ارزیابی برخی متغیرهای موثر بر ویژگی های اسیدی شدن خمیر ترش مایع

امین سرفراز[۱]، محمد حسین عزیزی[۲*]، زهره حمیدی اصفهانی[۳]، علی ظفری[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
٤- مدیر تحقیق و توسعه شرکت نان آوران سبوس، تهران.

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/٤ تاریخ پذیرش: ۹۲/٦/۷)

چکیده

تخمیر خمیرترش توسط باکتری های لاکتیک اسید و مخمر نانوایی با اسیدی شدن خمیر و تولید لاکتیک اسید و استیک اسید، اثرات مهمی بر ویژگی های کیفی نان دارد. کاربرد خمیرترش مایع در صنایع نانوایی به علت بازدهی خمیر بالاتر، سهولت انتقال و فرایند یک مرحله‌ای، توجه زیادی را جهت دستیابی به خصوصیات بافت و طعم دلخواه فراورده به خود معطوف کرده است. در تحقیق حاضر، رویه سطح پاسخ به منظور بهینه سازی تخمیر خمیرترش مایع با هدف افزایش تولید اسید به کار برده شد. مدت زمان (۱۸/۷-۵/۳ ساعت)، درجه حرارت تخمیر (°C ۳۸/٤-۲۱/٦) و بازدهی خمیر (۳۵۰/٤ -۲٤۹/٦) مطابق با طرح مرکب مرکزی به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شد و اثرات آنها در خمیرترش مایع تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه کازئی*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *ساکارومایسس سرویزیه* مطالعه شد. مقادیر لاکتیک اسید، استیک اسید و اسیدیته به عنوان پاسخ های اصلی در نظر گرفته شد. مدل های چند جمله ای درجه دوم به طور مناسبی اثرات متغیرها بر ویژگی های تولید اسید را پیش بینی کردند (R^2_{adj}> 0.80). تجزیه آماری نشان داد که تمامی پاسخ ها ارتباط معنی داری با مدت زمان و درجه حرارت تخمیر داشتند (P<0.01). با افزایش مدت زمان و دمای تخمیر، تولید لاکتیک اسید، استیک اسید و اسیدیته بیشتر شد و مدت زمان تخمیر مهمترین عامل موثر بر اسیدی شدن بود. لاکتیک اسید تحت تاثیر بازدهی خمیر قرار نگرفت، اما بازدهی پایین خمیر منجر به افزایش استیک اسید و اسیدیته می گردد. شرایط بهینه برای بیشینه تولید اسید، بر اساس نمودارهای سطح پاسخ و کانتور مدت زمان تخمیر (۲۱ ساعت)، درجه حرارت (°C ۳۸) و بازدهی خمیر (DY:۳۲۵) بود.

کلید واژگان: خمیرترش مایع، اسیدی شدن، تخمیر، بهینه سازی.

*مسئول مکاتبات: azizit_m@modares.ac.ir

۱- مقدمه

تخمیر توسط خمیرترش در نتیجه ساز و کار مشترک باکتری‌های لاکتیک اسید[1] (LAB) و مخمرها نقش های مختلفی در انواع نان ایفا می‌کند. بهبود ویژگی‌های خمیر، بافت و عطر و طعم نان، بهبود ارزش تغذیه‌ای، به تاخیر انداختن بیاتی، کپک‌زدگی و جلوگیری از فساد طنابی از جمله مزایای کاربرد خمیرترش در تولید نان محسوب می شود. نقش LAB تولید اسید در خمیرترش بوده، در حالی که مخمرهای خمیرترش در تولید ترکیبات طعم و برای متعادل نمودن طعم نان به همراه اسیدها خیلی مهم هستند [۱, ۲]. روش های تهیه خمیرترش عبارتند از: ۱- تخمیر خود به خودی ۲- افزودن مقدار کمی از خمیرترش رسیده[2] ۳- افزودن کشت آغازگر. همچنین خمیرترش‌ها براساس فناوری‌های تولید به سه دسته تقسیم می شوند: ۱) خمیرترش سنتی که زمان بر است و اغلب از فرایندهای تخمیر سه مرحله‌ای بدین منظور استفاده می‌شود. ۲)خمیرترش مایع[3] که با تخمیر یک مرحله‌ای و با صرف زمان کمتر و دماهای بالاتر از ۳۰°C حاصل می‌شود. ۳) پودر خمیرترش [۳].

تحقیقات متعددی در ایران در زمینه اثرات خمیرترش بر کاهش بیاتی [٤]، جلوگیری از فساد قارچی [٥]، مقایسه اثرات خمیرترش تازه و خشک بر ویژگی های حسی و بیاتی نان [٦]، تاثیر نمک طعام بر رشد لاکتوباسیل ها و فعالیت ضد میکروبی آن [۷] ، اثر فرایند انجماد و خشک کردن انجمادی بر زنده مانی باکتری های لاکتیکی [۸] و ... انجام شده است. در صنایع نانوایی تخمیرهای مایع بدلیل سهولت انتقال و قابلیت پمپ شوندگی مناسب بسیار مورد توجه بوده اند لیکن آنها نیاز به تولید اسید سریع‌تری دارند. مزیت سامانه مایع اینست که عوامل محیطی (از قبیل دسترسی به مواد مغذی) در سرتاسر این سامانه یکنواخت می‌باشد. در محیط مایع کنترل اسیدیته، آزادسازی آمینواسیدها و تولید ترکیبات طعمی مختلف به راحتی امکان‌پذیر است و می‌توان محصولی با اسیدیته بالاتر یا پائین‌تر مطابق بافت و طعم محصول نهایی مورد انتظار تولید نمود.

