

# دانشور پزشکی

## بررسی مقایسه‌ای شمارش سویه‌های لاکتوباسیلوس در طول زمان ماندگاری در چند نمونه ماست پروبیوتیک صنعتی

نویسندگان: احسان انصاریان<sup>۱</sup>، مریم کاظمی<sup>۲</sup>، محسن نعمتی<sup>۳\*</sup>، افشین  
آخوندزاده بستی<sup>۴</sup>، طناز موسوی<sup>۵</sup>

۱. دکترای عمومی دامپزشکی گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه  
آزاد اسلامی واحد گرمسار، ایران

۲. کارشناس ارشد گروه تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

۳. دانشیار گروه تغذیه، مراکز تحقیقات بیوشیمی تغذیه، سرطان و جراحی‌های آندوسکوپی  
کم تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

۴. استاد گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران

۵. استادیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی  
واحد گرمسار، ایران

E-mail: NematyM@mums.ac.ir

\* نویسنده مسئول: محسن نعمتی

### چکیده

مقدمه و هدف: لاکتوباسیلوس‌ها از میکروارگانیسم‌های اصلی ماست پروبیوتیک هستند که برای  
اثربخشی بالینی باید از نظر تعداد و میزان بقا در زمان ماندگاری ماست در حد مطلوب حفظ شوند. هدف  
این مطالعه ارزیابی شمارش لاکتوباسیلوس‌ها در چند نمونه ماست پروبیوتیک از برندهای معمول لبنی  
در زمان ماندگاری بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی ۵۰ نمونه ماست پروبیوتیک (۱۰ نمونه از ۵ برند) تهیه و  
کدگذاری شد. پس از کشت سطحی، کلونی‌های تمامی سویه‌های لاکتوباسیلوس در ۲ نوبت (۱: روز میانی  
و ۲: روز پیش از پایان دوره ماندگاری) شمارش شد و در نوبت دوم، pH نمونه‌ها نیز اندازه‌گیری شد.  
داده‌ها با نرم‌افزار SPSS آنالیز شد.

نتایج: میانگین شمارش لاکتوباسیلوس‌ها در ۴ برند ارزیابی‌شده در کشت نوبت ۲ کمتر از نوبت ۱ بود  
( $p \leq 0/002$ ). ماکزیمم لاکتوباسیلوس شمارش‌شده در تمامی نمونه‌ها کمتر از حداقل میزان توصیه‌شده-  
بود ( $p < 0/0001$ ) ( $CFU/mL$ ،  $10^6$  vs.  $2/9 \times 10^5$ ). pH اندازه‌گیری‌شده در تمامی نمونه‌ها در پایان دوره  
نگهداری از pH مطلوب کمتر بود ( $p < 0/0001$ ).

نتیجه‌گیری: کمتر بودن میانگین شمارش کولونی‌های لاکتوباسیلوس در مدت ماندگاری و بالاتر بودن  
اسیدیته نمونه‌ها در پایان دوره نگهداری در مقایسه با میزان مطلوب، خواص پروبیوتیک ماست‌های  
ارزیابی‌شده و احتمال اثربخشی بالینی آنها را به‌صورت جدی کاهش می‌دهد؛ علاوه بر آزمایش‌های کنترل  
کیفی منظم براساس پروتکل‌های کشوری استاندارد، انجام مطالعات گسترده‌تر در این زمینه پیشنهاد-  
می‌شود.

واژگان کلیدی: ماست، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، زمان ماندگاری

دوماهانامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیستم - شماره ۱۰۶  
شهریور ۱۳۹۲

دریافت: ۱۳۹۲/۴/۱  
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۲/۷/۵  
پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱۶

## مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و غیر-بیماری‌زای (۱) موجود در برخی از مواد غذایی‌اند که وقتی در مقادیر کافی به بدن، وارد شوند (۲) از طریق احیا و بازسازی فلور میکروبی دستگاه گوارش (۳) آثاری ارزشمند بر سلامت میزبان می‌گذارند (۴). پژوهش در زمینه پروبیوتیک‌ها از موضوع‌های روز علوم تغذیه و پزشکی به‌شمار می‌رود. گرچه توافق نظر قطعی در زمینه ساختار عمل پروبیوتیک‌ها (۵) وجود ندارد، عملکرد آنتی‌بیوتیکی آنها در زمان اتصال به اپیتلیوم روده کوچک و کولون، پیشگیری از تهاجم و عبور پاتوژن‌ها از سد روده‌ای، تعدیل مقاومت دفاعی لومن گوارشی از طریق کاهش سیتوکین‌های التهابی و تغییر پوشش سلولی روده از وضعیت پیش‌التهابی به ضدالتهابی از جمله برجسته‌ترین نظریه‌های پیشنهاد شده در این زمینه هستند (۵ و ۶).

از مهم‌ترین اندیکاسیون‌های بالینی پروبیوتیک‌ها می‌توان به افزایش ایمنی و مقاومت دفاعی (۷)، کاهش بروز و تسریع درمان اسهال، تسریع بهبود و افزایش طول دوره کمون و کاهش مدت و دفعات عود بیماری‌های التهابی روده (۸)، بهبود عدم تحمل لاکتوز و آلرژی‌های غذایی (۹) و درمان آتوپیک در نوزادان کودکان (۷) اشاره کرد.

غنی‌سازی غذاهای پرمصرف با میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مناسب و قابل اطمینان نظیر لبنیات، به‌ویژه ماست که از پرطرفدارترین آنها در ایران است (۱۰)، استقبال فزاینده متخصصان را به‌همراه داشته‌است. از مهم‌ترین پروبیوتیک‌ها که استارتر روند تولید ماست نیز به-شمار می‌آیند، بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس هستند که مصرف آنها به کاهش خطر بروز عفونت و بهبود تحمل گوارشی در بیماران بستری منجر شده‌است (۹ و ۱۱).

