مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بهینه‌سازی ترکیب ماست همزده پروبیوتیک حاوی سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ***LA5*** به روش سطح پاسخ

مریم پیرایش اسلامیان[۱]، جواد حصاری[۲*]، مهناز منافی دیزج یکان[۳]

۱-دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

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

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت:۱۴۰۳/۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲

کلمات کلیدی:

پروبیوتیک،

سطح پاسخ،

سلامت‌افزا،

ماست همزده

DOI:10.22034/FSCT.22.162.278.

* مسئول مکاتبات:

jhesari@tabrizu.ac.ir

چکیده

با استفاده از روش سطح پاسخ اثر سه متغیر مستقل شامل چربی (۸، ۶/۶۸، ۴/۷۵، ۲/۸۲، ۱/۵ درصد)، نمک (۱، ۰/۸۲، ۰/۵۵، ۰/۲۸، ۰/۱۰ درصد) و ماده خشک بدون چربی (SNF) (۱۵، ۱۳/۶۸، ۱۱/۷۵، ۹/۸۲، ۸/۵۰ درصد)، روی ویژگی‌های نمونه‌های ماست همزده پروبیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ارزیابی حسی نمونه‌ها نشان داد که نمونه‌های با ترکیب (چربی ۴/۷۵، نمک ۱، SNF ۱۱/۷۵ درصد) و (چربی ۶/۶۸، نمک ۰/۸۲، SNF ۱۳/۶۸ درصد) بیشترین امتیاز را در روز اول و نمونه‌های با ترکیب (چربی ۸ نمک ۰/۵۵، SNF ۱۱/۷۵ درصد) و (چربی ۴/۷۵، نمک ۰/۵۵، SNF ۱۵ درصد) کمترین امتیاز را در روز ۲۱ کسب کردند. با توجه به نتایج حاصل از بهینه‌سازی ارزیابی حسی، ماست همزده پروبیوتیک (چربی ۵/۴۵، نمک ۰/۲۸، SNF ۱۳/۶۸ درصد) به عنوان نمونه بهینه با نمونه تهیه شده در صنعت به عنوان نمونه کنترل (چربی ۱/۴، نمک ۰، SNF ۱۰ درصد)، برای انجام آزمون میکروبی مقایسه شد. نتایج نشان داد که درصد چربی، SNF و نمک اثر معنی‌داری بر pH نمونه‌ها نداشتند اما درصد SNF و نمک و اثر متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری ($p<0/05$) بر اسیدیته آن‌ها نشان دادند. بررسی‌های میکروبی حاکی از تأثیر معنی‌داری ترکیب، مدت زمان نگهداری و اثر متقابل آن‌ها روی شمارش باکتری‌های آغازگر و پروبیوتیک بود ($p<0/01$). کاهش در شمارش باکتری‌های آغازگر و پروبیوتیک در نمونه کنترل به افزایش اسیدیته نسبت داده شد. با جمع‌بندی نتایج حاصل از آزمون‌های مختلف، چربی ۵/۴۵، نمک ۰/۲۸ و SNF ۱۳/۶۸ درصد به عنوان بهترین فرمولاسیون ماست همزده پروبیوتیک معرفی می‌شود.

۱-مقدمه

موادغذایی فراسودمند نوظهور باعث ایجاد تنوع در تولید محصولات غذایی شده است. این مواد علاوه بر تأمین منابع تغذیه‌ای مناسب، موجب سلامتی مصرف‌کنندگان گردیده است. امروزه بیشترین و مهمترین موادغذایی فراسودمند پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک می‌باشند. ماست محبوب‌ترین محصول تخمیری لبنی است که به عنوان مهمترین محصول تجاری پروبیوتیک در دنیا تولید و به بازار عرضه می‌شود. محصولات لبنی از جمله ماست می‌تواند نقش مهمی به عنوان حامل باکتری‌های پروبیوتیک داشته و عامل انتقال آن به مصرف‌کننده باشد [۱]. ماست از نظر محققان فرآورده لبنی تخمیری است که توسط دو میکروارگانیسم *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* از شیر تازه تهیه می‌شود [۲]. علت محبوبیت و مصرف بالای این فرآورده لبنی ارزش تغذیه‌ای (سرشار از کربوهیدرات، پروتئین، چربی، موادمعدنی و ویتامین‌ها) و اثرات سودمند باکتری‌های آغازگر آن (حفظ توازن فلور میکروبی دستگاه گوارش) و خواص درمانی از قبیل سلامتی پوست، ضد سرطان، کنترل وزن و غیره می‌باشد [۳ و ٤]. امروزه انواع مختلفی از ماست بر اساس ماهیت فیزیکی، شیمیایی و ویژگی‌های عطروطعمی تولید می‌شوند. معمول‌ترین آن‌ها از لحاظ تجاری ماست قالبی، همزده، نوشیدنی و منجمد می‌باشند. ماست همزده به وسیله‌ی تخمیر شدن شیر و به هم زدن دلمه برای شکستن ساختار سفت ژل، جهت بدست آوردن مایع ویسکوز به دست می‌آید [۵]. ویژگی‌های فیزیکی و ساختار محصولات تخمیری همزده از قبیل ماست معیاری ضروری و مهم برای مقبولیت مصرف‌کننده است. اما با این حال با توجه به اینکه باکتری‌های آغازگر تجاری ماست توان زنده‌مانی در دستگاه گوارش و بروز خواص سودمند را نداشته، علاقه به مصرف ماست پروبیوتیک ایجاد شد [٦]. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر در مقادیر کافی مصرف شوند اثرات سودمندی بر میزبان خواهند داشت. باور موجود در مورد اثرات مفید پروبیوتیک‌ها، بر پایه این واقعیت قرار دارد که فلور میکروبی روده نقش محافظت کننده‌ای در برابر بیماری‌های مختلف از خود نشان می دهد؛ اثر اصلی پروبیوتیک‌ها با تثبیت فلور میکروبی روده مشخص می‌شود [۷]. مشاهده شده است که مصرف دائم پروبیوتیک‌ها درکاهش میزان بروز بیماری‌های مختلف موثر است که این تأثیر در جمعیت‌های دارای خطر بالا (مانند کودکان بستری در بیمارستان، کودکانی که شیر مادر مصرف نمی‌کنند یا در شرایط محروم به سر می برند) بارزتر است. زنده‌مانی و فعالیت متابولیتی فرآورده‌های پروبیوتیک باید در تمامی مراحل فرآوری موادغذایی از تولید تا هضم توسط مصرف‌کننده حفظ شود. تولید ماست پروبیوتیک مستلزم انتخاب درست سویه‌های میکروبی و نیز ترکیب مناسب ماده غذایی حامل به همراه به کارگیری فرآیندهای سازگار با حیات سویه‌های منتخب می‌باشد [۸]. در منابع علمی جمعیت $۱۰^{۷}$ –$۱۰^{٦}$ تعداد کلنی در گرم[1]، در محصول نهایی به عنوان مقادیر درمانی در موادغذایی فرآوری شده بیان شده است. در تولید ماست پروبیوتیک عوامل مختلفی بر ویژگی‌های ارگانولپتیکی، رئولوژیکی، بافتی و ریزساختار آن از جمله، فرآیند تخمیر، نوع شیر، نوع کشت آغازگر، گونه پروبیوتیک، فرمولاسیون و غیره اثر دارند، [۹] که منجر به ایجاد محصولی مطلوب از لحاظ کیفی و متناسب با تقاضای مصرف‌کننده می‌شود. بنابراین زنده ماندن و پرگنه‌سازی در محیط روده شرط اساسی پروبیوتیک بودن است. از گونه‌های مهم پروبیوتیک‌ها می‌توان باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس* مثل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و باکتری‌های جنس *بیفیدوباکتریوم* مثل *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* را نام برد. هرچند که محصولات لبنی بستر مناسبی برای انتقال باکتری‌های

