



## بررسی ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی شیر طعم‌دار پروبیوتیک با استفاده از باسیلوس کواگولانس و شیره انگور

نسیم کاظم علیلو<sup>۱</sup>، صابر امیری<sup>۲</sup>، محمود رضازاد باری<sup>۳</sup>، صونا دودانگه<sup>۴</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی صبا، ارومیه، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده	اطلاعات مقاله
<p>امروزه، مصرف شیر و فرآورده‌های آن به عنوان یکی از شاخص‌های توسعه جوامع بشری مطرح است. شیر طعم‌دار، یک نوشیدنی سالم، مغذی، خوشمزه و رفع‌کننده تشنگی است که توسط گروه عظیمی از مردم به ویژه کودکان مصرف می‌شود. از این رو، هدف از این پژوهش استفاده از شیره انگور به عنوان طعم‌دهنده در شیر پروبیوتیک حاوی باسیلوس کواگولانس و بررسی ویژگی‌های کیفی این محصول جدید بود. برای این منظور دو فاکتور عددی کمی شامل غلظت شیره انگور (۰/۱۷، ۱، ۳، ۵ و ۵/۸۳ درصد) و مدت زمان نگهداری (۰/۹۶، ۲، ۴/۵، ۷ و ۸/۰۴ روز)، هر کدام در پنج سطح با به کارگیری روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی جهت بهینه‌سازی فرمولاسیون این محصول جدید استفاده شد. نتایج نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف شیره انگور و مدت زمان نگهداری بر pH، اسیدیته قابل تیتراسیون، ماده خشک، چربی و زنده‌مانی میکروارگانیسم باسیلوس کواگولانس شیر طعم‌دار پروبیوتیک معنی‌دار بود (<math>P &lt; 0/05</math>). بهینه‌سازی براساس حداکثر مقدار pH، حداقل مقدار اسیدیته قابل تیتراسیون و همچنین حداکثر زنده‌مانی میکروارگانیسم باسیلوس کواگولانس انجام شد. شرایط بهینه در این پژوهش با مطلوبیت کل ۹۵٪، مقدار ۱ درصد شیره انگور و مدت زمان نگهداری ۲ روز به دست آمد.</p>	<p>تاریخ‌های مقاله :</p> <p>تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۰۴</p> <p>تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۰۷</p>
	<p>کلمات کلیدی:</p> <p>باسیلوس کواگولانس،</p> <p>شیر پروبیوتیک،</p> <p>شیر طعم‌دار،</p> <p>شیره انگور.</p>
	<p>DOI: 10.52547/fsct.18.03.02</p> <p>* مسئول مکاتبات:</p> <p>m.rezazadehbari@urmia.ac.ir</p>

## ۱- مقدمه

مصرف سرانه‌ی شیر در کشورهای جهان به عنوان شاخصی از پیشرفت و توسعه تلقی می‌شود و همبستگی بالایی بین مصرف فرآورده‌های لبنی و سطح سلامتی افراد جامعه به لحاظ کارایی و ضریب هوشی، میزان ابتلا به بیماری‌های عفونی، تنظیم فعالیت‌های متابولیکی بدن، کاهش فشارخون، جلوگیری از ابتلا به سرطان کولون و پیشگیری از پوکی استخوان وجود دارد [۱]. با این وجود، طعم شیر با ذائقه‌ی برخی مصرف‌کنندگان به ویژه کودکان سازگاری ندارد. بنابراین برای ایجاد علاقه‌مندی به مصرف شیر و رفع این مشکل، بخش بزرگی از تولید شیرهای آشامیدنی به تولید شیرهای طعم‌دار اختصاص یافته است [۲ و ۳]. جهت افزایش رغبت به مصرف شیر به خصوص در کودکان، شیرهای طعم‌دار نقش بسزایی را ایفا می‌کنند. استفاده از افزودنی‌های مجاز در نوشیدنی‌های لبنی به منظور ایجاد عطر و طعم و رنگ‌های گوناگون برای تأمین سلیقه‌ی گروه‌های مصرف‌کننده به افزایش مصرف این دسته از محصولات به خصوص در میان کودکان منجر شده است [۴]. بر همین اساس شیرهای طعم‌دار متنوعی در واحدهای صنعتی، تولید می‌گردد که از این میان می‌توان به شیرکاکائو، شیرنسکافه، شیرعسل، شیرقهوه، شیرخرما و غیره اشاره نمود. اهمیت افزودن ترکیبات مختلف به شیر زمانی بیش‌تر می‌شود که علاوه بر ایجاد رنگ، عطر و طعم خاص در محصول، بتوان با بهره‌گیری از این افزودنی‌ها، اثرات فراسودمندی شیر را نیز افزایش داد [۵ و ۶]. استفاده از افزودنی‌های با منشأ طبیعی و ویژگی‌های تغذیه‌ای مناسب، مورد توجه کارشناسان قرار دارد. استفاده از طعم‌های میوه، رنگ‌ها و موادی همچون کاکائو و عسل در تولید شیرهای طعم‌دار متداول است [۷ و ۸].

