

بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین D₃، عصاره روغنی زیره سبز و زمان تخمیر با استفاده از روش سطح پاسخ بر بهینه‌سازی تولید ماست پروبیوتیک برای بیماران دیابتی

سمانه شجاعی مهر^۱، مینا باباشاهی^۱، مریم میرلوحی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، فواید دریافت پروبیوتیک‌ها، ویتامین D₃ و اسانس روغنی زیره سبز، هر کدام به تنهایی در مدیریت بیماری دیابت مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر، تولید ماست حاوی غلظت‌های مختلفی از ویتامین D₃ و اسانس روغنی زیره سبز با به کار بردن زمان‌های مختلف تخمیر برای دستیابی به محصول پروبیوتیک با بالاترین شمارش سلولی باکتری پروبیوتیک که به شکل کشت الحاقی به آن افزوده شده بود، مورد بررسی قرار گرفت و تولید فراورده پروبیوتیک با ارزش سلامتی افزوده برای کمک به افراد دیابتی هدف نهایی مطالعه تعیین شد.

روش‌ها: روش سطح پاسخ با مدل مرکب مرکزی برای بررسی تأثیر سه فاکتور متفاوت شامل اسانس روغنی زیره، ویتامین D₃ و زمان تخمیر بر جمعیت سویه پروبیوتیک باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم A7 مورد استفاده قرار گرفت. غلظت اسانس زیره در چهار سطح ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد و غلظت ویتامین D₃ در پنج سطح ۲۰، ۴۰، ۴۰۰، ۴۰۰۰ و ۲۰۰۰ IU و طول زمان تخمیر در پنج سطح ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۲۴ ساعت متغیرهای آزمایش تعریف شد. بر اساس مدل مورد استفاده، ۱۵ طرح آزمایشی در ۲۰ تکرار تعیین شد و نتایج در نرم افزار SAS (Statistical analysis system) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تأثیر هر یک از متغیرهای مورد بررسی بر نتیجه نهایی در سطح ۵ درصد احتمال معنی دار در نظر گرفته شد ($P < 0/05$).

یافته‌ها: اثر توأم غلظت اسانس زیره و زمان بر نرخ رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم A7 بیشترین اثر را داشت و به ترتیب بعد از آن اثر توأم زیره و ویتامین D₃، ویتامین D₃ با توأم دو و ویتامین D₃ با توأم یک بر نرخ رشد بیشینه سویه باکتری واقع شد. بعد از آن، اسانس زیره با توأم یک و زمان با توأم یک اثر کمی بر نرخ رشد این باکتری نشان داد که شرایط بهینه برای فرمولاسیون حد میانی هر یک از متغیرها تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: ماست پروبیوتیک غنی شده با ویتامین D₃ و اسانس زیره می‌تواند حاوی جمعیت بالایی از باکتری زنده (10^7 cfu/ml) از سویه پروبیوتیک الحاقی باشد. این محصول می‌تواند به عنوان محصول فراسودمند برای افرادی که از بیماری دیابت رنج می‌برند، مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ماست پروبیوتیک، زیره سبز، ویتامین D₃، روش سطح پاسخ

ارجاع: شجاعی مهر سمانه، باباشاهی مینا، میرلوحی مریم. بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین D₃، عصاره روغنی زیره سبز و زمان تخمیر با استفاده از روش سطح پاسخ بر بهینه‌سازی تولید ماست پروبیوتیک برای بیماران دیابتی. مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۵؛ ۱۲ (۳): ۳۱۵-۳۲۲

پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۱۳

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۲۷

از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک با کاهش عوارض دیابت نوع دو ارتباط مستقیم دارد (۲). همچنین، در مطالعه اجتهد و همکاران از مصرف ماست پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (Bb-12) کاهش سطح گلوکز خون و افزایش آنتی‌اکسیدان در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو مشاهده شد (۶). در مطالعه Yadav و همکاران مصرف ماست کم‌چرب پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در موش‌های دیابتی نوع دو باعث کاهش عوارض دیابت گردید (۴). در تحقیق دیگری فعالیت هایپوگلیسمیک پروبیوتیک‌ها و اثر فعالیت مهارکنندگی آن‌ها در مقابل آنزیم‌های آلفاگلوکوزیداز و آلفامیلاز نشان داده شد (۵). علاوه بر پروبیوتیک‌ها، برخی از ترکیبات شیمیایی عملکردی مانند ویتامین

مقدمه

غذاهای عملکردی، غذاهایی است که علاوه بر تأمین نیازهای تغذیه‌ای عادی باعث جلوگیری از بیماری‌های مزمن می‌شود و ماست‌های پروبیوتیکی از مهم‌ترین این گروه مواد غذایی است که امروزه به شکل تجارتي بخش مهمی از بازار مواد غذایی را به خود اختصاص داده است (۱). در سال‌های اخیر، اثر مصرف ماست‌های پروبیوتیکی در درمان و تخفیف عوارض بیماری دیابت به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و گزارشات متعددی از ثمربخش بودن چنین مداخلاتی گزارش شده است (۵-۲). از جمله شواهد تأثیر ماست‌های پروبیوتیکی در درمان و کاهش عوارض دیابت می‌توان به مطالعه محمدشاهی و همکاران اشاره کرد که مصرف روزانه ماست پروبیوتیک حاوی جمعیت مشخصی

۱- کارشناس ارشد، گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: m_mirlohi@hlth.mui.ac.ir

نویسنده مسؤول: مریم میرلوحی

ویتامین D₃ و اسانس‌های گیاهی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی در پیشگیری یا کاهش عوارض دیابت در مطالعات انسانی- حیوانی نتایج تأیید شده و مثبتی را نشان داده‌اند (۷-۱۰، ۴). در ارتباط با اثربخشی ویتامین D₃ می‌توان به اثر انکارناپذیر مصرف دوزهای بالایی از این ویتامین در درمان و بهبود دیابت اشاره کرد (۱۱-۱۸). علاوه بر این، اثر درمانی زیره سبز و آثار مفید آن بر افراد دیابتی در مطالعات متعددی اشاره شده است (۱۹-۲۲).

