بررسی تاثیر افزودن لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس پنتوسوس جداشده از عسل معده زنبور عسل به ماست همزده

بهنام صادقیان لودریجه [۱]، لیلا ناطقی [۲*]

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۹)

چکیده

زنبور عسل حشره‌ای مفید است که در طبیعت به واسطه گرده افشانی نقش مهمی دارد. دستگاه گوارش زنبور عسل دارای میکروارگانیسمهای همزیست است. استفاده از مکملهای پروبیوتیک در صنعت زنبورداری سبب افزایش سرعت رشد و بهبود ضریب تبدیل خوراک و بهبود مقاومت در مقابل بیماری و افزایش تولید عسل می شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر افزودن دو باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* جدا شده از عسل موجود در معده زنبور عسل بر ماست همزده می باشد .در این بررسی ابتدا خواص پروبیوتیکی باکتریهای *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از عسل موجود در معده زنبور عسل شامل مقاومت به اسید، مقاومت به نمک‌های صفراوی (بایل)، مقاومت به شیره‌ی معده (پپسین، تریپسین)، عدم فعالیت همولیتیک، هیدرولیز ال-آرژنین مورد بررسی قرار گرفت. ٤ تیمار مطابق با طرح کاملا تصادفی طراحی گردید و نتایج آزمایشات با آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد توسط نرم Minitab 16 تجزیه و تحلیل شد. نتایج نشان داد هر دو باکتری پروبیوتیک، خاصیت پروبیوتیکی نشان دادند و با افزایش مدت زمان نگهداری خواص حسی به طور معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۵) کاهش یافت. بالاترین امتیاز بافت و رنگ به تیمارهای حاوی *باکتریهای لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* تعلق گرفت. میزان بقای باکتری‌های پروبیوتیک طی زمان نگهداری در تمامی تیمارها کاهش یافت و بالاترین میزان زنده‌مانی پس از ۲۸ روز نگهداری متعلق به نمونه تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود که کمترین میزان اسیدیته را نیز داشت. همچنین از لحاظ خواص حسی نیز تیمارمذکور بالاترین امتیاز طعم و مزه را داشت. مطابق با نتایج ماست همزده تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان تیمار بهینه از نظر بالاترین میزان زنده‌مانی و خواص حسی انتخاب گردید.

کلید واژگان: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*، ماست پروبیوتیک

*مسئول مکاتبات: leylanateghi@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

۱- مقدمه

با ارتقاء دانش مصرف‌کنندگان از تأثیر تغذیه بر سلامت انسان انتظار می‌رود غذای مصرفی سالم و حتی قادر به محافظت مصرف‌کنندگان در برابر برخی بیماری‌ها باشد. فرآورده‌های عملگرا[1] یا فراویژه یا هدفمند از خواص سلامت‌بخش ویژه‌ای علاوه بر خواص تغذیه‌ای غذاهایی که مصرف عمومی یافته‌اند برخوردار هستند. اثرات سلامت بخشی آنها در بیشتر موارد به وجود ترکیب مؤثره موجود در آنها مربوط می‌شود که می‌تواند از غنی‌سازی یک یا چند ترکیب مغذی یا حذف ترکیبات مضر ناشی شود [۱ و۲]. غذاهای پروبیوتیک، غذاهایی هستند که حاوی میکروارگانیسم‌های زنده بوده و با خوردن آنها سلامت مصرف-کنندگان از طریق بهبود تعادل میکروفلور روده افزایش می‌یابد [۳].

در بین تمام محصولات لبنی تخمیری، ماست یکی از محبوب‌ترین فرآورده‌های لبنی است که از مقبولیت بیشتری در سراسر جهان برخوردار است. این محصول به وسیله تخمیر لاکتیکی توسط دو باکتری آغازگر، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*[2] و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[3] بدست می‌آید [٤]. این فرآورده، عمدتاً به دلیل کاهش میزان لاکتوز و غلظت بالای Ca^{2+} ارزش غذایی بالایی دارد و نیز دارای آثار زیست‌فعال مثبتی است (عمدتاً در فرآورده‌های حاوی ترکیبات پری‌بیوتیک و یا باکتری‌های پروبیوتیک)، توسط متخصصان تغذیه مورد ملاحظه قرارگرفته است [٥].

تاریخچه استفاده از میکروارگانیسم‌های زنده در مواد غذایی بخصوص باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک به‌منظور حفظ و بهبود سلامت انسان بسیار طولانی است. فرآورده‌های لبنی، اولین محصولات پروبیوتیکی هستند که مورد استفاده بشر قرار گرفته‌اند [٦]. گزارشات متعددی نشان می‌دهد که تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها به‌طور طبیعی داخل و روی بدن حشرات وجود دارند [۷]. حضور این میکروارگانیسم‌ها در دستگاه گوارش زنبورعسل، به علت کمک به فرایند هضم مواد غذایی، کمک به سنتز و جذب ویتامین‌ها و مواد معدنی، تجزیه پلی‌ساکارید، تحریک سیستم ایمنی برای میزبان ضروری است. بنابراین جمعیت میکروفلور طبیعی روده تحت تأثیر عوامل مختلف مانند تغییرات جیره‌غذایی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان، تراکم بالای افراد گله، دستخوش تغییراتی می‌گردد [۸].