کشت‌های آغازگر برای تخمیر خمیرترش شامل کشت‌های خالص لیوفیلیزه LAB یا مخلوطی از LAB و مخمرهای خمیرترش هستند که بر اساس توانایی تولید اسید در خمیرترش در مدت زمان کوتاه انتخاب می گردند. شاخص‌های شیمیایی خمیرترش شامل pH، اسیدیته کل قابل تیتر[4] (TTA)، میزان لاکتیک اسید و استیک اسید می باشد و نسبت مولی لاکتیک اسید به استیک اسید (ضریب تخمیر) نقش مهمی در توسعه عطر و طعم نان‌های تهیه شده از خمیرترش دارند. تحقیقات نشان داده است عوامل موثر بر تخمیر خمیرترش شامل نوع آرد (گندم/ چاودار، درجه استحصال آرد و فعالیت آنزیمی)، نسبت آرد و آب (بازدهی خمیر[5])، فلور میکروبی آغازگر (باکتری‌های لاکتیک اسید و مخمرها)، میزان آغازگر افزوده شده و متغیرهای فرایند از قبیل درجه حرارت و مدت زمان تخمیر می باشد [۲, ۹].

در سامانه خمیرترش آرد، سوبسترای لازم برای ریزسازواره‌های تخمیرکننده را فراهم می‌کند. میزان کربوهیدرات‌های قابل تخمیر در آرد بسته به نوع غله مورد نظر، بویژه فعالیت آنزیمی آرد حاصله، متغیر است. میزان بالای خاکستر، قدرت تورم (حفظ گاز) و ظرفیت بافری زیاد آردهای با درجه استحصال بالا بر فعالیت ریزسازواره‌های موجود تاثیر دارد. به منظور تخمیر خمیرترش، خمیر را به صورت سفت و یا به شکل دوغاب آرد و آب تهیه می‌کنند. قوام خمیر بر عملکرد ریزسازواره‌ها موثر است و خمیرترش‌های با قوام پایین (میزان آب بیشتر) لاکتیک اسید و اتانول بیشتری تولید کرده و تخمیر با سرعت بیشتری انجام می شود و قندهای قابل تخمیر بیشتری مصرف می‌کنند. دمای بهینه برای رشد LAB نزدیک دمای بهینه برای تولید اسید بوده و اغلب LAB دارای دمای بهینه ۳۵-۳۰ °C هستند. با افزایش مدت زمان و دمای تخمیر میزان تولید اسید در خمیرترش افزایش می‌یابد [۹, ۱۰].

سرفراز و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی ویژگی های کیفی نان های تهیه شده توسط خمیرترش تخمیرشده با انواع مایه تلقیح LAB ومخمر نانوایی نشان دادند که مایه تلقیح لاکتوباسیلوس کازئی+ لاکتوباسیلوس فرمنتوم+ ساکارومایسس سرویزیه به لحاظ ویژگی های اسیدی شدن خمیرترش و عطر وطعم نان حاصله برتری نسبی داشت [۱۱]، لذا در تحقیق حاضر با ثابت فرض کردن مایه تلقیح و سوبسترای تخمیر، متغیرهای بازدهی

1. Lactic acid bacteria
2. Mature sourdough (mother sponge)
3. Liquid sourdough
4. Total titrable acidity
5. Dough yield (DY: $\frac{\text{flour+ water}}{\text{flour}} \times 100$)

خمیر، درجه حرارت و مدت زمان تخمیر خمیرترش مایع با هدف تولید بیشینه اسید بهینه می گردد. مطالعات محدودی در زمینه کاربرد تخمیر خمیرترش مایع در نانوایی انجام شده است و بررسی‌های بیشتری در خصوص بهینه‌سازی ترکیب محیط مایع تخمیر (آرد، مخمر و قند) و متغیرهای فرایند (سرعت همزدن، دما و زمان تخمیر) مورد نیاز است [۳].کارایی روش سطح پاسخ[1] در پیشرفت و بهینه سازی تولید فراورده های غلات و فرایندهای مربوطه به خوبی توسط محققین مختلف ثابت شده است [۱۲-۱۵]. لذا در این تحقیق رویه سطح پاسخ برای مطالعه اثرات تکی و اثرات متقابل متغیرهای مستقل درجه حرارت، مدت زمان تخمیر و بازدهی خمیر بر ویژگی‌های تولید اسید، انتخاب شد.

۲- مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

۲-۱-آماده سازی مایه تلقیح

کشت‌های لیوفیلیزه LAB شامل *لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه کازئی*[2] ATCC 9338 (باکتری هتروفرمانتاتیو اختیاری) و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[3] ATCC 39392 (باکتری هتروفرمانتاتیو اجباری) از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (PTCC) تهیه شد و برای حفظ زنده مانی در ۸۰°C- به حالت منجمد نگهداری شد [۱۱]. قبل از تلقیح خمیرترش، LAB از محیط انجمادی مایع، دو بار در محیط کشت MRS broth کشت داده شد و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C به مدت ۲٤ ساعت انجام شد تا سلول‌ها کاملاً فعال گردند [۱٦]. مخمر نانوایی *ساکارومایسس سرویزیه*[4] (IADY) از شرکت ایران مایه تهیه شد و به میزان ۰/۰٤ گرم (10^6 CFU/g خمیرترش) در ترکیب نمونه های خمیرترش به کار رفت. میزان مایه تلقیح باکتریایی 10^7 CFU/g خمیرترش بود.

