مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات ۵۰-۴۱

اثر دمای تخمیر و نسبت تلقیح باکتری‌های آغازگر بر تولید اسید پروپیونیک در نوشیدنی شیری تخمیرشده با *پروپیونی‌باکتریوم*

شهلا فرهادی[۱]، کیانوش خسروی دارانی[۲]، مرتضی مشایخ[۳]، سید امیر محمد مرتضویان[۳]، عبدالرضا محمدی[۳]، فرزانه شهراز[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com
۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: روند روزافزون چاقی و اضافه وزن به شکل‌گیری ایده تولید محصولات غذایی با خاصیت تشدیدکنندگی سیگنال‌های سیری منجر شده است. نقش اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در ایجاد سیری در افراد مهم است. هدف تحقیق حاضر بررسی اثر دو متغیر دمای گرمخانه‌گذاری و نسبت تلقیح باکتری‌های آغازگر بر میزان تولید اسید پروپیونیک در نوشیدنی شیری تخمیری حاوی *پروپیونی-باکتریوم* پس از تخمیر و طی دوره نگهداری یخچالی است.

مواد و روش‌ها: برای تهیه نوشیدنی شیری تخمیری از کشت مخلوط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* به‌ترتیب، به نسبت‌های ۱ به ۲، ۱ به ۴ و ۱ به ۸ و دمای گرمخانه‌گذاری ۳۰، ۳۵ و ۴۰ °C تا رسیدن به pH = ۴ استفاده شد. میزان اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک تولید شده در کلیه نمونه‌ها بلافاصله پس از تخمیر توسط دستگاه HPLC تعیین شد. غلظت اسیدهای تولید شده در نوشیدنی شیری تخمیری حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی اندازه‌گیری شد. ارزیابی حسی محصول تولید شده در پایان دوره تخمیر توسط ۱۱ ارزیاب آموزش دیده با استفاده از روش هدونیک انجام شد.

یافته‌ها: بیشترین میزان اسید پروپیونیک در پی تلقیح با نسبت ۱ به ۴ *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C حاصل شد. میزان این اسید طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی از ۰/۷۵ درصد (وزنی/ وزنی) در روز صفر به ۱/۲ درصد (وزنی/ وزنی) در روز ۲۸ افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: دمای گرمخانه‌گذاری اثر معکوس و معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) بر میزان تولید اسید پروپیونیک در محصول داشت.

واژگان کلیدی: اسید پروپیونیک، پروبیوتیک، *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، نوشیدنی شیری تخمیری

• مقدمه

روند روزافزون چاقی و اضافه وزن و بار تحمیل شده از سوی چاقی بر سلامت و تندرستی افراد اعم از بیماری‌های قلبی عروقی به واسطه تشدید عوامل خطر فشارخون و کلسترول بالا، دیابت، انواع سرطان و حتی مرگ، به شکل‌گیری ایده تولید محصولات غذایی با خاصیت تشدیدکنندگی سیگنال‌های سیری در سبد غذایی انسان منجر شده است و با گذشت زمان با اهمیت‌تر جلوه می‌کند. به علاوه، تولید چنین محصولی فرصتی را برای صنایع غذایی به منظور تأمین نیازهای تغذیه‌ای و تنوع بخشیدن به طیف فراورده‌های تولیدی لبنی امکان‌پذیر می‌سازد. عدم توازن انرژی دریافتی و مصرفی به عنوان دلیل اصلی چاقی در نظر گرفته می‌شود. گرچه تأمین تعادل انرژی دریافتی و مصرفی از طریق رژیم غذایی، فعالیت بدنی و اصلاح الگوی رفتاری

Archive of SID
www.SID.ir

اغلب به کاهش وزن کوتاه مدت منجر می‌شود، ولی مشکل اصلی، حفظ وزن در طولانی مدت است.

تولید محصولات غذایی با خاصیت تشدید کنندگی سیگنال‌های سیری از ارزش ویژه‌ای برخوردار است. در این میان، نقش اسیدهای آلی، به خصوص اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (اسیدهای استیک، پروپیونیک و بوتیریک) در ایجاد سیری حائز اهمیت است (۱). با وجود مطالعات فراوانی که در زمینه استفاده از گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* (*Propionibacteium*) به عنوان استارتر در تهیه پنیر و ماست انجام شده است، تنها در یک مطالعه که در سال ۲۰۰۸ توسط *Ruijschop* و همکاران انجام شد، قدرت سیرکنندگی نوشیدنی شیری تخمیری حاوی اسید پروپیونیک در مقایسه با نوشیدنی شیری غیر تخمیری بررسی شد. در پژوهش *Ruijschop* نوشیدنی شیری تخمیری در مقایسه با نوشیدنی شیری غیر تخمیری احساس گرسنگی و تمایل به خوردن را در افراد مصرف‌کننده به طور معنی‌داری کاهش داد(۱).