1. Colony Forming Unit/gr

پروبیوتیک به بدن انسان درنظر گرفته می‌شوند اما موانع تکنولوژیکی، مانند انتخاب سویه‌های مناسب پروبیوتیک، مقدار نمک، نوع بسته‌بندی حضور یا عدم حضور اکسیژن، زمان رسیدن و شرایط نگهداری محصول می‌تواند کارایی تولید و استفاده از این محصولات را کاهش دهد. ویژگی‌های حسی فرآورده‌های پروبیوتیک ممکن است اثر نامطلوبی روی بازارپسندی آن بگذارد. لذا در انتخاب سویه‌ها و فرمولاسیون ماست پروبیوتیک باید به بهبود ویژگی‌های حسی محصول توجه شود [۱۰]. هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر مقدار چربی، ماده خشک بدون چربی و درصد نمک بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، میکروبی و حسی ماست همزده پروبیوتیک، جهت تولید محصولی فراسودمند با کیفیت مطلوب از دید مصرف‌کننده می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

شیر، خامه و پودر شیرخشک بدون چربی تهیه شده از شرکت شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان شرقی، استارتر تجاری ماست YC-X11 (کشت مخلوط *استرپتوکوکوس‌ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس‌دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، شرکت کریستین هانسن، دانمارک)، باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 (شرکت کریستین هانسن، دانمارک)، محیط کشت M17 آگار (شرکت کیولب، کانادا) و MRS آگار (شرکت لیوفیلیکوم، ایتالیا)، استفاده شد.

۲-۲- روش تهیه ماست همزده پروبیوتیک

در این تحقیق برای تولید ماست همزده پروبیوتیک، شیر استانداردسازی شده با درصدهای مختلف چربی، ماده خشک بدون چربی[۱] (SNF) و نمک (جدول ۱) در دمای ۶۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد در فشار ۲۰-۱۵ مگاپاسکال هوموژنیزه شد. سپس در دمای ۹۰-۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد، پس از سرد شدن تا دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد استارتر ماست YC-X11 (کشت مخلوط *استرپتوکوکوس‌ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس‌دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*) و سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 اضافه و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. هنگامی که pH به ۴/۶ رسید، نمونه‌ها جهت هم‌زدن از گرمخانه خارج و پس از هم زدن تا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خنک و در ظروف پلاستیکی ماست بسته‌بندی شدند و در نهایت به سردخانه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتقال پیدا کردند [۱۱].

Table1 Coded and actual values of the independent variables used in the central composite design

Sample	Independent variables					
	Coded values			Actual values		
	Fat	Salt	SNF	Fat	Salt	SNF
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1	2.82	0.28	**9.82**
2	0	0	0	4.75	0.55	**11.75**
3	0	0	0	4.75	0.55	**11.75**
4	0	0	+1.68	4.75	0.55	**8.50**
5	0	-1.68	0	4.75	1	**11.75**
6	-1	-1	+1	2.82	0.28	**13.68**
7	-1	+1	-1	2.82	0.82	**9.82**
8	-1.68	0	0	1.5	0.55	**11.75**

1. Solids-non-fat

9	+1	+1	+1	6.68	0.82	**13.68**
10	+1	-1	+1	6.68	0.28	**13.68**
11	0	-1.68	0	4.75	0.10	**11.75**
12	+1	-1	-1	6.68	0.28	**9.82**
13	+1	+1	-1	6.68	0.82	**9.82**
14	-1	+1	+1	2.82	0.82	**13.68**
15	0	0	0	4.75	0.55	**11.75**
16	+1.68	0	0	8	0.55	**11.75**
17	0	0	0	4.75	0.55	**11.75**
18	0	0	+1.68	4.75	0.55	**15**

The unit of actual values is percentage.

