

بررسی اثر چند ترکیب پری بیوتیکی بر زنده ماندن باکتری‌های پروبیوتیک بیفیدو باکتر لاکتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شیر پاستوریزه‌ی تخمیر نشده

مأده محسنی^۱، محمد رضا احسانی^۲، علی محمدی ثانی^{۳*}

^۱ دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان

^۲ استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

^۳ استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۵

چکیده

هدف از انجام این تحقیق، تولید شیر سن بیوتیک با ویژگی‌های حسی طبیعی و غیرتخمیری و بررسی تاثیر پری بیوتیک‌های اینولین، لاکتولوز، گالاکتوالیگو ساکارید و اینولین به صورت مخلوط بر شمارش سویه‌های پروبیوتیکی شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La 5) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (Bb 12) در شیر پاستوریزه شده و خنک شده بود. برای تحقق هدف پژوهش ترکیبات پری بیوتیکی ذکر شده به ترتیب در مقادیر ۰/۶٪، ۰/۴٪ و ۱/۶٪ و کشت پروبیوتیکی 10^9 cfu/ml به میزان ۰/۰۱ درصد به صورت جداگانه و مخلوط به شیر ۲/۵ درصد چربی در خط تولید شیر پاستوریزه در شرکت پگاه تهران اضافه گردید به گونه‌ای که شمارش باکتریایی به مضر بی از 10^7 cfu/ml برسد سپس ویژگی‌های شیمیایی محصول و بررسی بقاء میکروبی با شمارش آن‌ها در مدت ۱۰ روز نگهداری شیر در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و فواصل زمانی ۰، ۳، ۷ و ۱۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به غیرتخمیری بودن محصول، افزایش زیادی در جمعیت باکتری مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، پری بیوتیک، سن بیوتیک، شیر، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتر لاکتیس.

۱- مقدمه

پری بیوتیک‌ها، غذای مطلوب پروبیوتیک‌ها بوده، در افزایش تعداد و بقای میکروب‌ها نقش مثبتی دارند. شمار این نوع فرآورده‌ها که در یک دهه‌ی گذشته محدود بوده است امروز افزایش چشم‌گیری یافته و ادامه دارد. توانایی این لیگوساکارید برای تغییر میکروفلور روده به سود ریز زنده‌های مفید (مانند پروبیوتیک‌ها و به ویژه بیفیدوباکترها) به اثبات رسیده است. فروکتوالیگوساکاریدها، لاکتولوز و گالاکتو لیگوساکاریدها از جمله پری بیوتیک‌های رایج به شمار می‌آیند. این عوامل به دلیل توانایی تغییر میکروفلور روده‌ی انسان پس از یک دوره‌ی کوتاه مصرف به طور گسترده‌ای در اروپا مورد استفاده قرار گرفته‌اند. شاخص تخمیر پری بیوتیک‌ها توسط باکتری‌های مفید تولید اسیدهای چرب با زنجیر کوتاه (استات/ پروپیونات و بوتیرات) هیدروژن و دی اکسید کربن است (۵ و ۳).

در صورت استفاده توأم از عوامل پروبیوتیک و پری بیوتیک در یک فرآورده، اصطلاحاً به آن سیمبیوتیک گویند که تولید این فرآورده‌ها در کشورهای مختلف در دست بررسی است. تخمین زده شده است که در بازار جهانی حدود ۸۰٪ از محصولات محتوی گونه‌های بیفیدوباکتر و بیش از ۴۵٪ از انواع کارخانجات لبنی در اروپا مواد غذایی محتوی پروبیوتیک‌ها تولید می‌کنند (۸).

هدف از انجام این تحقیق، تولید شیر سیمبیوتیک با ویژگی‌های حسی غیرتخمیری و مشابه محصول عادی و بررسی تاثیر پری بیوتیک‌های اینولین، لاکتولوز، گالاکتوالیگوساکارید و اینولین به صورت مخلوط بر زنده‌مانی سویه‌های پروبیوتیکی شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La5) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (Bb 12) در شیر پاستوریزه بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده سازی نمونه‌ها