پاتابهیرامه و همکاران (۲۰۱۲) باکتری‌های سیستم گوارشی زنبور عسل را مورد بررسی قراردادند. مطابق با نتایج آنها، این ریزسازواره‌ها جزء پروبیوتیک‌ها می‌باشند و اثرات مفیدی بر سلامتی انسان می‌گذارند [۹].

تاج‌ابادی و همکاران (۲۰۱۲) ریزسازواره‌های موجود در عسل معده زنبور عسل را با استفاده از روش PCR بررسی کردند. نتایج ایشان نشان داد که ریزسازواره‌های غالب در عسل معده زنبور عسل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[4]، *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*[5] و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[6] می‌باشد [۱۰]. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی خواص پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداشده از عسل موجود در معده زنبور عسل و امکان افزودن باکتریهای مذکور به ماست همزده و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی و آن‌ها بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مصرفی

محیط کشت‌های MRS Agar و MRS Broth، قرص رینگر، سود، اسید کلریدریک و اسید آمینه ال-آرژنین از شرکت مرک (آلمان)، محلول بافر استاندارد ٤ و ۷، معرف فنل فتالئین و تیترازول سود ۰/۱ نرمال از شرکت مینا تجهیز (ایران)، معرف نسلر[7] از شرکت شیمیران (ایران)، استارتر ماست از شرکت کریستین هانسن (دانمارک)، خون دفیبرینه گوسفند از شرکت آزما پرشین طب (ایران)، بافر فسفات از شرکت سیگما (آمریکا)، کنسانتره پروتئین شیر از شرکت لیدوما طلایی روز (ایران) و شیر خشک اسلیم از شرکت به‌تام پودر (ایران) تهیه گردید.

1. Functional food
2. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*
3. *Streptococcus thermophilus*
4. *Lactobacillus plantarum*
5. *Lactobacillus pentosus*
6. *Lactobacillus* Fermentum
7. Nessler's reagent

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

۲-۲- آماده‌سازی تیمارها

۲-۲-۱- آماده‌سازی مایه تلقیح

لاکتوباسیلوس پنتوسوس و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مؤسسه تحقیقات علوم دامی (کرج، ایران) از عسل موجود در معده زنبور عسل جداسازی گردید و به منظور فعال سازی مایه تلقیح در محیط MRS Broth کشت داده شد و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. شمارش سلول-های زنده مایه تلقیح با استفاده از روش کشت استاندارد و محیط کشت MRS Agar و گرمخانه‌گذاری به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت [۱۱].

۲-۲-۲- روش تولید ماست همزده

برای تهیه کلیه تیمارها شیر خام از شرکت پگاه تهران تهیه و استفاده شد. ترکیب شیر به کار رفته در ماست شامل ٪۱/٤ چربی، ٪۳/۳ پروتئین، ٪۸/۳۲ ماده جامد بدون چربی، ۱٤/۵۳ درجه دورنیک و pH آن ٦/٦۵ بود. شیر خام تا ٦۰ درجه سانتی‌گراد گرم گردید و سپس ۲ درصد وزنی/وزنی پودر شیر اسکیم و ۲ درصد وزنی/وزنی کنسانتره پروتئین شیر ٦۵ درصد، به آن اضافه شد. سپس شیر استاندارد شده در دمای ۹۰-۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه و سپس تحت فشار ۱۸۰ بار با هموژنایزر مدل آرمفیلد tf۹ (آلمان) هموژن گردید [۱۲]. و تا دمای ٤۵ درجه سانتی‌گراد سرد شد. سپس کشت آغازگر معمول ماست (*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* + *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*) به تمامی نمونه‌ها اضافه و برای تولید ماست‌های همزده پروبیوتیک میکروارگانیسم‌های *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به صورت جداگانه با غلظت cfu/ml $۱۰^{۸}$ و به صورت ترکیبی از این دو میکروارگانیسم مجموعا با غلظت cfu/ml $۱۰^{۸}$ به نمونه‌ها اضافه گردیدند و پس از مخلوط شدن به انکوباتور ٤۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و تا رسیدن اسیدیته ماست به ٦۸ درجه دورنیک در همین دما نگهداری شدند. سپس لخته‌ها توسط همزن الکتریکی مولینکس (اسپانیا) با دور کمتر از ۲۰rpm به مدت ۳ دقیقه مخلوط گردیدند. پس از همزدن و شکستن ژل نمونه‌ها در ظروف پلی‌اتیلنی ۱۰۰ گرمی ریخته شدند و پس از دربندی به سرعت تا دمای ٤ درجه سانتی‌گراد خنک و تا انجام آزمونهای مربوطه در همین دما نگهداری شدند. با توجه به اینکه فرآورده‌های تخمیری مانند ماست معمولاً بین یک هفته تا ده روز پس از تولید مصرف می‌شوند بنابراین نمونه‌های ماست در این پژوهش به مدت ۲۸ روز نگهداری شدند [۱۳]. لازم به ذکر است نمونه شاهد از کشت آغازگر معمول ماست (*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* + *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*) بدون افزودن باکتری پروبیوتیک تهیه شده بود.

