

## بررسی رشد میکروب‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در شیر سویا

محمد حسین مرحمتی زاده<sup>۱\*</sup>، سارا رضازاده<sup>۲</sup>، زینب نظافت کازرونی<sup>۲</sup>، ابراهیم جعفری<sup>۲</sup>

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون- ایران.

۲- دانش آموخته مهندسی صنایع غذایی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون- ایران.

۳- دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون- ایران.

\* نویسنده مسئول: Dr\_mhmz@yahoo.com

### Determination of soy milk as carrier of probiotic microbe Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum

Marhamatizadeh, M.H.<sup>1\*</sup>, Rezazadeh, S.<sup>2</sup>, Nezafat kazerroni, Z.<sup>2</sup>, Jafari, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon- Iran.

<sup>2</sup> Graduated of Food Sciences, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon- Iran.

<sup>3</sup> Graduated from faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon- Iran.

#### Abstract

This research was done to study Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in soy milk and soy milk had been produced separately and in combination. In the first stage, we used sample soy milk, and for the this, we used Lactobacillus acidophilus. To the second sample of soy milk, Bifidobacterium bifidum and to the third sample at the same time Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum as the starter added to the samples. Resulted changes in injected soy milk were registered considering acidity indexes and biological ability of probiotic bacteria in 2-hour and 3-day time interval respectively in incubation. Lactobacillus acidophilus reach 42 degree of Dornic sooner than Lactobacillus acidophilus - Bifidobacterium bifidum and the resulted soy milk was rancidity. Then we used The flavored soy milk (with melon flavor) with lower pH indices used for one liter. This study showed that soy milk with Lactobacillus acidophilus and then sample whit Lactobacillus acidophilus - Bifidobacterium bifidum need the less time for reach to 42 degree Dornic acidity of sample with Bifidobacterium biphidium and the produced soy milk with Bifidobacterium biphidium has better flavor than another one. The productions had not suitable flavor. And the production whit flavored soy milk (with melon flavor) was better than simple soy milk in flavor. *et. J. of Islamic. Azad. Univ., Garmsar Branch. 5,2:99-103,2009-2010.*

**Keywords:** Probiotic, Soy milk, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum.

### چکیده

جهت بررسی رشد باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در شیر سویا، به شکل جداگانه و مخلوط در تهیه شیر سویای پروبیوتیکی این تحقیق انجام شد. در مرحله اول از شیر سویای ساده استفاده شد و به نمونه اول شیر سویا، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، به نمونه دوم بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و به نمونه سوم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به صورت همزمان به عنوان استارتر افزوده شد. تغییرات حاصله در شیر سویای تلقیحی از نظر شاخص‌های اسیدیته و قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیکی در فرجه‌های زمانی به ترتیب دو ساعته و سه روزه در گرماخانه ثبت گردید. در ادامه این پژوهش از شیر سویای طعم دار (طعم طالبی) با اسیدیته و میزان باکتری کمتر در هر لیتر در نظر گرفته شد. مشاهدات حاکی از آن بود که شیر سویای ساده حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و پس از آن لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدوباکتریوم بیفیدوم زودتر از بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به اسیدیته ۴۲ درجه دورنیک رسید و شیر سویای حاصل از آن‌ها مزه تندی مواجه شد. اما محصول تولیدی از بیفیدوباکتریوم بیفیدوم مزه بهتری نسبت به دو محصول دیگر داشت. در کل شیر سویای تولیدی از نظر طعم مورد قبول واقع نشد. محصولات تولیدی از شیر سویای طعم دار (طالبی) مزه بهتری نسبت به شیر سویای ساده داشت و مورد قبول واقع شد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ۱۳۸۸، دوره ۵، شماره ۲، ۱۰۳-۹۹.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، شیر سویا، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم.

### مقدمه

پروبیوتیک از واژه یونانی پروبیوس به معنای حیات بخش اقتباس شده است و از نظر مفهوم در مقابل واژه پادزیست به معنای ضد حیات قرار دارد (۲).