۲-۳- آنالیز آماری

برای تعیین مقادیر بهینه اجزاء در فرمولاسیون ماست همزده پروبیوتیک از روش سطح پاسخ درقالب طرح مرکب مرکزی با ۱۸ تیمار و ٤ تکرار در نقطه مرکزی (تعیین خطای آزمایش) استفاده شد. اثر سه متغیر مستقل شامل درصد چربی (۸، ٦/٦٨، ٤/٧٥، ۲/۸۲، ۱/۵ درصد)، نمک (۱، ۰/۸۲، ۰/۵۵، ۰/۲۸، ۰/۱۰ درصد) و ماده خشک بدون چربی (۱۵، ۱۳/٦٨، ۱۱/۷۵، ۹/۸۲، ۸/۵۰ درصد)، روی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و حسی نمونه‌های ماست همزده پروبیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفت (طبق جدول ۱). برای بررسی مدل و انتخاب فرمول بهینه از پاسخ ارزیابی حسی استفاده و تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزارDesign-Expert 7.0.0 انجام شد. در مرحله دوم نمونه ماست با ترکیب بهینه (چربی ۵/٤۵، نمک ۰/۲۸، SNF ۱۳/٦٨ درصد) از لحاظ ویژگی‌های میکروبی با نمونه ماست همزده صنعتی (چربی ۱/٤، نمک ۰، SNF ۱۰ درصد)، به عنوان نمونه کنترل با استفاده از طرح فاکتوریل مقایسه شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 16 انجام گرفت.

۳- آزمایش‌ها

۳-۱- آزمایش‌های فیزیکی شیمیایی

۳-۱-۱- اندازه‌گیری pH و اسیدیته

pH نمونه‌های مختلف ماست همزده پروبیوتیک پس از ۱، ۷، ١٤ و ۲۱ روز پس از نگهداری با استفاده از دستگاه pH متر (نیک، آلمان) پس از کالیبره کردن، با وارد کردن مستقیم الکترود دستگاه به داخل بافت ماست همگن شده، تعیین شد. همچنین اسیدیته با استفاده از روش تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال در حضور فنل فتالئین اندازه‌گیری و در نهایت بر حسب درجه دورنیک برطبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲ گزارش شد [۱۲].

۳-۱-۲- اندازه‌گیری چربی

اندازه‌گیری چربی به روش ژربر برطبق استاندارد ملی ایران شماره ٦۹۵ [۱۳] صورت گرفت.

۳-۱-۳- اندازه‌گیری ماده خشک بدون چربی

برای اندازه‌گیری ماده خشک بدون چربی ابتدا میزان رطوبت شیر به روش خشک کردن آونی برطبق استاندارد ملی ایران شماره ٦۳۷ [١٤] اندازه گیری شد سپس میزان ماده خشک بدون چربی از کم کردن مقدار چربی از ماده خشک کل بدست آمده از میزان رطوبت محاسبه شد.

۳-۲- آزمایش‌های میکروبی

۳-۲-۱- شمارش باکتری‌های آغازگر و پروبیوتیک

شمارش باکتری‌های آغازگر تجاری ماست *(استرپتوکوکوس ترموفیلوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه‌ی بولگاریکوس)*، و پروبیوتیک *(لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس)* در فواصل زمانی ۱، ١٤ و

۲۱ روز نگهداری انجام پذیرفت. *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در محیط M17 آگار و *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* در محیط MRS آگار به روش پورپلیت کشت داده شدند و به ترتیب تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی به مدت ۷۲ و ٤٨ ساعت در دمای ٤٢-۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. برای شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از محیط کشت MRSآگار حاوی کلیندامایسین و سیپروفلوکساسین استفاده شد و به روش پورپلیت کشت داده شد و در شرایط بی‌هوازی توسط گازپک به مدت ۷۲ ساعت دردمای ٤٢-۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پلیت‌های حاوی ۳۰۰-۳۰ کلنی شمارش گردید [۱۵و۱٦].

٤- ارزیابی ویژگی‌های حسی نمونه‌های ماست همزده پروبیوتیک

ارزیابی ویژگی‌های حسی شامل رنگ ماست، ویژگی‌های بافتی (قوام و احساس دهانی بافت)، ویژگی‌های عطروطعمی، طعم کهنگی و کپک‌زدگی و ارزیابی کلی ماست همزده پروبیوتیک با استفاده از ۱۵ ارزیاب حسی در ۱، ۷، ۱٤ و ۲۱ روز پس از تولید و به روش هدونیک ۵ نقطه‌ای انجام گرفت [۱۷]. برای این منظور نمونه‌ها پس از کدگذاری، به همراه فرم نظرخواهی که در آن برای درجه‌بندی کیفیت از امتیاز ۵ برای کیفیت مطلوب و از امتیاز ۱ برای کیفیت نامطلوب استفاده شد، به افراد ارزیاب داده شد. به منظور دستیابی به نتایج صحیح، نمونه‌ها قبل از ارزیابی به دمای محیط رسانده شد و در فاصله ارزیابی هر یک از نمونه‌ها آب در اختیار ارزیاب‌ها قرار گرفت.

۵- نتایج و بحث

۵-۱- pH و اسیدیته

بر اساس نتایج مدل رگرسیون و تجزیه واریانس اثر درصد چربی، نمک و SNF برای تغییرات pH و اسیدیته در طی مدت نگهداری ۲۱ روز تنها اثر متقابل SNF و نمک در روز ١٤ معنی‌دار($p<۰/۰۵$) بود. مقدار بالای R^2 (۸٦/٤۹ درصد) در این روز نشان می‌دهد که مدل رگرسیونی توانسته رابطه بین متغییرهای مستقل و وابسته را نشان داده و پیش‌بینی کند. همچنین تمامی اثرات بر تغییرات pH بی‌معنی بود. شکل ۱ تأثیر متقابل SNF و نمک را روی تغییرات اسیدیته نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش SNF مقدار اسیدیته افزایش پیدا کرد. عامل کاهش pH طی دوره نگهداری، تخمیر مداوم لاکتوز به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد. در مورد نمک نیز چنین اثری مشاهده می‌شود اما این اثر نسبت به SNF کمتر است. به نظر می‌رسد که افزایش محتوی SNF باعث افزایش حالت بافری که فاکتور اصلی مؤثر در تغییرات pH فرآورده‌های لبنی است [۱۸] و توسعه اسید اضافی توسط کشت آغازگر برای دست‌یابی به pH مورد نظر می‌شود. همچنین گزارش شده که نوع میکروارگانیسم‌های مورد استفاده، دما و زمان رسیدن تأثیر متقابلی بر توسعه اسیدیته دارد. به نظر می‌رسد با توجه به اینکه در تولید نمونه‌های ماست در این پژوهش سویه‌های پروبیوتیک به همراه کشت آغازگر تجاری بطور همزمان مورد استفاده قرار گرفته‌اند لذا اثر تخمیری آن‌ها روی لاکتوز و تولید اسید لاکتیک در نمونه‌های ماست پروبیوتیک بیشتر از نمونه کنترل بود. این نتیجه با نتایج حاصل از آزمایش‌های برخی محققان مطابقت داشت [۱۹].

