Archive of SID

بررسی تاثیر نوع کشت آغازگر، دمای گرمخانه‌گذاری و pH نهایی محصول بر خواص کیفی و رئولوژیکی دوغ پروبیوتیک

علی دینی[۱]،سید محمدعلی ابراهیم‌زاده موسوی[۲]، ناصر صداقت[۳]، سید هادی رضوی[۴]، احسان امینی[۵]

۱-مرکز تحقیقات سلامت پسته، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران (نویسنده مسئول)*

۲-گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده بیوسیستم ، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳-گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴-گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده بیوسیستم ، دانشگاه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۵-گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

در این پژوهش تاثیر عوامل نوع کشت آغازگر، دمای گرمخانه‌گذاری و pH نهایی بر زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و خصوصیات رئولوژیکی و حسی در دوغ پروبیوتیک مورد مطالعه قرار گرفت از دو آغازگر ABY۱ و ABY۲ در سه دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ °C، ۴۰ °C و ۴۴ °C و در چهار سطح pH نهایی ۴/۶، ۴/۰، ۴/۴ و ۳/۸ استفاده شد ارزیابی آماری نشان داد در ارتباط با قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها میان متغیرهای ذکر شده اثر معنی‌داری وجود دارد بهترین نمونه‌ها از نظر زنده‌مانی کل باکتری‌های پروبیوتیک، نمونه تهیه شده از آغازگر ABY۲ با دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ °C و pH نهایی ۴/۴ و ۴/۶ بودند دمای گرمخانه‌گذاری و pH نهایی تاثیر معنی‌داری بر رفتار جریانی و قطر ذرات داشتند با کاهش pH از ۴/۶ به ۴ قطر ذرات افزایش یافته و پس از کاهش pH به ۳/۸ قطر ذرات کاهش یافت دمای گرمخانه‌گذاری ۴۴ °C نسبت به ۳۷ °C و ۴۰°C باعث افزایش قطر ذرات، ویسکوزیته و تفاوت در احساس دهانی نمونه‌ها گردید بهترین طعم، احساس دهانی و پذیرش کلی در نمونه‌های تخمیر شده در دمای ۴۴ °C مشاهده شد و نمونه‌های با بیشترین زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها به میزان متوسط ارزیابی شدند.

کلید واژگان: *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*، خواص کیفی، دوغ پروبیوتیک، زنده‌مانی، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*.

* a.dini@rums.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

دیری نیست که صنعت غذا در جهان در مسیر تولید غذاهای فراسودمند گام برداشته است. برای مثال در سه دهه گذشته، تلاش بر این بوده تا با مصرف باکتری‌های پروبیوتیک، به ایجاد توازن در ریزفلور میکروبی روده انسان کمک شود. باکتری‌های مذکور با ممانعت از رشد باکتری‌های نامطلوب در روده و در نتیجه کاهش تولید مواد مضر به وسیله باکتریهای مضر، سرکوب کردن آن‌ها، کاهش کلسترول خون، کاهش حساسیت به لاکتوز، تحریک و تقویت سیستم ایمنی بدن و خواص پادعفونتی و افزایش ارزش تغذیه‌ای برای انسان اثرات سلامت بخش دارند(۱, ۲). خواص مفید ذکر شده در صورتی بروز می‌کند که حداقل 10^7 cfu/ml باکتری پروبیوتیک درماده غذایی وارد روده شود(۳). از جمله عوامل موثر بر زنده‌ماندن این باکتری‌ها عبارت است از نوع باکتری، pH محصول، اسیدیته آن، فرایندهای وابسته به گرما شامل فرآیندهای گرمائی، گرمخانه‌گذاری و دمای نگهداری، افزودنی‌های محرک رشد و نظایر موارد مذکور است.

به‌طور کلی قابلیت بقای پروبیوتیک‌ها در فرآورده‌های تخمیری به دلیل پائین بودن pH و بالا بودن اسیدیته نسبتاً اندک است (۴, ۵). اسیدیته بالا و pH پایینِ فرآورده‌های پروبیوتیک از مهم‌ترین عوامل کاهش قابلیت زیستی این باکتری‌ها می‌باشند. به‌طوری‌که قابلیت زیستی در فرآورده‌هایی چون شیرشیرین دست کم ۱۰ بار بیشتر از فرآورده‌های تخمیری است (۶, ۷). انتخاب دمای بهینه گرمخانه‌گذاری با توجه به تفاوت دمای بهینه در باکتری‌های پروبیوتیک بالاخص با باکتری‌های سنتی ماست با توجه به اینکه بر دو شاخص مدت زمان تخمیر و قابلیت زیستی اثر معنی‌داری دارد، از اهمیت زیادی برخوردار است (۸).

باکتری‌های پروبیوتیک به‌طور گسترده‌ای در محصولات لبنی به‌صورت منفرد مانند شیر اسیدوفیلوس و به‌صورت مجموعه‌ای از باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در محصولات لبنی هم به‌شکل منفرد و بدون حضور باکتری‌های سنتی ماست و نیز هم‌کشت شده با باکتری‌های سنتی ماست مورد استفاده قرار می‌گیرند. هم‌کشت کردن باکتری‌های پروبیوتیک با باکتری‌های سنتی ماست در مرحله اول به منظور ایجاد ترکیبات مورد نیاز رشد پروبیوتیک‌ها (که به شکل قابل دسترس در محیط شیر وجود ندارد یا مقدار آن‌ها اندک است) انجام می‌گیرد. به عبارت دیگر نوعی رابطه زیستی هم‌یاری یک‌طرفه ایجاد می‌شود به طور مثال گزارش شده است که نژادهایی از بیفیدوباکتریوم که قادر به رشد در شیر نبودند از طریق هم‌کشت کردن با باکتری‌های حامی، که از قابلیت پروتئین کافتی[1] بالایی برخوردار هستند، توانایی رشد یافتند (۸). از روابط هم‌یاری مابین باکتری‌های سنتی ماست و پروبیوتیک‌ها می‌توان به تجزیه پروتئین کازئین توسط باکتری‌های سنتی ماست و در اختیار قرار دادن پپتیدهای آزاد و اسیدهای آمینه برای باکتری‌های پروبیوتیک بالاخص *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*[2]، که فاقد و یا دارای قدرت پروتئین کافتی کمی هستند، نام برد (۹-۱۱). با این وجود کشت‌های حامی ممکن است در ابتدا رابطه هم‌یاری زیستی با پروبیوتیک‌ها برقرار کنند اما به تدریج موجب محدودیت رشد و یا مرگ آن‌ها می‌شوند و هم‌یاری زیستی جای خود را به پادیاری زیستی می‌دهد. نمونه بارز چنین رویدادی را می‌توان در رابطه زیستی پروبیوتیک‌ها با باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*[3] مشاهده کرد. این باکتری در ابتدا با پروتئولیز کازئین و فراهم آوردن ازت آلی غیرپروتئینی در دسترس، رشد پروبیوتیک‌ها را تشدید می‌کند، اما در ادامه تخمیر با رشد سریع، اسیدسازی شدید، کاهش pH و تولید پراکسیدهیدروژن و باکتریوسین طی تخمیر و دوره نگهداری بر رشد و قابلیت بقای این باکتری‌ها اثر سوء می‌گذارد (۱۲, ۱۳). از این‌رو مشخص نمودن عوامل بهینه رشد اعم از نوع کشت آغازگر، دمای بهینه گرمخانه‌گذاری و pH نهایی محصول تخمیر شده،

[1] Proteolysis
[2] *Bifidobacterium lactis*
[3] *Lactobacillus bulgaricus*

www.SID.ir

Archive of SID

جهت دست‌یابی به بیشترین زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک از اهمیت بسزایی برخوردار است.

محصولات پروبیوتیک را می توان به محصولات تخمیری و غیرتخمیری تقسیم کرد. دوغ محصولی است تخمیری که امروزه در ایران و کشورهای همسایه مثل ترکیه مصرف کنندگان زیادی دارد. به‌طوری‌که این محصول را نوشیدنی ملی کشورمان می‌دانند(۱۴). این نوشیدنی حاوی ٪۶-۴ ماده خشک، ٪۱/۵-۰ چربی، ٪ ۰/۵-۰/۲ نمک به همراه ترکیبات طعم دهنده مانند نعناع، پونه، اسانس‌های کاکوتی، خیار و می‌باشد.

در تحقیقاتی که بر روی خصوصیات رئولوژیکی دوغ انجام شده است آن را سیال نیوتنی ارزیابی کرده‌اند (۱۵). که رفتار جریانی آن تحت تاثیر مقدار ماده خشک و نمک قرار گرفته و رفتار رقیق شونده با جریان نیز از خود نشان می‌دهد(۱۶). مشخص شده که در محصولات و نوشیدنی‌های لبنی کیفیت و خصوصیات حسی تحت تاثیر خصوصیات رئولوژیکی محصول قرار گرفته و بیشترین مقبولیت در احساس دهانی در نمونه‌های رقیق شونده با جریان مشاهده شده است (۱۷, ۱۸).

اگر چه ارزش اساسی فرآورده‌های پروبیوتیک خاصیت سلامت بخش آن‌ها است، خواص حسی این فرآورده‌ها نیز جایگاه پراهمیتی دارند. به عبارت دیگر، امتیاز مصرف پروبیوتیک‌ها از طریق مواد غذایی، و نه به صورت دارو، برخورداری از خواص حسی آن‌ها است.