زیره سبز، گیاه علفی یک ساله، ظریف و معطر از خانواده چتریان بوده و با نام علمی *Cuminumcyminum* معروف می‌باشد (۲۳). در طب سنتی ایرانی اثرات آنتی‌دیابتیک، آنتی‌کارسینوژنیک، آنتی‌موتازنیک، ضد انقباض و ضد تشنج به زیره سبز نسبت داده شده است (۲۴، ۲۵). با توجه به کاربرد طب سنتی و تأکید بر استفاده از گیاهان دارویی در سال‌های اخیر می‌توان گفت که یکی از جنبه‌های متفاوت به کارگیری گیاهان دارویی استفاده از آن‌ها در فرآورده‌های پروبیوتیک است (۲۶). این مطالعه با هدف تولید و بهینه‌سازی فرمولاسیون ماست پروبیوتیک حاوی ویتامین D₃ و غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز برای افراد مبتلا به دیابت طراحی شد. موضوع مورد مطالعه به خصوص از این نظر حایز اهمیت است که تاکنون هیچ فرآورده غذایی، به طور اختصاصی برای گروهی از بیماران در ایران تولید نشده است.

روش‌ها

طراحی آزمایشات برای بهینه‌سازی ترکیب ویتامین D₃ و اسانس زیره و زمان تخمیر ماست برای حفظ بیشترین جمعیت لاکتوباسیلوس پلانترام A₇

جهت بررسی سه فاکتور غلظت ویتامین D₃، غلظت اسانس زیره سبز و زمان تخمیر از روش سطح پاسخ در قالب طرح آزمایشی مرکب مرکزی با سه متغیر مستقل در نرم‌افزار SAS (SAS Institute, Inc verison 9.2) استفاده شد. جدول ۱، پنج سطوح واقعی سه متغیر فوق را با کد مربوط آن‌ها مطابق طرح انتخابی نشان می‌دهد. غلظت اسانس زیره در چهار سطح ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد، غلظت ویتامین D₃ در پنج سطح ۲۰، ۴۰، ۴۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ IU و طول زمان تخمیر در پنج سطح ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۲۴ ساعت متغیرهای آزمایش تعریف شد.

با استفاده از روش طرح مرکب مرکزی در برنامه سطح پاسخ، ۱۵ آزمایش با ۶ تکرار در نقطه مرکزی طراحی شد. میانگین مقادیر به دست آمده جمعیت شمارش شده لاکتوباسیلوس پلانترام A₇ از سه مرتبه تکرار کامل آزمایشات در فاصله زمانی کمتر از یک هفته به عنوان متغیر وابسته (یا پاسخ) در نظر گرفته شد. مدل عمومی چند جمله‌ای درجه دو برای پیش‌بینی رابطه پاسخ و سه فاکتور قابل کنترل بر اساس رابطه زیر بیان شد.

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^3 B_i X_i + \sum_{i=1}^3 B_{ii} X_i^2 + \sum_{i>j=1}^3 B_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{23} X_2 X_3$$

جدول ۱. نمایش سطوح واقعی بر اساس کد تعیین شده برای سه متغیر مستقل شامل غلظت ویتامین D₃، غلظت اسانس زیره سبز و زمان تخمیر بر اساس طرح مرکب مرکزی برای حفظ بالاترین جمعیت سویه پروبیوتیک L.A₇

متغیر	کد متغیر	سطوح واقعی متغیرها بر اساس کد نسبت داده شده				
		-۱/۴	-۱/۰	۰	۱/۰	۱/۴
درصد اسانس زیره	X1	۰	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۵
درصد ویتامین D ₃	X2	۲۰	۴۰	۴۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰
(ساعت) زمان	X3	۳	۶	۹	۱۲	۲۴

درصد غلظت‌ها، وزنی حجمی سنجیده شده است.

آگار با استفاده از روش کشت سطحی انجام شد. کلیه مراحل تهیه ماست برای ۲۰ طرح آزمایشی در سه تکرار انجام شد. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS صورت گرفت و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از معیار گزارش شد.

یافته‌ها

جدول ۲ نتایج به دست آمده از این تحقیق بر اساس ترکیب سه متغیر زمان تخمیر، درصد اسانس زیره و غلظت ویتامین D₃ را بر شمارش نهایی باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم A₇ در ۱۵ طرح آزمایشی نشان می‌دهد.