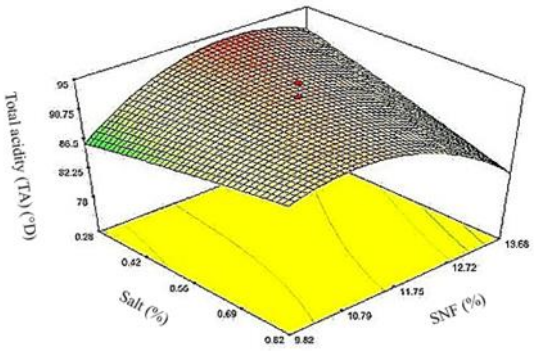


Figure 1 Three-dimensional response level of acidity versus SNF and salt percentage on day 14.

۵-۲- ارزیابی ویژگی‌های حسی

تعادل ترکیبات طعمی در محصولات غذایی به صورت وسیعی مقبولیت کلی آن‌ها را تعیین می‌کند که عموماً توسط مصرف‌کننده قابل درک می‌باشد. لذا با توجه به اهمیت ویژگی‌های حسی، بررسی و شناخت فاکتورهای مؤثر بر آن‌ها برای دستیابی به ویژگی‌های حسی مطلوب ضروری است [۲۰].

۵-۲-۱- رنگ

نتایج حاصل از ارزیابی رنگ نمونه‌های ماست همزده پروبیوتیک نشان داد که با افزایش درصد چربی وSNF کمترین امتیاز (۳/۲۷) به رنگ داده شده است، که نشان می‌دهد افزایش درصد چربی اثر منفی بر آن دارد. همچنین با توجه به نتایج مدل رگرسیون و آنالیز واریانس برای رنگ اثر متقابل متغیرهای مستقل در طی ۲۱ روز معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۲).

Table 2 The results of variance analysis of the appearance properties of probiotic stirred yogurt samples during storage time

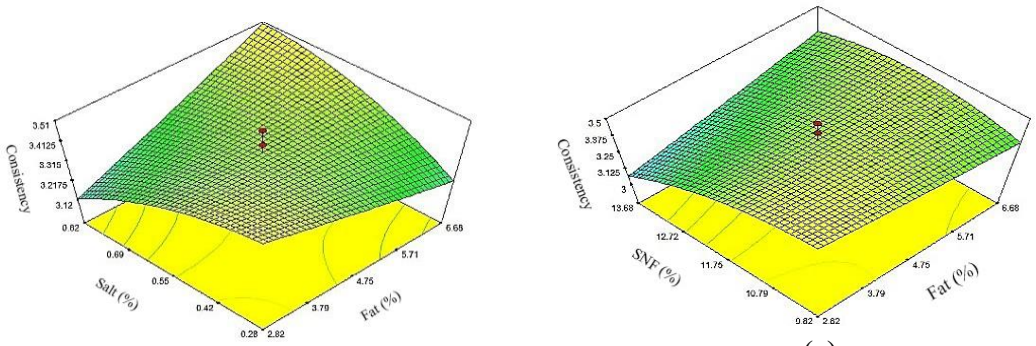
Source	Sum of Squares (SS)			
	Storage time (Day)			
	1	7	14	**21**
Model	2.97 ns	0.8 ns	0.43 ns	0.88 ns
X_1	0.43 ns	0.02 ns	0.08 ns	0.10 ns
X_2	0.038 ns	0.03 ns	0.06 ns	0.11 ns
X_3	0.29 ns	0.02 ns	0.05 ns	0.00 ns
X_1X_2	0.16 ns	0.1 1 ns	0.05 ns	0.05 ns
X_1X_3	0.067 ns	0.11 ns	0.03 ns	0.03 ns
X_2X_3	1.12 ns	0.06 ns	0.05 ns	0.53 ns
X_1^2	0.57 ns	0.28 ns	0.09 ns	0.07 ns
X_2^2	0.59 ns	0.07 ns	0.01ns	0.02 ns
X_3^2	0.15 ns	0.02 ns	0.01ns	0.00 ns
Residual	2.57 ns	0.2 ns	0.092 ns	0.46 ns
Lack of fit	1.95 ns	0.11 ns	0.016 ns	0.1 ns
Pure error	0.62 ns	0.09 ns	0.08 ns	0.36 ns
Linear	4.15 ns	0.85 ns	0.26 ns	0.78 ns

Intraction	2.8 ns	0.58 ns	0.14 ns	0.18 ns
Quadratic	1.95 ns	0.11 ns	0.016 ns	0.1 ns
Total	5.54 ns	1 ns	0.43 ns	0.35 ns
R^2	0.5363	0.7964	0.8236	0.6564

Ns shows non-significance.