مهمترین عوامل موثر در طعم محصولات لبنی مقادیر استالدئید و دی‌استیل می‌باشند که در اثر تخمیر در محصولات لبنی ایجاد، و بعضی از باکتری‌های سیترات منفی مثل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[1] قادر به تجزیه دی‌استیل به استوئین می‌باشند. باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیشتر از بیفیدوباکترها قادر به تولید اسید لاکتیک هستند و استالدئید تولیدی را توسط آنزیم الکل دهیدروژناز به اتانل احیا می‌کنند (۱۱). اسید استیک یکی از اسیدهای آلی است که توسط بیفیدوباکتریوم‌ها تولید می شود و بر طعم و مزه فرآورده تاثیر می‌گذارند (۱۹). کلیه واکنش‌هایی که منجر به تولید مواد موثر بر طعم و بو و تجزیه آن‌ها توسط پروبیوتیک‌ها می‌گردند، پیچیدگی خاصی را ایجاد می‌کنند که انجام آزمون‌های حسی را جهت انتخاب محصول مناسب از نظر خواص حسی امری ضروری می‌نماید.

این موضوع که دوغ فرآورده‌ای با خاستگاه ایرانی است و نظر به اهمیت مصرف پروبیوتیک‌ها وتولید محصولات با بالاترین قابلیت زیستی این باکتری‌ها، ما را بر آن داشت تا در این تحقیق تاثیر نوع کشت آغازگر، تغییرات pH و اسیدیته و دمای گرمخانه‌گذاری را که از مهم‌ترین عوامل موثر بر زنده‌مانی و تعیین کننده زمان و شدت تغییر روابط هم‌یاری به پادیاری در باکتری‌های یاد شده هستند را بر میزان زنده‌مانی نهایی محصول و همچنین بر رفتار جریانی دوغ و تاثیر این پارامترها بر خصوصیات حسی محصول را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های آغازگر بکاررفته

از کشت‌های آغازگر پروبیوتیک لیوفلیزه شده تجارتی ABY۱ و ABY۲ تهیه شده از شرکت کریس‌هنسن[2] (محتوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدو باکتریوم لاکتیس* و باکتری‌های معمول ماست) به ترتیب با نسبت ۱:۱ و ۱:۲ و به میزان ۰/۰۴۸ g/l تلقیح شد. به‌گونه‌ای که هر میلی‌لیتر شیر تلقیح شده با کشت آغازگر ABY۲، حاوی ۴×۱۰^{۶} باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، $۸/۸\times۱۰^{۶}$ باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بود. نمونه تلقیح شده با کشت آغازگر ABY۱ حاوی $۱/۲۸\times۱۰^{۶}$ باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و $۱/۳۶\times۱۰^{۶}$ باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بود.

[1] *Lactobacillus acidophilus*

[2] Chr Hansen

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت

از محیط کشت MRS بایل‌آگار استفاده گردید. محیط کشت MRS آگار از شرکت مرک آلمان[1] تهیه شده و با افزودن ٪۰/۱۵ نمکهای صفراوی خریداری شده از شرکت سیگما آلدریچ[2] آمریکا با اثر ممانعت کنندگی بایل بر روی باکتری‌های سنتی ماست، محیطی مناسب به منظور شمارش انتخابی[3] تهیه شد. این محیط توسط ویندرولا و رینهیمر (۲۰۰۰) جهت شمارش اختصاصی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ترکیب کشتهای ABY در شرایط هوازی مورد استفاده قرار گرفت (اثبات شده است که شمارش ل- اسیدوفیلوس در کشت AY در شرایط هوازی و بی‌هوازی یکسان است)(۲۰, ۲۱).

نحوه شمارش باکتریایی

قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها توسط شمارش تفریقی باکتریایی با روش تشتک گذاری[4] در محیط MRS بایل‌آگار در دمای ۳۷°C و به‌مدت ۷۲ h انجام شد. با توجه به عدم اثر پادیاری زیستی میان این دو باکتری در محیط کشت یاد شده و امکان شمارش هر دو باکتری در شرایط بی هوازی (مجموع *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*) و قابلیت یکسان پرگنه‌سازی[5] *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی و بدلیل بی هوازی مطلق بودن *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و عدم رشد و تولید پرگنه توسط این باکتری در شرایط هوازی، شمارش باکتری‌های پروبیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. برای محاسبه تعداد پرگنه *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* از تفریق مجموع تعداد پرگنه‌های تشکیل شده در کشت در شرایط بی‌هوازی از کشت در شرایط هوازی به‌دست آمد. به‌منظور بی‌هوازی کردن محیط از گاز پک تیپ A تهیه شده از شرکت مرک آلمان استفاده به‌عمل آمد.

[1] Merck
[2] Sigma-Aldrich, Reyde
[3] Selective
[4] Plate count agar
[5] colony forming ability

آماده سازی دوغ

در ابتدا با استفاده از شیر بازساخته بدون چربی (شیر خشک شرکت زرین لبن، قزوین، ایران) با تنظیم ماده خشک کل ٪ ۴ و نمک ٪۰/۵ آن را تحت دمای پاستوریزاسیون ۹۵ °C در مدت ۱۵ min قرار داده و نمونه را تا حصول به درجه حرارت گرماگذاری سرد می‌نماییم و تلقیح به میزان٪۰/۰۴۸ w/v صورت گرفته (از تلقیح ۴ ml/l محیط کشت رقیق شده در ۱L شیر) و نمونه‌ها در سه دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ °C، ۴۰ °C و ۴۴ °C تا حصول به چهار سطح pH نهایی ۳/۸، ۴/۰، ۴/۴ و ۴/۶ گرمخانه‌گذاری شدند.

روند افزایش اسیدیته

اسیدیته کل برحسب اسید لاکتیک در ۱۰۰g نمونه محاسبه گردید از روش تیتراسیون با سود ۰/۱N هر ۳۰min یک‌بار تا پایان تخمیر استفاده شد و اسیدیته براساس درجه درنیک (mg/۱۰ ml) و بر پایه اسید لاکتیک (اسید غالب در فرآورده‌های تخمیری) گزارش گردید.

بررسی روند افت pH

هر ۳۰min یک‌بار با استفاده از pH متر دیجیتالی (متلر۶، (متلر۶، مدل MA۲۳۵، سوئیس) روند افت pH در طول تخمیر تا زمانی که تخمیر در pH مورد نظر متوقف گردیده، اندازه‌گیری شد.

تعیین مقدار اسید استیک دوغ

مقدار اسید استیک نمونه‌ها با استفاده از دستگاه HPLC مطابق روش آلکام و همکاران[7](۲۰۰۷) اندازه گیری شد(۲۲). g ۴ نمونه دوغ در ml ۲۵ محلول N ۰/۱ اسید سولفوریک رقیق‌سازی و پس از همگن شدن در ۵۰۰۰g به‌مدت زمان ۱۰min سانتریفیوژ شد. فاز شفاف (سوپرناتانت) از خلال کاغذ واتمن شماره (۱) و سپس صافیμm ۰/۲ عبور داده شد. ml ۲ از محلول حاصل تا زمان استفاده جهت تزریق در ویال مخصوص در دمای

[6] Mettler
[7] Alkam

www.SID.ir

Archive of SID

۱۸°C- نگهداری شد و میزان ۲۰ µl برای تزریق به دستگاه مورد استفاده قرار گرفت. از آشکارساز فرابنفش و ستون نوکلئوسیل ۵-۱۲۰ و C ۱۸ استفاده گردید. فاز متحرک، محلول N ۰/۰۰۹ اسید سولفوریک با سرعت حرکت ml/min ۰/۵ بود. مدت زمان باز ماند برای این اسید ۷/۶min بود.

پس از تهیه سه استاندارد برای اسید استیک (٪۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۴۵) منحنی استاندارد رسم شده و میزان اسید استیک موجود در هر یک از نمونه ها توسط محاسبه مساحت زیر پیک با انتقال به منحنی استاندارد تخمین زده شد.

سنجش اندازه ذرات

با استفاده از روش پراش پرتو لیزر، توزیع و قطر متوسط ذرات کلوئیدی در تیمارهای مختلف توسط دستگاه مستر سایزر۱ مدل S ۲۰۰۰ تعیین گردید. اندازه‌گیری بر اساس اصل فران‌هوفر انجام شد. آزمون‌ها پس از گذشت حداقل h ۲۴ از زمان تولید نمونه‌ها انجام شد، تا حالت ثابت در نمونه ها حاصل شده باشد. جهت اطمینان بیشتر، پس از خارج شدن از یخچال دمای نمونه‌ها به دمای اتاق رسانده شد.

آزمون رفتار جریانی

جهت انجام آزمون های رئولوژیک و بررسی خواص جریانی نمونه‌ها، از دستگاه ویسکومتر چرخشی بروکفیلد۲ مدل RVII (ساخت امریکا) با بازوی چرخان یا اسپیندل ULA استفاده شد. نمودارهای جریان در محدوده نرخ برش(s-۱) ۱۰۰-۰/۱ در زمان min ۳ و با توقف زمانی s ۱۰ در هر نقطه اندازه‌گیری شد. میزان ویسکوزیته در نرخ برش s-۱ ۵۵ به عنوان ویسکوزیته ظاهری دوغ به‌دلیل مطابقت با نرخ برش دوغ در دهان که میزان تقریبی s-۱ ۵۰ است مورد محاسبه قرار گرفت (۲۳).