نتایج مطالعات انجام شده در خصوص شرایط رشد گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* نشان می‌دهد pH مناسب برای رشد گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* در دامنه ۶ تا ۷ قرار دارد. حداکثر pH برای رشد، معادل ۸/۵ و حداقل ۴/۶ است و در pH کمتر از ۴/۶ حجم تلقیح بیشتری برای رشد مورد نیاز است (۲). این باکتری‌ها در محدوده دمایی ۴۵ °C - ۷ رشد می‌کنند، اما دمای مناسب رشد آن‌ها ۳۰ °C است (۳، ۲). گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* در شرایط غیرهوازی یا در غلظت‌های پایین اکسیژن رشد می‌کنند (۴). در مورد توانایی تحمل نمک در مورد *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که تعداد باکتری‌ها در محیط حاوی ۶۰ g/Lit – ۱۰ نمک، بیشتر از محیط فاقد نمک است (۵). به علاوه، بهترین منبع کربن از نظر غلظت نهایی و بهره‌وری اسید پروپیونیک، لاکتات است (۳). گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* روی محیط کشت سدیم لاکتات آگار در شرایط غیرهوازی در دمای ۳۰ °C و به مدت ۷ تا ۹ روز کلنی‌هایی قهوه‌ای با حاشیه روشن‌تر و با قطر ۱ تا ۲/۵ mm تشکیل می‌دهند. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*Lactobacillus acidophilus*) در صورت رشد روی این محیط کلنی‌های ۰/۵ میلی‌متری تشکیل می‌دهد که قابل تشخیص از یکدیگر هستند. در صورت رشد باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توان تعداد شمارش شده روی این محیط در روز ۳ را که نشان‌دهنده تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک است، از تعداد شمارش شده در روز ۷ کم کرد. این اختلاف نمایانگر تعداد پروپیونی-باکتریوم‌ها است. زیرا پروپیونی‌باکتریوم‌ها قبل از روز ۳ روی این محیط رشد نمی‌کنند (۶).

فواید پروبیوتیک گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* به خوبی شناخته شده است. این باکتری‌ها از طریق تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر بر pH روده اثر کرده و جذب آهن و کلسیم را افزایش می‌دهند (۸، ۷). از طرف دیگر، رشد بیفیدوباکتریوم‌ها را افزایش می‌دهند و از این طریق، فلور میکروبی روده را تنظیم می‌کنند و باعث حفظ سلامت دستگاه گوارش می‌شوند. در ضمن، این باکتری‌ها از فعالیت آنزیم‌های تولید کننده عوامل موتاژن جلوگیری و از این طریق سیستم ایمنی بدن را تقویت می‌کنند (۹). پروپیونی‌باکتریوم‌ها با مهار سنتز کلسترول در کبد از طریق ممانعت از فعالیت آنزیم هیدروکسی‌متیل-گلوتاریل Co.A سنتاز و افزایش دفع اسیدهای صفراوی از مدفوع و میزان کلسترول مصرفی به منظور سنتز مجدد اسیدهای صفراوی، می‌توانند سطح کلسترول پلاسما را کاهش دهند (۱۱، ۱۰). برخی گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* قادر به تولید ویتامین‌های B_2 و B_{12} هستند که این موضوع به خصوص در کشورهای دچار کمبود و در رژیم افراد گیاهخوار اهمیت دوچندان می-یابد (۱۲، ۴).

به کارگیری پروپیونی‌باکتریوم‌ها در تهیه محصولات لبنی، علاوه بر تامین نیازهای تغذیه‌ای و ایجاد خاصیت سیرکنندگی (به واسطه تحریک ترشح پپتید روده‌ای YY به‌عنوان مهارکننده اشتها (۱۵-۱۳، ۱) و تأخیر تخلیه معدی ناشی از تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر به‌خصوص اسید پروپیونیک) (۱۶، ۱) فواید دیگری نیز برای صنعت غذا در بر دارد. از این فواید می‌توان به افزایش گرانروی در محصولاتی نظیر ماست (از طریق تولید اگزوپلی‌ساکاریدها) (۱۸، ۱۷، ۹) و مهار رشد میکروارگانیسم‌های نامطلوب در محصول (از طریق تولید اسید پروپیونیک و باکتریوسین) و در نتیجه، افزایش ماندگاری محصول (۹) اشاره کرد. رشد *پروپیونی‌باکتریوم* تداخلی با رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک در محصول لبنی ندارد (۱۹، ۹). در مطالعه انجام شده توسط *Ekinci* و *Gurel* (۲۰۰۸) از کشت همزمان باکتری‌های آغازگر ماست و ترکیبات متفاوت پروپیونی‌باکتریوم‌ها شامل *پروپیونی‌باکتریوم توانی‌یی* (*Propionibacterium thoenii*) و

Archive of SID
www.SID.ir

پروپیونی‌باکتریوم جنسه‌نی‌یی (*Propionibacterium jensenii*) با میزان تلقیح ۲٪ حجمی در تمامی نمونه‌ها برای تهیه ماست استفاده شد. براساس نتایج مطالعه *Ekinci* و *Gurel* فعالیت پروپیونی‌باکتریوم‌ها با آغازگرهای لاکتیک تداخلی نداشت و پروپیونی‌باکتریوم‌ها به‌علت تولید اگزوپلی‌ساکارید، گرانروی محصول نهایی را افزایش دادند. در مطالعه آن‌ها به دلیل استفاده از باکتری‌های آغازگر ماست و کم بودن مدت زمان گرمخانه‌گذاری (به دلیل افت ناگهانی pH) میزان اسید پروپیونیک تولید شده در محصول قابل ملاحظه نبود (۹).

از آن جا که در زمینه تولید نوشیدنی شیری تخمیری حاوی اسید پروپیونیک در ایران، نه تنها در مقیاس صنعتی بلکه در مقیاس آزمایشگاهی نیز مطالعه‌ای انجام نشده است و با توجه به رشد روزافزون مصرف نوشیدنی‌های شیری تخمیری، هدف تحقیق حاضر به‌کارگیری *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* (*Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii*) در تهیه نوشیدنی شیری تخمیری بود. با انجام این تحقیق، تولید نوعی غذای فراسودمند شیری امکان‌پذیر می‌شود که علاوه بر تأمین نیازهای تغذیه‌ای، خاصیت سیرکنندگی (satiety) نیز برای مصرف کننده دارد.

