بررسی اثرات درصد(۰/۵ یا ۱٪)، ترکیب (NaCl یا NaCl/KCl) و زمان افزودن نمک بر ویژگی های بیو شیمیایی، میکرو بیولوژیک و حسی دوغ پروبیوتیک

سیده معصومه عرب[۱]، سید امیرمحمد مرتضویان *[۲]، ابراهیم آزاد نیا[۳]، رزیتا کمیلی[۴]، تارا علیمیری[۵]، مریم نجفی[۵]

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
۲-دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
۳- کارشناس ارشد شیمی تجزیه، کارشناس آزمایشگاه، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
٤- لیسانس تغذیه، کارشناس آزمایشگاه، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
۵- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹٤/۲/۲۳)

Archive of SID

چکیده

در این پژوهش درصد نمک (۰/۵ یا ۱٪) و ترتیب افزودن آن (قبل یا بعد از تخمیر)، در دو نسبت متفاوت نمک مخلوط NaCl/KCl (۱۰۰:۰ و ۵۰:۵۰)، به عنوان متغیر های پژوهش در دوغ پروبیوتیک به کار گرفته شد. پروبیوتیک ها شامل *ل. اسیدوفیلوس* LA-5، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* BB-12 و باکتری های سنتی ماست در کشت مخلوط ABY به نمونه ها تلقیح شدند. pH، اسیدیته و پتانسیل احیا نمونه ها طی مدت زمان تخمیر اندازه گیری شد. همچنین قابلیت زیستی در بازه های زمانی هفت روزه طی دوره نگهداری یخچالی بررسی شد. ارزیابی حسی نمونه ها در روز های ۰ و ۲۱ انجام گرفت. جایگزینی نسبی نمک KCl با NaCl در غلظت های مورد آزمون بر قابلیت زیستی پروبیوتیک ها اثر مثبت داشت. بیشترین قابلیت زیستی در تیمار حاوی ۱ درصد نمک NaCl/KCl و سپس در تیمار حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl/KCl قبل از تخمیر مشاهده شد. نمونه های حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl قبل از تخمیر بیشترین پذیرش و نمونه های حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl/KCl در رتبه ی دوم پذیرش قرار گرفتند ($p < 0.05$). بنابر این، جایگزینی نسبی نمک KCl با NaCl، در غلظت ۰/۵ درصد نمک از لحاظ حسی قابل قبول بود. در کل، تیمار حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl/KCl قبل از تخمیر، بهترین تیمار برای تولید دوغ پروبیوتیک با نمک جایگزین تشخیص داده شد.

کلید واژگان: دوغ، شیر های تخمیری، نمک، پروبیوتیک، قابلیت زیستی

www.SID.ir

۱- مقدمه

امروزه تولید فرآورده های لبنی حاوی ریز زنده های پروبیوتیک به یک مسئله مهم همراه با سود تجاری چشمگیری تبدیل شده و فرآورده هایی از این دست در نقاط مختلف جهان موجود است [۳-۱]. در حال حاضر دو جنس پر استفاده از پروبیوتیک ها در صنعت لبنیات *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* است. از میان سویه های *بیفیدوباکتریوم*، جنس *ب.لاکتیس* به دلیل مقاومت خوبی که به شرایط محیطی موجود در شیر های تخمیری شامل: اسیدیته و pH پایین و اکسیژن مولکولی موجود در فرآورده دارد، بیشتر استفاده می شود [٦-٤]. مهم ترین فاکتور کیفی برای ریز زنده های پروبیوتیک این است که آن ها باید تا لحظه مصرف در محصول نهایی زنده بمانند. اگر چه توافق کلی برای تعداد ریز زنده های پروبیوتیک در گرم یا میلی لیتر فرآورده پروبیوتیک در لحظه مصرف وجود ندارد، اما معمولا میزان 10^6 و 10^8-10^7 cfu/ml یا cfu/gr به ترتیب به عنوان حد کمینه و رضایت بخش در نظر گرفته می شود. در ژاپن " شیر های تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس" باید شامل 10^7 cfu/ml یا cfu/gr سلول زنده پروبیوتیک باشند تا در دسته بندی فرآورده های لبنی پروبیوتیک قرار گیرند [۷،۸]. همچنین گفته شده است که برای آن که 10^9 سلول زنده پروبیوتیک به روده وارد شود، باید به طور منظم ۱۰۰ گرم در روز محصول پروبیوتیک مصرف شود [۹]. باکتری های پروبیوتیک به طور معمول قابلیت زنده مانی خود را در طول تولید و دوره ی نگهداری، مخصوصا در شیر های تخمیری، از دست می دهند [۱, ٤, ٥, ۸, ١٤-١٠]. دراستاندارد ملی ایران کمینه ی سلول زنده پروبیوتیک 10^5 cfu/gr سلول در دوغ در نظر گرفته شده است [۱۵]. دوغ یک نوع نوشیدنی ایرانی است که به کشور های دیگر نیز صادر می شود (حدود ۱۵۰۰۰۰ تن در سال) و در کشور های دیگر مانند افغانستان، آذربایجان، ارمنستان، عراق، سوریه، ترکیه، بالکان و به مقدار کمتر در کشور های دیگر خاورمیانه و آسیای مرکزی مصرف می شود [١٦]. دوغ از ماده ی خشک بدون چربی شیر (بیشتر از ۲/۳٪ و معمولا ٤ تا ٦٪ وزنی/وزنی)، چربی شیر (که نباید بیشتر از ۵۰٪ ماده ی خشک بدون چربی شیر باشد)، نمک (حداکثر ۱٪) و ترکیبات طعم دهنده (مانند نعناع و اسانس خیار) با PH کمتر از ٤/٥ تشکیل شده است. دی اکسید کربن می تواند به طور طبیعی (به وسیله ی کشت های آغازگر) یا به طور مصنوعی به محصول اضافه شود [۱۵]. نمک معمول که در دوغ استفاده می شود کلرید سدیم است. ثابت شده است که مصرف زیاد یون سدیم می تواند مضر باشد. مطالعات متعددی دلالت بر آن دارد که افزایش دریافت پتاسیم از طریق رژیم غذایی می تواند باعث ایجاد اثرات حفاظت کننده بر انسان، با جلوگیری از ایجاد فشار خون، کاهش دفع کلسیم از طریق ادرار وجلوگیری از بروز پوکی استخوان، که ناشی از مصرف زیاد سدیم است، شود [۱۷، ۱۸]. محصولات لبنی کم سدیم محصولاتی هستند که در آنها کلرید سدیم به طور نسبی (معمولا بیشتر از ۲۵٪) با نمک دیگری جایگزین شده باشد. نمک کلرید پتاسیم یا مخلوطی از کلرید سدیم و پتاسیم معمول ترین نمک هایی هستند که به طرز موفقیت آمیزی به عنوان جایگزین نسبی در محصولات مختلف مانند پنیر فتا به کار برده شده اند [۲۲-۱۹]. افزودن نمک به دوغ می تواند قبل و یا بعد از تخمیر صورت گیرد. اثرات مشترک زمان افزودن (قبل و یا بعد از تخمیر)، ترکیب (NaCl یا NaCl/KCl) و درصد نمک (۰/۵٪ یا ۱٪) بر ویژگی های بیوشیمیایی، میکرو بیولوژیک و حسی دوغ پروبیوتیک تا به حال گزارش نشده است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- روش تولید نمونه ها