نحوه بررسی آنالیز حسی

تخمیر نمونه‌ها تا چهار سطح pH نهایی ۳/۸، ۴/۰، ۴/۴ و ۴/۶ متوقف گردید و تا دمای یخچالی به سرعت سرد گردیده و توسط ۱۰ نفر از افراد آشنا به محصول از لحاظ طعم، بو، بافت، قوام، طعم‌های مشکوک و نامطلوب و قابلیت پذیرش کلی به روش هدونیک مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول عالی ۷، محصول خیلی خوب ۶، محصول خوب ۵، محصول متوسط(نه خوب نه بد) ۴، محصول ضعیف ۳، محصول بد۲، محصول خیلی بد ۱، در نظر گرفته شد. این امر پس از نگهداری یخچالی حداکثر h ۲۴ پس از تولید محصول انجام گرفت.

روش ارزیابی آماری

تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شده و اختلاف معنی‌دار میان تیمارها با استفاده از نرم افزار MSTATC تحلیل شده و جداول و شکلها توسط نرم افزار Word و Excel رسم شدند.

بحث

تغییرات اسیدیته، پتانسیل اکسیداسیون و احیاء و pH در زمان تخمیر

تغییرات در pH و پتانسیل اکسیداسیون و احیا در نمونه‌های تلقیح شده با کشت مخلوط با باکتریهای سنتی ماست در شکل (۱) نشان داده شده است. کاهش pH در نمونه‌های دوغ گرمخانه‌گذاری شده در دمای °C ۴۴ سریع تر از نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دماهای ۳۷°C و ۴۰°C می‌باشد. در دمای °C ۳۷ و °C ۴۰ تفاوت معنی‌داری در سرعت و زمان تخمیر در استفاده از کشتهای آغازگر متفاوت مشاهده نشد(جدول۱). این در حالی است که در دمای گرمخانه‌گذاری °C ۴۴ تخمیر در نمونه‌هایی که با کشت آغازگر ABY۱ تلقیح شده بودند، در pH یکسان، ۳۰ تا min ۵۰ سریع‌تر از نمونه‌های تلقیح شده با کشت ABY۲ بود. دمای °C ۴۴ دمای بهینه رشد باکتری‌های سنتی ماست می‌باشد. تخمیر در این دما، باعث تحریک فعالیت آن‌ها شده، به‌گونه ای که با توجه به این‌که میزان باکتری‌های

[1] Mastersizer
[2] Brookfield

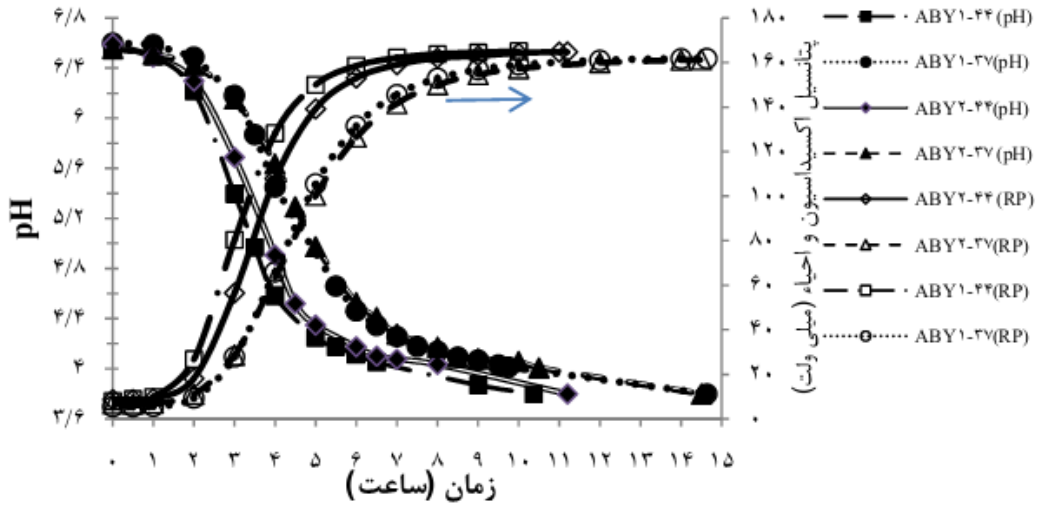
www.SID.ir

Archive of SID

سنتی ماست در هر دو کشت آغازگر تقریباً برابر بود، بدلیل بیشتر بودن نسبت باکتری‌های سنتی ماست به مجموع پروبیوتیک‌ها در کشت آغازگر ABY۱ نسبت به ABY۲ باعث گردید. در این دمای گرمخانه‌گذاری سرعت تخمیر در نمونه‌هایی که با کشت آغازگر ABY۱ تلقیح شده‌اند، علی‌رغم تقریباً ۵ برابر شدن تعداد پروبیوتیک‌ها در کشت آغازگر ABY۲، بیشتر ارزیابی شود. تعداد بیشتر باکتری‌های پروبیوتیک در کشت آغازگر ABY۲ سبب شد تا نسبت رشد باکتری‌های سنتی ماست (که باکتری‌های اصلی تخمیرکننده و تولید کننده متابولیت‌های کاهش دهنده pH می باشند) در نمونه‌ها کاهش یابد. در نمونه‌ها مشاهده شده که باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* که عامل پس اسیدسازی یا بیش‌اسیدسازی در ماست معرفی شده، در محصول دوغ نیز به همان صورت عمل کرده، بر خلاف *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[1] که در pH کمتر از ۴/۵ فعالیتش متوقف می‌شود حتی تا pH پائین‌تر از این مقدار (۳/۵-۳) می‌تواند تولید اسید را ادامه دهد (۸). در دوغ نیز این باکتری قادر به کاهش pH به کمتر از ۳/۸ می‌باشد. به‌طور کلی می توان گفت در زمان تخمیر روند کاهش اسیدیته در محصول تا pH<۳/۸ ادامه خواهد یافت و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* قادر به بیش‌اسیدسازی در محصول دوغ می‌باشد. هر چه دمای گرمخانه‌گذاری به دمای بهینه این باکتری نزدیک‌تر باشد. سرعت کاهش pH، افزایش پتانسیل اکسیداسیون و احیاء و افزایش اسیدیته به دلیل افزایش فعالیت باکتریهای سنتی ماست، افزایش یافته، موجب غالب شدن سریع‌تر این باکتری در محیط شده و می‌تواند تاثیر زیادی بر قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک بگذارد.

بررسی میزان تولید اسید استیک

تغییرات میزان اسید استیک موجود در نمونه ها توسط HPLC اندازه‌گیری شد. که در شکل (۲) نشان داده شده است. غلظت اسید استیک در نمونه‌ها قبل از تخمیر ۳/۲µg/g می باشد. همان‌گونه که در شکل مشخص شده در نمونه‌های مختلف میزان تولید اسید استیک متفاوت بود و با کاهش pH ، بتدریج افزایش یافت. استفاده از کشت آغازگر ABY۲ باعث ایجاد میزان بیشتری از این اسید در نمونه‌ها شد. در نمونه‌های تخمیر شده توسط هر کشت آغازگر، استفاده از دمای پائین‌تر، باعث افزایش میزان این اسید شده است. در نمونه‌های تخمیر شده توسط کشت ABY۲ مشاهده شد که افزایش مقدار این اسید در محدوده تغییرات pH=۴/۶-۴/۴ بیشتر از محدوده تغییرات pH<۴/۴ است. که این مورد در خصوص استفاده از کشت آغازگر ABY۱ مشاهده نشد. بیشترین میزان اسید استیک تولید شده در نمونه تخمیر شده توسط کشت آغازگر ABY۲، و دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ °C مشاهده گردید.

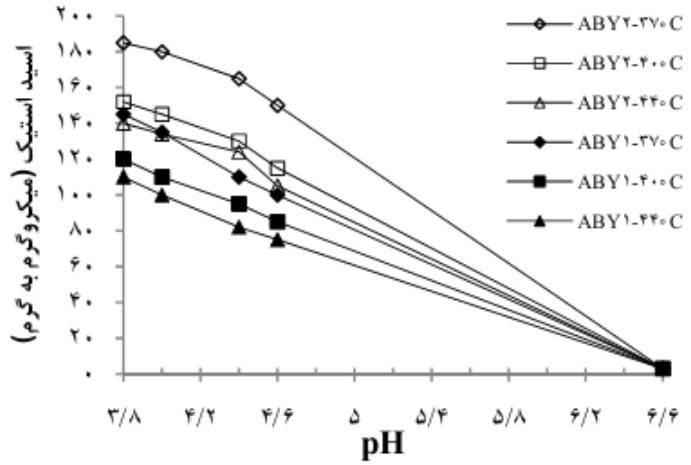


شکل (۱): تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیاء و pH در زمان تخمیر نمونه‌ها

[1] *streptococcus thermophilus*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل (۲) : میزان اسید استیک تولید شده در حین تخمیر در نمونه‌های مختلف