۲-۳- آزمون‌های مورد مطالعه

۲-۳-۱- خواص پروبیوتیکی

۲-۳-۱-۱- مقاومت به اسید باکتری‌های اسیدلاکتیک

به منظور بررسی مقاومت باکتری‌های اسیدلاکتیک به اسید، از محیط MRS مایع استریل که به کمک اسیدکلریدریک (HCL) ۱۰ نرمال و سود (NaOH) ۱۰ نرمال، pH آن‌ها به ترتیب به ٤ و ۲/۵ رسانده شده بود، استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری-های تازه کشت شده به این محیط‌ها منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و در زمان‌های صفر، ۱، ۱٤، ۲۸ ساعت رشد باکتری‌ها از طریق خواندن جذب در طول موج ٦۲۰ نانومتر با استفاده از رفراکتومتر شرکت مینا تجهیز (ایران) بررسی شد [۱٤ و۱۵].

۲-۳-۱-۲- مقاومت به نمک‌های صفراوی (بایل)

۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های تازه رشد کرده به محیط‌های MRS مایع حاوی ٪۰/۳ درصد نمک صفراوی استریل اضافه شد، سپس رشد باکتری‌ها در زمان، ۱، ۱٤، ۲۸ ساعت از طریق خواندن جذب در طول موج ٦۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. میزان بازدارندگی رشد با استفاده از روش شرح داده شده توسط گوپال[1] و همکاران.، در سال ۲۰۰۱ و رابطه ۱ محاسبه شد [۱٤و ۱٦].

رابطه ۱

$$Cinh = \frac{(\Delta T8-T0\ control-\Delta T8-T0\ Treatment)}{\Delta T8-T0\ control}$$

۲-۳-۱-۲- مقاومت به شیره معده (پپسین، تریپسین)

برای انجام این تست کشت شبانه لاکتوباسیلوس منتخب را پس از سانتریفیوژ ژربر (آلمان) و جداسازی توده باکتری از سوپ رویی دو بار با بافر فسفات (pH 7.0 و 0.1 M) شستشو داده و سپس در محلول الکتریکی استریل حل و بلافاصله به محلول

1. Gopal

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

هم‌حجم شیره معده (NaCl (w/v ٪ و (w/v) pepsin٪۰/٦) افزوده شد. سوسپانسیون میکروبی حاصل بلافاصله در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به آرامی اسیدی شده و دربازه زمانی ۹۰ دقیقه pH آن از ۵ به ۲/۲ رسانده شد. شمارش سلول‌های زنده مانده پس از ۲۸ دقیقه بر روی محیط آگار بررسی شد [۱۷].

۲-۳-۱-۳- عدم فعالیت همولیتیک

بررسی لیز گلبول‌های قرمز خون گوسفندی با کشت میکروارگانیسم بر روی محیط کشت آگاردار حاوی خون گوسفند انجام شد. میکروارگانیسم ایزوله شده بر روی محیط کشت آگار خون‌دار (محیط پایه حاوی ٪۷ خون گوسفندی دفیبرینه) به روش نقطه‌ای کشت شد. سپس پلیت‌ها به صورت وارونه در دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری گردید. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر وجود هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها بررسی شد. وجود هاله شفاف نشان‌دهنده واکنش مثبت و نوع بتا بود. از *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۱۸].

۲-۳-۱-٤- هیدرولیز ال-آرژینین

به‌منظور انجام تست هیدرولیز ال-آرژینین در باکتری‌های اسیدلاکتیک، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده از کشت تازه باکتری را به محیط مایع حاوی ۰/۳ درصد اسیدآمینه ال-آرژینین منتقل کرده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌کنیم. پس از پایان انکوباسیون شبانه ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت روی کاغذ صافی حاوی معرف نسلر قرار گرفت و تغییر رنگ بررسی شد. ایجاد رنگ نارنجی متمایل به قرمز نشان‌دهنده واکنش مثبت است. از *استافیلوکوکوس اورئوس* (RTCC1240) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۱۸].

۲-۳-۱-۵- شمارش میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک

تعداد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک موجود در یک گرم از کشت میکروبی در محیط کشت MRS با تهیه رقت‌های مختلف از هر کدام از نمونه در سه تکرار انجام شد [۱۸].

