بررسی ویژگی‌های میکروبیولوژیک نوشیدنی شیری تخمیری پروبیوتیک حاوی اسید پروپیونیک در پایان تخمیر و طی نگهداری یخچالی

شهلا فرهادی[۱]، کیانوش خسروی دارانی[۲*]، مرتضی مشایخ[۳]، سید امیر محمد مرتضویان[۴]، عبدالرضا محمدی[۵]، فرزانه شهراز[۶]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- استادیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- استادیار گروه آموزشی صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- استادیار گروه آموزشی صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵- استادیار گروه آموزشی صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۶- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۷)

چکیده

هدف تحقیق حاضر تولید نوشیدنی شیری تخمیری با استفاده از *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و بررسی ویژگی‌های میکروبیولوژیک، بلافاصله پس از تخمیر و طی دوره نگهداری یخچالی است. در این مطالعه با استفاده از طرح فاکتوریل کامل، اثر دو متغیر دمای گرمخانه‌گذاری و نسبت ریزسازواره‌های موجود در تلقیح بر ویژگی‌های میکروبیولوژیک نوشیدنی شیری تخمیری بررسی شد. برای تهیه نوشیدنی شیری تخمیری از کشت همزمان *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* به نسبت 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. قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از طریق کشت نوشیدنی تهیه شده روی محیط MRS آگار و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C و قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* از طریق کشت روی محیط سدیم لاکتات آگار و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C تعیین شد. قابلیت زنده‌مانی ریزسازواره‌های تلقیح شده، در نمونه حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک در روزهای ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ تعیین شد. به‌علاوه میزان دوفاز شدن نوشیدنی شیری تهیه شده طی ۷ روز نگهداری یخچالی اندازه گرفته شد. بیشترین تعداد سلول زنده *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 به‌دست آمد. قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* با دمای گرمخانه‌گذاری ارتباط معکوس و معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) را نشان داد. بیشترین قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نوشیدنی تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* معادل ۱ به ۸ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ °C مشاهده شد. قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ °C، در هفته اول و آخر به ترتیب، به‌طور قابل ملاحظه کاهش یافت.

کلید واژگان: پروبیوتیک، *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، نوشیدنی شیری تخمیری، ویژگی‌های میکروبیولوژیک.