شیر خام با شمارش باکتریایی کم‌تر از 10^6 cfu/ml در کارخانه‌ی پگاه تهران مورد استفاده قرار گرفت. پس از تنظیم چربی به میزان ۲/۵٪، عوامل پروبیوتیکی شامل اینولین (ساخت شرکت Orafit بلژیک)، گالاکتوالیگوساکارید (ساخت شرکت Frieslandfoods هلند) و لاکتولوز (ساخت شرکت Fresenius kabi استرالیا) به ترتیب در مقادیر ۰/۴٪، ۰/۶٪، ۰/۴٪

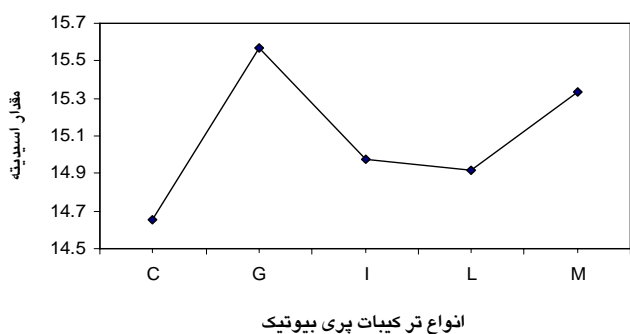
پروبیوتیک‌ها اجزاء غذایی از نوع میکروب‌های زنده هستند که اثرات مفیدی بر سلامت میزبان مصرف کننده شان به جای می‌گذارند (۱۵). معیارهای اصلی در انتخاب سویه‌های پروبیوتیکی شامل داشتن منشاء انسانی، مقاومت در برابر اسید و صفرای سیستم گوارش و قابلیت چسبیدن به دیواره‌ی روده و مقابله با میکروب‌های بیماری زای آن محیط می باشد (۴، ۱۰ و ۱۴). طبیعی است که تعادل میکروبی مناسب در سیستم گوارش انسان مرتبط با تغذیه صحیح بوده، اثرات بسیار مهمی در سلامت مصرف کنندگان دارند (۱۳). تعادل میکروبی دستگاه گوارش می‌تواند تحت تاثیر عوامل زیادی از جمله بیماری، استرس، سن، رژیم غذایی، شرایط جغرافیایی و برخی عوامل دیگر برهم خورده و در نتیجه اختلالاتی را در سلامت فرد به وجود آورد. لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها در حفظ این تعادل میکروبی در درجه‌ی اول اهمیت قرار دارند. این میکروارگانیسم‌ها جزو خانواده‌ی باکتری‌های لاکتیکی هستند که استفاده از آن‌ها پیشینه‌ی طولانی دارد؛ از این رو ایمن بودن آن‌ها کاملاً محرز گشته است. امروزه لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها بخش اعظمی از کشت‌های آغازگر پروبیوتیکی را تشکیل می‌دهد (۸ و ۱۲) و به شکل گسترده‌ای از آن‌ها در تولید فرآورده‌های غذایی پروبیوتیکی استفاده می‌شود (۶، ۷ و ۱۱). این فرآورده‌ها اغلب از نوع لبنی هستند چرا که شیر ضمن داشتن ارزش تغذیه‌ای فوق‌العاده، ماتریکس مناسبی برای این میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌آورد.

واحد ایمنی مواد غذایی سازمان بهداشت جهانی، اولویت بالایی را به تحقیقات در زمینه‌ی تخمیر به عنوان یک تکنیک جهت تهیه و نگهداری غذا داده است، زیرا در کشورهای در حال توسعه، یک دهم کودکان زیر پنج سال به دلیل از دست دادن آب بدن، جان خود را از دست می‌دهند. از دست دادن آب، اساساً به علت شیوع اسهال است و از دلایل ابتلاء به اسهال، دریافت غذاهایی است که استاندارد مطابق با شرایط بهداشتی را ندارند. استاندارد بهداشتی یک ماده‌ی غذایی براساس فرآیند و شرایط ماده‌ی خام است و تخمیر لاکتیکی غذا به عنوان یک فرآیند استاندارد عامل کاهش خطر رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در غذا شناخته شده است (۳).