۲-۳-۲- آزمون میکروبی ماست

۲-۳-۲-۱- شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک

برای شمارش سلول‌های زنده باکتریایی از روش رقت سازی دهگانی و پورپلیت طبق روش SPC[1] استفاده شد. یک قرص رینگر به ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد (مطابق با دستورالعمل روی بسته‌بندی) و در هر لوله آزمایش ۹ میلی‌لیتر ریخته شد. درب لوله‌ها با پنبه و فویل بسته و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. بعد از سرد شدن رینگرها، ۱ میلی‌لیتر از نمونه تخمیر شده به ۹ میلی‌لیتر محلول رینگر اضافه شد. رقت حاصل 10^{-1} می‌باشد. از این رقت ۱ میلی‌لیتر به ۹ رینگر میلی‌لیتر اضافه شد و با شیکر به خوبی مخلوط شد، رقت حاصل 10^{-2} می‌باشد. این روند تا تهیه رقت 10^{-8} ادامه یافت. از رقت‌های 10^{-7} و 10^{-8} برای شمارش باکتری‌ها استفاده شد [۱۸].

از رقت‌های انتخابی ۱ میلی‌لیتر داخل پلیت استریل ریخته شد و سپس محیط MRS آگار استریل شده بر روی آن ریخته شد. سپس پلیت‌ها به‌منظور اختلاط کامل محیط کشت و سوسپانسیون به شکل علامت 8 روی سطح صاف حرکت داده شدند. بعد از سفت شدن محیط کشت، پلیت‌ها به انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و ٤٨ ساعت در این دما گرمخانه‌گذاری شدند [۱۸]. بعد از زمان طی شده پرگنه‌های رشد کرده توسط پرگنه شمار شمارش شدند. پلیت‌هایی که بیش از ۳۰۰ کلنی داشتند، به علت تعداد زیاد باکتری‌ها و احتمال تشکیل کلنی‌ها بر روی یکدیگر در نظر گرفته نشدند، پلیت‌هایی هم که کمتر از ۱۰ کلنی داشتند شمارش نشدند، زیرا از نظر آماری خطا ایجاد می‌کنند [۱۹].

شمارش باکتری‌های زنده با استفاده از روش فوق صورت گرفت. تعداد باکتری‌های لاکتیک با در نظر گرفتن دو رقت متوالی و از طریق رابطه ۲ محاسبه گردید [۲۰].

رابطه ۲

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n1+0/1n2)d}\Sigma C$$

مجموع پرگنه‌های شمارش‌شده در همه پلیت‌های نماینده دو رقت متوالی، V حجم رقت تلقیح شده در هر پلیت بر حسب میلی‌لیتر، n_1 تعداد پلیت‌های شمارش‌شده در اولین رقت (غلیظ‌تر)، n_2

1. Standard plate counts

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

تعداد پلیت‌های شمارش‌شده در دومین رقت (رقیق‌تر)، d ضریب رقت بر اساس اولین رقت شمارش‌شده (غلیظ‌تر) بود.

۲-۳-۳- آزمون حسی

در ارزیابی حسی ویژگی بافت، رنگ، طعم و مزه مورد آزمایش قرار گرفت. در سیستم ارزیابی حسی نمونه‌های ماست با استفاده از آزمون هدونیک نه نقطه‌ای با استفاده از ۱۰ ارزیاب آزموده انجام شد. که در این میان گزینه خیلی خوب دارای امتیاز ۹ و گزینه خیلی بد دارای امتیاز ۱ بود [۲۱].

۲-٤- تجزیه وتحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد، آنالیز نتایج با نرم‌افزار مینی‌تب ۱٦ و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن (در سطح احتمال ۵ درصد) و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی خواص پروبیوتیک

نتایج مربوط به بررسی ارزیابی فعالیت سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* نمونه‌های ماست پروبیوتیک همزده طی ۲۸ روز نگهداری در دمای ٤°C و شاهد در جدول ۱ نشان داده شده است. از آنجایی که تعداد باکتری‌های زنده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* در مجاورت اسید در pH برابر ۲/۵ و ٤ به ترتیب برابر 29×10^{5} cfu/ml و 211×10^{4}cfu/ml بود و مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹٤۵۹ باید تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* شمارش شده کمتر از 10^{6} cfu/ml نباشد [۱۸] بنابراین خاصیت پروبیوتیکی آن از لحاظ مقاومت به اسید تایید گردید. همچنین مقاومت به نمک صفراوی باید کمتر از ۰/٤ باشد و مقاومت به شیره معده نیز نباید کمتر از 10^{6} cfu/ml باشد که مطابق با استاندارد ملی ایران ، این دو پارامتر در محدوده مجاز بودند. از طرفی عدم فعالیت همولیتیک و هیدرولیز ال-آرژانین باید منفی باشد که این دو پارامتر نیز در محدوده بوده و مغایرتی با استاندارد ملی ایران نداشتند. بنابراین با توجه به آزمون‌های ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* جدول ۱، ثابت گردید که باکتری‌های جدا شده از عسل موجود در معده زنبور عسل یعنی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* دارای خصوصیات پروبیوتیکی بودند.