*مسئول مکاتبات: kiankh@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

۱- مقدمه

پروپیونی‌باکتریوم‌ها ریزسازواره‌های گرم مثبت، کاتالاز مثبت، غیراسپورزا، غیرمتحرک، بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل‌اند و همانند سایر پروبیوتیک‌ها، اخیرا بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در تخمیر انجام شده توسط گونه‌های *پروپیونی-باکتریوم*، ۳ مول اسید لاکتیک به ۲ مول اسید پروپیونیک، ۱ مول اسید استیک و ۱ مول دی اکسید کربن تبدیل می‌شود (۱). فواید پروبیوتیک گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* به‌خوبی شناخته شده است. برخی گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* قادر به تولید ویتامین‌های B_2 و B_{12} هستند که این موضوع به‌خصوص در کشورهای دچار کمبود این ویتامین‌ها و در رژیم افراد گیاهخوار اهمیت دوچندان می‌یابد [۲ و ۳]. این باکتری‌ها از طریق تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر بر pH روده اثر کرده و جذب آهن و کلسیم را در روده افزایش می‌دهند [۴ و ۵]. از طرف دیگر رشد بیفیدوباکتریوم‌ها را افزایش می‌دهند و از این طریق فلور میکروبی روده را تنظیم و منجر به حفظ سلامت دستگاه گوارش می‌شوند [۶]. پروپیونی‌باکتریوم‌ها همچنین از طریق مهار سنتز کلسترول در کبد، از طریق ممانعت از فعالیت آنزیم هیدروکسی‌متیل-گلوتاریل Co.A سنتاز و افزایش دفع اسیدهای صفراوی از طریق مدفوع، قادر به کاهش سطح کلسترول پلاسما هستند [۷ و ۸]. از فواید دیگر به‌کارگیری گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* در تهیه محصولات لبنی می‌توان به ارتقای ویسکوزیته در محصولاتی نظیر ماست (از طریق تولید اگزوپلی‌ساکاریدها) [۶، ۹ و ۱۰] و مهار رشد ریزسازواره‌های نامطلوب در محصول (از طریق تولید اسید پروپیونیک و باکتریوسین) و در نتیجه افزایش ماندگاری محصول [۶] اشاره کرد. با وجود مطالعات زیادی که در زمینه استفاده از گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* به‌عنوان باکتری آغازگر در تهیه پنیر انجام شده است، تنها در مطالعه انجام شده توسط اکینسی و گورل در سال ۲۰۰۸ از کشت همزمان باکتری‌های آغازگر ماست و ترکیبات متفاوت پروپیونی‌باکتریوم‌ها شامل *پروپیونی‌باکتریوم توانی‌یی*[1] و *پروپیونی‌باکتریوم‌جنسه‌نی‌یی*[2] با میزان تلقیح ۲ درصد حجمی در تمام نمونه‌ها، به‌منظور تهیه ماست استفاده شد. براساس نتایج این مطالعه فعالیت پروپیونی‌باکتریوم‌ها با باکتری‌های آغازگر ماست تداخلی نداشت. پروپیونی‌باکتریوم‌ها به‌علت تولید اگزوپلی‌ساکارید، ویسکوزیته محصول نهایی را افزایش می‌دهند. به‌طوری‌که ماست تهیه شده از طریق کشت همزمان باکتری‌های آغازگر ماست و *پروپیونی‌باکتریوم‌توانی‌یی* از مستحکم‌ترین ساختار برخوردار بود. در ماست تهیه شده با استفاده از رشد همزمان *پروپیونی‌باکتریوم‌توانی‌یی*، *پروپیونی‌باکتریوم جنسه‌نی‌یی* و باکتری‌های آغازگر ماست بالاترین میزان استالدئید در روز اول به‌دست آمد. گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* به علت فعالیت پروتئولیتیک پایین که منجر به رشد آهسته این باکتری‌ها می‌شود، در صورتی که به‌تنهایی به‌عنوان باکتری آغازگر در تهیه محصولات لبنی استفاده شوند مدت زمان گرمخانه‌گذاری را افزایش می‌دهند در حالی که در کشت همزمان با باکتری‌های آغازگر ماست (*استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[3] و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*[4]) و سایر باکتری‌های اسیدلاکتیک مدت زمان گرمخانه‌گذاری کاهش می‌یابد [۶]. با عنایت به این که در زمینه تولید نوشیدنی شیری تخمیری با استفاده از *پروپیونی‌باکتریوم* در ایران، نه تنها در مقیاس صنعتی بلکه در مقیاس آزمایشگاهی نیز مطالعه‌ای انجام نشده است و با توجه به رشد روزافزون مصرف نوشیدنی‌های لبنی، هدف تحقیق حاضر تولید نوشیدنی شیری تخمیری با استفاده از کشت همزمان *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی*[5] و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[6] و بررسی ویژگی‌های میکروبیولوژیک محصول تولید شده، پس از تخمیر و طی نگهداری یخچالی است.

۲- روش تحقیق

۲-۱- کشت آغازگر

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 از شرکت پیشگامان پخش صدیق تهیه شد. *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* (DSM 20270) به‌صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری و در محیط مایع پروپیونی‌باکتریوم کشت و هر ماه پاساژ داده شد. این محیط کشت شامل ۱ درصد کازئین، ۰/۵ درصد عصاره مخمر و ۱ درصد لاکتات سدیم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است که پس

1. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *thoenii*
2. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. jensenii
3. *Streptococcus thermophilus*
4. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*
5. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*
6. *Lactobacillus acidophilus*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

از تهیه و تنظیم pH در بازه ۷/۲ – ۷ در دمای °C ۱۲۱ به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. به‌منظور آماده‌سازی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* برای تلقیح، ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون مادر حاوی cfu/mL 10^{9} باکتری در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع پروپیونی‌باکتریوم پاساژ داده و به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور °C ۳۰ قرار داده شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع در دمای °C ۴ و با سرعت g ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از جدا کردن فاز رویی، به رسوب حاصله ۲۵ میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات اضافه و مجددا با سرعت g ۳۰۰۰ در دمای °C ۴ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به‌دست آمده از این مرحله با ۱۵ میلی‌لیتر محلول بافر نمکی فسفات و گلیسرول به نسبت ۸۵ به ۱۵ به ترتیب، به‌خوبی برای مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شد و سوسپانسیون به‌دست آمده در ۱۵ ویال سترون ۱ میلی‌لیتری تقسیم شد و در فریزر °C ۸۰- 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. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۷ روز در دمای °C ۳۰ در شرایط غیرهوازی قرار داده شد (۶ و ۱۱). بر اساس نتایج به‌دست آمده سوسپانسیون موجود در هر ویال تهیه شده حاوی cfu/mL 6×10^{10} *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* است.