۲-۲- تهیه و تخمیر نمونه های خمیرترش

نمونه‌های خمیرترش مایع (۵۰۰ گرم) با استفاده از مایه تلقیح *لاکتوباسیلوس کازئی+ لاکتوباسیلوس فرمنتوم+ ساکارومایسس سرویزیه* و سوبسترای تشکیل شده از آرد گندم تیره (۱۵۰ گرم)، آرد چاودار (۲۵ گرم)، آرد مالت (۵ گرم)، مالتوز (۲ گرم)، پودر عصاره مخمر (۲ گرم) و آب (۳۰۰ گرم) در ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری آماده شد. آرد گندم تیره بدلیل دارا بودن قدرت بافری بالا، آرد چاودار (دارای میزان بالای قندهای پنتوز)، آرد مالت برای افزایش فعالیت آنزیمی آلفا آمیلاز و عصاره مخمر برای حصول بیشترین بازیافت سلولی در ترکیب سوبسترا به کار رفت. مواد اولیه جهت تهیه خمیرترش در ظروف شیشه‌ای توزین و به ارلن مایر منتقل شد. سپس اختلاط خمیر روان، درون ارلن با استفاده از قاشق پلاستیکی تا مخلوط شدن کامل انجام شد. نمونه ها در گرمخانه مجهز به همزن در سطوح مختلف درجه حرارت و مدت زمان مطابق با طرح آزمایشی (جدول ۲ و۳) و سرعت همزدن ۱۵۰ rpm گرمخانه‌گذاری شدند تا عمل تخمیر انجام شود [۱۷].

۲-۳- تجزیه شیمیایی

نمونه‌های ۱۰ گرمی از خمیرترش‌های آزمون در زمان‌های مختلف تخمیر جمع آوری و برای تجزیه شیمیایی در ۲۵ °C- منجمد گردید. قبل از انجام تجزیه شیمیایی، نمونه‌های منجمد به مدت یک شب در دمای ٤°C (یخچال) یخزدایی شدند. مقدار اسیدیته (TTA) به روش تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال تا رسیدن به pH نهایی ۸/۵ اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌لیترهای سود ۰/۱ نرمال مصرفی بیان شد [۱۸].

دستگاه HPLC ساخت شرکت WATERS (model 2487, USA) برای اندازه گیری اسیدهای آلی (لاکتیک اسید و استیک اسید) به کار رفت. ستون Prontosil 120-3 C18 AQ (250×46mm, dp=3µm) Knauer, Germany) برای جداسازی استفاده شد. فسفریک اسید با غلظت ۵۰ میلی مولار و سرعت جریان ۰/۷ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان فاز متحرک استفاده شد. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و جداسازی در دمای اتاق با شناسایی توسط آشکارساز UV-vis

1. Response surface methodology
2. *L. casei subsp casei*
3. *L. fermentum*
4. Instant active dry yeast

در طول موج ۲۰۵ نانومتر انجام گرفت. جهت حذف ذرات معلق، نمونه‌های ۱۰ گرمی تهیه شده ابتدا با ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر سرد همگن شده و وزن نمونه‌ها به ۱۰۰ گرم رسانده شد. سپس سانتریفوژ در ۴۰۰۰× g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۵ °C انجام شد. ۲۰ میلی‌لیتر از جزء رویی برداشته و با ۵ میلی‌لیتر محلول Carrez I (Potassium II hexaferrocyanate, 0.85 M) و محلول Carrez II (Zinc sulfate, 0.25 M) مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل توسط سود ۰/۵ مولار تا رسیدن به pH نهایی ۸/۵ خنثی شد. حجم مخلوط را با آب مقطر به حدود ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و سپس مخلوط به منظور حذف ذرات معلق ۲ بار صاف شد (ابتدا با صافی واتمن شماره ۴۱ و سپس با صافی استات سلولزی ۰/۲۲ میکرون). از نمونه‌های صاف شده برای تزریق به دستگاه HPLC استفاده شد. اندازه گیری ها با ۲ تکرار انجام شدند [۲].

جدول ۱ ویژگی‌های آرد های مورد استفاده برای تهیه نمونه‌های خمیرترش مایع

ویژگی	AACC Method	آرد گندم تیره	آرد چاودار	آرد مالت
رطوبت (درصد)	16-44	۱۳	۱۲/۵	۱۰
خاکستر (درصد)	08-01	۱/۶	۱/۷	۱/۹۵
چربی (درصد)	30-10	۱/۸	۱/۶	–
پروتئین (درصد)	46-12	۱۲/۷	۱۰/۶	۱۳/۸
گلوتن مرطوب (درصد)	10-38	۳۴	–	–
عدد فالینگ (ثانیه)	56-81	۳۱۵	۴۲۵	۱۳۳(درجه لینتنر)

۲-۴- طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بهینه سازی تخمیر خمیرترش مایع از روش آماری سطح پاسخ استفاده شد. درجه حرارت (X_1، ۳۸/۴- °C ۲۱/۶)، مدت زمان تخمیر (X_2، ۱۸/۷-۵/۳ ساعت) و بازدهی خمیر (X_3، ۳۵۰/۴- ۲۴۹/۶درصد) به عنوان متغیرهای مستقل فرایند در نظر گرفته شد (جدول ۲).

