Study on effect of Artemisia sieberi hydro-alcoholic extract on the survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis in probiotic yoghurt

Saeed Akbari[1], Ataollah Azhdari[2], Gholam Reza Sharifzadeh[3]

Background and Aim: In the present study, the possibility of probiotic yoghurt production using *Artemisia sieberi* hydro- alcoholic extract and also the effects of different concentrations of this medicinal herb on the survival of two probiotic strains, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis,* in probiotic yoghurt were investigated.

Materials and Methods: In different treatments, the amounts of 0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 gr/lit of Artemisia sieberi extract together with conventional yoghurt starter, *Bif. lactis* and *lact. acidophilus* were added to 1 liter of boiled milk. The samples were incubated at 37?centigrade, and then, the acidity and pH changes every two hours during the incubation period were examined up to approximately 80? of the survival of probiotic bacteria was tested during the storage of the samples in the refrigerator .On the tenth day, after yoghurt production, all the samples were examined for sensory evaluation using a panel test and the obtained data was analyzed by means of SPSS software (V:19).

Results: There was no significant difference in the acidity and pH changes during the production process of probiotic yoghurt in different treatments. The probiotic yoghurt containing 0.4 gr/lit of Artemisia hydro-alcoholic extract had the best quality in terms of organoleptic properties and shelf life of the product. During 21 days storage in the refrigerator none of the treatments showed the number of probiotic bacteria less than 10^6 bacteria in gram.

Conclusion: It was found that appropriate concentrations of Artemisia sieberi extract can be used for the production of probiotic yoghurt, as a new functional food containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifodobacterium lactis.*

Key Words: Artemisia sieberi, Probiotic yoghurt, *Lactobacillus acidophlus, Bifidobacterium lactis*.

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2017; 24 (1): 50-61.

Received: June 8, 2016 Accepted: April 10, 2017

[1] *Graduated M.Sc. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Birjand Branch, Islamic Azad University, Birjand, Iran*
[2] **Corresponding Author;** *Department of Food Science and Technology, Assistant Professor faculty of Agriculture, Birjand Branch, Islamic Azad University, Birjand, Iran.*
Email: Ataazhdari@yahoo.com Tel: +985632409283 Fax: +985632345591
[3] Social Determinant of Health Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

مقاله اصیل پژوهشی

مطالعه تأثیر عصاره آبی - الکلی گیاه دارویی درمنه دشتی (Artemisia sieberi) بر بقای باکتری‌های لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس در ماست پروبیوتیک

سعید اکبری[1]، عطاله اژدری[2]، غلامرضا شریف‌زاده[3]

چکیده

زمینه و هدف: در این مطالعه، امکان تولید ماست پروبیوتیک با استفاده از عصاره آبی- الکلی گیاه دارویی درمنه دشتی و نیز تأثیر غلظت‌های مختلف این عصاره بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* در ماست پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق: در تیمارهای مختلف به یک لیتر شیر حرارت دیده، عصاره آبی- الکلی درمنه به‌میزان 0، 0/1، 0/2، 0/3 و 0/4 گرم در لیتر، استارتر معمولی ماست و باکتری‌های پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌صورت توأم افزوده گردید. نمونه‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و هر دو ساعت تغییرات pH و اسیدیته آنها تا رسیدن اسیدیته به حدود 80 درجه دورنیک بررسی می‌شد. در طول مدّت‌زمان نگهداری در یخچال، نمونه‌ها از نظر قابلیّت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک مورد بررسی و آزمون قرار گرفتند. در روز دهم پس از تولید نیز تمامی نمونه‌ها با کمک آزمون پانل مورد ارزیابی حسی قرار گرفت. در نهایت داده‌ها با کمک آزمون آماری کروسکال‌والیس و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش 19) تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: در روند تولید ماست پروبیوتیک، تمامی نمونه‌ها تقریباً در یک زمان به pH و اسیدیته موردنظر رسیدند و تغییرات اسیدیته و pH در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری با هم نداشت. ماست پروبیوتیکی که به آن 0/4 گرم در لیتر عصاره آبی-الکلی درمنه دشتی افزوده شد، بهترین نتایج را از نظر خواص ارگانولپتیک و ماندگاری داشت. در طی دوره نگهداری نمونه‌ها در یخچال، از روز اول تا روز 21 تعداد باکتری‌های پروبیوتیک روند کاهشی داشت، ولی در هیچ‌یک از نمونه‌ها، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک از 10^6 باکتری در هر گرم کمتر نشد.

نتیجه‌گیری: می‌توان از غلظت مناسب عصاره گیاه دارویی درمنه دشتی در تولید ماست پروبیوتیک حاوی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* به‌عنوان یک غذای فراسودمند جدید استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: درمنه دشتی، ماست پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس*

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1396؛ 24 (1): 50-61.

دریافت: 1395/03/19 **پذیرش: 1396/1/21**

[1] گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد بیرجند، دانشگاه آزاد اسلامی، بیرجند، ایران.

[2] **نویسنده مسؤول؛** گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد بیرجند، دانشگاه آزاد اسلامی، بیرجند، ایران.