۲-۲- روش تولید نمونه‌ها

شیر مورد استفاده برای تولید نوشیدنی از طریق بازسازی پودر شیر خشک بی چربی و پس از استاندارد کردن ماده خشک (معادل ۴ درصد) تهیه شد. شیر بازسازی شده، ۳۰ دقیقه در دمای °C ۸۵ حرارت داده شد. سپس از کشت همزمان *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* به نسبت ۱ به ۲، ۱ به ۴ و ۱ به ۸ به ترتیب (بر اساس تعداد سلول‌های زنده ریزسازواره‌های تلقیح شده)، استفاده شد. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰، ۳۵ و °C ۴۰ تا رسیدن به pH ۴، انجام شد. شاخص‌های pH ، اسیدیته و پتانسیل احیا طی مدت زمان تخمیر اندازه‌گیری شدند.

۲-۳- اندازه‌گیری میزان اسید پروپیونیک

پس از هموژن کردن محصول توسط دستگاه اولتراتوراکس، mL ۲۰ اسیدسولفوریک ۰/۱ مولار به ۵ گرم نمونه تهیه شده اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از آماده‌سازی نمونه، میزان اسید پروپیونیک تولید شده در محصول با استفاده از دستگاه HPLC مجهز به ستون ODS-5 اندازه‌گیری شد. جهت آنالیز از فاز متحرک شامل اسید سولفوریک 10^{-4} مولار (فاز متحرک A) و متانول (فاز متحرک B) و سرعت جریان mL/min ۱ استفاده و آنالیز اسیدهای مذکور در طول موج آشکارساز معادل nm ۲۱۰ انجام شد.

۲-۴- تعیین قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از طریق کشت محصول تولید شده بر روی محیط کشت MRS آگار و گرمخانه‌گذاری در دمای °C ۳۷ و در شرایط هوازی به‌مدت ۷۲ ساعت در رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-7} [۱۲] و قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* از طریق کشت بر روی محیط سدیم لاکتات آگار وگرمخانه‌گذاری در دمای °C ۳۰ و در شرایط غیرهوازی به‌مدت ۷ روز در رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-7} بررسی شد. شرایط بی‌هوازی با استفاده از جار بی‌هوازی و گازپک ایجاد شد. به‌منظور تهیه محیط کشت سدیم لاکتات آگار از ۱۰ گرم کازئین، ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم لاکتات سدیم، ۲ گرم پیرووات سدیم، ۲ گرم گلیسین، ۱/۵ گرم کلرید سدیم، ۰/۵ گرم تواین ۸۰، ۰/۲۵ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات و ۱۲ گرم آگار در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. پس از تنظیم pH در بازه ۰/۲ ± ۷، محیط کشت تهیه شده در دمای °C ۱۲۱ به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد [۱۱]. کلیه آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین گزارش شد. نسبت بقاء رشد (GPI) از تقسیم تعداد نهایی باکتری‌های تلقیح شده بر تعداد اولیه آن‌ها به‌دست آمد [۱۳].

۲-۵- تعیین میزان دوفاز شدن نمونه‌ها طی نگهداری یخچالی

میزان دوفازشدن محصول تولید شده حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک طی نگهداری در دمای °C ۴ به‌مدت ۷ روز، با استفاده از استوانه مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری سترون اندازه‌گیری شد. به‌منظور تعیین میزان دوفازشدن، نوشیدنی حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک توسط دستگاه هموژنایزر اولتراتوراکس

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

در 2 سرعت ۵۰۰۰ و (rpm) ۱۵۰۰۰ هموژن شد. سپس نوشیدنی شیری تخمیری در استوانه مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری در دمای ۴ °C به‌مدت ۷ روز نگهداری شد و میزان دوفاز شدن در محصول، طی این مدت اندازه گرفته شد. درصد سرم‌دهی طی دوره نگهداری یخچالی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۱۴]:

درصد سرم‌دهی = ۱۰۰ × (کل ارتفاع نمونه / ارتفاع بخش سرم در سطح)

۲-۶- ارزیابی آماری

وجود تفاوت معنی‌دار میان میانگین داده‌های حاصل از تیمارهای اعمال شده، با استفاده از آزمون ANOVA در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ از نرم افزار SPSS بر مبنای طرح عاملی کامل (فاکتوریل کامل) بررسی شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم شد.

۳- یافته‌ها و بحث

نتایج حاصل از ارزیابی آماری اطلاعات به‌دست آمده در خصوص قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* در جدول ۱ و ۲ آورده شده است.