شیر دوغ سازی از راه بازسازی پودر شیر بی چربی (ماده ی خشک ۵٪) ساخته شد و در ادامه مراحل تولید به دو صورت انجام گرفت: در حالت اول بعد از استاندارد کردن ماده ی خشک، آب و نمک استریل (۰/۵٪ کلرید سدیم، ۰/۵٪ کلرید های سدیم و پتاسیم به نسبت مساوی، ۱٪ کلرید سدیم یا ۱٪ کلرید های سدیم و پتاسیم به نسبت مساوی) به شیر دوغ سازی افزوده شده و سپس به مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای ۸۵°C تحت تیمار حرارتی قرار گرفت. پس از سرد کردن شیر تا ٤۲°C (دمای تخمیر)، کشت آغازگر ABY1، که حاوی باکتری های سنتی ماست، *ل. اسیدوفیلوس* LA-5 و *ب. لاکتیس* BB-12 بود، به آن اضافه شده و تا رسیدن به pH ٤/۲ در دمای ٤۲°C گرمخانه گذاری شد. پس از آن نمونه طی دو مرحله (۱۵°C- ۵°C) مورد سرد شدن قرار گرفت. در حالت دوم آب و نمک سرد استریل بعد از مرحله سرد کردن

www.SID.ir

به نمونه ها اضافه شد. همچنین یک نمونه شاهد بدون نمک نیز تهیه شد. شاخص های آزمایشی (pH، اسیدیته، پتانسیل احیا) هر نیم ساعت در حین تخمیر و بلافاصله پس از آن مورد اندازه گیری قرار گرفتند. در پایان تخمیر، برای تعیین قابلیت زیستی پروبیوتیک ها، از نمونه ها کشت میکروبی تهیه شده و در نهایت ارزیابی حسی انجام شد. نمونه ها به مدت ۲۱ روز در دمای ٤ °C نگهداری شده و قابلیت زیستی پروبیوتیک ها هر ۷ روز بررسی شد.

۲-۲- شمارش سلول های پروبیوتیک؛

سلول های زنده باکتری های *ل. اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* با استفاده از محیط کشت MRS- آگار، مطابق با روش Subtractive enumeration method (SEM) به صورت انتخابی شمارش شدند [۱۲]. شرایط بی هوازی با به کارگیری جار بی هوازی و گازپک ایجاد شد. گرمخانه گذاری در ۳۷°C به مدت ۷۲ ساعت انجام شد.

۲-۳- اندازه گیری pH و پتانسیل احیا در نمونه ها؛

pH و پتانسیل احیای نمونه های دوغ طی تخمیر با استفاده از pH سنج و الکترود پلاتین متصل به آن اندازه گیری شد. روند افت pH و افزایش پتانسیل احیا هر نیم ساعت یکبار طی تخمیر اندازه گیری و منحنی های مربوطه ترسیم شد. شاخص های سرعت افت pH و سرعت افزایش پتانسیل احیا طی تخمیر با استفاده از روابط زیر مورد محاسبه قرار گرفتند:

- سرعت افت pH = مقدار کاهش واحد pH تا دو رقم اعشار/ مدت زمان کاهش pH به دقیقه (واحد pH /دقیقه)
- سرعت افزایش پتانسل احیا= مقدار افزایش پتانسیل احیا تا یک رقم اعشار/ مدت زمان افزایش پتانسیل احیا به دقیقه (میلی ولت/ دقیقه)

۲-٤- اندازه گیری اسیدیته قابل تیتر در نمونه ها؛

اسیدیته قابل تیتر نمونه های دوغ هر نیم ساعت یک بار طی تخمیر اندازه گیری شد. روش محاسبه آن تیتر کردن مولکول های اسید آلی در نمونه با سود ۰/۱ نرمال و استفاده از روابط زیر بود:

- درصد اسیدیته قابل تیتر (بر حسب اسید لاکتیک)= مقدار سود مصرفی به میلی لیتر × نرمالیته سود × میلی اکی والان گرم اسید لاکتیک/ مقدار نمونه به گرم