Table 1 Evaluation of probiotic strains of *lactobacillus plantarum* and *lactobacillus pentosus* isolate from honey in the stomach of the bee

Characteristics		*lactobacillus plantarum*	*lactobacillus pentosus*	Standard level
Acid resistance	**pH 2.5**	29×10^{5} cfu/ml	211×10^{4} cfu/ml	More than 10^{6} cfu/ml
	pH 4	171×10^{5} cfu/ml	98×10^{5} cfu/ml	
Resistance to bile salts		0.323	0.218	Equal or less than 0.4
Resistance to digestive fluid (Pepsin, trypsin)		10^{6} cfu/ml	10^{6} cfu/ml	More than 10^{6} cfu/m
Hemolytic inactivity		Negative	Negative	Negative
Hydrolysis of L-Arginine		Negative	Negative	Negative
Cell counts of probiotic microorganisms		10^{6} cfu/ml	10^{6} cfu/ml	More than 10^{6} cfu/m

۳-۲- بررسی زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک (Log CFU/ml) نمونه‌های ماست پروبیوتیک همزده

جدول ۲ زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک (Log CFU/ml) نمونه-های ماست پروبیوتیک همزده طی ۲۸ روز نگهداری در دمای ٤°C را نشان می‌دهد. مطابق با نتایج میزان زنده‌مانی تمامی تیمارهای مورد بررسی طی دوره نگهداری به صورت معنی‌داری

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

($p\leq$۰/۰۵) کاهش یافت. نتایج نشان داد بالاترین میزان زنده‌مانی پس از ۲۸ روز نگهداری متعلق به نمونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (٦/٦٣ Log CFU/ml) و پایین‌ترین آن متعلق به نمونه ماست حاوی *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* (٦/٢٧ Log CFU/ml) بود که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار ($p>$۰/۰۵) نبود.

وانگ و همکاران (۲۰۰۳) نیز در بررسی استفاده از مخلوط پروبیوتیک‌ها در تهیه و فرمولاسیون ماست پروبیوتیک دریافتند که استفاده از مخلوط پروبیوتیک به جهت اثرات تقویتی و سینرژبستی باکتری‌های پروبیوتیک میزان بقاء و زنده‌مانی را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت [۲۲].

شین و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند میزان پایداری بیفیدوباکتریوم و باکتریهای اسید لاکتیک در شیر یا ماست تا زمان انقضا (۲۱ روز پس از تولید) 10^{6} کلنی در هر گرم است که حداقل مقدار ممکن را برای داشتن اثرات سلامتی بخش دارا می‌باشند [۲۳].

Table 3 Effect of adding *lactobacillus plantarum* and *lactobacillus pentosus* on the dry matter and viability of stirred yoghurt[1]

Samples	Dry matter (%)			Viability (Cfu/ml)		
	Day 1	Day 14	Day 28	Day 1	Day 14	Day 28
Control	12.19 ± 0.07^{aA}	12.72 ± 0.07^{aB}	12.56 ± 0.11^{aB}	-	-	-
Lactobacillus plantarum	13.11 ± 0.06^{abA}	12.65 ± 0.02^{aB}	12.50 ± 0.12^{aB}	7.72 ± 0.03^{aA}	7.40 ± 0.12^{aA}	6.63 ± 0.08^{aB}
Lactobacillus pentosus	12.90 ± 0.07^{abA}	12.65 ± 0.15^{aAB}	12.41 ± 0.13^{aB}	7.42 ± 0.04^{bA}	7.74 ± 0.13^{bB}	6.27 ± 0.04^{aC}
Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus pentosus	12.84 ± 0.11^{bA}	12.59 ± 0.08^{aAB}	12.42 ± 0.07^{aB}	7.50 ± 0.09^{abA}	7.08 ± 0.09^{abAB}	6.48 ± 0.33^{aB}

1. Results are shown as mean ± standard deviation.
The small letters shows a significant ($p \leq 0.05$) difference in each column.

۳-۳- بررسی خواص حسی نمونه‌های ماست پروبیوتیک همزده

جدول ۳ امتیاز خواص حسی نمونه‌های ماست پروبیوتیک همزده طی ۲۸ روز نگهداری در دمای ٤°C را نشان می‌دهد. بررسی نتایج ارزیابی حسی نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین خصوصیات حسی تیمارها وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش مدت زمان نگهداری و همچنین افزایش میزان جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در نمونه ماست حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم همراه لاکتوباسیلوس پنتوسوس*، بافت، طعم و مزه و عطر و بو تیمارها دستخوش تغییر می‌شوند و خصوصیات بافت و طعم و مزه نمونه‌ها بطور معنی‌داری کاهش و عطر و بو افزایش یافت ($p\leq$۰/۰۵). در واقع با افزایش میزان اسیدیته تیمارها خصوصیات طعم تیمارها نیز به طور معنی‌داری کاهش نشان داد ($p\leq$۰/۰۵). در حالیکه در صورت استفاده از باکتریهای پروبیوتیک و بخصوص *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* امتیاز عطر و بو افزایش نشان داد. از طرفی افزایش مدت زمان نگهداری و همچنین افزایش میزان جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک، بر روی رنگ اثر معنی‌داری نداشت ($p>$۰/۰۵).