فلور روده انسان حاوی انواع مختلفی از باکتری‌ها است. دسته‌ای از این باکتری‌ها که به باکتری‌های پروبیوتیک معروف هستند، علاوه بر کمک به گوارش، مولکول‌های پیچیده و ترکیباتی مانند ویتامین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را تولید می‌کنند که برای بدن مفید می‌باشد [۹]. WHO و FAO پروبیوتیک را این گونه تعریف می‌کنند، «پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف آن‌ها به مقدار کافی سبب نمایان شدن اثرات سلامت‌بخش در بدن می‌شود [۱۰ و ۱۱]. به منظور ایجاد اثرات سلامت‌بخش بر بدن میزبان لازم است که تعداد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک

در محصول غذایی حامل تا حد معینی بالا باشد  $10^6 \text{ cfu/ml}$  تا  $10^{10} \text{ cfu/ml}$  [۱۲ و ۱۳]. پروبیوتیک‌ها بر تعادل باکتری‌های مفید و مضر روده تأثیر می‌گذارند و این تعادل را به نفع افزایش جمعیت باکتری‌های مفید تغییر می‌دهند، در واقع پروبیوتیک‌ها از همین طریق، اثرات سلامت‌بخش خود را در بدن انسان انجام می‌دهند [۱۴ و ۱۵]. شیره انگور طبیعی که عصاره تغلیظ شده انگور می‌باشد و تمام خواص آن را در خود دارد، حاوی ویتامین‌های A, B, C, D و املاحی مانند آهن، منیزیم، منگنز، کلر، ید، آرسنیک، فسفر و سیلیس است. همچنین دارای مقدار زیادی تانن می‌باشد. این محصول حاوی مواد معدنی به ویژه کلسیم و آهن بوده و منبع غنی از مونوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز می‌باشد. ترکیبات آب انگور به جز فیبرها و روغن‌های هسته، تقریباً مشابه انگور است. آب انگور حاوی اسید تارتاریک، مالیک، سیتریک و همچنین ویتامین‌های تیامین، آسکوربیک اسید، بیوتین، نیاسین، فولیک اسید و پانتوتنیک اسید می‌باشد [۱۶]. این ماده خوراکی، بسیار انرژی‌زا بوده و برای فصل زمستان که بدن به انرژی بیش‌تری برای گرم کردن خود احتیاج دارد، بهترین غذا محسوب می‌شود. در این راستا استفاده از ترکیباتی نظیر شیره انگور در مواد غذایی، به عنوان یک طعم‌دهنده می‌تواند پاسخی به نیاز مصرف‌کنندگان باشد که از جمله در فرآورده‌های آردی به کار می‌رود. مطالعاتی در زمینه‌ی افزودن شیره انگور به فرمولاسیون فرآورده‌هایی نظیر محصولات قنادی و لبنی صورت گرفته است که نتایج حاصل، تأثیر افزودن شیره انگور بر ویژگی‌های فیزیکی کیک را این گونه نشان داد که با افزودن شیره انگور، روشنایی و فعالیت آبی کیک‌ها کاهش و محتوی مواد معدنی در محصول افزایش یافت. امروزه آب انگور تغلیظ شده به عنوان شیرین‌کننده محصولات غذایی کاربرد زیادی دارد؛ به‌طوری‌که در تولید انواع مربا، ژله، ماست‌های طعم‌دار، کوکی و دیگر محصولات نانوائی می‌تواند به‌عنوان جایگزین شکر استفاده گردد [۱۷]. امروزه مصرف‌کنندگان مواد غذایی به مواردی مانند طعم مطبوع، پایین بودن کالری و چربی و اثر مفید غذا در سلامتی توجه خاصی دارند. از این رو صنایع غذایی در تلاش است محصولات تولید نماید که طعم و خواص بهتری داشته باشند که در این بین فرآورده‌های شیری فرآوری‌شده با پروبیوتیک‌ها از اهمیت زیادی در ارتقای سلامت برخوردار می‌باشند.

## ۲- مواد و روش کار

### ۲-۱- مواد مورد استفاده

جهت انجام آزمون‌ها، باکتری پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانس *IBRC-M 10807* به صورت پودر، از شرکت فرآورده‌های زیستی پردیس رشد مهرگان، شیر انگور (دوشاب گستر پاکیزه) از بازار محلی ارومیه و شیر خام گاوی با محتوای چربی ۳/۵ درصد از لبنیاتی سطح شهر خریداری و مورد استفاده قرار گرفت و سایر مواد شیمیایی (سدیم هیدروکسید، اسید سولفوریک، الکل آمیلیک و غیره) و محیط‌های کشت (NYSM آگار و غیره) مورد استفاده از برندهای معتبر مواد شیمیایی تهیه شدند.