۵-۲-۲- ویژگی‌های بافتی

نتایج ارزیابی ویژگی‌های بافتی (قوام و احساس دهانی بافت) نشان داد که با افزایش درصد چربی وSNF به ترتیب بیشترین امتیاز (٤/٥٣)، (٤) به این ویژگی‌ها داده شده است و بدیهی است که با افزایش این دو متغیر پایداری، ویسکوزیته، سفتی و احساس دهانی نمونه‌ها بیشتر می‌شود. با توجه به نتایج مدل رگرسیون و آنالیز واریانس برای ویژگی‌های بافتی (قوام) تأثیر متقابل چربی و نمک در سطح ۰/۰۱ و چربی و SNF در روز ۲۱ معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشد. شکل ۲ (الف) تأثیر متقابل چربی و نمک، (ب) چربی و SNF را روی مطلوبیت قوام نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۲ (الف) ملاحظه می‌گردد با افزایش درصد چربی و نمک قوام نیز افزایش پیدا کرده است. شکل۲ (ب) نیز بیانگر این است که در مقادیر متوسط چربی و SNF قوام افزایش یافته است. با توجه به نتایج مدل رگرسیون و آنالیز واریانس برای ویژگی‌های بافتی (احساس دهانی بافت) تأثیر متقابل نمک و SNF در سطح ۰/۰۵ در روز ۷ معنی‌دار بود. شکل ۳ تأثیر متقابل نمک و SNF را روی مطلوبیت احساس دهانی بافت نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود با افزایش درصد نمک و SNF احساس دهانی بافت امتیاز بالایی را کسب کرده است.



(a)

(b)

Figure 2 Three-dimensional response level of consistency versus fat and salt percentage (a), fat and SNF percentage (b) on day 21.

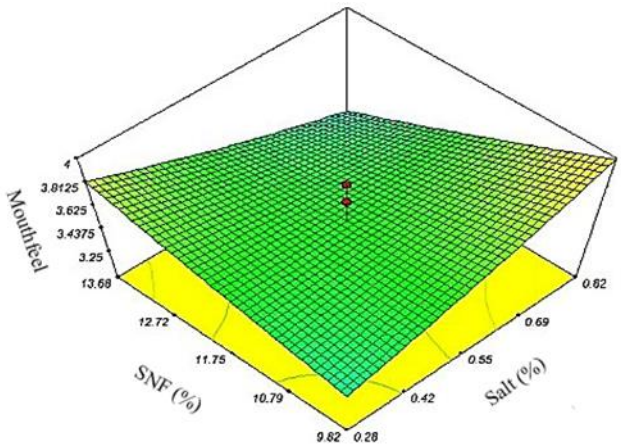


Figure 3 Three-dimensional response level of texture mouthfeel versus SNF and salt percentage on day 7.

۵-۲-۳- ویژگی‌های عطروطعمی

نتایج ارزیابی ویژگی‌های عطروطعمی نشان داد که با افزایش درصد SNF و در نتیجه افزایش اسیدیته ناشی از فعالیت باکتری‌های آغازگر عطروطعم با گذشت زمان و به ویژه در روز ۲۱ کمترین امتیاز (۳) را کسب کرده است. با توجه به نتایج مدل رگرسیون و آنالیز واریانس برای عطروطعم، تأثیر متقابل چربی و نمک در سطح ۰/۰۰۱ در روز ۷ معنی‌دار می‌باشد. شکل ٤ تأثیر متقابل چربی و نمک را روی مطلوبیت عطروطعم نشان می‌دهد. با توجه به شکل، زمانی که چربی در مقادیر کم و نمک در مقادیر بالا است، عطروطعم امتیاز بالایی را کسب کرده است. نتایج ارزیابی طعم کهنگی و کپک‌زدگی نیز نشان داد که با افزایش درصد چربی و SNF و با گذشت زمان این ویژگی کمترین امتیاز(۲/٦۰) را کسب کرده است. با توجه به نتایج مدل رگرسیون و آنالیز واریانس برای طعم کهنگی و کپک-زدگی اثر متقابل متغیرهای مستقل در طی ۲۱ روز معنی‌دار نمی‌باشد.

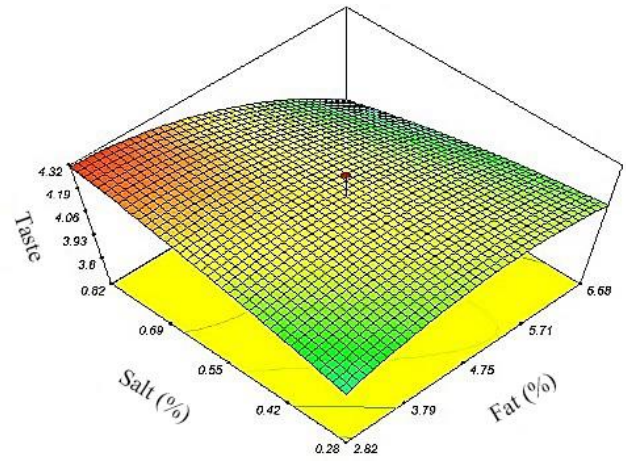
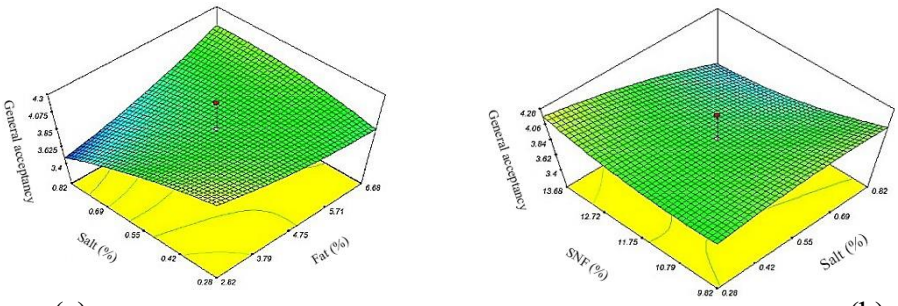


Figure 4 Three-dimensional response level of taste versus fat and salt percentage on day 7.