در تحقیق که توسط بلوریان و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی اثر تخمیر لاکتیکی با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر ویژگی های پوسته نان نیمه‌حجیم (باگت) صورت پذیرفت نشان داده شد که بیشترین میزان امتیاز عطر و آروما به تیمار با بالاترین درصد استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تعلق گرفت. حضور آنزیمهای پروتئولیتیکی در سیستم خمیرترش پروتئینهای مختلف را تجزیه می‌کند. بر اثر پروتئولیز، اسیدهای آمینه آزاد بوجود می‌آید که ازعوامل بوجودآورنده عطر و طعم می‌باشند. البته بالابودن اسید آمینه به تنهایی نمی‌تواند آرومای خوب بوجود آورد. آلدئیدها و کتون‌ها نقش تعیین کننده‌ای در مواد معطر نان دارند و به عنوان پایه اصلی تولید مواد معطر شناخته می‌شوند [٢٤].

باکتری‌های لاکتیکی می‌توانند مواد معطر متفاوتی از جمله دی‌استیل، استالدئید، هگزانال و اتیل‌استات تولید کنند. ویژگی‌های اصلی (عطر و طعم خمیرترش و تولید متابولیت‌های مناسب) تابع گونهٔ میکروبی مورد استفاده، مواد خام و فراهم بودن کربوهیدرات و چگونگی فرایند تولید می‌باشد [٢٤].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

Table 3 Evaluation of texture, color and taste and flavor of probiotic stirred yogurt containing *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* [1]

Samples	Taste and Flavor			Color			Texture		
	Day1	Day14	Day28	Day1	Day14	Day28	Day1	Day14	Day28
Control	6.63±0.16^{aA}	6.52±0.34^{abA}	5.95±0.26^{aA}	7.81±0.02^{aA}	7.73±0.16^{aA}	7.58±0.19^{aA}	6.64±0.20^{aA}	6.47±0.09^{bA}	5.90±0.32^{abA}
Lactobacillus plantarum	6.84±0.09^{aA}	6.79±0.12^{abA}	6.29±0.19^{aA}	7.71±0.10^{aA}	7.72±0.02^{aA}	7.62±0.28^{aA}	7.14±0.32^{aA}	7.11±0.20^{aA}	6.53±0.25^{aA}
Lactobacillus pentosus	6.90±0.36^{aA}	6.97±0.31^{aA}	6.32±0.09^{aA}	7.98±0.19^{aA}	7.70±0.03^{aA}	7.58±0.32^{aA}	6.94±0.26^{aA}	6.93±0.30^{abA}	6.27±0.23^{abA}
Lactobacillus plantarum +Lactobacillus pentosus	6.11±0.14^{aA}	5.79±0.16^{bAB}	5.04±0.26^{bB}	7.73±0.08^{aA}	7.52±0.09^{aA}	7.44±0.26^{aA}	6.31±0.14^{aA}	6.19±0.13^{bA}	5.41±0.04^{bB}

1. Results are shown as mean ± standard deviation.
The small letters shows a significant ($p \leq 0.05$) difference in each column.

لی و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی اثر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در خصوصیات تخمیری ماست پرداختند و مشاهده نمودند که افزودن این باکتری هیچ اثر منفی بر خصوصیات حسی شیر تخمیری نداشت و حتی تغییر آشکاری در کیفیت کلی شیر تخمیری مشاهده شد که علل خصوص در بافت (چسبندگی) و ترکیبات طعم دهنده فرار (استالدئید) بود [۲۵].

نعیمی و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی تاثیر افزودن اینولین و فرآیند ریزپوشانی بر میزان زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در طول دوره نگهداری ماست بستنی سین‌بیوتیک به نتایج مشابهی دست یافتند که با افزایش میزان اسیدیته میزان مطلوبیت طعم و مزه به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p \leq ۰/۰۵$) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت [۲۶].

دمای گرمخانه‌گذاری از عوامل تعیین کننده در بافت و به طور خاص، طعم فرآورده می‌باشد که از یک سو به طور گزینشی سبب غالب شدن یک یا چند باکتری آغازگر نسبت به سایر آغازگرها می‌شود و از طرف دیگر بر قابلیت اسیدسازی و رایحه‌سازی تمامی ریززنده‌های آغازگر اثر می‌گذارد. در کشتهای پروبیوتیک حاوی باکتریهای ماست، دماهای گرمخانه‌گذاری پایین‌تر موجب کاهش کیفیت حسی فرآورده به ویژه طعم (مهمترین ویژگی در ارزیابی حسی در فرآورده ماست) آن می‌شود. در چنین شرایطی طعم گسی و بوی اتانولی در فرآورده محسوس است [۲۷].

