



بررسی تاثیر سولفات منگنز و ویتامین B<sub>12</sub> بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، بافتی و حسی شیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5

معصومه رنجبر حسن باروق<sup>۱</sup>، مرضیه بلندی<sup>۲\*</sup>، عبدالرضا محمدی نافچی<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

۲- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخ های مقاله:</p> <p>تاریخ دریافت: ۹۹/۰۴/۲۶</p> <p>تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۱۴</p>	<p>محصولات لبنی غنی شده با عناصر معدنی و ویتامین‌ها نقش مهمی در توسعه غذاهای عملگرا ایفا می‌کنند. در بین باکتری‌های اسیدلاکتیک، استارترهای ماست دارای جایگاه ویژه‌ای از دیدگاه صنعت هستند که نقش سلامت‌زایی آن‌ها نیز تایید شده است. طولانی بودن زمان تخمیر توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک در فرآورده‌های لبنی، مستلزم صرف زمان و انرژی بالایی بوده و منجر به افزایش هزینه‌های تولید می‌شود. بنابراین شناسایی شرایط مناسب رشد سویه‌های مختلف و عوامل تاثیرگذار بر آن‌ها از ملزومات اولیه تولید می‌باشد. از این رو، در این پژوهش، تاثیر افزودن سولفات منگنز (صفر، ۰/۰۰۶ و ۰/۰۳ درصد) و ویتامین B<sub>12</sub> (صفر و ۰/۵ پی‌پی‌ام) به تنهایی و همچنین در ترکیب با یکدیگر بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، بافتی و حسی شیر تخمیر شده تولید شده در حضور باکتری‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 بررسی شد. نتایج کاهش pH و افزایش اسیدیته را در طول دوره نگهداری نشان داد. مقادیر شاخص‌های L* و b* کاهش و میزان a* نیز طی دوره نگهداری افزایش یافت (P&lt;۰/۰۵). همچنین ویژگی‌های بافتی و میزان آب‌اندازی در نمونه‌های حاوی ۰/۰۰۶ درصد سولفات منگنز و ۰/۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> به تنهایی و تیمار ترکیبی حاوی ۰/۰۰۶ درصد سولفات منگنز+ ۰/۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> به صورت معناداری بهبود یافت (P&lt;۰/۰۵). با افزایش طول دوره نگهداری، مزه ترشی شیر تخمیر شده غنی‌شده با ویتامین و منگنز افزایش یافت (P&lt;۰/۰۵). در حالی که بدبویی و بدطعمی در این نمونه‌ها حس نشد. همچنین زمان نگهداری نیز بر این ویژگی‌های حسی تاثیر معنی‌داری نداشت (P&gt;۰/۰۵).</p>
<p>کلمات کلیدی:</p> <p>باکتری‌های اسید لاکتیک، پروبیوتیک، زمان تخمیر، سولفات منگنز، ویتامین B<sub>12</sub>.</p>	
<p>DOI: 10.52547/fsct.18.02.10</p>	
<p>*مسئول مکاتبات: bolandi75@gmail.com</p>	

## ۱- مقدمه

تحریک سیستم ایمنی بدن برای آن‌ها مطرح شده است [۱]. با توجه به آهسته بودن میزان رشد باکتری‌های پروبیوتیک در حین تخمیر و به دنبال آن کاهش سرعت تخمیر شیر، طولانی‌تر شدن زمان آن می‌تواند بر عطر و بوی محصول نهایی موثر باشد [۷]. از این رو یکی از راه‌های افزایش سرعت رشد این باکتری‌ها، تقویت ویژگی غذا بعنوان سوبسترا، با افزودن ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و عناصر معدنی می‌باشد. در این ارتباط در دو پژوهش مختلف، یائو و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند افزودن ویتامین B<sub>6</sub>، ویتامین B<sub>12</sub> و بیوتین جهت تحریک رشد لاکتوباسیلوس هلویتیکوس و افزایش متابولیسم گلوکز ضروری بودند [۸]. همچنین دمیرهان و همکاران (۲۰۱۳) نیز به تاثیر مثبت املاح معدنی و ویتامین‌های گروه B بر رشد دانه‌های کفیر اشاره کردند [۹]. علاوه بر این، کاپراسوب و همکاران (۲۰۱۸) اعلام کردند که ویتامین‌های گروه B می‌توانند به عنوان منبع جدید پری‌بیوتیک برای تخمیر سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس استفاده شوند [۱۰]. با توجه به این که اطلاعات مختصری در رابطه با غنی‌سازی محصولات لبنی با سولفات منگنز و ویتامین B<sub>12</sub> به عنوان ترکیبات فراسودمند و محرک رشد سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس وجود دارد، هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی تاثیر ترکیبات فوق بر ویژگی‌های فیزیوشیمیایی، بافتی و حسی شیر تخمیر شده تولیدی می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد اولیه

در این تحقیق باکتری‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی از شرکت طوبی پایا ایران و سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 از شرکت کریستین هانسن دانمارک تهیه شد. تمام مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش با خلوص آزمایشگاهی از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه شدند.

### ۲-۲- روش تولید شیر تخمیر شده

برای تهیه شیر تخمیر شده پروبیوتیک، از شیر بازساخته (شیرخشک بدون چربی<sup>۵</sup> پگاه گرگان) استفاده شد که بعد از اعمال فرآیند حرارتی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه،

کاربرد عناصر معدنی و ویتامین‌ها در محصولات لبنی می‌تواند سبب تولید محصولات عملگرا<sup>۱</sup> با خواص سلامت‌بخشی برای مصرف‌کنندگان گردد. تاثیر مطلوب برخی از این افزودنی‌ها بر رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB)<sup>۲</sup> و پروبیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد موجب افزایش متابولیسم میکروارگانیسم‌ها و کاهش زمان تخمیر شیر شده و به دنبال آن کاهش هزینه‌های تولید را به همراه دارند [۱]. در صنعت لبنیات، باکتری‌های اسید لاکتیک به طور گسترده به عنوان کشت آغازگر<sup>۳</sup> استفاده می‌شوند. رشد و فعالیت این باکتری‌ها می‌تواند تحت تاثیر محیط کشت به عنوان تأمین کننده ترکیبات محرک رشد، یون‌های فلزی و ویتامین‌های لازم برای رشد و فعالیت متابولیکی باکتری‌ها قرار گیرد [۲]. علاوه بر موارد ذکر شده، سوش میکروارگانیسم، حالت فیزیولوژیکی آن، نوع حامل پروبیوتیک، پری‌بیوتیک‌های مورد استفاده و همچنین شرایط محیطی از جمله فعالیت آبی، پتانسیل اکسیداسیون-احیاء و شرایط نگهداری نیز روی رشد و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها موثر هستند [۳]. مطالعات نشان داده است که یون‌های فلزی از جمله  $Mg^{2+}$  و  $Mn^{2+}$  به عنوان تقویت کننده فعالیت آنزیمی نقش مهمی در رشد و فعالیت متابولیکی باکتری‌های اسید لاکتیک ایفا می‌کنند [۴]. علاوه بر عناصر معدنی، ویتامین‌ها نیز در فرایند متابولیسم سلولی موثر بوده و موجب افزایش تقسیم سلولی می‌شوند. از طرف دیگر ویتامین‌ها پیش‌ساز آنزیم‌های مختلفی هستند که جهت انجام واکنش‌های بیوشیمیایی حیاتی در سلول‌های زنده ضروری بوده و باعث تبدیل مواد غذایی به ATP<sup>۴</sup> می‌گردند. در بین ویتامین‌ها، ویتامین‌های گروه B بخصوص B<sub>12</sub> نقش مهمی در رشد و متابولیسم باکتری‌های اسیدلاکتیک ایفا می‌کنند [۵]. ویتامین B<sub>12</sub> به عنوان کوفاکتور، دارای کوآنزیم آ بوده که در واکنش‌های کربوکسیلاسیون و همچنین در تقسیم سلولی شرکت می‌کند [۶]. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس به عنوان سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس شناخته شده‌اند. پروبیوتیک‌ها اجزاء فعال زیستی محصولات لبنی تخمیری فراسودمند هستند که اثرات ضد جهش‌زا، ضد سرطان‌زا، بهبود متابولیسم لاکتوز و

1. Functional foods
2. Lactic acid bacteria
3. Starter culture
4. Adenosine triphosphate

5. Skim milk power

### ۲-۳-۳- رنگ سنجی

تعیین رنگ نمونه‌ها با دستگاه رنگ سنج هانترلب (Huter Lab, Flex Color, USA) انجام شد. قبل از انجام آزمون، دستگاه با کاشی‌های سفید و سیاه کالیبره و از کاشی زرد جهت کنترل دستگاه استفاده شد. اساس رنگ سنجی در این سیستم، سنجش شاخص‌های  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  بود که به ترتیب نشان دهنده روشنی، رنگ سبز تا قرمز و آبی تا زرد هستند [۱۴].