جدول (۱): تغییرات pH و اسیدیته قابل تیتر در مدت زمان تخمیر در تیمارهای مختلف

نوع کشت آغازگر	دمای گرمخانه گذاری	سرعت افت pH (دقیقه /واحد)				سرعت میانگین افزایش اسیدیته (دقیقه /درجه درنیک)				سرعت افزایش پتانسیل اکسیداسیون، احیاء (دقیقه /میلی ولت)			
		۳/۸	۴/۰	۴/۴	۴/۶	۳/۸	۴/۰	۴/۴	۴/۶	۳/۸	۴/۰	۴/۴	۴/۶
ABY۱	۴۴°C	۰/۰۰۴۴a	۰/۰۰۶۰a	۰/۰۰۸۰a	۰/۰۰۸۱a	۰/۰۷a	۰/۰۷۹a	۰/۱۰۸a	۰/۱a	۰/۲۵a	۰/۳۶a	۰/۴۹a	۰/۴۹۷a
	۴۰°C	۰/۰۰۳۵b	۰/۰۰۴۷b	۰/۰۰۶b	۰/۰۰۶۵b	۰/۰۵۵b	۰/۰۷b	۰/۰۸۱ab	۰/۰۸b	۰/۱۹b	۰/۲۷b	۰/۳۸ab	۰/۴b
	۳۷°C	۰/۰۰۳۲b	۰/۰۰۴۴b	۰/۰۰۵۵b	۰/۰۰۶۰b	۰/۰۵b	۰/۰۶۸b	۰/۰۷۵b	۰/۰۷c	۰/۱۷۸b	۰/۲۵b	۰/۳۴b	۰/۳۵b
ABY۲	۴۴°C	۰/۰۰۴۱۸a	۰/۰۰۵۵a	۰/۰۰۷۵a	۰/۰۰۷۶۸a	۰/۰۶۹a	۰/۰۹۱a	۰/۰۹۳a	۰/۰۸۴a	۰/۲۳a	۰/۳۲a	۰/۴۳۶a	۰/۴۳۲a
	۴۰°C	۰/۰۰۳۴b	۰/۰۰۴۲b	۰/۰۰۵۴b	۰/۰۰۶ab	۰/۰۵۷b	۰/۰۷۰b	۰/۰۷۵b	۰/۰۷۰b	۰/۲۰b	۰/۲۵b	۰/۳۶b	۰/۳۵b
	۳۷°C	۰/۰۰۳۲b	۰/۰۰۴۰b	۰/۰۰۵۳b	۰/۰۰۵۵b	۰/۰۵۵b	۰/۰۶۷b	۰/۰۷۲b	۰/۰۶۷b	۰/۱۷۷b	۰/۲۳۴b	۰/۳۲b	۰/۳۳b

معنی داری در سطح ۵٪ و اختلاف‌ها بصورت ستونی و با حروف کوچک لاتین و برای هر آغازگر جداگانه می باشد

در تحقیقات گذشته تولید اسید استیک به گونه های بیفیدوباکتریوم‌ها نسبت داده شده است و گزارش شده در این گونه‌ها میزان تولید این اسید نسبت به اسید لاکتیک ۳:۱ مول در طی تخمیر به نفع اسید استیک می باشد(۲۴, ۲۵). تغییرات اسید استیک در کلیه نمونه‌ها هم‌سو با تغییرات جمعیتی این باکتری در دوغ می‌باشد. بیشترین میزان اسید

www.SID.ir

Archive of SID

استیک در نمونه‌های با بیشترین میزان زنده‌مانی مشاهده گردید. با توجه به اینکه بیشترین تغییرات روند مرگ و میر این باکتری، در نمونه‌های تخمیر شده توسط کشت ABY۲ مشاهده گردید. این امر باعث شده تا نسبت افزایش غلظت اسید استیک در این نمونه‌ها یکنواخت نبوده و به دلیل کاهش شدید جمعیت *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در محدوده pH<۴/۴ به‌تدریج کاهش یابد.

بررسی خصوصیات فیزیکی (اندازه ذره و ویسکوزیته)

در شکل‌های (۳) و (۴) تغییرات ناشی از اندازه ذرات و ویسکوزیته نمونه‌های مختلف در طی تخمیر نشان داده شده است. در نمونه‌های مختلف اندازه ذرات و ویسکوزیته در حین تخمیر و با تغییرات pH ، تغییر می‌نمایند. در نمونه‌های تخمیر شده در دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ °C اندازه ذرات در محدوده ۰/۳-۶۰μm می‌باشند و تنها تفاوت در نمونه‌های مختلف با pHنهایی متفاوت در محدوده بالا توزیع اندازه ذرات و به میزان ۱۵-۱۰ μm می‌باشد. در نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۴ °C اندازه قطر ذرات در محدوده ۱۸۵-۰/۵ μm گسترده شده و در نمونه‌های با pH نهایی متفاوت اختلاف در محدوده بالا توزیع اندازه ذرات و به میزان ۳۵-۳۰ μm می‌باشد. با کاهشpH تا ۴ نمایه قطر میانگین افزایش می یابد و پس از کاهش pH به کمتر از آن، مجدداً قطر ذرات کاهش یافته و سپس ثابت می‌ماند. در هر نمونه در حین تخمیر بیشترین قطر ذره و ویسکوریته مربوط به pH=۴ بود و نمونه‌ها در این محدوده از pH، دارای بیشترین قطر ذرات نسبت به pHهای دیگر بودند. در اندازه‌گیری ویسکوزیته نمونه‌ها در نرخ تنش ۱-۵۵s مشاهده شد. که با تغییرات pH، میزان ویسکوزیته نیز هم‌سو با تغییرات قطر ذرات، تغییر می‌کند و رابطه مستقیمی با تغییر قطر ذرات دارند. بیشترین ویسکوزیته مربوط به نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۴ °C و pH نهایی ۴ می‌باشد.

مطالعات گذشته در خصوص تاثیر pH و عوامل حرارتی بر اندازه ذرات و ویسکوزیته نشان داد که در شیر بازساخته با کاهش pH به کمتر از ۵/۵ افزایش فاحشی در قطر ذرات کازئین ایجاد می شود (۲۶, ۲۷).

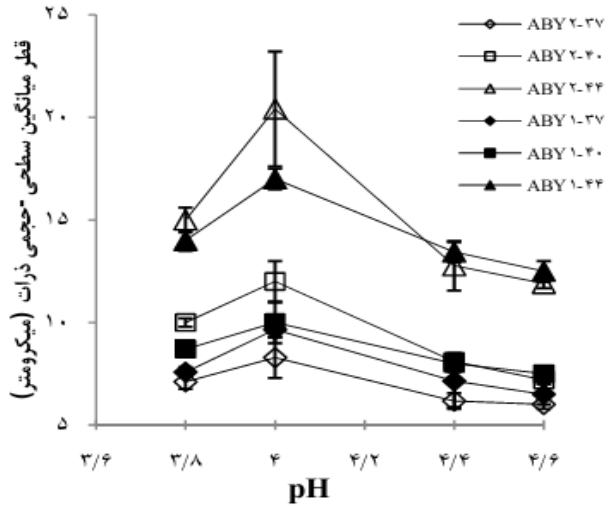
کازئین ها در شیر توسط نیروهای دافعه پایدار شده‌اند. وجود رانش الکترواستاتیک میان میسل‌های کازئین مانع هم‌جوشی آن‌ها می‌شود (۲۸). زیرا میسل‌های کازئین دارای بار خالص منفی هستند.کاهش pH شیر باعث خروج کلسیم کلوئیدی از ساختار میسل‌های کازئین و محلول شدن آن و همچنین کاهش نیروی دافعه بین میسل‌های کازئین می‌شود. بنابراین با وارد عمل شدن نیروهای آب‌گریز، میسل‌های کازئین تجمع می یابند (۲۹). در تولید دوغ، باکتری‌های اسید لاکتیک با تولید اسید، pH را به نقطه ایزوالکتریک کازئین می‌رسانند و با پیوند میسل‌های کازئین و تجمع آن‌ها به گرد یکدیگر ذرات درشت‌تری از کازئین شکل می‌گیرد(۹). در pH هم‌بار (pI) این میسل‌ها (۵-۴)، میسل-های کازئینی که به شدت از نظر ترمودینامیک ناپایدار هستند (انرژی آزاد بالا)، به وسیله جاذبه‌های واندروالس به یکدیگر می‌پیوندند و پدیده همجوشی و در نهایت انعقاد رخ می دهد(۳۰). هر چند نیروهای واندروالس جاذبه‌هایی ضعیف هستند، اما به سبب بزرگ بودن میسل‌های کازئین و تشکیل شدن این جاذبه‌ها به میزان بالا و در محدوده وسیع، نقش آن‌ها در پایداری شبکه کازئینی قابل توجه است و در نهایت در pHهای پایین‌تر از ۴/۵ نوآرایی و تجمع ذرات کازئین رخ داده که منجر به تشکیل یک شبکه پروتئینی حاوی خوشه‌ها و زنجیره‌هایی از میسل‌ها می‌شود(۹, ۳۱).