جدول ۲ متغیرهای مستقل و سطوح مختلف آنها در آزمایش های بهینه سازی به روش سطح پاسخ

عامل	نماد	سطوح مختلف متغیرها				
		+۱/۶۸	+۱	۰	-۱	-۱/۶۸
درجه حرارت (°C)	X_1	۳۸/۴	۳۵	۳۰	۲۵	۲۱/۶
مدت زمان تخمیر (ساعت)	X_2	۱۸/۷	۱۶	۱۲	۸	۵/۳
بازدهی خمیر (درصد)	X_3	۳۵۰/۴	۳۳۰	۳۰۰	۲۷۰	۲۴۹/۶

با استفاده از طرح مرکب مرکزی[1] (CCD)، ۱۸ آزمایش شامل ۴ آزمایش در نقطه مرکزی، تعیین شد (جدول ۳).

طرح مرکب مرکزی در ۵ سطح برای هر متغیر (۱/۶۸، ۱، ۰، ۱- و ۱/۶۸-) در نظر گرفته شد [۱۹]. سطوح متغیرها بر اساس مطالعات مختلف انجام شده در زمینه تخمیر خمیرترش انتخاب گردید. نتایج آزمایش‌ها براساس معادله چند جمله‌ای درجه دوم زیر تحلیل می‌شود:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^{k} \beta_j X_j + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} X_j^2 + \sum\sum_{i<j} \beta_{ij} X_i X_j$$

1. Central composite design

در معادله ذکر شده y پاسخ پیش بینی شده، β_0 ضریب ثابت، β_j اثر خطی، β_{jj} اثر مربعات (درجه دوم) و β_{ij} اثرمتقابل متغیرهابوده و X_i و X_j متغیرهای مستقل کد شده می‌باشند.

به منظور تجزیه و تحلیل و رسم منحنی‌های سطح پاسخ نرم‌افزار SAS 9.1, USA استفاده گردید.

جدول ٣ ماتریس طرح مرکب مرکزی و نتایج هر واحد آزمایشی

آزمایش	درجه حرارت C)°(	مدت زمان تخمیر(ساعت)	بازدهی خمیر (درصد)	لاکتیک اسید (mg/١٠٠ g)	استیک اسید (mg/١٠٠ g)	اسیدیته (میلی‌لیتر سود ٠/١ نرمال مصرفی)
١	−١	−١	−١	*٧٢٣/٠٢±٤٩/٨٠	١٣٦/٤٦±٣١/٦٤	١٠/٠±٠/٤
٢	−١	−١	+١	٤٠٧/٢٢±٢٦/٥٣	٨٧/٧٤±٨/٠٦	٧/٥±٠/٣
٣	−١	+١	−١	٩٢٢/٦٥±٠/٠٨	١٥٧/٩٦±١/٢٩	١٦/٠±٠/١
٤	−١	+١	+١	٩٤٤/٣٢±٢٢/٤٦	١٧١/١٤±٥/٨٠	١٣/٥±./٢
٥	+١	−١	−١	٧١٣/١٤±٥٧/٧٤	١١٨/٤٠±٨/٨٠	١١/٠±٠/٦
٦	+١	−١	+١	٥٩٢/٠٧±١٦/٥٩	١٠٠/٧٤±٩/٧٦	٧/٥±٠/٢
٧	+١	+١	−١	١٢١٥/٧١±١٦٨/٥٣	٢١٨/٩٦±٢٧/٨٩	١٨/٠±١/٠
٨	+١	+١	+١	١٢٧٦/٦٧±٢٣/٤٠	١١٤/٥٩±١٢/٧٤	١٦/٠±٠/٢
٩	−١/٦٨	٠	٠	٢٢٢/٥٥±٣٣/٠٤	٤٠/٤٧±٥/٧٨	٥/١±٠/٢
١٠	+١/٦٨	٠	٠	١٠٣٤±٤٦/٧٢	١٢٧/١٣±٢/٣٢	١٤/٥±٠/٢
١١	٠	−١/٦٨	٠	١٤٥/٧٧±٢٤/٠٣	٤٧/٧٣±٨/٣٩	٦/٠±٠/٢
١٢	٠	+١/٦٨	٠	٨١٧/٤٥±٢٤/٢٥	٩٤/٥٤±٣/٤٧	١٦/٠±٠/٢
١٣	٠	٠	−١/٦٨	٩٣٤/٧٣±٥٥/١٤	١٥٨/٨٤±٣٨/٤٠	١٣/٥±٠/٣
١٤	٠	٠	+١/٦٨	٨٢٢/٣٩±٧٣/٩٤	١٦٨/٤٠±٢٠/٧٩	١١/٥±٠/٤
١٥	٠	٠	٠	٧٩١/٤٣±٦٧/٨٢	١٢٨/٩٤±٩/٧٦	١٢/٠±٠/٣
١٦	٠	٠	٠	٦٣٨/٨٨±١٥/٢٩	١٣٥/٥٢±٣/٥٠	١١/٥±٠/٢
١٧	٠	٠	٠	٦٥٣/٣٣±١٦/١٤	١٣٥/٧٨±٥/٩٦	١١/٥±٠/٢
١٨	٠	٠	٠	٨٠٩/٣٤±٤٢/٣٨	١١٨/٧٣±٨/٠٧	١٢/٠±٠/٢

* اعداد جدول بصورت انحراف استاندارد ± میانگین درج شده است.

