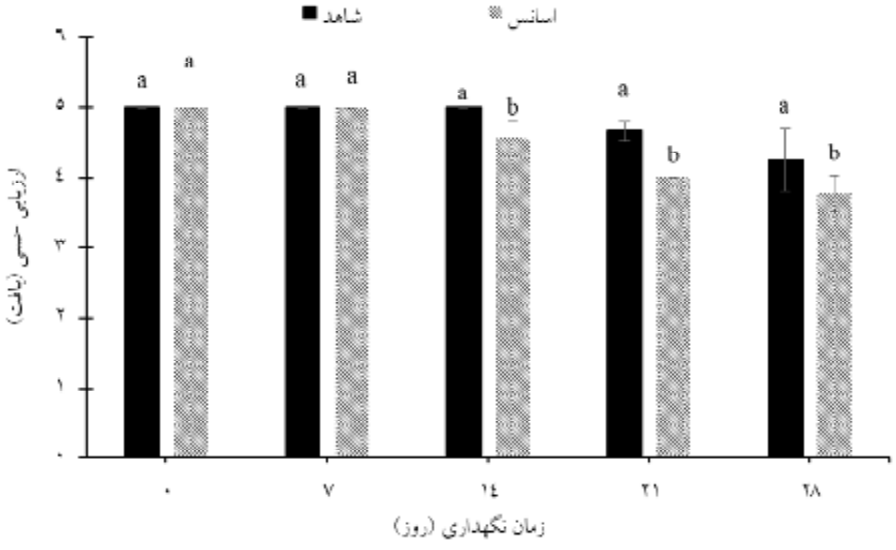
۳-۵-بررسی خواص حسی درماست پروبیوتیک طی زمان نگهداری

کیفیت‌محصولات‌تخمیری‌لبنی‌به‌طور عمده وابسته به ادراک حسی است. ادراک حسی، فرایند پیچیده‌ای است که تحت تأثیر عوامل متعددی مانند میزان ترکیبات طعمی، بافت و ظاهر واقع می‌شود. با گذشت زمان نگهداری، طعم (نمودار ۵) ماست‌های تولیدی در تمامی نمونه‌ها کاهش یافته بود ($p<۰/۰۵$) اما در دو تیمار اختلاف معنی داری باهم نداشت ($p>۰/۰۵$). کاهش‌امتیازطعم نمونه‌ها در طی دوره نگهداری می‌تواند به افزایش اسیدیته وکاهش فعالیت باکتری‌های مؤلد عطر و طعم باشد. بافت ماست‌های پروبیوتیک (نمودار ۶) درطی دوره نگهداری در هر دو تیمار کاهش یافته‌بود به‌طوری که شدت کاهش در تیمار واجد استرس در مقایسه باتیمارشاهدبیشتر بود($p<۰/۰۵$). همان‌طورکه انتظار می‌رفت باافزایش‌آب‌اندازی‌ماست،بافت(سفتی)ماست‌های‌پروبیوتیک کاهش یافته بود. در واقع آب‌اندازی و سفتی ماست رابطه معکوسی با یکدیگر دارندبه‌این‌معنی‌که‌باکاهش آب‌اندازی، سفتی‌ماست‌افزایش می‌یابد. پذیرش کلی (نمودار ۶) نمونه‌ها نیز با گذشت زمان در هر دو تیمار کاهش یافته بود اما شدت کاهش در نمونه‌ها واجد استرس بیشتر از نمونه شاهد بود ($p<۰/۰۵$). لاکتوباسیلوس‌ها در صنعت برای اصلاح بو، طعم و بافت محصولات تخمیری به کار می‌روند. سویه‌های