۵-۲-٤- ارزیابی کلی

نتایج حاصل از ارزیابی کلی حاکی از آن است که افزایش چربی تا ۸ درصد و SNF تا ۱۵ درصد و نمک تا ۱ درصد قابل قبول بود و بیش از این مقادیر، مقبولیت کلی محصول کاهش پیدا می‌کند. با توجه به نتایج مدل رگرسیون و آنالیز واریانس برای ارزیابی کلی، تأثیر متقابل چربی و نمک در سطح ۰/۰۱ و نمک و SNF در سطح ۰/۰۵ در روز ۱ معنی‌دار بود. شکل ۵ (الف) تأثیر متقابل چربی و نمک، (ب) نمک و SNF را روی ارزیابی کلی نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌گردد با افزایش درصد چربی و نمک ارزیابی کلی نیز افزایش پیدا می‌کند. در شکل ۵ (ب) نیز مشاهده می‌شود که در حالی که نمک در مقادیر پایین و SNF در مقادیر بالا باشد، امتیاز کلی بالا است.



(a) (b)

Figure 5 Three-dimensional response level of general acceptancy versus fat and salt percentage (a), salt and SNF percentage (b) on day 1.

۵-۳- بهینه‌سازی

جهت بهینه‌سازی سطوح متغیرهای مستقل، پاسخ‌ها از قبیل رنگ، قوام، احساس دهانی بافت، عطروطعم، کهنگی و کپک‌زدگی و ارزیابی کلی با درجه اهمیت متفاوت که مقبولیت ماست همزده پروبیوتیک را تحت تأثیر قرار می‌دهند، تعیین شدند. معیارهای مورد استفاده و نقطه بهینه تعیین شده در جدول ۳ آورده شده‌اند.

Table 3 Criteria for optimizing process condition along with responses

Limitation	Target	Lower limit	Upper limit	Importance	Solution
Fat	In range	2.82	6.68	3	5.45
Salt	In range	0.28	0.82	3	0.28
SNF	Maximize	9.82	13.68	3	13.68
Color	In range	3.86	4.73	3	4.50
Consistency	Maximize	2.9	4.46	3	3.79
Mouthfeel	Maximize	2.9	4.46	3	4.01
Taste	In range	3.6	4.6	3	4.14
Old and musty taste	In range	4.06	4.8	3	4.24
General acceptancy	In range	3.4	4.5	3	4.13

۵-٤- مقایسه نمونه ماست با ترکیب بهینه با ماست همزده کنترل از لحاظ ویژگی‌های میکروبی

۵-٤-۱- تأثیر ترکیب و زمان نگهداری بر شمارش *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که ترکیب، مدت زمان نگهداری و اثر متقابل آن‌ها اثر معنی‌داری روی شمارش *استرپتوکوکوس‌ترموفیلوس* دارد. (p<۰/۰۱) جدول ٤ اثر ترکیب و زمان را روی شمارش *استرپتوکوکوس‌ترموفیلوس* در نمونه‌های ماست همزده پروبیوتیک نشان می‌دهد. با توجه به جدول روند کاهشی در طی زمان وجود دارد. همچنین بیشترین میزان شمارش باکتری استرپتوکوکوس‌ترموفیلوس مربوط به نمونه بهینه (چربی ۵/٤۵، نمک ۰/۲۸، SNF ۱۳/٦۸ درصد) و کنترل (چربی ۱/٤، نمک ۰، SNF ۱۰ درصد) در روز اول و کمترین آن مربوط به نمونه شاهد در روز ۲۱ام می‌باشد. جنس *استرپتوکوکوس* نسبت به جنس *لاکتوباسیلوس* به افزایش اسیدیته حساستر بوده و رشد و تکثیر آن در محیط اسیدی بیشتر کاهش می‌یابد [۲۱]. بنابراین احتمالاً با افزایش اسیدیته در نمونه کنترل در روز ۲۱ و حساسیت بالای استرپتوکوکوس تعداد آن کاهش پیدا کرده است.

Table 4 Effect of composition and time on *Streptococcus thermophiles* count

Sample	***Streptococcus thermophiles* count during storage (Log cfu/ml)**		
			Storage time (day)
	1	14	21
Control	7.62 ±0.07 [a]	7±0.10 [ab]	5 ± 0.06 [c]
Optimum	7.60± 0.11 [a]	7.07 ±0.16 [b]	7.09 ±0. 43[b]

Non-identical Latin letters indicate a significant difference (p< 0.05).

۵-٤-۲- تأثیر ترکیب و زمان نگهداری بر شمارش *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که نوع ترکیب و مدت زمان نگهداری (p<۰/۰۱) و اثر متقابل آن‌ها (p<۰/۰۵) اثر معنی‌داری روی شمارش *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* دارد. جدول ۵ اثر ترکیب و زمان را روی شمارش *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در نمونه‌های ماست همزده پروبیوتیک نشان می‌دهد. با توجه به جدول بیشترین میزان شمارش باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* مربوط به نمونه بهینه (چربی ۵/٤۵، نمک ۰/۲۸، SNF ۱۳/٦۸ درصد) در روز اول و کمترین آن مربوط به نمونه بهینه و کنترل (چربی ۱/٤، نمک ۰، SNF ۱۰ درصد) در روز ۲۱ام بود. کاهش تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در نمونه کنترل نسبت به نمونه بهینه احتمالاً به علت افزایش اسیدیته در این نمونه باشد که ممکن است موجب ممانعت از رشد و فعالیت باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* شود.

Table 5. Effect of composition and time on *Lactobacillus bulgaricus* count

Sample	***Lactobacillus bulgaricus* count during storage (Log cfu/ml)**		
			Storage time (day)
	1	14	21
Control	7.39 ± 0.06 [b]	6.97±0.09 [c]	6.45 ±0.10 [d]
Optimum	7.77 ±0. 13[a]	7.73 ±0.14 [a]	6.56± 0.22 [d]

Non-identical Latin letters indicate a significant difference (p< 0.05).