٣- نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از آزمون های شیمیایی آرد گندم، آرد چاودار و آرد مالت [٢٠] در جدول ١ ارائه شده است. هدف از انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی، بدست آوردن یک مدل ریاضی برای پیش‌بینی رفتار فرآیند می‌باشد. با استفاده اززروش آماری سطح پاسخ، برای هر پاسخ اندازه گیری شده (لاکتیک اسید، استیک اسید و اسیدیته) یک معادله درجه دوم محاسبه شد. نتایج تجزیه واریانس مدل های رگرسیون لاکتیک اسید، استیک اسید و اسیدیته (جدول ٤) نشان می دهد که مدل‌های مذکور با ضرایب همبستگی به ترتیب ٨٨/٧٠، ٨٩/٤٨ و ٩٠/٦٤ همگی معنی دار بوده و با نتایج آزمایش ها به خوبی برازش داده شده اند.

جدول ٥ ضرایب رگرسیون و مقادیر P را برای پاسخ های مختلف نشان می‌دهد. مقادیر بالای ضریب تبیین R^2 و $R^2_{Adjusted}$، بیانگر قدرت بالای مدل در پیش بینی می باشد.

جدول ٤ تجزیه واریانس مدل چند جمله ای برای تولید لاکتیک اسید، استیک اسید و اسیدیته

پاسخ	منبع	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درجه آزادی	ارزش F	ارزش P
لاکتیک اسید	مدل	٣١٠٠٤٣٧	٣٤٤٤٩٣	٩	١٥/٦٩٩٧٩	**٠/٠٠٠١
	خطی	٢٨٩٠٩١٩	٩٦٣٦٣٩/٧	٣	٤٣/٩١٦٥٤	**٠/٠٠٠١
	مربعی	١٤٨٣٧٩/٧	٤٩٤٥٩/٨٩	٣	٢/٢٥٤٠٦٦	٠/١١٦٩٤٩
	اثر متقابل	٦١١٣٨/٤٥	٢٠٣٧٩/٤٨	٣	٠/٩٢٨٧٦٧	٠/٤٤٧٠٥٤
استیک اسید	مدل	٦٧٠٦٥/٧٤	٧٤٥١/٧٤٩	٩	١٧/٠٠٢٩٨	**٠/٠٠٠١
	خطی	٥٠٦٢٣/٧٦	١٦٨٧٤/٥٩	٣	٣٨/٥٠٣٤٨	**٠/٠٠٠١
	مربعی	١٣٣٨٨/٢٦	٤٤٦٢/٧٥٣	٣	١٠/١٨٢٨٦	**٠/٠٠٠٣٨١
	اثر متقابل	٣٠٥٣/٧٢٩	١٠١٧/٩١	٣	٢/٣٢٢٦٠٩	٠/١٠٩٤٢٤
اسیدیته	مدل	٣٥٢/٩٦	٣٩/٢١٧٧٨	٩	١٩/٣٧٥١٤	**٠/٠٠٠١
	خطی	٣٣٢/٥٠٤٧	١١٠/٨٣٤٩	٣	٥٤/٧٥٦٨٦	**٠/٠٠٠١
	مربعی	١٤/٧٢٥٥٦	٤/٩٠٨٥٢١	٣	٢/٤٢٥٠٠٥	٠/٠٩٩١٣٩
	اثر متقابل	٥/٧٢٩٧٢٧	١/٩٠٩٩٠٩	٣	٠/٩٤٣٥٧١	٠/٤٤٠٣٠٩

** معنی‌دار در سطح P<0.01

جدول٥ ضرایب رگرسیون مدل های چند جمله ای برای پاسخ لاکتیک اسید، استیک اسید و اسیدیته

ضریب	لاکتیک اسید		استیک اسید		اسیدیته	
	پاسخ	احتمال P	پاسخ	احتمال P	پاسخ	احتمال P
$\hat{a}_1$	١٧٣/٨٣	**٠/٠٠٠١	٢١/١٧٨٨	**٠/٠٠٠١	١/٧٦٤٢	**٠/٠٠٠١
$\hat{a}_2$	٣٢٤/٦٢	**٠/٠٠٠١	٤٣/٨٦٣٧	**٠/٠٠٠١	٣/٣٢٠٢	**٠/٠٠٠١
$\hat{a}_3$	−٢٤/٥٦	٠/٤٣١٥	٠/١٩٥٠	٠/٩٦٤٤	−٠/٨١١٣	*٠/٠١٢٧
$\hat{a}_{12}$	٥١/١٣	٠/٢٤٨٤	١٤/٣٦٥١	*٠/٠٢٩١	٠/٥٣٠٤	٠/٢١٤
$\hat{a}_{13}$	٢١/٤٣	٠/٦١٩٥	−٠/٣١٣٥	٠/٩٥٨٨	−٠/٣٤٧٤	٠/٤٠٥٠
$\hat{a}_{23}$	٥٩/٧٧	٠/١٨٠٢	١٠/٠٧٤٧	٠/١١٣٦	٠/٢٨٠٤	٠/٥٠٤٥
$\hat{a}_{11}$	−٦٧/٩٤	٠/٠٦٧١	−٩/١٠٨٨	٠/٠٨١١	−٠/٤٩٩٩	٠/١٥٢٩
$\hat{a}_{22}$	٥/٥١	٠/٨٨٣٥	−٥/١٤٠٦	٠/٣٣٩٤	٠/٠٥٧١	٠/٨٧٤٢
$\hat{a}_{33}$	٢٠/٤٢	٠/٥٦٥٤	١٩/١٠٣	**٠/٠٠١١	٠/٤٥٤٧	٠/١٩١٤
R^2	٨٨/٧٠		٨٩/٤٨		٩٠/٦٤	
R^2-adjusted	٨٨/٠٥		٨٤/٢١		٨٥/٩٧	

* معنی‌دار در سطح P<0.05 و ** معنی‌دار در سطح P<0.01

در بین اثرات خطی به استثنای بازدهی خمیر، اثر خطی سایر عوامل (درجه حرارت و مدت زمان تخمیر) بر غلظت لاکتیک اسید، استیک اسید و اسیدیته معنی دار بود (P<0.01). همچنین اثر درجه دوم بازدهی خمیر (P<0.01) و اثر متقابل درجه حرارت- مدت زمان(P<0.05)، در مدل بدست آمده برای استیک اسید معنی دار بودند. بنابراین با حذف برخی عوامل که معنی‌دار نبود، معادلات زیر برای مقادیر کد شده لاکتیک اسید، استیک اسید و اسیدیته در خمیرترش مایع فراهم شد.