آدرس: بیرجند- انتهای بلوار آیت ا... غفاری- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بیرجند

تلفن: 056-32409283 نمابر: 056-32345591 پست الکترونیکی: Ataazhdari@yahoo.com

[3] مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثّر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

مقدمه

مادّه غذایی هدفمند[1]، مادّه غذایی است که دربردارنده دست‌کم یک خاصیت سلامت‌بخش مشخص و به‌اثبات رسیده، افزون برخواص تغذیه‌ای پایه بوده و به‌صورت هدفمند از جانب تولیدکننده یا توسط متخصصین علم تغذیه توصیه و توسط مصرف‌کنندگان مصرف شود. در واقع این دسته موادّ غذایی از طریق افزایش فعالیت‌های فیزیولوژیکی مشخص، باعث تقویت سطح سلامت می‌شوند، ولی برای درمان بیماری‌ها مفید نیستند (1).

پروبیوتیک‌ها عبارتند از مکمل‌های غذایی میکروبی زنده که با تولید ترکیبات مهاری و ممانعت‌کننده، رقابت با عوامل پاتوژن برای دستیابی به مواد شیمیایی و مکان‌های اتصال، تحریک و تنظیم فعالیت سیستم ایمنی و بهبود تعادل میکروبی روده، اثرات سودمندی بر میزبان دارند (2). از جمله مزایای بالقوّه غذاهای پروبیوتیک در سلامتی انسان، بهبود تعادل میکروفلور دستگاه گوارش، تحریک سیستم ایمنی و فعالیت ضدّ سرطانی، درمان عدم تحمّل لاکتوز، درمان سندرم روده تحریک‌پذیر، پیشگیری و درمان اسهال و کاهش کلسترول می‌باشد (3). طبق استانداردهای بین‌المللی، برای آنکه باکتری‌های پروبیوتیک بتوانند اثرات سلامت‌بخش خود را در انسان ایجاد کنند، حداقل 10^6 cfu/gr باکتری به‌هنگام مصرف مادّه غذایی لازم است تا تعداد کافی و مناسب از ارگانیسم‌های زنده مفید بتوانند به روده بزرگ رسیده و در آنجا اثرات خود را اعمال کنند. بنابراین نکته حائز اهمیّت در تولید و عرضه این‌گونه محصولات، حفظ بقا و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها از لحظه تولید تا رسیدن به روده بزرگ است (4، 5)؛ زیرا تعداد زیادی از پروبیوتیک‌ها طی تولید و نگهداری و پس از آن در حین عبور از دستگاه گوارش از بین می‌روند. بنابراین انتخاب سوش مناسب که در برابر شرایط محیطی نامناسب در حین فرآوری و ذخیره‌سازی و نیز در برابر اسید معده و صفرا پایدار بوده و زنده بماند، یکی از اولویت‌های مهم است (6، 7).

به‌طور معمول یکی از گروه‌های مواد غذایی که می‌توان به بهترین نحو ممکن آن را با باکتری‌های پروبیوتیک غنی کرد، شیر و برخی فرآورده‌های لبنی نظیر ماست می‌باشد. از معمول‌ترین کشت‌های میکروبی که در صنعت غذا در تولید فرآورده‌های پروبیوتیک به‌کار می‌روند می‌توان به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و ... اشاره کرد (8). *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، غیراسپورزا و بی‌هوازی اختیاری بوده و یکی از مفیدترین گونه‌های *لاکتوباسیلوس* و جزء فلور طبیعی روده انسان و حیوانات می‌باشد. این‌گونه که به‌عنوان پرمصرف‌ترین پروبیوتیک شناخته‌شده، از مقاوم‌ترین گونه‌های *لاکتوباسیلوس* به شرایط اسیدی‌مانند شیره معده و همچنین نمک‌های صفراوی است و داخل فرآورده‌های تخمیری نیز وجود دارد. *بیفیدوباکتریوم‌ها*، بی‌هوازی اجباری و بدون اسپور بوده و از فراوان‌ترین میکروب‌هایی هستند که فلور طبیعی روده بزرگ انسان را تشکیل می‌دهند؛ بدون حرکت، کاتالاز و ایندول منفی بوده و قادر به احیای نیتریت نیستند (9، 10).

گیاه درمنه با نام علمی آرتمیزیا [2] گیاهی بوته‌ای و متعلّق به خانواده آستراسه[3] می‌باشد. بسیاری از گونه‌های درمنه، معطّر و غنی از عصاره هستند که این عطر ویژه، ناشی از وجود مونوترپن‌ها[4] و سزکویی‌ترپن‌ها[5] بوده و دلیل کاربرد آنها در طب سنّتی است. تجزیه عصاره درمنه نشان می‌دهد که موادّ مختلفی مانند: سانتونین، کافور، الفا تیوجن، سینئولی، میرسین، ترکیبات الکلی و... در اسانس آن وجود دارند (10). گونه‌های درمنه عملکرد ضدّ التهابی و تب‌بر داشته و خاصیت ضدّ باکتریایی، ضدّ ویروسی، ضدّ مالاریایی، ضدّ قارچی و آنتی‌اکسیدانی دارند. ترکیبات آن به‌عنوان اشتهاآور، محرّک،

[1] *Functional foods*

[2] *Artemisia*
[3] *Asteraceae*
[4] *Monoterpene*
[5] *Sesquiterpene*

ضدّ عفونی‌کننده، بازکننده مجاری و عروق، ضدّ سرفه، ضدّ انگل و در تسکین سردرد و دردهای روماتیسمی به‌کار می‌روند (11، 12).

هدف اصلی از انجام این تحقیق، مطالعه امکان استفاده از عصاره گیاه دارویی درمنه دشتی در تولید ماست پروبیوتیک بود؛ به‌گونه‌ای که فرآورده تولیدشده ضمن دارابودن خواص یک مادّه غذایی فراسودمند، تا حدّی از ویژگی‌های ارگانولپتیک جدید و اثرات سلامت‌بخش ناشی از به‌کارگیری عصاره گیاه دارویی درمنه نیز برخوردار باشد.