جدول ۱ نتایج حاصل از ارزیابی آماری اطلاعات به‌دست آمده در خصوص قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

منبع تغییرات	SS	D. F	Variance	F. value	F (table) α = 0.05	P. value
دما	۰/۰۸۵۶۰۷	۲	۰/۰۴۲۸۰۳۵	۰/۸۲۰۵۷۳	۳/۵۵ [۱]	۴/۳۲۶
نسبت تلقیح	۰/۴۸۴۴۹۶	۲	۰/۲۴۲۲۴۸۰	۴/۶۴۴۰۶۲	۳/۵۵ [۱]	۰/۷۶۴
اندرکنش دما و نسبت تلقیح	۰/۰۹۷۹۴۸	۴	۰/۰۲۴۴۸۷۱	۰/۴۶۹۴۳۵	۲/۹۳ [۲]	۶/۲۴۱
خطا	۰/۹۳۸۹۳۴	۱۸	۰/۰۵۲۱۶۳۰	-	-	
مجموع	۱/۶۰۶۹۸۵	۲۶	–	-	-	

۱- F جدول با درجه آزادی معادل ۲، درجه آزادی خطای معادل ۱۸ و α=0.05: ۳/۵۵

۲- F جدول با درجه آزادی معادل ۴، درجه آزادی خطای معادل ۱۸ و α=0.05: ۲/۹۳

جدول ۲ نتایج حاصل از ارزیابی آماری اطلاعات به‌دست آمده در خصوص قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی*

منبع تغییرات	SS	D. F	Variance	F. value	F (table) α = 0.05	P. value
دما	۱۰/۰۹۶۱۹۶	۲	۵/۰۴۸۰۹۸	۷۴/۷۴۱۵۳	۳/۵۵ [۱]	۰/۰۴۷
نسبت تلقیح	۳/۲۹۸۵۱۹	۲	۱/۶۴۹۲۵۹	۲۴/۴۱۸۷۳	۳/۵۵ [۱]	۰/۱۴۵
اندرکنش دما و نسبت تلقیح	۰/۶۵۱۲۰۴	۴	۰/۱۶۲۸۰۱	۲/۴۱۰۴۱	۲/۹۳ [۲]	۱/۲۱۶
خطا	۱/۲۱۵۷۳۴	۱۸	۰/۰۶۷۵۴۱	-	-	-
مجموع	۱۵/۲۶۱۶۵۲	۲۶	–	-	-	-

۱- F جدول با درجه آزادی معادل ۲، درجه آزادی خطای معادل ۱۸ و α=0.05: ۳/۵۵

۲- F جدول با درجه آزادی معادل ۴، درجه آزادی خطای معادل ۱۸ و α=0.05: ۲/۹۳

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

۳-۱- قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* بلافاصله پس از تخمیر

قابلیت زنده‌مانی و ظرفیت رشد *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین قابلیت زنده‌مانی *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 به‌دست آمد. قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* به‌طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) با دمای گرمخانه‌گذاری ارتباط دارد، به‌طوری‌که با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۴۰ °C در هر یک از نسبت‌های تلقیح شده، قابلیت زنده‌مانی این باکتری به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. علت این موضوع می‌تواند رشد سریعتر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در دمای ۳۵ و ۴۰ °C نسبت به دمای ۳۰ °C باشد که در نتیجه آن سرعت کاهش pH افزایش و طول مدت گرمخانه‌گذاری کاهش می‌یابد و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* فرصت کافی برای رشد نخواهد داشت. به‌علاوه کاهش سریع pH می‌تواند منجر به کاهش قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* شود. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد، با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۳۵ و ۴۰ °C در هر یک از نسبت‌های تلقیح شده، طول مدت گرمخانه‌گذاری از حدود سه روز به دو روز کاهش می‌یابد. در مطالعه انجام شده توسط اکینسی و گورل در سال ۲۰۰۸ نیز گزارش شد که فعالیت پروتئولیتیک پایین گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* منجر به رشد آهسته این باکتری‌ها می‌شود [۶]. به‌علاوه بر اساس نتایج مطالعات انجام شده دمای مناسب رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۴۰ °C – ۳۵ است (۱۵). در هر یک از ۳ سطح دمای به‌کار برده شده، بیشترین قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* در نسبت ریزسازواره‌های تلقیح شده معادل ۱ به ۴ به‌دست آمد. نتایج به‌دست آمده نشان داد، قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* با افزایش نسبت تلقیح ۴:۱ به ۸:۱ کاهش می‌یابد. علت این موضوع می‌تواند ناشی از کمبود مواد مغذی مورد نیاز در محیط، به دلیل تلقیح مقادیر زیاد *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* باشد.

