

بهینه‌یابی اثر سطوح مختلف استارتر، مخمر و زمان نگهداری بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی نوشیدنی کفیر با استفاده از روش سطح پاسخ

سهیلا احمدیان مسک^۱، فریده طباطبایی یزدی^{۲*}، سید علی مرتضوی^۲، آرش کوچکی^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۹)

چکیده

کفیر نوشیدنی سنتی است که از طریق تخمیر شیر توسط دانه‌های کفیر تهیه می‌شود، دانه‌های کفیر مخلوط پیچیده‌ای از باکتری‌ها، مخمرها و پلی‌ساکارید تولید شده به وسیله این میکروفلور می‌باشند. مقدار اولیه دانه کفیر که برای تولید این نوشیدنی تلقیح شده بر کیفیت نهایی آن (مقدار pH، ویسکوزیته و مشخصات میکروبی)، اثر می‌گذارد. در این پژوهش اثرات سطوح مختلف استارتر (۴، ۶ و ۸ درصد، حاوی *Streptococcus thermophilus* و *Bifidobacterium Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*، مخمر *Saccharomyces cerevisiae*)، ۲، ۳ و ۴ درصد) و زمان نگهداری (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح) بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی نوشیدنی کفیر با استفاده از طرح مرکب مرکزی رویه سطح پاسخ به منظور تولید محصولی با میزان باکتری‌های پروبیوتیک بالاتر نسبت به مخمرها، مورد بررسی قرار گرفت. خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل اسیدیته، pH، اتانول، گرانروی ظاهری و پارامترهای رفتار جریان، همچنین شمارش جمعیت میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق نتایج حاصل از آزمون‌های انجام شده میزان مخمر، بیشترین اثرگذاری را بر گرانروی ظاهری داشته و با افزایش میزان مخمر و در طی زمان نگهداری مقدار گرانروی ظاهری و ضریب قوام کاهش یافت، علاوه بر این با افزایش درصد استارتر بر میزان گرانروی ظاهری افزوده گردید. در خصوص میزان اتانول نیز با افزایش مقدار مخمر میزان اتانول تولید شده افزایش یافته و در طیزمان نگهداری به علت افزایش مقدار مخمر بر میزان تولید اتانول افزوده شد و در نهایت شمارش میکروبی در زمان نگهداری کاهش یافت. نتایج بهینه‌یابی نشان داد که نمونه حاوی ۲ درصد مخمر و ۴ درصد استارتر در زمان ۳۸ ساعت پس از تلقیح کمترین میزان اتانول را داشته و از لحاظ خواص رئولوژیکی مناسبی باشد.

کلید واژگان: کفیر، استارتر، مخمر، زمان نگهداری، خصوصیات فیزیکوشیمیایی

* مسئول مکاتبات: Tabatabai @ um.ac.ir

۱- مقدمه

بوده و در بعضی موارد پیشرفت سرطان پستان را به تاخیر انداخته است [۶]. نوشیدنی کفیر از ترکیب غیر یکنواخت برخوردار بوده و عواملی همچون نوع و حجم شیر، ترکیب دانه‌ها و شرایط تولید بر ویژگی‌های بافتی، شیمیایی و حسی این نوشیدنی اثر می‌گذارند [۷]، کفیر معمولاً حاوی ۸۹-۹۰ درصد آب، ۰/۲ درصد لیپید، ۳ درصد پروتئین، ۰/۷ درصد خاکستر، اسید لاکتیک و الکل هر کدام ۱ درصد است [۸]. با توجه به بررسی‌های میدانی انجام شده در مورد کفیر تجاری که سوش غالب آن را مخمر تشکیل می‌دهد، هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر درصدهای مختلف استارتر و مخمر در زمان نگهداری بر روی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی و میکروبی نوشیدنی کفیر و انتخاب تیمار بهینه می‌باشد، به نحوی که میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک نسبت به مخمر با نسبت بالاتری تلقیح شده و سوش غالب آن را میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک تشکیل دهد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- آغازگر (مایه کشت)

آغازگر مورد استفاده، آغازگر صنعتی با نام تجاری ABT_2 حاوی *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *Bifidobacterium* از نوع مستقیم (DVS) و به صورت خشک شده انجمادی (لیوفیلیزه) بوده که از شرکت کریستین هانسن (دانمارک) تهیه گردید، همچنین از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* تولید شده توسط شرکت ساف لیفور (فرانسه) استفاده شد.

۲-۲- تولید کفیر

به منظور تولید نوشیدنی بهینه کفیر در ابتدا استارتر مستقیم (DVS) مورد استفاده شامل *Streptococcus Lactobacillus delbrueckii* subsp. *thermophilus*

کفیر یک نوشیدنی تخمیری اسیدی و الکلی است که منشا آن منطقه قفقاز در آسیا می‌باشد [۱] که به دو روش سنتی و صنعتی تولید می‌شود. در روش سنتی، دانه‌های کفیر و در روش صنعتی، کشت آغازگر تجاری به طور مستقیم به شیر تلقیح می‌شود. استفاده مستقیم از کشت‌های آغازگر، با انتخاب دقیق مخمرها و گونه‌های باکتری، تولید تجاری محصول کفیر با عطر و طعم قابل قبول و کیفیت نگهداری مناسب را امکان پذیر می‌سازد. کفیر تولید شده با این روش تا ۲۸ روز ماندگاری داشته درحالی‌که کفیر تولید شده با دانه‌های کفیر ۱۲-۳ روز ماندگاری دارد (۲). دانه‌ها شامل مجموعه‌ای از باکتری‌های اسید لاکتیک، مخمر و گاهی اوقات باکتری‌های اسیداستیک در یک ماتریکس پلی‌ساکاریدی به نام کفیران^۱ می‌باشند [۳]. نوشیدنی کفیر طعم ملایم اسیدی، بوی مخمری و قوام خامه‌ای^۴ دارد [۴] و به دلیل وجود ترکیباتی نظیر اسید لاکتیک، استالدهید^۳، اتانول، استوین^۵ و سایر فراورده‌های حاصل از تخمیر دارای ویژگی‌های حسی خاصی بوده که این ویژگی‌ها در اثر فعالیت فلور میکروبی موجود در دانه‌های کفیر ایجاد می‌گردد [۵].