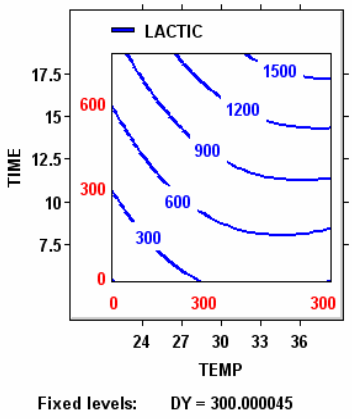
$$Lactic acid = 857.5475 - 173.8298X_1 + 324.6171X_2$$

$$Acetic acid = 123.6604 - 21.1788X_1 + 43.8637X_2 + 0.1950X_3 - 9.1088X_{11} + 5.1405X_{22} + 19.1029X_{33} + 14.3650X_{12} - 0.3134X_{13} + 10.0746X_{23}$$

$$Acidity = 1.7568 + 1.7642X_1 + 3.3202X_2 - 0.8112X_3$$

۳-۱-تولید لاکتیک اسید

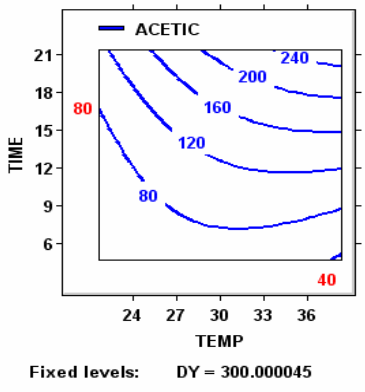
شکل ۱ تاثیر سطوح مختلف درجه حرارت و مدت زمان تخمیر بر مقدار لاکتیک اسید در شرایط بازدهی خمیر ثابت در خمیرترش مایع را نشان می‌دهد. طبق نمودار با افزایش درجه حرارت و مدت زمان تخمیر، تولید لاکتیک اسید افزایش می‌یابد و بیشترین مقدار لاکتیک اسید در محدوده دمای ۳۸-۳۵ °C و مدت زمان ۲۰-۱۸ ساعت بدست می‌آید. مقدار لاکتیک اسید تحت تاثیر بازدهی خمیر قرار نگرفت. مدل پیش بینی در سطح احتمال ۹۵ درصد برای لاکتیک اسید نشان داد که مدت زمان تخمیر بیشترین تاثیر را بر تولید لاکتیک اسید دارد. نشان داده شده است که با افزایش دمای تخمیر در نتیجه تولید بالای لاکتیک اسید میزان اسیدیته کل خمیرترش افزایش می‌یابد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد [۱۷].



شکل ۱ نمودار کانتور تاثیر سطوح مختلف درجه حرارت و مدت زمان تخمیر بر مقدار لاکتیک اسید در شرایط بازدهی خمیر ثابت

۳-۲- تولید استیک اسید

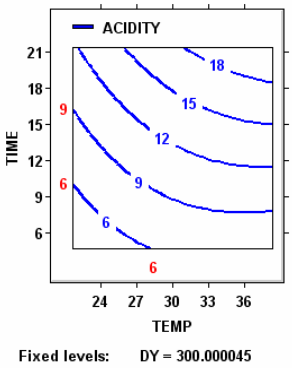
شکل ۲ تاثیر سطوح مختلف درجه حرارت و مدت زمان تخمیر بر مقدار استیک اسید در شرایط بازدهی خمیر ثابت در خمیرترش مایع را نشان می‌دهد. طبق نمودار با افزایش درجه حرارت و مدت زمان تخمیر، تولید استیک اسید افزایش می‌یابد و در شرایط ثابت نقطه مرکزی بازدهی خمیرترش، بیشترین مقدار استیک اسید در محدوده دمای ۳۸-۳۴ °C و زمان ۲۰-۱۸ ساعت حاصل می‌شود. با افزایش دمای تخمیر به بالاتر از ۳۸ °C تولید استیک اسید کمتر شده و به حداقل می‌رسد. مدل پیش‌بینی در سطح احتمال ۹۵ درصد برای استیک اسید نشان داد مدت زمان تخمیر تاثیر بیشتری در مقایسه با درجه حرارت تخمیر بر تولید استیک اسید دارد. استیک اسید کمتر تحت تاثیر بازدهی خمیر قرار گرفت.