۵-٤-۳- تأثیر ترکیب و زمان نگهداری بر شمارش لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس LA5*

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که نوع ترکیب و مدت زمان نگهداری ($p<۰/۰۱$) و اثر متقابل آن‌ها دارای اثر معنی‌داری روی شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می‌باشد ($p\leq۰/۰۵$). جدول ٦ اثر ترکیب و زمان را روی شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نمونه‌های ماست همزده پروبیوتیک نشان می‌دهد. با توجه به جدول بیشترین میزان شمارش باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مربوط به نمونه بهینه (چربی ۵/٤۵٪، نمک ۰/۲۸، SNF ۱۳/٦۸ درصد) در روز اول و کمترین آن مربوط به نمونه کنترل (چربی ۱/٤، نمک ۰، SNF ۱۰ درصد) در روز ۲۱ام می‌باشد. در ماست کم‌چرب افزایش اسیدیته در طول مدت نگهداری ممکن است برای پروبیوتیک‌ها مضر باشد و منجر به کاهش زنده‌مانی آن‌ها در مقایسه با ماست پرچرب شود که در تطابق با یافته‌های سایر محققان می‌باشد [۲۲-۲۳ و ۲٤]. تغییر در غلظت‌های نمک در محصولات لبنی غشای سلولی باکتری‌ها را تحت تأثیر قرار داده و منجر به کاهش رشد و فعالیت آن‌ها می‌شود. با این وجود مطالعات اندکی درباره‌ی آسیب توسط نمک به باکتری‌های پروبیوتیک وجود دارند. برطبق مطالعات شاه و گاندهی[3] (۲۰۱۵) که اثر نمک را بر زنده‌مانی و نفوذپذیری غشای سلولی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، لاکتوباسیلوس کازئی و *بیفیدوباکتریوم لانگوم* با تکنیک فلوسیتومتری بررسی کردند، در غلظت‌های بالای ۳/۵ درصد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مقاوم است. لذا در این تحقیق احتمالاً نمک اثر معنی‌داری در شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ندارد. همچنین تکنیک مرسوم شمارش در پلیت فقط کاهش رشد سلول را نشان می‌دهد و اطلاعات دقیقی از فعالیت متابولیکی، درجه آسیب و سلامت سلول ارائه نمی‌دهد. عمدتاً، تعداد باکتری‌های تلقیح شده در محصول باید طوری باشد که هنگام مصرف محصول تعداد آن‌ها در حداکثر خود باشد تا مزایای مورد نظر از مصرف محصولات پروبیوتیک تأمین گردد [۲۵]. برای تأمین حداکثر مزایای پروبیوتیکی، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در یک محصول لبنی هنگام مصرف باید حداقل 10^6 CFU/gr باشد و این محصول لبنی باید بطور منظم روزانه تا ۱۰۰ گرم مصرف شود [۲٦].

Table 6. Effect of composition and time on *Lactobacillus acidophilus* count

Sample	***Lactobacillus acidophilus*** **count during storage (Log cfu/ml)**		
			Storage time (day)
	1	14	21
Control	6.94 ± 0.67^{b}	6.87 ± 0.13^{ab}	4.72 ± 0.17^{c}
Optimum	7.36 ± 0.05^{a}	7.26 ± 0.16^{b}	6.42 ± 0.05^{b}

Non-identical Latin letters indicate a significant difference ($p< 0.05$).

٦- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، میکروبی و حسی ماست‌های همزده پروبیوتیک تولید شده نشان داد که درصد نمک و SNF و اثر متقابل آن‌ها روی برخی از ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی ماست همزده پروبیوتیک شامل اسیدیته معنی‌دار بود. نتایج ارزیابی کلی از لحاظ رنگ، ویژگی‌های بافتی و عطروطعمی نمونه‌های ماست همزده‌ی پروبیوتیک نشان داد که از نظر مصرف‌کنندگان

1. Shah & Gandhi

نمونه‌های با ترکیب (چربی ٤/٧٥، نمک ١، SNF ١١/٧٥ درصد) و (چربی ٦/٦٨، نمک ٠/٨٢، SNF ١٣/٦٨ درصد) بیشترین امتیاز را در روز اول و نمونه‌های با ترکیب (چربی ٨، نمک ٠/٥٥، SNF ١١/٧٥ درصد) و(چربی ٤/٧٥، نمک ٠/٥٥، SNF ١٥ درصد) کمترین امتیاز را در روز ٢١ کسب کردند. در مجموع نمونه‌های با درصد چربی ٤/٧٥ تا ٦/٦٨ و درصد SNF ١١/٧٥ تا ١٣/٦٨ و درصد بالای نمک بیشتر مورد پسند واقع شدند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که نوع ترکیب، مدت زمان نگهداری و اثر متقابل این فاکتورها اثر معنی‌داری روی شمارش باکتری‌های آغازگر و پروبیوتیک دارد. به طور کلی در نمونه کنترل و نمونه بهینه در مدت زمان نگهداری ٢١ روز، روند کاهشی در شمارش باکتری‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، همچنین شمارش باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به علت افزایش اسیدیته مشاهده شد. کاهش در شمارش باکتری‌های آغازگر و پروبیوتیک در نمونه کنترل در مقایسه با نمونه بهینه می‌تواند به دلیل افزایش اسیدیته در این نمونه باشد. در این تحقیق نمک اثر معنی‌داری در شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نداشت چرا که این باکتری تا غلظت‌های ٣/٥ درصد نمک مقاوم است. با توجه به محبوبیت محصولات پروبیوتیک به ویژه ماست، به دلیل دارا بودن اثرات سلامت‌بخش و خواص درمانی برای مصرف‌کننده از جمله کنترل عفونت‌های روده‌ای، بهبود عدم تحمل به لاکتوز، فعالیت ضدسرطانی، تأثیر بر دیابت و غیره و همچنین با جمع‌بندی نتایج حاصل از آزمون‌های مختلف، ماست حاوی (چربی ٥/٤٥، نمک ٠/٢٨، SNF ١٣/٦٨ درصد) به عنوان بهترین فرمولاسیون ماست همزده پروبیوتیک معرفی می‌گردد.

۷- سپاسگزاری

نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از مدیریت و کارکنان شرکت پگاه تبریز به دلیل همکاری‌های ارزنده در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش اعلام می‌دارند.

۸- منابع

[1] Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance a review. Appetite, 51(3), 456-467.