واژه پروبیوتیک از ابتدای کاربرد آن، بر ریزنده‌هایی با خواص مورد بحث دلالت نداشته و تا رسیدن به مفهوم امروزی بارها به معنایی مختلف به کار برده شده است. این واژه ظاهراً نخستین بار در سال ۱۹۵۴ در دست نوشته‌های شخصی بنام ویرجیو (Virgio)



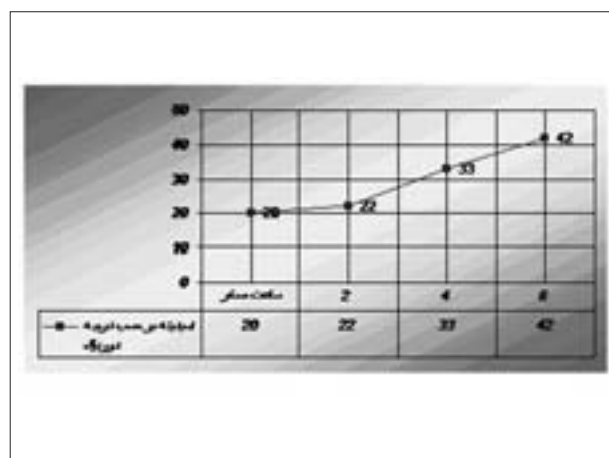
حاوی بیش از ۱۰<sup>۷</sup> عدد میکروب لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گرم، به ظرف دوم ۰/۵۰ گرم بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و به ظرف سوم مخلوطی از هر دو باکتری فوق به نسبت های مساوی (هر کدام ۰/۲۵ گرم) به عنوان استارتر به طور مستقیم به شیر سویا افزوده و به هم زده شد و سپس در گرمخانه ۳۸ درجه سانتیگراد قرار داده شد. تقریباً هر دو ساعت یک بار آزمون اسیدیته تا رسیدن به اسیدیته ۴۲ درجه دور نیک انجام گرفت، سپس نمونه ها از گرمخانه به یخچال انتقال داده شد. شیر سوئیای پروبیوتیکی هر سه روز یک بار جهت شمارش میکروبی به روش مستقیم مورد ارزیابی قرار گرفت (۱).

#### تیمار دوم: روش تولید شیر سوئیای طعم دار با اسیدیته کمتر

در تیمار دوم از شیر سوئیای طعم دار (طالبی) استفاده شد در ابتدا مقدار ۴/۵ لیتر شیر سوئیای طعم دار به مقادیر مساوی در سه ظرف ریخته و سپس به ظرف اول ۰/۵۰ گرم باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، به ظرف دوم ۰/۵۰ گرم بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و به ظرف سوم مخلوطی از هر دو باکتری فوق به نسبت های مساوی (هر کدام ۰/۲۵ گرم) افزوده گردید. به علت اینکه در تیمار اول نمونه ها با مزه تندی مواجه شدند پس از رسیدن اسیدیته نمونه ها به ۳۰ درجه دور نیک از گرمخانه به یخچال انتقال داده شدند (۴).

### نتایج

نمودار ۱، ۲ و ۳ افزایش اسیدیته را در شیر سوئیای ساده تیمار اول نشان می دهند. بررسی رشد میکروب ها در شیرهای تیمار اول در جدول نشان داده شده است. نمودار ۴، ۵ و ۶ افزایش اسیدیته را در شیرهای تیمار دوم نشان می دهند. بررسی رشد میکروب ها در شیرهای تیمار دوم در جدول ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۱ - روند افزایش اسیدیته بر حسب درجه دور نیک در شیر سوئیای حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (تیمار اول)

به کار رفته است. او در دست نوشت خود با عنوان (پاذریست ها و زیست بخش ها)، (Anti - and Pro biotika) به بررسی اثرات زیان بخش مصرف پاذریست ها بر جمعیت میکروبی روده پرداخته و پروبیوتیک ها را موادی دانسته بود که بر این فلور میکروبی اثر مطلوب دارند (۸).

در سال ۱۹۸۹ فولر (Fuller) پروبیوتیک، را تحت عنوان "مکمل های غذایی حاوی میکروب های زنده که از طریق تعادل میکروفلور روده اثرات مفید در بدن میزبان ایجاد می نماید" تعریف نمود که در این تعریف اثرات مفید پروبیوتیک فقط از طریق میکروفلور روده شناخته شده است (۵).

افزایش گرایش به مصرف مواد غذایی گیاهی در بسیاری از نقاط جهان سبب شده که اخیراً فرآورده های پروبیوتیک گیاهی یا با پایه گیاهی فراوانی طراحی و تولید شوند که از جمله آن ها فرآورده های پروبیوتیک با پایه سویا و شیر سوئیای تخمیری پروبیوتیک است (۹، ۱۱).