### ۲-۲- روش‌ها

#### ۲-۲-۱- روش تهیه شیر طعم‌دار پروبیوتیک

شیره انگور در نسبت‌های مشخص (۰/۱۷، ۱، ۳، ۵ و ۵/۸۳ درصد)، به شیر پاستوریزه شده در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه اضافه گردید و عمل هم‌زدن تارسیدن به دمای ۴۰ درجه سلسیوس انجام شد و سپس پودر باسیلوس کوآگولانس (*Bacillus coagulans*) اضافه گردید. دمای نمونه‌ها را همراه با هم‌زدن مخلوط به ۸۰ درجه سلسیوس رسانده و سپس تا دمای ۴ درجه سلسیوس سرد شدند و تا روز آزمون در بطری شیشه‌ای در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. آنالیز شیر خام مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

Table 1 Characteristics of raw milk

Characteristics	Value
pH	6.65±0.02
Acidity (%)	0.16±0.01
Fat content (%)	3.53±0.05
Moisture (%)	88.69±0.04
Density (g/cm <sup>3</sup> )	1.029±0.002

#### ۲-۲-۲- آزمون‌های کیفی

##### ۲-۲-۲-۱- اندازه‌گیری pH

pH نمونه توسط دستگاه pH متر دیجیتالی (Metrohm 781 No، ساخت سوئیس) اندازه‌گیری شد [۱۸].

##### ۲-۲-۲-۲- اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیتراسیون

برای این منظور تیتراسیون با استفاده از محلول ۰/۱ مولار

NaOH انجام شد و به صورت درصد اسید لاکتیک بیان گردید [۱۹].

##### ۲-۲-۲-۳- اندازه‌گیری چربی

اندازه‌گیری میزان چربی با استفاده از روش ژربر و براساس استاندارد ملی ایران شماره ۶۹۵ انجام شد [۲۰].

##### ۲-۲-۲-۴- اندازه‌گیری ماده خشک

این آزمون با استفاده از تبخیر در آون (مدل SHIMAZ CO، ساخت ایران) طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۶۳۷ در طی مدت نگهداری اندازه‌گیری شد [۲۱].

##### ۲-۲-۲-۵- شمارش باسیلوس کوآگولانس

به منظور شمارش تعداد اسپور باکتری پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانس در نمونه‌های شیر طعم‌دار از روش تهیه سریال رقت در محلول نرمال سیلین (نمک ۰/۹ درصد) و کشت پورپلیت استفاده شد. در این مرحله پس از تهیه رقت‌های مورد نظر، در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه حرارت‌دهی انجام شد تا با از بین رفتن سلول‌های رویشی بتوان اسپور باکتری باسیلوس کوآگولانس را شمارش کرد. شمارش تعداد اسپور باکتری پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانس در محیط کشت NYSM آگار با pH=۶/۷ تحت شرایط هوازی و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد [۲۲].

### ۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه دو فاکتور غلظت شیره انگور (۰/۱۷، ۱، ۳، ۵ و ۵/۸۳ درصد) و مدت زمان نگهداری (۰/۹۶، ۲، ۴/۵، ۷ و ۸/۰۴ روز) هر کدام در پنج سطح با به کارگیری روش سطح پاسخ و طرح آماری مرکب مرکزی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این طرح، ۹ نمونه همراه با ۴ نقطه مرکزی در جهت برآورد عدم تطابق و تکرارپذیری در نظر گرفته شد. پس از انجام آزمایشات جهت گردآوری اطلاعات برای آزمون، معنی‌دار بودن فاکتورها و اثرات متقابل آن‌ها از روش تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) و توزیع فیشر استفاده شد و سطح معنی‌داری  $\alpha=0/05$  در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها از نسخه ۷ نرم افزار Design expert استفاده شد.

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- بررسی تغییرات pH شیر طعم‌دار

## پروبیوتیک

بررسی داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف شیره انگور و مدت زمان نگهداری بر pH شیر طعم‌دار پروبیوتیک اثر معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت شیره انگور و مدت زمان نگهداری، pH شیر طعم‌دار پروبیوتیک کاهش یافت (شکل‌های ۱ و ۲). براساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، با افزایش غلظت شیره انگور و مدت زمان نگهداری، pH شیر طعم‌دار پروبیوتیک کاهش یافت که دلیل کاهش pH طی مدت زمان نگهداری، تولید لاکتیک اسید توسط باسیلوس کوآگولانس بود و با افزایش غلظت شیره انگور، ماده غذایی مورد نیاز جهت فعالیت باکتری پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانس تامین گردید. شیر طعم‌دار شده توسط شیره انگور محیط بهتری برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک را فراهم می‌سازد زیرا که حامل فاکتورهای رشد می‌باشد که در شیر وجود ندارد، بنابراین باکتری‌های پروبیوتیک بهتر می‌توانند در شیر طعم‌دار شده توسط شیره انگور رشد و تکثیر نمایند [۲۳] و در نتیجه تولید اسید نیز افزایش یافت. شریفی سلطانی و همکاران (۱۳۹۵) به تولید ماست کاکائو پروبیوتیک پرداختند و نشان دادند میزان pH در کلیه نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری کاهش یافت که این کاهش در نمونه‌های حاوی پودر کاکائو نسبت به نمونه‌های شاهد بیش‌تر بود و فاکتور زمان تاثیر معنی‌داری را در تغییرات pH ایجاد کرد [۲۴] که نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