### ۲-۴- ارزیابی ویژگی‌های بافتی

ارزیابی ویژگی‌های بافتی نمونه شیر تخمیر شده تولیدی از جمله سفتی و چسبندگی آن با استفاده از دستگاه بافت سنج (CT3 Texture Analyzer with Texture Pro CT) (software, Brookfield AMETEK, USA) صورت گرفت. در این آزمون پروب استوانه‌ای با سطح مقطع صاف به قطر ۳۵ میلی‌متر و سرعت حرکت ۱ میلی‌متر بر ثانیه مورد استفاده قرار گرفت [۱۴].

### ۲-۵- ارزیابی حسی نمونه‌های شیر تخمیر شده

ارزیابی حسی نمونه‌های شیر تخمیر شده از لحاظ مزه ترش، بدبویی و بدطعمی با استفاده از ۲۰ نفر ارزیاب آموزش دیده صورت گرفت و از آن‌ها درخواست گردید که در فرم‌های پرسشنامه‌ای که به این منظور تدوین گردیده بود، به هریک از فاکتورهای اشاره شده با استفاده از مقیاس ۹ نقطه‌ای (۱=غیر قابل درک تا ۹= به شدت قوی) امتیاز دهند. برای جلوگیری از تداخل طعم‌ها در زمان ارزیابی، داورها قبل از هر آزمایش چشایی، دهان خود را با آب ولرم شستشو دادند [۱۵].

### ۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری نتایج

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲.۰ انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج توسط آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد انجام شد. نمودارهای مربوطه با Excel نسخه ۲۰۱۳ رسم گردیدند. کلیه آزمون‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی در سه تکرار انجام شدند. نتایج نیز به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش گردید.

تا دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد. سپس ۵ درصد شیر خشک بدون چربی (وزنی-وزنی)، ۴ درصد پودر آب پنیر شیرین (کارخانه شیر پگاه گرگان) (وزنی-وزنی) به صورت بازساخته، ۰/۵ درصد دکستروز (وزنی-وزنی) (شرکت ایران)، سولفات منگنز مونوهیدراته با درصد خلوص ۷۸-۸۰ درصد (شرکت صنایع شیمیایی اصفهان) در سه سطح (صفر، ۰/۰۶ و ۰/۰۳ درصد) و ویتامین B<sub>۱۲</sub> در دو سطح (صفر و ۰/۵ پی‌پی‌ام) به تنهایی و همچنین در ترکیب با یکدیگر (۰/۰۶ و ۰/۰۳ درصد) سولفات منگنز + ۰/۵ پی‌پی‌ام و ویتامین B<sub>۱۲</sub> که براساس پیش تیمارهای انجام شده تعیین شدند، جهت غنی‌سازی محصول حاصله به مخلوط فوق اضافه شدند. یک تیمار هم به عنوان شاهد (فاقد سولفات منگنز و ویتامین B<sub>۱۲</sub>) در نظر گرفته شد [۱۱]. تمامی مواد فوق توسط همزن مخلوط گردیدند و سپس باکتری‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 به صورت جداگانه به تعداد ۴/۱ و ۵/۲ کلونی در هر میلی‌لیتر به عنوان کشت آغازگر تلقیح شدند و به ترتیب در دمای ۴۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در ادامه میزان pH، اسیدیته، آب‌اندازی<sup>۱</sup>، پارامترهای بافتی شامل سفتی<sup>۲</sup> و چسبندگی<sup>۳</sup>، شاخص‌های رنگی و ارزیابی حسی محصول خنک شده در روزهای ۱ و ۲۱ دوره نگهداری در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) ارزیابی گردید [۱۲].

### ۲-۳- آزمون‌های فیزیکوشیمیایی

#### ۲-۳-۱- اندازه‌گیری pH و اسیدیته

pH محصول با استفاده از دستگاه pH متر (Metrohm، ۸۲۷ ساخت سوئیس) و اسیدیته قابل تیترا نمونه‌ها برحسب درجه دورنیک اندازه‌گیری شد [۱۳].

#### ۲-۳-۲- اندازه‌گیری میزان آب‌اندازی

۱۰ گرم نمونه شیر تخمیر شده با دور ۱۷۶× به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (LC-04 Zenithlab, CENTRIFUGE ساخت چین) شد. مایع شفاف رویی دور ریخته شد و لوله به همراه فاز پایینی وزن گردید. میزان آب‌اندازی شیر تخمیر شده براساس وزن اندازه‌گیری شده شیر تخمیر شده به وزن اولیه آن بیان شد [۱۴].

1. Syneresis
2. Hardness
3. Adhesiveness

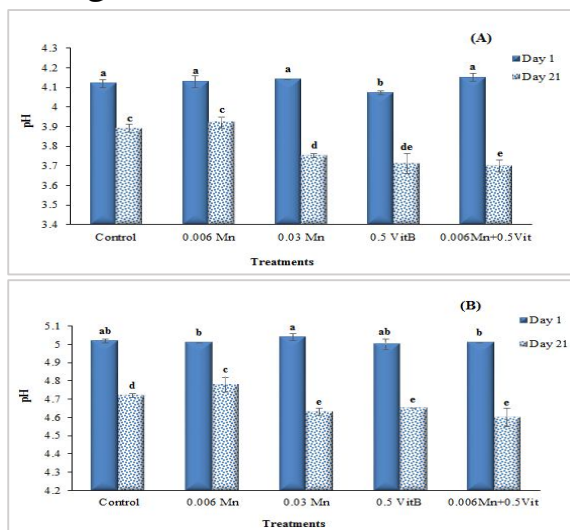
## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- تغییرات pH و اسیدیته نمونه‌های شیر

## تخمیر شده غنی شده طی دوره نگهداری

در شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب تغییرات pH و اسیدیته شیر تخمیر شده غنی شده با سولفات منگنز و ویتامین B<sub>12</sub> در حضور لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی (A) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 (B) نشان داده شده است. با توجه به شکل ۱-۲ (A) تغییرات pH و اسیدیته شیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی نشان داد که در روز اول، اختلاف آماری معنی‌داری بین همه تیمارهای مورد بررسی با تیمار حاوی ۰/۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> وجود دارد به طوری که این تیمار منجر به کاهش قابل توجه pH در مقایسه با نمونه شاهد شد ( $P < 0/05$ ). علت عدم تغییر قابل توجه pH و اسیدیته در این تیمارها (تیمار ترکیبی و تیمارهای حاوی سطوح ۰/۰۶ و ۰/۵ درصد منگنز) ( $P > 0/05$ ) می‌تواند ناشی از تداخل رشد باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس با باکتری‌های مایه کشت باشد که منجر به تولید آهسته اسید در باکتری‌های پروبیوتیک می‌شود [۳]. اما در روز ۲۱ نگهداری، حضور سولفات منگنز در سطح ۰/۰۳ درصد اثر متفاوت معناداری بر فعالیت متابولیکی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی داشت و باعث تسریع معنادار کاهش pH و افزایش اسیدیته گردید ( $P < 0/05$ ). در حالی که کاهش سولفات منگنز از ۰/۰۳ به ۰/۰۶ درصد روی کاهش pH موثر نبود. بررسی‌ها نشان داد با افزودن ۰/۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> به محیط کشت، سرعت نزول pH و افزایش اسیدیته قابل توجه بود به طوری که میزان غلظت اسیدلاکتیک تولیدی در این تیمار به طور معناداری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ). اما نکته قابل توجه در این پژوهش، عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین دو تیمار حاوی ۰/۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> و تیمار حاوی ۰/۰۳ درصد سولفات منگنز بود ( $P > 0/05$ ). حداقل میزان pH، حداکثر اسیدیته و بیشترین غلظت اسیدلاکتیک تولیدی در طی تخمیر توسط لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی در تیمار ترکیبی حاوی ۰/۰۶ درصد سولفات منگنز+ ۰/۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> در روز ۲۱ تعیین شد ( $P < 0/05$ ) که اختلاف آماری معنی‌داری بین این تیمار و تیمار حاوی ویتامین B<sub>12</sub> به تنهایی وجود نداشت ( $P > 0/05$ ). نتایج بدست آمده در تیمار ترکیبی