• مواد و روش‌ها

کشت آغازگر: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5 از شرکت *کریستین هنسن* (Chr-Hansen) تهیه شد. *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* (DSM 20270) نیز به صورت لیوفیلیزه از DSMZ خریداری و در محیط مایع پروپیونی‌باکتریوم کشت و هر ماه پاساژ داده شد. این محیط کشت شامل ۱٪ کازئین، ۰/۵٪ عصاره مخمر و ۱٪ لاکتات سدیم در ۱۰۰۰ mL آب مقطر بود که پس از تهیه و تنظیم pH در دامنه ۷/۲ - ۷ در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. به منظور آماده‌سازی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* برای تلقیح ۱ mL سوسپانسیون مادر حاوی 10^{9} cfu/mL باکتری در ۲۵۰ mL محیط مایع پروپیونی‌باکتریوم پاساژ داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۰ °C قرار داده شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت ۲۵۰ mL محیط مایع در دمای ۴ °C و با سرعت ۳۰۰۰*g* به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از جدا کردن فاز رویی، به رسوب حاصل ۲۵ mL فسفات بافر سالین اضافه و دوباره با سرعت ۳۰۰۰ *g* در دمای ۴ °C برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب به دست آمده از این مرحله با ۱۵ mL محلول فسفات بافر سالین و گلیسرول به نسبت ۸۵ به ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شد و سوسپانسیون به دست آمده در ۱۵ ویال استریل ۱ میلی‌لیتری تقسیم شد و در فریزر ۸۰°C- قرار گرفت.

به‌منظور تعیین تعداد دقیق باکتری موجود در هر ویال، یک ویال در رقت‌های 10^{-6} تا 10^{-12} روی محیط سدیم لاکتات آگار کشت داده شد. برای تهیه محیط کشت سدیم لاکتات آگار از ۱۰ g کازئین، ۱۰ g عصاره مخمر، ۱۰ g لاکتات سدیم، ۲ g پیرووات سدیم، ۲ g گلیسین، ۱/۵ g کلرید سدیم، ۰/۵ g توئین ۸۰، ۰/۲۵ g دی پتاسیم هیدروژن فسفات و ۱۲ g آگار در ۱۰۰۰ mL آب مقطر استفاده شد. پس از تنظیم pH در دامنه ۰/۲ ± ۷ محیط کشت تهیه شده در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۷ روز در دمای ۳۰°C در شرایط غیرهوازی قرار داده شدند (۶). بر اساس نتایج به دست آمده، سوسپانسیون موجود در هر ویال تهیه شده حاوی 6×10^{10} cfu/mL *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* بود.

تولید نمونه‌ها: شیر مورد استفاده برای تولید نوشیدنی از طریق بازسازی پودر شیر خشک بی‌چربی و پس از استاندارد کردن ماده خشک (معادل ۴٪) تهیه شد. شیر تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۵ °C حرارت داده شد. سپس از کشت مخلوط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* به نسبت‌های ۱ به ۲، ۱ به ۴ و ۱ به ۸ و دمای گرمخانه‌گذاری ۳۰، ۳۵ و ۴۰ °C تا رسیدن به pH = ۴ برای تهیه نوشیدنی شیری استفاده شد. طی تخمیر در انکوباتور شاخص‌های pH ، اسیدیته قابل تیتر و پتانسیل احیا اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری میزان اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک: پس از هموژن کردن محصول توسط دستگاه اولتراتوراکس ۲۰ mL اسیدسولفوریک ۰/۱ مولار به ۵ g نمونه تهیه شده اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. فاز شفاف رویی به کمک فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵µm فیلتر شد. ۲ mL از محلول حاصل برای تزریق به دستگاه به کار رفت. میزان اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک تولید شده در محصول با استفاده از دستگاه HPLC مجهز به ستون ODS-5 اندازه‌گیری شد. برای آنالیز از فاز متحرک شامل اسید سولفوریک 10^{-4} مولار (فاز متحرک A) و متانول (فاز متحرک B) و سرعت جریان

Archive of SID
www.SID.ir

۱ mL/min استفاده و آنالیز اسیدهای مذکور در طول موج آشکارساز معادل ۲۱۰ nm انجام شد. محلول استاندارد اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک در آب مقطر تهیه شد. زمان بازماند (retention time) پیک مربوط به اسیدهای لاکتیک، استیک و پروپیونیک به‌ترتیب ۲/۴۲، ۲/۵۳ و ۴/۳۹ دقیقه بود. نمونه حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک، برای تعیین غلظت اسیدهای تولید شده طی نگهداری یخچالی به‌مدت ۲۸ روز در دمای ۴ °C نگهداری شد.

تعیین قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک: قابلیت زیستی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از طریق کشت محصول تولید شده روی محیط کشت MRS آگار و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C و در شرایط هوازی به مدت ۷۲ ساعت در رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-7} (۲۰) و قابلیت زیستی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* از طریق کشت روی محیط سدیم لاکتات آگار و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C و در شرایط غیرهوازی به مدت ۷ روز در رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-7} بررسی شد (۶). شرایط بی‌هوازی با استفاده از جار بی‌هوازی و گازپک ایجاد شد. ضریب نسبت بقا GPI (Growth Proportion Index) از تقسیم تعداد نهایی باکتری‌های پروبیوتیک بر تعداد اولیه آن‌ها به دست آمد (۲۱).

ارزیابی حسی: ارزیابی حسی محصول تولید شده با استفاده از آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای انجام شد(صفر: غیر قابل مصرف، ۱: غیر قابل قبول، ۲: قابل قبول، ۳: رضایت بخش، ۴: عالی). محصولات تولید شده حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک در پایان دوره تخمیر توسط ۱۱ ارزیاب آموزش دیده بررسی شد. ویژگی‌های طعم (مزه و بو)، ظاهر (رنگ و همگنی بافت)، بافت دهانی و گرانروی غیردهانی (چشمی) مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از انجام ارزیابی حسی و محاسبه میانگین امتیاز داده شده به هر یک از شاخص‌های مورد نظر، مجموع امتیازها از طریق حاصل‌ضرب میانگین امتیاز داده شده در ضرایب مربوط به هر یک از شاخص‌ها (ضریب طعم: ۶، ضریب بافت دهانی: ۳/۵، ضریب ظاهر (رنگ و همگنی بافت): ۲ و ضریب گرانروی غیر دهانی: ۱) به‌دست آمد (۲۲).