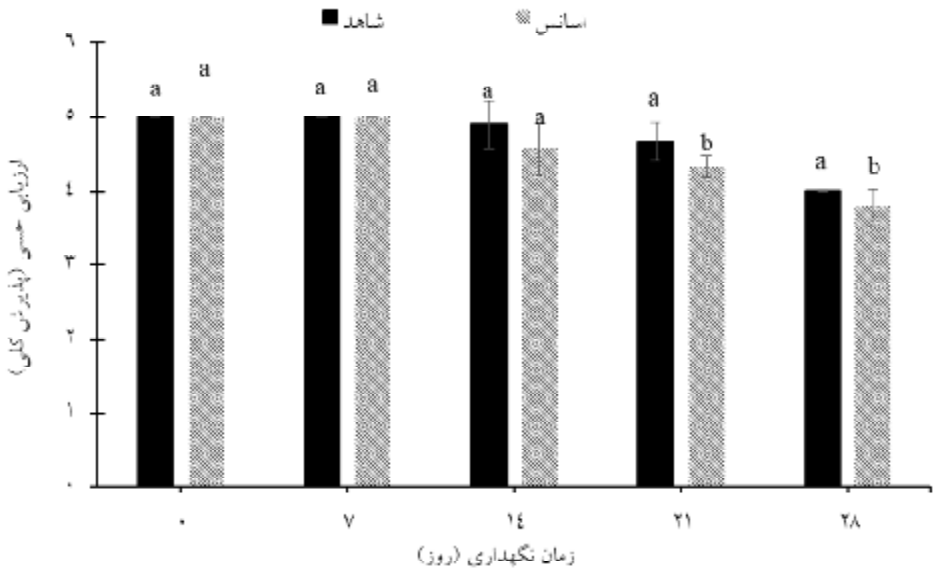
پروتئولیتیک لاکتوباسیلوس‌ها از جمله لاکتوباسیلوس کازئی می‌توانند در ایجاد طعم و مزه، از طریق متابولیسم کربوهیدارت‌ها، پرتئولیز و مقدار کمی لیپولیز مؤثر باشند. این آنزیم‌ها کازئین را هیدرولیز کرده و پپتیدهای بزرگ و متوسط تولید می‌کنند. این پپتیدها ممکن است بعداً توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک حاصل از میکروفلور باکتری‌های استارتر، باکتری‌های غیر اسید لاکتیک و پروبیوتیک‌های افزوده شده به پپتیدهای کوچک و اسیدآمینه آزاد تجزیه گردد که مهمترین عامل ایجاد طعم در فرآورده‌های لبنی هستند (۶).



نمودار۵- اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی طعم



نمودار٦-اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی بافت



نمودار۷- اثر متقابل تیمار و زمان‌های نگهداری روی پذیرش کلی

٤- نتیجه‌گیری

تا به‌حال مطالعه اندکی درارتباط‌بااسترس‌اسانس بر زنده‌مانی باکتری‌لاکتوباسیلوس‌کازئی در ماست پروبیوتیک و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ماست پروبیوتیک تحت تأثیر استرس‌انجام‌شده‌است. مطابق‌نتایج pHو جمعیت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* در طی دوره نگهداری برای هر دو تیمارکاهش‌یافته‌بوددرحالی‌که اسیدیته و درصد آب‌اندازی افزایش یافته بود. براساس یافته‌های به دست آمده از تحقیق حاضر، استرس‌های‌کمتراز حداقل غلظت بازدارندگی، سبب حفظ تعدادباکتری‌های‌لاکتوباسیلوس‌کازئی به مقدار توصیه شده ($۱۰^{۶}$- $۱۰^{۷}$CFU/ ml) درماست پروبیوتیک طی فرآیند تولید و نگهداری شده بود زنده مانی در تیمار تحت استرس‌اختلاف معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد نداشت، استرس با اسانس زیره سبز تاثیر منفی ناچیزی بر ویژگی‌های حسی‌وکیفی‌ماست پروبیوتیک طی فرآیند تولید و نگهداری داشت. با توجه به تاثیرمنفی به نظر می‌رسد، اسانس زیره سبز جز گیاهان دارویی باشد که تاثیر منفی بر ویژگی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* دارند.

٥- منابع

۱. سازمان ملی استاندارد ایران. ۱۳۸۵. روش تعیین pH اسیدیته کل و آن. استاندارد شماره ۲۸۵۲.

۲. مهاجرفر، ط.، حسین زاده، ا.، آخوندزاده بستی، ا.، خنجری، ع.، میثاقی، ع. و گندمی نصرآبادی، ح.۱۳۹۱.تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)لیزوزیم و آویشن شیرازی روی لیستریا مونوسیتوژنز.*گیاهان‌دارویی*، دوره۱۱، شماره٤٤، ۷۷- ۷۰.