۳- نتایج و بحث

با توجه به آنالیزهای آماری صورت گرفته بر روی نمونه‌های شیری سیمبیوتیک، نتایج بیانگر این مطلب است که هر کدام از ترکیبات پری بیوتیک بر روی خصوصیات میکروبی و شیمیایی نمونه‌ها تاثیر متفاوتی داشته، باکتری‌های پروبیوتیک نیز به تنهایی و یا به صورت مخلوط (۳۰٪) اثر مشخصی داشته‌اند. نمونه‌های شیر سیمبیوتیکی در طی زمان نگه‌داری اختلاف معنی‌دار داشته و بعد از گذشت ۱۰ روز تفاوت آن‌ها مشخص‌تر می‌شود. گرچه تغییرات pH نمونه‌ها بسیار اندک بوده است ولی در بین پری بیوتیک‌ها نمونه‌ی گالاتو الیگوساکارید دارای بیش‌ترین کاهش pH (۶/۶۸) و نمونه‌ی شاهد کم‌ترین کاهش (۶/۷۲) را داشته است (شکل ۱). تمام نمونه‌ها در روز سوم دارای افزایش pH بوده، سپس به حالت عادی برگشته و سرانجام روند نزولی داشته‌اند. علت افزایش pH را می‌توان به تولید گازها و تغییرات آن‌ها و به ویژه اکسیژن و کاهش گاز دی‌اکسید کربن در اثر به هم خوردن و جابجایی، نسبت داد. این اتفاق در شیر پاستوریزه به صورت ناپیوسته روی می‌دهد.

تغییرات اسیدیته، رابطه‌ی معکوس با عامل pH دارد (شکل ۲). گالاتو الیگوساکارید در بین نمونه‌ها حداکثر افزایش اسیدیته و نمونه شاهد کم‌ترین کاهش اسیدیته را داشته است.



شکل ۱- مقدار اسیدیته‌ی نمونه‌های شیر نگه‌داری شده در شرایط دمایی یخچالی حاوی پریبیوتیک‌های مختلف (M: مخلوط پری بیوتیکی (لاکتولوز، گالاتو الیگوساکارید و اینولین)، C: شاهد، G: گالاتو الیگوساکارید و L: لاکتولوز)

و ۱/۶٪ در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به شیر اضافه و به صورت دستی مخلوط گردیدند. هموژنیزاسیون در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت فشار ۱۷۰ بار و پاستوریزاسیون در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. نمونه‌های شیر تولیدی تا دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با روش حمام آب یخ، خنک گردیده، سپس آغازگر تک‌سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (Bb 12) (ساخت شرکت Chr. Hansen دانمارک) که به صورت لیوفیلیزه موجود است، در مقادیر ۰/۰۱ درصد (وزنی/وزنی) به صورت جدا و ترکیب دو باکتری به نسبت ۱ به ۱ به نمونه‌ها اضافه گردید به گونه‌ای که شمارش باکتریایی مورد نظر در محدوده $10^6 - 10^7$ cfu/ml باشد.

۲-۲- آزمون‌های شیمیایی و میکروبی

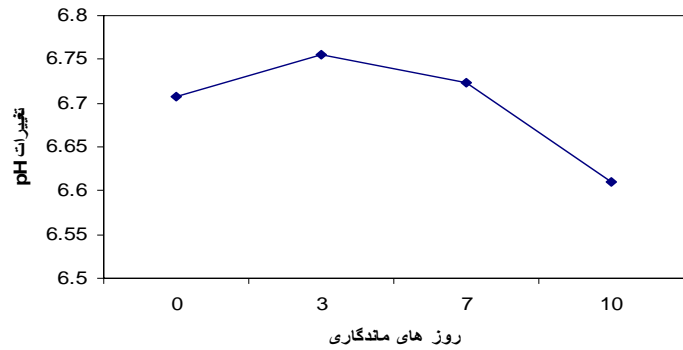
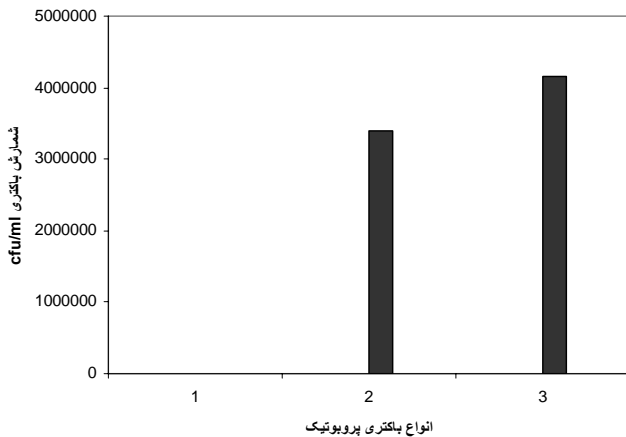
آزمون‌های شیمیایی شامل اندازه‌گیری اسیدیته بر حسب درجه‌ی دورنیک و سنجش pH طبق روش استاندارد ملی ایران به شماره‌ی ۲۸۵۲ و آزمون میکروبی شامل کشت نمونه‌ها در محیط MRS آگار (مرک آلمان) طبق استاندارد ملی ایران به شماره‌ی ۱۱۳۲۵ انجام گردید.