Lactobacillus kefiranofaciens و *Lactobacillus parakefir* تولیدکننده‌های اصلی آگزوپلی‌ساکارید موجود در میکروفلور دانه کفیر می‌باشند که آگزوپلی‌ساکارید تولید شده به وسیله میکروارگانیزم‌های کفیر، بافت و احساس دهانی محصول تولیدی را بهبود می‌بخشد. کفیران ممکن است خاصیت ضد سرطانی، ضد آلرژی و جلوگیری کننده از ایجاد زخم معده داشته و به عنوان ترکیب پروبیوتیک عمل کند [۵]. کفیر و ترکیبات آن ویژگی سلامتی بخش دارد که بر ایمنی و سیستم گوارش تاثیر مثبت گذاشته و از بروز عوارض عدم تحمل لاکتوز جلوگیری می‌کند. همچنین بر متابولیسم کلسترول اثر داشته و در برابر مواد سرطانزای روده بزرگ نیز تاثیر درمانی دارد، بعلاوه منبع برخی ویتامین‌ها

1. kefiran
2. creamy consistency
3. acetaldehyde³
4. acetoin

5. Direct Vat Set

Plate Count Agar (مرک، آلمان) درون هر پلیت ریخته شد و در نهایت پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از پایان گرمخانه‌گذاری پلیت‌هایی که بیشتر از ۳۰ و کمتر از ۳۰۰ کلنی داشتند جهت شمارش انتخاب گردید [۱۴].

۲-۵- طراحی آزمایش

طراحی آزمایش با استفاده از نرم افزار Design Expert version 7.0. انجام گرفت. تیمارهای تولیدی به روش کاملاً تصادفی در قالب طرح مرکب مرکزی با چهار تکرار در نقطه مرکزی برای ۳ متغیر مستقل (درصد استراتر، درصد مخمر و زمان) هر کدام در سه سطح به گونه‌ای بسته شدند که تعداد کل تیمارها به ۱۸ رسید (جدول ۱).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- برازش مدل

نتایج آنالیز واریانس برای هر یک از صفات مورد بررسی در جدول ۳ درج گردیده است. برای آنکه مدل، توانایی مطلوبی جهت برازش داده‌ها داشته باشد میبایست مقدار R^2 بیشتر از ۰/۸ باشد (۱۵). در نمونه‌های مدل کفیر ضریب تبیین (R^2) برای کلیه صفات بالاتر از ۰/۹ و ضریب تبیین تعدیل شده (R^2 -adj) مدل‌ها نیز در حد مناسب (بین ۰/۸۷ تا ۰/۹۸) بوده، ضریب تغییرات در حد قابل قبول و فاکتور عدم برازش آن‌ها نیز در سطح اطمینان ۰/۹۵ معنی‌دار نمی‌باشد. بنابراین بالا بودن R^2 و R^2 -adj، معنی‌دار نبودن عدم برازش برای تمام پاسخ‌ها و همچنین بیشتر بودن adequate precision از ۴، صحت مدل را برای برازش داده‌ها تایید می‌کند. هر یک از متغیرهای وابسته در قالب مدل درجه دوم پس رونده چند جمله‌ای تعمیم یافت (جدول ۲) و برای مشاهده بهتر اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ‌ها، نمودارهای سطح پاسخ برای هر پاسخ رسم گردید.

Bifidobacterium bulgaricus در سه سطح ۴، ۶ و ۸ درصد همراه با مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در سه سطح ۲، ۳ و ۴ درصد [۹ و ۱۰] در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به شیر پاستوریزه و هموژنیزه شده پرچرب تلقیح گردید. محتویات هر ظرف بعد از اختلاط کامل به گرمخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. با رسیدن نمونه‌ها به pH: ۴/۶ از گرمخانه خارج و به یخچال با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت و آزمون‌های میکروبی، فیزیکوشیمیایی و حسی در طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح انجام گرفت [۵].

۲-۳- آزمون‌های فیزیکوشیمیایی نوشیدنی

کفیر:

۲-۳-۱- تعیین pH و اسیدیته

pH کفیر با استفاده از pH متر (Metrohm، سوئیس) دیجیتال اندازه‌گیری شد (استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲) همچنین میزان اندازه‌گیری اسیدیته نمونه‌ها نیز بر حسب اسید لاکتیک مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ انجام گرفت [۱۱].

۲-۳-۲- اندازه‌گیری الکل

اندازه‌گیری الکل به روش اسپکتروسکوپی مطابق روش سید^۶ و همکاران، ۲۰۱۵ انجام گرفت [۱۲].

۲-۳-۳- اندازه‌گیری ویسکوزیته

اندازه‌گیری رفتار جریان با استفاده از ویسکومتر چرخشی مدل Dv3 ultra، بروکفیلد ساخت کشور آمریکا در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد توسط اسپیندل شماره ۳، در محدوده سرعت برشی ۱ تا ۸۰ بر ثانیه انجام گرفت [۱۳].

۲-۴- آزمون میکروبی

شمارش میکروبی از طریق رقیق کردن سریالی نمونه‌های کفیر انجام گرفته بدین صورت که یک میلی‌لیتر از رقت 10^{-6} و 10^{-7} به درون پلیت سترون انتقال داده شد سپس از محیط کشت

Table 1 Independent variables and related levels in the process of kefir production

independent variable	Symbols	Code and related level		
		-1	0	+1
Starter (%)	A	4	6	8
Yeast (%)	B	2	3	4
Time (hours)	C	0	24	48

Table 2 Quadratic model for the pH, acidity, ethanol, microbial count and flow behavior parameters of the kefir samples.