در محصول دوغ تهیه شده از شیر خشک تغییرات pH از ۴/۶ به ۴/۰ باعث افزایش در قطر ذرات شده است. کاهش pH به pH< ۴/۰ به دلیل افزایش بار ذرات کازئینی و رانش الکترواستاتیکی و همچنین افزایش حلالیت کازئینات باعث کاهش قطر ذرات شد(۳۲). این افزایش بار توانسته بر نیروهای واندروالسی و هیدروفوب ذرات کازئینی تا حدودی فائق آید و قطر ذرات کازئینی را کاهش دهد. این کاهش قطر ذرات پس از مدتی ثابت شده، حلالیت کازئینات کاهش یافته و دیگر افزایش بار ذرات کازئینی نتوانسته بر نیروی هیدروفوبی و واندروالسی ذرات کازئینی

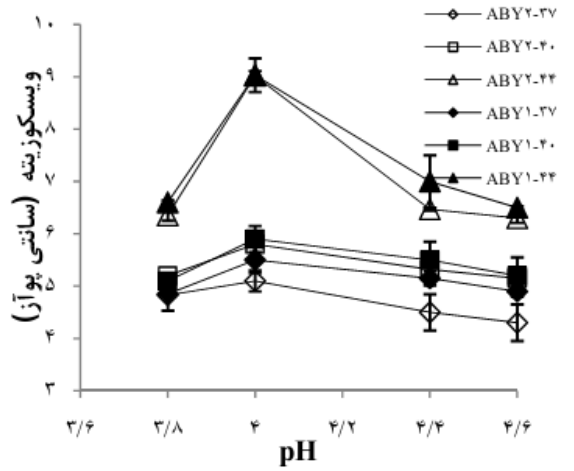
www.SID.ir

Archive of SID

فائق آید. دمای گرمخانه‌گذاری بطور مستقیم بر زمان تخمیر تاثیر دارد و هر چه دمای گرمخانه‌گذاری به دمای بهینه رشد باکتری‌های سنتی ماست نزدیک‌تر باشد سرعت تخمیر افزایش می‌یابد و کاهش pH با سرعت بیشتری رخ می‌دهد (جدول (۱)) در دو دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷°C و ۴۴°C مشاهده شد تفاوت ۲- ۱/۵ ساعتی بین زمان گرمخانه‌گذاری تا رسیدن به pH خاص وجود دارد. قطر ذرات در دمای گرمخانه‌گذاری ۴۴°C بطور معنی‌داری بیشتر از دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷°C بود. دلیل آن می‌تواند این نکته باشد که با کاهش pH و ناپایدار شدن ترمودینامیک، تمایل به اجتماع و گردهمایی در میسل‌های کازئین پدید می‌آید. حال هر چه سرعت کاهش pH بیشتر باشد (دمای گرمخانه‌گذاری ۴۴°C) ناپایداری ترمودینامیکی و تمایل به اجتماع نیز افزایش می‌یابد و تمایل بیشتر به اجتماع ممکن است به ایجاد ذراتی با قطر بیشتر منجر شود.



شکل (۳): تغییرات نمایه قطر (۲و۳) D نسبت به تغییرات pH در حین تخمیر



شکل (۴): تغییرات ویسکوزیته در نرخ برش ۵۵ s-۱ نسبت به تغییرات pH در حین تخمیر

www.SID.ir

Archive of SID

با افزایش قطر ذره، ویسکوزیته نمونه‌ها نیز افزایش یافت در برخی پژوهش‌ها رفتار جریانی دوغ را نیوتنی ذکر نموده‌اند(۱۵). در تحقیقات دیگر نوشیدنی‌های لاکتیکی و اسیدی را رقیق شونده با جریان ذکر کرده‌اند۱۶). در این مطالعه مشخص شد که اندازه قطر ذره در مقدار ویسکوزیته ظاهری (شکل(۴)) و نوع رفتار جریانی دوغ موثر است. اندازه ذره کوچک که در دمای گرمخانه گذاری°C ۳۷ حاصل شد باعث ایجاد رفتاری نیوتنی و خطی در دوغ گردید و دوغ حاوی ذرات بزرگ‌تر موجب بروز رفتار رقیق شونده با جریان در دوغ می‌گردد(داده ها آورده نشده است).

بررسی اثر منفرد نوع کشت آغازگر، دمای گرمخانه‌گذاری و pH نهایی بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

نوع کشت آغازگر بطور معنی‌داری بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در محصول تاثیر گذاشته است. با توجه به اینکه مقدار تلقیح محیط کشت و میزان باکتری‌ها سنتی تلقیح شده در هر نمونه تقریباً مساوی بود، اما نسبت مجموع پروبیوتیک‌ها در کشت ABY۲ تقریبا ۴/۸ برابر کشت آغازگر دیگر است، که موجبات ایجاد اختلاف معنی‌داری در زنده‌مانی را فراهم نموده است. حجم، نسبت تلقیح و تعداد باکتری‌های پروبیوتیک تلقیح شده یکی از فاکتورهای کلیدی در تامین یک محصول با مقدار کافی باکتری‌های زنده و فعال پروبیوتیک است (۲۵). به عنوان یک قاعده کلی، در کشت‌های پروبیوتیک حاوی باکتری‌های سنتی ماست، هر چه نسبت تلقیح پروبیوتیک‌ها در مایه کشت بیشتر باشد، جمعیت نهایی پروبیوتیک‌ها پس از پایان تخمیر بیشتر می گردد و علت آن غالب شدن پروبیوتیک‌ها بر باکتریهای لاکتیک غیر پروبیوتیک است. علاوه بر این، اثرات تقویت شده هم‌یاری‌زیستی میان پروبیوتیک‌ها در جمعیت بالاتر این ریززنده‌ها و عدم مغلوبیت آن‌ها باعث رشد سریع‌تر باکتری‌های سنتی ماست می گردد. همچنین ثابت شده است که به ویژه در کشت‌های پروبیوتیک حاوی باکتری‌های سنتی ماست افزایش درصد تلقیح بر قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در فرآورده نهایی، پس از تخمیر، به‌طور چشم گیری می‌افزاید(۳۳).

دمای گرمخانه گذاری تاثیر معنی‌داری در سطح ($p<۰/۰۵$) بر زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و مجموع باکتری‌های پروبیوتیک داشت. بیشترین و کمترین میزان زنده‌مانی به ترتیب در دمای °C ۳۷ و °C ۴۴ مشاهده شد. دماهای بالاتر از °C ۳۷ باعث تسریع در غالب شدن باکتری‌های سنتی ماست شده و موجب تسریع جایگزینی روابط هم‌زیستی با روابط پادیاری بین باکتری‌های سنتی ماست، بالاخص *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و باکتری‌های پروبیوتیک می گردد. هر چه به دماهای بهینه رشد باکتری‌های سنتی ماست نزدیک‌تر می‌شویم، بر شدت روابط آنتی‌گونیستی افزوده شده و باعث غالب آمدن باکتری‌های سنتی ماست در محیط می‌گردد (۵). غالب آمدن باکتری‌های سنتی ماست باعث افزایش سرعت تولید اسید و پراکسیدهیدروژن و باکتریوسین‌ها در محیط می‌گردد. در محصولات پروبیوتیک حاصل از کشت‌های همراه نوع ABY کاهش میزان باکتری‌های پروبیوتیک، به‌طور مثال *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، بر اثر تولید پراکسیدهیدروژن توسط *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* گزارش شده است(۲۴, ۳۴). هر چه شرایط گرمخانه‌گذاری به دمای بهینه جهت رشد باکتری‌های سنتی ماست نزدیک‌تر باشد، سرعت کاهش pH به زیر حد بهینه رشد باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* یعنی ۶-۵/۵ افزایش یافته و ضمن غالب آمدن این باکتری‌ها بر پروبیوتیک‌ها، باعث نزول pH به محدوده خارج از توان تحمل باکتری‌های پروبیوتیک بالاخص *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (pH<۵) می‌گردد(۲۵, ۳۵).

اثر معنی‌داری در سطح ($p<۰/۰۵$) در خصوص تاثیر pH بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در محصول تازه مشاهده نشد. دلیل این موضوع می‌تواند گونه نژادی این باکتری باشد. این نتیجه مطابق است با تحقیقات گذشته که

www.SID.ir

Archive of SID

توقف رشد اسیدوفیلوس‌ها را در pH، ۴ و اسیدیته بیشتر از ۰/۶٪ (۶۰ درجه درنیک) دانسته‌اند(۳۶, ۳۷). در حالی که pH نهایی در سطح ($p<0/05$) اثر معنی‌داری را بر زنده‌مانی باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* نشان داد. تحقیقات گذشته نشان داده است به دلیل حساسیت بالای این باکتری نسبت به *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس*، باعث شده تا مرگ و میر آن‌ها از pH< ۵ آغاز گردد(۲۱, ۳۵, ۳۸). کاهش pH در محدوده قابل قبول و استاندارد دوغ (pH<۴/۶) باعث مرگ و میر و کاهش زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم‌لاکتیس* گردید.

جدول(۲): مقایسه میانگین به روش دانکن (α=۰/۰۵) در اثرات متقابل سه گانه

تیمارها			مقایسه میانگین زنده مانی		
کشت آغازگر	دمای گرمخانه گذاری (°C)	pH نهایی	ل-اسیدوفیلوس	ب-لاکتیس	مجموع پروبیوتیک‌ها
۲ABY	۳۷ °C	۴/۶	B ۷/۶۳	A۸/۳	A۸/۳۹
		۴/۴	AB۷/۷۶	A۸/۱۷	A۸/۳۱
		۴/۰	A۷/۸۸	C۷/۶۴	B۸/۰۸
		۳/۸	BC۷/۱	D۷/۳	D۷/۵۱
	۴۰ °C	۴/۶	B۷/۴	B۷/۷۹	BC۷/۹۳
		۴/۴	B۷/۵	C۷/۶۰	BC۷/۸۵
		۴/۰	AB۷/۵۵	DE۷/۲۳	C۷/۷۲
		۳/۸	DE۶/۵	DE۷/۰۵	E۷/۱۵
	۴۴ °C	۴/۶	C۶/۶۹	C۷/۵۵	D۷/۴۱
		۴/۴	C۶/۷۹	D۷/۲۹	D۷/۴۲
		۴/۰	C۶/۸۴	E۶/۸۰	E۷/۱۶
		۳/۸	F۶/۱۵	F۶/۵۶	F۶/۷
۱ABY	۳۷ °C	۴/۶	C۶/۸۵	D۷/۳۵	D۷/۴۷
		۴/۴	C۶/۸۷	D۷/۲۹	D۷/۴۳
		۴/۰	D۶/۶۸	DE۷/۱۷	DE۷/۲۹
		۳/۸	F۶/۲	DE۷/۰۹	E۷/۱۴
	۴۰ °C	۴/۶	EF۶/۳۵	DE۷/۲	DE۷/۲۵
		۴/۴	E۶/۴۱	DE۷/۱	E۷/۱۸
		۴/۰	E۶/۴	DE۶/۹۵	EF۷/۰۵
		۳/۸	FG۶	E۶/۸۵	EF۶/۹
	۴۴ °C	۴/۶	F۶/۱۷	DE۷/۱۳	E۷/۱۷
		۴/۴	F۶/۱۸	DE۷/۰۷۸	E۷/۱۳
		۴/۰	F۶/۱۸	E۶/۸۸	EF۶/۹۶
		۳/۸	G۵/۷	EF۶/۷۴	EF۶/۹