گراته‌پانچ و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که مقادیر بالای باکتری‌های اسید لاکتیک و *بیفیدوباکتریوم* در پنیر به علت تولید ترکیبات نامطلوب سولفیدی دارای اثرات منفی روی خصوصیات حسی این فرآورده می‌باشد که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت نشان داد [۲۸].

٤- نتیجه‌گیری کلی

این تحقیق با هدف استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس پنتوسوس* جدا شده از زنبور عسل در تهیه ماست همزده مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که نتایج نشان داد هردو باکتری پروبیوتیک خواص پروبیوتیکی مطلوبی را در ماست نشان دادند و قابلیت زنده‌مانی مطلوبی طی ۲۸ روز نگهداری (بالاتر از $۱۰^{٦}$ cfu/ml) در تمامی تیمارهای ماست داشتند. نتایج نشان داد افزایش مدت زمان نگهداری منجر به کاهش امتیاز حسی ماست‌های پروبیوتیک طی دوره نگهداری گردید. مطابق با نتایج استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بالاترین میزان زنده‌مانی را پس از ۲۸ روز نشان داد و از آن جایی که دارای بالاترین امتیاز طعم و مزه نیز بود بنابراین تیمار مذکور به عنوان تیمار بهینه انتخاب گردید.

٥- منابع

[1] FAO food and nutrition paper. 2001. Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Argentina.

[2] Kalantari, S., Alizadeh Khaled Abad, M., and Zomorodi, Sh. 2011. Effect of tarragon and dill essential oils on qualitative properties of probiotic yoghurt. Master's thesis, Faculty of the International Campus Aras. Tabriz University. (In Persian)

[3] Wang, K.Y., Li, S.N., Liu, C.S., Perng, D.S., Su, Y.C., Wu, D.C., Jan, C.M., Lai, C.H., Wang, T.N., and Wang, W.M. 2004. Effects of ingesting Lactobacillus-and Bifidobactrium-

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

containing yogurt in subjects with colonized Helicobacter pylori. American Journal of Clinical Nutrition. 80: 3. 737-741.

[4] Coisson, J.D., Travaglia, F., Piana, G., Capasso, M., and Arlorio, M. 2005. Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt. Food Research International. 38: 8-9. 893–897.

[5] Aghajani, A.R., Pourahmad, R., Mahdavi Adeli, H. R. 2012. Evaluation of Physicochemical Changes and Survival of Probiotic Bacteria in Synbiotic Yoghurt. Journal of Food Biosciences and Technology. 2. 13-22.

[6]De Rodas, B.Z., Gilliland, S.E., and Maxwell, C.V. 1996. Hyoholesterolei action of *Lactobacillus acidophilus ATTC 43121* and calcium in swing with hypercholesterolemia induced by diet. Journal of Dairy Science. 79: 12. 2121-2128.

[7] Aghili, S., and Fersi, M. 2004. Internal and external microbes of healthy honey bee. Veterinary Department of Chaharmahal and Bakhtiari province. 1-10. (In Persian)

[8] Kailasapathy, K., Harmstorf, I., and Phillips, M. 2008. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* in stirred fruit yoghurts. LWT –Food Science and Technology. 41: 7. 1317–1322.

[9] Pattabhiramaiah, M., Reddy, M.S., and Brueckner, D. 2012. Detection of novel probiotic bacterium *Lactobacillus* spp. in the workers of Indian honeybee, Apis cerana indica. International Journal of Environmental Sciences. 2: 3. 1135-1143.

[10] Tajabadi, N., Mardan, M., Shahaimi, M., Feizabadi, F., Nateghi, L., and Rasti,B. 2012. Novel lactic bacterium isolated from honey. Journal of Food Agriculture and Environment. 10: 2. 263-267.

[11] Veissi, M., Vakili, M., Jarah Zadeh, M., Delaviz, E., Hardani,A., and Mohammadi, F. 2014. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in Probiotic Yogurts. Jundishapur Scientific Medical Journal. 13:3. 357-364. (In Persian)

[12] Mehraban Sangatash, M., Karazhyan, R., Hadad Khodaparast, M.H., Habibi Najafi, M.B., and Beiraghi Toosi, S. 2007. Effect of Essential Oil and Extract of Ziziphora Clinopodioides on Yoghurt Starter Culture Activity. Journal of Food Science and Technology. 3:4. 47-55. (In Persian)

[13] Aghajani, A.R., Pourahmad, R., and Mahdavi Adeli, H. R. 2011. The Effect of Prebiotics on Probiotic Yogurt Containing *Lactobacillus casei*. Food Technology and Nutrition. 8:4. 73-83. (In Persian)

[14] Al-Saleh, A., Metwalli, A., Abu-Tarboush, H. 2006. Bile salts and acid tolerance and cholesterol removal from media by some lactic acid bacteria and Bifidobacteria. Journal Saudi Society for Food and Nutrition. 1:1.1-17.