شکل ۲ نمودار کانتور تاثیر سطوح مختلف درجه حرارت و مدت زمان تخمیر بر مقدار استیک اسید در شرایط بازدهی خمیر ثابت

۳-۳- مقدار اسیدیته

شکل ۳ تاثیر سطوح مختلف درجه حرارت و مدت زمان تخمیر بر مقدار اسیدیته در شرایط بازدهی خمیر ثابت در خمیرترش مایع را نشان می‌دهد. طبق نمودار با افزایش درجه حرارت و مدت زمان تخمیر مقدار اسیدیته افزایش می‌یابد و بیشترین میزان اسیدیته در محدوده دمای ۳۸-۳۲ °C و زمان ۲۰-۱۸ ساعت حاصل می‌شود. مدل پیش‌بینی در سطح احتمال ۹۵ درصد برای اسیدیته نشان داد که تاثیر مدت زمان تخمیر بر اسیدیته بیشتر از تاثیر دمای تخمیر بوده و با افزایش بازدهی خمیر، اسیدیته کاهش یافته و خمیرترش‌های با بازدهی خمیر پایین، اسیدته بیشتری داشتند. اثر مثبت درجه حرارت تخمیر بر پیشرفت اسیدیته خمیرترش در کارهای دیگر نیز گزارش شده است [۱۳, ۱۶, ۱۷]. تولید قابل توجه اسیدهای آلی تنها با ترکیبی از مدت زمان تخمیر طولانی (بالاتر از ۱۶ ساعت) و دماهای تخمیر بالا (بیشتر از ۳۲ °C) بدست می‌آید [۱۲].



شکل ۳ نمودار کانتور تاثیر سطوح مختلف درجه حرارت و مدت زمان تخمیر بر مقدار اسیدیته در شرایط بازدهی خمیر ثابت

کتینا و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کردند به طور کلی با افزایش درجه حرارت، مدت زمان تخمیر و مقدار خاکستر آرد، تشکیل اسیدیته (pH، TTA و میزان اسیدهای آلی) در خمیرترش‌ها افزایش یافت و مهمترین عامل موثر بر اسیدیته مدت زمان تخمیر بود. اثرات متقابل مدت زمان و درجه حرارت تخمیر در تخمیرهای مختلف خمیرترش نشان داد که برای کاهش موثر pH، زمان تخمیر طولانی و دماهای تخمیر بالا ضروری است. بالاترین میزان TTA در خمیرترش‌های تخمیر شده با مدت زمان تخمیر ۱۸ ساعت، درجه حرارت ۳۲ °C و میزان خاکستر آرد ٪ ۱/۲< یافت شد [۱۲]. این یافته ها با نتایج تحقیق حاضر هماهنگی دارد. تاثیر مسلم میزان خاکستر آرد، مدت زمان و درجه حرارت تخمیر بر مقدار اسیدیته به خوبی توسط محققان ثابت شده است [۱۵, ۲۱-۲۳]. مارتینز- آنایا و همکاران نشان دادند درجه حرارت و بازدهی خمیر نقش کمتری در کنترل تولید اسید داشتند، اما افزایش آنها عموماً تاثیر آرد را بیشتر می‌کند [۲۱]. کارنوالی و همکاران (۲۰۰٦) با بررسی متابولیت های اولیه و متابولیت های ثانویه در خمیرترش مایع نشان دادند متغیرهای فرایند ازجمله درجه حرارت تخمیر (°C ۳۷-۳۰) و هوادهی ملایم محیط تاثیر چندانی در روند تخمیر نداشت. در عوض ترکیب آرد، تعداد سلول‌های آغازگر برای تخمیر و مدت زمان تخمیر متغیرهای اصلی برای کنترل تخمیر بهینه بودند [۳]. میزان اسیدهای تولید شده در خمیرترش با افزایش دمای تخمیر در نتیجه تولید بالای لاکتیک اسید افزایش می‌یابد. در حالیکه تولید استیک اسید تنها به مقدار ناچیزی تحت تاثیر دما قرار می‌گیرد و بر مبنای قانون کلی مقدار استیک اسید در خمیرترش سرد در مقایسه با خمیرترش گرم‌تر بالاتر است تولید لاکتیک اسید تحت تاثیر بازدهی خمیر قرار نمی‌گیرد در حالیکه عموماً در خمیرترش‌های مایع استیک اسید کمتری تولید می‌شود [۲۲]. این یافته ها در مقدار لاکتیک اسید و اسیدیته با نتایج تحقیق حاضر هماهنگی دارد.

٤- نتیجه گیری

با استفاده از روش سطح پاسخ متغیرهای موثر در تخمیر خمیرترش مایع با هدف بیشترین مقدار تولید اسیدهای آلی بهینه‌سازی شد. مدل‌های رگرسیون بخوبی توانستند اثرات درجه حرات، مدت زمان تخمیر و بازدهی خمیر بر تولید لاکتیک اسید، استیک اسید و اسیدیته را نشان داده و پیش بینی کنند. با انجام تخمیر در شرایط بهینه دمای ۳۸°C، مدت زمان ۲۱ ساعت و بازدهی خمیر ۳۲۵ بیشترین مقادیر لاکتیک اسید (۱۷۷۰mg/۱۰۰ g)، استیک اسید (۲۹۰mg/۱۰۰ g) و اسیدیته (۲۰ ml) در خمیرترش مایع فراهم شد.

٥- سپاسگزاری

از حمایت های مادی و معنوی شرکت نانآوران سبوس و مرکز رشد سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می شود.

٥- منابع

[1] Kulp K, Lorenz K. Handbook of Dough fermentations: CRC; 2003.
[2] Robert H, Gabriel V, Lefebvre D, Rabier P, Vayssier Y, Fontagné-Faucher C. Study of the behaviour of Lactobacillus plantarum and Leuconostoc starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. LWT-Food Science and Technology. 2006;39(3):256-65.
[3] Carnevali P, Ciati R, Leporati A, Paese M. Liquid sourdough fermentation: industrial application perspectives. Food microbiology. 2007;24(2):150-4.
[4] Sadeghi A, Shahidi F, Mortazavi A, Nasiri M, Kochaki A. Sourdough Effect on Reduction of Barbari Bread Staling. JWSS - Isfahan University of Technology. 2009;13:37-46..
[5] Khorasanchi N, Peighambardoust SH, Tafti AG, Hejazi MA, Rafat SA. Evaluating the

ability of liquid sourdough containing L. plantarum and L. reuteri starters in inhibition of bread mold spoilage. Journal of food research, University of Tabriz. 2012;21(3):391-400.