معنی داری در سطح ۵٪ و اختلاف‌ها بصورت ستونی و با حروف بزرگ لاتین می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی اثر مشترک عوامل بر زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

همان‌گونه که در شکل (۵) نشان داده شده است. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به pH>۴ حساسیت کمی داشته و مرگ و میر این باکتری در این محدوده مشاهده نشد. حتی رشد این باکتری تا pH=۴/۰۵±۰/۰۵ ادامه داشت. روند رشد این باکتری تا pH=۴/۰۵ تابع دمای گرمخانه‌گذاری بود و بیشترین مقدار رشد در دمای ۳۷ °C مشاهده شد. میزان تلقیح اولیه این باکتری باعث افزایش تعداد این باکتری در محصول بود. در دمای ۴۴ °C رشد این باکتری به میزان کمی مشاهده شد و در این دما تنها تعداد باکتری‌های زنده در محصول تابع مقدار اولیه تلقیح بود.

مرگ و میر در pH<۴ مشاهده شد که در مطالعات گذشته نیز توقف و یا کاهش رشد این باکتری در این pH مشاهده شده بود (۳۷, ۳۹). در pH<۴ حساسیت این باکتری به افزایش اسیدیته تغییر کرده و کاهش جمعیت باکتری با شیب زیادی ارزیابی شد.. این تغییر حساسیت در اسیدیته ۵۰-۴۷ درجه درنیک رخ داده که میزان افزایش تعداد اولیه و دمای بهینه گرمخانه گذاری باعث ایجاد حدود بالا و پائین در این محدوده گردید. در محصول ماست حساسیت *ل- اسیدوفیلوس* دراسیدیته بیش از ٪۰/۶افزایش می یابد (۳۳)، که این تفاوت را می توان بدلیل تفاوت ایجاد شده در ظرفیت بافری در دوغ و ماست بواسطه اختلاف ماده خشک در این دو محصول دانست. پژوهش‌های دیگر نیز نشان داده‌اند که افزایش اسیدیته در ماست نقش موثری در کاهش شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* دارد (۴۰, ۴۱). چنانچه در تحقیقات گذشته مشخص شده به‌نظر می رسد که تولید پراکسیدهیدروژن در حین تخمیر توسط *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، ماده اصلی مسئول در ایجاد روابط پادزیستی *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* بر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می باشد (۴۲).

هال و همکاران[1] (۱۹۸۴) گزارشی مبنی بر کاهش شدید *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست‌های تجارتی را بواسطه افزایش تعداد *ل-بولگاریکوس* در این محصول ثبت نموده و نشان دادند حضور و تشدید عوامل افزاینده رشد *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* باعث افزایش مرگ و میر در *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می گردد(۱۳).

بیشترین زنده مانی این باکتری در نمونه تلقیح شده با کشت آغازگر ABY۲ و گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۳۷°C در نمونه‌های با pHنهایی ۴/۴ و ۴ مشاهده شد و کمترین زنده‌مانی در نمونه تخمیر شده توسط کشت آغازگر ABY۱ و دمای گرمخانه‌گذاری ۴۴°C با pH نهایی ۳/۸ مشاهده شد.

بررسی اثر مشترک تیمارها بر زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*

تغییرات در زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در جدول (۲) و شکل (۶) نشان داده شده است همان‌گونه که مشخص گردیده، بیشترین زنده‌مانی در نمونه‌هایی که از کشت ABY۲ (میزان ۶ برابر کشت ABY۱ باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در میزان ثابت تلقیح داشت) در تهیه آن‌ها استفاده شده، مشاهده شد. در مقایسه نمونه‌هایی که از کشت آغازگر یکسانی استفاده شده است. دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ °C زنده‌مانی بیشتری را نسبت به دماهای ۴۰ °C و ۴۴ °C نتیجه داده است و بیشترین زنده‌مانی این باکتری در pH=۴/۶ مشاهده شد. بیشترین زنده‌مانی متعلق به نمونه‌ای است که از کشت ABY۲ و دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ °C استفاده شده و تخمیر در pH نهایی ۴/۶ متوقف گردیده است. افزایش میزان تلقیح این باکتری در نمونه دوغ موجب گردید تا تعداد آن‌ها در محصول نهایی بیشتر باشد.

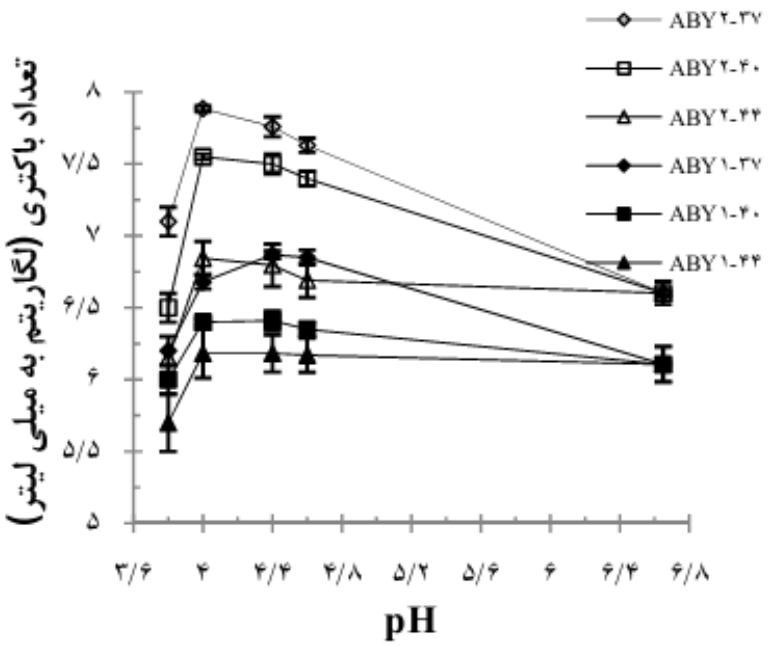
تغییرات میزان زنده‌مانی در کشت ABY۲ در محدوده pH=۴/۶-۳/۸ به میزان تقریبا ۱ لگاریتم و با شیب منفی(log(cfu)/pH)۱/۴۲- ۰/۹۲ بود. این در حالی است که در نمونه‌هایی که با کشت ABY۱ تلقیح شده بودند، دراین محدوده از pH حاصل از تخمیر محصول دوغ، شیب تغییرات زنده مانی منفی و (log(cfu)/pH)۰/۴۸- ۰/۲۳ بود.

[1] Hull

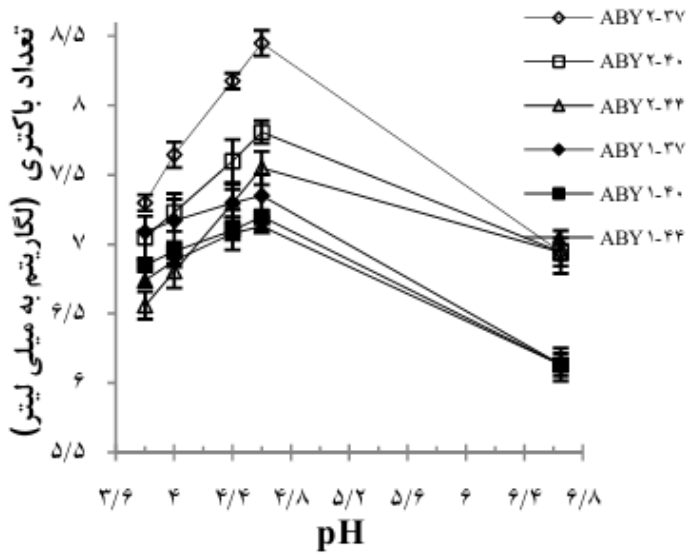
www.SID.ir

Archive of SID

گلی‌لند[1] و اسپک[2] (۱۹۷۷) تاثیر منفی تغییرات pH<۵ را بر زنده مانی بیفیدوباکتریوم‌ها گزارش کرده‌اند(۴۲).