[2] Tamime, A.Y., & Robinson, R.K. (2007). Yoghurt: Science and technology, (1-772). Cambride: England.

[3] Davoodi, H., Esmaeili, S., & Mortazavian, A.M. (2013). Effects of milk and milk products consumption on cancer: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12(3), 249–264.

[4] Hassan, A., & Amjad, I. (2010). Nutritional Evaluation of yoghurt prepared by different starter cultures and their physiochemical analysis during storage. African Journal of Biotechnology, 9(20), 2913–2917.

[5] Tamime, A.Y., & Deeth, H.C.)1980). Yogurt: technology and biochemistry. Journal of Food Protection, 43(12), 939-977.

[6] Gilliland, S. E. (1979). Beneficial inter-relationships between certain microorganisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. Journal of Food Protection, 42(2), 164–167.

[7] Akalin, A.S., Fenderya, S., & Akbulut, N. (2004). Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. International Journal of Food Science and Technology, 39(6), 613–621.

[8] Nyanzi, R., Jooste, P.J., & Buys, E.M., (2021). Invited review: Probiotic yogurt quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects. Journal of Dairy Science, *104*(1), 1-19.

[9] Shah, N. (2017). Yogurt in Health and Disease Prevention. United Kingdom: London.

[10] Hekmat, S., & Reid, G., (2006). Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. Nutrition research, *26*(4), 163-166.

[11] Heller, K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. American Journal of Clinical Nutrition, 73(2), 374S–9S.

[12] Iran National Standard Organisiattion. (2006). Milk and milk products-Determination of titrable acidity and value pH- Test method. 2852. First edition. In Persian.

[13] Iran National Standard Organisiattion. (2008). Yogurt- Specifications and test methods. 695. 4th Revision. In Persian.

[14] Iran National Standard Organisiattion. (1970). Determination of solid-non-fat of milk. 637. First edition. In Persian.

[15] Iran National Standard Organisiattion. (2005). Yogurt- Enumeration of characteristic microorganisms- Colony count technique at 37 C. 7714. First edition. In Persian.

[16] Iran National Standard Organisiattion. (2008). Milk products- Enumeration of presumptive *lactobacillus acidophilus* on a selective medium- Colony-count technique at 37 C. 9616. First edition. In Persian.

[17] International standard. (2009). Milk and milk products-sensory analysis-recommended methods for sensory evaluation. First edition. Iso 22935-2. In Persian.

[18] Salaun F., Mietton B., & Gaucheron F. (2005). Buffering capacity of dairy products. International Dairy Journal, 15(2). 95-109.

[19] Lee, W. J. A., & Lucey, J. A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. Asian-Aust. Journal of Animal Science, 23(9), 1127 – 1136.

[20] Aziznia, S., Khosrowshahi, A., Madadlou*, A.,* & Rahimi*, J.* (2008). Whey protein concentrates and gam tragacanth as fat replacers in non-fat yogurt: Chemical, physical and microstructural properties. Journal of Dairy Science, 91(7), 2545-2552.

[21] Senaka ranadheera, C., Evans, C.A., Adams, M.C., & Baines, S.K. (2012). Probiotic viability and physicochemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. Food Chemistry, 135(3), 1411-1418.

[22] Dave, R.I., & Shah, N.P. (1997a). Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. International Dairy Journal, 7(8-9), 537–545.

[23] Dave, R. I., & Shah, N. P. (1997b). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy Journal, 7(1), 31–41.

[24] Vinderola, C. G., Costa, G. A., Regenhardt, S., & Reinheimer, J. A. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. International Dairy Journal, 12(7), 579–58.

[25] Song, M., Park, W. S., Yoo, J., Han, G., Kim, B., Seong, P., Oh, M., Kim, K., & Jam, J. (2017). Characteristics of Kwark cheese supplemented with Bifidobacterium longum KACC 91563. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 37 (5), 773-779.

[26] Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B. & Reinheimer, J.A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. International Dairy Journal, 14(5), 375-387.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Optimization of composition of probiotic stirred yogurt containing *lactobacillus acidophilus LA5* by response surface methodology

Maryam Pirayesh Eslamian[1], Javad Hesari[2*], Mahnaz Manafi Dizaj yekan[3]

1-MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3-Assitant Professor, Department of Food Science and Technology, Khoy Branch, Islamic Azad University, Khoy, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received:2024/12/9

Accepted:2025/1/21

Keywords:

Stirred Yogurt,
Functional,
Probiotic,
Response surface.

DOI: 10.22034/FSCT.22.162.278.

*Corresponding Author E-

jhesari@tabrizu.ac.ir

ABSTRACT

Response surface methodology was applied to investigate the effect of three independent variables, including fat (8, 6.68, 4.75, 2.82, 1.5%), salt (1, 0.82, 0.55, 0.28, 0.10%) and solids-non-fat (SNF) (15, 13.68, 11.75, 9.82, 8.50%) on the probiotic stirred yogurt. The results of organoleptic evaluation showed that samples with composition of 4.75% fat, 1% salt, 11.75% SNF and 6.68% fat, 0.82% salt, 13.68% SNF obtained the highest score at the first day and samples with composition of 8 fat, 0.55 salt, 11.75% SNF and 4.75 fat, 0.55 salt, 15% SNF had the lowest score on the 21st day. According to the results of sensory evaluation, probiotic yogurt with composition of 5.45 fat, 0.28 salt, 13.68% SNF was selected as optimum sample and compared to commercial stirred yogurt (1.4 fat, 0 salt, 10% SNF) as control sample with respect to microbial characteristics. Statistical analysis showed that the percentage of fat, SNF and salt had no significant effect on pH of samples, but the SNF and salt and their interaction had a significant ($p<0.05$) effect on acidity. The results of microbial analysis showed that composition, storage time and interaction of them had a significant ($p<0.01$) effect on bacterial and probiotic count. Decreasing in the number of starter and probiotic bacteria in the control sample was due to an increase in the acidity. Finally, 5.45 fat, 0.28 salt and 13.68% SNF is introduced as the best probiotic stirred yogurt formulation.