۲-۳- ارزیابی حسی

از ۱۰ نفر ارزیاب حسی آموزش دیده در کارخانه‌ی پگاه تهران برای این منظور استفاده شد. بدین صورت که دو تیمار، انتخاب و از نظر عطر، بو، طعم و مزه مورد بررسی قرار داده شد. نمونه‌ها به ترتیب شامل پری بیوتیک گالاتو الیگوساکارید به همراه هر دو باکتری پروبیوتیک و نمونه‌ی دیگر فقط شامل باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیل بود. در این آزمون، نمونه شیر ۲/۵٪ چربی پاستوریزه به عنوان نمونه‌ی شاهد انتخاب گردید.

۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از شمارش میکروبی، آزمون‌های شیمیایی و ارزیابی حسی توسط نرم‌افزار آماری ANOVA و نتایج حاصله به روش تجزیه واریانس با احتساب دامنه‌ی اطمینان ۹۵ درصد مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند. جهت ارزیابی مقبولیت محصول از آزمون هدونیک (هفت نقطه‌ای با یک نقطه تعادل) استفاده شد.



شکل ۲- میانگین روند تغییرات pH در شیرهای سیمبیوتیک نگه داری شده در شرایط یخچالی در طی روزهای نگه داری ۰، ۳، ۷ و ۱۰ روز

شکل ۳- رشد میکروبی باکتری بیفیدو باکتر در سه حالت: ۱= لاکتو باسیل ۲- بیفیدو باکتر ۳- هر دو باکتری (در تیمار ۱ به علت اینکه از باکتری بیفیدو باکتر استفاده نشده است جمعیت این باکتری صفر بوده است)

تاکنون در کارهای متعددی، تولید فرآورده شیری پروبیوتیکی تجربه شده و در بسیاری از موارد محصولات روانه بازار مصرف شده‌اند. بیشترین توجه معطوف به تولید فرآورده تخمیری پروبیوتیکی مانند ماست بوده است. کوشش‌هایی نیز در زمینه تولید شیر مایع پروبیوتیکی به عمل آمده اما با توجه به انجام تخمیر و تغییر طعم نتوانسته است مورد توجه مصرف کنندگان قرار گیرد. در این پژوهش سعی شد که شیر پاستوریزه پروبیوتیکی تولید شود بدون اینکه در آن تخمیری صورت بگیرد که مثلاً با تولید اسید لاکتیک طعم فرآورده را تحت تاثیر قرار دهد و به همین لحاظ تزریق باکتری‌های پروبیوتیک در دمای زیر ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شده و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نیز نگهداری شده و با اضافه کردن ترکیبات پری بیوتیکی زمینه رشد میکروبی‌های مطلوب در دستگاه گوارش تامین شده است مصرف چنین فرآورده‌ای شرایطی را در دستگاه گوارش به وجود می‌آورد که در نهایت مانع رشد کلستریدیوم‌های تولید کننده سم، باکتریودس‌های پروتئولیتیک و /شرشیا کلای توکسیژنیک می‌شود(۱۲).

مصرف مستمر چنین فرآورده‌هایی شرایطی را فراهم می‌سازد که باکتری‌های پروبیوتیک در روده استقرار یافته و با توجه به تولید متابولیت‌های مفید مانع رشد میکروبی‌هایی می‌شوند که علاوه بر تولید ترکیبات نامطلوب از مشکلات مصرف کننده به ویژه در سنین بالا جلوگیری می‌کند(۳، ۷ و ۱۷).