[15] Başyiğit, G., Kuleaşan, H., and Karahan, A.G. 2006. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 33: 9. 796-800.

[16] Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H.S. 2001. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. International Journal of Food Microbiology. 67:3. 207-216.

[17] Stamatova, I., and Meurman, J.H. 2009. Probiotics and periodontal disease. Periodontology. 51: 1. 141-151.

[18] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2013. Probiotic microorganisms - features and test methods, No. 19459.

[19] Mousavi, Z. E. S., Mousavi, S.H., and Razavi, Z. 2011. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. world journal biotechnol. 27: 1. 123-128.

[20] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2007. Milk and its products - Determination of acidity and pH - Test method, No. 2852.

[21] Luckow, T., Sheehan, V., fitzgerald, G., and declahunty, C. 2006. Exposure health in formation and flavor masking strategics for improving the sensory quality of probiotic juice. Appetitle. 47: 3. 315-323.

[22] Wang, Y.C., Yu, R.C., Yang, H.Y., and Chou, C.C. 2003. Suger and Acid Contents in Soymilk Fermented Will Lactic Acid Bacteria

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

alone or Simultaneously with Bifidobacteria. Food Microbiology. 20: 3. 333-338.

[23] Shin, H.S., Lee, J.H., Pestka, J.J., and Ustunol, Z. 2000. Viability of bifidobacteria in commercial dairy prouducts during refrigerated storage. Journal of Food Protection. 63: 3. 327-331.

[24] Bolourian, Sh., Haddad Khodaparast, M. H., Goli Movahhed, Gh., and Afshary, M. 2010. Effect of lactic fermentation (*Lactobacillus plantarum*) on physicochemical, flavor, staling and crust properties of semi volume bread (bagget). Journal of Food Science and Technology. 7: 3. 33-39. (In Persian)

[25] Li, Ch., Song, J., Kwok, L.Y., Wang, J., Dong, Y., Yu, H., Hou, Q., Zhang, H., and Chen, Y. 2017. Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent changes during postfermentation storage. Journal of Dairy Science. 100: 4. 1-14.

[26] Naeemi, H., Mortazavi, S. A., Milani, E., and Koochaki, A. 2013. The influence of adding Inulin and Encapsulation on survivability *lactobacillus casei* storage of synbiotic yoghurt. Journal of Food Science and Technology. 40:10. 27-36. (In Persian)

[27] Mortazavian, A.M., Khosrokhavar, R., and Rastegar, H. 2010. Effect of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of doogh (Iranian fermented milk drink). Italian journal of food science. 22: 1. 98-104.

[28] Grattepanche, F., Miescher-Schwenninger, S., Meile, L., and Lacroix, C.H. 2008. Recent Developments in Cheese Cultures With Protective and Probiotic Functionalities. Dairy Science and Technology. 88: 4-5. 421-444.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

Study the effect of adding *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* isolated from honey of the bee stomach to stirred yoghurt

Sadeghiyan Loderijeh, B. [1], Nateghi, L. [2*]

1. Master, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

(Received: 2018/06/30 Accepted:2019/01/09)

Bumblebee is a useful insect that plays an important role in pollinating by nature. Gastrointestinal digestive tract has symbiotic microorganisms. The use of probiotic supplements in the beekeeping industry increases the rate of growth and improves feed conversion and improves resistance to disease and increases the production of honey. The purpose of current study was to investigate the effect of adding two bacteria of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* isolated from honey in the bee stomach to stirred yoghurt and its viability and its effect on physico-chemical and sensory properties of stirred yogurt. In this study, probiotic properties of *Lactobacillus Pentosus* and *Lactobacillus plantarum* isolated from honey in the bee stomach, including resistance to acid, resistance to bile salts (bile), resistance to gastric juice (pepsin, trypsin), lack of hemolytic activity, hydrolyzed alanine was studied. Four treatments were designed according to a completely randomized design and the results of the tests were analyzed by Duncan's mean comparison test at %95 confidence level by Minitab 16 software. The results showed that both probiotic bacteria showed probiotic properties and with increase in storage time, the sensory properties significantly ($p \leq 0.05$) decreased. The highest score of texture and color were belonged to the treatments containing *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus*. The survival rate of probiotic bacteria in all treatments decreased during storage, and the highest survival rate after 28 days of storage belonged to the inoculated sample with *Lactobacillus plantarum* which had also the lowest acidity. Also, in terms of sensory properties, this treatment had the highest taste and flavor. According to the results stirred yogurt inoculated with *Lactobacillus plantarum* was selected as optimum treatment for the highest survival and sensory properties.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, Probiotic yogurt

* Corresponding Author E-Mail Address: leylanateghi@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]