مقدار اسیدیته قابل تیتر بر حسب اسید لاکتیک و به درجه دورنیک به صورت زیر گزارش شد:

- مقدار اسیدیته قابل تیتر به درجه دورنیک = درصد اسیدیته قابل تیتر × ۱۰۰

شاخص سرعت افزایش اسیدیته طی تخمیر از رابطه زیر محاسبه شد:

- سرعت افزایش اسیدیته قابل تیتر= مقدار افزایش اسیدیته به درجه دورنیک تا یک رقم اعشار/ مدت زمان افزایش اسیدیته قابل تیتر (درجه دورنیک/ دقیقه)

۲-۵- ویژگی های حسی؛

ارزیابی حسی نمونه ها بر مبنای چهار ویژگی طعم، شوری، احساس دهانی و پذیرش کلی انجام شد. ۹ نفر ارزیاب از بین دانشجویان دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انتخاب شدند. ارزیابی به صورت هدونیک در روز های ۰ و ۲۱ بین چهار نمونه با ترکیب نمک مختلف انجام شد. نمره ۰ به بدترین کیفیت و نمره ٤ به بهترین کیفیت در بین نمونه ها داده شد. گفتنی است که به نمونه ها کد سه رقمی به صورت تصادفی داده شده و از ارزیاب ها خواسته شد که بین دو ارزیابی آب مصرف نمایند.

۲-٦- ارزیابی آماری؛

تمامی نمونه ها در سه تکرار تولید شده و مورد آزمون قرار گرفتند. طرح آزمایشات به صورت فاکتوریل کامل بوده و یافتن تفاوت معنی دار میان میانگین داده های تیمار های اعمال شده با استفاده از آزمون ANOVA دو طرفه از نرم افزار Minitab در سطح معناداری ۰/۰۵ صورت گرفت.

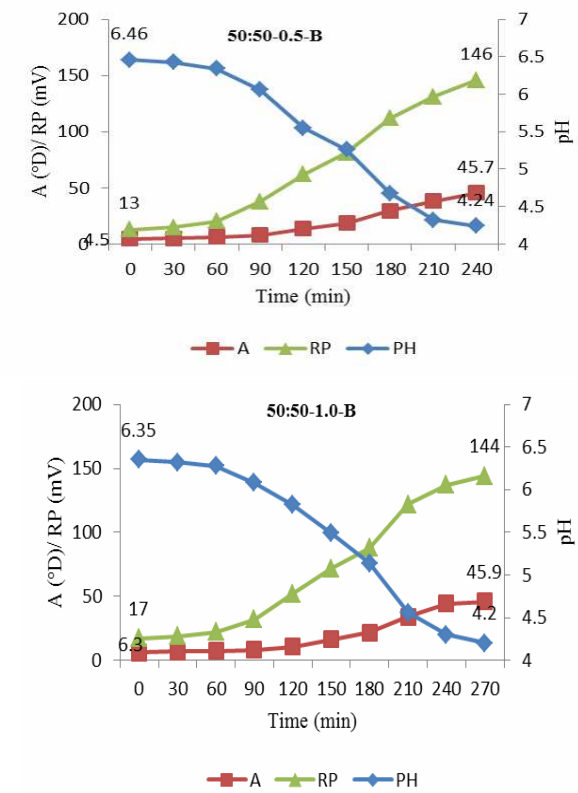
۳- نتایج

۳-۱- شاخص های بیوشیمیایی

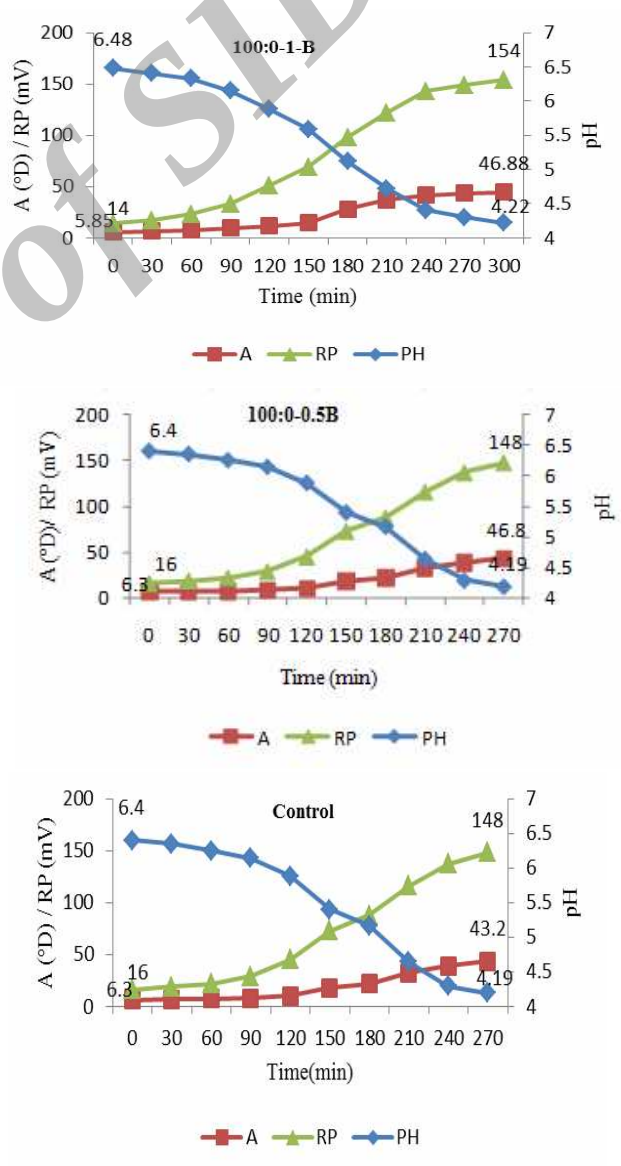
شکل ۱ نشان دهنده روندهای کاهش pH، افزایش اسیدیته و پتانسیل احیا طی تخمیر است. در بررسی اثر درصد نمک مشاهده شد که تیمار های دارای ۱ ٪ نمک NaCl و ۰/۵٪ نمک ترکیبی NaCl/KCl در مقایسه با تیمار شاهد در زمان کوتاه تری به بازه زمانی مربوط به بیشترین افت در pH و افزایش اسیدیته (t_{max}) رسیده اند. همچنین با مقایسه زمان لازم

