بررسی تأثیر مدت زمان نگهداری و برخی خصوصیات شیمیایی ماست بر ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیک

کوشا علی‌محمدی[۱]، ولی‌اله کوهدار[۲*]

۱- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
۲- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

دریافت مقاله: ۱۱ اسفند ۱۳۹۷، بازنگری: ۲۸ فروردین ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۱۳ شهریور ۱۳۹۸

چکیده

عوامل مختلفی بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک مؤثر می‌باشند. در این تحقیق، تأثیر برخی از ویژگی‌های شیمیایی ماست و مدت زمان نگهداری بر ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیک در ۳۰ نمونه ماست پروبیوتیکی نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌ها در فواصل زمانی ۷ روز، از نظر باکتری‌های پروبیوتیک زنده، کلی‌فرم‌ها، میزان pH و اسیدیته مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای شمارش باکتری‌های پروبیوتیک از محیط کشت MRS بایل آگار و با روش کشت مخلوط استفاده گردید. شمارش کلی‌فرم‌ها با استفاده از محیط‌های کشت VRBA و BGB انجام شد. برای اندازه‌گیری اسیدیته از روش تیتراسیون با سود و اندازه‌گیری pH از pH متر دیجیتال استفاده شد. نتایج نشان داد که در همه نمونه‌ها، شمارش باکتری‌های پروبیوتیک و میزان اسیدیته به ترتیب کاهش و افزایش معنی‌داری داشت. میزان pH نیز در مدت نگهداری ماست کاهش نشان داد. ارتباط معنی‌داری بین شمارش باکتری‌های پروبیوتیک و میزان اسیدیته و pH مشاهده گردید. افزایش مختصری در تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در روزهای اول اتفاق افتاد، اما در روزهای آخر، کاهش شدید این میزان اتفاق افتاد. تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در ۴۶/۶۷ درصد از نمونه‌ها کمتر از حداقل مورد نیاز (10^6 cfu/g) در روز ۲۸ نگهداری بود. این مطالعه نشان داد زمان مناسب برای مصرف ماست پروبیوتیک تا ۲۱ روز پس از تولید می‌باشد. به علاوه کاهش بقای باکتری‌های پروبیوتیک به میزان کاهش pH و افزایش اسیدیته وابسته می‌باشد.

واژگان کلیدی: *اسیدیته، باکتری‌های پروبیوتیک، ماست، PH*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: dr.koohdar@gmail.com

مقدمه

در دنیای کنونی، تهیه غذاهایی با ارزش تغذیه‌ای بالا و خواص مفید برای سلامتی بدن، مخصوصاً غذاهایی که از ابتلاء به بیماری‌ها جلوگیری کنند و یا سلامتی را حفظ نمایند، از اهمیت ویژه‌ای برای مصرف‌کنندگان برخوردار است. لذا تهیه و تولید غذاهایی با این ویژگی‌ها، یکی از دلایل تحقیقات وسیع محققین صنایع مواد غذایی در این خصوص می‌باشد (۱). در این میان، فرآورده‌های لبنی تخمیری به دلیل دارا بودن باکتری‌های پروبیوتیک و تأثیرات سودمندی که بر سلامت مردم دارند حائز اهمیت می‌باشند و در بین فرآورده‌های لبنی تخمیری نیز ماست یکی از مهم‌ترین غذاها از این منظر بوده و در اروپا، بیشترین میزان مصرف فراورده‌های پروبیوتیکی را ماست پروبیوتیک به خود اختصاص داده است (۲). ماست به عنوان یک فراورده لبنی تخمیری به دلیل اسیدیته بالا و PH پایین، محیط مناسبی برای حفظ و انتقال پروبیوتیک‌ها به بدن نمی‌باشد، ولی همه‌گیر بودن مصرف آن، این فراورده را به مهم‌ترین و مرسوم‌ترین فراورده لبنی پروبیوتیکی تبدیل نموده است. این فراورده با داشتن ارزش غذایی بالا، میکروارگانیسم‌های مفید و پروبیوتیک‌ها و ترکیبات فعال زیستی به‌طور وسیعی در جهان مصرف می‌شود (۳).