طراحی و ارزیابی آماری: در این تحقیق اثر دو متغیر دما و نسبت تلقیح بر میزان تولید اسید پروپیونیک با استفاده از طرح فاکتوریل کامل بررسی شد. تعداد کل 3^2 آزمایش انجام شد تا همه حالات ترکیبی ممکن (ترکیب تیمار با علامت اختصاری tc) از کنار هم قرار گرفتن دو متغیر در سه سطح بررسی شود. در مجموع ۹ تیمار تولید شده و هر تیمار در سه تکرار تهیه و آزمون شد. بنابراین، تعداد کل تیمارها ۲۷ به دست آمد. وجود تفاوت معنی‌دار میان میانگین داده‌های حاصل از تیمارهای اعمال شده، با استفاده از آزمون ANOVA در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ با نرم افزار SPSS بررسی شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم شد.

• یافته‌ها

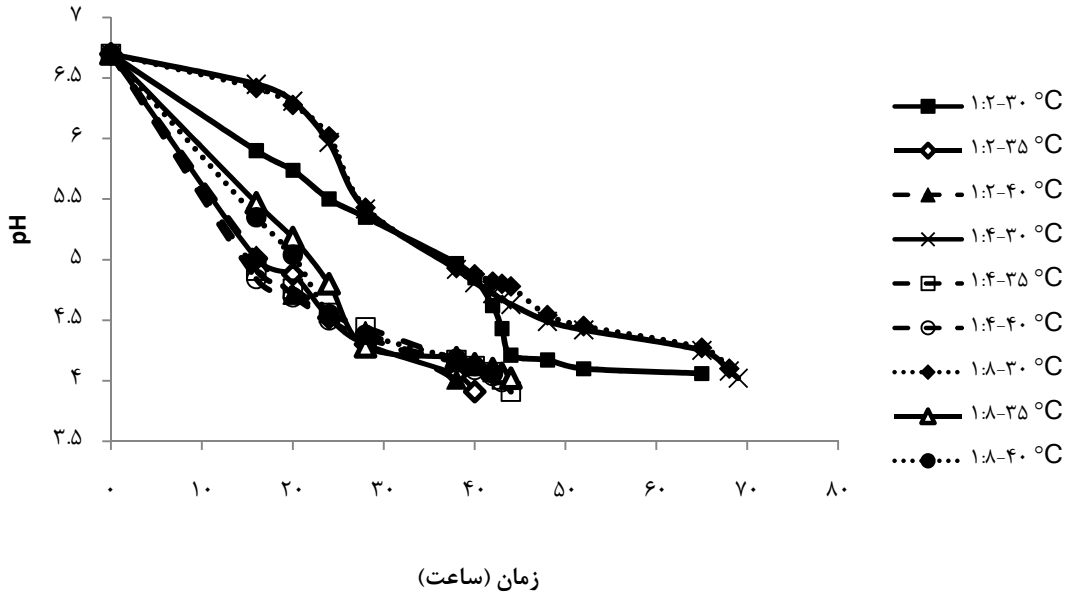
تغییرات pH طی دوره تخمیر: شکل ۱ روند تغییرات pH طی دوره تخمیر را نشان می‌دهد. با گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها در دمای ۳۰ °C سه مرحله تاخیر، رشد لگاریتمی و سکون رشد مشخص است، ولی با افزایش دما از ۳۰ به ۴۰ °C تنها دو مرحله رشد لگاریتمی و سکون در نمودارها نمایان است.

غلظت اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک در پایان دوره تخمیر: غلظت اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک تولید شده در نمونه‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در کلیه نمونه‌ها مقدار اسید استیک بیشتر از میزان اسید لاکتیک است. بیشترین میزان اسید پروپیونیک در نمونه تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* معادل ۱ به ۴ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C تولید شد و این مقدار معادل ۰/۷۷ درصد (وزنی/ وزنی) بود. کمترین میزان اسید پروپیونیک متعلق به نمونه تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* معادل ۱ به ۲ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۴۰ °C بود و این مقدار معادل ۰/۲۵ درصد (وزنی/ وزنی) است.

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که میان میزان اسید پروپیونیک و اسید استیک تولید شده با دمای گرمخانه‌گذاری ارتباط معکوس و معنی‌داری ($P<0/05$) وجود دارد؛ به طوری‌که در نسبت ثابت میکروارگانیسم‌های تلقیح شده، با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۴۰ °C میزان اسیدهای پروپیونیک و استیک تولید شده کاهش یافت. بهترین نسبت تلقیح در هر یک از دماهای به‌کار رفته از نظر دستیابی به بیشترین میزان اسید پروپیونیک در محصول، به ترتیب ۱:۴، ۱:۸ و ۱:۲ بود.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. روند تغییرات pH طی تخمیر در نمونه‌های تولید شده

جدول ۱- غلظت اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک (درصد وزنی/ وزنی) تولید شده در نوشیدنی شیری تخمیری در پایان دوره تخمیر*

تیمار		شاخص‌ها		
نسبت تلقیح	دما (°C)	اسید پروپیونیک (درصد وزنی/ وزنی)	اسید لاکتیک (درصد وزنی/وزنی)	اسید استیک (درصد وزنی/وزنی)
۱ به ۲	۳۰	۰/۴۹^{c}	۰/۲۵^{b}	۰/۳۲^{b}
۱ به ۲	۳۵	۰/۳۵^{d}	۰/۲۱^{d}	۰/۲۹^{c}
۱ به ۲	۴۰	۰/۲۵^{e}	۰/۱۸^{e}	۰/۲۱^{e}
۱ به ۴	۳۰	۰/۷۷^{a}	۰/۲۷^{a}	۰/۳۵^{a}
۱ به ۴	۳۵	۰/۴۶^{c}	۰/۲۳^{c}	۰/۳۲^{b}
۱ به ۴	۴۰	۰/۳۴^{d}	۰/۲۵^{b}	۰/۲۷^{d}
۱ به ۸	۳۰	۰/۶۰^{b}	۰/۲۶^{ab}	۰/۳۳^{b}
۱ به ۸	۳۵	۰/۳۶^{d}	۰/۱۸^{e}	۰/۳۰^{c}
۱ به ۸	۴۰	۰/۳۲^{de}	۰/۲۰^{d}	۰/۲۶^{d}

* میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند ($p<۰/۰۵$).

قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک: قابلیت زیستی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در پایان دوره تخمیر در جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین قابلیت زیستی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* در نوشیدنی تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* معادل ۱ به ۴ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C به دست آمد. قابلیت زیستی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* به طور معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) با دمای گرمخانه‌گذاری ارتباط داشت؛ به‌طوری‌که با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۴۰ °C در هر یک از نسبت‌های تلقیح شده، قابلیت زیستی این باکتری کاهش یافت. بیشترین تعداد زنده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نوشیدنی تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی-باکتریوم فرئودنریچی‌یی* معادل ۱ به ۸ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ °C مشاهده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲. قابلیت زیستی و نسبت بقای رشد باکتری‌های پروبیوتیک در نوشیدنی شیری تخمیری در پایان دوره تخمیر*

تیمار		تعداد نهایی باکتری‌های پروبیوتیک پس از تخمیر (log cfu/mL)			ضریب نسبت بقاء (GPI)		
نسبت تلقیح	دما (°C)	P**	A***	P + A	P	A	P + A
۱ به ۲	۳۰	۷/۴۱^{c}	۷/۶۹^{b}	۷/۸۸^{d}	۱/۲۸	۴/۹۰	۲/۵۳
۱ به ۲	۳۵	۷/۰۸^{c}	۷/۷۸^{ab}	۸/۱۶^{bc}	۰/۶۰	۶/۰۳	۴/۸۰
۱ به ۲	۴۰	۶/۰۳^{d}	۸/۰۱^{ab}	۸/۰۲^{cd}	۰/۰۵	۱۰/۲۰	۳/۵۰
۱ به ۴	۳۰	۸/۶۰^{a}	۸/۰۶^{ab}	۸/۷۲^{a}	۱۰/۰۰	۱۱/۵۰	۱۰/۵۰
۱ به ۴	۳۵	۷/۴۲^{c}	۸/۱۴^{a}	۸/۲۳^{bc}	۰/۶۶	۱۳/۸۰	۳/۴۰
۱ به ۴	۴۰	۷/۰۶^{c}	۸/۱۱^{ab}	۸/۱۵^{bc}	۰/۲۹	۱۲/۹۰	۲/۸۲
۱ به ۸	۳۰	۸/۰۵^{b}	۸/۰۸^{ab}	۸/۳۷^{b}	۱/۴۰	۱۲/۰۰	۲/۶۰
۱ به ۸	۳۵	۷/۳۶^{c}	۸/۱۶^{a}	۸/۲۳^{bc}	۰/۲۹	۱۴/۴۰	۱/۸۹
۱ به ۸	۴۰	۶/۴۷^{d}	۸/۱۲^{ab}	۸/۱۴^{bc}	۰/۰۴	۱۳/۲۰	۱/۵۶

*میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند (p<۰/۰۵).
** *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی زیرگونه شرمانی‌یی*
*** *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

روند تغییرات pH، اسیدیته و غلظت اسیدهای تولید شده طی نگهداری یخچالی: با توجه به این که نوشیدنی تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* معادل ۱ به ۴ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک بود، این نمونه به مدت ۲۸ روز در دمای ۴ °C نگهداری و تغییرات pH، اسیدیته قابل تیتر و غلظت اسیدهای تولید شده در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ تعیین شد.

روند تغییرات pH، اسیدیته، غلظت اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک در نوشیدنی شیری تخمیری حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک، طی ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ °C در جدول ۳ آورده شده است. طی نگهداری یخچالی، pH کاهش و اسیدیته قابل تیتر افزایش یافت. همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، میزان اسید پروپیونیک از هفته دوم نگهداری یخچالی به طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان این اسید طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی از ۰/۷۵ درصد (وزنی/ وزنی) در روز صفر به ۱/۲ درصد (وزنی/ وزنی) در روز ۲۸ افزایش یافت.

ارزیابی حسی: نتایج حاصل از ارزیابی حسی نوشیدنی‌های حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک و نمونه شاهد در جدول ۴ آورده شده است. بیشترین میزان مطلوبیت در نمونه تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* معادل ۱ به ۴ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C دیده شد. کمترین میزان مطلوبیت به نمونه تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* معادل ۱ به ۲ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C تعلق داشت. با توجه به مجموع امتیاز محاسبه شده و جدول امتیازدهی شاخص‌های حسی (۲۲) نمونه‌های تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* معادل ۱ به ۴ و ۱ به ۸ در گروه محصولات خوب و نمونه تهیه شده با استفاده از نسبت ۱ به ۲ و نمونه شاهد در گروه محصولات متوسط قرار گرفتند.