جدول ۳ قابلیت زنده‌مانی و نسبت بقاء رشد باکتری‌های پروبیوتیک در پایان دوره تخمیر*

نسبت تلقیح	تیمار: دمای گرمخانه‌گذاری	تعداد اولیه باکتری‌های پروبیوتیک (log cfu/mL): P**	A***	P + A	پس از تخمیر: تعداد نهایی باکتری‌های پروبیوتیک (log cfu/mL): P	A	P + A	نسبت بقاء رشد (GPI): P	A	P + A
۱ به ۲	۳۰°C	۷/۳۰	۷/۰۰	۷/۴۸	۷/۴۱^{c}	۷/۶۹^{b}	۷/۸۸^{d}	۱/۲۸	۴/۹۰	۲/۵۳
۱ به ۲	۳۵°C	۷/۳۰	۷/۰۰	۷/۴۸	۷/۰۸^{c}	۷/۷۸^{ab}	۸/۱۶^{bc}	۰/۶۰	۶/۰۳	۴/۸۰
۱ به ۲	۴۰°C	۷/۳۰	۷/۰۰	۷/۴۸	۶/۰۳^{d}	۸/۰۱^{ab}	۸/۰۲^{cd}	۰/۰۵	۱۰/۲۰	۳/۵۰
۱ به ۴	۳۰°C	۷/۶۰	۷/۰۰	۷/۷۰	۸/۶۰^{a}	۸/۰۶^{ab}	۸/۷۲^{a}	۱۰/۰۰	۱۱/۵۰	۱۰/۵۰
۱ به ۴	۳۵°C	۷/۶۰	۷/۰۰	۷/۷۰	۷/۴۲^{c}	۸/۱۴^{a}	۸/۲۳^{bc}	۰/۶۶	۱۳/۸۰	۳/۴۰
۱ به ۴	۴۰°C	۷/۶۰	۷/۰۰	۷/۷۰	۷/۰۶^{c}	۸/۱۱^{ab}	۸/۱۵^{bc}	۰/۲۹	۱۲/۹۰	۲/۸۲
۱ به ۸	۳۰°C	۷/۹۰	۷/۰۰	۷/۹۵	۸/۰۵^{b}	۸/۰۸^{ab}	۸/۳۷^{b}	۱/۴۰	۱۲/۰۰	۲/۶۰
۱ به ۸	۳۵°C	۷/۹۰	۷/۰۰	۷/۹۵	۷/۳۶^{c}	۸/۱۶^{a}	۸/۲۳^{bc}	۰/۲۹	۱۴/۴۰	۱/۸۹
۱ به ۸	۴۰°C	۷/۹۰	۷/۰۰	۷/۹۵	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*

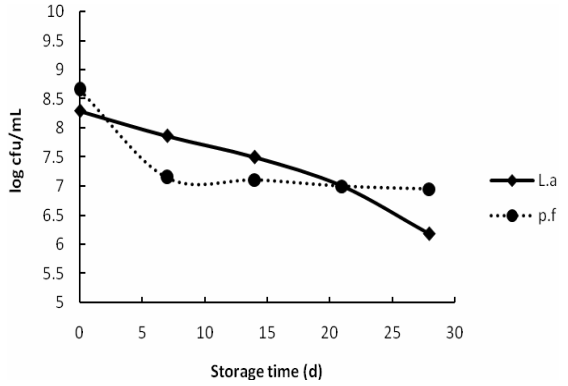
[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

۳-۲- قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بلافاصله پس از تخمیر

همان‌طورکه در جدول ۳ مشخص است، بیشترین تعداد زنده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نوشیدنی تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* معادل ۱ به ۸ و گرمخانه‌گذاری در دمای °C ۳۵ مشاهده شد. در نسبت ثابت ریزسازواره‌های تلقیح شده، بیشترین قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در دمای °C ۳۵ به‌دست آمد. افزایش نسبت *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* اثر منفی بر قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نداشت که همانند نتایج مطالعه اکینسی و گورل در سال ۲۰۰۸ [۶] نشان دهنده عدم تداخل فعالیت گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* با رشد باکتری‌های آغازگر لاکتیکی است. بلکه افزایش نسبت *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* منجر به افزایش جزئی در قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* شد. نتایج مطالعه لیو و مون (۱۳۸۲) نشان داد، کشت مخلوط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* منجر به افزایش میزان رشد هر دو ریزسازواره و قابلیت زنده‌مانی بالاتر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می‌شود. به‌طوری‌که، تعداد سلول‌های زنده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در کشت مخلوط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* ۱/۴ برابر کشت خالص *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است. در این مطالعه گزارش شد، تولید CO_2 توسط *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* منجر به تحریک رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می‌شود [۱۶]. نتایج مطالعه انجام شده توسط مرتضویان (۲۰۰۸) نیز نشان داد افزودن گاز CO_2 تا حدود ۰/۴ درصد (وزنی/ حجمی) نه تنها اثر سوء بر رشد پروبیوتیک‌ها ندارد بلکه بقای آن‌ها را نیز در مواردی افزایش می‌دهد. همچنین در این مطالعه مشاهده شد افزودن گاز CO_2 اثر مثبت بیشتری بر بقای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نسبت به *بیفیدوباکتریوم* دارد [۱۴]. به‌علاوه، تولید مقادیر بالای لاکتات توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می‌تواند رشد *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و تولید اسید توسط این ریزسازواره را در کشت مخلوط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* تحریک نماید [۱۶]. بر اساس نتایج به‌دست آمده، میزان اسید تولید شده توسط گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* در روز دوم و در محیط حاوی لاکتات معادل میزان اسید تولید شده در روز هشتم و در محیط حاوی لاکتوز است[۱۷].

۳-۳- قابلیت زنده‌مانی ریزسازواره‌های تلقیح 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 °C ۳۰ حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک بود این نمونه به‌مدت ۲۸ روز در دمای °C ۴ نگهداری و در روزهای ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک تلقیح شده، در نمونه تعیین شد. قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نوشیدنی شیری تخمیری حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک، طی ۲۸ روز نگهداری در دمای °C ۴ در شکل ۱ آورده شده است. قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* از log cfu/mL ۸/۶۶ در روز ۰ به log cfu/mL ۶/۹۵ در روز ۲۸ و قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از log cfu/mL ۸/۲۹ در روز ۰ به log cfu/mL ۶/۱۸ در روز ۲۸ کاهش یافت. قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* طی ۲۸ روز نگهداری در دمای °C ۴، در هفته اول به‌طور قابل ملاحظه کاهش یافت و پس از سازگاری با این شرایط، کاهش قابل ملاحظه در قابلیت زنده‌مانی این ریزسازواره مشاهده نشد.



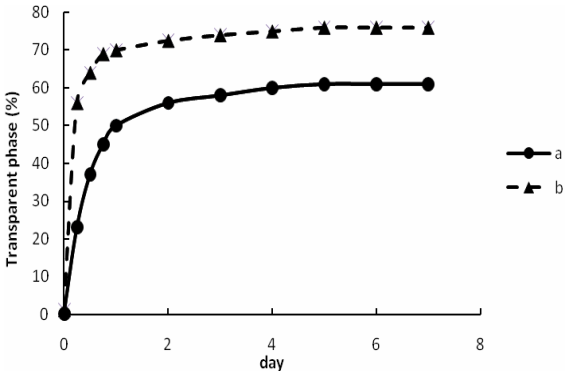
شکل ۱ قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی ۲۸ روز نگهداری در دمای °C ۴.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

نتایج مطالعه انجام شده توسط پارکس و همکاران (۱۹۶۷) نیز نشان داد، گونه‌های *پروپیونی‌باکتریوم* قادر به رشد در دمای ۷/۲ °C و کمتر می‌باشند [۱۸]. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی، در هفته آخر به‌طور قابل ملاحظه کاهش می‌یابد. علت کاهش قابل ملاحظه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در هفته آخر می‌تواند ناشی از تشدید اثر مهارکنندگی اسیدهای آلی تولید شده در محصول در اثر کاهش pH، طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی باشد. بر اساس مطالعات انجام شده، اثر مهارکنندکی اسیدهای آلی بر حسب pH، نوع و غلظت اسید، نوع سویه و فاز رشد باکتریایی متفاوت است [۱۹ و ۲۰]. نتایج مطالعه لیند و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داد اسید پروپیونیک از خاصیت مهارکنندگی بیشتری نسبت به اسید استیک و لاکتیک برخوردار است. همچنین اثر مهارکنندگی اسیدهای آلی با کاهش pH، به‌طور قابل ملاحظه افزایش می‌یابد. (۲۱). قابلیت زنده‌مانی هیچ یک از باکتری‌های پروبیوتیک تلقیح شده، در پایان نگهداری یخچالی به کمتر از 10^6 cfu/mL کاهش نیافت. بنابراین نوشیدنی شیری تهیه شده در گروه محصولات پروبیوتیک قرار می‌گیرد زیرا سطح پیشنهادی از طرف صنایع تولید کننده محصولات پروبیوتیک 10^6 cfu/g سلول زنده این باکتری-هاست [۲۲].

۳-۴- میزان دوفاز شدن

شکل ۲ میزان دوفاز شدن نوشیدنی شیری حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک را در دو سرعت متفاوت هموژنیزاسیون (a :۵۰۰۰ rpm و b :۱۵۰۰۰ rpm) نشان می‌دهد.



شکل ۲ درصد ترسیب نوشیدنی لبنی حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک در 2 سرعت متفاوت هموژنیزاسیون (a :۵۰۰۰ rpm و b :۱۵۰۰۰ rpm)

طی نگهداری نوشیدنی تهیه شده در دمای ۴ °C، دو فاز در استوانه مدرج قابل رویت بود : فاز شفاف رویی و فاز کدر قرار گرفته در قسمت پایین استوانه مدرج. نتایج به‌دست آمده نشان داد با افزایش سرعت هموژنیزاسیون از ۵۰۰۰ به ۱۵۰۰۰ rpm، میزان دوفاز شدن افزایش می‌یابد. با افزایش بیشتر سرعت هموژنیزاسیون با از هم گسیختگی درشت مولکول‌های کلوئیدی موجود در شیر، سرعت ترسیب افزایش می‌یابد. فرآیند سرم‌دهی شامل دو رویداد هم‌زمان رسوب تدریجی فاز پراکنده و جداشدن بخش سرم به سطح است. هرچه ذرات تشکیل دهنده یک پراکنش (دیسپرسیون) ریزتر باشند، چگالی نسبی هر یک از آن‌ها نسبت به فاز آبی در قیاس با وضعیتی که این ذرات به یکدیگر می‌پیوندند و فضاهای میان‌بافتی شامل فاز آبی در ساختار توده‌های انبوهه شده در آن‌ها پدید می‌آید، بیشتر است. تیمارهای همگن شده به سبب ریزتر شدن قابل توجه ذرات، سرعت سرم‌دهی به مراتب بیشتری نسبت به تیمارهای همگن نشده دارند زیرا در تیمارهای همگن نشده ساختارهای توده شکل و کم‌چگال‌تر، رسوب کمتر آن‌ها را نتیجه می‌دهد. در مطالعه انجام شده توسط مرتضویان (۲۰۰۸) نیز مشاهده شد تیمارهای همگن شده به سبب ریزتر شدن قابل توجه ذرات، سرعت سرم‌دهی به مراتب بیشتری نسبت به تیمارهای همگن نشده دارند [۱۴].

۴- نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌دست آمده، مناسب‌ترین دما جهت رشد *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در این محصول، به ترتیب ۳۰ و ۳۵ °C است. بیشترین قابلیت زنده‌مانی *پروپیونی‌باکتریوم* فرئودنریچی‌یی زیرگونه *شرمانی‌یی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نوشیدنی تهیه شده با استفاده از نسبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی-یی* معادل ۱ به ۴ و ۱ به ۸ به ترتیب، به‌دست آمد. قابلیت زنده‌مانی هیچ یک از باکتری‌های تلقیح شده، در پایان نگهداری یخچالی به کمتر از 10^6 cfu/mL کاهش نیافت. بنابراین نوشیدنی شیری تهیه شده درگروه محصولات پروبیوتیک قرارمی‌گیرد و می‌توان نتیجه‌گیری نمود این محصول محیط مناسبی برای رشد این باکتری‌هاست. به‌علاوه، نتایج ارزیابی حسی با استفاده از آزمون هدونیک نشان داد، نوشیدنی تهیه

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

شده حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک در مقایسه با سایر نوشیدنی‌های تهیه شده از مطلوبیت بیشتری برخوردار است.

۵- منابع

[1]Zhang, A., Yang, S., 2009. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. Process Biochemistry. 44: 1346-1351.

[2]Leblance, J.G., Rutten, G., Bruinenberg, P., Sesma, F., Savoy de Giori, G. Smid, E.J., 2006. A novel dairy product fermented with *Propionibacterium freudenreichii* improves the riboflavin status of deficient rats. Nutrition. 22: 645-651.

[3]Quesada-Chanto, A., Schmid-Meyer, A.C., Schroeder, A.G., Carvaiho-Jonas, M.F., Blanco, I., Jonas R., 1998. Effect of oxygen supply on biomass, organic acids and vitamin B12 production by *Propionibacterium shermanii*. World J. Microbiol. Biotechnol. 14: 843-846.

[4]Bougle, D., Vaghefi-Vaezzadeh, N., Roland, N., Bouvard, G., Arhan, P., Bureau, F., Neuville, D., Maubois, J.L., 2002. Influence of short-chain fatty acids on iron absorption by proximal colon. Scand. J. Gastroenterol. 37: 1008–1011.

[5] Trinidad, T.P., Wolever, T.M., Thompson, L.U., 1996. Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. Am. J. Clin. Nutr. 63: 754–758.

[6] Ekinci, F.Y., Gurel, M., 2008. Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. J. Dairy Sci. 91: 892–899.

[7] Deming, C., Morand, C., Levrat, M.A., Besson, C., Moundras, C., Remesy, C., 1995. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. Br. J. Nutr. 74: 209-219.

[8] Hara, H., Haga, S., Aoyama, Y., Kiriyama, S., 1999. Short chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. J. Nutr. 129: 942-948.

[9] Deutsch, S.M., Falentin, H., Dols-Lafargue, M., Lapointe, G., Roy, D., 2008. Capsular exopolysaccharide biosynthesis gene of *propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*. Int. J. Food microbiol. 125: 252-258.

[10]Gorret, N., Maubois, J.L., Ghoul, M., Engasser, J.M. 2001. Exopolysaccharide production by *Propionibacterium acidipropionicii* on milk microfiltrate. J. Appl. Microbiol. 90: 779-787.

[11] Tharmaraj, N. and Shah, N.P., 2003. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus,* Bifidobacteria, *Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus,* and Propionibacteria. J. Dairy Sci. 86: 2288–2296.

[12] Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B.C., 2001. Yogurt as probiotic carrier food (Review). Int Dairy J. 11: 1-17.

[13] Mortazavian, A.M., Khosrokhavar, R., Rastegar, H., Mortazaei, G.R., 2010. Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of doogh (Iranian fermented milk drink). Ital. J. Food Sci. 22(1): 98-104.

[14]Mortazavian, A.M., 2008. Effects of fundamental formulating and process factors on qualitative aspects of probiotic Doogh. PhD Diss. Univ. Tehran. [in Persian]

[15] Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic bacteria. Trends Food Sci. Technol. 10: 139-157.

[16] Liu, J.A.P., Moon, N.J., 1982. Commensalistic interaction between *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium shermanii*. Appl. Environ. Microbiol. 44(3): 715-722.

[17] El-Hagarawy, I.S., Slatter, W.L., Harper, W.J., 1957. Organic acid production by propionibacteria. I. Effect of strains, pH, carbon source, and intermediate fermentation products. J. Dairy Sci. 10(56): 579-587.

[18] Parks, H.S., Reinbold, G.W., Hammond, E.G., Clark, W.S., 1967. Growth of Propionibacteria at low temperatures. J. Dairy Sci. 50(4): 589-591.

[19] Cheung, H.N.B., Huang, G.H., Yu, H., 2010. Microbial-growth inhibition during composting of food waste: Effects of organic acids. Bioresour. Technol. 101: 5925–5934.

[20] Sundberg, C., Jonsson, H., 2005. Process inhibition due to organic acids in fed-batch composting of food waste – influence of starting culture. Biodegradation. 16: 205–213.

[21] Lind, H., Jonsson, H., Schnurer, J., 2005. Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. Int. J. Food Microbiol. 98: 157– 165.

[22] Chandan, R.C., 1999. Enhancing market value of milk by adding cultures. J. Dairy Sci. 82: 2245-2256.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

Study of the microbiological characteristics of fermented dairy probiotic beverage containing propionic acid after fermentation and during cold storage

Farhadi, S. H. [1], Khosravi-Darani, K. [2 *], Mashayekh, M. [3], Mortazavian , A. M. 4, Mohammadi, A. [5], Shahraz, F. [6]

1- Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
2- National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
3- Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
4- Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
5- Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
6- Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences
(Received:90/1/28 Accepted:90/12/7)

The objective of this research was to produce fermented dairy beverage with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* and study the microbiological characteristics immediately after fermentation and during cold storage. In this study, impact of two process variables of incubation temperature and inoculation ratio on microbiological characteristics was studied by full factorial design. For the preparation of the fermented dairy beverage, a mixed culture of *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* was grown at the ratio of 1:2, 1:4 and 1:8 and incubation was performed at 30, 35 and 40°C until the pH reached 4 ± 0.1. Cell count of *L. acidophilus* was conducted on MRS Agar and incubation at 37 °C. Enumeration of *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* was done on sodium lactate agar (NaLa agar) medium and incubation at 30 °C. In the most suitable condition for propionic acid production, profile of viability of microorganisms was determined in intervals of 0, 7, 14, 21 and 28 days. Also, phase separation of produced beverage was studied during the first week of storage at 4°C. The maximum viable cell count of *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* was occurred by inoculation ratio of 1 to 4 and incubation temperature of 30 °C. There was an adverse and significant ($P < 0.05$) relationship between viability of *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* and incubation temperature. The maximum cell count of *L. acidophilus* was observed in a mixed culture of *L. acidophilus* and *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* at ratio of 1 to 8 and incubation temperature of 35°C. Considerable decreased cell counts of *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* and *L. acidophilus* were obtained during the first and the last weeks of cold storage, respectively.

Key words: Fermented dairy beverage, *Lactobacillus acidophilus*, Microbiological characteristics, Probiotic, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*.

* Corresponding Author E-Mail address: kiankh@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]