Design Expert® Software

Factor Coding: Actual

pH

● Design Points

X1 = B: Time

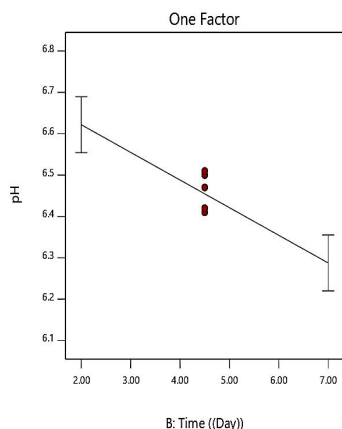
Actual Factor  
A: Grapes syrup = 3.00

Fig 2 The effect of storage time on the pH of probiotic flavored milk

## ۳-۲- بررسی تغییرات اسیدیته قابل تیتراسیون

## شیر طعم‌دار پروبیوتیک

نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف شیره انگور، مدت زمان نگهداری و اثر متقابل آن‌ها بر اسیدیته شیر طعم‌دار پروبیوتیک اثر معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ). به طوری که با افزایش غلظت شیره انگور و مدت زمان نگهداری اسیدیته شیر طعم‌دار پروبیوتیک افزایش یافت (شکل ۳). براساس نتایج به دست آمده در مطالعه انجام شده، با افزایش غلظت شیره انگور و مدت زمان نگهداری اسیدیته شیر طعم‌دار پروبیوتیک افزایش یافت. افزایش اسیدیته پارامتری است که نشان‌دهنده عملکرد تخمیریک کشت میکروبی است [۲۵]. که نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از امیری و همکارانش (۱۳۹۸) که گزارش نمودند دمای گرم‌خانه گذاری، مدت زمان گرم‌خانه گذاری، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و نوع باکتری پروبیوتیک بر اسیدیته قابل تیتراسیون تاثیر معنی‌دار داشتند، مطابقت داشت [۲۶].

Design Expert® Software

Factor Coding: Actual

Acidity (D)

● Design Points

17 21

X1 = A: Grapes syrup

X2 = B: Time

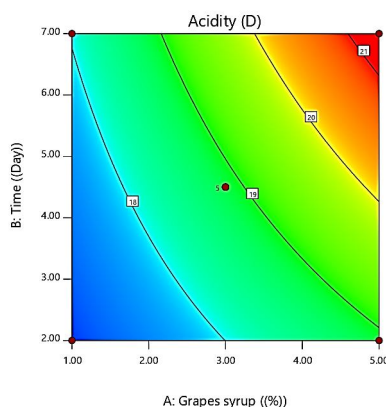


Fig 3 Effect of grape syrup concentration and shelf life on the acidity of probiotic flavored milk

Design Expert® Software

Factor Coding: Actual

pH

● Design Points

X1 = A: Grapes syrup

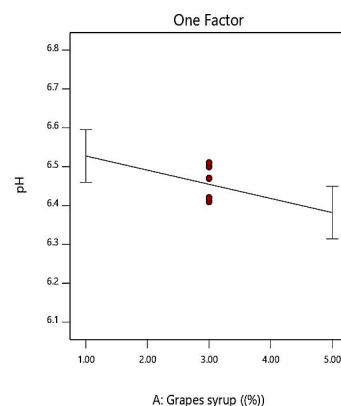
Actual Factor  
B: Time = 4.50

Fig 1 The effect of different concentrations of grape syrup on the pH of probiotic flavored milk

### ۳-۳- بررسی تغییرات چربی شیر طعم‌دار

#### پروبیوتیک

بررسی داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف شیره انگور و مدت زمان نگهداری بر چربی شیر طعم‌دار پروبیوتیک اثر معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت شیره انگور، چربی شیر طعم‌دار پروبیوتیک افزایش یافت و با افزایش مدت زمان نگهداری چربی شیر طعم‌دار پروبیوتیک کاهش یافت (شکل‌های ۴ و ۵).

۴۰۰ میلی‌گرم چربی وجود داشت) و با افزایش مدت زمان نگهداری، چربی شیر طعم‌دار پروبیوتیک کاهش یافت. این در حالی است که در پژوهش صورت گرفته توسط شریفی سلطانی و همکاران (۱۳۹۵) افزایش میزان چربی در نمونه‌های حاوی پودر کاکائو نسبت به نمونه‌های شاهد در سطح معنی‌داری نبود و همچنین فاکتور زمان تاثیر معنی‌داری را در تغییرات چربی ایجاد نکرد [۲۴].