$$\text{pH: } 4.69900 - 0.0075A - 0.015979C + 0.00012283$$

$$\text{Acidity: } +0.71300 + 0.010075C + 0.0000560764C^2$$

$$\text{Ethanol: } -0.22636 - 0.00649500A + 0.15722B + 0.00125240C + 0.00306875AB - 0.000101302AC - 0.020992B^2$$

$$k: +0.92976 + 0.57414A - 0.61033B - 0.00525404C - 0.036998A^2$$

$$n: +0.37433 - 0.025695A + 0.088770B + 0.000837917C$$

$$\text{Apparent viscosity: } +370.69539 + 30.813A - 105.493B - 1.91158C$$

$$\text{Microbial count: } +6.23500 + 0.081520A - 0.097610B + 0.042386C + 0.077962AB - 0.00617031AC$$

۲-۳- آزمایشات فیزیکی شیمیایی کفیر

۱-۲-۳- اندازه‌گیری pH

بر اساس داده‌های جدول آنالیز واریانس (جدول ۳)، از بین متغیرهای آزمون، درصد استارتر و دوره نگهداری به صورت درجه اول در میزان pH موثر است و در بین معادلات درجه دوم نیز فقط دوره نگهداری معنی‌دار بود که نشانگر اهمیت این متغیر بر میزان pH می‌باشد. بر اساس احتمال p، عبارت خطی دوره نگهداری بیشترین اثر و پس از آن عبارت درجه دوم دوره نگهداری و سپس درصد استارتر کمترین اثر را بر میزان pH داشتند. مطابق شکل ۱، با افزایش درصد استارتر میزان pH کاهش یافته و در طول دوره نگهداری نیز به علت تجزیه لاکتوز توسط باکتری‌های آغازگر به لاکتیک و استیک اسید،

میزان pH کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از مطالعات سایر پژوهشگران [۱۸-۱۶ و ۵]. نیز بیانگر این موضوع می‌باشد.

۲-۲-۳- اندازه‌گیری اسیدیته

کاهش pH و افزایش اسیدیته نمونه‌های کفیر در طول نگهداری سرد در یخچال به متابولیزه شدن لاکتوز توسط فلور میکروبی موجود در محصول نهایی مربوط می‌باشد [۱۹]. مطابق نتایج جدول ۳ فقط اثرات خطی و درجه دوم دوره نگهداری معنی‌دار بود. شکل ۲ تاثیر متغیر دوره نگهداری را بر میزان اسیدیته نشان می‌دهد، بر اساس اطلاعات شکل مذکور در طول مدت نگهداری میزان اسیدیته افزایش یافت که مشابه نتایج دادخواه و همکاران، ۲۰۱۱ و گول^۷ و همکاران، ۲۰۱۵ می‌باشد [۱۸ و ۱۶].

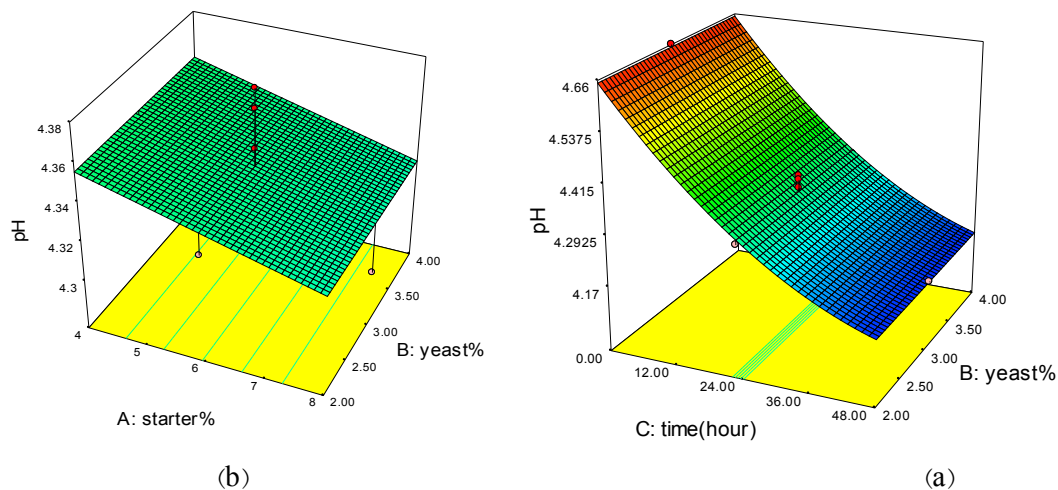


Fig 1 a) Response surface plot of interaction between starter and yeast percentage while storage time on the intermediate level has been kept constant. b) Response surface plot of interaction between storage time and yeast percentage while starter percentage on the intermediate level has been kept constant.

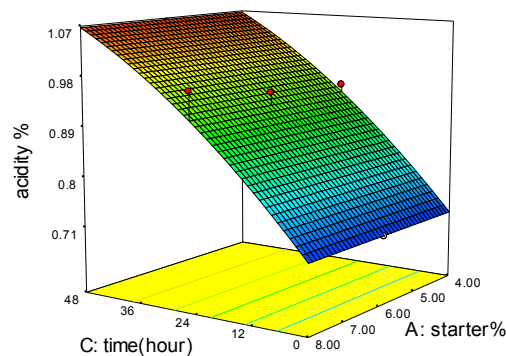


Fig 2 Response surface plot of interaction between storage time and starter percentage while yeast percentage on the intermediate level has been kept constant.

می‌توان به زمان، دمای تخمیر و کشت آغازگر اشاره نمود [۲۲]. بر اساس گزارش مگالهایز^{۱۲} و همکاران در سال ۲۰۱۱ در نوشیدنی کفیر، در درجه اول *Saccharomyces cerevisiae* مسئول تولید اتانول است، اگرچه بعضی از باکتری‌ها از جنس *Lactobacillus* نیز قادر به تولید اتانول می‌باشند و از هنگام شروع فعالیت الکل دهیدروژناز، این آنزیم قادر به تبدیل استالندید به اتانول می‌باشد [۲۳]. با توجه به نتایج بدست آمده از جدول ۳ عبارت خطی درصد مخمر و زمان نگهداری و عبارت درجه دوم درصد مخمر و همچنین اثر متقابل درصد استارتر_مخمر و درصد استارتر_دوره نگهداری معنی‌دار شدند. بر اساس احتمال p عبارت خطی