Archive of SID
www.SID.ir

برای رسیدن بـه t_{max} در تیمـار هـای حـاوی ۰/۵ و ۱ درصـد مشاهده می شود که تیمار های حاوی نمک ۰/۵ درصد سـریع تر به t_{max} رسیده اند. نمونـه هـای حـاوی ۰/۵ درصـد نمـک دارای دو بازه ی زمانی t_{max} می باشند، در حالی کـه در تیمـار های حاوی ۱ درصد نمک تنها یک بار بازه ی ذکر شده وجود دارد. در بررسی اثر نوع نمک مشاهده شد که جایگزینی بخشی از NaCl با KCl در تیمارهای با ۰/۵ درصد نمـک، رشـد را همچنان بیشتر تحریک می کند اما زمـانی کـه درصـد نمـک ۱ درصد می شود، تحریک رشد نسبت به ۰/۵ درصد کمتر است. زیرا t_{max} در زمان دیرتری از تخمیر مشاهده می شود.



شکل ۱ تغییرات pH، اسیدیته و پتانسیل احیا در نمونه ها طی تخمیر. 100:0-0.5-B و 100:0-1-B به ترتیب نشانگر نمونه های حاوی ۰/۵ و ۱٪ نمک NaCl و 50:50-0.5-B و 50:50-1-B به ترتیب نشانگر نمونه های حاوی ۰/۵ و ۱٪ نمک NaCl/KCl قبل از تخمیر و Control نشان گر تیمار های بدون نمک است



جـدول ۱ نـشانگر میـانگین سـرعت‌هـای افـت pH، افـزایش اسیدیته، اسیدیته قابل تیتر نهایی، مـدت زمـان تخمیـر و زمـان اوج در تیمارهای مختلـف طـی تخمیـر و در پایـان آن اسـت. همان گونه که در این جدول مشاهده می شود، در نمونه هـای حاوی نمک نسبت به نمونه ی کنترل، میانگین سرعت کـاهش pH بیشتر بوده اسـت. همچنـین مـشاهده مـی شـود میـانگین سرعت کاهش pH و افزایش اسیدیته قابل تیتر در نمونـه‌هـای حاوی ۰/۵ درصد NaCl/KCl از سایر تیمار ها بیـشتر بـوده است. زمان تخمیر در نمونه هـای حـاوی ۰/۵ درصـد نمـک NaCl و ۱ درصـد نمـک NaCl/KCl بـا نمونـه ی کنتـرل یکسان بوده است. گروه های حاوی ۰/۵ درصد نمک

Archive of SID

www.SID.ir

NaCl/KCl به طور معنی‌داری سریع تر از نمونه های دیگر تخمیر شده‌اند.

۳-۲- قابلیت زیستی پروبیوتیک ها

جدول ۲ قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها و ضریب رشد (VPI[1]) آن ها در تیمارها بلافاصله پس از تخمیر را نشان می‌دهد. طبق این جدول قابلیت زیستی هر دو باکتری پروبیوتیک در نمونه های حاوی نمک قبل از تخمیر، بالاتر از سایر تیمار ها بود. نمونه های حاوی ۱درصد نمک NaCl/KCl قبل از تخمیر بیشترین قابلیت زیستی و بیشترین ضریب رشد (۵/۸۰) را داشتند.

جدول ۳ قابلیت زیستی پروبیوتیک ها در تیمار ها طی دوره نگهداری یخچالی نشان می دهد. مشاهده می شود که کاهش پروبیوتیک ها در نمونه های حاوی نمک بعد از تخمیر بیشتر از سایر تیمار ها است.

۳-۳- ویژگی های حسی

نمونه های حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl بیشترین پذیرش طعم را در پایان تخمیر و بیشترین پذیرش در روز ۲۱ داشتند. بعد از آن تیمار های حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl/KCl قرار گرفتند. از لحاظ شوری، نمونه های حاوی ۱٪ نمک کمترین امتیاز را کسب کردند. از لحاظ ویژگی احساس دهانی تفاوت معنی داری بین نمونه ها مشاهده نشد. در مجموع نمونه های حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl از لحاظ پذیرش کلی بالاتر بودند. نمونه های حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl/KCl بعد از تیمار ذکر شده در رتبه دوم قرار گرفتند.