شکل(۵): تغییرات زنده مانی *ل- اسیدوفیلوس* نسبت به تغییرات pH در حین تخمیر



شکل (۶) : تغییرات زنده مانی *ب- لاکتیس* نسبت به تغییرات pH در حین تخمیر

[1] Gilliland
[2] Speck

www.SID.ir

Archive of SID

مارتین و چوو[1] (۱۹۹۲)، pH= ۵/۵–۵/۶ را محدوده‌ای با حداقل اثر بر زنده‌مانی این باکتریها گزارش نمودند و pH<۵/۵ را آغاز مرگ و میر این باکتریها در محصولات لبنی گزارش نمودند(۴۳). با توجه به اینکه نوع باکتری در هر دو کشت استفاده شده در این پژوهش یکسان می باشد (BB۱۲) و احتمال تاثیر و حساسیت نوع واریته بکار رفته در کشتهای آغازگر منتفی است(۴۴). با توجه به اینکه در نمونه‌های تهیه شده، سرعت تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیاء، اسیدیته و pH تحت تاثیر دمای گرمخانه‌گذاری قرار دارد (جدول و شکل (۱)) علی‌رغم پیش‌بینی تاثیر این فاکتور بر روند تغییرات زنده‌مانی این باکتری، این روند تنها تحت تاثیر کشت آغازگر که اختلاف آن‌ها در میزان تلقیح اولیه باکتری‌های پروبیوتیک بود، قرار گرفت. دیو و شاه[2] (۱۹۹۷) دلیل عدم رشد کافی بیفیدوباکتریوم‌ها را در ماست پروبیوتیک تهیه شده از کشت‌های ABY را به‌سبب اسیدهای آلی و هیدروژن‌پراکسید تولید شده از *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* ندانسته، بلکه دلیل آن‌را تاثیرات آنتی‌گونیستی میان باکتری‌های کشت آغازگر دانسته‌اند. با توجه به این‌که بیفیدوباکتریوم‌ها فعالیت پروتئولیزی کمی داشته و دارای رشد ضعیفی در محیط شیر می‌باشد(۳۹). از این‌رو قادر به تولید منابع اسید آمینه مورد نیاز خود نمی‌باشند. از این جهت در استفاده از کشت‌های حاوی *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* (ABY) زنده‌مانی بیشتری در محصول نهایی و در زمان ماندگاری نسبت به استفاده از کشت‌های بدون حضور *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و تنها در حضور *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (ABT) در محصول ماست، مشاهده شده است (۲۴). در دوغ نیز با توجه به اینکه منابع انرژی و نیتروژن کمتر از ماست می باشد، استفاده و تلقیح بیشتر بیفیدوباکتریوم با استفاده از کشت آغازگر ABY۲ باعث گردید علی‌رغم اینکه زنده‌مانی در محصول نهایی افزایش یابد، اما در ادامه تخمیر به دلیل عدم تامین اسیدهای آمینه و قابلیت رقابت با جمعیت بالای باکتری‌های دیگر، باعث شد تا روند مرگ و میر این باکتری با شیب سه برابری در مقایسه با استفاده از کشت آغازگر ABY۱ رخ داده و ادامه تخمیر باعث کاهش سطح زنده‌مانی و عدم تفاوت معنی‌دار در زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در شرایط متفاوت و در pH های کمتر از ۳/۸ گردد.

بررسی خواص حسی

همان‌گونه که در جدول (۳) نشان داده شده است. آزمون حسی حاصل از نتایج ۱۰ ارزیاب، تفاوت معنی‌داری را در ظاهر نمونه‌ها از نظر رنگ و ظاهر مشخص نکرد. اما از نظر احساس دهانی نمونه‌هایی که در دمای گرمخانه‌گذاری ۴۴ °C که دارای رفتار جریانی رقیق شونده با جریان هستند، بیشترین مقبولیت را از نظر احساس دهانی داشتند. نمونه‌های۴-۳۷- ABY۲ و ۳/۸-۳۷- ABY۲ دارای کمترین مقبولیت از نظر طعم و رایحه و بیشترین بدطعمی می باشند، که در نمونه‌های ذکر شده بیشترین زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم‌ها و بیشترین میزان اسید استیک تولیدی مشخص شده است. این موضوع می تواند بدلیل تاثیرات منفی پروبیوتیک‌ها بر طعم و رایحه بدلیل تولید اسید استیک بیشتر در این نمونه‌ها و همچنین بالاتر بودن زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* که باعث تجزیه بیشتر ترکیبات ایجاد کننده طعم، شده است، باشد. بیشترین مقبولیت از نظر طعم و رایحه و عدم بدطعمی در نمونه‌های ۴-۴۴-ABY۱ و ۳/۸-۴۴- ABY۲ مشاهده شد که از نمونه‌های دارای کمترین زنده‌مانی بودند. نمونه‌های با بیشترین و کمترین پذیرش کلی به ترتیب ۴-۴۴-ABY۱ و ۴/۴-۳۷- ABY۲ ارزیابی شد که در محدوده خوب تا متوسط قرار داشتند. هر چند که افزایش رشد پروبیوتیک‌ها باعث کاهش طعم شده و ناگزیر موجب کاهش پذیرش کلی می گردد. اما این کاهش در حدود یک سطح بوده و طعم نمونه‌هایی با زنده‌مانی بالای باکتری‌های پروبیوتیک در حد متوسط به بالا ارزیابی شده و با توجه به قابلیت عملگرا و سودمند بودن این فرآورده می‌تواند مورد مصرف و بازارپسندی قرار گیرد.

[1] Martin & Chou.
[2] Dave & Shah.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول(۳): بررسی خواص حسی دوغ پروبیوتیک

نمونه	رنگ و ظاهر	احساس دهانی	طعم	رایحه	طعم نامطلوب	پذیرش کلی
ABY۱-۳۷-۴/۶	۵a	۴/۳c	۴bc	۳/۸c	۳a	۴/۱b
ABY۱-۳۷-۴/۴	۵/۴a	۴/۳c	۴/۲bc	۴c	۳ab	۴/۳ab
ABY۱-۳۷-۴	۵/۱a	۴c	۴/۱bc	۴bc	۲/۵b	۴/۲۸ab
ABY۱-۳۷-۳/۸	۴/۷a	۴/۲c	۴bc	۴/۱bc	۲/۶ab	۴/۲۴b
ABY۲-۳۷-۴/۶	۵/۴a	۴/۱bc	۴bc	۳/۲c	۳/۵a	۳/۹۷b
ABY۲-۳۷-۴/۴	۴/۵a	۴/۶c	۴bc	۳/۲c	۳/۳a	۳/۹۵b
ABY۲-۳۷-۴	۵a	۴/۳c	۳/۹۵c	۳/۵c	۳ab	۴b
ABY۲-۳۷-۳/۸	۵/۱a	۴/۵c	۳/۷c	۳/۵c	۳/۱a	۴b
ABY۱-۴۰-۴/۶	۴/۹a	۵bc	۴/۲bc	۴bc	۲bc	۴/۵۵ab
ABY۱-۴۰-۴/۴	۴/۶a	۴/۹bc	۴/۱bc	۴c	۲bc	۴/۴۵ab
ABY۱-۴۰-۴	۴/۸a	۴/۸۵bc	۴/۴b	۴/۵b	۲/۱bc	۴/۶۵ab
ABY۱-۴۰-۳/۸	۵a	۵/۱b	۴/۳b	۴/۳bc	۱/۵c	۴/۷۶ab
ABY۲-۴۰-۴/۶	۵a	۵b	۴bc	۴c	۲/۵b	۴/۴۳ab
ABY۲-۴۰-۴/۴	۵/۱a	۵/۲b	۴/۲bc	۴/۱bc	۲bc	۴/۶ab
ABY۲-۴۰-۴	۴/۹a	۵/۱b	۴/۴b	۵ab	۲bc	۴/۸۵ab
ABY۲-۴۰-۳/۸	۵a	۵/۲b	۴bc	۴/۵b	۲/۳bc	۴/۶۲ab
ABY۱-۴۴-۴/۶	۴/۷a	۶ab	۴/۷ab	۵ab	۱/۵c	۵/۱۵a
ABY۱-۴۴-۴/۴	۴/۶a	۶/۱a	۵a	۵ab	۱/۳c	۵/۲۶a
ABY۱-۴۴-۴	۵a	۶/۲۵a	۵/۱a	۵/۱a	۱/۲c	۵/۴۱a
ABY۱-۴۴-۳/۸	۴/۹a	۵/۹ab	۵/۳a	۴/۵b	۲bc	۵/۱a
ABY۲-۴۴-۴/۶	۴/۸a	۶/۲a	۴/۴b	۴/۵b	۱/۵c	۵/۱a
ABY۲-۴۴-۴/۴	۴/۵a	۶/۵a	۴/۵ab	۵a	۱/۴c	۵/۲a
ABY۲-۴۴-۴	۴/۵a	۶/۳a	۴/۳bc	۵/۳a	۲bc	۵a
ABY۲-۴۴-۳/۸	۴/۶a	۶/۳۵a	۵a	۵/۲a	۱/۸bc	۵/۲۷a

معنی داری در سطح ۵٪ و اختلاف‌ها بصورت ستونی و با حروف کوچک لاتین می باشد

نتیجه‌گیری

نتیجه این پژوهش نشان داد که نمونه‌هایی که شرایط گرمخانه‌گذاری با دمای ۳۷°C بر آن‌ها اعمال شده و تخمیر در pH نهایی ۴/۴ و ۴/۶ متوقف گردیده و از کشت آغازگر ABY۲ استفاده شده، دارای بیشترین زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک می باشند. دمای گرمخانه‌گذاری و

www.SID.ir

Archive of SID

pH نهـــایی، علـــی‌رغـــم اینکـــه زنـــده‌مـــانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در pH>۴ مستقل از فاکتور pH می‌باشد، اثر مشترکی بر زنده‌مانی مجموع باکتری‌های پروبیوتیک داشت. نه تنها متابولیت‌های تولیدی توسط باکتری‌های پروبیوتیک و تاثیر آن‌ها بر طعم و رایحه نمونه‌ها، بلکه عوامل فرایند مورد بررسی، مانند دمای گرمخانه‌گذاری نیز با تاثیر بر رفتار جریانی و ویسکوزیته ظاهری نمونه‌ها (تاثیر بر احساس دهانی)، مزید بر علت گردید تا ارزیاب‌ها نمونه‌های با بیشترین زنده‌مانی کلی پروبیوتیک‌ها را از لحاظ خصوصیات حسی، ضعیف‌تر ارزیابی نمایند. ناگزیر شرایط بهینه تولید دوغ پروبیوتیک با تاثیر منفی بر خصوصیات رئولوژیکی و حسی دوغ موجبات ارزیابی ضعیف‌تری از محصول را فراهم می آورند، اما تفاوت این نمونه‌ها با نمونه‌هایی که بیشترین پذیرش کلی را داشتند، تنها یک سطح بود و خصوصیات حسی نمونه‌های با زنده‌مانی بالای باکتری‌های پروبیوتیک متوسط تا بیشتر از حد متوسط ارزیابی شدند.

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از آزمایشگاه مهندسی فرایندهای بیوتکنولوژی گروه علوم ومهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران و شرکت زمزم ایران که هزینه و امکانات انجام این پژوهش را تامین نمودند.

منابع

1.Roberfroid MB. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. Nutrition Reviews. 1996;54(11):S38.
2.Sanders ME. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. International Dairy Journal. 1998;8(5):341-7.
3.Tharmaraj N, Shah NP. Survival of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* and *Propionibacterium* in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. International dairy journal. 2004;14(12):1055-66.
4.Kitazawa H, Ueha S, Itoh S, Watanabe H, Konno K, Kawai Y, et al. AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*. International journal of food microbiology. 2001;65(3):149-62.
5.Varnam A, Sutherland JP. Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology: Springer Science & Business Media; 2001.
6.Dinakar P, Mistry V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. Journal of dairy science. 1994;77(10):2854-64.
7.Hekmat S, McMAHON DJ. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. Journal of dairy science. 1992;75(6):1415-22.
8.Kneifel W, Jaros D, Erhard F. Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. International Journal of Food Microbiology. 1993;18(3):179-89.
9.Tamime AY, Robinson RK. Yoghurt: science and technology: Woodhead Publishing; 1999.
10. Klaver FA, Kingma F, Weerkamp AH. Growth and survival of bifidobacteria in milk. Nederlands melk en Zuiveltijdschrift. 1993;47(3-4):151-64.
11. Ishibashi N, Shimamura S. Bifidobacteria: research and development in Japan. Food Technology. 1993; 47: 126–135.
12. Kailasapathy K, Rybka S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp*.-their therapeutic potential and survival in yogurt. Australian Journal of Dairy Technology. 1997;52(1):28.
13. Hull R, Roberts A, Mayes J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. Australian Journal of Dairy Technology. 1984;39(4):164-6.
14. Akin N, Rice P. Main yogurt and related products in Turkey. Cultured dairy products journal (USA). 1994; 29:23-29.
15. Kiani H, Mousavi SMA, Emam-Djomeh Z. Rheological properties of Iranian yoghurt drink, Doogh. International Journal of Dairy Science. 2008;3(2):71-8.
16. Köksoy A, Kiliç M. Effects of water and salt level on rheological properties of ayran, a Turkish yoghurt drink. International Dairy Journal. 2003;13(10):835-9.
17. Janhøj T, Frøst MB, Ipsen R. Sensory and rheological characterization of acidified milk drinks. Food Hydrocolloids. 2008;22(5):798-806.
18. Penna ALB, Sivieri K, Oliveira M. Relation between quality and rheological properties of lactic beverages. Journal of Food Engineering. 2001;49(1):7-13.
19. Sandine WE. Roles of Lactobacillus in the intestinal tract. Journal of Food Protection®. 1979;42(3):259-62.
20. Mortazavian A, Ehsani M, Sohrabvandi S, Reinheimer J. MRS-bile agar: its suitability for the

www.SID.ir

Archive of SID

milk products. Journal of Food Protection®. 1995;58(1):70-5.
34. Shah NP, Lankaputhra WE, Britz ML, Kyle WS. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. International Dairy Journal. 1995;5(5):515-21.
35. Gomes AM, Malcata FX. *Bifidobacterium spp*. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science & Technology. 1999;10(4):139-57.
36. Shah N. Bifidobacteria: Characteristics and potential for application in fermented milk products. Milchwissenschaft. 1997; 52(1):16-20..
37. Shah N. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of dairy science. 2000;83(4):894-907.
38. Sgorbati B, Biavati B, Palenzona D. The genus Bifidobacterium. The genera of lactic acid bacteria: Springer; 1995. p. 279-306.
39. Hughes DB, Hoover DG. Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. Journal of Dairy Science. 1995;78(2):268-76.
40. Lj RJ, Kurmann J. Bifidobacteria and their role. Birkhauser Verlag Basel, Basel, Switzerland; 1983.
41. Bolin Z, Libudzisz Z, Moneta J. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in fermented milk products during refrigerated storage. Polish journal of food and nutrition sciences. 1998;7(3):465-72.
42. Shah N, Jelen P. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. Journal of Food Science. 1990;55(2):506-9.
43. Gilliland S, Speck M. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. Journal of Dairy Science. 1977;60(9):1394-8.
44. Martin J, Chou K. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: I-tolerance to pH of yogurt. Cultured dairy products journal (USA). 1992; 27: 21-25.
45. Lankaputhra W, Shah N. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp* in the presence of acid and bile salts. Cultured dairy products journal (USA). 1995; . 30:2-7.
enumeration of mixed probiotic cultures in cultured dairy products. Milchwissenschaft. 2007;62(3):270-2.
21. Vinderola C, Reinheimer J. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, *bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. International Dairy Journal. 2000;10(4):271-5.
22. Akalin AS, Fenderya S, Akbulut N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. International journal of food science & technology. 2004;39(6):613-21.
23. Bourne M. Food texture and viscosity: concept and measurement: Academic press; 2002.
24. 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.
25. Lourens-Hattingh A, Viljoen B. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. Food Research International. 2001;34(9):791-6.
26. Anema SG, Lowe EK, Li Y. Effect of pH on the viscosity of heated reconstituted skim milk. International Dairy Journal. 2004;14(6):541-8.
27. Anema SG, Lowe EK, Lee SK. Effect of pH at heating on the acid-induced aggegation of casein micelles in reconstituted skim milk. LWT-Food Science and Technology. 2004;37(7):779-87.
28. Fox P. The major constituents of milk: Woodhead Publishing Limited, Cambridge; 2003.
29. Van Hooydonk A. pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 1. Effect of acidification on physico-chemical properties. Netherlands Milk and Dairy Journal. 1986;40:281-96.
30. Chakraborty A, Basak S. pH-induced structural transitions of caseins. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2007;87(3):191-9.
31. Walstra P. Dairy technology: principles of milk properties and processes: CRC Press; 1999.
32. Bingham EW. Influence of temperature and pH on the solubility of α s1-, β-and K-casein. Journal of Dairy Science. 1971;54(7):1077-80.
33. Medina L, Jordano R. Population dynamics of constitutive microbiota in BAT type fermented

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of type of starter culture, incubation temperature and final pH on the quality and rheological properties of probiotic acidic dairy drink (Probiotic Doogh)

Ali Dini [1], Seyed Mohammad Ali Ebrahimzade Mousavi[2], Naser Sedaghat[3], Seyed Hadi Razavi[4], Ehsan Amini[5]

1.Pistachio Safty research center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran (Correspond author)[*].
2.Department of Food science, engineering and Technology, Faculty of Biosystem Engineering, Agicultural Campus, University of Tehran, Karaj, Iran.
3.Department of Food science, engineering and Technology, Faculty of Agicultural, University of Ferdowsi, Mashhad, Iran.
4.Department of Food science, engineering and Technology, Faculty of Biosystem Engineering, Agicultural Campus, University of Tehran, Karaj, Iran.
5.Department of Food science, engineering and Technology, Faculty of Agicultural, University of Ferdowsi, Mashhad, Iran.

Abstract

In this study, the effect of starter culture, incubation temperature and final pH on the viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*, sensory characteristic and rheological properties of doogh were studied Samples were fermented at temperatures (37, 40 and 44˚C) till the pH value dropped to 46, 44 40 or 38 by two starters culture (ABY1 and ABY2) Statistical evaluation showed that the relationship between the variables listed and viability Probiotics were significant effect Compound treatment of ABY2 starter culture, incubation temperature of 37◦c and 46 and 44 for final pH resulted in highest viability of both probiotic bacterias final pH and incubation temperature exhibit a significant effect on flow behavior and particle size distribution, By reducing of pH from 46 to 4, increased the diameter of particles and then diameter of particles decreased with dropping of the pH to 38 Incubation temperature of 44°c to 40°c and 37°c increase the diameter of particles range and viscosity it changed mouthfeel as the Best flavor, mouthfeel and overall acceptability were observed at samples that were fermented at 44°c and Samples with the highest viability of Probiotic bacteria have lowest overall acceptance and the sensory properties of them was evaluated intermediate

Keywords:*Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, probiotic doogh, quality properties, viability.

[*] a.dini@rums.ac.ir

www.SID.ir