۳-۲-۳- اندازه‌گیری الکل

طعم و رایحه متمایز کفیر ناشی از اتانول موجود در آن بوده و یکی از فاکتورهای مهم در کیفیت مطلوب کفیر محسوب می‌گردد [۱۸]. مطابق گزارش مارشال^۸ و کول^۹ وجود ۰/۱۷ درصد اتانول، یک کفیر مطلوب را تولید می‌کند [۲۰]. از طرفی دویتسچپور^{۱۰} و همکاران در سال ۱۹۸۷ گزارش کردند که در فرایند تخمیر کفیر ۰/۱۲ تا ۰/۱۸ درصد اتانول تولید می‌گردد [۲۱]. کورولوا^{۱۱} در سال ۱۹۸۸ نشان داد که فاکتورهای زیادی بر درصد اتانول موجود در کفیر اثر می‌گذارد که در این رابطه

8. Marshall
9. Cole
10. Duitschaever
11. Koroleva

12. Magalhães

دوره نگهداری نیز به علت افزایش مقدار مخمر بر میزان تولید اتانول افزوده شد (این افزایش میزان اتانول در محدوده استاندارد بوده است)، که نتایج فوق مطابق نتایج سایر پژوهشگران [۱۷ و ۱۸] می‌باشد.

درصد مخمر دارای بیشترین اثر و عبارت اثر متقابل درصد استارت-دوره نگهداری دارای کمترین اثر بر میزان اتانول تولید شده بودند. همانگونه که در شکل ۳ دیده می‌شود با افزایش مقدار مخمر، میزان اتانول تولید شده افزایش یافت. در طول

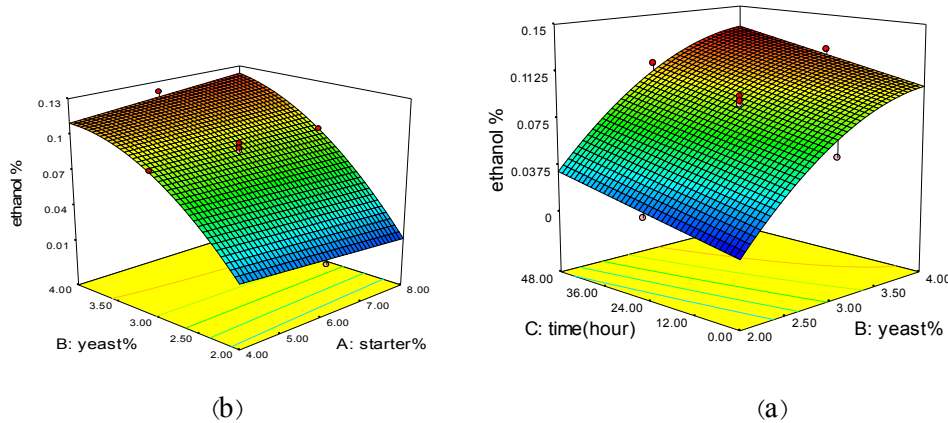


Fig 3 a) Response surface plot of interaction between starter and yeast percentage while storage time on the intermediate level has been kept constant. b) Response surface plot of interaction between storage time and yeast percentage while starter percentage on the intermediate level has been kept constant.

میزان اثرگذاری مربوط به عبارت خطی درصد مخمر و پس از آن به ترتیب مربوط به عبارت خطی درصد استارت و عبارت خطی دوره نگهداری می‌باشد. مطابق شکل ۴، با افزایش درصد مخمر و در طول دوره نگهداری میزان k کاهش می‌یابد. این کاهش k را می‌توان به هیدرولیز احتمالی پلی‌ساکارید کفیران نسبت داد که مطابق با نتایج کوکتاس^{۱۳} و همکاران در سال ۲۰۱۳ می‌باشد [۵]. از طرفی به علت تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط سویه‌های موجود در آغازگر با افزایش درصد آغازگر میزان k افزایش یافته که مشابه نتایج بابینا^{۱۴} و روژوکوا^{۱۵}، ۱۹۷۳ بود آنان در مطالعه مذکور دریافتند که باکتری‌های اسید استیک و *Lactobacillus* در دانه کفیر، ویسکوزیته را افزایش داده و در نتیجه باعث افزایش قوام کفیر می‌گردد [۲۶].

۴-۲-۳- خواص رئولوژیکی

نتایج به دست آمده بیانگر آن است که مدل قانون توان، سازگاری بالایی برای بررسی رفتار جریان نمونه‌های مدل کفیر دارد و نشان می‌دهد مدل کفیر طراحی شده همانند آنچه در اکثر مطالعات راجع به رفتار جریان کفیر بیان شده، رفتار کرده است.

۱-۴-۲-۳- بررسی رفتار جریان

رئولوژی غذا مطالعه تغییر شکل و جریان مواد غذایی است [۲۴]. ویسکوزیته کفیر با افزایش سرعت برشی کاهش پیدا می‌کند که نشان دهنده رفتار غیر نیوتنی می‌باشد [۲۵].

الف-ضریب قوام (k)

همانگونه که جدول ۳ نشان می‌دهد عبارات خطی درصد استارت و مخمر و دوره نگهداری معنی‌دار شدند که بیشترین