وجود پروتئین های سویا فرآورده یاد شده را از قابلیت پروبیوتیک - حفاظتی بالا در برابر اسید معده و صفرا بر خوردار می سازد. شیر سویا همچون شیر، محیط نسبتاً مناسبی برای رشد باکتری های لاکتیک است علت این پدیده وجود عوامل مغذی محرک شامل الیگوساکاریدها، اسیدهای آمینه آزاد و پتیدها است (۶). عقیده بر آن است که فرآورده های سویا به تنهایی، دارای قابلیت بازداری بیماری های مزمن مانند سرطان، نرم - استخوانی، پوکی استخوان و اختلالات یائسگی هستند. از این رو ساخت فرآورده های پروبیوتیک با پایه سویا می تواند به تولید فرآورده های هدفمند کم نظیر بیانجامد (۱۳).

پس در راستای این هدف، کلیه مراحل تولید شیر سویا از نظر اسیدیته، میزان واحدهای تشکیل دهنده میکروارگانیسم، ساعت تولید، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج ثبت شدند.

### مواد و روش کار

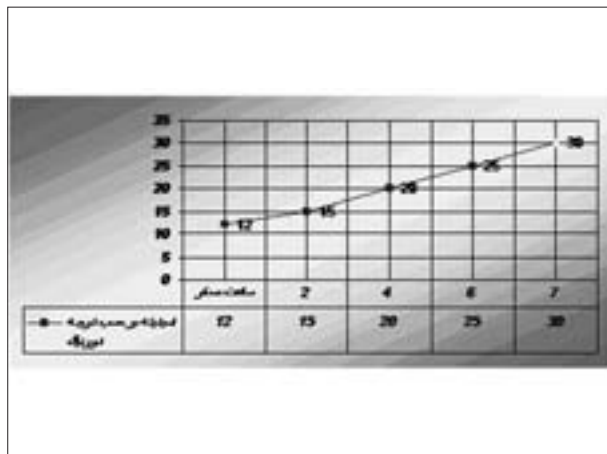
۱- باکتری لیوفیلیزه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم ساخت شرکت Chr Hansen دانمارک

۲- شیر سوئیای استریلیزه (ساده و طعم دار)

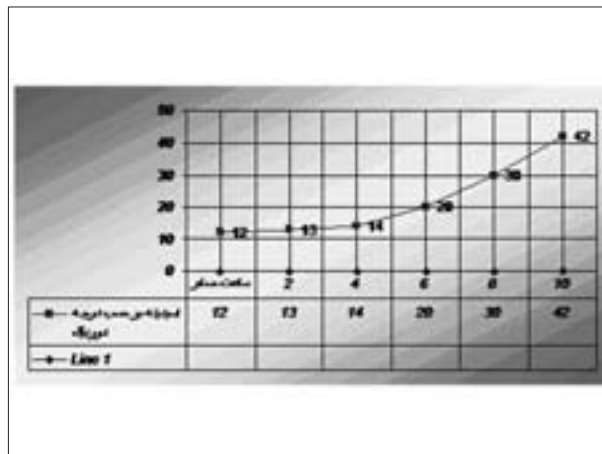
تیمار اول: روش تولید شیر سوئیای ساده

در ابتدا مقدار ۴/۵ لیتر شیر سوئیای ساده را به مقادیر مساوی در سه ظرف ریخته و سپس به ظرف اول ۰/۵۰ گرم در لیتر طبق توصیه شرکت تولید کننده برای بدست آوردن ماده غذایی پروبیوتیکی

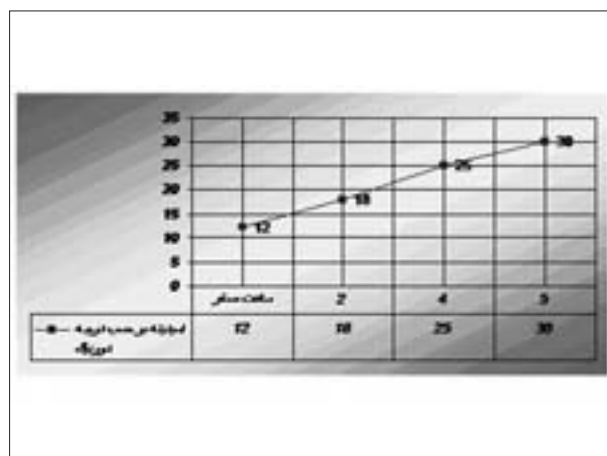




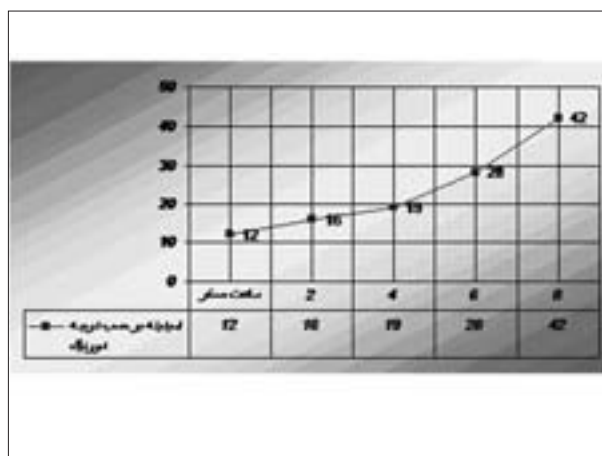
نمودار ۴ - روند افزایش اسیدیته بر حسب درجه دورنیک در شیر سویای حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس (تیمار دوم)



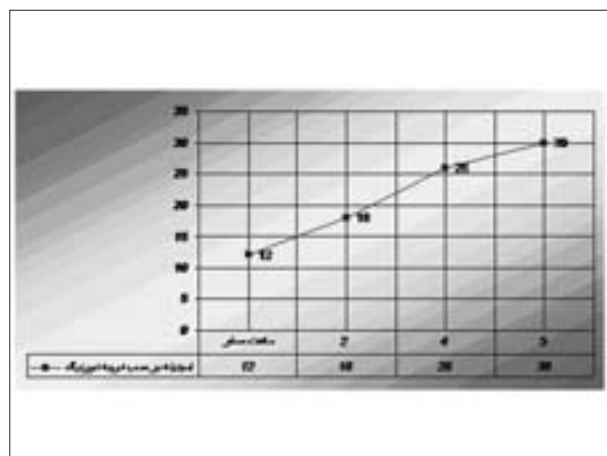
نمودار ۲ - روند افزایش اسیدیته بر حسب درجه دورنیک در شیر سویای حاوی بیفیدو باکتریوم بیفیدوم (تیمار اول)



نمودار ۵ - روند افزایش اسیدیته بر حسب درجه دورنیک در شیر سویای حاوی بیفیدو باکتریوم بیفیدوم (تیمار دوم)



نمودار ۳ - روند افزایش اسیدیته بر حسب درجه دورنیک در شیر سویای حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم (تیمار اول)



نمودار ۶ - روند افزایش اسیدیته بر حسب درجه دورنیک در شیر سویای حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم (تیمار دوم)

### جدول ۱- بررسی رشد میکروب ها در شیر سویای تیمار اول

روز سوم	روز ششم	روز نهم	شمارش میکروبی بر حسب bacterial ml
$4 \times 10^7$	$2 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس
$2 \times 10^7$	$8 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	بیفیدو باکتریوم بیفیدوم
$2 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم



## جدول ۲- بررسی رشد میکروب‌ها در شیرهای تیمار دوم

شمارش میکروبی بر حسب bacterial ml	روز سوم	روز ششم	روز نهم
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	$9 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^7$
بیفیدو باکتریوم بیفیدوم	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم	$1 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$1 \times 10^7$

## بحث و نتیجه‌گیری

در طی تولید شیر سویای ساده پروبیوتیکی پس از افزودن باکتری‌های لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و مخلوط لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم برای رسیدن به اسیدیته ۴۲ درجه دورنیک در گرمخانه قرارداد، پس از رسیدن اسیدیته نمونه‌ها به ۴۲ درجه دورنیک شیرسویاها به یخچال انتقال داده شدند، که در این میان اسیدیته نمونه حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس به طور ناگهانی بالا رفت و به ۵۳ درجه دورنیک رسید. اسیدیته در طی یخچال‌گذاری نیز به بالا تراز ۴۲ درجه دورنیک رسید و شیرسویای حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مدت زمان کمتری نسبت به شیر سویای حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و سپس شیر سویای حاوی بیفیدو باکتریوم بیفیدوم به اسیدیته مورد نظر رسید. این موضوع نشان دهنده بالا بودن سرعت رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به بیفیدو باکتریوم بیفیدوم می‌باشد.

آمار نشان می‌دهند که به طور کلی میزان افت بیفیدو باکتریوم بیفیدوم‌ها در مقایسه با لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و سایر پروبیوتیک‌های اسید لاکتیک بیشتر و میزان رشد و تکثیر آن در فرآورده کمتر است. این موضوع را می‌توان به حساسیت بیشتر این جنس نسبت به اکسیژن، اسیدیته بالا و PH پایین، نیاز به مکمل‌های رشد یعنی ازت آلی کوچک مولکول و ویتامین‌ها و نیاز به پتانسیل احیای پایین نسبت داد (۳).

شیر سویای حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس قبل از یخچال‌گذاری به صورت لخته در آمده بود و یک لایه قهوه‌ای رنگ روی آن نقش بسته بود و پس از یخچال‌گذاری اسیدیته آن بالا رفت و به ۱۴۸ درجه دورنیک رسید و یک لایه روغن بر روی آن نقش بست و شیر سویای حاصل از آن قابل خوردن نبود و تندور نسید شده بود. شیر سویای حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو

باکتریوم بیفیدوم نیز قبل از انتقال به یخچال در گرمخانه به صورت لخته در آمده و یک لایه قهوه‌ای کم رنگ روی آن نقش بسته بود و اسیدیته آن به ۱۲۱ درجه دورنیک رسید و مزه تند و نامطلوبی داشت.

شیر سویای حاوی بیفیدو باکتریوم بیفیدوم نیز در حین گرمخانه‌گذاری یک لایه کرم رنگ روی آن تشکیل شده بود ولی قوام کمتری نسبت به دو حالت قبل داشت و اسیدیته آن به ۷۰ درجه دورنیک رسید، مزه بهتری نسبت به دو حالت فوق داشت. این تفاوت مزه و رنگ در شیر سویای حاوی بیفیدو باکتریوم بیفیدوم می‌تواند در اثر رشد کندترین باکتری و پایین بودن میزان اسیدیته آن به وجود آید.

در تحقیق دیگری که هم‌زمان و در همین شرایط انجام گرفت رشد باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم در شیر طی زمان کمتری نسبت به شیر سویا به اسیدیته مورد نظر (۴۲ درجه دورنیک) رسید و طی یخچال‌گذاری اسیدیته شیر پروبیوتیکی کمتر از شیر سویای پروبیوتیکی بود که نشان دهنده آن بود که باکتری‌های پروبیوتیکی در شیر سویا نسبت به شیر رشد بیشتری دارند.

با توجه به اینکه شیر سویای تولیدی طعم خوبی نداشت در تیمار دوم از شیر سویای طعم دار (طعم طالبی) و شیر سویا را تا رسیدن به اسیدیته ۳۰ درجه دورنیک در گرمخانه قرار داده شد تا به میکروب‌ها اجازه رشد داده شود.

شیر سویای طعم دار حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس یک لایه قهوه‌ای کم رنگ در سطح آن به وجود آمده بود و اسیدیته آن در زمان یخچال‌گذاری به ۸۰ درجه دورنیک رسید اما مزه بهتری نسبت به شیر سویای ساده پروبیوتیکی داشت.

شیر سویای طعم دار حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس - بیفیدو باکتریوم بیفیدوم بر سطح آن یک لایه سفید رنگ ایجاد شده بود و اسیدیته آن در زمان یخچال‌گذاری به ۸۲ درجه دورنیک رسید.

شیر سویای طعم دار حاوی بیفیدو باکتریوم بیفیدوم یک لایه نازک سفید رنگ بر سطح آن نقش بسته بود و اسیدیته آن در زمان یخچال‌گذاری ۵۶ درجه دورنیک بود که مزه بهتری نسبت به دو باکتری قبل داشت.

از نمونه‌های حاوی شیر سویای پروبیوتیکی شمارش میکروبی به روش مستقیم انجام گرفت، حداقل میزان باکتری در فرآورده‌های پروبیوتیک ۱۰<sup>۷</sup> است در حالی که در این مطالعه میزان



فرآورده پروبیوتیکی شیر با استفاده از کشت کمکی لاکتوباسیلوس کازی، مجله علمی پژوهشی علوم دامپزشکی، سال اول، شماره ۱، صفحه: ۸۴-۷۵.