ترکیبات پری بیوتیکی بر روی روند رشد باکتری‌های پروبیوتیک تاثیر گذاشته است. از آن‌جا که پری بیوتیک‌ها بیفیدوژنیک می‌باشند و بیش‌ترین اثر را بر روی باکتری بیفیدوباکتر دارند و بر افزایش جمعیت این نوع از باکتری پروبیوتیک موثرتر می‌باشند. فاکتورهای بیفیدوژنیک ترکیباتی با ماهیت کربوهیدرات هستند که طی متابولیسم مستقیم در بدن میزبان به جای مانده و در روده بزرگ به عنوان منبع انرژی توسط بیفیدوباکترها مصرف می‌گردند. در این‌جا نیز بیفیدوباکتر در مقایسه با لاکتوباسیل تحت تاثیر مثبت ترکیبات پری بیوتیکی قرار گرفته است. استفاده همزمان از بیفیدوباکتر همراه لاکتوباسیل در محصول، موجب افزایش رشد بیفیدوباکتر شده است (شکل ۳). در صورتی که این حالت همزیستی بیفیدو باکترها در لاکتوباسیل چشمگیر نمی‌باشد.

اگر چه شیر به دلیل فقر مواد نیتروژنی آزاد محیط مناسبی برای رشد پروبیوتیک‌ها نیست(۹) ولی با این حال لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به دلیل داشتن فعالیت پروتئولیتیکی رضایت‌بخش‌تری نسبت به دیگر باکتری‌های پروبیوتیکی مثل بیفیدوباکترها، بعد از گذشت زمان کافی با تامین مواد نیتروژنی آزاد از طریق پروتئولیز پروتئین‌های شیر، رشد مطلوب‌تری پیدا کرده و جمعیتش زیادتر می‌شود(۱۶). محققان دیگری نیز روند رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را در شیر بررسی نموده و به این نتیجه رسیده‌اند که با گذشت ۱۲ الی ۲۴ ساعت از زمان گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جمعیت این باکتری به بالاترین حد خود می‌رسد(۱).

در تداوم این پژوهش می‌توان آثار دراز مدت مصرف آن را بررسی نمود. می‌توان انتظار داشت که انتقال مقادیر عظیم باکتری‌های پروبیوتیک در شرایطی که غذای مناسب خود را در اختیار دارند به روده منجر به افزایش این میکروب‌ها و متقابلاً کاهش میکروب‌های نامناسب تولید کننده‌ی گاز شود. وجود پری بیوتیک‌ها نه تنها منجر به افزایش این میکروب‌ها می‌شود بلکه به پروبیوتیک‌های بومی دستگاه گوارش نیز کمک می‌کند که با سرعت بیشتری به رشد خود ادامه داده و تناسب میکروب‌های دستگاه گوارش را به سمت غالب شدن باکتری‌های مطلوب و سلامت زا در مدت کوتاه‌تری تغییر دهد.

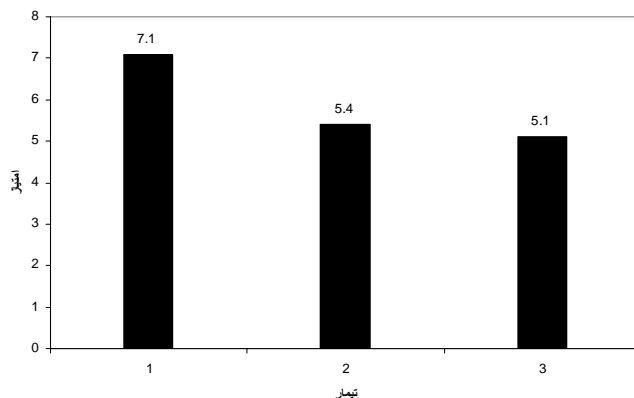
۵- سپاسگزاری

بدین وسیله از شرکت سهامی صنایع شیر ایران که تامین کلیه تسهیلات اعتباری و اجرایی این طرح را بر عهده داشته است قدردانی می‌شود.