13. Kk-Taş
14. Babina
15. Rozhokova

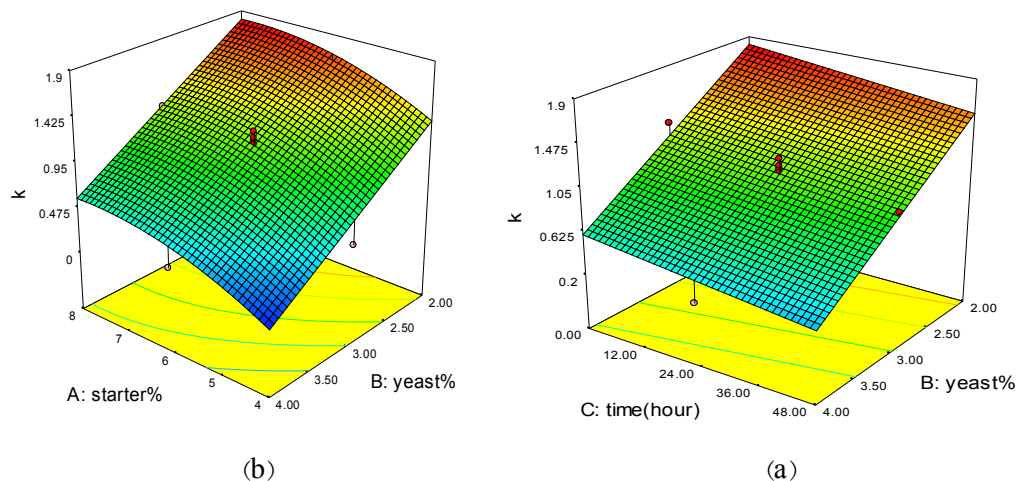


Fig 4 a) Response surface plot of interaction between starter and yeast percentage while storage time on the intermediate level has been kept constant. b) Response surface plot of interaction between storage time and yeast percentage while starter percentage on the intermediate level has been kept constant.

ب-شاخص رفتار جریان (n)

بر اساس نتایج حاصل از آزمون انجام شده مقدار شاخص رفتار جریان (n) برای تمامی نمونه‌ها کمتر از یک بدست آمد که مشخص می‌کند نمونه‌ها سیالات سودوپلاستیک با رفتار شل شونده با برش هستند. نتایج حاصل از مطالعات سایر پژوهشگران [۲۷ و ۲۵ و ۲۷]. نیز موید این موضوع است. مطابق نتایج آنالیز واریانس در جدول ۳، عبارات خطی درصد استارتر و مخمر معنی‌دار شدند. با در نظر گرفتن احتمال p اثرگذاری درصد مخمر از درصد استارتر بیشتر می‌باشد همانطور که شکل ۵ نشان می‌دهد با افزایش درصد استارتر میزان n کاهش یافته از طرفی با افزایش درصد مخمر میزان n افزایش یافته، که این افزایش شاخص رفتار جریان در نمونه‌های کفیر ناشی از کاهش میزان شاخص قوام و نزدیک شدن رفتار به حالت نیوتنی می‌باشد.

۲-۴-۲-۳- گرانروی ظاهری

گرانروی عبارت است از مقاومت در برابر جریان و هر چه این شاخصه بیشتر باشد، سیالیت نوشیدنی تولیدی کاهش می‌یابد [۲۸]. طبق نتایج جدول ۳ عبارات خطی درصد استارتر، مخمر و دوره نگهداری معنی‌دار شدند که از لحاظ میزان اثر گذاری، عبارت خطی درصد مخمر دارای بیشترین اثرگذاری و پس از آن عبارت خطی درصد استارتر و سپس عبارت خطی دوره نگهداری قرار داشتند.

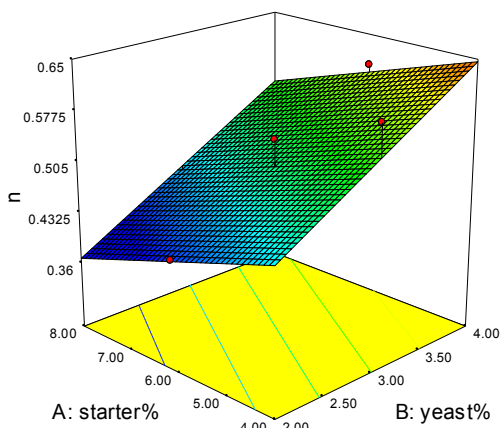


Fig 5 Response surface plot of interaction between starter and yeast percentage while storage time on the intermediate level has been kept constant.

همانگونه که شکل ۶ نشان می‌دهد با افزایش میزان مخمر و در طی زمان نگهداری مقدار گرانروی ظاهری کاهش و با افزایش درصد استارتر میزان آن افزایش یافته است، این امر ممکن است به حضور پلی ساکارید کفیران که بر روی رفتار جریان کفیر اثر می‌گذارد نسبت داده شود. طبق گزارشات ریمادا^{۱۶} و همکاران در سال ۲۰۰۶ حضور کفیران، گرانروی ظاهری را افزایش می‌دهد. کفیران در طول دوره ذخیره‌سازی به علت هیدرولیز احتمالی اگزوپلی ساکارید کاهش می‌یابد [۲۹].

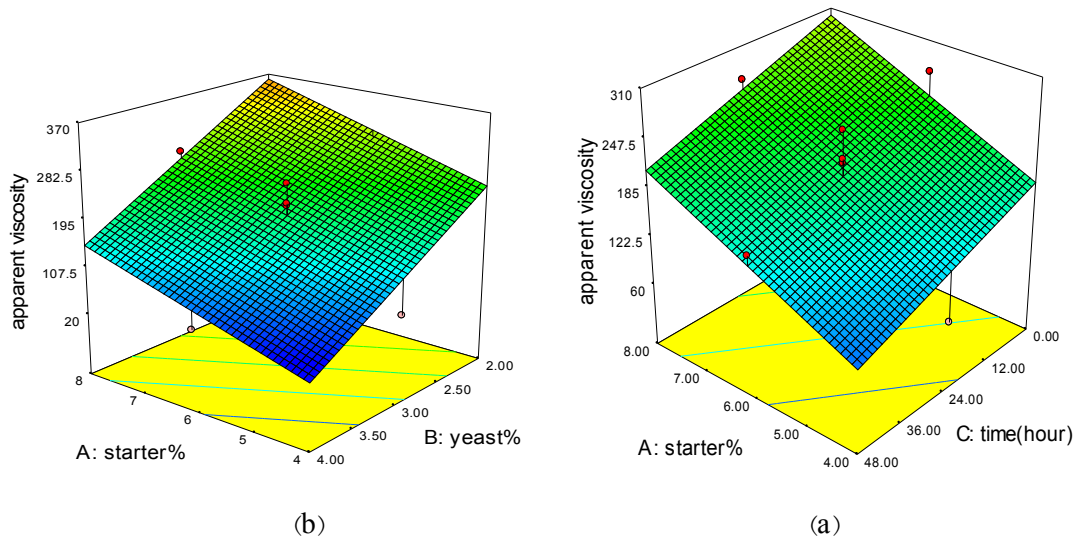


Fig 6. a) Response surface plot of interaction between starter and yeast percentage while storage time on the intermediate level has been kept constant. b) Response surface plot of interaction between storage time and starter percentage while yeast percentage on the intermediate level has been kept constant