3. Al-Okbi, S.Y. and Mohamed, D.A. 2012. Preparation and evaluation of functional foods in adjuvant arthritis. J. *Gras. Yace.*, 63(4): 394-402.
4. Amirdivani S. and Baba, A. S. 2011. Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *LWT– Food Science and Technology*, 44: 1458-1464.
5.

6. Atallah, A. A. 2016. The production of bio-yoghurt with probiotic bacteria, Royal jelly and Bee pollen grains. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 6 (3): 510.
7. Ayar, A. and Gurlin, E. 2014. Production and sensory, textural, physico-chemical properties of flavored spreadable yogurt. *Life Sci. J*, 11(4): 58-65.
8. Azizkhani, M. and Parsaeimehr, M. 2018. Probiotics survival, antioxidant activity and sensory properties of yogurt flavored with herbal essential oils. *Int. Food Res. J*, 25(3): 921-927.
9. Bonezar, G., Wszolek, M. and Suita, a. 2002. The effect of certain factors on the properties of yogurt made from ewe's milk. *Food Chemistry*, 79: 85-91.
10. Burt, S. 2004. Essentialoils: their antibacterial propertied and potential application in foods-a review. *International Food Mashinicrobiology*, 94 (30): 223- 253.
11. Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. and Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci*, 90(6): 2580-2595.
12. Chen, M. J., Tang, H. Y. and Chiang, M.-L. 2017. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated robiotic Lactobacillus kefiranofaciens M1. *Food Microbiol*, 66: 20-27.
13. de Souza, E. L., da Cruz Almeida, E. T. and de Sousa Guedes, J. P. 2016. The Potential of the Incorporation of Essential Oils and Their Individual Constituents to Improve Microbial Safety in Juices: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 15(4): 753-772.
14. El-Shafei, K., Tawfik, N. F., Dabiza, N. M. A., Sharaf, O. M. and Effat, B. A. 2010. In vitro assessment of gastrointestinal viability of potentially probiotic Lactobacilli. J. *American Sci*, 6 (11): 357-367.
15. Flinger, K., Lundomood, J.B. and Hasan, P.M.T. 1988. Fortification of low fat plain yogurt with calcium gluconate. *Cultured Dairy Product J*. 23(1): 5-9.
16. Fontana, A., Zacconi, C. and Morelli, L. 2018. genetic signatures of dairy *Lactobacilluscasei* Group. *Front in microbiol*, 9: 2611.
17. Granato, D., Branco, GF., Cruz, AG. and P. Shah. 2010. Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5): 455 – 470.
18. Haghiroalsadat, F., Vahidi, A., Sabour, M., Azimzadeh, M., Kalantar, M. and Sharafadini M. 2011. The Indigenous *Cuminum Cyminum* L. of Yazd Province: Chemical Assessment and Evaluation of its Antioxidant Effects. *JSSU*, 19 (4): 472-481.
19. Hekmat, S., Soltani, H. and Reid, G. 2009. Growth and survival of Lactobacillusreuteri RC-14 and Lactobacillusrhamnosus GR-1 in yogurt for use as a functional food. Innov. *Food Sci. Emerg. Technol*, 10 (2): 293-296.
20. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 1992. Probiotic yogurt-Specifications and test methods. *ISIRI*. no 11325. 1st Revision, Karaj, ISIRI. [In Persian].
21. Jooyandeh, H., Noshad, M. and Khamirian, R. 2018. Modeling of ultrasound-assisted extraction, characterization and in vitro p+h armacological potential of polysaccharides from Vaccinium arctostaphylos L. *Int J Biol Macromol*, 107: 938-48.
22. Kailasapathy, KJL-FS. 2006. Technology Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT– Food Science and Technology*, 39(10): 1221-7.
23. Keogh, M. K. and B. T. O'Kennedy. 1998. Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. *J. Food Sci*. 63:108–114.
24. Lankaputhra, W. E. V. and Shah, N. P. 2014. Investigation of factors affecting viability of Lactobacillus acidophilus in yogurt. *Dairy Congress melborne*, 18-22.

green, white and black tea on Streptococcus thermophilus and Lactobacillus spp. in yogurt during refrigerated storage. *J. Asso. Arab. Uni. Basic Appl. Sci*, 22: 26–30.