جدول ۳. تغییرات pH، اسیدیته، غلظت اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک در نوشیدنی شیری تخمیری حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک طی نگهداری یخچالی*

شاخص \ روز	صفر	۷	۱۴	۲۱	۲۸
pH	۴/۰۵	۴/۰۰	۳/۹۱	۳/۸۲	۳/۷۵
اسیدیته قابل تیتر (درجه دورنیک)	۴۴/۱۰	۴۵/۰۰	۴۵/۹۰	۴۷/۲۵	۴۷/۷۰
اسید پروپیونیک (درصد وزنی/ وزنی)	۰/۷۵^{D}	۰/۷۶^{D}	۰/۸۷^{C}	۱/۰۲^{B}	۱/۲۰^{A}
اسید لاکتیک (درصد وزنی/ وزنی)	۰/۲۸^{C}	۰/۳۱^{C}	۰/۳۷^{B}	۰/۴۵^{A}	۰/۴۴^{A}
اسید استیک (درصد وزنی/ وزنی)	۰/۳۵^{C}	۰/۳۵^{C}	۰/۴۰^{A}	۰/۳۸^{B}	۰/۳۷^{B}

* میانگین‌هایی که در یک ردیف با حروف متفاوت بزرگ نشان داده شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند (p<۰/۰۵).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۴. نتایج حاصل از ارزیابی حسی نوشیدنی‌های حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک و نمونه شاهد*

نمونه	شاخص‌های حسی				
	ظاهر (رنگ و همگنی بافت)	طعم (مزه و بو)	بافت دهانی	گرانروی غیر دهانی	مجموع امتیاز
نسبت ۱ به ۸ و ۳۰ °C	۵/۴۵[a]	۱۴/۴۵[b]	۸/۵۹[a]	۲/۸۲[a]	۳۱/۳۱[b]
نسبت ۱ به۲ و ۳۰ °C	۵/۱۸[b]	۱۱/۴۵[d]	۷/۹۵[c]	۲/۲۷[d]	۲۶/۸۵[d]
نسبت ۱ به ۴ و ۳۰ °C	۵/۰۰[c]	۱۵/۸۲[a]	۸/۲۷[b]	۲/۵۴[b]	۳۱/۶۳[a]
شاهد**	۵/۰۰[c]	۱۳/۶۴[c]	۸/۵۹[a]	۲/۴۵[c]	۲۹/۶۸[c]

*میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند ($p<0/05$).

** نوشیدنی تهیه شده با استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌تنهایی و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C

• بحث

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، بین میزان اسیدهای پروپیونیک و استیک تولید شده در محصول با دمای گرمخانه‌گذاری ارتباط معکوس و معنی‌داری ($P < 0/05$) وجود دارد؛ به طوری‌که در نسبت ثابت تلقیح، با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۴۰ °C میزان اسید پروپیونیک و اسید استیک تولید شده کاهش می‌یابد. علت این موضوع می‌تواند رشد سریع‌تر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در دماهای ۳۵ و ۴۰ °C نسبت به دمای ۳۰°C باشد که در نتیجه آن، سرعت افت pH افزایش و مدت زمان گرمخانه‌گذاری کاهش می‌یابد و در نتیجه، *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* فرصت کافی برای رشد نخواهد داشت. در روند تغییرات pH طی تخمیر (شکل ۱) نیز مشخص است که در نمونه‌های تهیه شده در دمای ۳۰ °C سه مرحله مشخص کمون، رشد لگاریتمی و سکون رشد باکتریایی نمایان است، ولی با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۴۰°C تنها دو مرحله رشد لگاریتمی و سکون در نمودارها قابل تشخیص است که تأیید کننده رشد سریع‌تر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در دماهای ۳۵ و ۴۰ °C نسبت به دمای ۳۰ °C است. در سایر مطالعات انجام شده نیز گزارش شده که دمای مناسب رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در محدوده ۳۵ تا ۴۰ °C است (۲۳). بر اساس مطالعات انجام شده دمای مناسب رشد پروپیونی‌باکتریوم‌ها ۳۰ °C است (۳، ۲) که منجر به تولید بیشتر اسیدهای پروپیونیک و استیک در این دما می‌شود. بنابراین، مقادیر بیشتر اسیدهای پروپیونیک و استیک نشانگر رشد بهتر *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* است. در این مطالعه حداکثر میزان اسیدهای پروپیونیک و استیک در نمونه حاوی بالاترین قابلیت زیستی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* (نمونه: ۱ به ۴ و ۳۰ °C) تولید شد. در کلیه نمونه‌ها مقدار اسید استیک تولید شده بیشتر از میزان اسید لاکتیک موجود در نمونه‌هاست. علت این موضوع می‌تواند مصرف اسید لاکتیک و تولید اسید استیک توسط *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* باشد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد در تخمیر انجام شده توسط این باکتری ۳ مول اسید لاکتیک به ۲ مول اسید پروپیونیک، ۱ مول اسید استیک و ۱ مول CO_2 تبدیل می‌شود (۲۴).

بر اساس نتایج به دست آمده، بهترین مقدار متغیرهای اعمال شده برای تولید بالاترین میزان اسید پروپیونیک در نوشیدنی شیری تخمیری عبارت است از: نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* معادل ۱ به ۴ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C. این مقدار معادل ۰/۷۷ درصد (وزنی/ وزنی) است که در مدت ۶۹ ساعت گرمخانه‌گذاری در محصول به دست آمد. با وجود مطالعات فراوانی که در مورد استفاده از گونه‌های پروپیونی‌باکتریوم به عنوان آغازگر در تهیه پنیر انجام شده است، تنها در مطالعه *Ruijschop* و همکاران از *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* در تهیه نوشیدنی شیری تخمیری استفاده شد. در این مطالعه، به منظور تهیه نوشیدنی شیری تخمیری از کشت همزمان *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *فرئودنریچی‌یی* به نسبت ۱ به ۵ در شیر پس‌چرخ استفاده شد. تخمیر در دمای ۳۰ °C و به مدت ۷ روز انجام شد. در مطالعه *Ruijschop* دمای گرمخانه‌گذاری و نسبت میکروارگانیسم‌های موجود در تلقیح

Archive of SID

www.SID.ir

در سطوح متفاوت، به‌منظور رسیدن به حداکثر میزان رشد و تولید اسید پروپیونیک بررسی نشد. به علاوه، تغییرات میزان اسید پروپیونیک طی نگهداری یخچالی مورد مطالعه قرار نگرفته است.