عبارت اثر متقابل درصد استارتر_دوره نگهداری، عبارت اثر متقابل درصد مخمر_دوره نگهداری، عبارت اثر متقابل درصد استارتر_درصد مخمر، عبارت خطی درصد مخمر همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود با افزایش میزان درصد استارتر و مخمر، شمارش کلی افزایش و در طول دوره نگهداری میزان شمارش کلی کاهش یافته است که منطبق بر نتایج مرتضوی و همکاران، ۱۳۹۲ است [۱۴] و به عنوان یک نتیجه کلی می‌توان گفت که تعداد باکتری‌های زنده شمارش شده رابطه مستقیمی با تغییرات pH دارد [۱۵].

۳-۳- ارزیابی ویژگی‌های زنده مانی آغازگرها (شمارش میکروبی)

بررسی جدول آنالیز واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که عبارات خطی درصد استارتر، دوره نگهداری و درصد مخمر و عبارات اثر متقابل آن‌ها نیز معنی‌دار شده‌اند، بر حسب احتمال p اهمیت اثر متغیرها بر ویژگی‌های زنده‌مانی آغازگرها به ترتیب ذیل است:
عبارت خطی دوره نگهداری، عبارت خطی درصد استارتر،

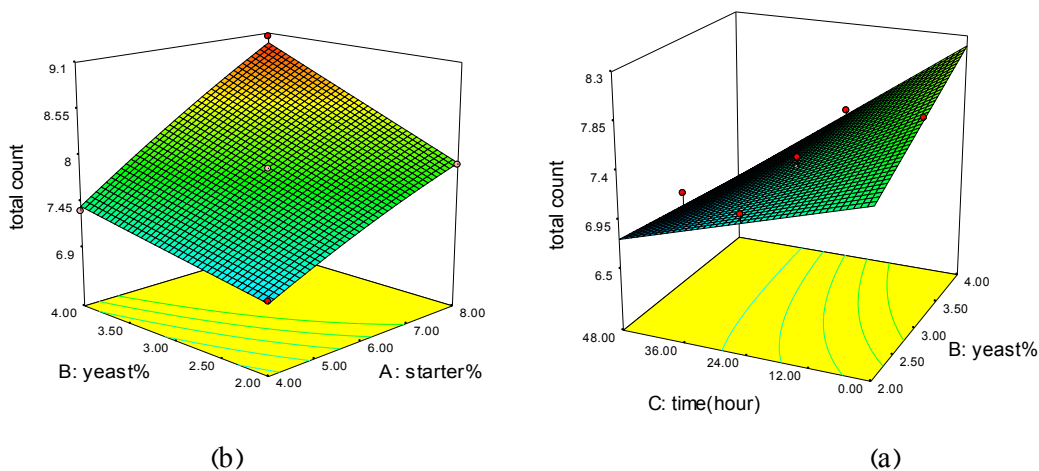


Fig 7 a) Response surface plot of interaction between starter and yeast percentage while storage time on the intermediate level has been kept constant. b) Response surface plot of interaction between storage time and yeast percentage while starter percentage on the intermediate level has been kept constant.

Table 3 ¹⁷ANOVA results of the quadratic model for the pH, acidity, ethanol, microbial count and flow behavior parameters of the kefir samples

source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P-value
pH					
model	0.61	3	0.20	552.07	<0.0001
A-starter%	0.002250	1	0.002250	6.11	0.0269
C-time (hour)	0.59	1	0.59	1589.72	<0.0001
C ²	0.022	1	0.022	60.39	<0.0001
Residual	0.005158	14	0.0003684		
Lack of Fit	0.003683	11	0.0003348	0.68	0.7234
Pure Error	0.001475	3	0.0004917		
Cor Total	0.62	17			
Acidity					
model	0.32	2	0.16	174.27	<0.0001
C-time (hour)	0.31	1	0.31	343.46	<0.0001
C ²	0.004637	1	0.004637	5.07	0.0397
Residual	0.014	15	0.0009142		
Lack of Fit	0.009744	12	0.0008120	0.61	0.7653
Pure Error	0.003969	3	0.001323		
Cor Total	0.33	17			
ethanol					
model	0.030	6	0.004921	146.65	<0.0001
A-starter%	0.000003136	1	0.000003136	0.093	0.7655
B-yeast%	0.025	1	0.025	735.48	<0.0001
C-time (hour)	0.002393	1	0.002393	71.32	<0.0001
AB	0.0003014	1	0.0003014	8.98	0.0122
AC	0.0001892	1	0.0001892	5.64	0.0369
B ²	0.001959	1	0.001959	58.37	<0.0001
Residual	0.0003691	11	0.00003356		
Lack of Fit	0.0003471	8	0.00004339	5.90	0.0859
Pure Error	0.00002205	3	0.000007350		
Cor Total	0.030	17			
microbial count					
model	5.98	6	1.00	104.98	<0.0001
A-starter%	1.12	1	1.12	118.03	<0.0001
B-yeast%	0.18	1	0.18	19.13	0.0011
C-time (hour)	3.34	1	3.34	351.55	<0.0001
AB	0.19	1	0.19	20.50	0.0009
AC	0.70	1	0.70	73.96	<0.0001
BC	0.44	1	0.44	46.73	<0.0001
Residual	0.10	11	0.009488		
Lack of Fit	0.071	8	0.008829	0.79	0.6527
Pure Error	0.034	3	0.011		
Cor Total	6.08	17			
k					
model	4.66	4	1.16	40.98	<0.0001
A-starter%	0.68	1	0.68	23.84	0.0003
B-yeast%	3.73	1	3.73	131.05	<0.0001
C-time (hour)	0.16	1	0.16	5.59	0.0342
A ²	0.097	1	0.097	3.42	0.0871
Residual	0.37	13	0.028		
Lack of Fit	0.36	10	0.036	10.72	0.0380
Pure Error	0.010	3	0.003353		
Cor Total	5.03	17			
n					
model	0.11	3	0.036	33.09	<0.0001
A-starter%	0.026	1	0.026	23.99	0.0002
B-yeast%	0.079	1	0.079	71.59	<0.0001

