مطالعه تاثیر عصاره آبی-الکلی گیاه گل گاوزبان (*Echium amoenum*) بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم در کفیر

خدیجه زارعی[1]، محمد حسین مرحمتی‌زاده*[2]، فرحناز جوانمردی[3]

[1] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
[2] استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون،دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
[3] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

تاریخ دریافت مقاله:۹۷/۱۰/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش:۹۸/۱۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: گیاه گل گاوزبان دارای اثر ضد باکتری، ضد اضطرابی، ضد دردی و ضد تشنج می‌باشد. این تحقیق به منظور مطالعه تأثیر عصاره آبی- الکلی گل گاو زبان بر رشد باکتری‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم در کفیر صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: به این منظور ۱۳ تیمار با غلظت‌های مختلف (عصاره آبی-الکلی گیاه گل گاو زبان با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم) به صورت جداگانه و یا توامان تولید شد. تیمارها شامل: تیمار۱- شاهد ۱۱۰ گرم کفیر، تیمارهای ٤و۳و۲ به ترتیب شامل کفیر حاوی۹و٦ و۳ گرم عصاره آبی- الکلی گل گاوزبان، تیمارهای ۷و٦و٥ به ترتیب شامل کفیر حاوی ۱۱گرم عصاره آبی- الکلی گل گاوزبان و۰/٦و۰/۳و۰/۱گرم لاکتوباسیلوس اسید و فیلوس، تیمارهای ۱۰و۹و۸ به ترتیب شامل کفیر حاوی ۱۱ گرم عصاره آبی- الکلی گل گاوزبان و۰/٦و۰/۳و۰/۱گرم بیفیدوباکتریوم، تیمار۱۱- کفیر حاوی ۱۱گرم عصاره آبی- الکلی گل گاوزبان و۰/۰۵گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و۰/۰۵گرم بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، تیمار۱۲- کفیر حاوی ۱۱ گرم عصاره آبی- الکلی گل گاوزبان و۰/۱۵گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و۰/۱۵ گرم بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، تیمار۱۳- کفیر حاوی ۱۱ گرم عصاره آبی- الکلی گل گاوزبان و۰/۳گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و۰/۳گرم بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بودند. سپس نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند و بعد محصولات در یخچال قرار داده شد. پس از تولید هر یک از محصولات فوق، طی دوره نگهداری هر یک از نمونه‌ها در روزهای ۱، ۷، ١٤، ۲۱ از نظر اسیدیته و PH مورد آزمایش قرار گرفتند. شمارش باکتریایی به دو روش مستقیم میکروبی و کشت پلیت در هفته‌های اول و سوم انجام گرفت. نتایج با استفاده از نرم افزارSPSS مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیشترین اسیدیته در زمان تولید و نگهداری مربوط به تیمار٤ بود . بیشترین PH در زمان نگهداری مربوط به تیمار٦ و تیمار ۱۱ بود. در شمارش مستقیم میکروبی در هفته اول بیشترین تعداد باکتری شمارش شده مربوط به تیمار ٦ بوده و در هفته سوم بیشترین تعداد باکتری شمارش شده در شمارش مستقیم میکروبی مربوط به تیمار ۱۳ بود. در شمارش کشت پلیت در هفته اول بیشترین تعداد شمارش شده مربوط به تیمار٤ بوده و در هفته سوم بیشترین تعداد باکتری شمارش شده به روش کشت پلیت مربوط به تیمار ۲ می‌باشد.

نتیجه‌گیری: عصاره آبی- الکلی گل گاوزبان باعث زنده مانی و حتی افزایش رشد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم گردید.

کلمات کلیدی: گیاه گل گاوزبان، پروبیوتیک، بیفیدو باکتریوم بیفیدوم، لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس

نویسنده مسئول:
گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

۰۹۱۷ -۷۲۱۰۶۴۵
E-mail: drmarhamati@gmail.com

مقدمه

با توجه به روند رو به رشد تولید و عرضه فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک (Probiotic) با اهداف سلامت بخشی به صورت عمومی و درمانی به صورت اختصاصی در دنیا و تمایل تولید کنندگان داخلی برای تولید و واردکنندگان مواد غذایی برای وارد کردن اینگونه فرآورده‌ها نیاز به کنترل کیفیت اینگونه فرآورده‌ها می‌باشد. در میان فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک، فرآورده های لبنی از مصرف بیشتری برخوردار هستند. فرآورده‌های شیری پایه‌ای مناسب برای تولید این فرآورده‌ها می‌باشند. [۱] اخیراً تجارت لبنیات به صورت بازار ثانویه برای مصرف کالاهای اضافی در نظر گرفته شده است. [۲] در سالهای اخیر، این تجارت بین المللی لبنیات چند سال توسط اتحادیه اروپا و استرالیا و نیوزیلند تحت سلطه بوده است. [۳]

پری‌بیوتیک‌ها (Prebiotic) ترکیبات هضم ناپذیر (Indigestible) یا هضم پذیر در برابر آنزیم‌های گوارش بدن انسان (اساس ترکیبات الیگوساکاریدی (Oligo saccharide)) هستند که رشد و یا فعالیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را به طور انتخابی تحریک می‌کنند. سین بیوتیک ها (Synbiotic) فرآورده‌هایی که به طور توأم دارای پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها هستند. کاربرد توأم دو عامل یاد شده با هدف ایجاد هم افزایی (Synergy) در اثرات سلامت بخش آن‌ها صورت می‌گیرد. [۴] در حال حاضر، ماست‌های گوناگون به منظور درمان عفونت‌های روده‌ای به ویژه اسهال و عفونت‌های باکتریایی و مخمری دستگاه تناسلی، تولید و مصرف می‌شوند. [۵و۶] لاکتیک اسید باکتری ها (Lactic Acid Bacteria) (LAB) و بیفیدو باکتریوم‌ها میکروب‌های متداولی هستند که به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند. [۷]

کفیر یک پروبیوتیک طبیعی است که از یک مجموعه هم زیستی میکروبی تشکیل شده است که دانه‌های ژله مانندی را(که قابلیت رشد دارند) تولید می‌کند. [۸] دانه‌های کفیر ژلاتینی اند، رنگ آنها متمایل به سفید یا زرد است و شبیه گلچه‌های گل کلم می‌باشد. دانه‌های کفیر شامل مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد که توسط یک ماتریکس پروتئینی پلی ساکاریدی (Poly Saccharide) در کنار هم نگه داشته می‌شود. [۹]