معادله ۱، مدل به دست آمده برای جمعیت نهایی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم (Y₁) را نشان می‌دهد. در این معادله (X₁) و (X₂) به ترتیب نشان دهنده دو متغیر اسانس زیره سبز و ویتامین D₃ می‌باشد و (X₃) متغیر سوم، زمان تخمیر را نشان می‌دهد.

$$Y_1 = 7/42 - 0/25X_1 + 0/28X_2 + 0/19X_3 - 0/04X_1^2 + 0/33X_1X_2 - 0/655X_1X_3 + 0/39X_2^2 - 0/20X_2X_3 + 0/19X_3^2$$

نتایج آنالیز واریانس در جدول ۳ حاکی از آن است که غلظت توأم اسانس زیره و زمان بر نرخ رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم A₇ بیشترین اثر را داشت و به ترتیب بعد از آن غلظت‌های توأم زیره و ویتامین D₃، ویتامین D₃ با درجه دو و ویتامین D₃ با درجه یک بر نرخ رشد بیشینه این باکتری مؤثر واقع شد. بعد از آن، اسانس زیره با درجه یک و زمان با درجه یک اثر کمی بر نرخ رشد این باکتری نشان داد.

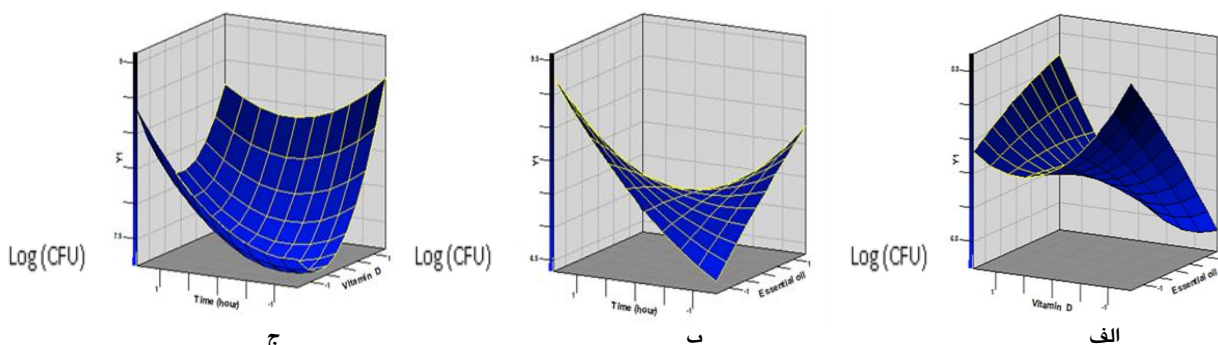
شکل ۱ شمای سه بعدی از اثر ترکیبی سه متغیر مستقل مورد بررسی در این مطالعه را به شکل دو به دو بر جمعیت زنده LA₇ نشان می‌دهد. بر اساس نمودار الف در شکل ۱ و اطلاعات جدول ۳ اگرچه عامل زمان تخمیر ماست و غلظت اسانس هر یک به تنهایی تأثیر قابل توجهی بر جمعیت سوبه پروبیوتیک نداشت، اما اثر همزمان این دو عامل دارای بالاترین سهم بر تغییرات جمعیت این باکتری بود؛ به طوری که با افزایش زمان تخمیر و افزایش غلظت اسانس اثر بازدارندگی اسانس بر جمعیت زنده باکتری بیشتر شد.

در معادله ذکر شده Y پاسخ پیش‌بینی شده، B₀ ضریب ثابت، B₁، B₂ و B₃ اثرات خطی، B₁₁، B₂₂، B₃₃ اثرات مربعی و B₁₂، B₁₃، B₂₃ اثرات متقابل می‌باشد.

شیر ۱/۵ درصد چربی از شرکت کاله آمل و اسانس زیره از شرکت بارچ اسانس اصفهان تهیه شد. ویتامین D₃ ۱۰۰۰۰۰ IU در گرم از نوع محلول در آب از شرکت DSM سوئیس خریداری شد.

باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم A₇ و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس از کلکسیون میکروبی دانشکده تغذیه و علوم غذایی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شد. باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در آزمایشگاه تحت شرایط استریل از ماست پاستوریزه تجاری جدا گردید. برای این منظور یک میلی‌لیتر از ماست پاستوریزه تجاری در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت M₁₇ مایع به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. سپس، یک میلی‌لیتر از ماست تخمیر شده بر روی محیط کشت M₁₇ جهت جداسازی سوش آغازگر استرپتوکوکوس ترموفیلوس کشت سطحی داده شد و در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در نهایت، از نظر مورفولوژی سلول، کلنی و آزمایشات بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفت. سوبه‌های لاکتیکی جهت فعال‌سازی حداقل ۲ مرتبه در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS (deMan Rogosa sharpe) یا M₁₇ به میزان ۱ درصد تلقیح و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس، رسوبات باکتریایی بعد از ۳ مرتبه سانتریفیوژ به ترتیب با ۱۰۰۰۰، ۸۰۰۰ و ۶۰۰۰ (rpm) به مدت ۱۵ دقیقه با سرم فیزیولوژیک دو بار شستشو داده شده و مایه تلقیح حاوی سلول‌های باکتری‌های استرپتوکوکوس ترموفیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتروم A₇ و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس با دانسیته نوری ۰/۷ در طول موج ۶۲۰ نانومتر در محیط کشت‌های M₁₇ و MRS فراهم گردید.