نتایج به دست آمده در مطالعه *Ruijschop* و همکاران نشان داد که نوشیدنی شیری تخمیری در مقایسه با نوشیدنی شیری غیر تخمیری احساس پرشدگی معدی را افزایش و احساس گرسنگی و تمایل به خوردن را کاهش می‌دهد. با این حال، تفاوت معنی‌داری میان نوشیدنی شیری تخمیری و نوشیدنی حاوی پروپیونات کلسیم، اضافه شده به صورت دستی و به‌میزان ۰/۶ درصد (وزنی/ وزنی)، وجود نداشت. این نتیجه، تأیید می‌کند که پروپیونات جزء فعالِ ایجاد کنندهٔ سیری است. در مطالعه *Ruijschop* و همکاران میزان اسید پروپیونیک تولید شده در دمای ۳۰°C در مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری ۰/۹۸ درصد (وزنی/ وزنی) بود (۱) در صورتی‌که در مطالعه حاضر ۰/۷۷ درصد (وزنی/ وزنی) اسید پروپیونیک در مدت ۶۹ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C در نوشیدنی تولید شد. این اختلاف مشاهده شده می‌تواند ناشی از تفاوت در نسبت تلقیح و زیرگونه *پروپیونی‌باکتریوم* مورد استفاده در مطالعه *Ruijschop* با مطالعه حاضر باشد. به طوری که در مطالعه *Ruijschop* و همکاران از *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *فرئودنریچی‌یی* و در مطالعه حاضر از *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* استفاده شد. به علاوه، pH اولیه شیر پس‌چرخ در مطالعه *Ruijschop* (حدود ۵/۸) با مطالعه حاضر (حدود ۶/۷) متفاوت بود که می‌تواند به تفاوت میزان اسید پروپیونیک تولید شده منجر شده باشد. در مطالعه *El-Hagarawy* و همکاران نیز مشاهده شد که گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* در pH اولیه بالاتر رشد بهتری دارند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان اسیدهای پروپیونیک و استیک تولید شده طی دو روز گرمخانه‌گذاری در pH اولیه معادل ۶/۶ به طور معنی‌داری بیشتر از pH=۵/۲ است (۲۵).

طی نگهداری یخچالی، pH کاهش و اسیدیته قابل تیتر، افزایش یافت که احتمالا ناشی از تولید اسیدهای آلی توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* طی این دوره است. میزان اسید پروپیونیک طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی از ۰/۷۵ درصد (وزنی/ وزنی) در روز صفر به ۱/۲ درصد (وزنی/ وزنی) در روز ۲۸ افزایش یافت. میزان این اسید در هفته اول نگهداری یخچالی تقریبا ثابت بود و از هفته دوم در حد قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. احتمالا علت عدم افزایش قابل - ملاحظه اسید پروپیونیک در هفته اول ناشی از کاهش قابل ملاحظه در قابلیت زیستی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* در این مدت است.

بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی حسی، بیشترین میزان مطلوبیت در نمونه تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* معادل ۱ به ۴ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C دیده شد. اگرچه ترکیبات آلی مختلفی در محصولات شیری تخمیری مانند ماست شناسایی شده‌اند، اما فقط تعداد کمی از آن‌ها اثر قابل ملاحظه‌ای روی طعم محصول دارند. به طوری‌که مهم‌ترین ترکیب معطر ماست استالدئید است (۲۶). مطالعه انجام شده توسط *Ekinci* و *Gurel* (۲۰۰۸) نشان داد که به‌کارگیری *پروپیونی‌باکتریوم* در تهیه ماست به افزایش میزان استالدئید تولید شده در روز اول منجر می‌شود (۹). با وجود این، در مطالعه انجام شده توسط *Ruijschop* و همکاران مشاهده شد که نوشیدنی تهیه شده با استفاده از کشت همزمان *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* و حاوی ۰/۹۸ درصد (وزنی/ وزنی) اسید پروپیونیک طعم ترش و مطلوبیت پایینی در میان افراد مصرف‌کننده داشت (۱). این اختلافِ مشاهده شده می‌تواند ناشی از تفاوت در میزان اسید پروپیونیک تولید شده و زیرگونه *پروپیونی‌باکتریوم* مورد استفاده باشد.