گیاهان دارویی، تاریخی به قدمت خلقت انسان دارند. استفاده از گیاه به عنوان ماده شفابخش از دیرباز در همه جای دنیا مرسوم بوده است. [۱۰] گیاه گل گاوزبان (Echium amoenum) عضو خانواده Boraginaceae است. [۱۱] مواد تشکیل دهنده گیاه گل گاوزبان توسط محققین مختلف جدا شده اند؛ که عبارتند از: اسید گاما لینولنیک (GLA)، کارواکرل، تیمول، اسید آلفا لینولنیک (ALA)، آتیل دزآوراناز دلتا ٦، دلفا ۸ اسفنگیلیپید دزاتوراز، آلکالوئیدها پیرلویزیدین، رزین، نیترات پتاسیم و نمک کلسیم همراه با اسیدهای معدنی. [۱۲]

گلها و برگ های گل گاوزبان در پزشکی به عنوان ضد انعقاد، ضد افسردگی، برای درمان استرس و بیماری‌های قلبی عروقی، برای اختلالات ریوی، به عنوان مکمل برای تورم التهابی[۱۳و۱۴]، به عنوان دیورتیک (به علت نیترات پتاسیم)، به عنوان ملین کننده، نرم کننده و اخیرا به عنوان عامل حفاظتی احتمالی در برابر سرطان به کار می‌رود.[۱۵]

در مطالعه صادقی و همکاران درسال ۲۰۱۸ مشخص گردید که عصاره آبی گل گاوزبان دارای اثرات مفیدی بر درمان اختلالات آلزایمری در مدلهای موش صحرایی می‌باشد.[۱۶] همچنین در مطالعه naseri و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داده شد که عصاره گل گاوزبان دارای فعالیت ضد التهابی بر ماکروفاژها از طریق مهار واسطه گر های التهابی و بیان سیتوکاین‌ها می‌باشد.[۱۷]

علاوه براین در مطالعه safaeian و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش گردید که آنتوسیانین استخراج شده از گل گاوزبان دارای اثرات حفاظتی برعلیه برخی صدمات مغزی ناشی از رپرفیوژن پس از ایسکمی می‌باشد.[۱۸] در مطالعهAbed و همکاران در سال ۲۰۱۲ مشخص گردید که گل گاوزبان از طریق اثرات آنتی اکسیدانتی، تعدیل کنندگی ایمنی و ضدالتهابی، شدت پانکراتیت مزمن القاشده توسط سرولئین را تصحیح می‌کند.[۱۹] در مطالعه حسین زاده و همکاران در در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که عصاره اتانولی و آبی بخشهای هوایی گل گاوزبان ممکن است دارای اثرات ضد اضطراب و فعالیت آرامبخش بدون تاثیر بر سستی ماهیچه‌ای باشد.[۲۰]

هدف از انجام این تحقیق، مطالعه امکان استفاده از عصاره

آبی- الکلی گیاه دارویی گل گاوزبان در تولید کفیر بود. بگونـه‌ای که فرآورده تولید شده ضمن دارا بودن خواص یـک مـاده غـذایی فراسودمند، تا حدودی از ویژگی های جدید ارگانولپتیک و اثرات سلامت بخش ناشی از بکارگیری عصاره گیاه دارویی گل گاوزبان نیز برخوردار باشد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل محـیط کشـت MRS Agar سـاخت مـرک آلمـان، بـاکتری لئـوفیلیزه لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس سـاخت شـرکت تـک ژن زیسـت ایـران، بـاکتری لئوفیلیزه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ساخت شـرکت تـک ژن زیسـت ایران، شیر پاستوریزه کم چرب ۱/۵ ٪ ساخت شرکت پگـاه ایـران و عصاره گل گاوزبان بود.

کفیر

تیمار اول تولید کفیر(گروه شاهد ۱۱۰ گرم): برای تولید کفیـر یـک ظـرف حـاوی یـک ونـیم لیتـر شـیر کـم چـرب)یـک ونـیم درصد(استریل را تا دمای ۲۵-۲۰ درجه سرد کرده و سپس میزان ٤ درصد دانه کفیر به آن اضافه شد و در دمای ۲۵ - ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ سـاعت درگرمخانـه نگهـداری شـد. بعـد از ۲٤ ساعت دانه کفیر را جدا کرده و کفیر تولید شده در ٤ درجه سـانتی گراد درسردخانه نگهداری شد.

تهیه عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان

گیاه گل گاوزبـان، پـس از تاییـد توسـط کارشـناس گیاهـان دارویی خشک شد. بدین منظور گیاه گـل گـاو زبـان بـا الکـل ۹٦ درصد به نسبت ۱ به ۵ مخلوط گردید. محلول آماده شـده حـاوی گل گاو زبان، آب و الکل با نسبت‌های اسـتاندارد در یـک محـیط نسبتاً گرم درون بن ماری یا بر روی یک شوفاژ بـه مـدت ۱۰ روز قرار داده شد. با اسـتفاده از صـافی واتمـن تفالـه از عصـاره جـدا گردید.در مرحله آخر باید الکل به صورت کامل از عصاره حـذف گردد که ایـن کـار توسـط دسـتگاه روتـاری در دمـای ٤۵ درجـه سانتیگراد انجام شد. عصـاره بدسـت آمـده بـه عنـوان مرجـع در یخچال نگهداری و از آن بطور مستقیم برای آماده سازی هر یـک از نمونه‌ها استفاده شد. [۲۱]

بررسی تاثیر عصاره آبی- الکلی گل گاو زبان بر کفیر

جهت بررسی تاثیر عصاره آبی- الکلی گیاه گاو زبان بـر کفیـر سه تیمار به شرح زیر آماده شد:

تیمار دوم: برای تیمار۲ علاوه بر عملیات تولید کفیـر، میـزان ۳ گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان در مرحله افـزودن دانـه کفیر اضافه شد و خوب بهم زده تا عصاره آبـی- الکلـی گـل گـاو زبان بصورت یکنواخت حل شد.

تیمار سوم: برای تیمار ۳ عـلاوه عملیـات تولیـد کفیـر، میـزان ٦گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان در مرحله افزودن دانه کفیر اضافه شد و خوب بهم زده تا عصاره آبـی- الکلـی گـل گـاو زبان بصورت یکنواخت حل شود.

تیمار چهارم: برای تیمار ٤ علاوه بر عملیات تولید کفیر، میزان ۹گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان در مرحله افزودن دانه کفیر اضافه شد وخوب بهم زده تا عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان بصورت یکنواخت حل شد.

بررسی تاثیر عصاره آبی- الکلی گیاه گل گـاو زبـان بـر رشد باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

جهت بررسی تاثیر عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبـان بـر رشد باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس سه تیمار به شرح زیر آماده شد:

تیمار پنجم: برای تیمار ۵ علاوه بر عملیات تولید کفیر، میـزان ۰/۱ گرم باکتری لئوفیلیزه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۱۱ گـرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان به تیمار در مرحلـه افـزودن دانه کفیر افـزوده شـد و خـوب بهـم زده تـا محتویـات بصـورت یکنواخت مخلوط شود.

تیمار ششم: برای تیمار ٦ علاوه بر عملیات تولید کفیر، میـزان ۰/۳ گرم لئوفیلیزه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۱۱گـرم عصـاره آبی-الکلی گیاه گل گاو زبان به تیمار در مرحله افزودن دانه کفیـر افزوده شد و خـوب بهـم زده تـا محتویـات بصـورت یکنواخـت مخلوط شد.

تیمار هفتم: برای تیمار۷ علاوه بر عملیات تولید کفیـر، میـزان

۰/٦ گرم لئوفیلیزه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۱۱گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان به تیمار در مرحله افزودن دانه کفیر افزوده شد و خوب بهم زده تا محتویات بصورت یکنواخت مخلوط شد.

بررسی تاثیر عصاره گیاه گل گاو زبان بر رشد باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم

جهت بررسی تاثیر عصاره عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم سه تیمار به شرح زیر آماده شد:

تیمار هشتم: برای تیمار ۸ علاوه بر عملیات تولید کفیر، میزان ۰/۱ گرم باکتری لئوفیلیزه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و ۱۱گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان نیز به تیمار در مرحله افزودن دانه کفیر اضافه شد. خوب بهم زده تا محتویات بصورت یکنواخت مخلوط شد.

تیمار نهم: برای تیمار ۹ علاوه بر عملیات تولید کفیر، میزان ۰/۳ گرم باکتری لئوفیلیزه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و ۱۱گرم عصاره آبی- الکلی گل گاو زبان نیز به تیمار در مرحله افزودن دانه کفیر اضافه شد و خوب بهم زده تا محتویات بصورت یکنواخت مخلوط شد.

تیمار دهم: برای تیمار ۱۰ علاوه بر عملیات تولید کفیر، میزان ۰/٦ گرم باکتری لئوفیلیزه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و ۱۱گرم عصاره آبی- الکلی گل گاو زبان نیز به تیمار در مرحله افزودن دانه کفیر اضافه شد و خوب بهم زده تا محتویات بصورت یکنواخت مخلوط شد.

بررسی تاثیر عصاره گیاه گل‌گاوزبان بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم

جهت بررسی تاثیر عصاره گیاه گل گاو زبان بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم سه تیمار به شرح زیر آماده شد:

تیمار یازدهم: برای تیمار ۱۱ علاوه بر عملیات تولید کفیر میزان ۰/۰۵ گرم باکتری لئوفیلیزه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و ۰/۰۵ گرم لاکتوباسیلوس و ۱۱ گرم عصاره آبی- الکلی گل گاو زبان نیز به تیمار در مرحله افزودن دانه کفیر افزوده شد و خوب بهم زده تا محتویات مخلوط شد.

تیمار دوازدهم: برای تیمار ۱۲ علاوه بر عملیات تولید کفیر، میزان۰/۱۵ گرم باکتری لئوفیلیزه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و ۰/۱۵گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۱۱ گرم عصاره آبی- الکلی گل گاو زبان نیز به تیمار در مرحله افزودن دانه کفیر افزوده شد وخوب بهم زده تا محتویات بصورت یکنواخت مخلوط شد.

تیمار سیزدهم: برای تیمار ۱۳ علاوه بر عملیات تولید کفیر، میزان ۰/۳ گرم باکتری لئوفیلیزه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و ۰/۳ گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۱۱ گرم عصاره آبی- الکلی گل گاو زبان نیز به تیمار در مرحله افزودن دانه کفیر افزوده شد و خوب بهم زده تا محتویات بصورت یکنواخت مخلوط شد.

پس از تولید ۱۳ تیمار، کلیه ی محصولات به مدت ۱۲ ساعت به انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند.در طول دوره انکوباسیون هر ۲ ساعت یک بار تست اسیدیته و PH انجام شد. پس از گذشت ۱۲ ساعت محصولات در یخچال با دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ٤ هفته سرد خانه گذاری شدند.

روش آزمایش اندازه گیری pH و اسیدیته

pH نمونه‌ها را به وسیله دستگاه pH متر در دمای ۲۵ċ اندازه گرفته و برای محاسبه اسیدیته نیز برحسب درجه دورنیک و با استفاده از سود یک دهم نرمال و معرف فنل فتالئین انجام شد.[۲۲]

تعیین مدت زمان ماندگاری محصول

پس از تولید هر یک از محصولات فوق، طی دوره نگهداری (۲۱ روز) هر یک از نمونه‌ها در روزهای ۱، ۷، ١٤، ۲۱ از نظر اسیدیته و pH مورد آزمایش قرار گرفتند.

شمارش باکتری‌ها

برای شمارش باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم از محیط کشت MRS Agar حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین هیدروکلراید و سیپروفلوکساسین

هیدروکلراید و روش کشت سطحی استفاده گردید. گرمخانه گذاری به مدت۳ ± ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و تحت شرایط هوازی صورت گرفت. پس از طی این مدت کلنی‌های شاخص توسط کلنی کانتر شمارش شدند. کلنی‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، پهن، زبر، سفید تا خاکستری با لبه‌های کم و بیش نامنظم با قطر ۳-۱ میلی متر می‌باشند. گونه‌های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم کلنی‌های متمایل به سفید، مدور یا دوکی شکل و یا برگ شبدری به قطر ٤-۱ میلی متر ایجاد می‌کنند[۲۳و۲٤].

تست شمارش مستقیم میکروبی

٤ لوله آزمایش برای هر نمونه آماده کرده و بر چسب گذاری می شود، به این صورت که:

لوله اول رقت 10^{-1}، لوله دوم رقت 10^{-2}، لوله سوم رقت 10^{-3}، لوله چهارم رقت 10^{-4}، ۹ سی سی نرمال سالین استریل در هر چهار لوله ریخته شد . ۱ سی‌سی از هر کدام از محصولات به وسیله پیپت کشیده و به لوله اول اضافه شد (رقت ۱-). سپس ۱ سی سی از لوله اول کشیده و به لوله دوم ریخته شد (رقت ۲-). بعد ۱سی‌سی ازلوله دوم کشیده وبه لوله سوم ریخته شد (رقت ۳-) و ۱ سی سی از لوله سوم کشیده و به لوله چهارم ریخته شد (رقت ٤-). توسط سمپلر از رقت 10^{-4} را کشیده و روی لام مخصوص شمارش (نئوبار) ریخته و در زیر میکروسکوپ شروع به شمارش شد.[۲۵]

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

در این تحقیق از طرح آماری کاملا تصادفی استفاده شد و کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۹ و روش تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون‌های چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام گرفت.

نتایج

نتایج مربوط به میزان اسیدیته زمان تولید و زمان نگهداری در گروه های مختلف در جداول ۲و۱ آورده شده است.

جدول ۱: میانگین اسیدیته زمان تولید گروه‌های مختلف براساس ساعت

گروه های مختلف	۱۰:۱۵	۱:۵۰	٤:۳۰	۷:۳۰	۱۰	N	اسیدیته (X ± SEM)
تیمار ۱	۲۳	۲۹	۳٤	۳٦	۳۹	۵	۳۲/۲۰±۲/۸۱
تیمار ۲	۳۳	۳۳	۳۷	٤۲	٤۳	۵	۳۷/٦۰±۲/۱۳
تیمار ۳	۳۲	۳۳	٤۰	٤۳	٤۵	۵	۳۸/٦۰±۲/٦۱
تیمار ٤	۳۳	۳۵	۳۸	٤۳	٤۷	۵	۳۹/۲۰±۲/۵۷
تیمار ۵	۳۳	۳٤	۳۸	٤۱	٤٤	۵	۳۸/۰۰±۲/۰۷
تیمار ٦	۳۱	۳۳	۳۹	٤۳	٤۵	۵	۳۸/۲۰±۲/۷۲
تیمار ۷	۲۹	۳۱	۳۵	۳۸	٤۲	۵	۳۵/۰۰±۲/۳٤
تیمار ۸	۳۱	۳۳	۳۹	٤۲	٤٤	۵	۳۷/۸۰±۲/۵۱
تیمار ۹	۳۲	۳۳	۳۸	٤۳	٤۵	۵	۳۸/۲۰±۲/۵۹
تیمار ۱۰	۳۲	۳٤	۳٦	٤۲	٤٦	۵	۳۸/۰۰±۲/٦۰
تیمار ۱۱	۳۲	۳۲	۳۷	٤۱	٤٦	۵	۳۷/۸۰±۲/۵۹
تیمار ۱۲	۳٤	۳٤	۳۸	٤۲	٤۵	۵	۳۸/٦۰±۲/۱۸
تیمار ۱۳	۳۲	۳۲	۳۷	٤۳	٤۵	۵	۳۷/۸۰±۲/۷۰

مقادیر براساس میانگین± انحراف معیار میانگین آورده شده اند.

جدول ۲: میانگین اسیدیته زمان نگهداری گروه‌های مختلف براساس هفته

گروههای مختلف	۱	۲	۳	٤	N	اسیدیته (X ± SEM)
تیمار ۱	٥٦	۸۱	۱۰۸	۱۳۷	٤	۹٥/٥۰±۱۷/٤۳
تیمار ۲	٤۹	۸٥	۱۲۲	۱٤٦	٤	۱۰۰/٥۰±۲۱/۲٦
تیمار ۳	۳۹	۸۹	۱۲۰	۱٦٥	٤	۱۰۳/۲٥±۲٦/٤۹
تیمار ٤	٤۸	۹۰	۱۱٥	۱٤۲	٤	۹۸/۷٥±۱۹/۹۷
تیمار ٥	٤۸	۷۹	۱۰۹	۱۳۹	٤	۸۸/۷٥±۱٦/۰۲
تیمار ٦	٥۹	۸٥	۱۱۸	۱۳۳	٤	۹۸/۷٥±۱٦/٦۱
تیمار ۷	٤۷	۹۱	۱۲۲	۱۳۸	٤	۹۹/٥۰±۲۰/۰۳
تیمار ۸	٥۹	۸٤	۱۲۱	۱٤۰	٤	۱۰۱/۰۰±۱۸/۱۹
تیمار ۹	٦۱	۸٥	۱۱۸	۱٤۳	٤	۱۰۱/۷٥±۱۸/۰٤
تیمار ۱۰	٥۸	۸۹	۱۲٥	۱٥۱	٤	۱۰٥/۷٥±۲۰/۳٦
تیمار ۱۱	٥۱	۸۰	۱۰۸	۱۳۱	٤	۹۲/٥۰±۱۷/۳۲
تیمار ۱۲	٤۸	۸۷	۱۳٤	۱٤۱	٤	۱۰۲/٥۰±۲۱/۷٦
تیمار ۱۳	٥۹	۸۳	۱۱۷	۱٤۲	٤	۱۰۰/۲٥±۱۸/۳۰

مقادیر براساس میانگین± انحراف معیار میانگین آورده شده اند.

نتایج مربوط به میزانPH زمان تولید و زمـان نگهـداری در گـروه های مختلف در جداول٤و۳ آورده شده است.

جدول ۳: میانگین pH زمان تولید گروه‌های مختلف بر اساس ساعت

گروههـــــای مختلف	۱۰:۱٥	۱:٥۰	٤:۳۰	۷:۳۰	۱۰	N Valid	pH (X ± SEM)
تیمار ۱	٦/٦٥	٦/۳۲	٦/۱۲	٥/۹۷	٥/۹۱	٥	٦/۱۹±۰/۱۳
تیمار ۲	٦/٤۹	٦/۳٦	٦/۱۸	٦/۰۱	٥/۹٥	٥	٦/۱۹±۰/۱۰
تیمار ۳	٦/٤۳	٦/۳٥	٦/۱٤	٥/۹۸	٥/۹۰	٥	٦/۱٦±۰/۱۰
تیمار ٤	٦/٤٥	٦/۲۷	٦/۱۰	٥/۹۲	٥/۸۰	٥	٦/۲٤±۰/۳۲
تیمار ٥	٦/٤٥	٦/۳٤	٦/۱٤	٥/۹۹	٥/۹۱	٥	٦/۱٤±۰/۸۰
تیمار ٦	٦/٤٦	٦/۳٦	٦/۱٤	٥/۹۸	٥/۹۲	٥	٦/۱۷±۰/۱۰
تیمار ۷	٦/٤۸	٦/۳۷	٦/۳۹	٦/۱٦	٦/۰٥	٥	٦/۲۹±۰/۷۰
تیمار ۸	٦/٤٥	٦/۳۰	٦/۱۲	٥/۹٦	٥/۸۹	٥	٦/۱٤±۰/۱۰
تیمار ۹	٦/٤٦	٦/۳٥	٦/۱٦	٥/۹٦	٥/۹۳	٥	٦/۱۷±۰/۱۰
تیمار ۱۰	٦/٤۸	٦/۳۷	٦/۱۷	٥/۹۹	٥/۹٤	٥	٦/۱۹±۰/۱۰
تیمار ۱۱	٦/٤۷	٦/۳۳	٦/۱٥	٥/۹۹	٥/۹۳	٥	٦/۱۷±۰/۱۰
تیمار ۱۲	٦/٤٦	٦/۳۲	٦/۱۳	٦/۰۰	٥/۹٤	٥	٦/۱۷±۰/۹۰
تیمار ۱۳	٦/٤۷	٦/۳۳	٦/۱٤	٥/۹۷	٥/۹۲	٥	٦/۱٦±۰/۱۰

مقادیر براساس میانگین± انحراف معیار میانگین آورده شده اند.

جدول ٤: میانگین pH زمان نگهداری گروه‌های مختلف بر اساس هفته

گروههای مختلف	۱	۲	۳	٤	N	pH (X ± SEM)
تیمار ۱	٥/۳۰	٥/۲٤	٥/۰۰	٤/٦۹	٤	٥/۰٥±۰/۱۳
تیمار ۲	٥/٥۷	٥/۱۸	٥/۰٦	٤/٦۸	٤	٥/۱۲±۰/۱۸
تیمار ۳	٥/۸۱	٥/۱٥	٤/۹۹	٤/٦۷	٤	٥/۱٥±۰/۲٤
تیمار ٤	٥/٦۹	٥/۲٦	٥/۰٦	٤/٦٦	٤	٥/۱٦±۰/۲۱
تیمار ٥	٥/۷۳	٥/۲۹	٥/۰۹	٤/٦٦	٤	٥/۱۹±۰/۲۲
تیمار ٦	٥/۹٤	٥/۲۲	٥/۰۹	٤/۷۰	٤	٥/۲۳±۰/۲٥
تیمار ۷	٥/۸۱	٥/۲۲	٥/۰٥	٤/۷٥	٤	٥/۲۰±۰/۲۲
تیمار ۸	٥/٤۹	٥/۱۹	٥/۰٦	٤/٦٦	٤	٥/۱۰±۰/۱۷
تیمار ۹	٥/٥۹	٥/۱۷	٤/۹٤	٤/٦۷	٤	٥/۰۹±۰/۱۹
تیمار ۱۰	٥/۸۱	٥/۱۲	٤/۸٦	٤/٥۷	٤	٥/۰۹±۰/۲٦
تیمار ۱۱	٥/۷۱	٥/۳۲	٥/۱۰	٤/۷۹	٤	٥/۲۳±۰/۱۹
تیمار ۱۲	٥/۸۲	٥/۱٤	٤/۹٥	٤/۷۲	٤	٥/۱٥±۰/۲۳
تیمار ۱۳	٥/۹٤	٥/۱۸	٤/۹۳	٤/٦۹	٤	٥/۱۸±۰/۲۷

مقادیر براساس میانگین± انحراف معیار میانگین آورده شده اند.

نتایج مربوط به تعداد باکتری براساس شمارش مستقیم و بـر روی محیطMRS Agar در گروه های مختلف در جـداول ٥ و ٦ آورده شده است. بیشترین اسیدیته در زمان تولید و نگهداری مربوط بـه کفیر پروبیوتیکی حاوی ۹ گرم گیاه گل گاو زبان بـود . بیشـترین PH در زمان نگهداری مربوط به کفیر حاوی ۱۱ گرم گل گاوزبان و۰/۳گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کفیر حاوی ۱۱ گرم گـل گاو زبان و ۰/۱٥گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود.

جدول ٥: میانگین شمارش مستقیم باکتری‌ها در گروه های مختلف براساس هفته

گروههای مختلف	۱	۳	N	تعداد باکتری (X ± SEM)
تیمار ٥	٤/٥ × ۱۰^٥	۱/۸ ×۱۰^٦	۲	+ ۰۰٦E۱/۱۲ ± + ۰۰٥E٦/۷٥
تیمار ٦	۸/۷٥ × ۱۰^٦	۱/۳ ×۱۰^٦	۲	+ ۰۰٦E٥/۰۲ ± + ۰۰٦E۳/۷۲
تیمار ۷	۱/۸ × ۱۰^٥	۱/٤ ×۱۰^٦	۲	+ ۰۰٥E۷/۹۲ ± + ۰۰٥E٦/۰۷
تیمار ۸	۳/۹ × ۱۰^٥	۱/٤ ×۱۰^٥	۲	+ ۰۰٥E۲/٦٥ ± + ۰۰٥E۱/۲٥
تیمار ۹	۱/٥٥ × ۱۰^٦	۱/۸٥ ×۱۰^٤	۲	+ ۰۰٥E۷/۸٤ ± + ۰۰٥E۷/٦٥
تیمار ۱۰	۱/۲٥ × ۱۰^٦	۸/۱۰ ×۱۰^٥	۲	+ ۰۰٦E۱/۰۲ ± + ۰۰٥E۲/۲٥
تیمار ۱۱	٤/٥ × ۱۰^٥	۱ × ۱۰^٦	۲	+ ۰۰٥E۷/۲٥ ± + ۰۰٥E۲/۷٥
تیمار ۱۲	۱/۹٥ × ۱۰^٥	۲/۳٥ × ۱۰^٤	۲	+ ۰۰٥E۱/۰۹ ± + ۰۰٤E۸/٥۷
تیمار ۱۳	۱/٥ × ۱۰^٥	۹/٥ × ۱۰^٤	۲	+ ۰۰٥E۱/۲۲ ± + ۰۰٤E۲/۷٥

مقادیر براساس میانگین± انحراف معیار میانگین آورده شده اند.

جدول ٦: میانگین کشت پلیت باکتری‌ها گروه های مختلف بر اساس هفته

گروههای مختلف	۱	۳	N	تعداد باکتری (X ± SEM)
تیمار ٥	$۱/٦٥۲ \times ۱۰^{۱۳}$	$۱/۷۱ \times ۱۰^{۱۲}$	۲	+ ۰۱۲E۹/۱۱ ± + ۰۱۲E۷/٤۰
تیمار ٦	$۱/۱۰٥ \times ۱۰^{۱۳}$	$٦/٥ \times ۱۰^{۱۱}$	۲	+ ۰۱۲E٥/۸٥ ± + ۰۱۲E٥/۲۰
تیمار ۷	$٤/۱ \times ۱۰^{۱۲}$	$۲/٥٤ \times ۱۰^{۱۲}$	۲	+ ۰۱۲E۳/۳۲ ± + ۰۱۱E۷/۸۰
تیمار ۸	$٤/٥ \times ۱۰^{۱۲}$	$۱/٤۱ \times ۱۰^{۱۲}$	۲	+ ۰۱۲E۲/۹٥ ± + ۰۱۲E۱/٥٤
تیمار ۹	$۲/۷۲ \times ۱۰^{۱۲}$	$۱/۲٤ \times ۱۰^{۱۲}$	۲	+ ۰۱۲E۱/۹۸ ± + ۰۱۱E۷/٤۰
تیمار ۱۰	$٤/۲ \times ۱۰^{۱۲}$	$۲/٤ \times ۱۰^{۱۲}$	۲	+ ۰۱۲E۳/۳۰ ± + ۰۱۱E۹/۰۰
تیمار ۱۱	$۱/٥۱ \times ۱۰^{۱۲}$	۳×۱۰^{۱۱}	۲	+ ۰۱۱E۹/۰٥ ± + ۰۱۱E٦/۰٥
تیمار ۱۲	$۳/۱۷ \times ۱۰^{۱۲}$	$۱/۰۱ \times ۱۰^{۱۲}$	۲	+ ۰۱۲E۲/۰۹ ± + ۰۱۲E۱/۰۸
تیمار ۱۳	$٤/۳۹ \times ۱۰^{۱۲}$	$۱/٦۹ \times ۱۰^{۱۲}$	۲	+ ۰۱۲E۳/۰٤ ± + ۰۱۲E۱/۳۰

مقادیر براساس میانگین± انحراف معیار میانگین آورده شده اند.

در شمارش مستقیم میکروبی در هفته اول بیشترین تعداد باکتری شمارش شده مربوط به کفیر حاوی ۱۱ گرم گیاه گل گاو زبان و ۰/۳ گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بوده و در هفته سوم بیشترین تعداد باکتری شمارش شده در شمارش مستقیم میکروبی مربوط به کفیر حاوی ۱۱ گرم گل گاو زبان و ۰/۳ گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۰/۳ گرم بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بود. در شمارش کشت پلیت در هفته اول بیشترین تعداد شمارش شده مربوط به کفیر حاوی ۹ گرم گل گاوزبان بوده و در هفته سوم بیشترین تعداد باکتری شمارش شده به روش کشت پلیت مربوط به کفیر پروبیوتیکی حاوی۳گرم گیاه گل گاو زبان می‌باشد.

بحث

کفیر پروبیوتیکی ۹ گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان در طی مدت زمان مطالعه دارای بیشترین اسیدیته ٤۷ درجه دورنیک بود و سپس نمونه‌های ٦ گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان و ۳ گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان و شاهد به ترتیب دارای اسیدتیه ٤٥ و ٤۳ و ۳۹ درجه دورنیک بودند و پس از آن به یخچال با دمای ٤ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. پس نتیجه می‌گیریم که در این قسمت هر چه غلظت عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان بیشتر باشد تأثیر بیشتری بر روی رشد کفیر طی مدت گرمخانه گذاری دارد. در شمارش مستقیم میکروبی در هفته اول بیشترین تعداد شمارش شده مربوط به ۱۱ گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان و ۰/۳ گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بوده و در هفته سوم بیشترین تعداد شمارش شده در شمارش مستقیم میکروبی مربوط به ۱۱ گرم عصاره آبی- الکلی گل گاو زبان و ۰/۳ گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۰/۳ گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۰/۳ گرم بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به میزان مساوی می‌باشد و در هفته سوم بیشترین تعداد میکروب شمارش شده مربوط به کفیر پروبیوتیکی و ۱۱ گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان و ۰/٦ گرم باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌باشد.

به طور کلی در مطالعه حاضر، افزودن عصاره گیاه گل گاو زبان به کفیر پروبیوتیک به طور معنی داری سبب رشد و تکثیر بیشتر پروبیوتیک‌ها نسبت به نمونه شاهد (نمونه بدون عصاره) می‌شود. با افزودن عصاره گیاه گل گاو زبان با غلظت‌های متفاوت رشد و تکثیر پروبیوتیک‌ها در تمام روزهای نگهداری نسبت به نمونه شاهد بالاتر بوده است. اما تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در تمام نمونه‌ها در طی مدت نگهداری ۲۸ روزه کاهش یافت که این کاهش در نمونه حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشتر از نمونه‌های حاوی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بوده است که با نتایج

Dave and Shah در سال ۱۹۹۷ (که از پری بیوتیک‌ها برای حفظ بقای پروبیوتیک‌ها استفاده کرده بودند) مطابقت دارد. چرا که طبق نوشته‌های آن‌ها تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و استرپتوکوکوس ترموفیلوس در طول دوره نگهداری کاهش یافت. [۲۶]

ابوالحسنی و همکاران در سال ۲۰۰٤ نشان دادند که عصاره آبی گل گاوزبان دارای فعالیت ضد باکتریایی وابسته به غلظت بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد و این اعتقاد وجود دارد که گل گاوزبان می‌تواند عفونت ناشی از تب را کنترل کند.[۲۷] فرهانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که عصاره گل گاوزبان فعالیت ضد ویروسی معنی داری در غلظت های غیر سمی بر آستر سلولی دارد و عصاره گیاه گل گاوزبان به عنوان مهارکننده همانندسازی ویروس در غلظت بالاتر از ٤۰۰µg/ml عمل می‌کند.[۲۸] سمنانی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که روغن گل گاوزبان دارای فعالیت ضد باکتریایی وابسته به غلظت برعلیه باکتری های باسیلوس سوبتیلیس و سالمونلا تیفی و آسپرژیلوس نیجر و کاندیدا آلبیکنس و سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کلی می‌باشد. [۲۹]

Sabour و همکاران در سال ۲۰۱٤ گزارش کردندکه عصاره متانولی گل گاوزبان دارای فعالیت ضد باکتری معنی داری بر علیه اسینتوباکتر بومانی می‌باشد.[۳۰] صابری فرد و همکاران در سال ۲۰۱٤ فعالیت ضد میکروبی عصاره گل گاوزبان بر علیه باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی را با استفاده از روش دیسک آگار نشان دادند.[۳۱]

از جمله ترکیبات موجود در گل گاوزبان، کارواکرول می‌باشد. در مطالعه Maquera-Huachi و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که کارواکرول دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه تشکیل بیوفیلم برسطوح کاشت تیتانیوم می‌باشد.[۳۲] همچنین در مطالعه Mooyottu و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داده شد که کارواکرول می‌تواند برای کنترل عدم تعادل میکروبها با محیط دستگاه گوارش و کاهش عفونت باکتری کلستریدیوم دیفیکیل به کار رود. [۳۳] در مطالعه Khan و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشخص گردید که تیمول و کارواکرول دارای فعالیت ضد بیوفیلم و باکتریایی برعلیه استرپتوکوکوس موتانس می‌باشد. [۳٤]

در مطالعه محبوبه اکسیری و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشخص گردید که می‌توان با استفاده از عصاره‌های بیدمشک و گل گاوزبان تولید نوشیدنی‌های پروبیوتیک کرد. در این مطالعه مشخص شد که تیمار حاوی لاکتوباسیلیوس کازئی، بیدمشک،گل گاوزبان و ۳۰ درصد آب سیب بیشترین قدرت زنده مانی باکتری را داشت و تیمار حاوی لاکتوباسیلیوس رامنوسوس، بیدمشک، گل گاوزبان و ۳۰ درصد آب سیب به علت داشتن بیشترین امتیاز پذیرش کلی، pH مناسب و عدد اسیدی مناسب به عنوان بهترین تیمار انتخاب شد. [۳۵]

در مطالعه جهاندیده و همکاران در سال ۲۰۱۲ از عصاره گل گاوزبان به عنوان محیط رشد برای چهار باکتری لاکتیک اسیدی شامل لاکتوباسیلیوس پاراکازئی، لاکتوباسیلیوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلیوس پلانتاروم، لاکتوباسیلیوس دیلبرویسکی استفاده گردید. نتایج نشان داد که همه این باکتریها قادرند که در عصاره گل گاوزبان بدون هیچ مکملی رشد کنند. [۳٦]

به نظر می‌رسد که افزایش رشد باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به دلیل داشتن ترکیبات پلی فنولی مانند کارواکرول و تیمول در گیاه گل گاوزبان باشد. زیرا ترکیبات موجود در گیاه و عصاره گل گاوزبان از یک طرف باعث کاهش رشد باکتری های مضر و از طرف دیگر باعث رشد باکتری های سودمند در کفیر شده و این اثرات متفاوت آنها بررشد باکتری ها احتمالا به علت ترکیبات متفاوت دیواره باکتری های گرم مثبت و منفی می‌باشد. از طرف دیگر با توجه به ترکیبات موجود در عصاره از جمله قندها می‌توانند محیط مغذی را برای رشد باکتری های سودمند لاکتوباسیلیوس اسیدوفیل و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در کفیر فراهم کنند.

در مطالعه حاضر بالاترین تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در نمونه حاوی ۱۱ گرم عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان و ۰/۱۵ گرم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌باشد. زمانی که زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس حاوی هر باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم مورد بررسی قرار گرفت تأثیر عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان کاهش یافته و زنده مانی کمتر شد. اثر عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان زمانی که باکتری‌های پروبیوتیک به تنهایی استفاده شد خیلی بیشتر بوده

است. روند تغییرات باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در طی دوره نگهداری ثابت بوده است و اثر زمان نگهداری بر تعداد آن غیر معنی دار گردیده است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که از عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان می‌توان جهت افزایش تعداد باکتری‌های بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ویژه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم استفاده نمود. همچنین افزودن از عصاره آبی- الکلی گیاه گل گاو زبان می‌توان گیاه گل گاو زبان به میزان ٦ گرم در صورت افزودن قبل از مایه زنی اثرات مثبتی بر کاهش میزان PH و اسیدیته داشت که دلیل این مسئله می‌تواند نابود کردن باکتری دیگر باشد.

References

1. Mortazavian Farsani, Nematollahi, Sohrab Vandi, et al. The use of fruits and vegetables as the basic environment for the production of non-lethal probiotic beverages. Seventh year Iran Journal of Nutrition Sciences and Food Technology 2013. 7 (4): 9-12.
2. Blayney D, gehlhar M. Bolling ch et al. US dairy at a global crossroads [Online]. United States Department of Agriculture, Economic Research Service, Economic Research Report number 28, November 2006. Available at:http://www.ers.usda.gov/publications/err28
3. More S. Global trends in milk quality: implications for the Irish dairy industry. Ir Vet J. 2009;62 Suppl 4:S5-14.
4. Fuller f. Beghin j, Rozelle S.Consumption of dairy products in urban china: results from bejing , shanghai and Guangzhou. The Australian Journal of Agricultural and Resource Economics 2007; 51: 459–474.
5. Mortazavian A, Sohrab Vandi C, Probiotics and Probiotics. First Edition . Tehran .2005; pp:1- 483
6. Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. Vet Q. 2007 Mar;29(1):18-31.
7. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. Int J Environ Res Public Health 2014;11(5):4745-67.
8. Fontán MCG, Martínez S, Franco I, Carballo J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. Int. Dairy J. 2006;16: 762–767.
9. Garrote G. L., Abraham A. G., De Antoni G. L. "Microbial Interactions in Kefir: a Natural Probiotic Drink," in Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, eds Mozzi F., Raya R. R., Vignolo G. M., editors. (Ames, IO: Wiley-Blackwell;). 2010; 327–340.
10. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. PHarmacogn Rev. 2012;6(11):1-5.
11. Zargari A. Medicinal plants. 4th edition, University Press. Tehran. Iran 1989:510-39.[In Persian]
12. Kast R.E. Borage oil reduction of rheumatoid arthritis activity may be mediated by increased cAMP that suppresses tumor necrosis factor-alpha. Int Immunopharmacol 2001;1(12):2197-9.
13. Ranjbar A, Khorami S, Safarabadi M, et al. Antioxidant activity of Iranian *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey flower decoction in humans: a cross-sectional before/after clinical trial. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2006;3(4):469–473.
14- Heidari MR, Azad EM, Mehrabani M. Evaluation of the analgesic effect of Echium amoenum Fisch & C.A. Mey. extract in mice: possible mechanism involved. Journal of EthnopHarmacology 2006;103(3):345–349.
15. Sayyah M, Sayyah M, Kamalinejad M. A preliminary randomized double blind clinical trial on the efficacy of aqueous extract of Echium amoenum in the treatment of mild to moderate major depression. Progress in Neuro-PsychopHarmacology and Biological Psychiatry 2006;30(1):166–169.
16. Sadeghi L, Yousefi Babadi V, Tanwir F. Improving effects of Echium amoenum aqueous extract on rat model of Alzheimer's disease. J Integr Neurosci. 2018;17(3-4):661-669.
17. Naseri N, Kalantar K, Amirghofran Z. Anti-inflammatory activity of *Echium amoenum* extract on macropHages mediated by inhibition of inflammatory mediators and cytokines expression. Res Pharm Sci. 2018;13(1):73-81.
18. Safaeian L, Tameh AA, Ghannadi A, Naghani EA, Tavazoei H, Alavi SS. Protective effects of Echium amoenum Fisch. and C.A. Mey. against cerebral ischemia in the rats. Adv Biomed Res. 2015;4:107.
19. Abed A, Minaiyan M, Ghannadi A, Mahzouni P, Babavalian MR. Effect of Echium amoenum Fisch. et Mey a Traditional Iranian Herbal Remedy in an Experimental Model of Acute Pancreatitis. ISRN Gastroenterol. 2012;2012:141548.

20. Hosseinzadeh H, Shahandeh S, Shahsavand S. Anxiolytic and Hypnotic Effects of Aqueous and Ethanolic Extracts of Aerial Parts of Echiumitalicum L. in Mice. Jundishapur J Nat PHarm Prod. 2012;7(2):71-9.

21. Shariatifar N, Ebadi Fathabad A, Madih S. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of Echium amoenum on foodborne pathogens. J Food Safe & Hyg. 2016; Vol 2 No. 3-4.

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

23. Moshtaghi C .Public and Clinical Laboratory Biochemistry. Isfahan: Jihad University Press, 1998: 127.[In Persian]

24. 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. 1 st ed. Standard No. 9616. Tehran: ISIRI Publisher; 2008. [In Persian]

25. Moshtaghi C .Public and Clinical Laboratory Biochemistry. Isfahan: Jihad University Press, 1998: 127.[In Persian]

26. Abolhassani M. Antibacterial effect of borage (Echium amoenum) on StapHylococcus aureus. Brazilian J Infect Disease 2004; 8: 382-85.

27. Farahani M. Antiviral Effect Assay of Aqueous Extract of Echium Amoenum-L Against HSV-1. Zahedan J Res Med Sci. 2013; 15: 46-48.

28. Dave RI, Shah NP. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy Journal 1997;7(1) : 31-41.

29. Morteza-Semnani K, Saeedi M, Akbarzadeh M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Echium italicum L. J Essen Oil Bear Plant. 2009; 12: 557-61.

30. Sabour M, Vala MH, Malayeri HOA. Evaluation of Antibacterial Effect of Echium Amoenum Fisch. et Mey on Multi-Drug Resistance Acinetobacter Baumannii Isolates from Clinical Samples of Burn Wounds. Iranian J Pub Health 2014; 43: 38.

31. Shariatifara N, Ebadi Fathabadb A, Madihia S. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of Echium amoenum on food-borne pathogens. J Food Safe & Hyg. 2016; 2 (3-4):63-66.

32. Maquera-Huacho PM, Tonon CC, Correia MF, Francisconi RS, Bordini EAF, Marcantonio É, Spolidorio DMP. In vitro antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces. Biofouling. 2018;34(6):699-709.

33. Mooyottu S, Flock G, Upadhyay A, Upadhyaya I, Maas K, Venkitanarayanan K. Protective Effect of Carvacrol against Gut Dysbiosis and *Clostridium difficile* Associated Disease in a Mouse Model. Front Microbiol. 2017;8:625.

34. Khan ST, Khan M, Ahmad J, Wahab R, Abd-Elkader OH, Musarrat J, Alkhathlan HZ, Al-Kedhairy AA. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by Streptococcus mutans. AMB Express. 2017;7(1):49.

35. Eksiri M, Nateghi L, Rahmani A. production of Probiotic drink using pussy willow and Echium amoenum extracts. Applied Food Biotechnology 2017;4(3).

36. Jahandideh F, Mousavi S M, Razavi S H.Utilization of *Echium amoenum* extract as a growth Medium for the production of organic acids by selected lactic acid Bacteria. Food and Bioprocess Technology 2012;5(6):,2275–2279.

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences

Alborz University of Medical Sciences Journal, May 2020, Vol. 9, No. 2: 219-230 *Original Article*

Khadijeh Zarei[1], Mohammad Hossein Marhamatizadeh[2*], Farahnaz Javanmardi[3]

[1] *MSc of Microbiology, Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun,Iran*
[2] *Assistant Professor, Department of Nutrition Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran*
[3] *Assistant Professor, Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran*

The Effect of *Echium amoenum* Hydro-alcoholic Extract on the Growth of Probiotic Bacteria Lactobacillus Acidophilus and Bifidobacterium Bifidum in Kefir

Received:8 Jan. 2019 ; Accepted:9 Feb. 2020

Abstract

Background: *Echium amoenum* have antibacterial, anti-anxiety, antinociceptive and anticonvulsant effects. This study was carried out to study the effect of *Echium amoenum* hydro-alcoholic extract on growth of probiotic bacteria Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in kefir.

Material and Methods: For this purpose, 13 treatments with different concentrations (*Echium amoenum* hydro-alcoholic extract with Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum) were produced separately or jointly. The treatments including: 1-sham: 110 g of kefir, 2, 3 and 4 treatments: respectively, kefir containing 3, 6 and 9 grams of hydro-alcoholic extract of *Echium amoenum*, treatments 5, 6, and 7: respectively, kefir containing 11 grams of hydro-alcoholic extract of *Echium amoenum* and 0.1 and 0.3 and 0.6 grams of lactobacillus acidophilus, treatments 8, 9, and 10: respectively, kefir containing 11 grams of hydro-alcoholic extract of *Echium amoenum*, and 0,1, 0,3 and 0,6 grams of bifidobacterium, bifidum, 11 treatment: kefir containing 11 grams of hydro-alcoholic extract of *Echium amoenum* and 0.05 grams of lactobacillus acidophilus and 0.05 grams of bifidobacterium bifidum, 12 treatment: Kefir containing 11 g of hydro-alcoholic extract of *Echium amoenum* and 0.15 g of lactobacillus acidophilus and 0.15 g of bifidobacterium bifidum, 13 treatment: Kefir containing 11 g of hydro-alcoholic extract of *Echium amoenum* and 0.3 g of lactobacillus acidophilus and 0.3 g of bifidobacterium bifidum.The specimens were then incubated at 30 ° C for 12 hours and then the products were placed in a refrigerator. After production of each of the above products, during the storage period of each of the samples on days 1, 7, 14, 21, they were tested for acidity and PH. Bacterial counting was done in two direct and cultures in the first and third weeks. The results were analyzed using SPSS software.

Results: The highest acidity was at the time of production and maintenance of treatment 4. The highest PH at the time of storage was for treatment 6 and treatment 11. In the direct microbial count in the first week, the highest number of bacteria counted was related to treatment 6 and in the third week, the highest number of bacteria counted in the direct microbial count was related to treatment 13. Plate culture count in the first week has the highest number of treatments 4 and in the third week, the highest number of bacteria counted by Plate culture method is for treatment 2.

Conclusion: *Echium amoenum* extract caused the survival and even increased growth of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum bacteria.

Keywords: Echium amoenum, Probiotic, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus acidophilus

***Corresponding Author:**
Department of Biology, Kazerun Branch, Kazerun, Islamic Azad University, Iran

Tel: 0917-7210645
E-mail: drmarhamati@gmail.com