### ۴-۳- بررسی تغییرات ماده خشک شیر طعم‌دار

#### پروبیوتیک

بررسی داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف شیره انگور بر ماده خشک شیر طعم‌دار پروبیوتیک اثر معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت شیره انگور، ماده خشک شیر طعم‌دار پروبیوتیک افزایش یافت (شکل ۶)، زیرا مطابق با نتایج حاصل از توکلی پور و کلباسی اشتري (۱۳۸۹) شیره انگور به ازای هر ۱۰۰ گرم، معادل با ۷۷/۴۷ گرم ماده خشک دارد. شریفی سلطانی و همکاران (۱۳۹۵) نشان دادند که افزایش میزان ماده خشک در نمونه‌های حاوی پودر کاکائو نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار بود و همچنین فاکتور زمان تاثیر معنی‌داری را در تغییرات ماده خشک ایجاد نکرد، که نتایج آن‌ها با نتایج این پژوهش مطابقت داشت [۲۴]. محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۷) در تولید ماست خرمای سین‌بیوتیک به بررسی خصوصیات فیزیکی‌وشیمیایی و زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus* پرداختند و نشان دادند با افزایش شیره خرما مقدار ماده خشک افزایش یافت، به طوری‌که بالاترین مقدار ماده خشک مربوط به ماست‌های با بیش‌ترین شیره خرما و پایین‌ترین مربوط به ماست‌های شاهد بود به طوری‌که در تمام روزهای بررسی اختلاف معنی‌داری بین هر یک از ماست‌های حاوی شیره خرما و شاهد وجود داشت و همچنین گذر زمان تغییر معنی‌داری بر میزان ماده خشک ماست‌ها ایجاد نکرد که کاملاً با نتایج به دست آمده از این پژوهش مطابقت داشت [۲۷].

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Fat (%)  
● Design Points  
X1 = A: Grapes syrup  
Actual Factor  
B: Time = 4.50

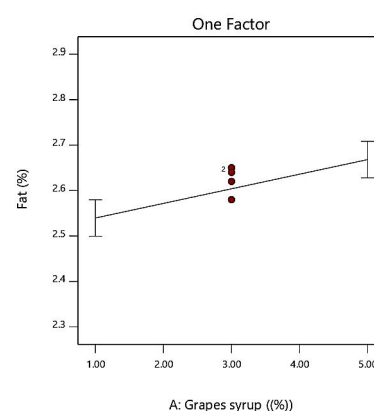


Fig 4 The effect of different concentrations of grape syrup on fat content of probiotic flavored milk

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Fat (%)  
● Design Points  
X1 = B: Time  
Actual Factor  
A: Grapes syrup = 3.000

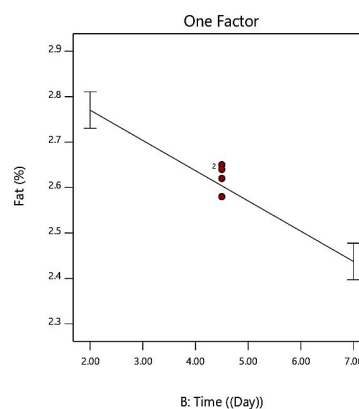
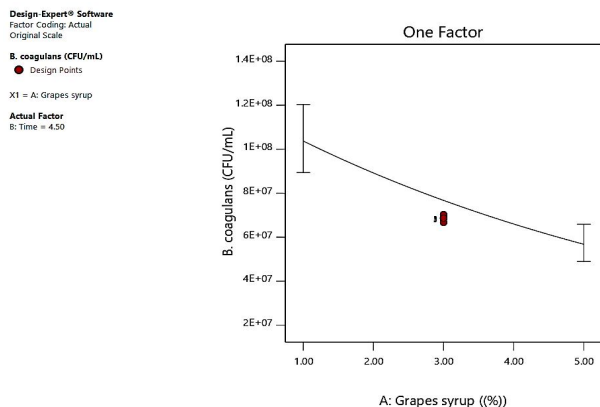


Fig 5 The effect of storage time on fat content of probiotic flavored milk

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، با افزایش غلظت شیره انگور چربی شیر طعم‌دار پروبیوتیک افزایش یافت (زیرا در بررسی ترکیبات شیره انگور به ازای هر ۱۰۰ گرم شیره انگور،

اسیدوفیلوس است (۲۹). در تحقیقی که جلالیتا و همکاران (۲۰۱۲) انجام دادند نتایج مشابه بود و مقاومت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در محیط معده بیش‌تر از سایر گونه‌ها از جمله بیفیدوباکتریوم بیفیدوم گزارش شد [۳۰]. پروبیوتیک‌ها اغلب زنده‌مانی ضعیفی در محصولات لبنی تخمیری نشان می‌دهند، کاهش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک و بقای ضعیف آن در طی زمان نگهداری و نیز کاهش در اثر آسیب‌های ناشی از افزایش اسیدیته توسط محققان گزارش شده است [۳۱-۳۴].