٤- بحث

نتیجه گرفته می شود که افزودن نمک در دوغ تا ۱درصد، نسبت به نمونه شاهد، فعالیت آغازگر های معمولی و پروبیوتیک را تحریک می کند. همچنین با مقایسه زمان لازم برای رسیدن به t_{max} در تیمار های حاوی ۰/۵ و ۱ درصد نمک مشاهده می شود که غلظت ۰/۵ درصد نمک اثر تحریک کنندگی رشد بیشتری را بر آغازگر ها داشته است. نمونه های حاوی ۰/۵ درصد نمک دارای دو بازه ی زمانی t_{max} می باشند، در حالی که در تیمار های حاوی ۱ درصد نمک تنها یک بار بازه ی ذکر شده وجود دارد. در توجیه این پدیده می توان گفت که در تیمارهای حاوی ۰/۵ درصد نمک ابتدا باکتری های آغازگر معمولی با سرعت زیاد رشد می کنند تا به فاز لگاریتمی رشد برسند (t_{max} اول). سپس از رشد آن ها کاسته می شود. در ادامه باکتری های پروبیوتیک، که سرعت رشد پایین تری دارند، به رشد خود ادامه می دهند و در pH های حدود ٤/۷-۵/۲ حداکثر رشد دیگری را در کاهش pH و افزایش اسیدیته به وجود می آورند (t_{max} دوم). در حالی که در تیمار های حاوی ۱ درصد نمک، به دلیل رشد آرام و مستمر آغازگر ها و عدم وجود رشد جهشی، افت pH و افزایش اسیدیته به صورت دوره ای نیست. با بررسی نتایج حاصل از نوع نمک می توان گفت که نمک جایگزین، بیشتر از ۰/۵٪، ظاهرا بر رشد باکتری ها اثرات بازدارندگی به جا می گذارد. با توجه به نتایج حاصل از قابلیت زیستی پروبیوتیک ها فهمیده می شود که اثر بازدارندگی مربوط به باکتری های سنتی ماست است و نمک جایگزین در غلظت ۱٪ باعث افزایش رشد پروبیوتیک ها شده است.

شکل ۱ آشکار می سازد که تیمار های حاوی ۱درصد نمک NaCl به رغم آن که با تیمار های حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl/KCl زمان اوج یکسانی دارند، اما مدت زمان تخمیر در تیمار نخست طولانی تر است.

این مشاهده را می توان چنین توجیه کرد که افزایش ناگهانی و بیش تر اسیدیته در نقطه اوج تیمار حاوی ۱درصد نمک NaCl نسبت به تیمار حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl/KCl، احتمالا با شوک نسبی اسیدیته در آغازگرها در تیمار اول همراه است.

1. Viability proportion index

www.SID.ir

جدول ۱- میانگین سرعت افت pH و افزایش اسیدیته قابل تیتر، اسیدیته قابل تیتر نهایی، مدت زمان تخمیر و زمان اوج در نمونه ها طی تخمیر و پایان آن*

تیمارها**	شاخص ها				
	میانگین سرعت افت pH (دقیقه / pH)	میانگین افزایش سرعت اسیدیته قابل تیتر (دقیقه / درجه دورنیک)	اسیدیته قابل تیتر نهایی (درجه درنیک)	مدت زمان تخمیر (دقیقه)	زمان اوج (دقیقه)
Control	۰/۰۰۷^{c}	۰/۱۵^{b}	٤٥/٥^{a}	۲۷۰^{b}	۱۸۰-۲۱۰
100:0-0.5-B	۰/۰۰۸^{b}	۰/۱۵^{b}	٤٥/٦^{a}	۲۷۰^{b}	۱۸۰-۲۱۰
100:0-1.0-B	۰/۰۰۸^{b}	۰/۱٤^{c}	٤٥/۷^{a}	۲۹٥^{a}	۱٥۰-۱۸۰
50:50-0.5-B	۰/۰۰۹^{a}	۰/۱۷^{a}	٤٥/٥^{a}	۲٤۰^{c}	۱٥۰-۱۸۰
50:50-1.0-B	۰/۰۰۸^{b}	۰/۱٥^{b}	٤٥/۷^{a}	۲۷۰^{b}	۱۸۰-۲۱۰
100:0-0.5-A	–	–	٤٥/٦^{a}	–	–
100:0-1.0-A	–	–	٤٥/٥^{a}	–	–
50:50-0.5-A	–	–	٤٥/٥^{a}	–	–
50:50-1.0-A	–	–	٤٥/٦^{a}	–	–

* میانگین هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده اند، به طور معنادار با یکدیگر متفاوت اند ($P < 0.05$).

**Control =دوغ بدون نمک،100:0-0.5-B=۰/۵٪ نمک سدیم قبل از تخمیر،100:0-1.0-B=۱٪نمک سدیم قبل از تخمیر،50:50-0.5-B=۰/۵٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) قبل از تخمیر، 50:50-1.0-B=۱٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) قبل از تخمیر،100:0-0.5-A =۰/۵٪ نمک سدیم بعد از تخمیر،100:0-1.0-A=۱٪نمک سدیم بعد از تخمیر،50:50-0.5-A=۰/۵٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) بعد از تخمیرو 50:50-1.0-A=۱٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) بعد از تخمیر.

جدول ۲ قابلیت زیستی پروبیوتیک ها و ضریب رشد (VPI) آن ها در تیمار ها بلافاصله پس از تخمیر*