روش تحقیق

بخش‌های هوایی گیاه درمنه دشتی با نام علمی آرتمیزیا سیبری[1] (که در گویش محلی به آن ترخ گفته می‌شود) از اطراف بیرجند جمع‌آوری و پس از تأیید توسط کارشناس گیاهان دارویی، در سایه خشک گردید. برای تهیه عصاره آبی- الکلی درمنه، از روش ماسراسیون (خیساندن) استفاده گردید. بدین‌منظور، 50 گرم از درمنه خشک‌شده، داخل ارلن ریخته شد و به آن به‌میزان500 میلی‌لیتر اتانول 96 درجه و500 میلی‌لیتر آب مقطر دیونایز اضافه گردید. درب ارلن با فویل آلومینیومی بسته و با کمک شیکر در دمای آزمایشگاه به‌مدت 72 ساعت هم‌زده شد. ترکیبات داخل ارلن با کاغذ صافی واتمن صاف شد و مایع صاف‌شده، با کمک روتاری اوپوراتور (IKA RV10- آلمان) در دمای 45 درجه سانتی‌گراد تا حد امکان تغلیظ و سپس به‌مدّت 72 ساعت در آون (Memmert UM 400- آلمان) 45 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا باقیمانده مایعات تبخیر شده و در نهایت عصاره حاصل به وزن ثابت برسد. عصاره به‌دست‌آمده به‌عنوان عصاره مرجع در یخچال نگهداری و از آن به‌طور مستقیم برای آمادّه سازی هر یک از نمونه‌ها استفاده شد (13).

برای تهیه ماست با استفاده از عصاره آبی- الکلی گیاه درمنه و باکتری‌های پروبیوتیک ابتدا استارتر سنّتی ماست (OPTIFERM-آلمان) حاوی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس‌دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس‌ترموفیلوس* و همچنین باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* (LAFTI-L10 DSL) و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* (LAFTI-B94 DSL) به‌صورت خشک‌شده انجمادی و از نوع DVS[2] از نمایندگی شرکت DSM هلند در ایران (شرکت آنزیم‌های صنعتی) خریداری گردید. شیر خام مورد استفاده (تهیه‌شده از کارخانه لبنی نیمبلوک)، در دمای 90-85 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 5 دقیقه حرارت داده شده و پس از آن دمای شیر تا 40 درجه سانتی‌گراد خنک گردید. تعداد 5 ظرف استریل تهیه و مقدار یک لیتر شیر حرارت‌دیده به هر کدام از ظروف اضافه گردید. از 5 ظرف مورد نظر، یک نمونه به‌عنوان شاهد حاوی 0/024 گرم استارتر سنّتی ماست، 0/03 گرم باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و0/0027 گرم باکتری *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس*، بدون عصاره در نظر گرفته شد (نمونه 1) و به چهار ظرف دیگر به‌ترتیب: 0/1، 0/2، 0/3 و 0/4 گرم در لیتر عصاره درمنه دشتی به‌همراه باکتری‌های گفته‌شده در بالا اضافه گردید و به‌ترتیب تحت عنوان نمونه‌های شماره 2 تا 5 کدگذاری شد. لازم به ذکر است که مقادیر افزوده‌شده هر یک از باکتری‌ها بر اساس توصیه شرکت تولیدکننده باکتری تعیین گردید.

کلیه ظروف که قبلاً کدگذاری شده بودند، پس از دربندی تا رسیدن به اسیدیته حدود80 درجه دورنیک در دمای37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. هر دو ساعت یک‌بار آزمون اسیدیته و pH تا رسیدن به اسیدیته مطلوب انجام گرفت (14). پس از رسیدن اسیدیته نمونه‌ها به حدّ مورد انتظار، نمونه‌ها از گرمخانه خارج و به یخچال با دمای 4 درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. برای ارزیابی حسّی، یک نمونه ماست معمولی نیز فقط با استفاده از استارتر سنّتی ماست

[1] *Artemisia sieberi*

[2] *Direct Vat Set*

(فاقد عصاره و باکتری‌های پروبیوتیک) تهیه گردید. نمونه‌های ماست پروبیوتیکی تولیدشده هر 7روز یک‌بار (تا رو ز21) برای شمارش میکروب‌ها، به روش کشت میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفتند (15، 16)؛ همچنین پس از ده روز نگهداری در یخچال، ماست‌ها از نظر ویژگی‌های حسّی ارزیابی شدند. ارزیابی حسّی با استفاده از پرسش‌نامه (آزمون پانل) در یک جمعیت50 نفری انجام شد. در پرسش‌نامه هرکدام از عوامل عطر و بو، طعم و مزه، قوام، شکل ظاهری و پذیرش کلّی در پنج سطح خیلی‌خوب، خوب، متوسط، ضعیف و خیلی ضعیف مورد سؤال قرار گرفت. نتایج پرسش‌نامه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش 19) و با کمک آزمون آماری کروسکال‌والیس مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت (17).

pH هر یک از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه pH متر (Hanna-pH211-پرتقال)، در دمای 20درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد؛ ضمن آنکه اندازه‌گیری اسیدیته نیز برحسب درجه دورنیک و با استفاده از سود یک‌دهم نرمال و معرّف فنل‌فتالئین صورت پذیرفت (14). برای شمارش باکتری *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* از محیط کشت TOS-Agar (Merck-آلمان) حاوی آنتی‌بیوتیک موپیروسین‌لیتیوم‌فسفات و روش کشت پورپلیت استفاده گردید. گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها به‌مدّت 3±72 ساعت در دمای37درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط بی‌هوازی در جار بی‌هوازی به‌همراه گازپک (Merck-1.13829.0001 آلمان) صورت پذیرفت. پس از گرمخانه‌گذاری، پلیت‌های حاوی کلنی‌های شاخص برای شمارش انتخاب شدند. بیشتر گونه‌های *بیفیدوباکتریوم*، کلنی‌های متمایل به سفید، مدوّر یا دوکی‌شکل تاحدودی ستاره‌ای شکل و یا برگ‌شبدری به قطر 4-1 میلی‌متر ایجاد می‌کنند (15).

برای شمارش باکتری *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس*، از محیط کشت MRS-Agar (Merck- آلمان) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین‌هیدروکلراید و سیپروفلوکساسین‌هیدروکلراید (MRS/CL/CIP) و روش کشت سطحی استفاده گردید. گرمخانه‌گذاری به‌مدّت 3±72 ساعت در دمای 37درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط هوازی صورت پذیرفت. پس از طی این مدّت، کلنی‌های شاخص توسط کلنی‌کانتر شمارش شدند. کلنی‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* صاف، پهن، زبر، سفید تا خاکستری با لبه‌های کم و بیش نامنظم به قطر 3-1 میلی‌متر می‌باشند (16).

به‌منظور شمارش تعداد کپک و مخمّر، پس از 21 روز نگهداری در یخچال، از هر یک از نمونه‌های ماست پروبیوتیک تولیدشده، در محیط کشت YGC agar[1] (Merck- آلمان) به روش کشت مخلوط، کشت میکروبی انجام شد و پلیت‌ها به‌صورت هوازی در انکوباتور یخچال‌دار (UELP FTC 90E- ایتالیا) در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به‌مدّت 5-3 روز گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از این مدّت کلنی‌ها شمارش شده و تعداد کپک و مخمّر در هر گرم از نمونه‌های مورد آزمون محاسبه گردید (18).

یافته‌ها

نتایج حاصل از ارزیابی اسیدیته و pH در روند تولید ماست پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* و غلظت‌های مختلف عصاره آبی-الکلی درمنه در طی دوره گرمخانه‌گذاری در جدول یک نشان داده شده است. لازم به ذکر است که هر یک از نمونه‌های یک تا پنج شامل ترکیبات ذیل بودند:

نمونه یک: حاوی استارتر سنّتی ماست، باکتری‌های *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* و فاقد عصاره؛

نمونه دو: حاوی استارتر سنّتی ماست، باکتری‌های *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* و 0/1gr/lit عصاره؛

نمونه سه: حاوی استارتر سنّتی ماست، باکتری‌های

[1] *Yeast Extract Glucose Chloramphenicole Agar*

لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* و 0/2gr/lit عصاره؛

نمونه چهار: حاوی استارتر سنّتی ماست، باکتری‌های *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* و 0/3عصاره؛

نمونه پنج: حاوی استارتر سنّتی ماست، باکتری‌های *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* و 0/4gr/lit عصاره.

بر اساس داده‌های جدول یک تمامی نمونه‌ها تقریباً در یک زمان به اسیدیته و pH مورد نظر رسیدند؛ ضمن آنکه اختلاف معنی‌داری در میانگین اسیدیته و همچنین میانگین pH در 5 گروه مورد مطالعه مشاهده نگردید (P>0/05).

در جدول 2 به نتایج شمارش تعداد هر یک از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* (برحسب میلیون باکتری در هر گرم ماست) و مقایسه میانگین آنها در نمونه‌های ماست پروبیوتیک حاوی هر دو باکتری و غلظت‌های مختلف عصاره آبی-الکلی درمنه طی مدّت‌زمان نگهداری نمونه‌ها در یخچال اشاره شده است. بر اساس داده‌های جدول 2 تعداد هر یک از باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* در تمامی نمونه‌ها طی دوره نگهداری در یخچال از روز اول تا روز بیست و یکم، روند کاهشی داشت. کاهش تعداد این باکتری‌ها با افزایش غلظت عصاره مشهودتر بود؛ ضمن آنکه اختلاف معنی‌داری در میانگین تعداد هر یک از باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* در 5گروه مورد مطالعه مشاهده نگردید (P>/05).

جدول 1- مقایسه اسیدیته (برحسب درجه دورنیک) و PH نمونه‌ها در روند تولید ماست پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس و غلظت‌های مختلف عصاره درمنه طی دوره گرمخانه‌گذاری

گروه مورد مطالعه	دوره گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها (ساعت)						±SD□		آزمون کروسکال‌والیس	
	02:00		04:00		05:15					
	PH	اسیدیته	PH	اسیدیته	PH	اسیدیته	PH	اسیدیته	PH	اسیدیته
نمونه یک (فاقد عصاره)	6/28	23	4/86	65	4/3	80	5/1±1/1	56±29/5		
نمونه دو (حاوی 0/1gr/lit عصاره)	6/3	21	4/7	61	4/3	84	4/9±0/93	55/3±31/9		
نمونه سه (حاوی 0/2gr/lit عصاره)	6/3	23	4/8	56	4/4	81	5/5±1/1	53/3±29/1	X2=0/74 Df=4 P=0/66	X2=0/74 Df=4 P=0/95
نمونه چهار (حاوی 0/3gr/lit عصاره)	6/2	24	4/6	67	4/3	83	5/03±1/02	58±30/5		
نمونه پنج (حاوی 0/4gr/lit عصاره)	6/1	26	4/6	67	4/2	82	4/97±1	58/3±28/9		