تعداد ۲۰ نمونه ۳۰۰ میلی‌لیتری شیر در ارن مایر تهیه شد. اسانس زیره استریل به میزان‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد از حجم نمونه شیر به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌های تخمیر در داخل انکوباتور در شرایط هوازی در دمای ۴۲ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد و در فواصل زمانی ۳ ساعته جهت شمارش میکروبی مورد نمونه‌برداری قرار گرفت. جهت شمارش باکتریایی یک میلی‌لیتر از هر نمونه با استفاده از محلول کلور سدیم ۰/۸۵ درصد در رقت‌های متوالی تهیه گردید. شمارش لاکتوباسیلوس پلانتروم A₇ بر محیط سوربیتول



شکل ۱: بررسی اثر همزمان متغیرهای مستقل بر پاسخ (Y = جمعیت زنده لاکتوباسیلوس پلانتروم A₇ Log Cfu/ml)، الف- اثر ترکیبی غلظت اسانس زیره و زمان، ب- اثر ترکیبی غلظت اسانس زیره و ویتامین D₃ و ج- اثر ترکیبی ویتامین D₃ و زمان

CFU: Colony form unit

جدول ۲. جدول طراحی آزمایشات و نتایج شمارش جمعیت باکتری پروبیوتیک LA7 در ۱۵ طرح آزمایشی مختلف (۵ تکرار در نقطه مرکزی) با ترکیب سه متغیر زمان تخمیر، غلظت ویتامین D₃ و غلظت اسانس زیره سبز

Run	اسانس زیره سبز درصد	غلظت ویتامین D ₃ درصد	زمان تخمیر (ساعت)	L. plantarum A7* Log(CFU/ml)
۱	X1	X2	X3	Y1
۱	-۱	-۱	-۱	۷/۳۶ (±۱/۲)
۲	-۱	-۱	۱	۹/۵۷ (±۲/۳)
۳	-۱	۱	-۱	۷/۴۴ (±۱/۵)
۴	-۱	۱	۱	۸/۴۲ (±۱/۹)
۵	۱	-۱	-۱	۷/۳۹ (±۱/۱)
۶	۱	-۱	۱	۶/۵۶ (±۰/۸۶)
۷	۱	۱	-۱	۸/۷۹ (±۱/۸)
۸	۱	۱	۱	۷/۵۷ (±۰/۹)
۹	-۱/۴	.	.	۷/۶۹ (±۱/۱)
۱۰	۱/۴	.	.	۷/۳۱ (±۰/۹۶)
۱۱	.	-۱/۴	.	۷/۶۱ (±۱/۴)
۱۲	.	۱/۴	.	۹/۰۸ (±۱/۹)
۱۳	.	.	-۱/۴	۷/۵۶ (±۰/۴)
۱۴	.	.	۱/۴	۸/۳۴ (±۱/۲)
۱۵	.	.	.	۷/۵۶ (±۱/۱)
۱۶	.	.	.	۷/۴ (±۲/۱)
۱۷	.	.	.	۷/۲۹ (±۰/۶)
۱۸	.	.	.	۷/۳۴ (±۰/۲)
۱۹	.	.	.	۷/۳۸ (±۱/۷)
۲۰	.	.	.	۷/۱۵ (±۱/۹)

تکرارهای ۱۵ تا ۲۰ تکرار آزمایش در نقطه مرکزی (نقطه میانی متغیرها و تکرارپذیری فرایند) را نشان می‌دهد؛ * میانگین شمارش لاکتوباسیلوس پلنتاروم A7 (انحراف معیار)
CFU: Colony form unit

زیره و ویتامین D₃ در غلظت اسانس زیره ۰/۰۲ درصد و ویتامین D₃ ۴۰۰ IU و طول زمان تخمیر ۹ ساعت تعیین گردید.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که جمعیت یک سویه پروبیوتیکی در یک فرمولاسیون عملگرای ماست پروبیوتیک به شدت تحت تأثیر عوامل زیست فعال در فرمولاسیون بود. جمعیت سوش پروبیوتیکی تحت تأثیر اسانس روغنی زیره با افزایش غلظت اسانس و افزایش زمان تخمیر که خود شاخصی از مواجهه بیشتر سوش پروبیوتیک با اسانس در فرمولاسیون بود، به شدت کاهش یافت؛ در حالی که ویتامین D₃ تجارتي مورد استفاده موجب حفاظت و افزایش جمعیت بازیابی شده پروبیوتیک از محیط کشت ماست گردید. کلیه این نتایج نشان می‌دهد که به کارگیری فرمولاسیون‌های ترکیبی نیازمند بهینه‌سازی با استفاده از طراحی مدل‌های ریاضی است.

همان طور که در شکل ۱ دیده می‌شود و بر اساس نتایج تجزیه واریانس در جدول ۳، در مطالعه حاضر متغیر غلظت ویتامین D₃ به تنهایی و یا در ترکیب با اثر غلظت زیره نقش مهمی در پاسخ آزمایش داشت. اثر بازدارندگی اسانس زیره بر جمعیت باکتری در غلظت کمتر ویتامین مشاهده شد؛ به طوری که در سطوح بالای غلظت ویتامین این اثر کم رنگ می‌گردد و به نحوی می‌توان گفت که ویتامین D₃ تأثیر محافظتی بر سویه میکروبی در برابر اسانس زیره داشته است. همین نتیجه در منحنی ج نیز مشاهده می‌گردد. بر اساس جدول تجزیه واریانس اگرچه تغییرات ناشی از ترکیب دو عامل غلظت ویتامین D₃ و زمان بر جمعیت باکتری از نظر آماری قابل توجه نبوده است، اما مشاهده روند تغییرات در منحنی ج نشان دهنده افزایش جمعیت باکتری زنده با افزایش غلظت ویتامین D₃ در این مطالعه بوده است.

