مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دوم، شماره۴، زمستان ۱۳۸۶ ، صفحات ۵۷-۴۹

متغیرهای موثر بر فرایند تولید اسید لینولئیک مزدوج در ماست پروبیوتیک با استفاده از طراحی تاگوچی

پروین روحی[۱]، هوشنگ نیکوپور[۲]، ابراهیم واشقانی فراهانی[۳]، کیانوش خسروی دارانی[۴]

۱- کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی، بخش مهندسی شیمی، دانشکده فنی، دانشگاه تربیت مدرس
۴- نویسنده مسئول: پژوهشگر گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۶/۶/۵ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۰/۱

چکیده

سابقه و هدف: اسید لینولئیک مزدوج (CLA) اسید چربی است که به طور طبیعی در چربی شیر وجود دارد. این اسید چرب، خواص مفید گوناگونی دارد مانند: آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، تنظیم عمل دستگاه ایمنی، ضد فشار خون، کاهش کلسترول و ضد دیابتی. ماست پروبیوتیک نیز با داشتن خواص بسیار مهم در سلامت، مقبولیت و مصرف فراوان دارد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر متغیرهای فرایند بر افزایش تولید CLA در ماست پروبیوتیک بود.

مواد و روش‌ها: برای این منظور، اثر متغیرهای مختلف شامل مقدار افزودن شیر خشک بدون چربی به شیر کامل، زمان افزودن روغن گلرنگ، مقدار افزودن روغن گلرنگ، دما و مدت زمان گرمخانه‌گذاری بر افزایش میزان CLA در ماست پروبیوتیکِ تهیه شده با آغازگرهای *ال. اسیدوفیلوس*، *ب. لاکتیس* و باکتری‌های سنتی ماست در دو سطح بررسی شد.

یافته‌ها: بالاترین میزان CLA با افزودن (w/w) ۲٪ شیر خشک بدون چربی، زمان افزودن روغن گلرنگ بعد از رسیدن به pH =۶، مقدار روغن گلرنگ افزوده شده $۱/۴ \times ۱۰^{-۳}$(v/v) درصد و دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷°C در زمان رسیدن به pH =۴/۸ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: در بهترین شرایط، مقدار CLA در ماست پروبیوتیک با ۳۲/۲ درصد افزایش از $۷/۰۷ \times ۱۰^{-۳}$ (w/w) درصد در ماست شاهد به $۹/۲۳ \times ۱۰^{-۳}$ (w/w) درصد در ماست حاوی روغن گلرنگ رسید.

واژگان کلیدی: ماست پروبیوتیک، اسید لینولئیک مزدوج، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*، غربال متغیرها

• مقدمه

اسید لینولئیک مزدوج Conjugated Linoleic Acid (CLA) اسیدچربی است که به صورت طبیعی در چربی شیر و فراورده‌های لبنی مانند ماست، کره و پنیر یافت می‌شود و به خانواده اسیدهای چرب امگا-۶ تعلق دارد. این اسید، یک ایزومر موضعی و فضایی از اسیدلینولئیک است (۱). ایزومر سیس ۹/ترانس ۱۱ CLA در چربی شیر، فعال و غالب (۷۵ تا ۹۰٪) است (۲). اهمیت این ایزومر بعد از کشف خاصیت ضد سرطانی بودن آن در مطالعات زیست‌پزشکی روی حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسید (۳). راهکارهای افزایش میزان CLA در فراورده‌های شیری از طریق بیوسنتز CLA درحیوانات نشخوار کننده (با اصلاح رژیم غذایی دام به منظور افزایش تولید CLA در معدهٔ چهارم حیوانِ نشخوار کننده از طریق مکانیسم هیدروژناسیون زیستی) و تولید میکربی CLA از طریق تخمیر (از طریق مکانیسم اکسیداسیون وهیدروژناسیون زیستی)است.

تولید میکروبی CLA در جنس‌هایی از خانواده باکتری‌های لاکتیکی و با استفاده از آنزیم لینولئیک اسید ایزومراز در حضور یک منبع اسید لینولئیک رخ می‌دهد. Ha و همکاران در سال ۱۹۸۹ دریافتند که مقدار CLA

پس از تخمیر فراورده‌های شیر افزایش می‌یابد (۴). Aneja و همکاران در سال ۱۹۹۰ به بررسی میزان CLA درنوعی فراوردهٔ تخمیری با نام Dahi (معادل کلمه ماست در زبان هندی) پرداختند (۵). نتایج این بررسی حاکی از افزایش میزان CLA از ۵/۵ به ۲۶/۵ میلی‌گرم در هر گرم چربی فراورده بود (۵). Lin و همکاران در سال ۱۹۹۵ عوامل مؤثر بر مقدار CLA در پنیر چدار را در یک مطالعه مروری گزارش کردند (۶) و نشان دادند که افزودن شیر خشکِ بدون چربی (به عنوان دهنده هیدروژن) واکنش ایزومریزاسیون در مرحلهٔ نخست بیوهیدروژناسیون و تبدیل رادیکال‌های اسید لینولئیک به CLA را تسریع می‌کند. همچنین، افزایش دما در عملیات فراوری از $۷۰^{\circ}C$ به $۸۵^{\circ}C$ با افزایش تشکیل رادیکال‌های اسید لینولئیک، مقدار CLA را در پنیر چدار افزایش می‌دهد.