جدول 2- تعداد و میانگین هر یک از باکتری‌های لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس در ماست حاوی هر دو باکتری و غلظت‌های مختلف عصاره درمنه طی مدّت نگهداری فرآورده در یخچال

گروه مورد مطالعه	نوع باکتری	تعداد باکتری برحسب میلیون در هرگرم ماست (×106/gr)				X±SD	آزمون کروسکال‌والیس	
		روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم		Lact.	Bif.
نمونه یک (فاقد عصاره)	Lact.	2/791	2/218	1/745	1/445	2/049±0/59	X2=2/04 Df=4 P=0/73	X2=1/39 Df=4 P=0/85
	Bif.	2/645	1/982	1/491	1/291	1/852±0/6		
نمونه دو (حاوی0/1gr/litعصاره)	Lact.	2/554	1/736	1/381	1/163	1/709±0/61		
	Bif.	2/827	1/836	1/318	1/027	1/752±0/79		
نمونه سه (حاوی0/2gr/litعصاره)	Lact.	2/290	1/745	1/527	1/027	1/647±0/52		
	Bif.	2/609	1/672	1/327	1/110	1/679±0/66		
نمونه چهار (حاوی0/3gr/litعصاره)	Lact.	2/027	1/772	1/418	1/054	1/568±0/42		
	Bif.	2/436	1/546	1/209	1/015	1/551±0/63		
نمونه پنج (حاوی0/4gr/litعصاره)	Lact.	2/254	1/618	1/318	1/054	1/561±0/52		
	Bif.	2/336	1/625	1/218	1/021	1/550±0/58		

جدول 3- شمارش تعداد کپک و مخمر در هر یک از نمونه‌های مورد مطالعه پس از 21 روز نگهداری در یخچال (cfu/gr)

	نمونه یک (فاقد عصاره)	نمونه دو (حاوی 0/1gr/lit عصاره)	نمونه سه (حاوی 0/2gr/lit عصاره)	نمونه چهار (حاوی 0/3gr/lit عصاره)	نمونه پنج (حاوی 0/4gr/lit عصاره)
تعداد کپک و مخمر	87	83	78	76	73

در جدول 3، نتایج شمارش تعداد کپک و مخمّر در هر یک از 5 تیمار مورد مطالعه پس از 21 روز نگهداری در یخچال ذکر شده است. مدت زمانی که برای ماندگاری انواع ماست در نظر گرفته می‌شود، 21 روز است. با توجه به ماهیّت اسیدی ماست، یکی از مهمترین عوامل میکروبی که پس از این مدت ممکن است این فرآورده را از رده خارج کند، افزایش تعداد کپک و مخمر در آن می‌باشد. بنابراین پس از 21 روز نگهداری در یخچال، تمامی نمونه‌های مورد مطالعه از این نظر نیز ارزیابی شدند. همانگونه که نتایج جدول 3 نشان می‌دهد، در تمامی نمونه‌ها، تعداد کپک و مخمر در هر گرم از فرآورده از حدّ مجاز استاندارد که حداکثر 100cfu/gr می‌باشد، کمتر بود (19)؛ بنابراین از این لحاظ می‌توان ادعا نمود که تمامی تیمارها که حاوی غلظت‌های مختلف عصاره آبی-الکلی درمنه بودند، حدّاقل به‌مدّت 21 روز قابلیّت نگهداری در یخچال داشتند.

در جدول 4 میانگین نمره شاخص‌های ارزیابی حسّی در نمونه‌های ماست پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* و غلظت‌های مختلف عصاره درمنه اشاره شده است. در این رابطه، هر یک از نمونه‌های مذکور با نمونه صفر (شاهد) که فقط حاوی استارتر سنّتی ماست بود (بدون عصاره و بدون باکتری‌های پروبیوتیک) مقایسه شد. بر اساس داده‌های جدول 4 می‌توان نتیجه گرفت که بین تیمارهای مختلف از لحاظ عطر و بو، قوام، شکل ظاهری و پذیرش کلی اختلاف معنی‌دار بود. در این رابطه از لحاظ این شاخص‌ها، نمونه شماره پنج (حاوی غلظت 0/4 گرم در لیتر عصاره درمنه) از بقیه تیمارها بهتر بود؛ ضمن آنکه با افزایش غلظت عصاره در ماست پروبیوتیک، شاخص‌های ارزیابی حسّی بهبود یافت.