17. Analysis of variance

C-time (hour)	0.004044	1	0.004044	3.67	0.0759
Residual	0.015	14	0.001101		
Lack of Fit	0.013	11	0.001184	1.49	0.4139
Pure Error	0.002387	3	0.0007957		
Cor Total	0.12	17			
Apparent viscosity					
model	0.00001703	3	56771.09	42.29	<0.0001
A-starter%	37977.64	1	37977.64	28.29	0.0001
B-yeast%	0.00001113	1	0.00001113	82.90	<0.0001
C-time (hour)	21047.91	1	21047.91	15.68	0.0014
Residual	18794.88	14	1342.49		
Lack of Fit	16099.09	11	1463.55	1.63	0.3800
Pure Error	2695.79	3	898.60		
Cor Total	0.00001891	17			

۴- بهینه‌یابی

ظاهری و پارامترهای رفتار جریان) انجام گرفت که بر اساس آن کمترین میزان گرانیوی ظاهری به علت حفظ سیالیت نوشیدنی و کمترین میزان اتانول با توجه به حداکثر میزان اتانول تایید شده توسط استاندارد ایران (۰/۵ درصد) در نوشیدنی کفیر به طور ویژه بررسی گردید (جدول ۴). نتایج بهینه‌یابی نشان داد که نمونه حاوی ۲ درصد مخمر و ۴ درصد استارتر در زمان ۳۸ ساعت پس از تلقیح مناسب می‌باشد.

هدف از بهینه‌یابی فرایند تولید مدل کفیر، دستیابی به بالاترین سطح از کیفیت نمونه با توجه به پارامترهای اندازه‌گیری شده می‌باشد. در این خصوص با توجه به مطالعات انجام شده و بررسی منابع موجود درباره‌ی نوشیدنی کفیر، بهینه‌یابی متغیرهای مستقل موثر در تولید مدل کفیر بر اساس متغیرهای وابسته (pH، اسیدیته، اتانول، شمارش کلی میکروبی، گرانیوی

Table 4 Optimization conditions

Row	Goal	lower limits	Upper limits	Weights
Ethanol (%)	minimize	0.0025	0.1284	1
Apparent viscosity (pa.s)	minimize	45.79	418.13	1

Table 5 Comparison of Predicted and experimental results of the optimal sample

Amounts	pH	Acidity	Ethanol	Total count	Apparent viscosity	k	n
Predicted	4.3337	1.01968	0.03558	6.91523	208.729	1.20966	0.48163
Experimental	4.3618±0.03981	1.0088±0.01533	0.03029±0.007481	6.87011±0.06380	207.483±1.76211	1.19033±0.027337	0.4878±0.008818

۵- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از آزمون‌های انجام شده (اسیدیته، pH، اتانول، گرانیوی ظاهری، پارامترهای رفتار جریان و شمارش جمعیت میکروبی) در نوشیدنی کفیر نشان داد که روش آماری رویه سطح پاسخ، یک ابزار مفید در مدل‌سازی تاثیر متغیرهای نسبت درصد استارتر به مخمر و زمان نگهداری بر ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی و میکروبی مدل کفیر می‌باشد. مطابق نتایج مذکور با تغییر محدوده متغیرها، تغییرات زیادی در ویژگی‌های مختلف نمونه‌های مدل کفیر حاصل می‌گردد.

لذا تولید مدل کفیر مطابق ترکیب متغیرها بر اساس شرایط ذکر شده منجر به حصول نمونه مناسب خواهد شد. به منظور بررسی صحت فرآیند بهینه‌یابی، تیمار بهینه با شرایط یکسان همانند سایر نمونه‌ها تولید شد. همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌کنیم نتیجه پیش‌بینی شده در محدوده اطمینان^{۱۸} نتیجه عملی قرار گرفت که این امر کارایی مدل‌ها را به خوبی اثبات می‌کند.

18. Confidence interval

- characteristics of kefir. *CyTA-Journal of Food*, 13(3), 340-345.
- [8] Sarkar, S. (2007). Potential of kefir as a dietetic beverage—a review. *British Food Journal*, 109(4), 280-290.
- [9] Jumah, R. Y., Abu-Jdayil, B., & Shaker, R. R. (2001). Effect of type and level of starter culture on the rheological properties of set yogurt during gelation process. *International journal of food properties*, 4(3), 531-544.
- [10] Wu, S., Li, D., Li, S. J., Bhandari, B., Yang, B. L., Chen, X. D., & Mao, Z. H. (2009). Effects of incubation temperature, starter culture level and total solids content on the rheological properties of yogurt. *International Journal of Food Engineering*, 5(2).
- [11] Standard and Industrial Research, Milk and its Products, pH and Acidity Determination, No. 2852.
- [12] Sayyad, S. A. F., Chaudhari, S. R., & Panda, B. P. (2015). Quantitative determination of ethanol in arishta by using UV-visible spectrophotometer. *Pharmaceutical and Biological Evaluations*, 2(5), 204-207.
- [13] Liu, J. R., & Lin, C. W. (2000). Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *Journal of Food Science*, 65(4), 716-719.
- [14] Mortazavi, S.A., Milani, E., Moeenfar, M. (1392). Microbiological diversity in Kurdish cheese throughout ripening and its relationship with physicochemical and sensory characteristics. *Iranian Journal of Food Science and Technology*. 11(2), 151-140.
- [15] Nick Far, F. (1394). The effect of the mixture of pistachio resin of Atlantida (Bennet) and Inulin on the physicochemical, rheological and sensory properties of non fat yogurt. PhD thesis, Ferdowsi University of Mashhad. 125.
- [16] Dadkhah, S., Pourahmad, R., Assadi, M. M., & Moghimi, A. (2011). Kefir production from soymilk. *Ann. Biol. Res*, 2, 293-299.
- [17] Grønnevik, H., Falstad, M., & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21(9), 601-606.
- [18] Gul, O., Mortas, M., Atalar, I., Dervisoglu, M., & Kahyaoglu, T. (2015). Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir
- بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های انجام شده، میزان مخمر بیشترین اثرگذاری را بر گرانروی ظاهری داشته و با افزایش میزان مخمر و در طول زمان نگهداری مقدار گرانروی ظاهری و شاخص قوام کاهش یافت، علاوه بر این با افزایش درصد استارتر بر میزان گرانروی ظاهری افزوده گردید. در خصوص میزان اتانول، با افزایش مقدار مخمر میزان اتانول تولید شده افزایش یافته و در طیزمان نگهداری به علت افزایش مقدار مخمر نیز بر میزان تولید اتانول افزوده شد. همچنین با افزایش درصد استارتر مقدار pH کاهش و در دوره نگهداری به علت تجزیه لاکتوز توسط باکتری‌های آغازگر به لاکتیک و استیک اسید نیز میزان pH کاهش و اسیدیته افزایش نشان داد و در نهایت شمارش میکروبی در زمان نگهداری کاهش یافت. نتایج بهینه‌یابی نشان داد که نمونه حاوی ۲ درصد مخمر و ۴ درصد استارتر در زمان ۳۸ ساعت پس از تلقیح کمترین میزان اتانول را داشته و از لحاظ خواص رئولوژیکی مناسب می‌باشد.