32. Pajohi Alamoti, M. R, Tajik, H., Akhondzade, A., Gandomi, H. and Ehsani, A. 2012. A Study on chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Mentha longifolia L. and Cuminum cyminum L. in soup. *FSCT*, 9(36): 33-45 [In Persian].
33. Prasanna Pradeep, P. H. and Charalampopoulos, D. 2019. Encapsulation in an alginate–goats' milk–inulin matrix improves survival of probiotic Bifidobacterium in simulated gastrointestinal conditions and goats' milk yoghurt. *International Journal of Dairy Technolgy*, 72(1): 132-141.
34. Ramasubramanian, L., Restuccia, C. and Deeth, H. C. 2008. Effect of calcium on the physical properties of stirred probiotic yogurt. *Journal of Dairy Science*, 91: 4164–4175.
35. Sahadeva, R. P. K., Leong, S. F., Chua, K. H., Tan, C. H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong, S.Y.W. and Chan, H. K. 2011. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *Int. Food Res. J*, 18(4): 1515-1522.
36. Shah, N. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83(4): 894-907.
37. Tamime, A.Y. and Robinson, R. K. 1999. Yogurt science and technology. *CRC Press, Boca Raton*. p. 37.

25. Lee, S. J., Hwang, J. H., Lee, S., Ahn, J. and Kwak, H. 2007. Property changes and cholesterol-lowering effects in evening primrose oil-enriched and cholesterol-reduced yogurt. *Int. J. Dairy Technol,* 1(60): 22- 30.
26. Lourens-Hattingh, A., Viljoen, BJFRI. 2001. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research Internationa*l, 34(9): 791-6.
27. Madhu, A. N., Amrutha, N. and Prapulla, S. G. 2012. Characterization and Antioxidant Property of Probiotic and Synbiotic Yogurts. *Probiotics & Antimicro*, 4: 90–97.
28. Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J*, 16(3): 189-199.
29. Marhamatizadeh, M. H., Ehsandoost, E., Gholami, P. and Davanyan Mohaghegh, M. 2013. Effect of olive leaf Extract on Growth and viabiolity of Lactobacillus acidophilus and Bifido bacterium bifidum for production of probiotic Milk and Yogurt. *International Journal of farming and Allied Sciences*, 2(17): 572-578.
30. Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Rezaei, K., Sohrabvandi, S. and Reinheimer, J. A. 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *Int. J. Dairy Technol*, 60 (2):123-127.
31. Muniandy, P., Shori, A.B., and Baba, A.S. 2017. Comparison of the effect of

(Original Research Paper)

The Effect of Cumin Essential Oil Stress on Survival and Stability of Lactobacillus casei in Probiotic Yogurt

Noushin Mohajeri[1], Peyman Mahasti Shotorbani[2*], Afshin Akhondzadeh Basti[3], Zhaleh Khoshkhoo[1], Ali Khanjari[3]

1-Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2-Department of Food Quality Control and Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Received:16/11/2021 Accepted:12/01/2022

Abstract

One of the main challenges in using probiotics is keeping them alive and active during the food production and storage process. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of stress less than the minimum inhibitory concentration on the survival of *Lactobacillus casei* and some physicochemical properties of probiotic yogurt during refrigeration. Cumin essential oil was extracted by steam distillation and its composition was determined by gas chromatography-mass spectrometry GC/ MS. Then, the effect of 50% MIC cumin essential oil stress were examined by comparing the stress treatment with the control in terms of the *L. casei* population, pH, acidity, and syneresis percentage in probiotic yogurt during storage in the refrigerator for 28 days. Data were analyzed by Tukey in SPSS software version 18. According to the results related to the constituents of the essential oil, the most compound was propanal-2-methyl-3-phenyl with 24.2%. Also, the results related to yogurt showed that the number of *Lactobacillus casei* bacteria and pH in both treatments decreased during the storage period so that the intensity of pH reduction in stress treatments was higher than the control treatment ($P < 0.05$). But bacterial changes of *Lactobacillus casei* in the two treatments were not significantly different ($P > 0.05$). The percentage of syneresis and acidity increased during the maintenance period for all treatments and the intensity of increase in stress treatment was higher than the control ($P < 0.05$). All in all applying stresses below the MIC resulted in the survival of *L. casei* in the recommended amount (10^6-107 CFU ml-1) in the probiotic yogurt until the end of 28 days

.

Keywords: Stress, *Lactobacillus casei*, Probiotic yogurt, Cumin.

*Corresponding Author: Pmahasti@yahoo.com