جدول 4- مقایسه میانگین نمره شاخص‌های ارزیابی حسی در نمونه‌های مختلف ماست پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس و عصاره درمنه

گروه مورد مطالعه	عطر و بو X±SD	طعم و مزه X±SD	قوام (بافت) X±SD	شکل ظاهری X±SD	پذیرش کلی X±SD
ماست معمولی (فاقد عصاره و پروبیوتیک)	1/17±0/38	3/61±1/19	3/89±1/02	3/83±0/99	3/78±0/94
نمونه یک(فاقد عصاره)	2/17±0/71	3/28±0/67	3/61±0/51	3/61±0/5	3/56±0/51
نمونه دو (حاوی0/1gr/litعصاره)	3/72±0/89	3/28±0/67	3/72±0/53	3/72±0/83	3/61±0/61
نمونه سه (حاوی0/2gr/litعصاره)	4/83±0/51	3/72±0/67	4/39±0/69	4/33±0/77	4/28±0/67
نمونه چهار (حاوی0/3gr/litعصاره)	5±0	3/67±0/91	4/5±0/62	4/61±0/61	4/5±0/51
نمونه پنج (حاوی0/4gr/litعصاره)	5±0	4/44±1/04	4/61±0/92	4/72±0/67	4/56±0/71
آزمون آماری کروسکال‌والیس	X2=96/5 Df=5 P<0/001	X2=5/13 Df=5 P=0/4	X2=25/9 Df=5 P<0/001	X2=31 Df=5 P<0/001	X2=31/5 Df=5 P<0/001
نتیجه آزمون آماری من‌ویتنی برای مقایسه گروه‌ها	0 با 2، 0 با 3، 0 با 4 و 0 با 5 1 با 2، 1 با 3، 1 با 4 و 1 با 5 2 با 3، 2 با 4 و 2 با 5 P<0/001		0 با 5 P=0/04 1 با 3 و 2 با 5 P=0/002 1 با 4 و 1 با 5 P<0/001 2 با 3 P=0/02 2 با 4 P=0/007	0 با 4 P=0/02 0 با 5 P=0/009 1 با 3 P=0/006 1 با 4 P<0/004 1 با 5 P<0/001 2 با 3 P=0/04 2 با 4 P=0/002 2 با 5 P=0/001	0 با 4، 0 با 5 و 2 با 3 P=0/02 1 با 3 P=0/004 1با 4، 1 با 5، 2 با 4 و 2 با 5 P<0/001

بحث

آزمون‌های انجام‌شده در زمینه ارزیابی اسیدیته و pH نشان داد که طی دوره گرمخانه‌گذاری در روند تولید ماست پروبیوتیک حاوی غلظت‌های مختلف عصاره درمنه دشتی، تمامی نمونه‌ها ازجمله نمونه شاهد (فاقد عصاره)، تقریباً در یک زمان به اسیدیته و pH مورد نظر رسیدند؛ بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های مختلف عصاره درمنه بر رشد باکتری‌های سنّتی ماست که عمده‌ترین عوامل تولیدکننده اسید و در نتیجه کاهش pH در فرآورده هستند، تأثیر منفی ندارد. در این رابطه نتایج مطالعات Simsek و همکاران نیز نشان داد که اسانس گیاه دارویی نعناع طی مدّت‌زمان نگهداری اثر معنی‌داری بر قابلیّت بقای باکتری‌های

سنّتی ماست ندارد (20). لازم به ذکر است که حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به انواع اسانس‌ها، به ویژگی‌های خود اسانس و میکروارگانیسم بستگی دارد و معمولاً بررسی فعالیت ضدّ میکروبی اسانس‌ها به‌خاطر فرّاریت، غیر محلول بودن در آب و پیچیدگی ساختار شیمیایی آنها با مشکل روبرو است (21).

در مطالعه حاضر تعداد هر یک از باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در تمامی نمونه‌ها طی نگهداری در یخچال از روز اول تا روز بیست و یکم روند کاهشی داشت و کاهش تعداد باکتری‌های مذکور با افزایش غلظت عصاره درمنه در تیمارهای مختلف مشهودتر بود. این امر نشان‌دهنده آن است که عصاره درمنه تا حدّی باعث کاهش بقای باکتری‌های پروبیوتیک در ماست می‌شود؛ ولی اختلاف معنی‌داری در میانگین تعداد هر یک از باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در 5 گروه مورد مطالعه مشاهده نگردید (P>0/05). در این رابطه نصیرپور و همکاران نیز نشان دادند که عصاره آبی درمنه دشتی و درمنه کوهی، دارای اثر ضدّ باکتریایی بوده و استفاده از آنها در صنایع غذایی به‌عنوان بازدارنده امکان‌پذیر است؛ از طرفی چون گیاهان مورد نظر دارای عطر و طعم مطلوبی هستند می‌توان در کنار یک عامل بازدارنده و ضدّ باکتریال طبیعی از آنها به‌عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی با ویژگی‌های خاص استفاده نمود (22). همچنین محمودی و فرزین بیان کردند که اسانس گیاه درمنه دشتی، اثرات ضدّ میکروبی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد (23).

از جمله سایر عوامل مؤثّر بر کاهش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک طی مدّت‌زمان نگهداری در یخچال می‌توان به تغییرات اسیدیته، تولید متابولیت‌هایی نظیر: اسیدهای آلی و پراکسید هیدروژن توسط باکتری‌های سنّتی ماست و همچنین محدودیت دسترسی به موادّ مغذی در محیط اشاره کرد. لازم به ذکر است که در تمامی تیمارها تعداد باکتری‌های پروبیوتیک مورد مطالعه در هر گرم از فرآورده تولیدشده بیشتر از حداقل توصیه‌شده در یک فرآورده پروبیوتیک (10^6باکتری در هر گرم) بود. بنابراین می‌توان ادعا نمود که تمامی نمونه‌ها تا روز 21 نگهداری در یخچال خواص مفید یک فرآورده پروبیوتیک را داشتند (4، 5). محققین در بررسی بقای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در ماست تهیه‌شده از کشت‌های تجاری ABY-2 (حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (LA-5)، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (BB-12) و باکتری‌های سنتی ماست)، تولید پراکسید هیدروژن توسط *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریگوس* و محدودیت دسترسی به موادّ مغذّی در محیط را از عوامل مهم کاهش میزان باکتری‌های پروبیوتیک گزارش نمودند (24). دمای نگهداری فرآورده‌های پروبیوتیک نیز می‌تواند به‌طور مستقیم از طریق اثرگذاری بر قابلیّت بقای سلول‌ها و به‌طور غیرمستقیم از طریق تغییرات سرعت تولید متابولیت‌های ضدّ میکروبی به‌خصوص در کشت‌های پروبیوتیک همراه با باکتری‌های سنّتی ماست بر بقای پروبیوتیک‌ها تأثیرگذار باشد. به‌طور کلّی در ماست تهیه‌شده از کشت آغازگرABY-2، استفاده از دمای 5درجه سانتی‌گراد برای نگهداری فرآورده (مشابه دمایی که در تحقیق حاضر برای نگهداری نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت)، بهترین نتیجه را از نقطه نظر قابلیت زیستی هر دو نوع باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در بر خواهد داشت. از این رو در دماهای بالاتر نگهداری به‌دلیل سرکش‌شدن *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و ایجاد پدیده بیش اسیدسازی، به مرور زمان موجبات از دست رفتن سلول‌های پروبیوتیک فراهم می‌گردد (25).

در مطالعات مختلف اثر اسانس انواع گیاهان دارویی بر ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیک مورد آزمایش قرار گرفته است. به‌عنوان مثال Ouwehand و همکاران، اثر ضدّ میکروبی اسانس‌های آویشن، رزماری و مرزنجوش نسبت به

بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس و غلظت بالای آویشن بر باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* را نشان دادند؛ ضمن آنکه در مطالعه آنها مشخص شد، باکتری *بیفیدوباکتریوم‌برو*[1] نسبت به اسانس‌های آویشن و رزماری، باکتری *بیفیدوباکتریوم‌لانگوم*[2] نسبت به غلظت بالای اسانس‌های آویشن و مرزنجوش و باکتری *لاکتوباسیلوس‌فرمنتوم* نسبت به اسانس‌های آویشن و مرزنجوش حساس بودند (26). در تحقیق سرابی و نیازمند، قابلیّت بقای *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* در بیوماست حاوی غلظت‌های مختلفی از منتاپیپریتا[3] و کاکوتی (از خانواده نعناعیان) بعد از 7 روز نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به‌طور قابل توجهی کاهش یافت (27). در تحقیقی Roldan و همکاران نشان دادند که اسانس منتا اسپیکاتا[4] (نعنای صحرایی) نسبت به اسانس پیپریتا اثر بازدارندگی بیشتری بر روی *بیفیدوباکتریوم‌برو* داشت و اسانس‌های مرزنجوش و آویشن بیشترین اثر بازدارنده بر روی باکتری‌های مفید *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌برو* از خود نشان دادند (28).

در تحقیق حاضر افزایش غلظت عصاره درمنه باعث بهبود خواص حسی فرآورده شد و در کل ماست پروبیوتیکی که به آن 0/4 گرم در لیتر عصاره آبی-الکلی درمنه افزوده شده بود، بهترین نتایج را از نظر عطر و بو، قوام، شکل ظاهری و همچنین از لحاظ پذیرش کلی داشت. به‌طور کلی ویژگی‌های حسی از عوامل اساسی پذیرش بسیاری از فرآورده‌ها و کسب رضایت از مصرف آنهاست. با توجه به اهمیت این خواص، بررسی و شناخت عوامل مؤثّر بر آنها به‌منظور دستیابی به خواص حسّی بهینه و جلوگیری از ایجاد خواص حسی نامطلوب ضروری است و می‌بایست یک محصول با در نظر گرفتن بالاترین قابلیت زیستی و خواص حسّی مطلوب، انتخاب و در اختیار مصرف‌کنندگان قرار گیرد.

در میان فرآورده‌های پروبیوتیک، فرآورده‌های تخمیری و به‌ویژه ماست پروبیوتیک به‌دلیل خواص حسّی کم‌نظیر از مقبولیّت جهانی برخوردار است. از مهمترین عوامل مؤثّر در طعم محصولات لبنی مقادیر استالدئید و دی‌استیل می‌باشند که در اثر تخمیر در محصولات لبنی ایجاد می‌شوند (25).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که امکان استفاده از عصاره گیاه دارویی درمنه دشتی برای تولید ماست پروبیوتیک حاوی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* به‌عنوان یک غذای فراسودمند جدید مهیا بوده و با افزودن 0/4گرم در لیتر از این عصاره در روند تولید، محصول حداقل به‌مدّت 21 روز قابلیت نگهداری داشته و تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در آن حتی پس از 21 روز نگهداری در یخچال از حداقل توصیه‌شده برای یک فرآورده پروبیوتیک (10^6cfu/gr) بیشتر خواهد بود؛ ضمن آنکه خواص ارگانولپتیک فرآورده حاوی عصاره درمنه در مقایسه با ماست معمولی بهبود خواهد یافت.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته مهندسی صنایع غذایی، مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد بیرجند با کد 13150401932005 می‌باشد که در محل آزمایشگاه میکروبیولوژی آن دانشگاه انجام شده است. بدین‌وسیله از تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

[1] *Bifidobacterium breve*
[2] *Bifidobacterium longum*
[3] *Mentha piperita*
[4] *Mentha spicata L.*

منابع:

1- Granato D, Branco GF, Nazzaro F, Cruz AG, Faria JAF. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, Concepts, and Products. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2010; 9(3): 292-303.