طی دوره نگهداری نمونه‌ها می‌تواند ناشی از اثر هم‌افزایی<sup>۱</sup> بین این دو ترکیب در کاهش pH و افزایش اسیدیته باشد. تغییرات pH و اسیدیته شیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 در شکل ۱-۲ (B) حاکی از حداقل میزان pH، حداکثر اسیدیته و بیشترین غلظت اسیدلاکتیک تولید شده در طی تخمیر در تیمار ترکیبی حاوی ۰/۰۶ درصد سولفات منگنز+ ۰/۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> و تیمار حاوی ۰/۰۶ درصد سولفات منگنز به تنهایی در روز اول نگهداری بود ( $P < 0/05$ ) که اختلاف آماری معنی‌داری بین دو تیمار ذکر شده و نمونه شاهد وجود نداشت ( $P > 0/05$ ). در روز ۲۱ نیز به صورت قابل توجهی pH تیمار ترکیبی، تیمار حاوی ویتامین B<sub>12</sub> به تنهایی و تیمار حاوی ۰/۰۳ درصد سولفات منگنز در مقایسه با نمونه شاهد و تیمار حاوی ۰/۰۶ درصد سولفات منگنز کاهش یافت ( $P < 0/05$ ) که نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار نوع تیمار و زمان مورد بررسی روی محصولات تولید شده توسط باکتری‌های لاکتیکی طی تخمیر لاکتوز می‌باشد. در واقع سطوح مختلف منگنز و همچنین حضور ویتامین B<sub>12</sub> توانست در دو بازه زمانی مورد بررسی بر سرعت افت pH، افزایش اسیدیته نمونه‌ها و همچنین غلظت اسیدلاکتیک تولیدی توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 در مقایسه با نمونه شاهد موثر واقع شود.



**Fig 1** pH changes of fermented milk enriched with manganese sulfate and vitamin B<sub>12</sub> in the presence of *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *Delbrookii* (A) and *Lactobacillus acidophilus* La-5 (B) during storage

Different letters shows significant differences between the treatments ( $P < 0.05$ ).

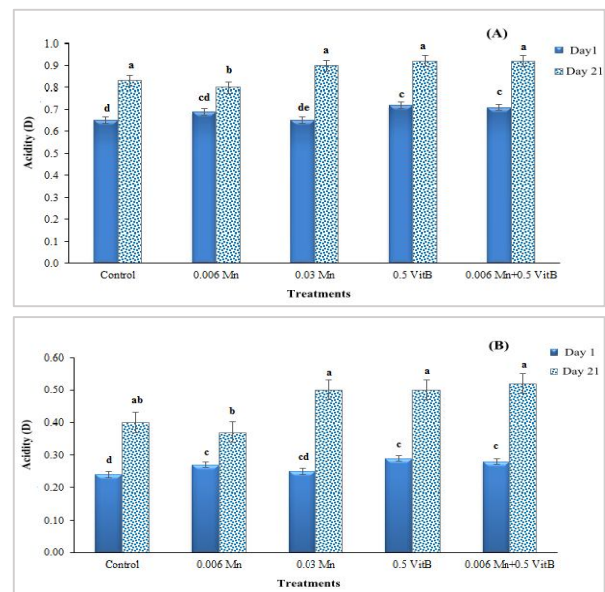
نیز علی‌رغم نوسانات pH، قابل پذیرش بودن ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و حسی کفیر شیر بز غنی شده با ویتامین‌های B<sub>۱۲</sub> و D<sub>۳</sub> را اعلام کردند [۲۱].

### ۳-۲- میزان آب‌اندازی نمونه‌های شیر تخمیر شده غنی شده در طول دوره نگهداری

یکی از مهم‌ترین اهداف صنعت، تولید محصولات مطلوب با حداقل آب‌اندازی در طی نگهداری و یا حمل و نقل است. ساختار ماست را می‌توان به صورت شبکه سه بعدی از زنجیره‌ها و خوشه‌های میسل‌های کازئین که شکل کروی خود را حفظ کرده‌اند، تعریف کرد. آب‌اندازی عموماً به دلیل تغییر و شکست در شبکه پروتئینی ماست، چروکیدگی ساختار آن و کاهش قدرت اتصال پروتئین‌های آب پنی‌ر به شبکه کازئینی در طی نگهداری و اعمال تنش رخ می‌دهد [۲۲]. نتایج آب‌اندازی شیر تخمیر شده غنی شده با سولفات منگنز و ویتامین B<sub>۱۲</sub> که در حضور لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (A) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 (B) تولید شدند در شکل ۳ نمایش داده شده است. با توجه به شکل ۳- (A) اثر نوع تیمار و زمان روی شیر تخمیر شده تولید شده توسط لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی معنی‌دار ارزیابی شد ( $P < 0.05$ ). بیشترین میزان آب‌اندازی در روز اول، در تیمار حاوی ۰/۰۰۶ درصد سولفات منگنز رخ داد که اختلاف آماری معنی‌داری با نمونه شاهد نداشت ( $P > 0.05$ ). در حالی که افزایش میزان سولفات منگنز به ۰/۰۳ درصد و از طرف دیگر حضور ویتامین B<sub>۱۲</sub> منجر به کاهش آب خارج شده از بافت در مقایسه با نمونه شاهد شد هر چند که از نظر آماری نتایج معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). اما کمترین درصد آب‌اندازی در تیمار ترکیبی حاوی ۰/۰۰۶ درصد سولفات منگنز + ۰/۰۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>۱۲</sub> مشاهده شد که اختلاف آماری معنی‌داری با نمونه شاهد و سایر تیمارهای مورد بررسی در این پژوهش در روز اول داشت ( $P < 0.05$ ). در روز ۲۱ نگهداری نیز حداقل آب خارج شده از بافت در تیمار ترکیبی در مقایسه با نمونه شاهد و تیمارهای حاوی ۰/۰۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>۱۲</sub> و ۰/۰۳ درصد سولفات منگنز به تنهایی رخ داد ( $P < 0.05$ ) که نشان دهنده تاثیر غلظت سولفات منگنز در خروج مایعات از بافت بود. همان‌طور که در شکل ۳- (B) نمایش داده شده است اثر نوع تیمار و زمان مورد بررسی روی شیر تخمیر شده تولید شده توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 معنی‌دار

این نتایج با نتایج اعلام شده توسط سانتیلان-اورکوئیزا و همکاران (۲۰۱۷) هم‌خوانی داشت [۱۴].