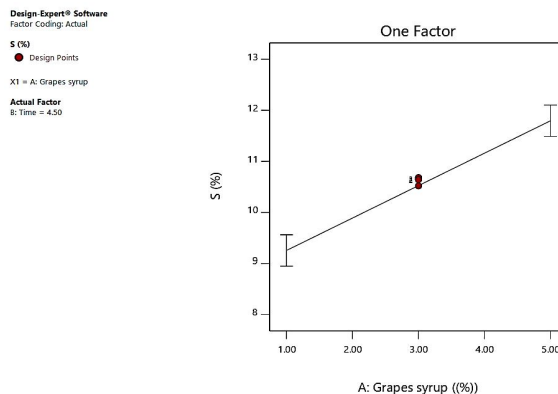
**Fig 7** The effect of different concentrations of grape syrup on the survival of *Bacillus coagulans* in probiotic flavored milk

### ۶-۳- بهینه‌سازی

بهینه‌سازی براساس حداکثر مقدار pH و زنده‌مانی میکروارگانیسم باسیلوس کوآگولانس و همچنین حداقل مقدار اسیدیته قابل تیتراسیون انجام شد. شرایط بهینه پژوهش شامل ۱ درصد شیر انگور و زمان نگهداری ۲ روز بود که در این شرایط ویژگی‌های کیفی شامل  $pH = 6.795$ ، اسیدیته  $17/109$ ، چربی  $2/706$  درصد، ماده خشک  $9/547$  درصد و زنده‌مانی میکروارگانیسم باسیلوس کوآگولانس  $1/18 \times 10^8$  بود. شایان ذکر است مطلوبیت کل برای فرمولاسیون این محصول جدید برابر ۹۵ درصد بود.

### ۴- نتیجه‌گیری کلی

در پژوهش حاضر از شیر انگور به عنوان طعم‌دهنده در شیر پروبیوتیک حاوی باسیلوس کوآگولانس استفاده شد و اثرات آن بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیر طعم‌دار پروبیوتیک بررسی گردید. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف شیر انگور و مدت زمان نگهداری بر pH، اسیدیته،



**Fig 6** The effect of different concentrations of grape syrup on the dry matter of probiotic flavored milk

### ۳-۵- بررسی تغییرات در زنده‌مانی باسیلوس

#### کوآگولانس شیر طعم‌دار پروبیوتیک

بررسی داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف شیر انگور و مدت زمان نگهداری بر زنده‌مانی باسیلوس کوآگولانس شیر طعم‌دار پروبیوتیک اثر معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ). به طوری‌که با افزایش غلظت شیر انگور زنده‌مانی باسیلوس کوآگولانس شیر طعم‌دار پروبیوتیک کاهش یافت (شکل ۷). براساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، با افزایش غلظت شیر انگور و کاهش pH به مرور زنده‌مانی باسیلوس کوآگولانس شیر طعم‌دار پروبیوتیک کاهش یافت. یکی از مهم‌ترین چالش‌های موجود در زمینه تولید و فرآوری محصولات پروبیوتیک پایین بودن قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک به دلیل حساسیت به شرایط سخت و دشوار درون محصول غذایی و همچنین شرایط نامساعد دستگاه گوارشی است. در طی بیست سال اخیر توجه به گونه‌های باسیلوس به عنوان پروبیوتیک به علت سازگاری در شرایط نامساعد افزایش یافته است [۲۸].

یکی از عوامل مهم که بر بقای سویه‌های باکتری پروبیوتیک در مواد غذایی تاثیر می‌گذارد، pH است، به طوری که بقاء در pH‌های پایین، محدود است [۲۹]. مرحمتی‌زاده و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه خود در مورد تاثیر پرمیات بر رشد و زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*L. acidophilus*) و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (*B. bifidum*) در تولید نوشیدنی‌های غذایی پروبیوتیک، به نتایج مشابه دست یافتند. آن‌ها گزارش کردند اثر ضدباکتری و مهارکننده pH پایین برای بیفیدوباکتریوم بیفیدوم قوی‌تر از لاکتوباسیلوس



- 10.22067/ifstrj.v15i3.76798
- [7] Gatade, A. A., Ranveer, R. C., & Sahoo, A. K. 2009. Physico-chemical and sensorial characteristics of chocolate prepared from soymilk. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 1(1), 1-5.
- [8] Huang, H. Y., Shih, Y. C., & Chen, Y. C. 2002. Determining eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A*, 959(1-2), 317-325.
- [9] Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*, 130(2), 396S-402S.
- [10] Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. 2019. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB12: optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. *International journal of biological macromolecules*, 123, 752-765.
- [11] Maleki, O., Khaledabad, M. A., Amiri, S., Asl, A. K., & Makouie, S. 2020. Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in whey protein isolate-crystalline nanocellulose-inulin composite enhanced gastrointestinal survivability. *LWT*, 109224.
- [12] Amiri S, RezayiMokarram R, SowtiKhiabani M, Rezazadeh Bari M, Alizadeh M. 2019. Production of bacteriocin in batch fermentation of dairy effluents by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB12. *FSCT*. 16 (90) :163-175. URL: <http://fsct.modares.ac.ir/article-7-33908-fa.html>
- [13] Ranadheera, C. S., Vidanarachchi, J. K., Rocha, R. S., Cruz, A. G., & Ajlouni, S. 2017. Probiotic delivery through fermentation: dairy vs. non-dairy beverages. *Fermentation*, 3(4), 67.
- [14] Amiri, S., Aghamirzaei, M., Mostashari, P., Sarbazi, M., Tizchang, S., & Madahi, H. 2020. The impact of biotechnology on dairy industry. In *Microbial biotechnology in food and health* (pp. 53-79). Academic Press.
- [15] Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. 2020. In situ production of conjugated linoleic acid by *Bifidobacterium lactis* BB12 and *Lactobacillus acidophilus* LA5 in milk ماده خشک، چربی و زنده‌مانی میکروارگانیسم باسیلوس کوآگولانس شیر طعم‌دار پروبیوتیک اثر معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ). در مقایسه این محصول جدید با شیرهای طعم‌دار مرسوم باید گفت که شیر کاکائو شناخته‌شده‌ترین و مقبول‌ترین نوشیدنی در بین انواع شیرهای طعم‌دار می‌باشد [۳۵] که با این‌وجود مقادیر بالای شکر در فرمولاسیون شیر کاکائو از معایب اصلی این محصول به حساب می‌آید [۳۶]. به طوری‌که با تمام فوایدی که ساکارز به عنوان یک شیرین‌کننده‌ی طبیعی با ویژگی‌های عملکردی ممتاز دارد، به دلیل ارتباط آن با برخی مشکلات سلامتی و نیز مسائل اقتصادی و تکنولوژیکی، پژوهش‌های روز افزونی جهت جایگزینی مناسب آن با سایر شیرین‌کننده‌های طبیعی در دست انجام می‌باشد. با این حال انتخاب شیرین‌کننده‌های جایگزین شکر و چگونگی حفظ کیفیت فرآورده طی دوره‌ی نگهداری از جمله مسائلی است که در حال بررسی می‌باشند [۳۷ و ۳۸]. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، شیره انگور می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای ساکارز مطرح باشد.
- ### ۵-منابع
- [1] Teimouri Yansary, A. 2006. Milk production and processing. *Sari: Avaye Masih*.
- [2] Bisig, W., & Kelly, A. L. 2017. Liquid milk products: flavored milks.
- [3] Bagheri, P., Haghdooost, A., DORTAJ, R. E., Halimi, L., Vafaei, Z., Farhangnia, M., & Shayan, L. 2011. Ultra analysis of prevalence of osteoporosis in Iranian women.
- [4] Keshtkaran, M., Mohammadifar, M. A., Asadi, G. H., Nejad, R. A., & Balaghi, S. 2013. Effect of gum tragacanth on rheological and physical properties of a flavored milk drink made with date syrup. *Journal of dairy science*, 96(8), 4794-4803.
- [5] Orleans, K. 2011. *Microbiological and Chemical Changes During Shelf-life in Regular and Chocolate Milk*. (Electronic Thesis or Dissertation). Retrieved from <https://etd.ohiolink.edu/>
- [6] Obudi, N., Alizadeh, M., Pirsas, S. 2019. Study of physicochemical/microbial properties and gas chromatographic profiles of synbiotic yogurt. *Iranian Food Science and Technology Research*, 15 (3), 45-59. doi:

- [28] Mattila-Sandholm, T., & Salminen, S. 1998. Up-to-date on probiotics in Europe. *Gastroenterology International*, 11(suppl 1), 8-16.
- [29] Hossein Marhamatizadeh, M., Ehsandoost, E., Gholami, P., Moshiri, H., & Nazemi, M. 2012. Effect of permeate on growth and survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* for production of probiotic nutritive beverages. *World Applied Sciences Journal*, 18(10), 1389-1393.
- [30] Jayalalitha, V., Balasundaram, B., & Palanidurai, R. 2012. In vitro assessment of microencapsulated probiotic beads. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2(1), 1-6.
- [31] Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., & de los Reyes-Gavilán, C. G. 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, 37(9), 839-850.
- [32] Lucas, A., Sodini, I., Monnet, C., Jolivet, P., & Corrieu, G. 2004. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 14(1), 47-53.
- [33] Hekmat, S., Soltani, H., & Reid, G. 2009. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food. *Innovative food science & emerging technologies*, 10(2), 293-296.
- [34] Sarabi, J. M., Rahnama, V. P., Kate, S. M., & Karazhiyan, R. 2017. Survivability Of Probiotic Bacteria In Simulated Gastric and Intestinal Model.
- [35] Spreer, E. (1998). *Milk and dairy product technology* (Vol. 83). CRC Press.
- [36] Ben Thabet, I., Besbes, S., Masmoudi, M., Attia, H., Deroanne, C., & Blecker, C. 2009. Compositional, physical, antioxidant and sensory characteristics of novel syrup from date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Food science and technology international*, 15(6), 583-590.
- [37] Gouhari, A. A., Habibi, N. M., & HADAD, K. M. H. 2005. Effect of date syrup as a substitute for sugar on the physicochemical and sensory properties of soft ice cream.
- [38] Specter, S. E., & Setser, C. S. 1994. Sensory and physical properties of a reduced-calorie frozen dessert system made with milk fat and sucrose substitutes. *Journal of dairy science*, 77(3), 708-717.
- model medium. *LWT*, 132, 109933.
- [16] Öztürk, B. A., & Öner, M. D. 1999. Production and evaluation of yogurt with concentrated grape juice. *Journal of Food Science*, 64(3), 530-532.
- [17] Topcu, A. A., Besler H. T., & Yurttagul M. 1997. Mineral content of CGJ Gıda Teknolojisi 2(2): 20-25.
- [18] Abbasi Asl, S., Amiri, S., & Rezazadeh Bari, M. 2019. Investigating the combined effect of inulin and gelatin on the qualitative properties of Mozzarella cheese using a combined experimental design. *Food Science and Technology*, 16(87), 127-140.
- [19] Rezazadeh-Bari, M., Najafi-Darmian, Y., Alizadeh, M., & Amiri, S. 2019. Numerical optimization of probiotic Ayran production based on whey containing transglutaminase and Aloe vera gel. *Journal of food science and technology*, 56(7), 3502-3512.
- [20] AOAC International. (2005). *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC international.
- [21] Abotalebi Kohne Shahri, R., & Ilkhanipour, M. 2019. Viability and efficacy of *Lactobacillus casei* LAFTI-L26 as adjunct starter in red Dutch cheese. *Food Science and Technology*, 15(83), 387-398.
- [22] Cutting, S. M. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220.
- [23] Mital, B. K., Steinkraus, K. H., & Naylor, H. B. (1974). Growth of lactic acid bacteria in soy milks. *Journal of Food Science*, 39(5), 1018-1022.
- [24] Sharifi, S. M., Karim, G., & Pourahmad, R. 2016. Possibility of The Production of Probiotic Chocolate Yogurt.
- [25] Namdari, A., & Nejati, F. 2016. Development of antioxidant activity during milk fermentation by wild isolates of *Lactobacillus helveticus*.
- [26] Amiri S, RezayiMokarram R, SowtiKhiabani M, Rezazadeh Bari M, Alizadeh M. 2019. Development of the antioxidant activity in cheese whey and milk permeate using *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB12. *FSCT*. 16 (91) :65-79. URL: <http://fsct.modares.ac.ir/article-7-33907-fa.html>
- [27] Mohammad, H. Z., & Pourahmad, R. 2019. Evaluation of Physicochemical Characteristics and Viability of *Lactobacillus Acidophilus* in Synbiotic Date Syrup Yogurt.





## Scientific Research

## Investigation of chemical and microbial properties of flavored probiotic milk using *Bacillus coagulans* and grape syrup

Kazem Alilou, N. <sup>1</sup>, Amiri, S. <sup>2</sup>, Rezazadeh Bari, M. <sup>3</sup>, Dodange, S. <sup>4</sup>

1. M.Sc. graduated, Department of Food Science and Technology, Saba College of Higher Education, Urmia, Iran.

2. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and 3. Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

4. PhD student of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received 25 July 2020 Accepted 27 December 2020</p>	<p>Today, consumption of milk and its products is one of the signs of development of human societies. Milk is a healthy, nutritious, delicious and thirsty drink that is consumed by a large group of people, especially children. Therefore, the aim of this study was using grape syrup as a flavoring in probiotic milk containing <i>Bacillus coagulans</i> and investigating effects of grape syrup on physicochemical and microbial properties of probiotic milk. For this purpose, two quantitative factors including grape syrup concentrations (0.17, 1, 3, 5 and 5.83 %) and storage time (0.96, 2, 4.5, 7 and 8.04 days) in five levels were evaluated by using a central composite design. The results showed that different concentrations of grape syrup and storage time on pH, acidity, dry matter, fat and viability of <i>B. coagulation</i> of probiotic flavored milk were significant (<math>P &lt; 0.05</math>). Optimum condition was obtained based on maximum pH and viability of <i>B. coagulation</i> and minimum acidity. The optimum condition was 1% grape syrup and 2 days' storage time, which its total desirability was 95%.</p>
<p><b>Keywords:</b></p> <p><i>Bacillus coagulans</i>, Probiotic milk, Flavored milk, Grape syrup.</p>	
<p><b>DOI:</b> 10.52547/fsct.18.03.02</p> <p>*Corresponding Author E-Mail: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir</p>	