بر اساس نتایج طراحی آزمایشات شرایط بهینه نرخ رشد بیشینه باکتری لاکتوباسیلوس پلنتاروم A7 در فرمولاسیون ماست پروبیوتیک حاوی اسانس

جدول ۳. جدول تجزیه واریانس نتایج به دست آمده از پاسخ (تعداد جمعیت زنده LA₇) آزمایشات از ترکیب سه متغیر غلظت اسانس زیره، غلظت ویتامین D₃ و زمان تخمیر

منبع	DF	SS	MS	F	Pr>F
۱X	۱	۰/۷۶۱۰۸۶	۰/۷۶۱۰۸۶	۸/۴۸۰۶۱۱	۰/۰۱۵۵
۲X	۱	۰/۹۶۸۶۵۸	۰/۹۶۸۶۵۸	۱۰/۷۹۳۵۴۰	۰/۰۰۸۲
۳X	۱	۰/۴۱۷۹۳۸	۰/۴۱۷۹۳۸	۴/۶۵۶۹۹۳	۰/۰۵۶۲
۱*X۱X	۱	۰/۰۱۳۲۸۶	۰/۰۱۳۲۸۶	۰/۱۴۸۰۴۰	۰/۷۰۸۵
۲*X۱X	۱	۱/۵۱۳۸۰۰	۱/۵۱۳۸۰۰	۱۶/۸۶۷۹۴۰	۰/۰۰۲۱
۳*X۱X	۱	۳/۴۳۲۲۰۰	۳/۴۳۲۲۰۰	۳۸/۲۴۴۲۴۰	۰/۰۰۰۱
۲*X۲X	۱	۱/۲۸۸۱۲۶	۱/۲۸۸۱۲۶	۱۴/۳۵۳۳۱۰	۰/۰۰۳۶
۳*X۲X	۱	۰/۳۲۸۰۵۰	۰/۳۲۸۰۵۰	۳/۶۵۵۳۸۸	۰/۰۸۴۹
۳*X۳X	۱	۰/۳۰۳۰۸۸	۰/۳۰۳۰۸۸	۳/۳۷۷۲۳۹	۰/۰۹۶۰
۱Model	۹	۹/۱۵۰۲۵۸	۱/۰۱۶۶۹۵	۱۱/۳۲۸۸۱۰	۰/۰۰۰۴
Linear	۳	۲/۱۴۷۶۸۲	۰/۷۱۵۸۹۴	۷/۹۷۷۰۴۹	۰/۰۰۵۲
Quadratic	۳	۱/۷۲۸۵۲۶	۰/۵۷۶۱۷۵	۶/۴۲۰۱۹۲	۰/۰۱۰۷
Cross product	۳	۵/۲۷۴۰۵۰	۱/۷۵۸۰۱۷	۱۹/۵۸۹۱۹۰	۰/۰۰۰۲
Error	۱۰	۰/۸۹۷۴۴۲	۰/۰۸۹۷۴۴		
Lack of fit	۵	۰/۷۶۲۳۵۹	۰/۱۵۲۴۷۲	۵/۶۴۳۶۲۰	۰/۰۴۰۳
Pure error	۵	۰/۱۳۵۰۸۳	۰/۲۷۰۱۷۰		
Total	۱۹	۱۰/۰۴۷۷۰۰			

DF: Degree of freedom; SS: Sum of squares; MS: Mean square; F: Index match

بقای زیستی گونه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس روتری، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس بیفیدوباکتریوم تحت اثر باکتری‌های استارتر ماست و کاهش pH در طی ۳۰ روز کاهش پیدا می‌کند (۳۷).
میرلوحی و همکاران نشان دادند که زنده مانی لاکتوباسیلوس پلاتناروم A7 تحت تأثیر فعالیت سوش‌های آغازگر ماست با قدرت تولید اسید زیاد قرار نمی‌گیرد (۳۳). همچنین، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس با پروتئولیز کازئین و فراهم آوردن ازت آلی غیر پروتئینی رشد پروبیوتیک‌ها را تشدید می‌کند، اما در ادامه تخمیر با رشد سریع، اسیدسازی شدید، کاهش pH، تولید پراکسید هیدروژن و باکتری‌سین طی تخمیر و دوره نگهداری بر رشد و قابلیت بقای این باکتری‌ها اثر سوء می‌گذارد (۳۸). اگرچه مطالعات فوق در توجیه مکانیسم‌های آثار هم‌افزایی و بازدارندگی محیط تخمیر مؤثر است، بهینه‌سازی شرایط برای حفظ و تقویت سوش میکروبی به ندرت در این گونه مطالعات مورد توجه قرار گرفته است. با این حال، گروهی از مطالعات اخیر بهینه‌سازی شرایط تهیه ماست را برای افزودن ترکیبات محرک رشد باکتری پروبیوتیک بررسی کرده‌اند. برخی کاربرد روش سطح پاسخ و مدل مرکب مرکزی تأثیر دو متغیر سطح شیر خشک و عصاره مخمر را در حفظ و افزایش جمعیت نهایی بیفیدو باکتریوم سودو کانتولاتوم بررسی کردند و نسبت‌های دقیقی از دو متغیر را برای حفظ بالاترین جمعیت این سویه گزارش نمودند (۳۹). در مطالعه‌ای دیگر، روش سطح پاسخ با مدل مرکب مرکزی برای بهینه‌سازی عوامل مختلف در شیر بلوط پروبیوتیک استفاده شد و سطوح بهینه گلوکز، فروکتوز اینولین و کشت استارتر برای حصول بالاترین جمعیت سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس روتری تعیین شد (۴۰).