دوره رسیدن پنیر نیز بسته به نوع پنیر و مدت زمان رسیدن، اثر متفاوتی در میزان CLA نشان داد. همچنین ۶ ماه پس از بسته‌بندی در قوطی، مقدار CLA افزایش می‌یابد؛ زیرا وجود هوا در فضای بالای قوطیِ بسته‌بندی، منجر به افزایش اکسیداسیون چربی می‌شود (۷). Lin و همکاران گزارش کردند که ارتباط مستقیمی بین مقدار پروتئین و میزان تولید CLA وجود دارد. این موضوع، تأیید کننده اثر افزایشی پروتئین‌ها (طی عمل پروتون‌دهی) در افزایش تشکیل CLA است (۶). غنی سازی پنیر Whiz با کنستانترهٔ آب پنیر، موجب افزایش CLA به میزان دو برابر در مقایسه با سایر پنیرها شد. وجود مقادیر زیاد پروتئین آلفا-لاکتاآلبومین و بتا لاکتوگلوبولین در کنستانترهٔ آب پنیر به عنوان منابع دهندهٔ هیدروژن، سبب این افزایش بود(۶).

بسیاری از گونه‌های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس و استرپتوکوکس قادر به تولید CLA از اسید لینولئیک در محیط‌های ویژه یا شیر پس‌چرخ یا کامل هستند؛ اما این تولید کاملاً به محیط کشت وابسته است. ساکارز، لاکتوز، فروکتوز و کلرید سدیم در بعضی موارد، اثرات منفی بر تولید CLA دارند. Lin و همکاران در سال ۱۹۹۹ توانایی باکتری‌های لاکتیکی در تولید CLA در محیط حاوی اسید لینولئیک را بررسی کردند (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه بولگاریکوس و *استرپتوکوکوس سالیواریوس* زیر گونه ترموفیلوس). میزان اسید لینولئیک اضافه شده به محیط کشت به ترتیب ۱ و ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت و زمان گرمخانه‌گذاری (صفر تا ۴۸ ساعت) در محیط شیر خشک بدون چربی استریل شده بود. نتایج نشان داد همهٔ باکتری‌های مورد بررسی، توانایی تبدیل اسید لینولئیک به CLA را دارند. تولید این اسید چرب توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در حضور ۱mg/ml اسید لینولئیک پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، افزایش معنی‌داری نشان داد؛ اما افزایش میزان اسید لینولئیک تا ۵mg/ml و طولانی کردن زمان تا ۴۸ ساعت، بی‌اثر بود (۸).

Kim و همکاران در سال ۲۰۰۲ افزایش میزان CLA چربی شیر با استفاده از باکتری‌های لاکتیکی را بررسی کردند. هدف آنها تعیین عوامل و روش‌های مؤثر در افزایش میزان این اسید چرب در فراورده‌های شیریِ تخمیری بود. در مطالعه آنها ۱۴ گونه باکتری لاکتیکی بررسی شد و روغن آفتابگردان به عنوان سوبسترا به کار رفت. در بین گونه‌های مورد بررسی، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم*، *لاکتوکوکوس کازئی* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* درشیر کامل و محیط MRS توانایی تولید اسیدلینولئیک مزدوج را داشتند. این متغیرها بر تشکیل CLA مؤثر شناخته شدند: گونه باکتری، تعداد سلول، غلظت سوبسترا و زمان. براساس پژوهش Kim تولید CLA با تبدیل آنزیمی اسیدلینولئیک در ارتباط بود و به دنبال رشد باکتری در شیر و کاهش pH (در اثر غیرفعال شدن آنزیم ایزومراز) متوقف شد. به دنبال تماس باکتری‌ها با سوبسترای چرب در فاز سکون، تجمع CLA مشاهده شد. در حالی که این تجمع در سلول‌های فاز لگاریتمی، کُندتر انجام شد. سن باکتری در فرایند بیوهیدروژناسیونِ کشت مخلوط و خالص، مؤثر بود (۹).

Shantha و همکاران در سال ۱۹۹۲ به بررسی عوامل مؤثر در تشکیل CLA در فراورده‌های شیری پرداختند.

افزودن پروتئین‌های آب پنیر و شیر خشک بدون چربی، میزان این اسید چرب را در پنیر و ماست بدون چربی افزایش داد (۱۰). Lin در سال ۲۰۰۳ به مطالعه اثر افزودن اسیدلینولئیک و الیگوساکاریدها در افزایش میزان CLA در ماست بدون چربی توسط باکتری‌های سنتی ماست به همراه باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* پرداخت و نشان داد که تلقیح آغازگر ماست به همراه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سبب افزایش میزان CLA از ۰/۷۱ به ۲/۹۵ میکروگرم در هر گرم ماستِ بدون چربیِ حاوی ۰/۱درصد اسیدلینولئیک شد. علت این افزایش به اثر "هم‌افزایی" باکتری‌های سنتی ماست و باکتری پروبیوتیک نسبت داده شد (۱۱).

آقاجانی و همکاران نیز در سال۱۳۸۳ به بررسی شرایط بهینه برای تولید میکروبی CLA پرداختند. این بررسی شامل فعال‌سازی باکتری‌های ماست، رشد آنها و سپس تلقیح به شیر و افزودن روغن آفتابگردان به شیر بود. نتایج این تحقیق نشان داد ۰/۲میلی لیتر مایه تلقیح، افزودن ۱۰ میکرولیتر روغن پس از دو ساعت، دمای گرمخانه‌گذاری $۴۰^{\circ}C$ و سردکردن مرحله سوم به روش سریع و بدون تکان دادن ماست، شرایط مناسبی را برای تولید میکروبی CLA فراهم می‌کند و مقدار آن را در ماست از ۴/۸ چربی به ۷ میلی‌گرم در هر گرم چربی می‌رسانَد (۱۲).

در تحقیق حاضر، برای اولین بار، اثر افزایش میزان CLA از کشت مخلوط ABY-1 (حاوی *استرپتوکوکوس سالیواریوس* زیرگونه ترموفیلوس، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه بولگاریکوس و آغازگرهای پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*) پس از افزودن روغن گلرنگ به عنوان یک منبع غنی از اسیدلینولئیک بررسی شد. در این تحقیق، اثر مقدار و زمان افزودن روغن گلرنگ، مدت زمان و دمای گرمخانه‌گذاری و مقدار شیرخشک بدون چربی افزود شده به شیر کامل نیز بر میزان تولید CLA در ماست پروبیوتیک بررسی و شرایط مناسب تولید تعیین شد.

• مواد و روش‌ها

آماده سازی نمونه‌ها: یک لیتر شیر (حاوی ۱۰٪ ماده خشک) از شیر خشک بدون چربی، تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای$۹۰^{\circ}C$ پاستوریزه و تا رسیدن به حرارت $۳۵^{\circ}C$ خنک شد. یک بسته کشت آغازگر ABY-I (حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بلگاریکوس*) به شیرِ بازساخته، افزوده و ضمن هم‌زدن آهسته توسط مگنت به مدت ۱۵دقیقه محلول شد.

عملیات تلقیح در کنار شعله و در شرایط سترون انجام شد. از مایه تلقیحِ تولید شده به میزان (v/v) ۰/۴ درصد به شیر اضافه شد. به این ترتیب، درجه رقت پودر حل شده در شیر معادل درجه رقت پیشنهادی شرکت دانمارکی کریستین هانسن (برابر ۰/۰۰۰۰۴۸) انتخاب شد و شیر ۳٪ چربی پس از افزودن شیر خشک بدون چربی به وسیله مایه آغازگرِ حاوی باکتری‌های پروبیوتیک تلقیح شد.

سپس نمونه‌ها با توجه به طرح آزمایشی از نظر کاهش pH (هر نیم ساعت یک بار) مورد بررسی قرار گرفتند تا نتایج مربوط به روند کاهش pH برای آزمایش‌های اصلی به کار گرفته شود. در این مرحله، روغن گلرنگ به میزان ۰/۱ درصد حجمی به شیرِ تلقیح شده، اضافه شد. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری (۱ و ۲ ساعت) و تا رسیدن به pH مورد نظر، نمونه‌ها در ظرف یخ قرار گرفتند و به سردخانه منتقل شدند ($0^{\circ}C$) تا فعالیت باکتری‌ها متوقف شده و از افت بیشتر pH و افزایش اسیدیته، جلوگیری شود. در انتها، میزان CLA در ماست پروبیوتیکِ تولید شده اندازه‌گیری شد (۸، ۶).

۸ آزمون مطابق طرح آزمایشی برای اندازه‌گیری مقدار CLA (بلافاصله پس از تولید و بعد از یک هفته نگهداری) در ماست پروبیوتیک، مقدار چربی ماست، مادهٔ خشک بدون چربی، pH، اسیدیته بر حسب اسید لاکتیک، شمارش باکتری‌های پروبیوتیک، و ارزیابی حسی در فراورده پایانی انجام شد (هر آزمون سه بار انجام شد).

روش‌های آماری: طراحی آزمایش‌ها با استفاده از روش تاگوچی و مطابق آرایه جدول ۱ انجام شد. یعنی برای ۵ متغیر در ۲ سطح، ۸ آزمایش طراحی و با ۲ تکرار انجام شد. تحلیل داده‌ها به روش تاگوچی و با نرم افزار Qualitek-4 انجام شد. به این ترتیب، ضمن بررسی اثر هر متغیر بر پاسخ سیستم، شرایط بهینهٔ موضعی در محدودهٔ تغییر سطح متغیرها برای رسیدن به بهترین پاسخ، توسط نرم افزار به دست آمد. برای ارزیابی حسی ماست پروبیوتیکِ حاوی روغن گلرنگ در مقایسه با ماست پروبیوتیکِ شاهد، از نظر طعم، بافت و مزهٔ هر دو نمونه ماست به ۳۰ ارزیاب آموزش ندیده ارائه شد. از آزمون ناپارامتری کولموگراف – اسمیرنوف و نرم افزار $SPSS_{11.5}$ برای جمع‌بندی نتایج استفاده شد.

جدول ۱- آرایه متعامد L_8 برای بررسی ۵ متغیر در ۲ سطح به روش تاگوچی

	شیر خشک بدون چربی(w/w) %	زمان افزودن روغن	دما (°C)	روغن گلرنگ (v/v) %	زمان تخمیر(h)
۱	۲	ابتدا	۳۷	۰	۵
۲	۲	ابتدا	۴۰	۱/۴	۴/۸
۳	۲	در pH ۶	۳۷	۱/۴	۴/۸
۴	۲	در pH ۶	۴۰	۰	۵
۵	۴	ابتدا	۳۷	۰	۴/۸
۶	۴	ابتدا	۴۰	۱/۴	۵
۷	۴	در pH ۶	۳۷	۱/۴	۵
۸	۴	در pH ۶	۴۰	۰	۴/۸

آنالیزهای شیمیایی برای استخراج و جداسازی CLA: مطابق روش Lin و همکاران (۱۱، ۸، ۶) ۲/۵ گرم از نمونه ماست تولیدی با ۱۰ ml مخلوط کلروفرم:متانول (به نسبت حجمی ۲:۱) با یکدیگر مخلوط و ابتدا به مدت ۳ دقیقه در ۲۸۰۰rpm و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۸°C- و ۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شد.

پس از این مرحله، سه لایه تشکیل شد: لایه رویی (آبی)، لایه وسط (ماده خشک ماست) و لایه آلی زیرین، حاوی کلروفرم و متانول به همراه اسیدهای چرب بود. لایه زیرین پس از افزودن ۰/۳گرم سولفات سدیم به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد. از سه لایه تشکیل شده در این مرحله (لایه بالایی: آب، لایه وسط: کلروفرم، متانول و اسیدهای چرب، و لایه سوم: سولفات سدیم) لایه رویی، حذف و لایه وسط با عمل دکانته کردن از سولفات سدیم جدا و توسط تبخیر کننده دَوَرانی، تغلیظ شد. این عملیات تا خشک شدن کامل حلال‌های (کلروفرم و متانول) ادامه یافت.

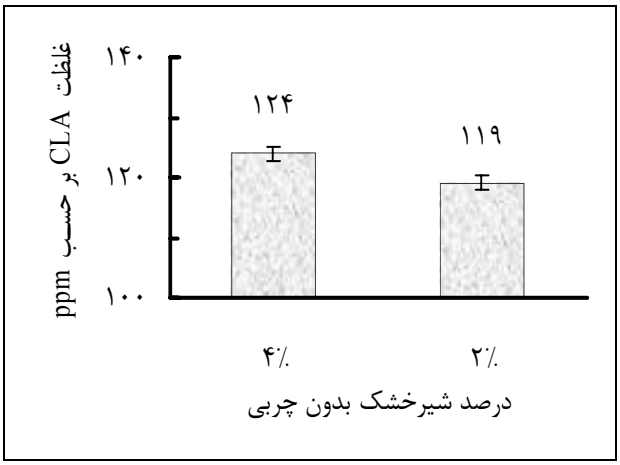
پس از افزودن ۱ ml محلول NaOH (1N) در متانول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰°C و خنک شدن در دمای محیط، ۶ml محلول ۴ درصد اسید کلریدریک در متانول به محلول فوق اضافه شد و ۲۰ دقیقه در حمام آب ۶۰°C قرار گرفت تا عملیات صابونی شدن و متیله شدن اسیدهای چرب انجام شود. سپس به نمونه ۲ml آب دو بار تقطیر، افزوده و ۱۵ دقیقه به شدت هم‌زده شد (برای آزاد شدن متیل استر به لایه آبی). سپس با افزودن ۵ml n-هگزان و ۱۵ دقیقه هم زدن شدید، متیل استر از لایه آبی، وارد لایه آلی شد. پس از دو بار شست و شو با ۲ml، به لایهٔ آلی خالص ۱ گرم سولفات سدیمِ بدون آب اضافه شد. یک میکرولیتر از لایه آلی به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شد(ستون کاپیلاری BP10، طول و قطر ستون؛ ۲۵ متر و ۰/۲۲mm و ضخامت فیلم ۰/۲۵mm، دمای ابتدایی ستون ۱۵۰°C و مدت زمان ۱ دقیقه، دمای تزریق ۲۵۰°C، دمای نهایی ستون ۲۳۰°C و مدت زمان ۱۰ دقیقه، شیب دمایی ۵°C در دقیقه) (۱۱، ۸، ۶).

آنالیز میکروبی: کشت ABY-1 حاوی باکتری‌های *اس. ترموفیلوس*، *ال. دلبروکی* زیرگونهٔ *بولگاریکوس*، *ال. اسیدوفیلوس* و *ب. لاکتیس* بود. برای شمارش انتخابی هر

یک از این دوگونهٔ پروبیوتیک درکشت‌های مخلوط ABY-1 از محیط کشت MRS-bile agar استفاده شد (مکمل bile به میزان ۰/۱۵ درصد به پایه MRS-agar افزوده شد تا از رشد باکتری‌های سنتی ماست جلوگیری شود). گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۷۲ ساعت در شرایط هوازی، منجر به رشد *ال. اسیدوفیلوس* و در شرایط بی‌هوازی به رشد بیفیدوباکتر شد (۱۳).

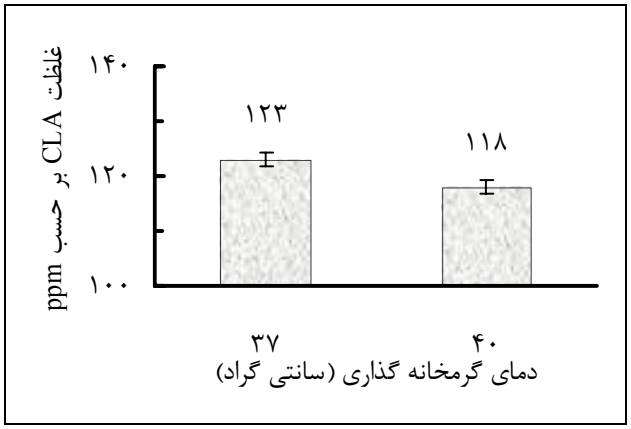
• یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده، مقدار CLA با افزودن شیرِ خشکِ بدونِ چربی به شیرِ کامل، افزایش یافت. شکل۱ نشان می‌دهد که افزودن ۲٪ شیر خشک بدون چربی به شیر کامل، منجر به افزایش معنی‌دار میزان CLA شد. با توجه به نقش پروتون‌دهی پروتئین‌ها در مکانیسم اکسیداسیون و تشکیل رادیکال اسیدلینولئیک می‌توان این افزایش را به این خصوصیت شیر خشک بدون چربی نسبت داد (۸،۱۱). البته، افزایش میزان شیر خشک تا ۴٪ باعث افزایش بیشتر میزان CLA نشد.



شکل ۱- اثر شیر خشک بدون چربی در افزایش CLA

شکل۲ نشان می‌دهد که دمای ۳۷°C برای افزایش CLA در ماست پروبیوتیک مؤثرتر بود. در فرایند تولید ماستِ پروبیوتیک با افزایش دما، شرایط رشد باکتری *ال. بولگاریکوس* که یک اسیدساز قوی محسوب می‌شود، مساعدتر شد و تجمع اسید لاکتیک تولید شده بر CLA تولید شده، اثر تخریبی داشت.



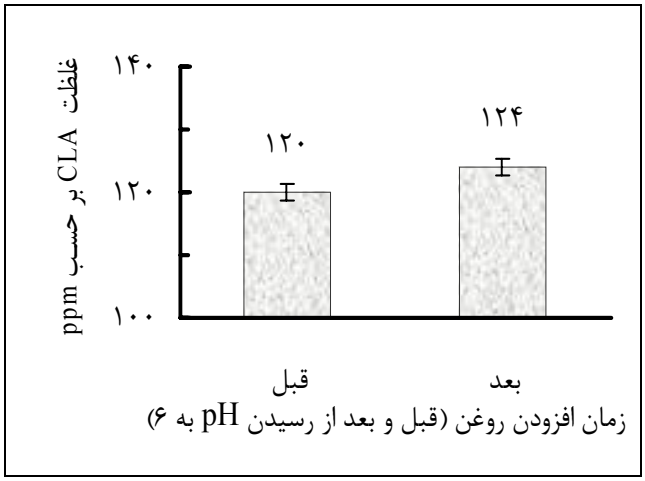
شکل ۲- اثر دمای گرمخانه‌گذاری در افزایش CLA

افزودن روغن گلرنگ به میزان ۰/۱ درصد حجمی به عنوان منبع غنی اسید لینولئیک، سبب افزایش میزان CLA شد. زمان افزودن روغن پس از رسیدن ماست به pH=۶ افزایش نسبی بیشتری را در میزان CLA منجر شد (شکل‌های ۳ و ۴). با توجه به نتایج سایر محققان در زمینه فراورده‌های شیری تخمیری، ارتباط مستقیمی بین مقدار اسید لینولئیک و اسیدلینولئیک مزدوج وجود دارد.

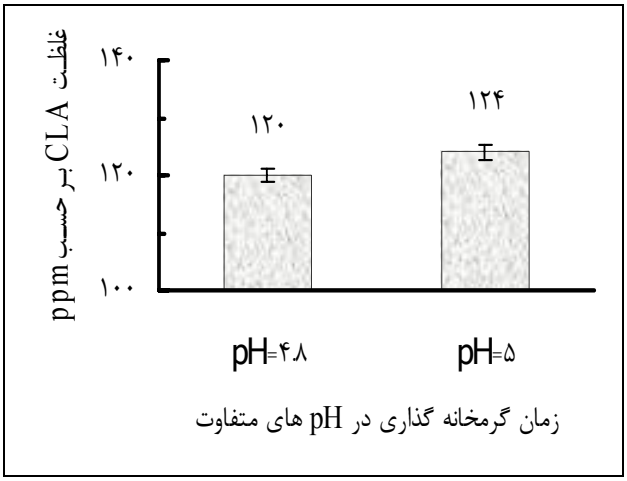
بهترین زمان برای پایان گرمخانه‌گذاری ماست، رسیدن به pH=۴/۸ به دست آمد. زیرا در این شرایط، ضمن حفظ بقای باکتری‌های پروبیوتیک و ایجاد رایحه و طعم مناسب در ماست پروبیوتیک، از تخریب اسیدلاکتیکی حاصل از *ال. دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* جلوگیری می‌شود (شکل۵). چنین نتیجه‌ای توسط Kim در سال ۲۰۰۲ نیز گزارش شده بود (۹).

در ضمن، استفاده از روغن گلرنگ و کشتِ مخلوطِ باکتری‌های پروبیوتیک *ال. اسیدوفیلوس و ب. لاکتیس* به همراه باکتری‌های سنتی ماست (شامل *اس. سالیواریوس زیرگونه ترموفیلوس و ال. دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس*) سبب افزایش میزان CLA شد.

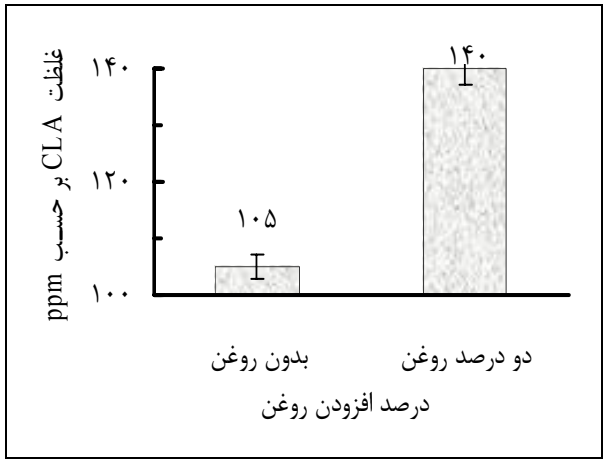
شکل ۶ نشان می‌دهد که ارزیابی حسی ماست پروبیوتیک حاوی روغن گلرنگ (از نظر طعم، بافت و مزه) در مقایسه با ماست پروبیوتیکِ شاهد، بین میانگین اندازه‌گیری‌های دو نمونه، اختلافی را نشان نداد و ماست پروبیوتیکِ حاوی روغن، از نظر طعم و مزه و بافت، کاملا مشابه ماست پروبیوتیک شاهد بود و افزودن ۰/۱ درصد روغن اثر سوئی بر خواص حسی یاد شده نداشت.



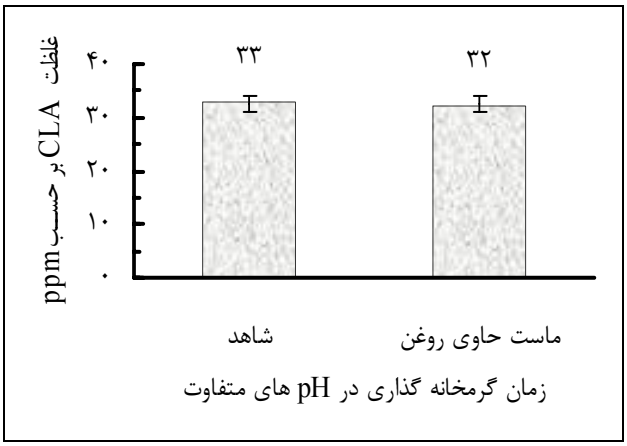
شکل ۳- اثر زمان افزودن روغن گلرنگ در تولید CLA



شکل ۵- اثر زمان پایان گرمخانه‌گذاری در تولید CLA



شکل ۴- اثر مقدار روغن گلرنگ افزوده در تولید CLA



شکل ۶- مقایسه میانگین ارزیابی حسی نمونه ماست پروبیوتیک با روغن گلرنگ در مقایسه با شاهد

بر اساس پژوهش انجام شده، بهترین شرایط برای افزایش میزان CLA در ماست پروبیوتیک، افزودن شیر خشک بدون چربی به میزان ۲٪ حجمی، دمای گرمخانه‌گذاری $^{\circ}C$ ۳۷، مقدار روغن گلرنگ اضافه شده ۰/۱درصد حجمی، زمان افزودن روغن گلرنگ در pH =۶ و پایان گرمخانه‌گذاری در زمان رسیدن به pH=۴/۸ مشخص شد. غلظت CLA تولیدی در چربی استخراجی از ۲/۵ml ماست پس از انحلال آن در ۵ ml حلال، برابر ۱۴۰/۱۹ ppm بود. ماست تولیدی حاوی ۰/۰۷۵ گرم چربی بود و حداکثر مقدار CLA در نمونه ماست پروبیوتیک و شاهد، معادل $۹/۲۳\times۱۰^{-۳}$ و $۷/۰۷\times۱۰^{-۳}$ درصد وزنی چربی کل بود.

جدول ۲- تغییر pH ماست در دوره گرمخانه‌گذاری در دماهای ۳۷°C و ۴۰ °C با افزودن ۲٪ شیر خشک بدون چربی

زمان (دقیقه)	pH در ۳۷ °C	pH در ۴۰°C
۰	۶/۶۰	۶/۶۸
۳۰	۶/۴۹	۶/۴۴
۶۰	۶/۳۷	۶/۲۸
۹۰	۶/۱۹	۶/۱۴
۱۲۰	۵/۸۸	۵/۷۶
۱۵۰	۵/۷۰	۵/۵۶
۱۸۰	۵/۳۳	۵/۲۰
۲۱۰	۵/۰۶	۵/۰۰
۲۴۰	۴/۸۳	۴/۷۸
۲۷۰	۴/۶۴	۴/۵۴

جدول ۳- تغییرات pH ماست در دوره گرمخانه‌گذاری در دماهای ۳۷ °C و ۴۰ °C با افزایش ۴٪ شیر خشک بدون چربی

زمان (دقیقه)	PH در ۳۷ °C	PH در ۴۰°C
۰	۶/۵۵	۶/۵۸
۳۰	۶/۴۷	۶/۴۲
۶۰	۶/۳۴	۶/۲۰
۹۰	۶/۲۰	۶/۱۴
۱۲۰	۶/۰۲	۶/۰۰
۱۵۰	۵/۷۴	۵/۶۳
۱۸۰	۵/۳۶	۵/۳۰
۲۱۰	۵/۰۶	۵/۰۳
۲۴۰	۴/۸۷	۴/۸۰
۲۷۰	۴/۷۵	۴/۵۲

جدول۴- ویژگی‌های شیمیایی فراوردهٔ نهایی در ماست پروبیوتیک با بالاترین میزانCLA

نمونه	ویژگی	مقدار CLA (میلی‌گرم در هر گرم چربی)		اسیدیته گرم بر صد گرم (بر حسب اسید لاکتیک)	PH	ماده خشک بدون چربی (درصد وزنی)	چربی (گرم در صد گرم)
		در ابتدا	پس ازیک هفته				
ماست حاوی CLA		۹/۲۳	۹/۱۸	۰/۷۶	۴/۸	۱۱/۲۴	۳٪

• بحث

تاثیر استفاده از شیر خشک بدون چربی در افزایش میزان CLA: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که افزودن ۲٪ شیر خشکِ بدون چربی به شیر کامل، منجر به افزایش میزان CLA می‌شود، اما در غلظت ۴٪ تغییر معنی داری مشاهده نمی‌شود. افزودن شیرِ خشک بدون چربی به فراورده‌های شیری باعث می‌شود که این مواد به عنوان منابع دهنده هیدروژن عمل کنند، واکنش ایزومریزاسیون در مرحله نخست بیوهیدروژناسیون افزایش یابد و رادیکال‌های اسیدلینولئیک اکسیدشده به CLA تبدیل شوند (۱۰).

تاثیر زمان افزودن روغن گلرنگ درافزایش میزان CLA: نتایج نشان داد که افزودن روغن گلرنگ در pH=۶ بیشترین تاثیر را در افزایش میزان CLA دارد (شکل ۳). برای تفسیر این نتیجه لازم است توجه شود که رشد و تکثیر باکتری‌ها در ظرف ماست، نوعی کشت غیر مداوم است. اسیدهای آلی تولید شده با رشد سلول‌ها ارتباط دارند. تغییراتpH و اسیدیته ماست در محدوده pH طبیعی شیر تا ۴/۵ دارای همبستگی معکوسِ تقریباً خطی هستند. جدول‌های ۲ و ۳ تغییرات pH ماست حاوی ۲ و ۴ درصد وزنی شیر خشک بدون چربی را در دوره گرمخانه گذاری در دو دمای مختلف نشان می دهد. نتایج حاکی از آن است که سینتیک افت pH نشان دهنده و متناسب با سینتیک رشد باکتری‌هاست. از سوی دیگر، فرایند بیوهیدروژناسیون، نیازمند انرژی است که در سلول‌های پیر کمتر رخ می‌دهد (۹). با توجه به منحنی تغییرات pH در ماست پروبیوتیک براساس نتایج پژوهش انجام شده، میزان CLA تولید شده در مرحلهٔ رشدِ لگاریتمی، بالاتر بود و افزودن سوبسترای چرب غنی از اسیدلینولئیک درpH =۶ بر افزایش CLA تاثیر بیشتری داشت. Kim و همکاران نیز در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که افزودن روغن آفتابگردان به شیر ۲/۵ درصد چربی تخمیر شده با آغازگرهای لاکتیکی از جمله

آغازگرهای معمول ماست، ۱۰ تا ۶۰ دقیقه قبل از پایان گرمخانه‌گذاری، سبب افزایش میزان CLA تولید شده در این فراورده‌ها می‌شود. این گزارش نشان داد که تولید CLA در سلول‌های فاز لگاریتمیِ رشد، بیشترین میزان است (۹).

تاثیر دمای گرمخانه‌گذاری در افزایش میزان CLA: تشکیل CLA (در ماست پروبیوتیک تهیه شده با آغازگرهای *ال.اسیدوفیلوس* و *ب. لاکتیس* به همراه باکتری‌های سنتی) در دمای ۳۷°C در مقایسه با دمای ۴۰°C بیشتر بود. با افزایش دما از ۳۷°C به ۴۰°C باکتری *ال. دلبروکی* زیر گونه بولگاریکوس موجود در کشت مخلوط، شرایط مناسب‌تری برای رشد یافت و به دنبال فعال شدن و اسیدسازی این میکروارگانیسم، باکتری‌های پروبیوتیک، غیرفعال می‌شوند. در تحقیق Kim و همکاران در سال ۲۰۰۲ نیز با اسیدی شدن محیط و رسیدن به pH=۴/۶، میزان تولید CLA کاهش یافت.

تاثیر افزودن روغن گلرنگ در افزایش میزان CLA: شکل ۴ نشان می‌دهد که افزودن روغن به میزان ۰/۱ درصد حجمی منجر به افزایش میزان تولید CLA می‌شود. Lin و همکاران نیز در سال‌های ۱۹۹۹ و ۲۰۰۳ نشان دادند که با افزودن ۰/۱ درصد حجمی اسیدلینولئیک به شیر مورد استفاده برای تولید ماست، میزان CLA تولیدی از ۰/۷۱ به ۲/۹۵ میکروگرم در هر گرم ماست بدون چربی رسید (۱۱، ۸). همچنین آقاجانی در سال ۱۳۸۳ نشان داد با افزودن ۰/۱ درصد حجمی روغن آفتابگردان به شیر برای تولید ماست معمولی با آغازگرهای *ال. دلبروکی* زیرگونه بولگاریکوس و *اس. سالیواریوس* زیرگونه ترموفیلوس، میزان تولید CLA از ۴/۸ به ۷ میلی‌گرم در هر گرم چربی در ماست حاوی روغن آفتابگردان رسید (۱۲).