تیمار ها**	جمعیت اولیه پروبیوتیک ها (log cfu/mL)			جمعیت نهایی پروبیوتیک ها (log cfu/mL)			ضریب رشد (VPI)		
	A***	B	A+B	A	B	A+B	A	B	A+B
Blank	٦/۸۹^{a}	٦/۹۸^{a}	۷/۲٤^{a}	٦/۹۳^{e}	۷/۲۹^{e}	۷/٤٦^{e}	۱/۱۰	۲/۰٤	۱/٦۸
100:0-0.5-B	٦/۸۹^{a}	٦/۹۸^{a}	۷/۲٤^{a}	۷/۱۱^{d}	۷/٤۷^{b}	۷/٦۳^{d}	۱/٦۷	۳/۰۹	۲/٤٥
100:0-1.0-B	٦/۸۹^{a}	٦/۹۸^{a}	۷/۲٤^{a}	۷/٤۹^{b}	۷/٦٦^{a}	۷/۸۸^{b}	۳/۹۹	٤/۷۸	٤/٤۳
50:50-0.5-B	٦/۸۹^{a}	٦/۹۸^{a}	۷/۲٤^{a}	۷/۲۱^{cd}	۷/٤٦^{b}	۷/٦٦^{cd}	۲/۱۰	۳/۰٤	۲/٦۲
50:50-1.0-B	٦/۸۹^{a}	٦/۹۸^{a}	۷/۲٤^{a}	۷/٦٥^{a}	۷/٦۹^{a}	۷/۹۸^{a}	٥/۸۰	٥/۱۸	٥/٤٦
100:0-0.5-A	٦/۸۹^{a}	٦/۹۸^{a}	۷/۲٤^{a}	٦/۹٤^{e}	۷/۲۸^{c}	۷/٤٦^{e}	۱/۱۳	۱/۹۹	۱/٦٦
100:0-1.0-A	٦/۸۹^{a}	٦/۹۸^{a}	۷/۲٤^{a}	٦/۹٥^{e}	۷/۳۰^{c}	۷/۳٦^{e}	۱/۱٥	۲/۰۹	۱/۷۳
50:50-0.5-A	٦/۸۹^{a}	٦/۹۸^{a}	۷/۲٤^{a}	٦/۹۳^{e}	۷/۲۹^{c}	۷/٤٦^{e}	۱/۱۱	۲/۰٥	۱/٦۹
50:50-1.0-A	٦/۸۹^{a}	٦/۹۸^{a}	۷/۲٤^{a}	٦/۹٥^{e}	۷/۲۹^{c}	۷/٤۷^{e}	۱/۱٦	۲/۰٤	۱/۷۰

* میانگین هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده اند، به طور معنادار با یکدیگر متفاوت اند ($P < 0.05$).

**Control = دوغ بدون نمک،100:0-0.5-B=۰/۵٪ نمک سدیم قبل از تخمیر،100:0-1.0-B=۱٪نمک سدیم قبل از تخمیر،50:50-0.5-B=۰/۵٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) قبل از تخمیر، 50:50-1.0-B=۱٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) قبل از تخمیر،100:0-0.5-A =۰/۵٪ نمک سدیم بعد از تخمیر،100:0-1.0-A=۱٪نمک سدیم بعد از تخمیر،50:50-0.5-A=۰/۵٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) بعد از تخمیرو 50:50-1.0-A=۱٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) بعد از تخمیر.

***A= لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، B= بیفیدوباکتریوم، A+B= مجموع پروبیوتیک ها.

www.SID.ir

جدول ۳ قابلیت زیستی پروبیوتیک ها در تیمارها طی دوره نگهداری یخچالی*

تیمارها**	جمعیت نهایی پروبیوتیک ها (log cfu/mL) d0			جمعیت نهایی پروبیوتیک ها (log cfu/mL) d7			جمعیت نهایی پروبیوتیک ها (log cfu/mL) d14			جمعیت نهایی پروبیوتیک ها (log cfu/mL) d21		
	A***	B	A+B	A	B	A+B	A	B	A+B	A	B	A+B
Control	٦/٩٣^{e}	٧/٢٩^{c}	٧/٤٦^{e}	٥/٧٠^{d}	٦/٠٨^{d}	٦/٢٣^{d}	٢/٧٠^{c}	٢/٠٠^{d}	٢/٨٤^{e}	٠	٠	٠
100:0-0.5-B	٧/١١^{d}	٧/٤٧^{b}	٧/٦٣^{d}	٦/١٨^{c}	٦/٤١^{c}	٦/٦١^{c}	٣/٣٠^{b}	٤/٣٦^{bc}	٤/٤٠^{d}	٠	٠	٠
100:0-1.0-B	٧/٤٩^{b}	٧/٦٦^{a}	٧/٨٨^{b}	٦/٥٤^{b}	٦/٧٠^{b}	٦/٩٣^{b}	٣/٣٠^{b}	٥/٠٠^{a}	٥/٠١^{c}	٠	٠	٠
50:50-0.5-B	٧/٢١^{cd}	٧/٤٦^{b}	٧/٦٦^{cd}	٦/١٨^{c}	٦/٤١^{c}	٦/٦١^{c}	٣/٣٠^{b}	٥/٣٧^{ab}	٥/٣٧^{b}	٠	٠	٠
50:50-1.0-B	٧/٦٥^{a}	٧/٦٩^{a}	٧/٩٨^{a}	٦/٨٢^{a}	٦/٨٥^{a}	٧/١٣^{a}	٥/٣٠^{a}	٥/٤٠^{ab}	٥/٦٥^{a}	٠	٠	٠
100:0-0.5-A	٦/٩٤^{e}	٧/٢٨^{c}	٧/٤٦^{e}	٤/٧٠^{e}	٥/٧٠^{e}	٥/٧٤^{e}	٢/٠٠^{d}	٢/٦٠^{d}	٢/٧٠^{e}	٠	٠	٠
100:0-1.0-A	٦/٩٥^{e}	٧/٣٠^{c}	٧/٣٦^{e}	٤/٠٠^{e}	٥/٠٠^{e}	٥/٠٤^{e}	٢/٠٠^{d}	٢/٧٠^{d}	٢/٨٤^{e}	٠	٠	٠
50:50-0.5-A	٦/٩٣^{e}	٧/٢٩^{c}	٧/٤٦^{e}	٤/٧٨^{e}	٥/٦٠^{e}	٥/٦٦^{e}	٠^{e}	٢/٧٠^{d}	٢/٧٠^{e}	٠	٠	٠
50:50-1.0-A	٦/٩٥^{e}	٧/٢٩^{c}	٧/٤٧^{e}	٤/٠٠^{e}	٥/٠٠^{e}	٥/٠٤^{e}	٠^{e}	٢/٧٠^{d}	٢/٧٠^{e}	٠	٠	٠

*میانگین‌هایی که با حروف کوچک متفاوت نشان داده شده‌اند، نشان‌دهنده تفاوت های معنی‌دار بین میانگین‌ها در ستون‌ها هستند ($P < 0.05$).