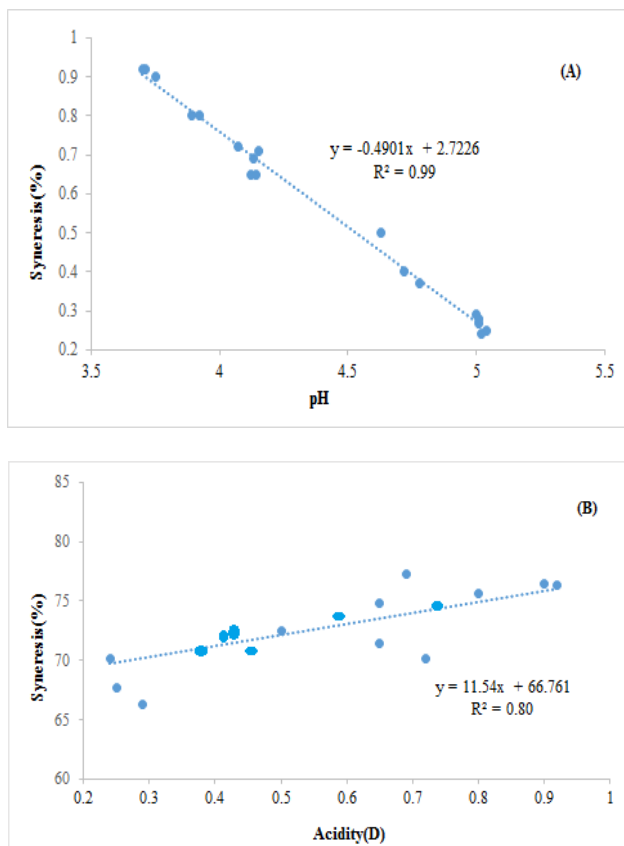
آن‌ها بیان کردند افزودن عناصر کلسیم، آهن و زینک به فرمولاسیون محصولات غذایی اسیدی نظیر ماست منجر به رهايش اسیدلاکتیک شده و پیامد آن افزایش اسیدیته و کاهش pH تیمارها طی دوره نگهداری می‌باشد [۱۴]. بورگین و همکاران (۲۰۱۴) ثابت کردند که وجود Mn<sup>+</sup> در محیط کشت، رشد لاکتوباسیلوس کازیبی را افزایش می‌دهد [۱۶ و ۱۷]. در بررسی تاثیر حضور نمک‌های آلی و ویتامین‌ها در فرآورده‌های تخمیری نتایج متفاوتی توسط پژوهش‌های مختلف اعلام شدند. از آن جمله زنامیروسکا و همکاران (۲۰۱۹) دریافتند که افزودن نمک‌های سترات و پیدولات منیزیم به شیر بز تخمیری تغییر معنی‌داری در میزان pH محصولات تولیدی نسبت به نمونه شاهد ایجاد نکرد [۱۸]. آریانا (۲۰۰۳) بیان کرد که افزودن سطوح مختلف اسیدفولیک به فرمولاسیون ماست قالبی، تاثیر معنی‌داری بر میزان pH نمونه‌ها نداشت [۱۹] که با نتایج بدست آمده در روز اول پژوهش حاضر همسو بود.



**Fig 2** Acidity changes of fermented milk enriched with manganese sulfate and vitamin B<sub>12</sub> in the presence of *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *Delbrooki* (A) and *Lactobacillus acidophilus* La-5 (B) during storage. Different letters shows significant differences between the treatments ( $P < 0.05$ ).

اما سزاجنار و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده کردند که غنی‌سازی با لاکتات منیزیم سبب افزایش معنی‌دار pH و کاهش اسیدیته نسبت به نمونه شاهد گردید [۲۰]. دیانتی و همکاران (۲۰۱۸)

فعال ماندن آنزیم بتا-گالاکتوزیداز می‌باشد. در این مواقع ممکن است pH به کمتر از 4/2 برسد و باعث جدا شدن سرم و عدم تشکیل شبکه ژلی مناسب در حین دوره نگهداری شده و از طرف دیگر زنده‌مانی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک به دلیل افزایش یون‌های هیدروژن در مقایسه با یون‌های لاکتات تحت تأثیر قرار می‌گیرد [22].



**Fig 3** Syneresis amount of fermented milk enriched with manganese sulfate and vitamin B<sub>12</sub> in the presence of *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *Delbrooki* (A) and *Lactobacillus acidophilus* La-5 (B) during storage  
Different letters shows significant differences between the treatments ( $P < 0.05$ ).

نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج آچانتا و همکاران (2007) هم‌خوانی داشت [23]. آن‌ها افزایش سینرسیس ماست قالبی غنی شده با آهن، سلنیوم، منگنز و منیزیم را طی دوره نگهداری در یخچال و همچنین آب‌اندازی کمتر آن‌ها را در مقایسه با شاهد به ظرفیت نگهداری آب بالاتر نسبت دادند [23 و 20] که ناشی از قابلیت شبکه پروتئینی در بدام انداختن آب ماست می‌باشد [19 و 22].

بود ( $P < 0.05$ ). بیشترین میزان آب‌اندازی در روز 1، در تیمار حاوی 0/06 درصد سولفات منگنز رخ داد که اختلاف آماری معنی‌داری با نمونه شاهد داشت ( $P < 0.05$ ). از طرف دیگر افزایش میزان سولفات منگنز به 0/03 درصد و همچنین حضور 0/5 پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> منجر به کاهش آب خارج شده از بافت در مقایسه با نمونه شاهد شد هر چند که از نظر آماری نتایج حاصل معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). اما کمترین درصد آب‌اندازی در تیمار ترکیبی حاوی 0/06 درصد سولفات منگنز + 0/5 پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> مشاهده شد که اختلاف آماری معنی‌داری با نمونه شاهد و سایر تیمارهای مورد بررسی در این پژوهش در روز اول داشت ( $P < 0.05$ ). در روز 21 نگهداری نیز حداقل آب خارج شده از بافت در تیمار ترکیبی در مقایسه با نمونه شاهد و تیمارهای حاوی 0/5 پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> و 0/03 درصد سولفات منگنز به تنهایی رخ داد ( $P < 0.05$ ) که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی سولفات منگنز و ویتامین B<sub>12</sub> در کاهش خروج مایعات از بافت شیر تخمیر شده بود. لازم به ذکر است تیمارهای حاوی 0/5 پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> و 0/03 درصد سولفات منگنز به تنهایی اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر در سطح مورد بررسی نداشتند ( $P > 0.05$ ). همچنین با مقایسه روند تغییرات در دو زمان مورد بررسی، شاهد افزایش میانگین آب‌اندازی نمونه‌های شیر تخمیر شده تولید شده توسط لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیر گونه دلبروکی هستیم ( $P < 0.05$ ، شکل 3- A) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 ( $P < 0.05$ ، شکل 3- B) در روز 21 در مقایسه با روز 1 نگهداری هستیم. نتایج بدست آمده از میزان آب‌اندازی نمونه‌های مختلف شیر تخمیر شده تولیدی در این پژوهش، نتایج حاصل از تغییرات اسیدیته و pH که در بخش قبل (3-1) به آن‌ها پرداختیم را تایید کردند و همان‌طور که در شکل 4- (A) و (B) نشان داده شده است، مؤید وجود ارتباط معنی‌دار بین میزان اسیدیته و pH شیرهای تخمیری و درصد آب‌اندازی بود. در واقع با کاهش pH نمونه‌ها، شاهد افزایش میزان آب‌اندازی هستیم ( $R^2 = 0.99$ ) در حالی که با افزایش اسیدیته درصد آب‌اندازی نمونه‌ها افزایش یافت ( $R^2 = 0.80$ ). مشکلی که در خصوص فرآورده‌های تخمیری وجود دارد افزایش میزان اسید در طول مدت زمان ذخیره‌سازی محصول است که به اسیدی شدن بیش از حد معروف بوده و ناشی از

نگهداری تایید شد ( $P < 0.05$ ). لازم به ذکر است که اختلاف میانگین میزان شاخص  $a^*$  بین دو تیمار ترکیبی و تیمار حاوی ویتامین  $B_{12}$  به تنهایی از نظر آماری معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ، جدول ۱). بالاترین میزان شاخص  $b^*$  در دو تیمار ترکیبی و تیمار حاوی ویتامین  $B_{12}$  به تنهایی مشاهده شد که اختلاف آن‌ها معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ). تیمارهای حاوی سطوح مختلف سولفات منگنز (۰/۰۳ و ۰/۰۰۶ درصد) نیز از نظر شاخص  $b^*$  اختلاف معنی داری با نمونه شاهد نداشتند ( $P > 0.05$ ). روند تغییرات شاخص  $b^*$  در طی دوره نگهداری نیز نزولی ارزیابی شد ( $P < 0.05$ ). در پژوهش حاضر منفی بودن پارامتر  $a^*$  و مثبت بودن پارامتر  $b^*$  نشان می‌دهد که کلیه نمونه‌های شیر تخمیر شده دارای رنگ سبز-زرد بودند ولی شدت آن با یکدیگر متفاوت بود. تغییرات رنگی در شیر می‌تواند به میزان پراکندگی و توزیع میسل‌های کازئین و گلبول‌های چربی در شیر مرتبط باشد. در واقع با کاهش pH و افزایش اسیدیته نمونه‌های مورد بررسی در طول دوره نگهداری و به دنبال آن هیدرولیز کازئین‌ها بعنوان عامل اصلی رنگ شیر، انعکاس نور کاهش می‌یابد که منجر به کاهش شاخص‌های رنگی  $L^*$  و  $b^*$  در نمونه‌ها می‌شود. از طرف دیگر حضور رنگدانه‌ها مانند ریبوفلاوین ( $B_2$ ) تولید شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک و همچنین نوع، غلظت و رنگ ذاتی ترکیبات افزوده شده به شیر جهت غنی‌سازی آن از جمله ویتامین  $B_{12}$  می‌تواند روی فاکتورهای رنگ سنجی موثر باشد [۲۵ و ۲۴]. پژوهش‌های مشابه انجام شده در این زمینه نیز صحت نتایج تحقیق حاضر را تایید کردند به طوری که سانتیلان-یورکوئیزا و همکاران (۲۰۱۷) اعلام کردند که افزودن آهن به نمونه‌ها سبب کاهش روشنایی و زردی رنگ و افزایش قرمزی در شیر تخمیر شده طی دوره انبارمانی گردید که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت نشان داد [۱۴]. همچنین شدت تیره‌گی ایجاد شده در نمونه‌ها با غلظت بکار رفته این عناصر رابطه مستقیم داشت [۱۸]. آریانا (۲۰۰۳) بیان کرد که به دلیل رنگ زرد ذاتی اسید فولیک، افزودن این ویتامین به ماست قالبی سبب کاهش شاخص  $L^*$  و افزایش شاخص  $b^*$  نسبت به نمونه شاهد گردید [۱۹]. کاهش معنی‌دار روشنایی شیرهای تخمیری غنی شده با نمک‌های منیزیم در مقایسه با نمونه شاهد از جمله گزارش‌های دیگر در این زمینه بود [۲۶].

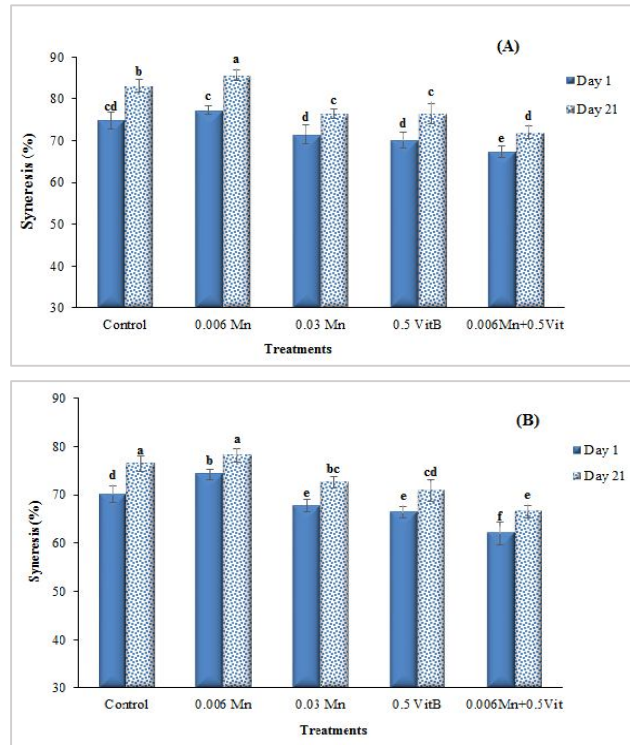


Fig 4 Correlation of syneresis versus pH (A) and acidity (B) of fermented milk enriched with manganese sulfate and vitamin  $B_{12}$

### ۳-۳- رنگ سنجی نمونه‌های شیر تخمیر شده

#### غنی شده در طول دوره نگهداری

شاخص‌های رنگی شیر تخمیر شده غنی شده با سولفات منگنز و ویتامین  $B_{12}$  که در حضور لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و زیروگنه دلبروکی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس  $La-5$  تولید شدند در جدول‌های ۱ و ۲ به ترتیب درج شده‌اند. با توجه به جدول ۱ اثر نوع تیمار و زمان روی شاخص‌های رنگی شیر تخمیر شده تولید شده در حضور هر دو باکتری معنی‌دار ارزیابی شد ( $P < 0.05$ ). همه نمونه‌های مورد بررسی در روز ۱ دوره نگهداری، دارای شدت روشنایی ( $L^*$ ) بالاتری در مقایسه با روز ۲۱ بودند ( $P < 0.05$ ). در مقاطع یکسان دوره نگهداری نیز، بجز تیمار حاوی ۰/۰۳ درصد سولفات منگنز، سایر تیمارهای مورد بررسی، از نظر میزان روشنایی نمونه‌های تولیدی اختلاف آماری قابل توجهی با یکدیگر نداشتند ( $P > 0.05$ ). شاخص  $a^*$  نیز در همه نمونه‌های مورد بررسی در مقایسه با نمونه شاهد پایین‌تر بود ( $P < 0.05$ ). همچنین با بررسی روند تغییرات این شاخص، افزایش  $a^*$  در همه نمونه‌های مورد بررسی در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۱

**Table 1** Color parameters of fermented milk with *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *Delbrookii* enriched with manganese sulfate and vitamin B<sub>12</sub>

Treatment	Storage time (Day)	a*	b*	L*
Control	1	-4.39±0.05 <sup>d</sup>	12.46±0.27 <sup>c</sup>	98.39±0.49 <sup>a</sup>
	21	-3.09±0.06 <sup>a</sup>	8.86±0.49 <sup>e</sup>	93.39±1.25 <sup>b</sup>
0.006% Mn	1	-4.67±0.09 <sup>e</sup>	12.29±0.34 <sup>c</sup>	98.72±0.62 <sup>a</sup>
	21	-3.37±0.08 <sup>c</sup>	8.26±0.51 <sup>e</sup>	94.21±0.99 <sup>b</sup>
0.03% Mn	1	-4.56±0.05 <sup>e</sup>	12.69±0.25 <sup>bc</sup>	93.54±0.73 <sup>b</sup>
	21	-3.17±0.09 <sup>ab</sup>	8.57±0.31 <sup>e</sup>	89.71±1.12 <sup>c</sup>
0.5 ppm Vit B <sub>12</sub>	1	-4.65±0.07 <sup>e</sup>	13.24±0.31 <sup>ab</sup>	97.96±0.69 <sup>a</sup>
	21	-3.27±0.05 <sup>bc</sup>	10.09±0.39 <sup>d</sup>	92.15±0.87 <sup>b</sup>
0.006% Mn+0.5ppm Vit B <sub>12</sub>	1	-4.61±0.08 <sup>e</sup>	13.41±0.17 <sup>a</sup>	98.02±0.52 <sup>a</sup>
	21	-3.35±0.06 <sup>c</sup>	9.97±0.47 <sup>d</sup>	92.91±0.69 <sup>b</sup>

Different letters shows significant differences between the treatments in rows ( $P < 0.05$ ).

**Table 2** Color parameters of fermented milk with *Lactobacillus acidophilus* La-5 enriched with manganese sulfate and vitamin B<sub>12</sub>

Treatment	Storage time (Day)	a*	b*	L*
Control	1	-4.12±0.06 <sup>d</sup>	13.07±0.55 <sup>bc</sup>	97.57±0.37 <sup>a</sup>
	21	-2.94±0.05 <sup>a</sup>	9.79±0.27 <sup>e</sup>	94.31±0.42 <sup>bc</sup>
0.006% Mn	1	-4.42±0.04 <sup>e</sup>	13.38±0.64 <sup>abc</sup>	98.21±0.97 <sup>a</sup>
	21	-3.11±0.08 <sup>bc</sup>	10.25±0.41 <sup>e</sup>	94.95±0.61 <sup>bc</sup>
0.03% Mn	1	-4.39±0.08 <sup>e</sup>	12.79±0.32 <sup>c</sup>	93.91±0.62 <sup>c</sup>
	21	-3.02±0.09 <sup>ab</sup>	9.42±0.62 <sup>e</sup>	90.23±0.41 <sup>d</sup>
0.5 ppm Vit B <sub>12</sub>	1	-4.47±0.09 <sup>e</sup>	13.92±0.41 <sup>ab</sup>	98.01±0.72 <sup>a</sup>
	21	-3.16±0.06 <sup>bc</sup>	11.21±0.54 <sup>d</sup>	95.31±0.65 <sup>b</sup>
0.006% Mn+0.5ppm Vit B <sub>12</sub>	1	-4.43±0.09 <sup>e</sup>	14.06±0.27 <sup>a</sup>	98.34±0.81 <sup>a</sup>
	21	-3.21±0.07 <sup>c</sup>	11.67±0.32 <sup>d</sup>	94.51±0.52 <sup>bc</sup>

Different letters shows significant differences between the treatments in rows ( $P < 0.05$ ).

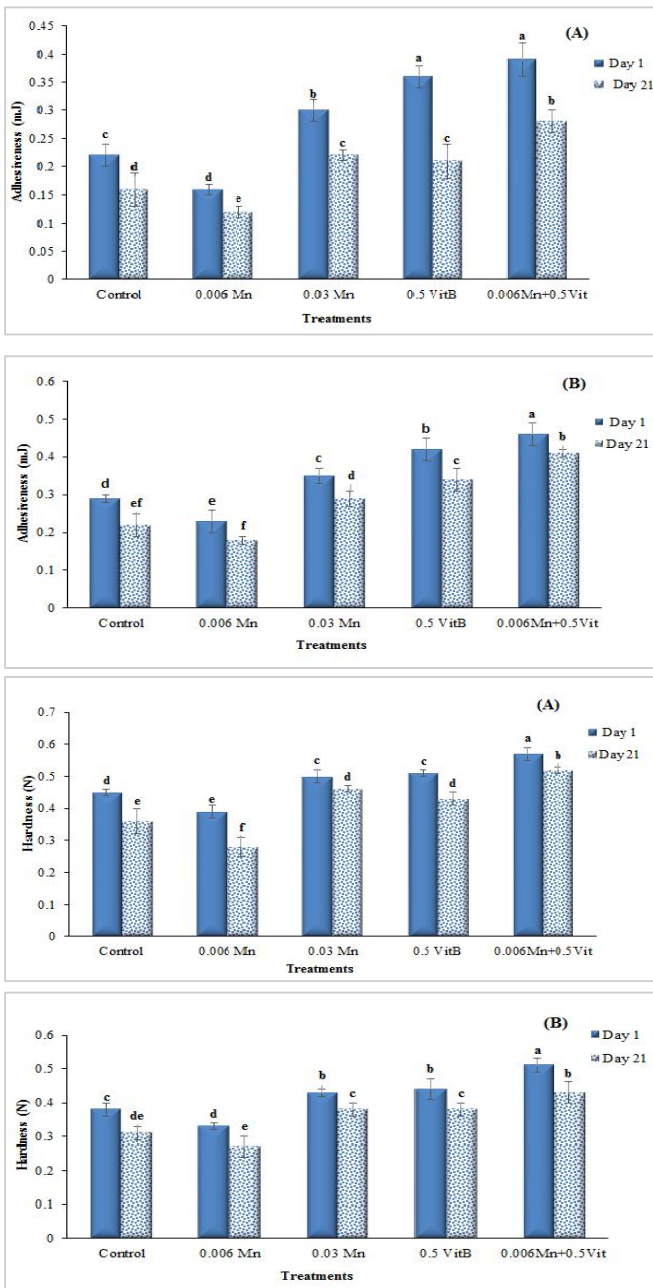
(A) اثر نوع تیمار و زمان مورد بررسی روی چسبندگی و سفتی بافت شیر تخمیر شده تولید شده توسط لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی معنی دار ارزیابی شد ( $P < 0.05$ ). در روز ۱ نگهداری، بافت شیر تخمیر شده تولیدی در تیمار ترکیبی و تیمار حاوی ۰/۵ پی پی ام ویتامین B<sub>12</sub> در مقایسه با نمونه شاهد چسبندگی بیشتری داشت ( $P < 0.05$ ) که از نظر آماری میانگین میزان چسبندگی در این دو تیمار معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ). نتایج مشابه موارد اشاره شده در روز ۲۱ نگهداری نیز بدست آمد، به طوری که بیشترین میزان چسبندگی در مقایسه با نمونه شاهد و همه تیمارهای مورد بررسی فقط در تیمار ترکیبی مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بررسی سفتی شیر تخمیر شده تولیدی در حضور لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی (شکل ۵-A) در دو زمان ۲۱ روز نشان داد که همه تیمارهای مورد بررسی بجز تیمار حاوی ۰/۰۶ درصد سولفات منگنز، بافت سفت تری در مقایسه با

### ۳-۴- ارزیابی ویژگی های بافتی نمونه های شیر

#### تخمیر شده غنی شده در طول دوره نگهداری

تشکیل ژل، یکی از خواص بافتی مهم شیر تخمیر شده است. این ساختار در نتیجه تجمع کازئین از طریق کاهش pH و ایجاد باند دی سولفیدی بین کاپا-کازئین و پروتئین های دناتوره شده شیر تخمیر شده تشکیل می شود [۲۷]. علاوه بر شرایط محیطی نظیر اسیدیته و pH، سایر پارامترها مانند ترکیبات بر پایه شیر، تیمار حرارتی بکار رفته، فرآیند تخمیر، شرایط انبارسازی و کشت آغازگر نیز نقش مهمی در تشکیل ساختار ژل دارند [۲۸]. در پژوهش حاضر، ویژگی های بافتی شامل چسبندگی و سفتی شیر تخمیر شده است غنی شده با سولفات منگنز و ویتامین B<sub>12</sub> که در حضور لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکی (A) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 (B) تولید شدند در شکل ۵ نمایش داده شده است. با توجه به شکل ۵-





**Fig 5** Textural attributes of fermented milk enriched with manganese sulfate and vitamin B<sub>12</sub> in the presence of *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *Delbrookii* (A) and *Lactobacillus acidophilus* La-5 (B) during storage. Different letters shows significant differences between the treatments ( $P < 0.05$ ).

### ۳-۵- ارزیابی ویژگی‌های حسی نمونه‌های شیر

#### تخمیر شده غنی شده در طول دوره نگهداری

خواص حسی محصولات لبنی غنی شده، تحت تأثیر نوع مواد معدنی و میزان ترکیبات افزوده شده به محصول است [۱۸]. ویژگی‌های حسی شیر تخمیر شده غنی شده با سولفات منگنز و ویتامین B<sub>12</sub> که در حضور لاکتوباسیلوس بولگاریکوس

نمونه شاهد داشتند که در تیمار ترکیبی سفتی شیر تخمیر شده محسوس تر نیز بود ( $P < 0.05$ ). نتایج بدست آمده با نتایج گزارش شده توسط سانتیلان-یورکوئیزا و همکاران (۲۰۱۷) و سزاجنار و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت داشت [۲۰ و ۱۴]. آن‌ها اثبات کردند که افزایش میزان سفتی بافت نمونه‌های ماست غنی شده با آهن، کلسیم، زینک و منیزیم به واکنش بین این عناصر با ماتریکس پروتئین‌های ماست برمی‌گردد که سبب قوی‌تر شدن ساختار ژلی ماست شده است [۲۰ و ۱۴]. چسبندگی و سفتی شیر تخمیر شده غنی شده با ویتامین B<sub>12</sub> و سولفات منگنز در حضور لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 به ترتیب در شکل ۵-(B) نشان داد که در دو زمان ۱ و ۲۱ روز، همه تیمارهای مورد بررسی بجز تیمار حاوی ۰/۰۰۶ درصد سولفات منگنز بافت چسبنده‌تر و سفت‌تری در مقایسه با نمونه شاهد داشتند که در تیمار ترکیبی، انسجام و بهبود ویژگی‌های بافتی شیر تخمیر شده مونه تولیدی چشم‌گیر بود ( $P < 0.05$ ). از طرف دیگر، بین ویژگی‌های بافتی تیمار حاوی ۰/۰۰۶ درصد سولفات منگنز و نمونه شاهد نیز اختلاف قابل توجه آماری در سطح مورد آزمون مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ، روز ۲۱ نگهداری). لازم به ذکر است، ماحصل نتایج بافت‌سنجی در دو زمان مورد بررسی، حاکی از کاهش میزان چسبندگی و سفتی بافت نمونه تولیدی غنی شده با ویتامین و سولفات منگنز با افزایش طول دوره نگهداری بود ( $P < 0.05$ ). آچانتا و همکاران (۲۰۰۷)، اوکاک و کوز (۲۰۱۰) و زنامیروسکا و همکاران (۲۰۱۹) نیز نتایج مشابه با نتایج بدست آمده در این پژوهش ارائه کردند [۲۳ و ۲۹ و ۱۸]. آچانتا و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که یون‌های منگنز و کروم می‌توانند سبب تغییر میکروساختارهای ژل ماست شده و ماتریکس ژلی بازتری که دارای ویسکوزیته کمتر و بافت نرم‌تر باشد را تشکیل دهند [۲۳]. اوکاک و کوز (۲۰۱۰) نشان دادند که با افزایش سطح مس در فرمولاسیون ماست سفتی بافت افزایش یافت که به دلیل کاهش تجمع پروتئین‌ها و کاهش میزان سرم بدام افتاده در فضاهای خالی بود [۲۹]. همچنین فرم پیدولات منیزیم منجر به افزایش سفتی بافت محصول در مقایسه با فرم‌های سیترات و لاکتات گردید [۱۸].

باکتری‌های مورد بررسی نسبت به نمونه شاهد بدبویی و بدطعمی نداشتند. همچنین زمان نگهداری نیز تأثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های ذکر شده نمونه‌ها نداشت ( $P > 0.05$ ). آچانتا و همکاران (۲۰۰۷) و سانتیلان-یورکوئیزا و همکاران (۲۰۱۷) نیز اظهار داشتند که تلفیق آهن، منیزیم، منگنز و سلنیوم [۲۳] و همچنین کلسیم و زینک [۱۴] در فرمولاسیون ماست قالبی، ویژگی‌های حسی نمونه‌های تولیدی را نسبت به شاهد تغییری نداد و زمان نگهداری نیز تأثیر معنی‌داری بر ظاهر و عطر و طعم ماست‌های تولیدی نداشت [۲۳]. غنی‌سازی ماست با لاکتات منیزیم سبب افزایش امتیاز مزه ترش و نمکی نمونه‌های تولیدی نسبت به شاهد گردید ولی تأثیری بر تلخی و بدطعمی نداشت [۲۰].

زیرگونه دلبروکی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 تولید شدند در جدول‌های ۳ و ۴ به ترتیب درج شده‌اند. با توجه به نتایج، همه نمونه‌های مورد بررسی بجز تیمار حاوی ۰/۰۰۶ درصد سولفات منگنز، دارای مزه ترشی بیشتری در مقایسه با نمونه شاهد بودند ( $P < 0.05$ ، روز ۱ دوره نگهداری) اما مزه تیمار دارای ۰/۰۰۶ درصد سولفات منگنز مشابه نمونه شاهد ارزیابی شد ( $P > 0.05$ ، روز ۲۱ دوره نگهداری). همچنین مزه تیمارهای ترکیبی، دارای ۰/۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>12</sub> و دارای ۰/۰۳ درصد سولفات منگنز نیز از نظر آماری تفاوت قابل توجهی با یکدیگر نداشتند ( $P > 0.05$ ). از طرف دیگر، با افزایش طول دوره نگهداری، ترشی شیر تخمیر شده غنی شده با ویتامین و منگنز افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). اما نکته قابل توجه در این پژوهش این بود که نمونه‌های غنی شده در حضور

**Table 3** Sensory characteristics of fermented milk with *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *Delbrooki* enriched with manganese sulfate and vitamin B<sub>12</sub>

Treatment	Storage time (Day)	Sour taste	Off-odor	Off-flavor
Control	1	4.31±0.39 <sup>c</sup>	1.17±0.29 <sup>a</sup>	1.50±0.59 <sup>a</sup>
	21	6.21±0.30 <sup>d</sup>	1.25±0.32 <sup>a</sup>	1.65±0.39 <sup>a</sup>
0.006% Mn	1	3.02±0.49 <sup>f</sup>	1.30±0.32 <sup>a</sup>	1.69±0.43 <sup>a</sup>
	21	5.74±0.38 <sup>d</sup>	1.52±0.25 <sup>a</sup>	1.83±0.21 <sup>a</sup>
0.03% Mn	1	6.31±0.51 <sup>cd</sup>	1.21±0.47 <sup>a</sup>	1.77±0.37 <sup>a</sup>
	21	8.81±0.55 <sup>a</sup>	1.39±0.39 <sup>a</sup>	1.91±0.23 <sup>a</sup>
0.5 ppm Vit B <sub>12</sub>	1	7.22±0.62 <sup>bc</sup>	1.09±0.31 <sup>a</sup>	1.45±0.31 <sup>a</sup>
	21	9.01±0.44 <sup>a</sup>	1.20±0.31 <sup>a</sup>	1.65±0.22 <sup>a</sup>
0.006% Mn+0.5ppm Vit B <sub>12</sub>	1	7.96±0.23 <sup>b</sup>	1.34±0.26 <sup>a</sup>	1.32±0.57 <sup>a</sup>
	21	9.25±0.29 <sup>a</sup>	1.39±0.25 <sup>a</sup>	1.50±0.38 <sup>a</sup>

Different letters shows significant differences between the treatments in rows ( $P < 0.05$ ).

**Table 4** Sensory characteristics of fermented milk with *Lactobacillus acidophilus* La-5 enriched with manganese sulfate and vitamin B<sub>12</sub>

Treatment	Storage time (Day)	Sour taste	Off-odor	Off-flavor
Control	1	2.47±0.26 <sup>c</sup>	1.24±0.31 <sup>b</sup>	1.68±0.36 <sup>a</sup>
	21	4.08±0.26 <sup>d</sup>	1.61±0.42 <sup>ab</sup>	1.79±0.29 <sup>a</sup>
0.006% Mn	1	1.54±0.32 <sup>f</sup>	1.41±0.46 <sup>ab</sup>	1.82±0.38 <sup>a</sup>
	21	3.85±0.31 <sup>d</sup>	1.72±0.39 <sup>ab</sup>	1.99±0.31 <sup>a</sup>
0.03% Mn	1	4.52±0.38 <sup>cd</sup>	1.62±0.69 <sup>ab</sup>	1.74±0.41 <sup>a</sup>
	21	6.97±0.53 <sup>b</sup>	1.98±0.42 <sup>a</sup>	2.03±0.54 <sup>a</sup>
0.5 ppm Vit B <sub>12</sub>	1	5.03±0.47 <sup>c</sup>	1.79±0.48 <sup>ab</sup>	1.96±0.40 <sup>a</sup>
	21	7.31±0.48 <sup>ab</sup>	1.89±0.25 <sup>a</sup>	1.92±0.63 <sup>a</sup>
0.006% Mn+0.5ppm Vit B <sub>12</sub>	1	4.83±0.35 <sup>c</sup>	1.69±0.58 <sup>ab</sup>	2.01±0.49 <sup>a</sup>
	21	8.32±0.66 <sup>a</sup>	1.92±0.29 <sup>a</sup>	2.40±0.62 <sup>a</sup>

Different letters shows significant differences between the treatments in rows ( $P < 0.05$ ).

## ۴- نتیجه گیری

شیر تخمیر شده پروبیوتیک معمول‌ترین و مهم‌ترین ماده غذایی پروبیوتیکی محسوب می‌شود. تحقیقات اخیر نشان داده که زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طی نگهداری کاهش می‌یابد. یکی از روش‌های حفظ زنده‌مانی این باکتری‌ها، غنی کردن محیط رشد آن‌ها با مکمل‌هایی نظیر عناصر معدنی و ویتامین‌ها می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد، افزودن ۰/۰۰۶ درصد سولفات منگنز و ۰/۵ پی‌پی‌ام ویتامین B<sub>۱۲</sub> منجر به بهبود ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، بافتی و حسی شیر تخمیر شده تولیدی شد. همچنین افزودن مکمل‌های مورد بررسی در این پژوهش به شیر می‌تواند سبب افزایش سرعت رشد و زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زیرگونه دلبروکوی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-۵ در شیر تخمیر شده پروبیوتیک و به دنبال آن کاهش طول دوره گرمخانه‌گذاری شود.

## ۵- منابع

- [1] Szajnar, K., Znamirowska, A., and Kuźniar, P. 2020. Sensory and textural properties of fermented milk with viability of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 and increased calcium concentration. *International Journal of Food Properties*. 23(1):582-598.
- [2] Fatemi, H. 2000. *Food Chemistry*. Enteshar Corporation Eds. 480pp. [In Persian].
- [3] Shafiei, Y. 2017. Evaluation of physicochemical and sensory changes of probiotic yogurt free and encapsulated *Lactobacillus plantarum* PTCC-1058 during storage, *Journal of Innovative Food Technologies*. 1:101-114 [In Persian].
- [4] Hayek, S. A., and Ibrahim, S. A. 2013. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*. 4(11):73-87. doi: 10.4236/fns.2013.411A010.
- [5] LeBlanc, J. G., Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L. G., Courau, S., and Langella, P. 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microbial cell factories*. 16(1):79. doi: 10.1186/s12934-017-0691-z.
- [6] Pawlos, M., Znamirowska, A., Szajnar, K., Kalicka, D. 2016. The Influence of the dose of calcium bisglycinate on physicochemical properties, sensory analysis and texture profile of kefir during 21 days of cold storage. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 15(1):37-45. doi: 10.17306/J.AFS.2016.1.4.
- [7] Sun, W., Wang, Y., Zhang, W., Ying, H., Wang, P. 2018. Novel surfactant peptide for removal of biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 172:180-186. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.029.
- [8] Yao, C., Chou, J., Wang, T., Zhao, H., and Zhang, B. 2018. Pantothenic acid, vitamin C and biotin play important roles in the growth of *Lactobacillus helveticus*. *Frontiers in microbiology*. 9:1194.
- [9] Demirhan, E., Gürses, B., Yalçın, B. E., Apar, D. K., and Özbek, B. 2013. Influence of vitamin (B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, C) and ions (Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) on kefir grain biomass growth. *Food Science and Biotechnology*. 22(4):1007-1013.
- [10] Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., and Somboonpanyakul, P. 2018. B vitamins and prebiotic fructooligosaccharides of cashew apple fermented with probiotic strains *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* and *Bifidobacterium longum*. *Process biochemistry*. 70:9-19.
- [11] Izadi, M., Eskandari, M. H., Niakousari, M., Shekarforoush, Sh., Haifpour, M. A., Izadi, Z. 2014. Investigating the effect of ingredients supplementation on survival rate of bacteria in probiotic yogurt powder. *Journal of food science and technology*. 42(11):107-116 [In Persian].
- [12] Forgani, S., Peighambaroust, S.H., Olad Ghaffari, A. 2017. Investigating organoleptic and physicochemical properties of functional set yogurt incorporating oat milk. *Iran Journal of Biosystem Engineering*. 48(3):279-288 [In Persian].
- [13] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2006. Milk and milk products-Determination of titrable acidity and value pH-Test method. ISIRI no. 2852. 1st Revision, Karaj: ISIRI [In Persian].
- [14] Santillan-Urquiza, E., Mendez-Rojas, M. A., Valez-Ruiz, J. F. 2017. Fortification of yogurt with nano and micro sized calcium, iron and zinc, effect on the physicochemical

- gelatin on functional properties of non-fat yogurt, *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*. 8(2):221-229 [In Persian].
- [23] Achanta, K. Aryana, K.-J. Boeneke, C.-A. 2007. Fat free plain set yogurts fortified with various minerals. *LWT-Food Science and Technology*. 40:429-442. doi: 10.1016/j.lwt.2006.01.001.
- [24] Nouri, M., Ezzatpanah, H., Abbasi, S., Behmadi, H. 2013. Investigating the stability of chemical and physical characteristics of non-fat set yoghurt containing textured milk during the storage time. *Journal of Food Science and Technology*, 40(1):57-66 [In Persian].
- [25] Nozière, P. Graulet, B. Lucas, A. Martin, B. Grolier, P. Doreau, M. 2006. Carotenoids for ruminants: from forages to dairy products. *Animal Feed Science Technology*. 131(3-4):418-450.
- [26] Szajnar K., Znamirowska, A., Kalicka, D. 2019. Effects of various magnesium salts for the production of milk fermented by *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. *International Journal of Food Properties*. 22(1):1087-1099.
- [27] Damina M.R., Alcântarab, M.R., Nunesb, A.P., Oliveira, M.N. 2009. Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. *LWT-Food Science and Technology*. 42(10):1744-1750.
- [28] Akalin, A.S., Unal, G., Dinkci, N., Hayaloglu, A.A. 2012. Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*. 95(7):3617-362. doi:10.3168/jds.2011-5297.
- [29] Ocak, E. and Köse, Ş. 2010. The effects of fortifying milk with Cu, Fe and Zn minerals on the production and texture of yoghurt. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 8(2):122 -125.
- and rheological properties. *LWT-Food Science and Technology*. 80:462-469.
- [15] Baryłko-Pikielna, N. Matuszewska, I. Sensoryczne Badania Żywności. Podstawy–Metody–Zastosowania. 2014. Sensory Food Testing. Fundamentals–Methods–Applications. *Wyd. Naukowe Pttż. Krakow*. 66:150–157.
- [16] Burgain, J., Scher, J., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Cailliez-Grimal, C., Corgneau, M., Francius, G., Gaiani, C. 2014. Significance of bacterial surface molecules interactions with milk proteins to enhance microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Hydrocolloids*. 41:60-70.
- [17] Groot, M.N., Klaassens, E., De Vos, W.M., Delcour, J., Hols, P. and Kleerebezem, M. 2005 Genome-based in silico detection of putative manganese transport systems in *Lactobacillus plantarum* and their genetic analysis. *Microbiology*. 151:1229–1238.
- [18] Znamirowska, A., Szajnar, K., Pawlos m. 2019. Organic magnesium salts fortification in fermented goat's milk. *International Journal of Food Properties*. 22(01):1615–1625. doi:10.1080/10942912.2019.1666871.
- [19] Aryana, K.J. 2003. Folic acid fortified fat free plain set yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*. 56(4):219–222. doi: 10.1046/j.1471-0307.2003.00105.x.
- [20] Szajnar K., Znamirowska, A., Kalicka, D., Piotr Kuźniar, P., Najgebauer-Lejko, D. 2018. Quality of yogurt fortified with magnesium lactat. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 17(3):247–255.
- [21] Dianti, EP., Anjani, G., Afifah, DN., N Rustanti, N., Panunggal B. 2018. Nutrition quality and microbiology of goat milk keffFortified with vitamin B<sub>12</sub> and vitamin D<sub>3</sub> during storage. *3rd International Conference on Tropical and Coastal Region Eco Development*. doi:10.1088/1755-1315/116/1/012032.
- [22] Ebdali, S., Motamedzadegan, A. 2013. Effect of partial replacement of solids with



## Evaluation of manganese sulfate and vitamin B<sub>12</sub> influence on physicochemical, sensory and textural attributes of fermented milk with *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *Delbrueckii* and *Lactobacillus acidophilus* La-5

Ranjbar Hasan Barogh, M.<sup>1</sup>, Bolandi, M.<sup>2\*</sup>, Mohammadi Nafchi, A.<sup>2</sup>

1. PhD Student of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
2. Associate Professor of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

## Article History:

Received 16 July 2020  
Accepted 04 November 2020

## Keywords:

Fermentation time,  
Lactic acid bacteria,  
Manganese sulfate,  
Probiotic,  
Vitamin B12.

DOI: 10.52547/fsct.18.02.10

\*Corresponding Author E-Mail:  
bolandi75@gmail.com

Dairy products fortified with minerals and vitamins play an important role in the development of functional foods. Among lactic acid bacteria, yogurt starters have a special role in the industry, and their health-promoting function has been confirmed. The long duration of fermentation time by lactic acid bacteria in dairy products, takes time and energy and leads to increased production costs. Therefore, the identification of appropriate conditions and factors affecting the growth of different strains are the basic necessities of production. Hence, in this research, the effect of adding manganese sulfate (0, 0.006 and 0.03%) and vitamin B<sub>12</sub> (0 and 0.5 ppm) alone as well as their combination on the physicochemical, textural, and sensory properties of fermented milk produced in the presence of *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *Delbrueckii* and *Lactobacillus acidophilus* La-5 were investigated. The results showed a decrease in pH and an increase in acidity during the storage period. The L\* and b\* index decreased and the values of a\* increased during the storage period ( $P < 0.05$ ). Also, textural characteristics and syneresis rate in samples containing 0.006% manganese sulfate and 0.5 ppm of vitamin B<sub>12</sub> alone and their combination treatment, containing 0.006% manganese sulfate+0.5 ppm vitamin B<sub>12</sub> were significantly improved ( $P < 0.05$ ). As the storage time proceeded, the sour taste of samples enriched with vitamin B<sub>12</sub> and manganese increased ( $P < 0.05$ ). While the off-odor and off-taste were not felt in these samples. Also, storage time had no significant effect on these sensory characteristics ( $P > 0.05$ ).