پروبیوتیک‌ها گروه ویژه‌ای از باکتری‌ها و مخمرهای زنده و مفید می‌باشند و نقش بسیار مهمی در کاهش بیماری‌های انسانی مخصوصاً بیماری‌های دستگاه گوارش که ناشی از عدم کفایت فلور میکروبی روده می‌باشد، دارند (۴). میکروارگانیسم‌هایی که اغلب به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند متعلق به گروه هتروژن باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک می‌باشند. این باکتری‌ها به صورت وسیع در فراورده‌های لبنی و غیر لبنی استفاده می‌شوند و البته فراورده‌های لبنی، بستر و حامل خوبی برای تکثیر و رساندن میکرواگانیسم‌های پروبیوتیک به مصرف‌کنندگان می‌باشند. از میان باکتری‌های پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس‌ها* و *بیفیدوباکترها* به شکل وسیعی در تولید فراورده‌های غذایی پروبیوتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. باکتری‌های پروبیوتیک با تأثیر مثبتی که بر روی فلور میکروبی مفید روده دارند، باعث جلوگیری از رشد باکتری‌های مضر شده و باعث افزایش پایداری و مقاومت در برابر عفونت‌ها و سرایت بیماری‌ها می‌شوند. همچنین در افزایش هضم و جذب غذاها، در کاهش کلسترول، در درمان بیماری عدم تحمل لاکتوز، تقویت سیستم ایمنی بدن و خاصیت ضد سرطان و جهش‌زایی نقش مهمی دارند (۵). گزارش‌هایی نیز در خصوص تأثیرات مفید پروبیوتیک‌ها بر پوست انسان (۶) و علیه سرماخوردگی و آنفلوانزا وجود دارد (۷).

میزان زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طول مدت نگهداری محصول برای ایجاد این اثرات مثبت، مهم‌ترین چالش در این دسته از فرآورده‌ها است (۸). اگر چه هنوز توافق کلی درخصوص میزان حضور باکتری‌های پروبیوتیک در ماده غذایی وجود ندارد، ولی به طور کلی پیشنهاد می‌شود که حداقل 10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر از محصول باید حضور داشته باشد (۱۰،۹). پارامترهای مختلف فیزیکوشیمیایی ماست و عوامل رشد بیرونی می‌توانند در طی نگهداری بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک تأثیرگذار باشند از جمله این پارامترها می‌توان اسیدیته بالا، pH پایین، میزان باکتری‌های ماست، مدت زمان و دمای نگهداری، وجود اکسیژن، زمان گرمخانه‌گذاری و میزان آغازگر اولیه را نام برد (۱۲-۱۰)

با توجه به این که هدف از مصرف ماست پروبیوتیکی در کنار ارزش تغذیه‌ای آن، رساندن

باکتری‌های پروبیوتیک به دستگاه گوارش می‌باشد، حضور حداقل تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در فراورده لازم می‌باشد. به منظور بررسی این ویژگی، تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* که به عنوان باکتری‌های پروبیوتیک غالب در تهیه و تولید ماست پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند و همچنین میزان تأثیر مدت زمان نگهداری و برخی از عوامل داخلی رشد (اسیدیته و pH) بر میزان این جمعیت میکروبی مورد تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: برای انجام این تحقیق مقطعی، ۳۰ نمونه ماست پروبیوتیک مربوط به پنج شرکت به صورت تصادفی در بهار ۱۳۹۷ و در روز توزیع در بازار که اولین زمان دسترسی مصرف‌کننده به فراورده می‌باشد، خریداری و بلافاصله در کنار یخ به آزماشگاه منتقل گردید. نمونه‌های مورد آزمون نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ از نظر شمارش باکتری‌های پروبیوتیک زنده، شمارش *کلی‌فرم‌ها*، میزان pH و اسیدیته مورد ارزیابی قرار گرفتند. در ابتدا ۱۰ گرم نمونهٔ یکنواخت و همگن شده از هر کدام از نمونه‌های تهیه شده، در ۹۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده رینگر حل شده و رقت 10^{-1} ایجاد شد. سپس رقت‌های بعدی تا رقت 10^{-8} تهیه گردید.

آزمون های میکروبی: به منظور شمارش باکتری‌های پروبیوتیک در حضور باکتری‌های سنتی ماست از محیط کشت MRS بایل آگار (Man Rogosa and Sharpe agar) (MRS agar: Merck, and Bile: Sigma) و با روش کشت مخلوط و به صورت دوبل از ۴ رقت انتهایی استفاده گردید. بایل (صفرا) از رشد باکتری‌های سنتی ماست جلوگیری کرده و کلنی‌های رشد یافته نمایانگر گونه مورد نظر است. پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه قرار گرفتند (۱۳). شمارش *کلی‌فرم‌ها* با استفاده از محیط‌های کشت Violet Red Bile (VRBA) Dextrose Agar و Brilliant Green Broth (BGB) (Merck) و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (۱۴).

آزمون های شیمیایی: برای اندازه‌گیری اسیدیته از روش تیتراسیون با سود استفاده شد که بر پایه میزان حضور اسیدلاکتیک می‌باشد. برای این منظور ۱۰ میلی‌لیتر نمونه در حضور فنل فتالئین با سود یک دهم نرمال تیتر شد. برای اندازه‌گیری pH از pH متر دیجیتال (مدل Mettler Toledo، ساخت سوئیس) استفاده شد. کالیبراسیون pH متر دیجیتال با استفاده از محلول‌های بافر ساخت شرکت مرک در pH ۴/۰ و ۷/۰ انجام شد (۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری: از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ برای آنالیز یافته‌ها استفاده شد. از آزمون آماری آنوای یک طرفه برای تعیین اختلاف میان میانگین‌های به دست آمده از ۵ گروه آزمون استفاده و آزمون همبستگی پیرسون به منظور بررسی وجود ارتباط بین متغیرها به کار رفت.