**Control = دوغ بدون نمک،100:0-0.5-B=۰/۵٪ نمک سدیم قبل از تخمیر،100:0-1.0-B=۱٪نمک سدیم قبل از تخمیر،50:50-0.5-B=۰/۵٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) قبل از تخمیر، 50:50-1.0-B=۱٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) قبل از تخمیر،100:0-0.5-A =۰/۵٪ نمک سدیم بعد از تخمیر،100:0-1.0-A=۱٪نمک سدیم بعد از تخمیر،50:50-0.5-A=۰/۵٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) بعد از تخمیرو 50:50-1.0-A=۱٪نمک سدیم/پتاسیم (با نسبت برابر) بعد از تخمیر.

***A=*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، B= *بیفیدوباکتریوم*، A+B= مجموع پروبیوتیک ها.

نتیجه این پدیده کند تر شدن رشد و/ یا فعالیت متعاقب آغازگر ها در مراحل بعدی تخمیر است. که این وضعیت در تیمار دیگر (دومی) وجود ندارد. در بررسی اثر افزودن نمک بر میانگین سرعت افزایش اسیدیته و افت pH در تیمار ها، مشاهده می شود که تیمار های حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl/KCl به علت اثر افزایش دهندگی رشد بیشتر KCl در این غلظت، بر هر دو باکتری ماست و پروبیوتیک، بیشترین افزایش را در میانگین های ذکر شده نشان داده اند. مشاهده می شود که افزودن نمک سبب افزایش چشمگیر جمعیت هر دو باکتری پروبیوتیک در پایان تخمیر می شود [۲۳]. خصوصا افزودن ۱ درصد نمک رشد و یا فعالیت پروبیوتیک ها به ویژه بیفیدوباکتریوم ها را به طور معنی دار تشدید می کند. سرعت افزایش اسیدیته در تیمار های دارای ۰/۵ درصد نمک NaCl و ۱ درصد نمک NaCl/KCl، با نمونه ی کنترل تفاوت معنی داری را نشان نداد و حتی در نمونه های حاوی ۱ درصد نمک NaCl سرعت کمتری مشاهده شده است. یک فرضیه برای این مشاهده می تواند به صورت زیر باشد: افزودن نمک احتمالاسبب کاهش قابل ملاحظه فعالیت باکتری های سنتی ماست در مقایسه با پروبیوتیک ها شده است. کاهش رشد و فعالیت باکتری های سنتی ماست، امکان موفق تر بودن پروبیوتیک ها در رقابت با این باکتری ها را فراهم می آورد. اما چون باکتری های پروبیوتیک اسید سازی کمی دارند، تحریک رشد آن ها به اسید سازی زیادی نخواهد انجامید. در نتیجه کاهش اسید سازی باکتری های ماست با افزایش اسید سازی پروبیوتیک ها جبران نمی شود. در نتیجه مدت زمان تخمیر در تیمار های حاوی ۱ درصد نمک بیشتر از ۰/۵ درصد نمک بوده است و حتی در نمونه های حاوی ۱ درصد نمک NaCl بیشتر از نمونه ی کنترل است. با مشاهده قابلیت زیستی پروبیوتیک ها در طول دوره نگهداری یخچالی مشاهده می شود که جمعیت پروبیوتیک ها در تیمار های حاوی نمک بعد

www.SID.ir

از تخمیر بیشتر از نمونه های حاوی نمک قبل از تخمیر کاهش یافته است. در توجیه این پدیده می توان گفت که پروبیوتیک ها در طی تخمیر به نمک سازگاری نسبی پیدا کرده اند. در حالی که افزودن ناگهانی نمک بعد از تخمیر باعث شوک به باکتری ها شده و پلاسمولیز و مرگ در آن ها رخ می دهد.

در بررسی نتایج حاصل از ارزیابی حسی مشخص شد که با وجود این که تیمار های حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl بیشترین پذیرش را داشتند اما نمونه های حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl/KCl نیز از لحاظ حسی قابل قبول بودند. پس نتیجه گرفته می شود که جایگزینی نسبی نمک NaCl با KCl، در غلظت ۰/۵ درصد نمک، از لحاظ حسی قابل قبول است. اما افزودن ۱ درصد نمک NaCl/KCl باعث ایجاد بدطعمی در دوغ می شود.

به عنوان نتیجه کلی این پژوهش می توان گفت که تیمار منتخب به عنوان دوغ پروبیوتیک با نمک جایگزین، تیمار حاوی ۰/۵ درصد نمک NaCl/KCl قبل از تخمیر بوده است.

۵- منابع

[1] Shafiee G, Mortazavian AM, Mohammadifar MA, Koushki MR, Mohammadi AR, Mohammadi R. Combined effects of dry matter content, incubation temperature and final pH of fermentation on biochemical and microbiological characteristics of probiotic fermented milk. *African Journal of Microbiological research.* 2010,4:1265-74.

[2] Shah NP. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technoogy*. 2001,55:46-53.

[3] Sohrabvandi S, Razavi SH, Mousavi SM, Motazavian AM. Viability of probiotic bacteria in low alcohol- and non-alcoholic beer during refrigerated storage. *Philippine Agricultural Scientist.* 2010,93:24-8.

[4]Heydari S, Mortazavian AM, Ehsani MR, Mohammadifar MA, Ezzatpanah H, Sohrabvandi S. Biochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic yogurt containing various prebiotic or fiber compounds. *Italian Journal of Food Science*. 2011,23:153-63.