[6] Peyghambardoust SH, Golshan TA, Khorasanchi N, Hejazi M, Rafat S. Comparing the effects of fresh and dried sourdough on the sensory characteristics and staling of pan bread. Journal of food research, University of Tabriz. 2010.

[7] Alizadeh S, Jamalifar H, Samadi N, Eaidi A, Fazeli M. Effect of sodium chloride on the kinetics of growth and antimicrobial potential of Lactobacilli isolated from Iranian traditional sourdough. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2010;5(3):47-56.

[8] Khorasanchi N, Peighambardoust SH, Hejazi M, Raafat S. Effect of Freez-drying process on the survival of sourdough lactic acid bacteria. Journal of food research, University of Tabriz. 2011.

[9] Hui YH, Meunier-Goddik L, Hansen AS, Josephsen J, Nip WK, Stanfield PS, et al. Handbook of food and beverage fermentation technology: CRC; 2004.

[10] Decock P, Cappelle S. Bread technology and sourdough technology. Trends in food science & technology. 2005;16(1):113-20.

[11] Sarfaraz A, Azizi M, Hamidi Esfahani Z, Torshizi K, Zafari A. Interaction between lactic acid bacteria and baker's yeast in liquid sourdough fermentation. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2008;3(2):73-80.

[12] Kati K, Kaisa P, Karin A. Influence and interactions of processing conditions and starter culture on formation of acids, volatile compounds, and amino acids in wheat sourdoughs. Cereal chemistry. 2004;81(5):598-610.

[13] Javanainen P, Linko YY. Factors affecting rye sour dough fermentation with mixed-culture pre-ferment of lactic and propionic acid bacteria. Journal of Cereal Science. 1993;18(2):171-85.

[14] Clarke C, Schober T, Angst E, Arendt E. Use of response surface methodology to investigate the effects of processing conditions on sourdough wheat bread quality. European Food Research and Technology. 2003;217(1):23-33.

[15] Simonson L, Salovaara H, Korhola M. Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations. Food microbiology. 2003;20(2):193-9.

[16] Esteve CC, Barber CB, Martinez-anaya MA. Microbial sour doughs influence acidification properties and breadmaking potential of wheat dough. Journal of food science. 2006;59(3):629-33.

[17] Gelinas P, Lachance O, Audet J. Flavorants for enhancing the taste and flavor of bakery products and process of making. Google Patents; 1992.

[18] Paramithiotis S, Chouliaras Y, Tsakalidou E, Kalantzopoulos G. Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. Process Biochemistry. 2005;40(8):2813-9.

[19] Haaland PD. Experimental design in biotechnology. 1989.

[20] St. Paul M. AACC. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. The American Association of Cereal Chemists Inc. 2000;10th ed.

[21] Martínez-Anaya M, Benedito de Barber C, Collar Esteve C. Effect of processing conditions on acidification properties of wheat sour doughs. International journal of food microbiology. 1994;22(4):249-55.

[22] Katina K. Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread: VTT Technical Research Centre of Finland; 2005.

[23] Salovaara H, Valjakka T. The effect of fermentation temperature, flour type, and starter on the properties of sour wheat bread. International journal of food science & technology. 1987;22(6):591-7.

Evaluation of some variables affecting the acidification characteristics of liquid sourdough

Sarfaraz, A[1], Azizi, M. H.[2*], Hamidi Esfahani, Z[3], Zafari, A[4]

1. M.Sc. graduate in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran.
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran.
4. R& D Manager of Nanavaran Saboos Company, Tehran

(Received: 92/2/4 Accepted: 92/6/7)

Sourdough fermentation by lactic acid bacteria and baker's yeast with acidification of dough and producing lactic acid and acetic acid has significant effects on quality characteristics of bread. Application of liquid sourdough in bakery industry has attracted much attention due to higher dough yield, ease of transition and one-step process in order to achieve desired texture and flavor characteristics in final product. In the research, Response surface liquid methodology was used to optimize sourdough fermentation for increased acidification. Fermentation time (5.3- 18.7 hrs.), temperature (21.6- 38.4 °C), and dough yield (249.6- 350.4) were considered as independent factors according to central composite design and their effects were studied in liquid sourdoughs fermented with *Lactobacillus casei subsp casei*, *Lactobacillus fermentum* and *Saccharomyces cerevisiae*. lactic acid and acetic acid contents and total titrable acidity (TTA) were considered as the main responses. The second order polynomial models satisfactory predicted the effects of variables on acidification properties (R^2_{adj}> 0.80). Statistical analysis showed that all the responses were significantly (P<0.01) correlated to fermentation time and temperature. Increase in fermentation time and temperature was associated with an increase in lactic acid, acetic acid and TTA and fermentation time was the most affecting factor on acidification. Lactic acid was not affected by dough yield but the lower dough yield caused in high acetic acid content and acidity. Based on response surface and contour plots, the optimum conditions for maximum acidification were: fermentation time (21 hrs.), temperature (38°C) and dough yield (DY: 325).

Key words: Liquid sourdough, acidification, fermentation, optimization.

* Corresponding Author E-Mail Address: azizit_m@modares.ac.ir