6. Bizkorovainy, A., Miller-Catchpole, R. (1989) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 29-72.
7. Daniel Commame, Roisin Hughes, Colette Short, Ian Rowland / Mutation Research 591. (2005) 276-278 Available on line at www.Sciencedirect.com.
8. Holzapfel, W.H., Steel, J. L. (2001) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 35 - 109.
9. Jay, J. M. (1992) Modern Food Microbiology, Chapt. 16. Chapman & Hall, London.
10. Matsuyama, J., Hirata, H., Yamagishi, T., Hayashi, K., Hirano, Y., Kuwata, K., Kiyosawa, I., Nagasawa, T. (1992) *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39-887.
11. MattilaSandholm, T., Mylarinen, P., Critenden, R., Modensen, G., Fonden, R., Saarela, M. (2002) Clinical applications of probiotic bacteria, *International Dairy Journal*, 12-173.
12. Modler, H. W., McKeller, R. C., Yaguchi, M. (1990) role of microorganisms in food production and preservation, *Candidan Institute of Food Science and Technology*, 23- 29.
13. Setchell, K.D.R., Cassidy, A. (1999) An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 129-758.
14. Swensen, U. (1999) Probiotics: A critical review. Horizon Scientific press, Wymondham, 57-64.

باکتری  $10^{10}$  میکروب بود بنابراین خواص مورد نظر میکروب های پروبیوتیکی را در مصرف کننده به وجود می آورند (۱۲) در کل شیر سویای حاوی باکتری های فوق از نظر طعم و مزه مورد قبول واقع نشد و طعم تند و اسیدی را داشتند.

تحقیقات نشان داده اند تفکیک شده دانه سویا رشد باکتری های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم را تشدید می کند، شیر سویای تخمیری پروبیوتیک بر روی باکتری لاکتوباسیلوس برو مورد مطالعه قرار گرفته است، ل. برو از پروبیوتیک های ثمر بخش در تولید این فرآورده بوده است، زیرا قادر است بدون غنی سازی محیط پایه فرآورده تا رسیدن به جمعیت  $10^9$  cfu/ml تکثیر کند و طی ۲۰ روز نگهداری در  $10^6$  درجه سانتیگراد نیزافت چندان نداشته باشد (۱۰).

در سال ۲۰۰۵ دنیل کمانه به بررسی خواص ضد سرطانی پروبیوتیک ها پرداخته است او پروبیوتیک ها را دارای خواص مفید اولیه برای میزبان در جلوگیری از عفونت های روده ای و تأثیرهای مفید دیگر شامل کاهش آلرژی، کنترل میزان کلسترول خون، تلفیق کننده عملکرد دستگاه ایمنی بدن و جلوگیری از سرطان کولون می داند (۷)

اسونسون (Swenson) در سال ۱۹۹۹ مطرح نمود که در صورت امکان، پروبیوتیک باید قادر به رشد در طول تخمیر باشد که این امر باعث افزایش تعداد کلی باکتری ها شده و قیمت تولید محصول را کاهش می دهد و از طرف دیگر باعث می گردد که باکتری هر چه بیشتر به محیط محصول عادت نماید (۱۴).

### منابع

- ۱- فرخنده، ع. (۱۳۷۷) روش های آزمایش شیر و فرآورده های آن، چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۲۷۰-۲۶۶.
- ۲- خسروی دارانی، ک. کوشکی، م. ر. (۱۳۸۷) پروبیوتیک ها در شیر و فرآورده های آن، انتشارات مرز دانش، چاپ اول، صفحه ۱-۱۲.
- ۳- مرتضویان، ا. سهراب وندی، س. (۱۳۸۵) پروبیوتیک و فرآورده های غذایی پروبیوتیک، انتشارات اتا، چاپ اول، صفحه ۲۶۴-۲۱۳.
- ۴- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸۵) شیر و فرآورده های آن. تعیین اسیدیته و pH - روش آزمون، استاندارد ملی شماره ۹۹۸۵.
- ۵- میرزایی، م. کریم، گ. (۱۳۸۳). مطالعه امکان تولید یک