اگرچه شواهد بالینی متقنی در خصوص پایین‌ترین دوز میکروارگانیسم لازم برای اثربخشی معنی‌دار بالینی پروبیوتیک‌ها وجود ندارد، عموم متخصصان بر این باورند که یک ماده غذایی پروبیوتیک باید دست‌کم

حاوی چندین میلیون میکروارگانیسم باشد تا به جایگیری و کلونیزاسیون کافی در روده منجر شود (۱). اغلب منابع دوز قابل قبول برای اثربخشی بالینی لاکتوباسیلوس‌ها در ماست پروبیوتیک را معادل  $10^6 - 10^7$  CFU/mL (log ۶-۸) اعلام کرده‌اند؛ به عبارتی، حداقل تعداد قابل قبول آن در روز پیش از تاریخ انقضا معادل  $10^6$  CFU/mL (۱۲ تا ۱۴) بیان شده‌است؛ نتایج مطالعات پیشین نشان داده‌اند که تعداد باکتری‌های پروبیوتیک محصولات تجاری با میزان ادعا شده در برچسب تغذیه‌ای مغایرت داشته و کمتر از میزان ادعا شده بوده‌است (۱۵ تا ۱۸). براساس یافته‌های این مطالعات، میزان بیفیدوباکتریوم‌ها و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، طی نگهداری در یخچال به‌ویژه در محیط اسیدی (۵/۴ pH ≤) در پایان دوره ماندگاری ماست، به طرز معنی‌داری کاهش می‌یابد (۱۹ و ۲۰)؛ بنابراین رعایت استانداردهای تولید فراورده غذایی پروبیوتیک و افزودن حداقل دوز توصیه‌شده میکروارگانیسم پروبیوتیک برای حفظ تعداد آنها در طول زمان ماندگاری و اثربخشی لازم محصول، حائز اهمیت است (۱ و ۱۲ تا ۱۳). مطالعه حاضر با هدف بررسی کفایت تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس در چند نمونه از ماست‌های پروبیوتیک صنعتی در طول زمان ماندگاری و ارزیابی شدت اسیدیته محیط فعالیت لاکتوباسیلوس‌ها پیش از پایان دوره ماندگاری صورت-گرفت.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه به شیوه مقطعی در سال ۱۳۸۹ و در طول نه ماه (آبان ۱۳۸۹ تا مرداد ۱۳۹۰) در شهر مشهد انجام-شد.

## انتخاب، آماده‌سازی نمونه‌ها و معیارهای ورود و خروج از مطالعه

محل تهیه نمونه‌ها به‌صورت تصادفی از میان سوپر-مارکت‌های سطح شهر مشهد انتخاب شد. پنج نوع ماست پروبیوتیک تولیدشده توسط شناخته‌شده‌ترین

<sup>1</sup>- Colony Formed Unit

مشهد)، مقالات مشابه (۱۸ و ۲۲) و نظرسنجی از استادان مربوط، پنج برند ماست به صورت آزمایشی (پایلوت) تعیین شدند و برای کسب برآورد قابل واقعی تر از تعداد لاکتوباسیلوس‌های موجود در هر نوع ماست، از هر برند انتخاب شده، ده نمونه جمع‌آوری شدند که در دو نوبت مورد ارزیابی قرار گرفتند؛ بدین ترتیب پنج گروه کلی از پنج برند ماست پروبیوتیک مجزا و در هر گروه، ده نمونه از هر برند داشتیم که در دو نوبت (روز میانی دوره نگهداری و روز پیش از تاریخ انقضا) از آنها کشت تهیه شد و دو متغیر اصلی مورد مطالعه که تعداد کلونی‌های تمامی سویه‌های لاکتوباسیلوس‌ها و میزان اسیدیته نمونه‌ها بود به ترتیب در دو نوبت و نوبت دوم کشت ارزیابی شدند.

### آماده‌سازی، نگهداری و کشت سویه‌های لاکتوباسیلوس

با توجه به ماهیت مطالعه، روش گردآوری اطلاعات به شیوه تجربی و ابزار گردآوری اطلاعات از طریق نمونه‌برداری و آزمایش‌های کیفی بود. با استناد به تاریخ تولید و تاریخ انقضا درج شده در روی بسته‌بندی محصول، زمان ماندگاری نمونه‌ها بین ۱۴ تا ۲۱ روز متغیر بوده و روز میانی دوره نگهداری نمونه‌ها روز وسط این بازه تعیین شد. تمامی نمونه‌ها از زمان تولید تا انقضا در یخچال یکسان و در برودت معادل با  $4^{\circ}\text{C}$  -  $2^{\circ}\text{C}$  (دمای اپتیمم حفظ و نگهداری لاکتوباسیلوس‌ها در ماست پروبیوتیک) نگهداری شدند (۱۰ و ۱۸). تمامی آزمایش‌ها در محل آزمایشگاه ایران، واقع در محل بزرگراه آسیایی در شهر مشهد صورت گرفت. هر آزمایش سه بار تکرار شد و برای شمارش میکروبی تعداد باکتری‌های پروبیوتیک از روش رقت‌های متوالی استفاده شد. برای کشت لاکتوباسیلوس‌ها از محیط کشت MRS agar: Quelab, Canada, and ) MRS-bile agar medium (bile: Sigma-Aldrich, Inc., Reyde, USA) استفاده شد (۱۰، ۱۱ و ۱۸). نظر به عدم تداخل تغذیه‌ای نمک‌های صفراوی در رشد لاکتوباسیلوس‌ها، به منظور اصلاح محیط کشت و افتراق رشد لاکتوباسیلوس‌ها از نمک‌های

کارخانجات تولید فراورده‌های لبنی انتخاب شدند. به منظور رعایت موازین اخلاقی از درج نام و مشخصات برند تجاری خودداری شد و برای ارجاع به نمونه‌ها از کدهای ریاضی استفاده شد.

برای ایجاد بیشترین مشابهت از نظر شرایط اولیه، نمونه‌ها با کمترین فاصله زمانی از تاریخ تولید (کمتر از ۲۴ ساعت) و با دوره ماندگاری مشابه تهیه شدند. برای بالا بردن میزان اطمینان از پایداری و تعداد مناسب لاکتوباسیلوس‌ها، حفظ زنجیره سرد و حفظ پایداری پروبیوتیک‌ها، تمامی مراحل تهیه، جمع‌آوری و انتقال نمونه‌ها از سطح شهر و نگهداری آنها تا زمان انتقال به محل آزمایشگاه با استفاده از کامیونت‌های یخچال‌دار دارای مجوز و کد بهداشتی معتبر و در دمای کنترل شده  $4^{\circ}\text{C}$  صورت گرفت.

در این مطالعه، برندهایی که در آنها، لاکتوباسیلوس‌ها به‌عنوان استارتر اصلی پروبیوتیک استفاده شده بود، به کار برده شد و نمونه‌هایی که در آنها ماست با استفاده از ریزمغذی‌ها غنی شده بود و همچنین، انواع ماست‌های طعم‌دار و میوه‌ای از مطالعه خارج شدند؛ همچنین برای انتخاب و ورود نمونه‌ها به مطالعه، پنج برند معتبر و شناخته شده تولیدکننده ماست پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفتند و پیش از تهیه ده نمونه از هر یک از برندها، در ابتدا پنج نفر داور از طریق ارزیابی حس بویایی و چشایی برگزیده شدند و نمونه‌های ماست را از طریق آزمون هدوینگ ۵ امتیازی با استناد به ویژگی‌های حسی (بو، طعم، بافت، مزه و پذیرش کلی) مورد داوری قرار دادند که نمونه‌ها بیشترین مشابهت را از نظر یک‌دست بودن ویژگی‌های ظاهری و حسی در بدو ورود به مطالعه داشته باشند (۲۱)؛ همچنین نمونه‌هایی که در زمان تهیه و انتقال به آزمایشگاه در شرایط نگهداری با دمای بالاتر از  $4^{\circ}\text{C}$  بودند از مطالعه خارج شدند.

### حجم نمونه، متغیرهای مطالعه و گروه‌ها

با استناد به محدودیت تنوع برندهای لبنی تولیدکننده ثابت محصولات پروبیوتیک در محل تحقیق (شهر

در روز پیش از پایان دوره نگهداری با pH مطلوب از آزمون t یک نمونه‌ای استفاده شد؛ سطح معنی‌داری در تمامی آزمون‌ها معادل  $p \leq 0/05$  بود و داده‌ها با حساب دامنه اطمینان ۹۵ درصد تجزیه و تحلیل شدند.

### نتایج

متوسط شمارش کلونی‌های لاکتوباسیلوس در نمونه‌ها در روز میانی دوره نگهداری و روز پیش از تاریخ انقضا در جدول ۱ و میانگین pH نمونه‌ها در هر یک از پنج برند ماست پروبیوتیک مورد ارزیابی در پایان دوره نگهداری در جدول ۲ نشان داده شده است. تمامی داده‌های نمایش داده شده در جدول‌ها برای تقریب نزدیک‌تر به میزان واقعی کلونی‌ها به صورت میانگین آماری از ده کشت متمایز و مجزا ارائه شده که برای هر یک از دو نوبت اول و دوم کشت لاکتوباسیلوس جداگانه محاسبه شده است. براساس داده‌های جدول ۱، بیشترین تعداد لاکتوباسیلوس‌ها  $2/9 \times 10^6$  CFU/mL (نمونه شماره ۴، کشت اول و پس از انجام تخمیر) و کمترین تعداد کلونی  $1/5 \times 10^4$  CFU/mL (نمونه شماره ۱ در کشت دوم) بود. میانگین تعداد کلونی لاکتوباسیلوس شمارش شده در چهار برند از پنج برند ارزیابی شده، در کشت نوبت دوم به طور معنی‌داری کمتر از نوبت اول بود ( $p \leq 0/002$ ) میزان متوسط کلونی‌ها در نوبت دوم کشت تا  $1/5 \times 10^4$  CFU/mL تقلیل یافت؛ این مسئله، نشانگر کاهش شدید و قابل توجه جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در طول نگهداری یخچالی بوده است که با نتایج مطالعات مشابه پیشین در این زمینه همسو است (۱۹ و ۲۰). براساس جدول ۱ کاهش جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها در نمونه ۴ از سایر نمونه‌ها، بارزتر است. به رغم آنکه از منظر صنایع غذایی و علوم تغذیه باکتری پروبیوتیک برای اثربخشی و حفظ خواص درمانی باید در طول دوره ماندگاری میزان زنده‌مانی قابل قبول ( $10^6$  CFU/mL) داشته، همچنین قادر به رشد و افزایش تعداد کلونی‌ها باشد، در این مطالعه، میزان باکتری‌های لاکتوباسیلوس برخلاف انتظار کاهش یافت

صفرای استفاده شد. نمونه ماست با حجم ۱ میلی‌لیتر با ۹ میلی‌لیتر از محلول استریل ۰/۱ درصد پپتون واتر که پیش‌تر به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت  $121^\circ\text{C}$  اتوکلاو قرار گرفته و به دمای محیط رسیده بود، رقیق‌سازی و همگن شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $25^\circ\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شد؛ سپس از مایع شناور رویی رقت‌های  $10^{-1}$  -  $10^{-9}$  تهیه شد و با محیط کشت جامد MRS agar کشت سطحی ۴ منطقه‌ای به صورت پورپلیت و مطابق با روش استاندارد صفحه‌ای انجام شد؛ سپس پلیت‌ها به منظور رشد لاکتوباسیلوس‌ها در شرایط میکروآنروبیلیک در جار بی‌هوایی حاوی گاز پک (Quelab, Canada) در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند؛ پس از آن، مشخصات میکروسکوپی از قبیل قوام و اندازه و ماکروسکوپی پرگنه‌های تشکیل شده پس از رنگ‌آمیزی به روش گرم مورد بررسی قرار گرفت و شمارش تعداد کلونی‌های تمامی سویه‌های لاکتوباسیلوس براساس CFU/mL و به کمک دستگاه کلنی کانترو و براساس استاندارد شماره ۷۷۱۴ استاندارد ملی ایران انجام شد. برای ارزیابی شاخص pH، در نوبت دوم کشت اسیدیته نمونه‌ها با دستگاه pH متر (Metrohm) و براساس (654 Digital pH meter, Herisau, Switzerland) استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ اندازه‌گیری شد (۲۱).

### طرح آماری و روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها در قالب طرح به طور کامل تصادفی با نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA) آنالیز شدند. تمامی نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. پس از تأیید نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف، برای بررسی اختلاف و مقایسه میانگین شمارش کلونی‌های لاکتوباسیلوس در هریک از پنج برند مورد ارزیابی با مقادیر توصیه شده، از آزمون t یک نمونه‌ای استفاده شد؛ همچنین برای مقایسه میانگین شمارش کلونی لاکتوباسیلوس به دست آمده در هریک از گروه‌ها در دو کشت اول و دوم، از آزمون t زوجی استفاده شد. برای مقایسه میانگین درجه اسیدیته نمونه‌ها

یک نمونه‌ای که در این مطالعه برای مقایسه میزان اسیدیته هریک از نمونه‌ها در پایان دوره نگهداری با حداقل اسیدیته توصیه شده برای رشد و بقای میکروبی باکتری‌های لاکتوباسیلوس به کار گرفته شد، نتایجی مشابه را در خصوص pH نمونه‌ها با حداقل pH مطلوب نشان داد ( $p < 0/0001$ ) (جدول ۲)؛ براساس داده‌های این جدول، بالاترین pH ثبت شده معادل ۴/۲ واحد و به طور معنی داری از حداقل pH توصیه شده برای ماست پروبیوتیک (۴/۵) کمتر بود و در نمونه ۴ تا حد ۳/۵ واحد، کاهش نشان داد؛ یافته‌های این مطالعه نشان داد که اسیدیته تمامی نمونه‌ها در پایان دوره نگهداری از میزان مطلوب به طوری قابل توجه بالاتر است و به عبارت دیگر میزان ترش شدن ماست‌ها در پایان دوره نگهداری بیشتر از حداقل مطلوب ارزیابی شد.

که می‌توان آن را با عدم توانایی رقابت لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک با سایر میکروارگانیسم‌های ماست و کاهش سازگاری و تحمل لاکتوباسیلوس‌ها در ماست پروبیوتیک مرتبط دانست (شکل‌های ۱ و ۲)؛ این مهم در بخش بعدی به صورت گسترده‌تر ارزیابی شده است؛ همچنین مقایسه متوسط کلونی‌های شمارش شده با میزان مطلوب با استفاده از آزمون t یک نمونه‌ای نشان داد که میزان کلونی‌های لاکتوباسیلوس‌ها در تمامی نمونه‌های مورد ارزیابی در مقایسه با حداقل توصیه شده به طور معنی داری کمتر بود ( $p < 0/0001$ ) و هیچ‌یک از نمونه‌های مطالعه، دارای حداقل میزان مطلوب این میکروارگانیسم پروبیوتیک نبودند. همان‌طور که داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهند، آزمون t

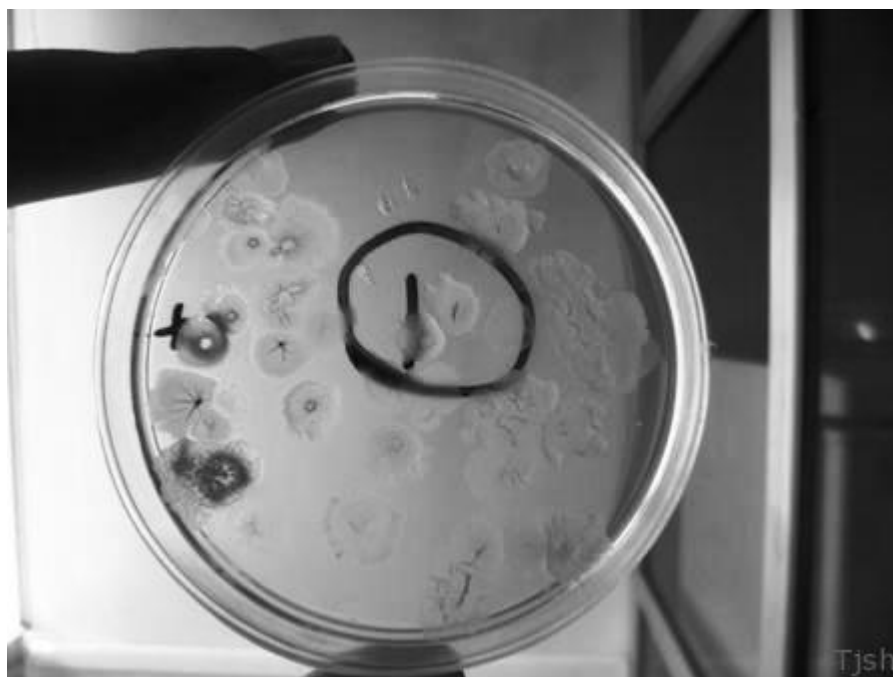
جدول ۱. متوسط شمارش کلونی‌های لاکتوباسیلوس در نمونه‌های ماست پروبیوتیک در دو نوبت کشت (روز میانی

دوره نگهداری و روز پیش از تاریخ انقضا)

p Value <sup>d</sup>	شمارش لاکتوباسیلوس در کشت دوم <sup>b,c</sup> (روز پیش از تاریخ انقضا)	شمارش لاکتوباسیلوس در کشت اول <sup>b,c</sup> (روز میانی دوره نگهداری)	گروه‌ها (بر اساس برند ماست)
۰/۶۹	$(1/5 \times 10^4) \pm (2 \times 10^4)$	$(2/8 \times 10^5) \pm (4 \times 10^4)$	۱ <sup>a</sup>
< ۰/۰۰۰۱	$(2/2 \times 10^5) \pm (2 \times 10^4)$	$(1/4 \times 10^5) \pm (3 \times 10^4)$	۲ <sup>a</sup>
< ۰/۰۰۰۱	$(3/7 \times 10^3) \pm (6 \times 10^3)$	$(2/1 \times 10^5) \pm (3 \times 10^3)$	۳ <sup>a</sup>
< ۰/۰۰۰۱	$(1/9 \times 10^5) \pm (5 \times 10^3)$	$(2/9 \times 10^5) \pm (3 \times 10^4)$	۴ <sup>a</sup>
۰/۰۰۲	$(1/5 \times 10^4) \pm (7 \times 10^3)$	$(1/5 \times 10^4) \pm (3 \times 10^4)$	۵ <sup>a</sup>

جدول ۲. میانگین pH نمونه‌های ماست پروبیوتیک ارزیابی شده در پایان دوره نگهداری

p Value <sup>c</sup>	pH <sup>b</sup> (واحد)	گروه‌ها (بر اساس برند ماست)
< ۰/۰۰۰۱	۴/۲ ± ۰	۱ <sup>a</sup>
< ۰/۰۰۰۱	۴/۲ ± ۰	۲ <sup>a</sup>
< ۰/۰۰۰۱	۴/۲ ± ۰	۳ <sup>a</sup>
< ۰/۰۰۰۱	۳/۵ ± ۰	۴ <sup>a</sup>
< ۰/۰۰۰۱	۳/۹ ± ۱	۵ <sup>a</sup>



شکل ۱. کلونی‌های رنگ‌آمیزی‌شده لاکتوباسیلوس در یک نمونه تصادفی در روز میانی دوره نگهداری (کشت اول)



شکل ۲. کلونی‌های رنگ‌آمیزی‌شده لاکتوباسیلوس در یک نمونه تصادفی در روز پیش از پایان دوره نگهداری (کشت دوم)

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که هیچ یک از نمونه‌های مورد آزمون در روز میانی دوره نگهداری و روز پیش از تاریخ انقضا دارای کم‌ترین میزان لاکتوباسیلوس توصیه شده برای ماست پروبیوتیک نبود؛ همچنین pH نمونه‌ها در پایان دوره ماندگاری، کمتر از حداقل مطلوب ارزیابی شد.

تأثیر مفید باکتری‌های پروبیوتیک در محصول‌های لبنی انکارناپذیر است اما باید توجه داشت مطالعاتی که تأثیر مفید ماست‌های پروبیوتیکی موجود در بازار را گزارش کرده‌اند با این فرض صورت گرفته‌اند که محصول‌های موجود در بازار از لحاظ تعداد باکتری‌های مفید در حد استاندارد بوده و حداقل زیست دسترسی پروبیوتیک (MBV<sup>1</sup>) را که یک شاخص کمی مهم برای ارزیابی درجه اثربخشی و تأثیرگذاری فرآورده پروبیوتیک به‌شمار می‌آید، دارند (۲۲).

تعداد مطالعات صورت گرفته در ایران که به ارزیابی میزان میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک در غذاهای غنی شده و چالش‌های مرتبط با آن پرداخته‌باشند، محدود است؛ براساس اطلاعات پژوهشگران می‌توان به یک مورد مطالعه‌ای مشابه انجام شده در ایران اشاره کرد که با جداسازی، خالص‌سازی باکتری‌های اسید لاکتیک ماست محلی و مقایسه آنها با ماست‌های پروبیوتیک تجاری به روش رنگ‌آمیزی گرم و کشت روی محیط کشت MRS agar بهره‌گیری از اثر جلوگیری‌کنندگی رشد با انتشار در آگار بر ۵ سویه استاندارد منتخب گرم مثبت و منفی، نشان داد که قدرت ضد میکروبی باکتری‌های لاکتوباسیلوس در ماست‌های محلی به‌عنوان سوش‌های پروبیوتیکی بومی در مقایسه با سه سوش استاندارد صنعتی بالاتر بود؛ در این مطالعه، توان ضد میکروبی ماست پروبیوتیک با شاخص میزان تولید باکتریوسین در فاز لگاریتمی رشد در محیط با pH خنثی به‌منظور حذف اثر تولید اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس

اسیدوفیلوس ارزیابی شد و نتایج نشان دادند که سوش‌های بومی، لاکتوسین بیشتری داشتند (۱۸)؛ این یافته با نتایج مطالعه حاضر که با روش مبتنی بر رنگ‌آمیزی گرم و شمارش مستقیم کلونی‌ها صورت گرفت همخوانی دارد. نتایج مطالعه‌ای مشابه که با روش همسان با مطالعه حاضر و هدف کنترل کیفی محصول‌های پروبیوتیک تجاری با آنالیزهای میکروبیولوژیکی به مقایسه و شمارش کلونی پروبیوتیک‌ها در هجده قلم ماده غذایی صنعتی پروبیوتیک انتخاب شده به‌صورت تصادفی در آمریکا پرداخت، نشان‌دهنده کیفیت بهتر محصول‌های پروبیوتیکی این بازار از نظر دوز پروبیوتیک‌ها در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر بود و تنها در هفت مورد (۳۹ درصد) میان محتوای ماده پروبیوتیک و میزان ادعا شده تفاوت وجود داشت (۱). از ساختارهای ارائه شده تبیین تفاوت‌های مشاهده شده میان محتوای پروبیوتیکی درج شده در برچسب اطلاعات تغذیه‌ای محصول‌ها با میزان شمارش شده می‌توان به آثار آنتاگونیستی فرایندهای غذایی و بسته‌بندی متداول در صنعت غذا روی میزان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها اشاره کرد که در جای خود جالب توجه، جدید و قابل ارزیابی در مطالعات آتی است. نتایج مطالعه‌ای مشابه در آفریقای جنوبی با هدف شمارش میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک‌ها در نه ماده غذایی صنعتی و مقایسه شمارش کلونی‌های پروبیوتیک مورد نظر با میزان ادعا شده در برچسب محصول نشان داد که تنها سه قلم از مواد غذایی ارزیابی شده حاوی میزان ادعا شده میکروارگانیزم پروبیوتیک در برچسب محصول بودند (۱۵). این مطالعه به روش کشت میکروبی و با استفاده از تهیه رقت‌های متعدد تا میزان ۱۰ برابر صورت گرفت و میزان کلونی‌های تشکیل شده از لاکتوباسیلوس، بیفدوباکتریوم و استرپتوکوکسی پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در شرایط بی‌هوازی و ۷۴ ساعته در شرایط میکروآنروفلیک برحسب CFU/g در هر محصول شمارش شد؛ با وجود این افتراق میکروارگانیزم‌ها به روش غیرکشتی و با روش Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

<sup>1</sup> -Minimum Biological Value

صورت‌گرفت که در قیاس با مطالعه ما خطایی کمتر و داشته، به تجهیزاتی پیچیده‌تر نیازمند است.

تفاوت‌های دیده‌شده در نتایج این مطالعات را می‌توان به آثار منفی روش‌های فراوری مواد غذایی صنعتی در از بین بردن و کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک و کاهش کیفیت و تأثیرگذاری فراورده پروبیوتیک نسبت‌داد؛ کم‌تر بودن شمارش پروبیوتیک‌ها در این مطالعات با عواملی دیگر از قبیل «ناکافی بودن مقدار و درجه خلوص میکروارگانیسم پروبیوتیک افزوده‌شده به ماده غذایی، عدم تناسب سویه میکروبی استفاده‌شده با غذای مورد نظر برای غنی‌سازی، عدم رعایت دمای نگهداری بهینه، عدم توجه به راهنماهای تدوین‌شده بین‌المللی از سوی کارخانجات تولیدکننده مواد غذایی و اهمال در کنترل کیفیت خط تولید فراورده‌های پروبیوتیک» مرتبط است (۱، ۱۰ و ۲۳)؛ از طرفی نتایج مطالعات مشابه نشانگر کاهش احتمال زنده ماندن و فعالیت لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها در ماست پروبیوتیک در محیط‌های اسیدی ( $\text{pH} \leq 5$ ) در طول دوره نگهداری یخچالی است که با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه ما همسویی دارد (۲۰).

مطالعه‌ای مشابه که در اروپا و با استفاده از روش PCR به‌عنوان جایگزین روش‌های سنتی شمارش با کلونی کانتیر برای جداسازی و تخلیص میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک انجام‌شد نتایجی ضد و نقیض را گزارش کرد؛ به‌نحوی که از ده قلم ماده غذایی پروبیوتیک تجاری، ۳ قلم فاقد و ۴ قلم حاوی میزان کمتری از میکروارگانیسم پروبیوتیک در قیاس با میزان ادعا شده بودند (۱۶)؛ در عین حال با توجه به اینکه مطالعه بالا با روشی متفاوت و جدیدتر در قیاس با روش کلونی کانتیر و رنگ‌آمیزی گرم که در مطالعه ما مورد استفاده قرار گرفته‌است، نتایج به‌دست‌آمده به‌طور عینی قابل‌استناد یا تطبیق نیست؛ توجه به این نکته و در- نظر گرفتن تفاوت‌های موجود در روش نمونه‌گیری و تفاوت در ترکیب‌های اولیه ماست در این مطالعات با

مطالعه ما از جمله مسائلی مهم است که بر نتایج به‌دست-آمده تأثیرگذار است (۱۵ و ۲۴)؛ از سوی دیگر در مطالعات صورت‌گرفته به تأثیرهای دما، شرایط نگهداری و عدم پایداری استارتر بر میزان میکروارگانیسم پروبیوتیک در دوره نگهداری اشاره‌شده‌است؛ از جمله آنها می‌توان به نتایج مطالعه روتار<sup>۱</sup> و همکاران اشاره کرد که در سه دوره (ابتدای دوره نگهداری، روز میانی و روز پایان دوره نگهداری) شمارش کلونی‌های باکتری‌های اسید لاکتیک به روش مرسوم کلونی کانتیر را مقایسه کرد و نشان داد نه تنها تعداد کلونی‌ها با گذشت زمان در طول دوره نگهداری ماست پروبیوتیک در حد مطلوب ( $10^6 \text{CFU/gr}$ ) حفظ‌نشده، بلکه در انتهای دوره به-طور قابل‌ملاحظه‌ای ( $10^4 \text{CFU/gr}$ ) کاهش یافت (۲۴)؛ همچنین شارل<sup>۲</sup> و همکاران، اثر منفی نگهداری ماست پروبیوتیک در دمای اتاق را در مقایسه با دمای  $4^\circ\text{C}$  بر تعداد کلونی برخی گونه‌های لاکتوباسیلوس از قبیل لاکتوباسیلوس جانسونی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست پروبیوتیک اعلام کرده، پس از کشت نمونه‌های نگهداری‌شده در دمای یخچال و دمای اتاق با استفاده از محیط کشت Man-Rogosa-Sharpe agar و شمارش به روش میکروسکوپی نشان دادند که در مقایسه با نمونه نگهداری‌شده در سرما، پس از ۶ ساعت نگهداری در دمای اتاق، تنها ۵۳/۸ درصد و پس از ۲۴ ساعت، ۲۵ درصد از باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس زنده ماندند (۲۵)؛ نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعات، مؤید اهمیت حفظ زنجیره سرد در حفظ و نگهداری محتوای کیفیت محصول پروبیوتیک هستند.

نتایج مطالعه‌ای مشابه در استرالیا که با متدکشت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک توسط کشت پورپلیت در محیط کشت MRS agar و شمارش کلونی‌ها به روش میکروسکوپی صورت‌گرفت، مؤید اثر منفی نگهداری ماست پروبیوتیک در دمای  $6-4^\circ\text{C}$  بر میزان زنده‌مانی و تعداد کلونی‌های بیفیدوباکتریوم در مقایسه با نگهداری

<sup>1</sup>- Rotar

<sup>2</sup>- Scharl



مرکزی (یک شهر) و نیاز به کنترل بیشتر در شرایط نگهداری (مانند شرایط نگهداری در یخچال مراکز فروش لبنیات پروبیوتیک و شرایط تولید و افزودن استارترها در کارخانه) از دیگر محدودیت‌های مطالعه حاضر بود که پیشنهاد می‌شود در طراحی و اجرای مطالعات گسترده آتی مورد توجه قرار گیرند.

#### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان دادند که میزان لاکتوباسیلوس ماست‌های صنعتی عرضه‌شده در بازار که از میکروارگانسیم‌های اصلی ماست پروبیوتیک به‌شمار می‌روند از حداقل میزان قابل قبول توصیه‌شده ( $10^7$  CFU/mL) کمتر است و در نتیجه، این فراورده‌ها فاقد ویژگی‌های سلامت‌بخش خود براساس ادعای صورت‌گرفته تولیدکنندگان آنها (که روی محصول نیز درج شده و به‌طور عمده از طریق حفظ و بهبود توازن فلور میکروبی روده میان میکروارگانسیم‌های سودمند و زیان‌بخش صورت می‌گیرد) هستند. عواملی متعدد وجود دارند که از رشد و بقای میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک و تأثیرگذاری درمانی مطلوب فراورده‌های پروبیوتیک آنها جلوگیری می‌کنند که از جمله مهم‌ترین آنها عدم افزودن کافی استارتر اولیه میکروارگانسیم پروبیوتیک و اهمال در حفظ پایداری ژنتیکی و فیزیکی آنها از زمان تولید و نگهداری تا مرحله فروش و زمان ورود به روده مصرف‌کننده است؛ رفع این موانع به تحقیقات بیشتر در قالب کارآزمایی‌های بالینی کنترل‌شده و انسانی گسترده و نظارت منظم و راهبردی بر عملکرد تولیدکنندگان مواد غذایی پروبیوتیک صنعتی نیازمند است.

#### تشکر و قدردانی

این مطالعه براساس پایان‌نامه دانشجویی احسان انصاریان در مقطع دکتری عمومی دامپزشکی با طرح و بودجه مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار با کد ۱۰۰۷ در سال ۱۳۸۹ انجام شد.

در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  بود. ساختار احتمالی برای این یافته را می‌توان به کاهش pH ماست بر اثر نگهداری در دماهای بالاتر از دمای یخچال نسبت داد که به افزایش اسیدیته و کاهش احتمال زنده‌مانی و رشد بیفیدو باکتریوم‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها می‌انجامد (۱۷)؛ نکته جالب توجه در این مطالعه، اهتمام پژوهشگران به تهیه ماست پروبیوتیک از شیر هموژنیزه و پاستوریزه در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاه توسط استارترهای صنعتی بود که احتمال مخدوش‌کنندگی تفاوت‌های احتمالی موجود در معیارهای زمینه‌ای از قبیل نوع مواد اولیه تولید ماست را کاهش می‌دهد و توجه به این نکته از مسائل حائز اهمیت در مطالعات آتی در زمینه ارزیابی میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک در فراورده‌های غذایی غنی‌شده با این میکروارگانسیم‌هاست.

مطالعه حاضر، تنها با هدف شمارش اختصاصی تمامی سویه‌های لاکتوباسیلوس‌ها صورت‌گرفت و دلیل عمده عدم شمارش سایر باکتری‌ها، استناد به احتمال بازدارندگی پروبیوتیک‌ها بر رشد و نمو یکدیگر و شمارش اختصاصی استارتر پروبیوتیکی مهم ماست (لاکتوباسیلوس‌ها) بود؛ در عین حال، عدم شمارش بیفیدوباکتریوم‌ها را می‌توان از محدودیت‌های اصلی مطالعه حاضر برشمرد. پیشنهاد می‌شود پیش از افزودن استارتر پروبیوتیکی به ماست، پیش از فرایند پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون هم انجام‌شود تا تعداد میکروارگانسیم‌های رقیب و ممانعت‌کننده از رشد لاکتوباسیلوس کاهش یابد و همچنین در ارزیابی میکروارگانسیم‌ها، در شرایط کنترل‌شده، تعداد بیفیدوباکتریوم‌ها نیز ارزیابی شود؛ از دیگر محدودیت‌های این مطالعه، عدم شمارش کلونی‌های لاکتوباسیلوس‌ها در زمان خروج از خط تولید و همچنین میسر نشدن شمارش لاکتوباسیلوس‌ها در چهار مقطع زمانی در حالت مطلوب (در دفعات متقسم از بدو تولید تا پایان دوره نگهداری در فواصل یکسان) با توجه به محدودیت‌های بودجه پژوهشی بود. تعداد محدود برندهای مورد مطالعه، انجام آزمایش به‌صورت تک-

منابع

- Williams NT. Probiotics. *Am J Health-Syst Pharm*. 2010;67(6):449-58.
- Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol*. 2009;44(1):26-46.
- Morrow LE, Gogineni V, Malesker MA. Probiotic, prebiotic, and synbiotic use in critically ill patients. *Curr Opin Crit Care*. 2012;18(2):186.
- Wallace TC, Guarner F, Madsen K, et al. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr Rev*. 2011;69(7):392-403.
- Brenner DM, Moeller MJ, Chey WD, Schoenfeld PS. The utility of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(4):1033-49.
- Scully P, McKernan DP, Keohane J, et al. Plasma cytokine profiles in females with irritable bowel syndrome and extra-intestinal co-morbidity. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(10):2235-43.
- Borchers A, Selmi C, Meyers F, Keen C, Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol*. 2009;44(1):26-46.
- Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, et al. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut*. 2010;59(3):325-32.
- Ezendam J, van Loveren H. Probiotics: Immunomodulation and Evaluation of Safety and Efficacy. *Nutr Rev*. 2006;64(1):1-14.
- Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Rezaei K, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *Int J Dairy Technol*. 2007;60(2):123-7.
- Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, et al. Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria. *Clin Infect Dis*. 2003;36(6):775-80.
- Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol*. 2000;78(1):80-8.
- Larsen CN, Nielsen S, Kaestel P, et al. Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr*. 2006;60(11):1284-93.
- Ng EW, Yeung M, Tong PS. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. *Int J Food Microbiol*. 2011;145(1):169-75.
- Elliott E, Teversham K. An evaluation of nine probiotics available in South Africa, August 2003. *SAMJ*. 2008;94(2):121.
- Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *J Food Microbiol*. 2004;97(2):147-56.
- Dave RI, Shah NP. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *INT DAIRY J*. 1997;7(1):31-41.
- Khanafari A, Akhavan Sepahi A, Esmailzadeh M. Estimation of Lactocin productibility potential produced by probiotic strains in local yogurts Lactacins. *Iran J Nutr Sci Food Technol*. 2009;4(1):67-78.
- Taheri P, Ehsani M, Khosravi-Darani K. Effects of *Lactobacillus acidophilus* La-5 on microbiological characteristics, sensory attributes and phase separation of Iranian Doogh drink during refrigerated storage. *Iran J Nutr Sci Food Technol*. 2009;4(3):15-24.
- Vinderola CG, Bailo N, Reinheimer JA. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Res Int*. 2000;33(2):97-102.
- Shakeri M.A.S, Beiraghi-Tousi SH, Mortazavi S.A.A.GH. Effect of WPC and Casein Hydrolysate Supplementations on Physicochemical and Sensory Properties of Bioyogurt. *IJFST*. 2006;3(2):1-10.
- Mortazavian A, Sohrabvandi S. Probiotics and food probiotic products. Tehran: Eta Publication. 2006:131-69. (in persian)
- Granato D, Branco GF, Cruz AG, Faria JAF, Shah NP. Probiotic dairy products as functional foods. *Compr Rev Food Sci Food Safety*. 2010;9(5):455-70.
- Rotar MA, Semeniuc C, Apostu S, et al. Researches concerning microbiological evolution of lactic acid bacteria to yoghurt storage during shelf-life. *J Agroalimnt Proc Technol*. 2007;13:1.
- Scharl M, Geisel S, Vavricka SR, Rogler G. Dying in yoghurt: the number of living bacteria in probiotic yoghurt decreases under exposure to room temperature. *Digest*. 2011;83(1-2):13-7.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research  
Journal of Shahed  
University  
Twentieth Year,  
No.106  
August, September  
2013*

Received: 2013/6/19

Last revised: 2013/9/27

Accepted: 2013/10/8

## A comparative study of total colony count of the lactobacilli strains during the shelf-life in some samples of commercial probiotic yoghurts

Ehsan Ansarian<sup>1</sup>, Maryam Kazemi<sup>2</sup>, Mohsen Nematy<sup>3</sup>, Afshin Akhondzadeh Basti<sup>4</sup>, Tannaz Mousavi<sup>5</sup>

1. School of Veterinary Medicine, Garmsar Azad University, Iran.
2. Department of Nutrition, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
3. Associate Professor - Department of Nutrition, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4. Professor - School of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor - School of Veterinary Medicine, Garmsar Azad University, Iran.

E-mail: NematyM@mums.ac.ir

### Abstract

**Background and Objective:** Lactobacilli are one of the major microorganisms in the probiotic yoghurt. The therapeutic potentials of these microorganisms are due to their variations and rates of survival during the shelf life of probiotic yoghurt. This study aimed to assess the total colony counts of lactobacillus strains in some examples of typical commercial probiotic yoghurt.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional survey, 50 samples of probiotic yoghurts (10 samples derived from 5 dairy brands) were collected and coded. The variations of all lactobacilli strains were counted after the preparation of surface cultures in 2 stages (1: Mid-day of shelf-life, and 2: 1 day before the expiration date of yoghurt); additionally, the pH of all samples was measured in the latter stage. Data were analyzed using the SPSS program.

**Results:** The average lactobacilli colony count was lower in the second culture as compared to the first one in 4 out of 5 probiotic yoghurt brands ( $p \leq 0.002$ ). Amongst all estimated samples, the highest number of colony counts was less than the minimum recommended dose ( $2.9 \times 10^5$  vs.  $10^6$ ,  $p < 0.0001$ ). The mean pH of samples was significantly lower than the optimum pH at the end of the shelf life ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusion:** Underrated total colony counts of lactobacilli strains during shelf life, and increased acidity of samples at the end of storage period would exacerbate the potential efficacy and clinical merits of evaluated commercial probiotic yoghurts. Implementing regular quality controls in accordance with national standardized protocols, as well as further extended research are warranted.

**Key words:** Yoghurt, Probiotic, Lactobacilli, Shelf life