[5] Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Rezaei K, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *International Journal of Dairy Technology*. 2007,60:123-7.

[6] Sadaghdar Y, Mortazavian AM, Ehsani MR. Survival and activity of five probiotic lactobacilli strains in two types of flavored fermented milk. Food Science and Biotechnology. 2012;21(1):151-7.

[7] Mortazavian AM, Ehsani MR, Azizi A, Razavi SH, Mousavi SM, Sohrabvandi S. Viability of calcium alginate-microencapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) during the refrigerated storage period and under the simulated gastrointestinal conditions. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2008,63:24-9.

[8] Ahmadi E, Mortazavian AM, Fazeli MR, Ezzatpanah H, Mohammadi R. The effects of inoculant variables on the physicochemical and organoleptic properties of Doogh. *International Journal of Dairy Technology*. 2012,65(2):274-81.

[9] Shah NP, Cruz AG, Faria JAF (2011). Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to the human health. Korbekandi H, Mortazavian AM, Iravani S. *Nova Science Publishing Ltd, USA*. Pp:131-168.

[10] Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Reinheimer JA, Emamdjame Z, Sohrabvandi S, et al. Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic micro-organismsin freshly made yogurt. *International Journal of Dairy Technology*. 2006a,59:8-11.

[11] Mortazavian AM, Sohrabvandi S, Mousavi SM, Reinheimer JA. Combined effects of temperature-related variables on the variables on the viability of probiotics in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2006b,61:248-52.

[12] Mortazavian AM, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. MRS-bile agar: Its suitability for the enumeration of mixed Probiotic cultures in cultured dairy products. *Milchwissenschaft*. 2007,62(2):270-2.

[13] Mortazavian AM, Khosrokhavar R, Rastgar H, Mortazaei GR. Effects of dry matter standardization order on biochemical

Archive of SID

www.SID.ir

and microbiological characteristics of Doogh (Iranian fermented milk drink). *Italian Journal of Food Science*. 2010,1:98-104.

[14] Mortazavian AM, Ghorbanipour S, Mohammadifar MA, Mohamadi M. Biochemical properties and viable probiotic population of yogurt at different bacterial inoculation rates and incubation temperatures. *Philippine Agricultural Scientist*. 2011,94:111-6.

[15] ISIRI NUMBER 11324. Iran national standard for probiotic Doogh .Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 1st Edition 2008.

[16] ISIRI NUMBER 2453. Doogh – Specifications ans test method. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 1st Edition 2008.

[17] Karagözlü C, Kinik O, Akbulut N. Effects of fully and partial substitution of NaCl by KCl on physico-chemical and sensory properties of white pickled cheese. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 2008,59(3):181-91.

[18] Goulding A (1997). Sodium and calcium metabolismDairy F. Brussels, Belgium. PP:33-36.

[19] Ayyash MM, Sherkat F, Francis P, Williams RPW, Shah NP. The effect of sodium chloride substitution with potassium chloride on texture profile and microstructure of Halloumi cheese. *Journal of Dairy Science*. 2011,94:37–42.

[20] Gomes AP, Cruz AG, Cadena RS, Celeghini RMS, Faria JAF, Bolini HMA, et al. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. *Journal of Dairy Science*. 2011b,94(6):2701-6.

[21] Aly ME. An attempt for producing low-sodium Feta-type cheese. *Food chemistry*. 1995,52:295-9.

[22] Katsiari MC, Voutsinas LP, Alichanidis E, Roussis IG. Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*. 1997,7:465-72.

[23] Mortazavian AM. Effects of fundamental compositional factors and microencapsulation of probiotics on qualitative parameters of probiotic doogh [dissertation]. Tehran: University of Tehran. Faculty of Biosystem Science;2008 [in Persian].

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of salt percentage (0.5 or 1%), combination (NaCl or NaCl/KCl) and stage of adding salt on biochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic Doogh

Arab, M. [1], Mortazavian, M. A. [2*], Azadnia, E. [3], Komeyli, R. [4], Alimiri. Tara, [5]. Najafi, M.[5]

1. Student of Food Science and Technology, School of Nutrition and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences.
2. Corresponding author, Associate professor, Department of Food Science and Technology, School of Nutrition and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences.
3. MSc of analytical chemistry, Laboratory expert, School of Nutrition and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences.
4. BS in nutrition, Laboratory expert, School of Nutrition and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences.
5. Student of Food Science and Technology, School of Nutrition and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences.

(Received: 92/2/15 Accepted: 94/2/23)

The combined effects of salt percentage (0.5 or 1%), its adding order (before or after the fermentation) and different ratios of NaCl/KCl (100/0 and 50/50) were used in the probiotic Doogh. Two probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium lactis* BB-12), along with the yogurt bacteria were used. pH, acidification and redox potential were measured during the fermentation period. Moreover, viability of probiotic bacteria was determined within 7-day intervals during the storage period. The sensory parameters were also evaluated at days 0 and 21. The partial substitution of NaCl with KCl in the studied concentration had a positive influence on the viability of probiotics. Treatments containing 1% NaCl/KCl and 0.5% NaCl/KCl which were added before fermentation showed the maximum viability of probiotics. The treatments with 0.5% NaCl and then 0.5% NaCl/KCl before fermentation showed higher acceptance. Thus the substitution of 0.5% NaCl with KCl was acceptable. In whole, the treatment containing 0.5% NaCl/KCl before fermentation was the best one for probiotic Doogh with substituted salt.

Keywords: Doogh, Fermented milks, Salt, Probiotic, Viability

* Corresponding Author E-Mail Address: mortazvn@sbmu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir