**مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران**
**سال چهارم، شماره۳، پاییز ۱۳۸۸ ، صفحات ۲۴-۱۵**

# تأثیر باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-۵ بر ویژگی‌های میکروبیولوژیک، خواص حسی و پایداری بافتی دوغ پروبیوتیک طی نگهداری یخچالی

پریناز طاهری[۱]، محمد رضا احسانی[۲]، کیانوش خسروی دارانی[۳]

۱- دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
۲- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده مهندسی بیوسیستم، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
پست الکترونیکی: mehsani@ut.ac.ir
۳- استادیار پژوهشی (پژوهشگر) گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۸/۸/۶

## چکیده

**سابقه و هدف:** محصولات شیری پروبیوتیک با ویژگی‌های ارزشمند تغذیه‌ای و درمانی، از بحث برانگیزترین موضوعات حال حاضر عرصه صنعت، تغذیه و پزشکی هستند و تاکنون اثرات مثبت مصرف آنها بر سلامت انسان به تأیید رسیده است. برای آنکه روند رو به رشد تولید و مصرف چنین محصولاتی موفقیت آمیز باشد، لازم است فراورده پروبیوتیک گونه پروبیوتیک موجود را طی زمان نگهداری در سطح تعریف شده حفظ کند و خصوصیات حسی و بافتی مطلوبی داشته باشد. دوغ به عنوان یک نوشیدنی تخمیری پر طرفدار در ایران مطرح است که جای دادن پروبیوتیک‌ها در آن می‌تواند به ارتقای سطح سلامت جامعه کمک شایانی کند. هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-۵ بر ویژگی‌های میکروبیولوژیک، اسیدسازی بعد از تولید، پایداری بافتی و مقبولیت کلی دوغ است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق در کنار کشت تجاری ماست (YF-3331)، از باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-۵ برای تولید دوغ پروبیوتیک استفاده شد و تغییرات شمار باکتری پروبیوتیک و باکتری‌های کشت ماست (*لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*)، میزان اسیدسازی، دوفاز شدن و مقبولیت حسی نمونه‌ها طی ۲۱ روز نگهداری در دمای ۴°C ارزیابی و با نمونه شاهد مقایسه شد.

**یافته‌ها:** جمعیت هر سه باکتری طی نگهداری در یخچال کاهش یافت. با این حال، قابلیت زیستی باکتری پروبیوتیک با کاهشی معادل ۰/۹۳ واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر محصول طی مدت ذکر شده بالاتر از سطح بهینه باقی ماند. مقایسه دوغ پروبیوتیک با نمونه شاهد نشان داد که این باکتری می‌تواند روند کاهش شمار باکتری‌های ماست را تسریع کند و به کاهش اسیدسازی بعد از تولید و بهبود مقبولیت کلی محصول طی نگهداری کمک کند. افزودن *ال. اسیدوفیلوس* بر پایداری بافتی نمونه پروبیوتیک طی نگهداری در مقایسه با نمونه شاهد، تفاوت معنی‌داری نداشت و درصد دو فاز شدن هر دو نمونه از روز اول تا هفتم شدید و بعد از آن کند ارزیابی شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که میکروارگانیسم پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-۵ می‌تواند در تولید دوغ با pH=۴/۳۰ ، درصد نمک ۰/۸ (w/v) و ماده جامد کل ۷/۴ درصد (w/v) مورد استفاده قرار گیرد. این باکتری توانست افت تعداد باکتری‌های ماست را افزایش دهد و دوغ پروبیوتیک تولیدی از نظر بقای *ال. اسیدوفیلوس*، کاهش اسیدسازی بعد از تولید، مقبولیت حسی و حفظ پایداری بافتی نسبت به نمونه شاهد، مطلوب ارزیابی شد.

**واژگان کلیدی:** *پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، دوغ، اسیدسازی بعد از تولید، دو فاز شدن، مقبولیت حسی

## • مقدمه

امروزه، فراورده‌های شیری مختلف نه تنها از نظر تحقیقات علمی بلکه در بازار تجارت جهانی رونق فراوانی یافته‌اند. مهم‌ترین عوامل مؤثر بر اقبال این محصولات، اثرات سلامت بخش، ویژگی‌های تغذیه‌ای مطلوب، خصوصیات حسی منحصر به فرد و افزایش ماندگاری آنهاست (۲، ۱). نوشیدنی‌های لاکتیک (Lactic Beverages) فراورده‌هایی هستند که روند تولید آنها شامل تخمیر شیر به وسیله باکتری‌های

لاکتیک و سپس رقیق سازی لخته حاصل با آب، آب پنیر و یا تراویده (Permeate) است که با توجه به تقاضای بازار، با استفاده از افزودنی‌هایی مثل شکر، نمک، پالپ یا آب میوه به فرمولاسیون مطلوب می‌رسند (۳).

نوشیدنی‌های آب پنیر، ماست نوشیدنی (Yogurt drink)، آیران (Ayran) و دوغ نمونه‌هایی از این محصولات هستند. طبق تعریف استاندرد ملی ایران، دوغ ساده، نوشیدنی لاکتیکی حاصل از تخمیر شیر است که ماده خشک آن از راه رقیق کردن ماست دوغ سازی (پس از تخمیر) یا شیر دوغ سازی (پیش از تخمیر) استاندارد شده باشد (۴). کاربرد گونه‌های مختلف *بیفیدوباکتریوم‌ها (Bifidobacteria)* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (Lactobacillus acidophilus)* به عنوان باکتری‌های پروبیوتیک، در تولید فراورده‌های شیری تخمیری از اواخر دهه ۱۹۷۰ و با افزایش دانش طبقه‌بندی باکتری‌ها رایج شد. به دنبال آن، اثرات درمانی منحصر به فرد و کاهش خاصیت اسیدسازی حین نگهداری باعث رونق بیشتر این محصولات شد (۵).

باکتری‌هایی که به طور معمول در تهیه ماست استفاده می‌شوند (استارترهای تکنولوژیک) توانایی زنده رسیدن به محیط روده را ندارند و اثرات مفید آنها اصولاً به حضور توده‌ٔ باکتریایی، ساخت آنزیم‌های خاص و تولید متابولیت‌های آنها مربوط می‌شود. اما باکتری‌های پروبیوتیک (استارترهای درمانی) توانایی تحمل اسید معده و نمک‌های صفراوی و قابلیت جایگزینی در روده را دارند (۷، ۶). مصرف مداوم و میزان مصرف این باکتری‌ها بر ایفای نقش‌های مفید درمانی آنها مؤثر است. دریافت روزانه $10^{8}$تا $10^{9}$ باکتری زنده، به عنوان حداقل تعداد قابل قبول مطرح شده است. بنابراین، مصرف روزانه ۱۰۰ گرم محصول پروبیوتیک دارای $1\times10^{6}$ تا $5\times10^{8}$ cfu باکتری‌های زنده در هر گرم فراورده می‌تواند حد بهینه مورد نظر را تأمین کند (۱۰-۸).

با آزمایش محصولات موجود مشخص می‌شود که همیشه چنین ویژگی‌هایی بر قرار نیست. تحقیقات گسترده نشان داده است که تعداد باکتری‌های پروبیوتیک (*بیفیدوباکتریوم‌ها و ال. اسیدوفیلوس*) طی نگهداری یخچالی به ویژه در محیط‌های اسیدی، به طور معنی‌دار کاهش می‌یابد (۱۲، ۱۱). بنابراین، حفظ تعداد این باکتری‌ها طی نگهداری دارای اهمیت فراوان است. به علاوه، خصوصیات حسی مورد پذیرش مصرف کننده نیز از بُعد تجاری و بازار فروش این محصولات حائز اهمیت است. فراورده‌های تخمیری حاصل از فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک، طعم توسعه نیافته و در مورد *بیفیدوباکتریوم‌ها* حتی طعم سرکه‌ای نامطلوبی دارند. بهترین راه برای بهبود طعم فراورده‌های پروبیوتیک، استفاده از کشت کمکی (Adjunct /Co-Culture Culture/Support Culture) مثل کشت‌های آغازگر ماست است (۱۴، ۱۳، ۱۱). در زمینه بافت نوشیدنی‌های تخمیری، شاخص دو فاز شدن (Phase sepration) دارای اهمیت فراوان است. در چنین محصولاتی، رسوب فاز پراکنده (پروتئین‌ها) باعث دو فاز شدن محصول در زمان نگهداری می‌شود (۱۵).

دوغ با ویژگی‌های تکنولوژیک و سلامت بخش خود از پر طرفدارترین محصولات شیری کشورمان است که جای دادن باکتری‌های پروبیوتیک در چنین محصول پرمصرفی می‌تواند به ارتقای سلامت جامعه کمک شایانی کند. استاندارد ملی ایران، دوغ پروبیوتیک را دوغ تولید شده به وسیله میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک با یا بدون استفاده از باکتری‌های سنتی ماست (*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس*) معرفی کرده و ویژگی‌های مواد تشکیل دهنده و محصول را مشخص کرده است (۱۶).

هدف از این تحقیق در درجه اول، بررسی امکان بقای باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-۵ در دوغ پروبیوتیک بدون چربی و در درجه بعد، ارزیابی تأثیرگذار بودن حضور این باکتری بر ویژگی‌های میکروبیولوژیک، مقدار اسیدسازی، پایداری بافتی و مقبولیت حسی محصول طی نگهداری ۲۱ روزه در دمای ۴°C بود.

## • مواد و روش‌ها

**کشت آغازگر مورد آزمون و آماده سازی آن:** در این تحقیق از دو کشت باکتریایی تجاری شامل کشت ترکیبی ماست (YF-3331) حاوی *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*) و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (*Streptococcus thermophilus*) و کشت تک سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5 (*Lactobacillus acidophilus* La-5) هر دو به صورت خشک شده انجمادی، نوع DVS، از شرکت کریستین هنسن (Chr- Hansen) دانمارک استفاده شد. برای فعال‌سازی کشت ترکیبی ماست، از شیر ماست‌سازی هموژن شده *کارخانه شیر پاستوریزه تهران (پگاه)* استفاده شد که بعد از اِعمال فرایند حرارتی ۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه، یک بسته ۵۰ واحدی از استارتر مورد استفاده به صورت استریل و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به یک لیتر آن اضافه و در مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰°C کاملاً حل شد و در زمان تلقیح به صورت درصد حجمی استفاده شد. کشت تک سویه پروبیوتیک (بستهٔ ۲۵ گرمی) به صورت درصد وزنی در شرایط اسپتیک مورد استفاده قرار گرفت.

**آماده سازی نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک:** با توجه به اینکه در تحقیقات قبلی، روش رقیق سازی پس از تخمیر به عنوان روش مؤثر در بالا بردن بقای پروبیوتیک‌ها شناسایی شد، در این تحقیق از این روش به عنوان الگوی اصلی تولید استفاده شد (۱۷). برای تولید شیر پایه، از شیر خشک بی چربی (*کارخانه شیر پاستوریزه پگاه تهران*) به میزان ۱۴ درصد وزنی ـ وزنی و پودر آب پنیر شیرین (*کارخانه شیر پگاه گرگان*)، به میزان ۰/۷۵ درصد وزنی ـ وزنی به صورت باز ساخته استفاده شد. سپس فرایند حرارتی در شرایط ۹۵°C و ۱۵ دقیقه اِعمال شد و بعد از کاهش دما تا درجه حرارت مناسب (۳۷°C)، تلقیح به وسیله کشت آغازگر ماست (۰/۲ درصد حجمی ـ حجمی) و باکتری پروبیوتیک *ال. اسیدوفیلوس La-۵* (۰/۵ درصد وزنی ـ حجمی) انجام پذیرفت. شمارش باکتری‌ها بلافاصله پس از تلقیح، تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* را به ترتیب ۸/۴۱، ۶/۴۲ و ۴/۱۲ log cfu/ml نشان داد. گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ °C به مدت ۶ ساعت انجام گرفت. بلافاصله پس از اتمام زمان مورد نظر، ماست تولیدی با pH حدود ۴/۳۰ در حمام آب سرد تا دمای ۴°C خنک شد. بعد از افزودن آب (۵۰ درصد حجمی ـ حجمی) و نمک (۰/۸ درصد وزنی ـ حجمی)، فراوردهٔ رقیق‌شده و تحت فشار ۱۵۰ بار هموژنیزه شد. در نهایت، نوشیدنی تولیدی در دمای ۴°C به مدت ۲۱ روز نگهداری شد. نمونه شاهد بدون افزودن *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و فقط از طریق تخمیر شیر با استفاده از همان کشت ماست و انجام سایر مراحل تولید شد.

نمونه‌برداری: برای بررسی بقای باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی نگهداری محصول و تأثیر آن بر ویژگی‌های دوغ پروبیوتیک و مقایسه با نمونه شاهد، نمونه برداری در روزهای اول، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم نگهداری در دمای ۴ °C روی نمونه پروبیوتیک و شاهد انجام شد.

### شاخص‌های مورد آزمون

**رشد و بقای میکروبی:** بقای باکتری‌ها طی مدت نگهداری از طریق شمارش تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در روزهای مورد نظر انجام شد. برای این منظور از ۱ میلی‌لیتر نمونه، سری رقت تهیه شد و هر باکتری با سه تکرار و به روش پورپلیت روی محیط‌های کشت انتخابی یا افتراقی مورد نظر کشت شد. شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* روی محیط انتخابی MRS-Bile آگار و بعد از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ °C به مدت ۷۲ ساعت در شرایط بی‌هوازی (GasPak System-OXOID) انجام شد (۱۸). شمارش پرگنه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری محیط MRS با pH حدود ۵/۲ در دمای ۴۵ °C و در شرایط بی‌هوازی انجام شد (۱۹). برای شمارش *استرپتوکوکوس*

*ترموفیلوس* از محیط کشت افتراقی M17 آگار در دمای ۳۷ °C به مدت ۷۲ ساعت در شرایط هوازی استفاده شد (۱۸). در نهایت، پلیت‌های حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی شمارش و تعداد حاصله به صورت log cfu در میلی‌لیتر محصول گزارش شد. شمارش کپک و مخمر طی مدت نگهداری بر روی محیط YGC agar به روش pour plate انجام شد و پلیت‌ها در دمای ۲۵°C و شرایط هوازی به مدت ۳ تا ۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**اسیدیته قابل تیتر حین نگهداری:** برای بررسی فعالیت و اسیدسازی باکتری‌ها طی نگهداری، اسیدیته قابل تیتر نمونه‌ها بر حسب درجه دورنیک (AOAC, 947.05) محاسبه شد. pH محصول در دمای ۲۵ °C (Criston, micro2000) و فقط بعد از رقیق سازی و در پایان مدت نگهداری اندازه‌گیری شد. pH فراورده در دوغ پروبیوتیک و شاهد، بعد از تولید به ترتیب ۴/۳۰ و ۴/۳۷ و در پایان روز بیست و یکم نگهداری به ترتیب ۴/۰۵ و ۳/۹۳ بود.

**پایداری بافتی:** برای اندازه‌گیری درصد دو فاز شدن و تخمین پایداری بافتی نمونه طی مدت نگهداری از مزور ۱۰۰ میلی‌لیتری استریل استفاده شد. به این ترتیب که بعد از پر کردن مزور تا خط نشانه، "در" آن به طور کامل توسط پارافیلم و فویل آلومینیم پوشانده و در دمای ۴ °C نگهداری شد. در روزهای آزمون میزان پایین رفتن سطح و جدا شدن سرم در سطح مزور اندازه‌گیری (بر حسب cm) و نسبت به ارتفاع کلی محصول در مزور، بر حسب درصد عنوان شد.

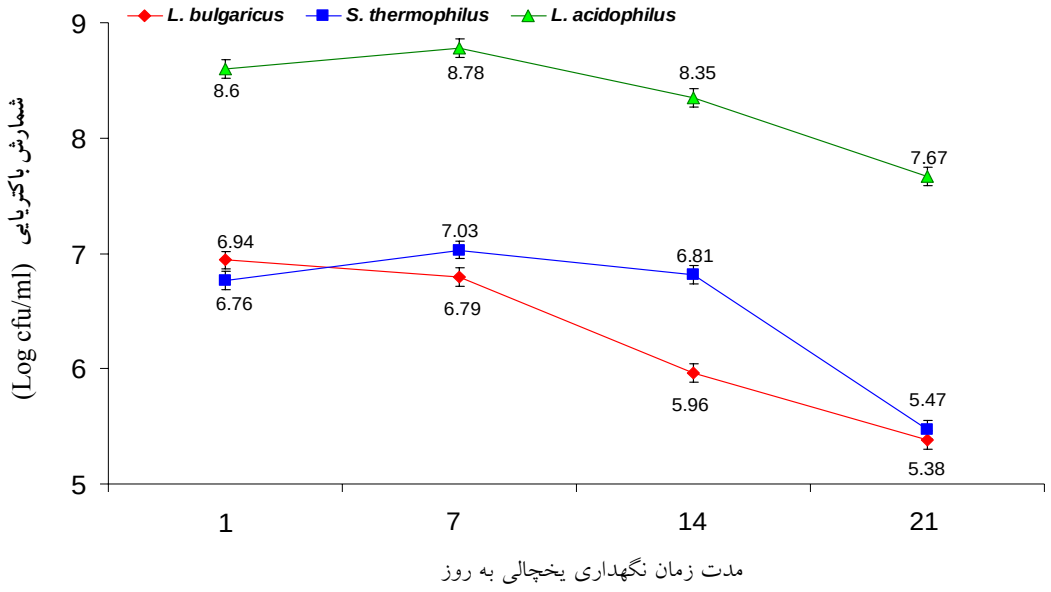
**مقبولیت حسی کلی:** آنالیزهای حسی محصول در روزهای آزمون با کمک پرسشنامه‌های آزمون هدونیک و تعیین درجه مقبولیت کلی (۷ نقطه با یک نقطه تعادل) به وسیله ۳۰ ارزیاب آموزش ندیده و مقایسه با نمونه شاهد انجام شد.

**آنالیز آماری:** در این تحقیق، آزمون‌های مورد نظر در سه دوره و هر دوره با سه تکرار انجام پذیرفت. مقایسه بین نتایج بدست آمده، بوسیلهٔ آزمون‌های آماری تجزیه واریانس ANOVA با احتساب سطح اطمینان ۹۵ درصد توسط نرم افزار SPSS 11.5 انجام شد. برای رسم نمودارها و شکل‌ها از نرم افزار Excel استفاده شد.

## • یافته‌ها

در این تحقیق با مقایسه ویژگی‌های دوغ پروبیوتیک بی‌چربیِ حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-۵ و دوغ ساده (نمونه شاهد) تأثیر این باکتری بر بقا و اسیدسازی میکروبی، پایداری بافتی و مقبولیت کلی محصول طی مدت زمان نگهداری ۲۱ روزه نشان داده شد.

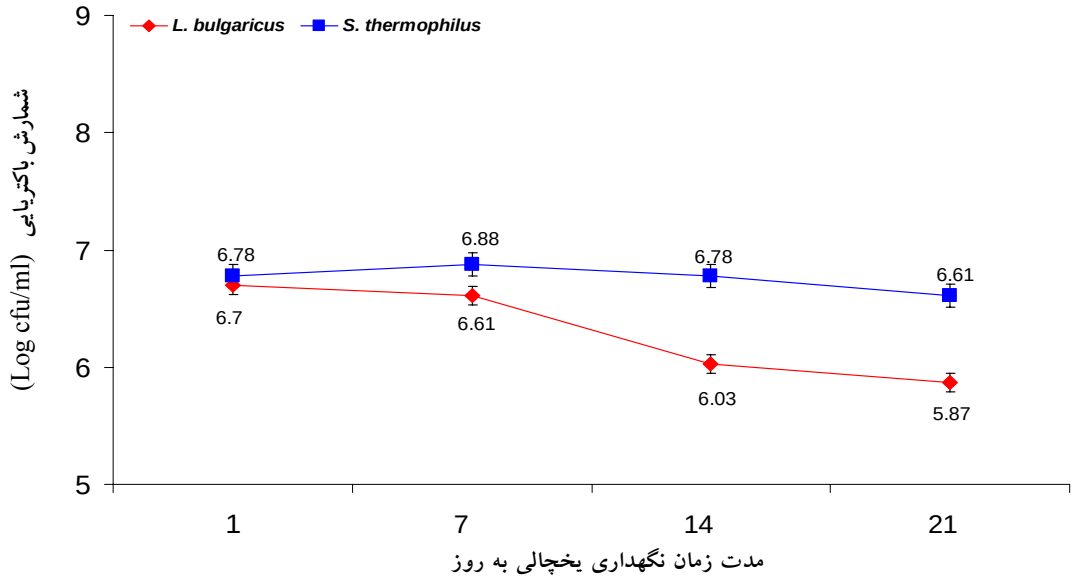
**رشد و بقای میکروبی:** شکل ۱ بیانگر روند تغییرات تعداد سه باکتری مورد ارزیابی (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*) در نوشیدنی پروبیوتیک مورد آزمون است. تعداد اولیه این باکتری‌ها به ترتیب ۸/۶۰، ۶/۹۴ و ۶/۷۶ log cfu/ml در روز اول نگهداری بود. همان گونه که مشخص است، در چنین محصولی از روز اول تا هفتم تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در حدود ۰/۱۸ واحد لگاریتمی افزایش و از روز هفتم به بعد در حدود ۱/۱۱ واحد لگاریتمی کاهش یافت. با این حال، در پایان مدت نگهداری همچنان تعداد این باکتری بیش از حد تعریف شده باقی ماند (۷/۶۷ log cfu/ml ) و فراورده تولیدی توانست پروبیوتیک باقی بماند. در حالی که دو باکتری دیگر با جمعیت اولیه پایین تر از باکتری پروبیوتیک، روند کاهنده خود را به این ترتیب طی نگهداری دنبال کردند: *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* در چنین محصولی به شدت کاهش یافت (۱/۵۶ واحد لگاریتمی) اما *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* از روز اول تا هفتم به میزان ۰/۲۷ واحد لگاریتمی افزایش و از روز هفتم به بعد کاهش یافت. کاهش تعداد باکتری‌های *استروپتوکوکوس ترموفیلوس* از روز هفتم تا چهاردهم آهسته بود (۰/۱۲ واحد لگاریتمی) و پس از آن سریع‌تر (۰/۳۴ واحد لگاریتمی) انجام شد.




**شکل ۱- تغییرات شمار میکروبی دوغ پروبیوتیک طی دوره نگهداری یخچالی**

شکل ۲ روند تغییرات تعداد باکتری‌های ماست طی مدت نگهداری یخچالی را در نمونه شاهد نشان می‌دهد. همان طور که از این نمودار مشخص است، افت در تعداد هر دو باکتری دیده شد، اما شدت آن نسبت به نمونه شاهد، بسیار خفیف و اندک بود؛ به ویژه در مورد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* با ۰/۱۷ واحد لگاریتمی کاهش که نسبت به نرخ کاهش آن در نمونه پروبیوتیک (۱/۲۹ واحد لگاریتمی) بسیار ضعیف گزارش شد. تعداد این باکتری در دوغ شاهد نیز در هفته اول افزایش یافت که این رشد، اندک و در حدود ۰/۱ واحد لگاریتمی بود. بقای *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* نیز در نمونه شاهد بهتر از دوغ پروبیوتیک بود و با افت ۰/۸۳ واحدی در نهایت به تعداد ۵/۸۷ log cfu/mL رسید.

بررسی رشد کپک و مخمر به عنوان شاخص آلودگی محصول در روزهای تعیین شده نشان داد که این شاخص به میزان قابل توجهی پایین‌تر از استانداردهای مربوطه است (۴).

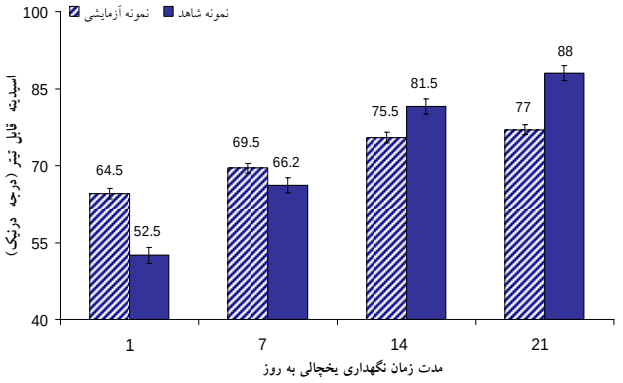



**شکل ۲- تغییرات شمار میکروبی دوغ شاهد طی دوره نگهداری یخچالی**

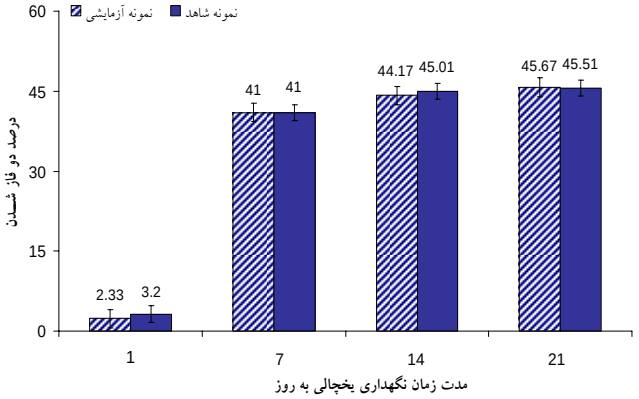
**میزان اسیدسازی حین نگهداری:** شکل ۳ مقایسه روند اسیدسازی دوغ پروبیوتیک با نمونه شاهد را نشان می‌دهد. اولین نکته‌ایی که در این نمودار به چشم می‌خورد، بالاتر بودن اسیدیتهٔ دوغ پروبیوتیک نسبت به نمونه شاهد در روز اول بعد از تولید بود. بنابراین می‌توان ادعا کرد که حضور *ال. اسیدوفیلوس* مقدار اسیدسازی حین تخمیر را بالا برده و اسیدیته نهایی بعد از پایان مدت تخمیر در دوغ پروبیوتیک بالاتر از نمونه شاهد بوده است. مقایسه روند اسیدسازی هر دو پایه حکایت از آن دارد که حضور *ال. اسیدوفیلوس* مشخصاً اسیدسازی بعد از تولید را پایین آورده و منجر به بهبود وضعیت محصول تولیدی در حین نگهداری شده است.

**پایداری بافتی:** همان گونه که در شکل ۴ مشخص است، درصد دو فاز شدن در نمونه و شاهد در سطح اطمینان ۹۵٪ تفاوت معنی‌داری با هم نداشت. به عبارت دیگر، افزودن *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تأثیری بر پایداری بافتی محصول نگذاشت. دو فاز شدن هر دو نمونه از روز اول تا هفتم به شدت (در حدود ۳۸ ٪) انجام شد و این در حالی است که از روز هفتم به بعد بافت، پایدار شده و شدت و میزان دو فاز شدن کاهش چشمگیر یافت.

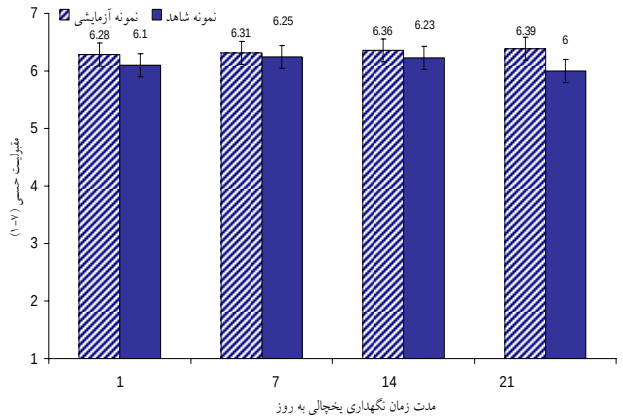
**مقبولیت حسی کلی:** شکل ۵ مقبولیت حسی فرمولاسیون دوغ پروبیوتیک و نمونه شاهد طی مدت نگهداری را به مقایسه گذاشته است. حضور *ال. اسیدوفیلوس* نه تنها تأثیر منفی بر خواص حسی و مقبولیت کلی محصول نداشت، بلکه در روز اول پس از تولید، مقبولیت بهتر بود و با افزایش زمان نگهداری باعث بهبود و افزایش مقبولیت کلی محصول شد.




**شکل ۳- تغییرات میزان اسیدیته دوغ پروبیوتیک و نمونه شاهد طی دوره نگهداری یخچالی**




**شکل ۴- تغییرات درصد دو فاز شدن دوغ پروبیوتیک و نمونه شاهد طی دوره نگهداری یخچالی**




**شکل ۵- میزان مقبولیت دوغ پروبیوتیک و نمونه شاهد طی دوره نگهداری یخچالی**

## • بحث

با توجه به اینکه مبحث محصولات پروبیوتیک یکی از مباحث جدید علمی در ایران است و شناخت هر چه بیشتر ظرایف تولید و نگهداری چنین محصولاتی گشاینده دریچه‌های بیشتری به سوی صنعتی شدن آن و ارتقای سطح سلامتی جامعه خواهد بود، تحقیق حاضر در ادامه تحقیقات سال‌های اخیر و با هدف ارزیابی نوعی محصول سلامت بخش شیری، مطابق با ذائقه ایرانی طراحی و انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان از میکروارگانیسم پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-۵ در تولید دوغ با pH =۴/۳۰ ، درصد نمک ۰/۸ و ماده جامد کل ۷/۴ درصد استفاده کرد. به این ترتیب، بقای این باکتری طی نگهداری ۲۱ روزه، مناسب ارزیابی شد و محصول توانست با حفظ تعداد باکتری پروبیوتیکی بالاتر از حد تعریف شده، بعد از زمان نگهداری نیز پروبیوتیک باقی بماند. ضمناً این باکتری توانست کاهش تعداد باکتری‌های ماست طی نگهداری را افزایش دهد و افت تعداد میکروب‌های ماست در نمونه دوغ پروبیوتیک بیش از نمونه شاهد ارزیابی شد.

*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از نظر حسی و اسیدسازی بعد از تولید، وضعیت بهتری را نسبت به دوغ شاهد ایجاد کرد. گذشته از اینکه دو فازشدن نمونه پروبیوتیک نسبت به شاهد، تفاوت معنی‌داری نداشت. بعد از تولید فراورده‌های شیری تخمیری که دارای میکروارگانیسم‌های فعال و بسیار حساس هستند، ارزیابی و بررسی رفتار میکروبی طی دوره نگهداری بسیار مهم است. تحقیقات قبلی نشان دادند که شمارش باکتریایی بعد از تولید شیر تخمیری و در شرایط نگهداری سرد ابتدا افزایش و سپس کاهش می‌یابد (۲۰). بررسی رفتار میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک و باکتری‌های ماست طی نگهداری محصول در تحقیقات قبلی نیز آمده است. Kneifel و همکاران نشان دادند که ماست‌های تازه دارای شمارش باکتریایی در حدود ۷ log cfu/ml تا ۹ هستند و عنوان کردند که شمارش باکتریایی بعد از تولید و در شرایط نگهداری یخچالی ابتدا افزایش و سپس کاهش می‌یابد (۲۱). تحقیق دیگری نشان داد که در یک ماست پروبیوتیکِ تجاری، جمعیت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* بعد از تخمیر، بیش از ۷ log cfu/mg محصول است که در طی نگهداری ۱۴ روزه دمای یخچال تعداد *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* کاهش نمی‌یابد اما تعداد *ال. اسیدوفیلوس* از روز هفتم به شدت کم می‌شود (۹). Shin و همکاران ضمن تأیید این یافته‌ها اعلام کردند که *بیفیدوباکتریوم‌ها* و سایر باکتری‌های پروبیوتیک در ماست‌های تجاری، طی ۳۵ روز نگهداری به اندازه ۳ log کاهش می‌یابند (۲۲). در حالی که در تحقیق حاضر، افت تعداد باکتری‌های ماست در دوغ پروبیوتیک (به ترتیب ۱/۵۶ و ۱/۲۹ log cfu/ml برای *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* ) بیش از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۰/۹۳ log cfu/ml ) گزارش شد. Gardini و همکاران نیز پایداری بیشتر پروبیوتیک‌ها نسبت به باکتری‌های ماست در دمای ۴°C را گزارش کردند و نشان دادند که تعداد هر سه باکتری در حین نگهداری یخچالی کاهش می‌یابد. آنها ادعا کردند که افزایش درصد تلقیح *ال. اسیدوفیلوس*، بقاء *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* را کاهش و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* را افزایش می‌دهد (۱۱). در تحقیق حاضر، مشخص شد که تلقیح باکتری پروبیوتیکی در کنار کشت ماست، به کاهش بیشتر *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروئه کی یی* زیرگونه *بولگاریکوس* منجر می‌شود. طی مطالعات و پژوهش‌های انجام شده توسط Vinderola و همکاران در سال ۲۰۰۲ نیز گزارش شد که متابولیت‌های تولیدی توسط *ال. اسیدوفیلوس*، روی استارترهای ماست تأثیر نامطلوبی دارد (۲۳). حتی گزارش شده است که وجود برخی گونه‌های پروتئولیتیک *ال. بلگاریکوس* می‌تواند بقای پروبیوتیک‌ها را نیز بهبود بخشد (۲۴).

در کنار رشد، اسیدسازی باکتری‌های آغازگر طی تولید و نگهداری محصول دارای اهمیت است. در این تحقیق مشخص شد که اسیدسازی محصول پروبیوتیک نسبت به شاهد، طی تولید و گرمخانه گذاری بیشتر بوده است. این ادعا با مشاهدات طاهری و همکاران در سال ۱۳۸۵ مطابقت دارد که افزایش درصد تلقیح *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را مسبب افزایش اسیدسازی ماست پروبیوتیک طی گرمخانه گذاری ۶ ساعته اعلام کردند (۲۵). علاوه بر میزان و سرعت اسیدسازی طی تولید که از نظر تکنولوژیک دارای اهمیت است، اسیدسازی حین نگهداری محصول نیز رخ می‌دهد که بالا بودن میزان و سرعت اسیدسازی در این مرحله از مشکلات نگهداری این محصولات است. به عبارتی پس- اسیدسازی (Post-acidification) در ماست‌های معمولی رخ می‌دهد. این پدیده به فعالیت غیر قابل کنترل *ال. بلگاریکوس* در درجه حرارت یخچال و pH پایین مربوط می‌شود که موجب افزایش دو فاز شدن، کاهش تعداد سلول‌های زنده و تجمع اسید لاکتیک D(-) در محصول می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که حضور باکتری پروبیوتیک *ال. اسیدوفیلوس* می‌تواند این پدیده را کاهش دهد و اسیدسازی حین نگهداری تا حدی کنترل شود. در تحقیقات پیشین نیز اسیدسازی طی نگهداری ماست‌هایی که در تهیه آنها علاوه بر کشت ماست معمولی از باکتری‌های پروبیوتیک مثل *ال. اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌ها* استفاده شده باشد، کمتر ارزیابی شده است. چنان که Kneifel اسید سازی ماست معمولی و ماست پروبیوتیک را بعد از دو هفته نگهداری در ۶ °C به ترتیب ۲۲/۳ و ۱۴/۹ درصد گزارش کرد (۲۶).

گذشته از پس- اسیدسازی، پدیده دو فاز شدن نیز از مشکلات موجود بر سر راه نگهداری این نوع شیرهای تخمیری است. تحقیقات در مورد محصولی مشابه نشان داد که تا روز ۱۴ ترسیب اتفاق می‌افتد و بعد از آن متوقف می‌شود. این مشکل در نمونه‌هایی که اسیدسازی بیشتری حین نگهداری داشتند، بیشتر مشاهده شد (۲۷). در تحقیق حاضر دو فاز شدن محصول تا روز هفتم، افزایش و از روز هفتم تا پایان مدت نگهداری کاهش یافت. این در حالی است که حضور باکتری پروبیوتیک *ال. اسیدوفیلوس* در کاهش یا افزایش این پدیده چندان مؤثر نبود.

علاوه بر موارد گفته شده، طعم یکی از مهم‌ترین جنبه‌های کیفی غذاها و نوشیدنی‌هاست که پذیرش مصرف کننده را در پی خواهد داشت. شیرهای تخمیر شده با باکتری پروبیوتیک *ال. اسیدوفیلوس* با وجود دارا بودن ارزش تغذیه‌ای قابل توجه، طعم ضعیفی دارند. (۲۸). Young در سال ۱۹۷۸ عنوان کرد که آنزیم الکل دهیدروژناز با تبدیل استالدئید به اتانل، باعث ضعف طعم شیرهای تخمیری اسیدوفیلوسی می‌شود (۲۹). با بررسی نتایج به دست آمده از این تحقیق، می‌توان برتری نمونه پروبیوتیک با شاهد خود، در روز اول پس از تولید را به اسیدیته بالاتر نمونه‌ها مربوط دانست (با توجه به شکل۳). میانگین آرای اتخاذ شده نشان می‌دهد که مقبولیت حسی محصول طی مدت نگهداری یخچالی افزایش می‌یابد. این افزایش در مورد محصول پروبیوتیک بیش از نمونه شاهد بود، اما پایین آمدن مقبولیت نمونه شاهد از روز ۱۴ به بعد به موازات افزایش اسیدیته بیش از حد آن می‌تواند نشانگر تأثیر نامطلوب ترشی بالای محصول بر خواص حسی باشد. بنابراین، می‌توان گفت که حضور باکتری پروبیوتیک *ال. اسیدوفیلوس* بر مقبولیت کلی دوغ تأثیر مثبت دارد و طی مدت نگهداری با کنترل اسیدسازی، این تأثیر مشهودتر است. با این حال Gardini نشان داد که خواص ارگانولپتیک محصول حاوی استارتر ماست و باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، تحت تأثیر درصد تلقیح *ال. اسیدوفیلوس* قرار نمی گیرد(۱۱).

**سپاسگزاری**

بدین وسیله از مسئولان محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران که تأمین کلیه تسهیلات اعتباری این طرح را بر عهده داشته و از مسئولان محترم *شرکت سهامی صنایع شیر ایران* که امکانات اجرایی آن را تقبل نمودند، قدردانی می‌شود.

## References


1. Chandan RC. Enhancing market value of milk by adding cultures. J Dairy Sci 1999*; 82*: 2245−2256.
2. Salminen S, Ouwehand, AC, Isolauri E. Clinical applications of probiotic bacteria. Int J Dairy Sci 1998; 8: 563−572.
3. Laurent MA, Boulenguer P. Stabilization of acid dairy drink (ADD) induced by pectin. Food Hydrocolloid 2003; 17: 445−454.
4. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Probiotic doogh-Specifications and test methods. ISIRI no 11324; 2009. [ in Persian]
5. Shortt C. The probiotic century: historical and current perspectives. Trends Food Sci Tech 1999; 10: 411−417.
6. Robinson RK. Therapeutic Properties of Fermented Milks. London: Elsevier 1991.
7. Saxelin M, Grenov B, Svensson U, Fonden R, Reniero R, Mattila-Sandholm T. The technology of probiotics. Trends Food Sci Tech, 1999; 10: 387−392.
8. Dave RI, Shah NP. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. Int J Dairy Sci 1997; 7: 31−41
9. Rybka S, Kailasapathy K. Effect of freeze drying and storage on the microbiological and physical properties of AB−yoghurt. Milchwissenschaft 1997; 52(7): 390−394.
10. International Dairy Federation. Fermented milks: science and technology. IDF Bulletin 1998; 227.
11. Gardini F, Lanciotti R, Guerzoni ME, Torriani S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. Int J Dairy Sci 1999; 9: 125−134.
12. Sarrela M, Mogensen G, Fonden R, Sandholm TM. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol 2000; 84: 197−215.
13. Gonzalez S, Ambrosini VM, Nadra M, Holgado AP, Oliver G. Acetaldehyde production by strains used as probiotic in fermented milks. J Food Protect, 1994; 57(5): 436-440.
14. Marshall VM, Cole WM. Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in Lactobacillus bulgaricus and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. J Biotechnol 1983; 50: 375-379.
15. Tuinier R, Kruif CG. Stability of casein micelles in milk. J Chem Phys 2002; 117 (3): 1290−1295.
16. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Doogh-Specifications and test methods. ISIRI no 2453. Karaj: ISIRI; 2009 [ in Persian]**.**
17. Mortazavian AM, Ehsani MR, Azizi A, Razavi H, Rin Himer J. Effect of principal formulating factors and probiotics micro encapsulation on qualitative parameters of probiotic Doogh [dissertation]. Tehran: Univercity of Tehran, College of Agriculture and Resources 2007 [in Persian].
18. Vinderola CG, Reinheimer JA. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. Int J Dairy Sci 1999; 9: 497-505.
19. Dave RI, Shah NP. Evaluation of media for selective enumeration of *S. thermophilus*, *L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, and bifidobacteria. J Dairy Sci 1996; *79*: 1529-1536.
20. Nighswomger BD, Brashears MM, Gilliland SE. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. J Dairy Sci. 1996; 79: 212−219
21. Kneifel W, Ulbert F, Erhard F, Joros D. Aroma profiles and sensory properties of yoghurt and yoghurt related products. Milchwissenschaft 1992; 47(6): 362−365.
22. Shin HS, Lee JH, Pestka JJ, Ustonol Z. Growth and viability of commercial Bifidobacterium spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin. Food Microbiology and Safety 2000; 65: 884−887.
23. Vinderola CG, Mocchiutti P, Reinheimer JA. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. J Dairy Sci 2002; 85: 721–729.
24. Shihata A, Shah NP. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. Int J Dairy Sci 2002; 12: 765−772.
25. Taheri P, Ehsani MR, Khosravi Darani K. Evaluation of effective parameters on acidification and pH decrease of probiotic yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 during incubation period, Iranian J Nutr Sci Food Tech 2007; 4(1): 37-46 [in Persian].
26. Kneifel W, Jaros D, Erhard F. Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. Int J Food Microbiol 1993; 18: 179−189.

27. Oliveira MN, Sodini I, Remeuf F, Tissier JP, Corrieu G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. Food Microbiology and Safety, 2002; 67(6): 2336−2341.

28. Marshall VM, Cole WM. Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. J Dairy Res 1983; 50, 375-379.

29. Young CH, Nelson FE. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in Sweet Acidophilus Milk during refrigerated storage. J Food Protect 1978; 41(4): 248-250.