۶- منابع

- 1- Baron, M. , Roy, D. and Vuillemard, J. C. 2000. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic acid starters and bifidobacteria, *Lait* , 80: 465-478.
- 2-Cristina, M. I, Alejandra, C. 2008. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 :540- 544.
- 3-Gibson, G. R. , Ottaway, P. B. , and Rastall, R. A. 2000. *Prebiotics ; new development in functional foods*. Chandos Publishing, (Oxford) , Limited, pp. 1-49.
- 4-Havenaar, R. , Ten_Brink, B. and Huis In't Veld, J. H. J. 1992. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics*. The Scientific Basis. Chapman and Hall, London, pp. 209-224.
- 5-Mattila-Sandholm, T. , and Saarela, M. 2003. *Functional dairy products*. CRC Press, p. 221-233.
- 6-Mital, B. K. and Garg, S. K. 1992. Acidophilus milk products : Manufacture and therapeutics. *Food Reviews International*, 8:347-389.
- 7-Molder, H. W. 1990. Bifidobacteria and Bifidogenic factors. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 231: 29-41.
- 8-Oliveiraa, M. N. , Sodinib, I. ,Remeufb, F. and Corrieub, G. 2001. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of

در ارزیابی حسی که بین تیمارها (نمونه گالاکتو الیگوساکارید به همراه دو باکتری پروبیوتیک، نمونه حاوی باکتری لاکتو باسیل و نمونه شاهد) نمونه حاوی گالاکتو الیگوساکارید به عنوان بهترین فرمولاسیون شناخته شد. از آنجایی که این پری بیوتیک از ترکیبات شیر استخراج شده است بیش‌ترین درصد پذیرش را داشت (۲).



شکل ۴- امتیاز حاصل از ارزیابی حسی در نمونه‌های مختلف (تیمار ۱: نمونه ی حاوی گالاکتوالیگوساکارید و دو سویه ی پروبیوتیکی، تیمار ۲: تیمار حاوی یک سویه ی پروبیوتیکی، تیمار ۳: نمونه ی شاهد)

۴- نتیجه‌گیری

در این بررسی از سه نوع پری بیوتیک و دو نوع پروبیوتیک استفاده شد که ترکیبات پری بیوتیکی به تنهایی و یا بصورت ترکیبی با باکتری‌ها همراه گردیدند. با توجه به عدم تخمیر در محصول و جلوگیری از کاهش pH و ترش شدن شیر، مدت ماندگاری محصول از لحاظ شمارش باکتری پروبیوتیک ۷ روز تعیین شد.

نتایج بدست آمده بیانگر این مطلب است که پری بیوتیک‌ها در دمای روده قابلیت تجزیه توسط باکتری را خواهند داشت و در سایر دماها قابل استفاده توسط باکتری پروبیوتیک نمی‌باشند. بنابر این با توجه به خواص تغذیه‌ای- درمانی فرآورده‌های شیری پروبیوتیکی لازم است که توجه بیشتری به تولید چنین فرآورده‌هایی برای مصرف تمام سنین اعم از کودکان و بزرگسالان گردیده و در راستای برنامه‌ی افزایش مصرف سرانه شیر و فرآورده‌های آن در معرفی و تبیین ارزش مصرف این دسته فرآورده‌ها اهتمام بیشتری صورت گیرد.

- fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11: 935–942.
- 9-Ostlie, H. M. , Treimo, J. and Narvhus, J. A. 2005. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk, *International Dairy Journal*, 15: 989-997.
- 10-Ouwehand, A. C. , Tuomola , E. M. , Tolkko , S. and Salminen, S. 2001. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology*, 64 : 119–126.
- 11-Patel, J. R. ,Dove, R. I. ,Sannabhati, S. S. And Dave, J. M. 1991. Use of Bifidobacteria in fermented dairy products. *Indian Dairyman* ,43: 181-190.
- 12-Richardson, D. 1996. Probiotics and product innovation. *Nutrition and Food Science*, 4: 27–33.
- 13-Rybka, S. and Kailasapathy, K. 1995. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 50(2): 51–57.
- 14-Salminen, S. , Laine, M. , von Wright, A. , Vuopio-Varkila, J. , Korhonen, T. and Mattila-Sandholm, T. 1996. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: A nordic and european approach. *Biosci. Microflora*, 15: 61–67.
- 15-Salminen, S. , Ouwehand, A. , Benno, Y. and Lee, Y. K. 1999. Probiotics: How should they be defined?, *International Dairy Journal*, 9: 623–630, 10: 107–110.
- 16-Shihata, A. and Shah, N. P. 2000. Proteolytic profiles of yoghurt and probiotic bacteria, *International Dairy Journal*, 10: 401- 408.
- 17-Zafar, T. A. , Weaver, C. M. , Zhao, Y. , Martin, B. R. and Wastney, M. E. 2004. Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. *American Society for Nutritional Science*, pp. 399-402.