با توجه رویکرد امروزی و رو به گسترش متخصصان تغذیه در استفاده از ترکیبات غذایی عملگرا و فرا سودمند در سلامت انسان، اهمیت به کارگیری چنین روش‌هایی در تولید فراورده‌های غذایی فراسودمند برای استفاده هرچه بیشتر خواص سلامتی بخش آن‌ها مشخص می‌شود. تولید این گونه فراورده‌های غذایی نه تنها برای عموم افراد بلکه برای گروه‌های خاص بیماران توجیه‌پذیر است. به خصوص بیماری‌های مزمن و شایع مانند دیابت که نقش تغذیه و دریافت‌های غذایی خاص در کاهش و تخفیف اختلالات بیماری در آن‌ها به طور کامل مشخص شده است. شاخصه اصلی یک محصول پروبیوتیک انتقال جمعیت مشخص و قابل توجهی از میکروارگانیسم پروبیوتیک به میزبان مصرف کننده است و هر عاملی که موجب تقلیل جمعیت از مقادیر استاندارد گردد، کاهش اثربخشی محصول و رد ادعای پروبیوتیکی آن را در پی خواهد داشت و منجر به کاهش جمعیت حتی مرگ باکتری شاخص پروبیوتیک در آن محصول گردد.
مطالعات زیادی از بررسی بر هم‌کنش کشت آغازگر ماست با سوش‌های پروبیوتیکی تلقیح شده در ماست منتشر شده است. اکثر این مطالعات پدیده‌های بیش اسیدسازی و پس اسیدسازی را طی بر هم‌کنش کشت باکتری‌های آغازگر ماست، سوش پروبیوتیک و تأثیر آن بر جمعیت نهایی سوش پروبیوتیک را مورد نظر قرار داده‌اند. اغلب هدف از انجام چنین تحقیقاتی ارزیابی توانایی سوش‌های پروبیوتیکی جدید و انتخاب سوش‌های مقاوم و جدید پروبیوتیکی بوده است. Donkor و همکاران مشاهده کردند که گونه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در دوره نگهداری ماست برخلاف کاهش قابل توجه pH پایداری خوبی داشت (۳۶). Martensson و همکاران در مشاهدات خود دریافتند که

ماست شد (۴۱). مطالعات فوق اگرچه بر هم‌کنش اسانس‌های گیاهی از جمله اسانس زیره را بر سوش‌های پروبیوتیک بررسی، اما بهینه‌سازی شرایط برای جلوگیری از اثر بازدارندگی غلظت افزوده شده، مانند آن چه در مطالعه حاضر صورت گرفت، تاکنون گزارش نشده شده است. علاوه بر این، بررسی منابع نشان می‌دهد که تاکنون افزودن اثر ویتامین D₃ بر سوش‌های پروبیوتیکی اطلاعاتی منتشر نشده است و مطالعه حاضر اولین گزارش در این مورد بود. با توجه به اقدامات قبلی صورت گرفته در ایران، استفاده از ماست حاوی پروبیوتیک یا ماست حاوی ویتامین D₃ برای بیماران دیابتی جنبه منطقی در تولید ماست مخصوص این بیماران را توجیه می‌نماید. علاوه بر این، استفاده از اسانس زیره سبز می‌تواند موجب تقویت آثار فراورده نهایی گردد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که تولید ماست فراسودمند با کاربرد سوش پروبیوتیک بومی، غلظت قابل توجهی از ویتامین D₃ که معادل میزان توصیه شده روزانه است و غلظتی از اسانس زیره سبز که در مطالعات از آن آثار سلامتی بخش مشاهده شده است، قابل تهیه و عرضه به بازار است. استفاده از روش سطح پاسخ در تهیه و بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های مشابه توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات امنیت غذایی در دانشکده تغذیه و علوم غذایی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، در قالب طرح تحقیقاتی مصوب با کد ۲۷۵۰ انجام شد.

در سال‌های اخیر توجه گروهی از محققان بر استفاده از اسانس‌های گیاهی و گیاهان سنتی در فرمولاسیون‌های پروبیوتیک معطوف شده است. به خصوص، سابقه ذهنی مثبت افراد جامعه از مصرف چنین فراورده‌هایی و نتایج تأیید کننده مطالعات بالینی مبنی بر اثربخش بودن مصرف آن‌ها به شکل مکمل، موجب تقویت فکر تولید محصولات پروبیوتیک متنوع مخلوط با چنین افزودنی‌هایی است. در همین رابطه، مطالعاتی در ارتباط با ارزیابی اثر افزودن آن‌ها بر فعالیت‌های کشت استارتر و لاکتیک اسید باکتری‌ها در محصولات لبنی تخمیری صورت گرفته است (۴۱). Kivanc و همکاران در مطالعه‌ای دریافتند که ادویه زیره در غلظت‌های اسانس ۱/۵ و ۲ درصد w/w باعث تحریک رشد لاکتوباسیلوس پلانتروم و لوکونوستوک مزنتروفیدس در محیط کشت مایع می‌شود. اسانس زیره سبز در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ درصد w/w باعث تحریک رشد لاکتوباسیلوس پلانتروم و در غلظت‌های بالاتر (۳۰۰-۴۰۰ ppm) مانع رشد آن در طی ۶ روز می‌شود؛ درحالی که بعد از دوره مشخصی، رشد لوکونوستوک مزنتروفیدس در تمام غلظت‌ها مشاهده شد. همچنین، پونه و اسانس آن در تمام غلظت‌ها سبب کاهش رشد هر دو باکتری در هر دو محیط کشت می‌گردد (۴۲). در مطالعه دیگری اثر اسانس گیاهی سرسم (Mentha spicata) بر باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس روتری و بیفیدوباکتریوم انیمالیس در کشت مایع صنعتی طی یک دوره ۲۰ روزه انبارمانی بررسی شد که نتایج حاصل از آن اثر بازدارندگی این اسانس را بر روی هر دو باکتری در غلظت‌های بالا نشان داد (۴۳).

در مطالعه محمودی استفاده همزمان اسانس زیره سبز و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی باعث کاهش تعداد این باکتری‌ها در طی دوره نگهداری

References

1. Siro I, Kapolna E, Kapolna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-a review. *Appetite* 2008; 51(3): 456-67.
2. Mohamadshahi M, Veissi M, Haidari F, Javid AZ, Mohammadi F, Shirbeigi E. Effects of probiotic yogurt consumption on lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized controlled clinical trial. *J Res Med Sci* 2014; 19(6): 531-6.
3. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V, et al. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Dairy Sci* 2011; 94(7): 3288-94.
4. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition* 2007; 23(1): 62-8.
5. Ju HE, Han JS. Hypoglycemic effect of fermented soymilk added with bokbunja (*Rubus coreanus* Miquel) in diabetic mice. *Food Sci Biotechnol* 2010; 19(4): 1041-6.
6. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* 2012; 28(5): 539-43.
7. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006; 313(5790): 1137-40.
8. Srinivasan K. Plant foods in the management of diabetes mellitus: spices as beneficial antidiabetic food adjuncts. *Int J Food Sci Nutr* 2005; 56(6): 399-414.
9. Platel K, Srinivasan K. Plant foods in the management of diabetes mellitus: vegetables as potential hypoglycaemic agents. *Nahrung* 1997; 41(2): 68-74.
10. Kwon DY, Daily JW, III, Kim HJ, Park S. Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. *Nutr Res* 2010; 30(1): 1-13.
11. Luong K, Nguyen LT, Nguyen DN. The role of vitamin D in protecting type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2005; 21(4): 338-46.
12. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 2005; 48(7): 1247-57.
13. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001; 358(9292): 1500-3.

14. Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabet Med* 2008; 25(3): 320-5.
15. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, Van Dam RM, Willett WC, Manson JE, et al. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2006; 29(3): 650-6.
16. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Int J Clin Pract* 2003; 57(4): 258-61.
17. Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65(9): 1005-15.
18. Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. The Eurodiab Substudy 2 Study Group. *Diabetologia* 1999; 42(1): 51-4.
19. Willatgamuwa SA, Platel K, Saraswathi G, Srinivasan K. Antidiabetic influence of dietary cumin seeds (*Cuminum cyminum*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Nutr Res* 1998; 18(1): 131-42.
20. Dhandapani S, Subramanian VR, Rajagopal S, Namasivayam N. Hypolipidemic effect of *Cuminum cyminum* L. on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 2002; 46(3): 251-5.
21. Jagtap AG, Patil PB. Antihyperglycemic activity and inhibition of advanced glycation end product formation by *Cuminum cyminum* in streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(8-9): 2030-6.
22. Mohiti Ardekani J, Akbarian Z, Nazarian A. Effects of cumin(*Cuminum Cyminum* L) Oil on serum glucose and lipid levels of rats. *J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci* 2011; 19(3): 388-97. [In Persian].
23. Haghirossadat F, Bernard F, Kalantar M, Sheikhha M, Hokmollahi F, Azimzadeh M, et al. *Bunium Persicum*(Black Caraway) of Yazd province: Chemical assessment and Evaluation of its Antioxidant Effects. *J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci* 2010; 18(3): 284-91. [In Persian].
24. Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem* 2007; 102(3): 898-904.
25. Johri RK. *Cuminum cyminum* and *Carum carvi*: An update. *Pharmacogn Rev* 2011; 5(9): 63-72.
26. Larijani B, Esfahani MM, Moghimi M, Shams Ardakani MR, Keshavarz M, Kordafshari G, et al. Prevention and Treatment of Flatulence From a Traditional Persian Medicine Perspective. *Iran Red Crescent Med J* 2016; 18(4): e23664.
27. Clark PA, Martin JH. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods. III. Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. *Cultured Dairy Products Journal* 1994; 29(3): 18.
28. Klaver FA, Kingma F, Weerkamp AH. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth Milk Dairy J* 1993; 47: 151-64.
29. Gilliland SE, Speck ML. Antagonistic Action of *Lactobacillus acidophilus* Toward Intestinal and Foodborne Pathogens in Associative Cultures. *J Food Prot* 1977; (12): 820-3.
30. Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J* 2001; 11(12): 1-17.
31. Khuri Ai, Mukhopadhyay S. Response surface methodology, Advanced Review. *Comput Stat* 2010; 0(2): 128-49.
32. Fazeli H, Sameti A. Antimicrobial of lactic probiotics isolated from the intestinal flora of children against common gastrointestinal pathogens. *Iran J Infect Dis* 2008; 13(42): 25-30.
33. Mirlohi M, Soleimani-Zad MS, Dokhani S, Sheikh-Zeinodin M. Microbial and physiochemical changes in yoghurts containing different *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in association with *Lactobacillus plantarum* as an adjunct culture. *Int J Dairy Technol* 2014; 67(2): 246-54.
34. Fazeli H, Moshtaghian J, Mirlohi M, Shirzad M. Reduction in serum lipid parameters by incorporation of a native strain of *Lactobacillus Plantarum* A7 in Mice. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 2010; 9: 22.
35. Mirelahi M, Soleymanianzad S, Dokhani Sh, Sheykh Zeyn Aldin M, Abghari A. Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. *Iranian Journal of Biotechnology* 2009; 7(4): 233-40.
36. Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NP. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int Dairy J* 2006; 16(10): 1181-9.
37. Martensson O, Oste R, Holst O. The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. *Food Res Int* 2002; 35(8): 775-84.
38. Kailasapathy K, Rybka S. *Acidophilus* and bifidobacterium spp: their therapeutic potential and survival in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology* 1997; 52(1): 28-35.
39. Stephenie W, Kabeir BM, Shuhaimi M, Rosfarizan AM. Growth optimization of a probiotic candidate, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4, in milk medium using response surface methodology. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2007; 12(2): 106-13.
40. Bernat N, Chafer M, Gonzalez-Martinez C, Rodriguez-Garcia J, Chiralt A. Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms. *Food Sci Technol Int* 2015; 21(2): 145-57.
41. Mahmoudi R. Improvement the hygienic quality and organoleptic properties of bioyoghurt using *Cuminum cyminum* L. essential oil. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 2013; 19(4): 405-12.
42. Kivanc M, Akgul A, Dogan A. Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Int J Food Microbiol* 1991; 13(1): 81-5.
43. Seyedyousefi L, Golestan L, Kaboosi H. Inhibitory effect of essential oil of *Mentha spicata* on the viability of probiotic bacteria in industrial liquid Kashk. *Journal of Innovation in Food Science and Technology* 2013; 5(3): 13-22. [In Persian].

The Effect of Different Concentrations of Vitamin D₃, Cuminum Cyminum Essential Oil, and Fermentation Time Using Response Surface Methodology on the Optimization of Probiotic Yogurt

Samaneh Shojaiemeher¹, Mina Babashahi¹, Maryam Mirlohi²

Original Article

Abstract

Background: In recent years, the functional benefits of probiotics, vitamin D₃, and Cuminum cyminum essential oil have been separately considered in diabetes management. In this study, production of probiotic yogurt containing different concentrations of vitamin D₃ and C. cyminum essential oil through applying different fermentation times was investigated in order to develop a new probiotic product with the highest probiotic bacterial cell count which was added through response surface methodology (RSM). The ultimate goal of the study was the production of a probiotic product with additional health benefits for diabetes patients.

Methods: RSM with central composite rotatable design was used to analyze the effect of different factors (essential oil extract, vitamin D₃, and fermentation time) on the population of Lactobacillus plantarum A7 probiotic strain in the product. C. cyminum essential oil concentrations of 0.01, 0.02, 0.03, and 0.05%, vitamin D₃ concentrations of 20, 40, 400, 1000, and 2000 IU/100ml, and fermentation time of 3, 6, 9, 12, and 24 hours were considered as the variables of the study. According to the model used, 15 experimental designs were determined in 20 replications and the results were analyzed using Statistical Analysis System (SAS) software. The effect of each factor was considered significant at P < 0.05.

Findings: The interactive effect of C. cyminum essential oil and fermentation time was the most significant effect, followed by the interactive effect of C. cyminum essential oil and vitamin D₃, and vitamin D₃ with power of 2 and D₃ with power of 1 on the maximum bacterial strain growth rate, respectively. C. cyminum essential oil with a power of 1 and time power of 1 had a minor effect on bacterial growth rate. Optimized conditions for production of a probiotic with highest possible probiotic strain were obtained for the median level of all three variables.

Conclusion: The probiotic yogurt formula optimized with vitamin D₃ and C. cyminum essential oil allows probiotic survival of 10⁷ cfu/ml. This product can be considered as a functional food for individuals with diabetes

Keywords: Probiotic yogurt, Cuminum cyminum, Vitamin D₃, Response surface methodology

Citation: Shojaiemeher S, Babashahi M, Mirlohi M. The Effect of Different Concentrations of Vitamin D₃, Cuminum Cyminum Essential Oil, and Fermentation Time Using Response Surface Methodology on the Optimization of Probiotic Yogurt. J Health Syst Res 2016; 12(3): 315-22.

1- Department of Food Safety and Hygiene, Food Security Research Center AND Department of Food Science and Technology, School of Nutrition and Food Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Food Security Research Center AND Department of Food Science and Technology, School of Nutrition and Food Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Maryam Mirlohi, Email: m_mirlohi@hlth.mui.ac.ir