2- Tukmechi A, Bandboni M. Effects of Saccharomyces cerevisiae supplementation on immune response, hematological parameters, body composition and disease resistance in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum, 1792). J Appl Ichthyol. 2014; 30(1): 55-61.

3- Ehsani A, Mahmudi R, Tokmechi A, Pajohi MR. Iranian white cheese as a food carrier for probiotic bacteria. Journal of Food Science and Technology. 2011; 8(31): 77-83.

4- Fritzen-Freire CS, Prudêncio ES, Pinto SB, Mu?oz ID, Amboni RDMC. Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. LWT - Food Science and Technology. 2013; 50(1): 39-44.

5- Saarela M, Alakomi HL, M?tt? J, Ahonen AM, Tynkkynen S. Acid tolerant mutants of Bifidobacterium animalis subsp. lactis with improved stability in fruit juice. Journal of Food Science and Technology. 2011; 44(4): 1012-8.

6- Martin-Dejardin F, Ebel Lemetais B, Nguyen Thi Minh H, Gervais P, Cachon R, Chambin O. A way to follow the viability of encapsulated Bifidobacterium bifidum subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. Eur J Pharm Sci. 2013; 49(2):166-74.

7- Yonekura L, Sun H, Soukoulis C, Fisk I. Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus NCIMB701748in matrices containing soluble fiber by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. J Funct Foods. 2014; 6: 205-14.

8- Atallah AA. The production of bio-yoghurt with probiotic bacteria, Royal jelly and Bee pollen grains. J Nutr Food Sci. 2016; 6: 3.

9- Govender M, Choonara YE, Kumar P, du Toit LC, van Vuuren S, Pillay V. A review of the advancements in probiotic delivery: conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. AAPS PharmSciTech. 2014; 15(1): 29-43

10- Behmanesh B, Heshmati GA, Mazandarani M, Reazei MB, Ahmadi AR, Ghaemi EO, et al. Chemical composition and Antibacterial Activity from Essential Oil of Artemisia sieberi Besser Subsp. Sieberi in North of Iran. Asian J Plant Sci. 2007; 6(3): 562-4.

11- El-Massry KF, El-Ghorab AH, Farouk A. Antioxidant activity and volatile components of Egyptian, Artemisia judaica L. Food Chem. 2002; 79(3): 331-6.

12- Shafizadeh F. Popular medicinal plants of Lorestan (Flora of Lorestan). Tehran: Hayyan press; 2002. Vol l. p: 82. [Persian]

13- Khosravi Rad F. The effect of Artemisia sieberi on the Imiria poultry [Dissertation]. [Tehran]: Tehran University; 2000. 62p. [Persian]

14- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Milk and milk products – Determination of titrable acidity and value pH – test method .1st ed. Standard No. 2852. Tehran: ISIRI Publisher; 2006. [Persian]

15- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Milk products – Enumeration of presumptive bifidobacteria – colony count teqnique at 37 ?c. 1st ed. Standard No. 13772. Tehran: ISIRI Publisher; 2011. [Persian]

16- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Milk products – Enumeration of presumptive lactobacillus acidophilus on a selective medium – colony count teqnique at 37 ?c. 1st ed. Standard No. 9616. Tehran: ISIRI Publisher; 2008. [Persian]

17- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. General method for sensory evaluation of dairy products. 1st ed. Standard No. 4691. Tehran: ISIRI Publisher; 1998. [Persian]

18- Institute of Standards and Industrial Research of Iran ISIRI. Milk and milk products – Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds-colony -count technique at 25°C. 1st ed. Standard No. 10154. Tehran: ISIRI Publisher; 2007. [Persian]

19- Institute of Standards and Industrial Research of Iran ISIRI. Milk and milk products – Specifications. 2nd ed. Revision, Standard No. 2406. Tehran: ISIRI Publisher; 2008. [Persian]

20- Simsek B, Sagdic O, Ozcelik S. Survival of Escherichia coli O157:H7 during the storage of ayran produced with different spices. J Food Eng. 2007; 78(2): 676-80.

21- Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Curr Med Chem. 2003; 10(10): 813-29.

22- Nasirpour M, Yavarmanesh M, Mohhamadi Sani A, Mohamdzade Moghadam M. Antibacterial effect of aqueous extract of Artemisia aucheri, Artemisia sieberi and Hyssopus officinalis L. On the food borne pathogenic bacteria. Iranian Journal of Food Science and Technology. 2015; 12(46): 73-84. [Persian]

23- Mahboubi M, Farzin N. Antimicrobial activity of Artemisia sieberi essential oil from central Iran. Iran J Microbiol. 2009; 1(2): 43-8.

24- 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.

25- Dini A, Razavi SH, Mousavi SM. Effect of incubation and storage temperatures and final pH On the viability of probiotic bacteria and sensory characteristics in probiotic Doogh. Journal of Food Research (University of Tabriz). 2013; 23(3): 367-80. [Persian]

26- Ouwehand AC, Tiihonen K, Kettunen H, Peuranen S, Schulze H , Rautonen N. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. Vet Med (Praha). 2010; 55(2): 71-8.

27- Sarabi-Jamab M, Niazmand R. Effect of essential oil of Mentha piperita and Ziziphora clinopodioides on Lactobacillus acidophilus activity as bioyoghurt starter culture. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2009; 6(2): 129-31.

28- Rold?n NP, D?az GJ, Duringer JM. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. Rev Colom Cienc Pecua. 2010; 23(4): 451-61.