۶- منابع

- [1] Zanirati, D. F., Abatemarco, M., de Cicco Sandes, S. H., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C., & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 32, 70-76.
- [2] Rattray, F. P. and O'Connell, M. J. (2011). kefir, Fermented Milks. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 6095: 518-524.
- [3] Suriasih, K., Aryanta, W. R., Mahardika, G., & Astawa, N. M. (2012). Microbiological and chemical properties of Kefir made of Bali cattle milk. *Food Science and Quality Management*, 6, 2225-0557.
- [4] Bensmira, M., & Jiang, B. (2011). Organic acids formation during the production of a novel peanut-milk kefir beverage. *British Journal of Dairy Sciences*, 2(1), 18-22.
- [5] Kök-Taş, T., Seydim, A. C., Özer, B., & Guzel-Seydim, Z. B. (2013). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 780-789.
- [6] Glibowski, P., & Kowalska, A. (2012). Rheological, texture and sensory properties of kefir with high performance and native inulin. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 299-304.
- [7] Arslan, S. (2015). A review: chemical, microbiological and nutritional

- [25] Doğan, M. (2011). Rheological behaviour and physicochemical properties of kefir with honey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6(3), 327-332.
- [26] Babina, N. A., & Rozhokova, I. V. (1973). Quantitative composition of kefir grains and kefir microflora at different of the year. *Molochnaya Promyshlennost*, 2, 15-17.
- [27] Dimitreli, G., Gregoriou, E. A., Kalantzidis, G., & Antoniou, K. D. (2013). Rheological properties of kefir as affected by heat treatment and whey protein addition. *Journal of Texture Studies*, 44(6), 418-423.
- [28] Taherian, A., Sadeghi mahonk, A. (1393). Study of the effect of Palm sap on physicochemical, microbial and sensory properties of drink made from kefir grains. *Quarterly Journal of Food Technology*, 2(6), 42-31.
- [29] Rimada P. & Abraham A. (2006). Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. *International Dairy Journal*, 16, 33-39.
- grain and starter culture. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1517-1525.
- [19] Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., & Ibanez, F. C. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90(4), 613-620.
- [20] Marshall, V. M., & Cole, W. M. (1985). Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. *Journal of Dairy Research*, 52(3), 451-456.
- [21] Duitschaeffer, C. L., Kemp, N., & Emmons, D. (1987). Pure culture formulation and procedure for the production of kefir. *Milchwissenschaft*, 42(2), 80-82.
- [22] Koroleva, N. S. (1988). Technology of kefir and kumys. *Bulletin of the International Dairy Federation (Belgium). Federation Internationale de Laiterie*. 227.
- [23] Magalhães, K. T., Pereira, G. V. D. M., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2011). Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 693-702.
- [24] Rao, M. A. *Food Rheology and Texture*. EolssPublishers, Inc.

Optimization of the effects of different levels of starter, yeast and storage time on the physicochemical and microbial properties of kefir beverage through response surface methodology.

Ahmadian Mask, S. ¹, Tabatabayi Yazdi, F. ^{2*}, Mortazavi, S. A. ², Kochaki, A. ²

1. MSc Student, Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Professor of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(Received: 2018/04/24 Accepted: 2019/01/29)

Kefir is a traditional beverage that is produced by fermented milk with kefir grains, Kefir grains are complex mixture of bacteria, yeasts, and polysaccharides produced by this micro flora. The initial amount of kefir grains used to produce kefir drinks affects the quality of the beverage in terms of pH, viscosity and microbial characteristics of the final beverage. In this study, the effects of different levels of starter (4, 6 and 8%, containing *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Bifidobacterium*), yeast *Saccharomyces cerevisiae* (2, 3 and 4%) and storage time (24, 48 and 72 hours after inoculation) on the physicochemical and microbiological properties of kefir beverage was studied using a central composite design and response surface methodology, in order to produce a product with higher probiotic bacteria than yeast. Physicochemical properties including acidity, pH, ethanol, apparent viscosity and flow behavior parameters, as well as microbial counting was performed. According to the results of the tests, the amount of yeast had the most effect on apparent viscosity and by increasing the amount of yeast and during of storage time, the apparent viscosity and consistency coefficient decreased. In addition, the viscosity increased with increasing starter rates. Regarding the amount of ethanol, the amount of produced ethanol increased by increasing the amount of yeast and during the storage time due to the increase in the amount of yeast and finally the microbial count decreased during storage. Optimization results showed that the sample containing 2% yeast and 4% starter in time 38 hours after inoculation had the lowest amount of ethanol and was suitable for rheological properties.

Keywords: Kefir, Starter, Yeast, Storage time, Physicochemical properties

* Corresponding Author E-Mail Address: Tabatabai @ um.ac.ir