تاثیر زمان پایان گرمخانه‌گذاری در افزایش میزان CLA: شکل۵ نشان می‌دهد که پایان گرمخانه‌گذاری در pH=۴/۸ منجر به تجمع بیشتر CLA می‌شود. در این pH ضمن اینکه بقای باکتری‌های پروبیوتیک حفظ و رایحه و طعم مناسب در ماست پروبیوتیک ایجاد می‌شود، از اثر تخریبی حاصل از اسیدلاکتیک تولیدی توسط *ال. بولگاریکوس* جلوگیری می‌شود.Kim و همکاران نیز در سال ۲۰۰۲ نشان دادند با افزایش میزان اسیدلاکتیک در محیط شیر ۲/۵ درصد تخمیر شده با آغازگرهای لاکتیکی و کاهش pH، تخریب CLA تولید افزایش می‌یابد (۹)

طبق نتایج حاصل از این پژوهش، استفاده از یک منبع غنی از اسیدلینولئیک، مانند روغن گلرنگ، با داشتن بیش از ۷۷ درصد اسیدلینولئیک در حضور باکتری‌های لاکتیکی معمول جهت تولید ماست به همراه دو باکتری (پروبیوتیک *ال.اسیدوفیلوس* و *ب. لاکتیس)* سبب افزایش میزان تولید CLA در ماست پروبیوتیک تهیه شده با آغازگرهای مزبور می‌شود. بر اساس پژوهش انجام شده، بهترین شرایط برای افزایش CLA در ماست پروبیوتیک عبارتند از: افزودن ۲٪ حجمی شیر خشک بدون چربی، دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷°C، افزودن (10^{-3}%v/v) ۱/۴ روغن گلرنگ در pH=۶ و زمان پایان گرمخانه‌گذاری در pH=۴/۸. غلظت CLA تولیدی در چربی استخراج شده از ۲/۵ml ماست، پس از انحلال در ۵ml حلال برابرppm ۱۴۰/۱۹ بود. ارزیابی حسی نمونه ماست پروبیوتیک حاوی روغن گلرنگ با ماست شاهد هیچ گونه تفاوت معنی داری را نشان نداد (شکل ۶).

برای ادامه کار و استفاده از نتایج این تحقیق، پیشنهاد می‌شود مطالعات بعدی در راستای اهداف ذیل صورت گیرد: تعیین میزان اسیدلینولئیک مزدوج در محصولات لبنی تولید شده در ایران، تولید شیر پروبیوتیک با افزایش میزان اسیدلینولئیک مزدوج، تاثیر استفاده از اسیدلینولئیک در افزایش اسیدلینولئیک مزدوج درمحصولات تخمیری، تولید ماست پروبیوتیک با سایر گونه های پروبیوتیک و استفاده از روغن سویای هیدرولیز شده به همراه شیر خشک بدون چربی.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور برای حمایت مالی و گروه بیوتکنولوژی دانشکده فنی دانشگاه تربیت مدرس برای همکاری در اجرای این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

• References

1.Kimoto N, Hirose M, Futakuchi M, Iwata T, Kasai M. & Shirai T. 2001. Site-dependent modulating effects of conjugated fatty acids from safflower oil in a rat two-stage carcinogenesis model in female Sprague dawley rats. Cancer Lett; 168: 15-21.

2.Chin S F, Liu W, Storkson J M, Ha Y L, Pariza M W 1992. Dietary source of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. J. Food Composition and Analysis, 5, 185-197.

3.McDonald H B, 2000. Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. J. Am. Coll. Nutr. 19. 1–13.

4.Ha LY, Grimm N K, Pariza, M W. 1989. Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. J. Agric. Food Chem; 37, 75–81.

5.Aneja R P. Murthi, T. N. 1990. Conjugated linoleic acid content of Indian curds and ghee. Ind. J. Dairy Sci; 43: 231-238.

6. Lin H, Boylston T D, Chang M J, Luedecke L O, and Shultz T D. 1995. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. J. Dairy Sci; 78: 2358 -2365.

7. Walstra P, Jenness R. Lipids. In: Dairy Chemistry. New York: John Wiley. 1984.p 58-94.

8. Lin TY, Lin CW, Lee C H. 1999. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. Food Chem; 67: 1–5.

9.Kim YJ, Liu RH. 2002. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. J. Food Sci; 67 (5): 1731–1737.

10. Shantha NC, Decker EA, Ustunol Z. 1992. Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. J. Oil Chem. Soc; 69: 425-428.

11. Lin T Y. 2003. Influence of lactic cultures, lionleic acid and fructo-oligosaccharides on conjugated linoleic acid concentration in non-fat set yogurt. Aust. J. Dairy Technol; 58 (1): 11–14.

۱۲. آقاجانی مهدی. جداسازی و انتخاب میکروارگانیسم و تعیین شرایط بهینه برای تولید میکروبی اسید لینولئیک مزدوج، [پایان نامه کارشناسی ارشد]. تهران: دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۸۳.

۱۳. مرتضویان فارسانی سید امیرمحمد. بررسی اثر مجموع متغیرهای حرارتی بر شاخص‌های کیفی ماست پروبیوتیک، [پایان‌نامه کارشناسی ارشد]. تهران: دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران؛ ۱۳۸۲.