با توجه به دستیابی به میزان نسبتا بالای اسید پروپیونیک در نمونه تولید شده، افزایش این مقدار طی نگهداری یخچالی و تعلق بالاترین مقبولیت حسی در میان نمونه‌های تولید شده به نمونه حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک می‌توان نتیجه‌گیری کرد انجام این تحقیق تولید نوعی غذای فراسودمند را میسر ساخته است. البته، بررسی دقیق اثرات سیرکنندگی این محصول در قالب یک مطالعه تغذیه‌ای توصیه می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Ruijschop RMAJ, Boelrijk AEM, te Giffel MC. Satiety effects of a dairy beverage fermented with propionic acid bacteria. Int Dairy J 2008; 18: 945–50.
2. Sheehan JJ, Wilkinson MG, McSweeney PLH. Influence of processing and ripening parameters on starter, non-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. Int Dairy J 2008; 18: 905-17.
3. Coral J, Karp SG, Porto de Souza Vandenberghe L, Parada JL, Pandey A, Soccol CR. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. Appl Biochem Biotechnol 2008; 151: 333-41.
4. Quesada-Chanto A, Schmid-Meyer AC, Schroeder AG, Carvaiho-Jonas MF, Blanco I, Jonas R. Effect of oxygen supply on biomass, organic acids and vitamin B12 production by *Propionibacterium shermanii*. World J Microbiol Biotechnol 1998; 14: 843-6.
5. Marshall DL, Odame-Darkwah JK. Influence of pH and NaCl on growth and survival of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, *Bacillus pumilus*, and *Saccharomyces cerevisiae* in broth media. Food Sci Technol 1995; 28: 222-6.
6. Tharmaraj N, Shah NP. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. J Dairy Sci 2003; 86: 2288-96.
7. Bougle D, Vaghefi-Vaezzadeh N, Roland N, Bouvard G, Arhan P, Bureau F, et al. Influence of short-chain fatty acids on iron absorption by proximal colon. Scand J Gastroenterol 2002; 37: 1008-11.
8. Trinidad TP, Wolever TM, Thompson LU. Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. Am J Clin Nutr 1996; 63: 754-8.
9. Ekinci FY, Gurel M. Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. J Dairy Sci 2008; 91: 892-9.
10. Demigne C, Morand C, Levrat MA, Besson C, Moundras C, Remesy C. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. Br J Nutr 1995; 74: 209-19.
11. Hara H, Haga S, Aoyama Y, Kiriyama S. Short chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. J Nutr 1999; 129: 942-8.
12. Leblance JG, Rutten G, Bruinenberg P, Sesma F, Savoy de giori G, Smid EJ. A novel dairy product fermented with *Propionibacterium freudenreichii* improves the riboflavin status of deficient rats. Nutrition 2006; 22: 645-51.
13. Batterham RL, Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, Herzog H, et al. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. Cell metabolism 2006; 4: 223-33.
14. Cherbut C, Ferrier L, Roze C, Anini Y, Blottiere H, Lecannu G, et al. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. Am J Physiol 1998; 275: 1415-22.
15. Dockray G. Gut endocrine secretions and their relevance to satiety. Curr Opin Pharmacol 2004; 4: 557-60.
16. Liljeberg HG, Bjorck IM. Delayed gastric emptying rate as a potential mechanism for lowered glycemia after eating sourdough bread: studies in humans and rats using test products with added organic acids or an organic salt. Am J Clin Nutr 1996; 64: 886-93.
17. Deutsch SM, Falentin H, Dols-Lafargue M, Lapointe G, Roy D. Capsular exopolysaccharide biosynthesis gene of *propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*. Int J Food microbiol 2008; 125: 252-8.
18. Gorret N, Maubois JL, Ghoul M and Engasser JM. Exopolysaccharide production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate. J Appl Microbiol 2001; 90: 779-87.
19. Kerjean JR, Condon S, Lodi R, Kalantzopoulos G, Chamba JF, Suomalainen T, et al. Improving the quality of European hard-cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionibacteria. Food Res Int 2000; 33: 281-7.
20. Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. Int Dairy J 2001; 11: 1-17.
21. Mortazavian AM, Khosrokhavar R, Rastegar H, Mortazaei GR. Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of doogh (Iranian fermented milk drink). Ital J Food Sci 2010; 22: 98-104.
22. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Yogurt – Specifications and test methods. ISIRI no 695. 4th revision, Karaj: ISIRI; 2008 [In Persian].
23. Gomes AMP, Malcata FX. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic bacteria. Trends Food Sci Technol 1999; 10: 139-57.
24. Zhang A, Yang S. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propioni-bacterium acidipropionici*. Process Biochem 2009; 44: 1346-51.
25. El-Hagarawy IS, Slatter WL, Harper WJ. Organic acid production by propionibacteria: Effect of strains, pH, carbon source and intermediate fermentation products. J Dairy Sci 1957; 10: 579-87.
26. Law BA. The formation of aroma and flavor compounds in fermented dairy products. Dairy Sci Abstr 1981; 43:143-54.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of incubation temperature and inoculation ratio of starter culture on propionic acid production in dairy beverage fermented with *propionibacterium*

*Farhadi Sh[1], Khosravi-Darani K[*2], Mashayekh M[3], Mortazavian AM[3], Mohammadi A[3], Shahraz F[4]*

1- M.Sc. in Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- [*]Corresponding author: Assistant Prof (in Research), Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E-mail: kiankh@yahoo.com

3- Assistant prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- M.Sc in Microbiology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received 28 May, 2011 **Accepted 4 Sept, 2011**

Background and Objective: Increasing trends of overweight and obesity prevalence have prompted food producers to develop products that can enhance satiety signals. The role of short-chain fatty acids as satiety-inducing triggers seems to be of interest in this regard. The objective of this research was to investigate the impact of two process variables, namely, incubation temperature and inoculation ratio of starter bacteria, on propionic acid production in the fermented dairy beverages containing *Propionibacterium* immediately after fermentation and during cold storage.

Materials and Methods: Fermented dairy beverage (FDB) samples were prepared using mixed cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* at a ratio of 1:2, 1:4 and 1:8, repectively, at incubation temperatures of 30, 35 and 40°C, until the pH reached 4.0 ± 0.1. Propionic, lactic and acetic acid contents of the samples were measured immediately after fermentation using HPLC. The FBD samples were refrigerated for 28 days and the concentrations of the acids in the samples with the highest propionic acid content were measured. Sensory evaluation of the samples produced was made by 11 trained panelists using the hedonic scale.

Results: The maximum propionic acid content (w/w%) was observed in a mixed culture of *L. acidophilus* and *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* at a ratio of 1:4 and an incubation temperature of 30 °C. It increased from 0.75 at day 0 to 1.2 at day 28 during storage at 4 °C.

Conclusion: The incubation temperature had a statistically significant inverse effect ($P<0.05$) on the propionic acid production in the fermented dairy beverages.

Keywords: Propionic acid**,** Probiotic, *Propionibacterium freudenreichii* ssp.*shermanii*, *Lactobacillus acidophilus*, Fermented dairy beverage

Archive of SID

www.SID.ir