نتایج

در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی آلودگی به *کلی‌فرم‌ها* در روز اول بررسی، مشاهده نگردید، لذا در روزهای بعدی آزمون، شمارش *کلی‌فرم‌ها* از دستور کار خارج گردید. روند تغییرات pH در نمونه‌های مختلف ماست پروبیوتیک شرکت‌های مورد بررسی طی دوره نگهداری در جدول شماره ۱ آمده است. با توجه به نتایج به دست آمده، کمترین مقدار pH در روز اول در میان نمونه‌های مورد آزمون، میزان ۴/۳۶ و بیشترین میزان آن ۴/۵۹ واحد بود. در روز اول، مقادیر pH در بین نمونه‌های برخی از شرکت‌ها، اختلاف آماری معنی‌داری داشت

(p <۰/۰۵). میزان pH در همه نمونه‌ها طی ۲۸ روز نگهداری ماست کاهش بسیار معنی‌داری نشان داد (p <۰/۰۱). میانگین دامنه کاهش pH در مدت زمان نگهداری ماست شرکت‌های مختلف، از ۰/۲۷ تا ۰/۳۵ واحد مشاهده شد و در مجموع ۰/۳۱ واحد، میانگین کاهش pH در مدت ۲۸ روز، ثبت گردید.

جدول شماره ۱- مقادیر pH در نمونه‌های ماست پروبیوتیک مربوط به پنج شرکت نگهداری شده به مدت ۲۸ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس

نمونه ها	روزهای نگهداری				
	۱	۷	۱۴	۲۱	۲۸
شرکت شماره۱	۴/۴۲± ۰/۰۱۲^{b}	۴/۳۷± ۰/۰۱۳^{c}	۴/۳۲± ۰/۰۱۳^{d}	۴/۲۴± ۰/۰۱۲^{e}	۴/۱۴± ۰/۰۱۱^{f}
شرکت شماره۲	۴/۵۲± ۰/۰۳۷^{a}	۴/۴۶± ۰/۰۳۸^{b}	۴/۳۸± ۰/۰۳۶^{c}	۴/۳۰± ۰/۰۳۲^{d}	۴/۱۷± ۰/۰۲۹^{f}
شرکت شماره۳	۴/۴۵± ۰/۰۳۶^{b}	۴/۴۰± ۰/۰۳۵^{c}	۴/۳۵± ۰/۰۲۸^{d}	۴/۲۹± ۰/۰۲۶^{d}	۴/۱۷± ۰/۰۲۸^{f}
شرکت شماره۴	۴/۴۲± ۰/۰۲۲^{b}	۴/۳۷± ۰/۰۲۵^{c}	۴/۳۲± ۰/۰۲۳^{d}	۴/۲۶± ۰/۰۲۶^{e}	۴/۱۴± ۰/۰۲۷^{f}
شرکت شماره۵	۴/۵۰± ۰/۰۳۰^{a}	۴/۴۳± ۰/۰۲۹^{b}	۴/۳۶± ۰/۰۲۴^{c}	۴/۳۱± ۰/۰۲۲^{d}	۴/۱۵± ۰/۰۱۱^{f}
مجموع	۴/۴۶± ۰/۰۱۵^{a}	۴/۴۰± ۰/۰۱۴^{b}	۴/۳۵± ۰/۰۱۱^{c}	۴/۲۸± ۰/۰۱۱^{d}	۴/۱۵± ۰/۰۱۰^{e}

*حروف لاتین متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها می‌باشد (p <۰/۰۵)

همان‌گونه که جدول شماره دو نشان می‌دهد، میزان اسیدیته با گذشت زمان و در طی نگهداری نمونه‌ها افزایش یافت و از نظر آماری نیز این افزایش بسیار معنی‌دار بود (p=۰/۰۰). در روز اول همانند pH، مقادیر اسیدیته در بین نمونه‌های برخی از شرکت‌ها، اختلاف آماری معنی‌داری داشت (p <۰/۰۵). میانگین دامنه افزایش اسیدیته در شرکت‌های مختلف و در مدت زمان نگهداری ماست از ۰/۲۶ تا ۰/۳۱ درصد برحسب اسیدلاکتیک مشاهده شد و در مجموع ۰/۲۷ درصد برحسب اسیدلاکتیک ، میانگین افزایش اسیدیته در مدت ۲۸ روز، ثبت گردید. بنابراین مدت زمان نگهداری ماست هم بر تغییرات pH و هم اسیدیته تأثیر بسیار معنی‌داری دارد (p=۰/۰۰).

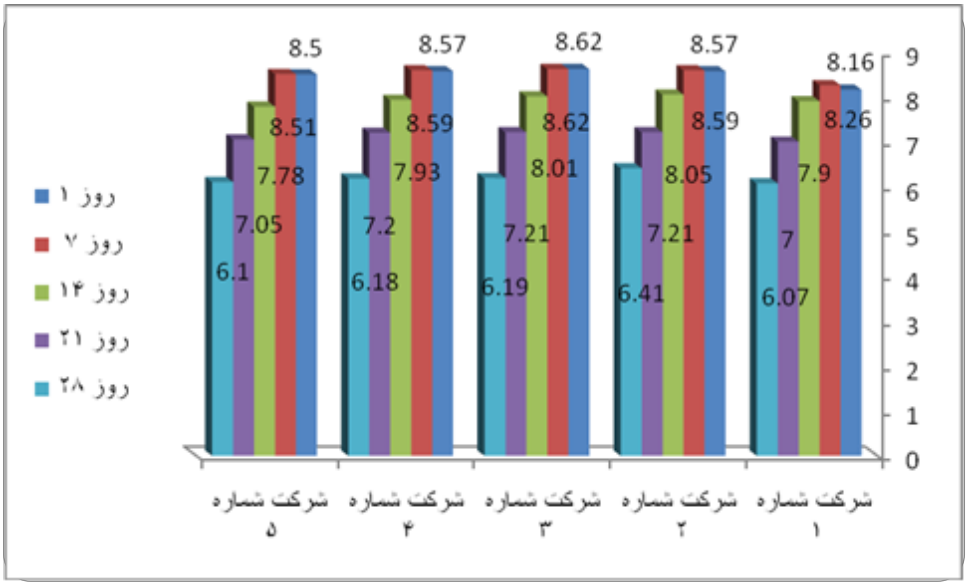
جدول شماره ۲- مقادیر اسیدیته (درصد برحسب اسیدلاکتیک) در نمونه‌های ماست پروبیوتیک مربوط به ۵ شرکت، نگهداری شده به مدت ۲۸ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس

نمونه ها	روزهای نگهداری				
	۱	۷	۱۴	۲۱	۲۸
شرکت شماره۱	۰/۹۹± ۰/۰۲۸^{b}	۱/۰۷± ۰/۰۱۸^{c}	۱/۱۳± ۰/۰۱۳^{d}	۱/۱۹± ۰/۰۱۴^{e}	۱/۲۶± ۰/۰۱۶^{f}
شرکت شماره۲	۰/۸۶± ۰/۰۴۶^{a}	۰/۹۶± ۰/۰۴۸^{b}	۱/۰۳± ۰/۰۳۶^{c}	۱/۰۷± ۰/۰۴۹^{c}	۱/۱۴± ۰/۰۳۶^{d}
شرکت شماره۳	۰/۹۱± ۰/۰۵۹ ^{a}	۰/۹۷± ۰/۰۵۸^{b}	۱/۰۱± ۰/۰۶۵^{b}	۱/۰۷± ۰/۰۷۲^{c}	۱/۱۷± ۰/۰۵۵^{e}
شرکت شماره۴	۰/۹۸± ۰/۰۳۸^{b}	۱/۰۴± ۰/۰۳۰^{c}	۱/۱۱± ۰/۰۳۴^{d}	۱/۱۷± ۰/۰۲۶^{e}	۱/۲۵± ۰/۰۳۲^{f}
شرکت شماره۵	۰/۹۴± ۰/۰۳۸^{a}	۱/۰۵± ۰/ ۰۱۶ ^{c}	۱/۱۱± ۰/۰۰۵^{d}	۱/۱۵± ۰/۰۱۳^{d}	۱/۲۵± ۰/۰۱۱^{f}
مجموع	۰/۹۴± ۰/۰۱۹^{a}	۱/۰۲± ۰/۰۱۸^{b}	۱/۰۸± ۰/۰۱۷^{c}	۱/۱۳± ۰/۰۱۹^{d}	۱/۲۱± ۰/۰۱۶^{e}

*حروف لاتین متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها می‌باشد (p <۰/۰۵)

حداقل تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در نمونه‌های مورد آزمون در روز اول ۸/۰۴ logcfu/g

شمارش شد. براساس نتایج آماری ارائه شده در نمودارهای شماره ۳ و ۴ ، اختلاف آماری معنی‌داری (p=۰/۰۰) در میزان شمارش باکتری‌های پروبیوتیک موجود در نمونه‌های برخی از شرکت‌ها در روز اول مشاهده گردید. نه تنها کاهشی در میزان بقای باکتری‌های پروبیوتیک در روز هفتم نسبت به روز اول اتفاق نیفتاد، بلکه میانگین این شاخص از ۸/۴۸ به ۸/۵۱ افزایش یافت ولی این میزان افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۰۷). اما از روز هفتم نگهداری نمونه‌های ماست، کاهش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک اتفاق افتاد و این میزان به logcfu/g ۷/۹۳ در روز چهاردهم و logcfu/g ۷/۱۳ در روز بیست و یکم کاهش یافت. در روز بیست و هشتم ۴۶/۶۷ درصد از نمونه‌ها، حاوی باکتری‌های پروبیوتیک کمتر از cfu/g ۱۰^۶ بودند. فاکتور زمان نگهداری ماست، همانند pH و اسیدیته، بر روی میزان بقای باکتری‌های پروبیوتیک از نظر آماری اثر معنی‌دار داشت (p=۰/۰۰)

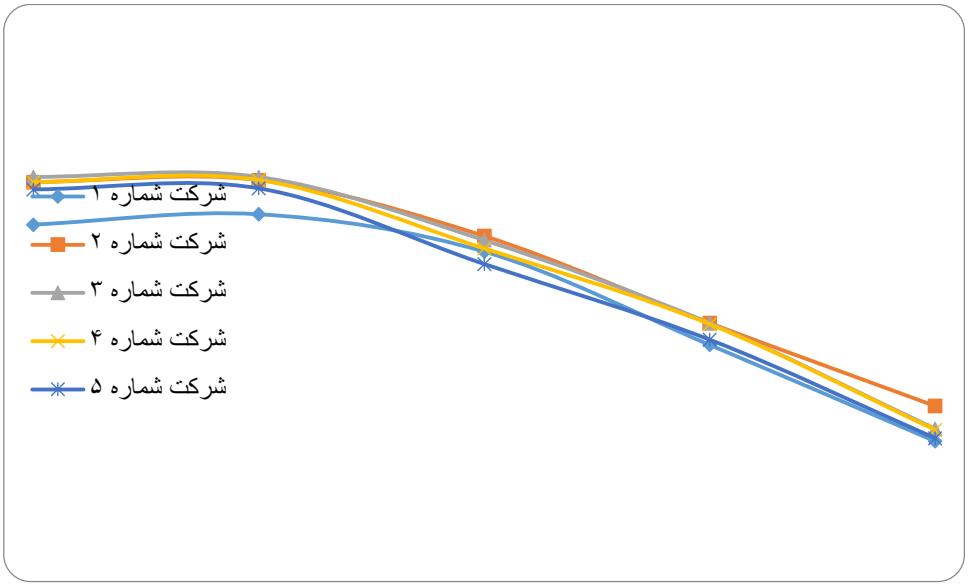


شکل شماره ۱- تعداد باکتری‌های پروبیوتیک (log cfu.ml^{-1}) شمارش‌شده در نمونه‌های ماست پروبیوتیک ۵ شرکت مورد بررسی در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس

بحث و نتیجه‌گیری

براساس استاندارد ملی ایران ، میزان pH ماست نباید از ۴/۶ بالاتر و مقدار اسیدلاکتیک آزاد موجود در ماست نباید از ۰/۷ درصد کمتر باشد (۱۶). البته PH مناسب و بهینه رشد باکتری‌های پروبیوتیک مورد آزمون ۶/۵ تا ۷ می‌باشد و در برابر اسید و اکسیژن مولکولی حساس می باشند (۳). هر دو ویژگی یاد شده (اسیدیته و pH) در مغایرت با شرایط بهینه رشد باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد؛ ولی در این میزان از pH و اسیدیته، از فساد فرآورده جلوگیری می‌شود. اندازه‌گیری این متغیرها در روز اول آزمون، نشان داد در همه نمونه‌های تحقیق حاضر، مقادیر pH از میزان یاد شده پایین‌تر بوده و میزان اسیدیته نیز براساس استاندارد موجود می‌باشد و لذا احتمال بروز فساد در آنها وجود ندارد. در تمامی نمونه‌های مورد آزمون هیچ *کلی‌فرمی* یافت نشد که دلالت بر همین موضوع دارد. به طور طبیعی فعالیت *کلی فرم ها* درpH کمتر از ۵/۲ متوقف می‌شود و لذا فعالیت این باکتری‌ها، فقط در مراحل آغازی تخمیر و قبل از اسیدی شدن محیط

امکان‌پذیر است (۱۷).



شکل شماره ۲- تغییرات تعداد باکتری‌های پروبیوتیک (log cfu.ml^{-1}) شمارش‌شده در نمونه‌های ماست پروبیوتیک ۵ شرکت مورد بررسی در طول ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس

معمولاً پس از کاهش و رسیدن pH ماست به حدود ۴/۵ واحد (pH نهایی) گرم‌خانه‌گذاری ماست متوقف شده و محصول وارد سردخانه می‌شود. در روز اول آزمون در برخی نمونه‌های مورد بررسی (نمونه‌های مربوط به شرکت‌های A و D) میزان pH پایین‌تر از سایر نمونه‌ها و به میزان ۴/۴۲ واحد بود که برای روز اول، pH مطلوبی به حساب نمی‌آید و می‌تواند ناشی از عدم حفظ زنجیره سرما در نگهداری و پخش فراورده باشد. مشخص شده که نگهداری ماست تازه تولید شده در دمای یخچالی (۵ درجه سلسیوس) به مدت ۲۴ ساعت تغییر معنی‌داری در میزان pH و اسیدیته ایجاد نمی‌کند و این مقادیر به ترتیب در حدود ۴/۴۷ واحد و ۱۱۰ درجه دورنیک اندازه‌گیری شده است، ولی استفاده از دمای ۲۰ درجه سلسیوس در مدت ۲۴ ساعت نگهداری، باعث کاهش چشمگیر pH و افت آن به ۴/۲۵ و افزایش اسیدیته به عدد ۱۲۰/۲ درجه دورنیک می‌شود (۱۸).

از طرف مقابل، پایین بودن بیش از حد pH و بالا بودن اسیدیته اثر سوء بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک دارد. در طول مدت نگهداری نمونه‌های ماست، کاهش و افزایش معنی‌داری ($p = ۰/۰۰$) به ترتیب در میزان pH و اسیدیته اتفاق افتاد. عنوان گردیده باکتری‌های استارتر و پروبیوتیک ماست قادر به فعالیت بطئی در شرایط یخچالی بوده و با تولید اسید از لاکتوز موجود در ماست، باعث کاهش pH درحین نگهداری ماست می‌شوند. تولید اسیداستیک و اسیدلاکتیک به ترتیب توسط *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست‌های پروبیوتیکی موجب کاهش pH فراورده می‌شود که نوع و میزان اسید تولید شده، بر رشد گونه‌های مختلف باکتری‌های پروبیوتیک اثر می‌گذارد (۱۲). افزایش میزان اسید در طول مدت زمان ذخیره‌سازی و نگهداری فراورده به دلیل بیش اسیدی‌سازی (post acidification) در اثر فعالیت آنزیم *بتا گالاکتوزیداز* در دماهای یخچالی می‌باشد. در چنین شرایطی احتمال افت pH به مقادیر کمتر از ۴/۲ وجود دارد که منجر به جدا شدن سرم ماست

و آب اندازی می‌شود. آب اندازی در ماست به دلیل تغییر ساختار شبکه پروتئینی رخ می‌دهد که باعث کاهش قدرت اتصال پروتئین‌ها با آب می‌شود (۸).

در تمامی نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق میزان PH بیش از ۴ واحد در روز ۲۸ مشاهده گردید. پایین‌ترین میانگین میزان pH با ۴/۱۵ واحد مربوط به روز ۲۸ نگهداری نمونه‌ها بود. همگام با کاهش pH، افزایش اسیدیته نیز در طول مدت نگهداری اتفاق افتاد به نحوی که تا روزهای ۲۱ و ۲۸ ، این متغیر به ترتیب به میزان ۰/۱۹ و ۰/۲۷ درصد برحسب اسیدلاکتیک افزایش یافت. در تحقیق مشابهی میزان کاهش pH در روز ۲۱ نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس نسبت به روز اول به طور میانگین در تیمارهای مختلف ۰/۳۵ واحد (۱۹) و در تحقیق دیگری این میزان و اسیدیته به ترتیب ۰/۱۷ تا ۰/۵۰ واحد و ۰/۰۹ تا ۰/۲۹ درصد در ۳۵ روز نگهداری در دمای ۵ درجه سلسیوس ثبت گردید (۲۰). لرنس و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند میزان pH در طی نگهداری شیر تخمیر شده در دمای ۵ درجهٔ سلسیوس طی یک مطالعه ۲۱ روزه از ۴/۳ -۳/۴۵به ۴/۱-۳/۲ کاهش می‌یابد و به همراه این کاهش، میزان بقای باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* نیز کاهش می یابد (۲۱). افت pH و همچنین سرعت کاهش آن، بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک مؤثر می‌باشند. سرعت بالای تشکیل اسید در فراورده تخمیری، می‌تواند منجر به کاهش pH در داخل سلول باکتری پروبیوتیکی شده و به طور معنی‌داری بقای آن را کاهش دهد (۲۲). کاهش pH و افزایش اسیدیته موجب اکسیداسیون ترکیبات سلولی شده و در نهایت مرگ سلول باکتری را سبب می‌شود (۲۳). اثرات ضد میکروبی پراکسید هیدروژن تولید شده توسط برخی از *لاکتوباسیل‌ها* و تأثیر آن بر بقای پروبیوتیک‌ها به خوبی شناسایی شده است (۲۴).

با کاهش میزان pH و افزایش اسیدیته، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک کاهش یافت. اگر چه در هفت روز اول نگهداری نمونه‌ها، علیرغم کاهش میزان pH از میانگین ۴/۴۶ واحد در روز اول به میانگین ۴/۴۰ واحد در روز هفتم، افزایش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک با میانگین ۰/۰۳ logcfu/g اتفاق افتاد که می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که شرایط برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک تا pH حدود ۴/۴ مناسب می‌باشد، ولی در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ که میزان pH به ترتیب و به طور میانگین۰/۱۱، ۰/۱۸ و ۰/۳۱ واحد نسبت به روز اول کاهش داشت، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک به ترتیب ۰/۵۵، ۱/۳۵ و ۲/۲۹ logcfu/g کاهش داشتند. نتایج این مطالعه با یافته‌های ساهادوا و همکارانش (۲۰۱۱) مطابقت دارد (۱۰). در تحقیق شریفی و همکاران (۱۳۹۵) مشخص گردید بیشترین و کمترین قابلیت زیستی به ترتیب در روزهای هفت و بیست و یک می‌باشد و با افزایش زمان انبارداری، ضمن کاهش pH و افزایش اسیدیته، قابلیت زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* کمتر می‌شود. با این وجود میزان این باکتری پروبیوتیک در همه نمونه‌ها در محدوده استاندارد بوده و هیچ‌گاه از ۲۰ میلیون در هر گرم پایین‌تر نیامد (۲۵) .آلبرت و همکاران (۱۹۹۲) نیز گزارش نمودند تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در ماست تازه بین ۷ تا ۹ logcfu/g بوده و در اثر نگهداری در یخچال، این میزان ابتدا افزایش مختصری داشته و سپس کاهش می‌یابد (۲۶). در مطالعه مشابه دیگری تعداد باکتری‌های پروبیوتیک ماست به میزان ۳ لوگ در هر گرم در مدت ۳۵ روز نگهداری کاهش یافت (۲۷). در گزارش مؤیدنیا و همکاران (۲۰۰۹) آمده است که تنها ۵۰ درصد از نمونه‌های ماست مورد بررسی بعد از ۳۱ روز

نگهداری، حاوی حداقل 10^6 cfu/g باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد (۲۸). در مطالعه‌ای حداکثر میزان بقای باکتری‌های پروبیوتیک در دماهای یخچالی ۲۰ روز اعلام گردیده است (۲۹).

نتایج این مطالعه نشان داد که کاهش باکتری‌های پروبیوتیک تا روز ۱۴ نگهداری فقط ۰/۵۵ logcfu/g می‌باشد؛ درحالی‌که این کاهش در روز ۲۱ نگهداری ۱/۳۵ logcfu/g می‌باشد. علیرغم این میزان کاهش، در هیچ یک از نمونه‌ها این میزان به کمتر از 10^6 در هر گرم (حداقل حضور باکتری‌های پروبیوتیک مطابق استاندارد) نرسید. اما در روز ۲۸ نگهداری، ۴۶/۶۷ درصد از نمونه‌ها، حاوی باکتری‌های پروبیوتیک کمتر از 10^6 cfu/g بودند. با توجه به تعداد باکتری‌های پروبیوتیک و همچنین میزان اسیدیته و pH، زمان مناسب برای مصرف ماست با تعداد باکتری پروبیوتیک بیشتر، تا بیست و یک روز پس از تولید و نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس می‌باشد.

سپاسگزاری

ضمن تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی با شماره ثبت ۱۷۱۸ می‌باشد.

References

1- Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. J Microbiol. 2004; 42(4): 315-318.

2- Lourens-Hattingh A, Viljoen CB. Yoghurt as a probiotic carrier food. Int Dairy J. 2001; 11: 1–17.

3- Wysong RL. Beneficial lactobacilli in food and feed. J food Prot. 2001; **4**: 487–51.

4- Tamime AY, Saarela M, Korslund AV, Shah NP. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In: Tamime, A.Y., editor. Probiotic Dairy Products. UK: Blackwell Publishing Ltd, 2005; pp: 39–72.

5- Agrawal R. Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. Food Biotechnol. 2009; 19: 227–246.

6- Krutman J. Pre- and probiotics for human skin. J Dermatol Sci. 2009; 54: 1–5

7- Leyer GJ, Li S, Mubshaer ME, Reifer C, Ouwehan AC. Probiotics effects on cold and influenza-like incidence and duration in children. Pediatrics. 2009; 124: 172–178.

8- Kailasapathy K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT Food SciTechnol. 2006; 39(10): 1221-1227.

9- Haris A, Ramasamy K, Tommy J, Chin S, Yin W. Effect of heat, pH and coating process with stearicacid using a fluidized bed granulator on viability of probiotic *Lactobacillus reuteri* C 10. Afric J Biotech. 2012; 11(26): 6857-65.

10- Sahadeva RPK, Leong SF, Chua KH, Tan CH, Chan HY, Tong EV. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. Int Food Res J. 2011; 18(4): 1515-22.

11- Bari M, Ashrafi R, Alizadeh M, Rofehgarineghad L. Effects of different of yogurt starter or probiotic bacteria, storage time & different concentration of cysteine on the microflora characteristics of Bio–Yogurt. Res J Biol Sci. 2009; **4** (2): 137-142.

12- Donkor ON, Nilmini SLI, Stolic P, VasilgevicT, Shah NP. Survival & activity of selected probiotic organism in set-type yoghurt during cold storage. Int Dairy J. 2007; 17(6): 577-665.

13- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 11325. Probiotic yogurt-Specifications and test methods. 1st. Edition.

14-Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 9263. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms –Colony-count technique. 1st. Edition.

15- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 2852. Milk and milk products- Determination of titrable acidity and value pH- test method.1st. Edition.

16- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, ISIRI Number 695. Yogurt – Specifications and test methods. 4th. Revision.

17- Gardini F, Martuscelli M, CarmelaCaruso F, Crudele MA, Favati F, Guerzoni ME, Suzzi G. Effects of PH and NaCl concentration on the growth kinetic,proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. Int J food Microbiol. 2001; 64: 105-117.

18- Ferdousi R, Rouhi M, Mohammadi R, Mortazavian AM, Khosravi-Darani K., Homayouni Rad A. Evaluation of Probiotic Survivability in Yogurt Exposed to Cold Chain Interruption. Iran J Pharm Res. 2013; 12: 139–144.

19- Nikbakhet HR, Fadaei Noghani V, Khosravi-darani K. Investigation on the viability of selected probiotics in low fat set yogurt by homogenized milk at various temperatures. Innov Food Technol. 2014; 1: 4.3-11.

20- Mani_lopez E, Palou E, López-Malo A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. J Dairy Sci. 2014; 97(5): 2578-90.

21- Lourens-Hattngh A, Viljoen BC. Survival of probiotic bacteria in South African commercial bio-yogurt. South Afr J Sci. 2002; 98(5-6): 298-300.

22- Mortazavian AM, Khosrokhavar R, Rastgar H, Mortazaei GR. Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of Doogh (Iranian fermented milk drink). Ital J Food Sci. 2010; 1: 98-104.

23- Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. Food Cont. 2009; 20(6): 598-602.

24- Martin F, Cachon R, Pernin K, Gervais P, Guichard E, Cayot N. Effect of oxidoreduction potential on aroma biosynthesis by lactic acid bacteria in nonfat yogurt. J Dairy Sci. 2011; 94(2): 614-622.

25- Sharifi Soltani M, Karim G, Pourahmad A. Possibility of the production of probiotic chocolate yogurt. J Food Hygi. 2016; 6(22): 51-63. [In Persian].

26- Ulberth F, Kneifel W. Aroma profiles and sensory properties of yogurt and yogurt-related products. II:Classification of starter cultures by means of cluster analysis. Milchwissenschaft. 1992; 47(7): 432-4.

27- Shin HS, Lee JH, Pestka JJ, Ustunol Z. Growth and Viability of Commercial *Bifidobacterium spp* in Skim Milk Containing Oligosaccharides and Inulin. J Food Sci. 2000; 65(5): 884–7.

28- Moayednia N, Ehsani MR, Emamdjomeh Z, Mazhari AF. Effect of refrigerated storage time on the viability of probiotic bacteria in fermented probiotic milk drinks. Int J Dairy Technol. 2009; 62(2): 204-8.

29- Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. Combined effects of temperature-related variables on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. Aust J Dairy Technol. 2006; 61(3): 248-52.

Effect of storage time and some chemical properties of probiotic yogurts on probiotic viability

Koosha Alimohammadi[1], Valiollah Koohdar[2]*

1- Graduated student, College of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2- Assistant professor, Department of Food Hygiene and Control, College of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Receive: March 2, 2019; Revise: April 17, 2019; Accept: September 4, 2019

Summary

Various factors affect viability of probiotic bacteria. In this investigation, the effect of some chemical specifications and the storage time on probiotic bacterial count in 30 samples of probiotic yogurts stored at 4ºC was studied. The samples were evaluated in 7 days interval for viable cell count, *coli* count, pH and acidity during refrigerated storage. The pour plate method of Culture with MRS-bile agar was used for enumeration of probiotic bacteria. Total *coliform* was enumerated in VRBA and BGB culture. Acidity of samples was determined with titration method and the values of pH were measured by a digital pH meter. The obtained results showed that the number of probiotic bacteria and titrable acidity in all of the samples were significantly decreased and increased, respectively. Also, the level of pH was decreased during the storage time. There were significant relationship between probiotic bacterial count and the amount of pH and acidity. A brief increase of probiotic bacterial counts was measured during the initial days, but there was sever declining during the final days of storage. 46.67% of examined samples had probiotic bacterial counts less than the minimum dose of 10^6 cfu per gram of yogurt in day 28. This study indicated that the deadline for storage and consumption of probiotic yogurts is 21 days after production. In addition, the decline in viability was dependent on the amount of pH and acidity.

Keywords: *Acidity, probiotic bacteria, Yogurt, pH*