ماندگاری بیفیدوباکتریوم لاکتیس (LAFTI-B94) آزاد و کپسوله شده و تأثیر آن بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی دوغ ایرانی

سمانه ابراهیم‌زادگان[1*]، شهین زمردی[2]، محمد حجت‌الاسلامی[3]، اصغر خسروشاهی اصل[4]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهر کرد، ایران
[2] استادیار بخش فنی و مهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، ارومیه، ایران
[3] استادیار گروه صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهر کرد، ایران
[4] استاد گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۳

چکیده

در این پژوهش ماندگاری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (LAFTI-B94) به دو شکل آزاد و کپسوله در دوغ و تأثیر آنها بر خواص فیزیکوشیمیایی، حسی و رئولوژیکی نمونه‌ها در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای ۱±۵ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید. تیمارها عبارت نمونه کنترل، بدون پرو یوتیک (C)، دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت آزاد (B) و دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت کپسوله شده (BC) بودند. نتایج بدست آمده نشان داد که در طول نگهداری مقدار *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در حالت آزاد ۰/۲۶ سیکل کاهش و در حالت کپسوله شده ۰/۳۶ سیکل لگاریتمی افزایش نشان داد. گرچه در هر دو فرم کپسوله شده و آزاد، پروبیوتیک‌های زنده مانده در دوغ بالاتر از حداقل مقدار توصیه شده برای خواص درمانی بود (10^7 واحد کلنی در گرم) اما شکل کپسوله در حفظ تعداد پروبیوتیک‌ها بیشتر از نوع آزاد آنها مؤثر بود. استفاده از پروبیوتیک‌ها موجب بهبود ویسکوزیته و پایداری دوغ گردید که در این میان باکتری-های کپسوله شده بیشترین مقدار پایداری (۴۶/۲۵ درصد) و ویسکوزیته (۵۴/۱۳ سانتی پوار) را داشتند. براساس نتایج ارزیابی حسی بین نمونه‌ها از لحاظ عطر و طعم اختلاف معنی‌داری مشاهده شد، بطوریکه نمونه‌های دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بالاترین امتیاز طعم را کسب کردند ($p<0/05$). بنابراین پروبیوتیک‌ها نه تنها تأثیر نامطلوب بر خواص فیزیکوشیمیایی و حسی دوغ نداشتند بلکه موجب بهبود خواص رئولوژیکی، پایداری و طعم دوغ گردید. لذا دوغ می‌تواند حامل خوبی برای پروبیوتیک‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*، پروبیوتیک، دوغ، کپسوله کردن.

* مسوول مکاتبه: eb.samaneh66@yahoo.com

۱- مقدمه

دوغ یک نوشیدنی لبنی تخمیری و از محصولات بومی ایران است. این محصول یکی از متداولترین نوشیدنی‌های اسیدی لبنی در سرتاسر دنیا است که علاوه بر ایران در سایر کشورها از جمله افغانستان، آذربایجان، ارمنستان، عراق، سوریه، بلغارستان، ترکیه، جزایر بالکان تولید و مصرف می‌شود (۲۶). این فرآورده در ایران و افغانستان دوغ و در استان‌های آذربایجان ایران و ترکیه آیران نامیده می‌شود. دوغ بطور سنتی از مخلوط ماست با آب و نمک تهیه می‌شود. دوغ با ویژگی‌های تکنولوژیک و سلامت بخش خود از پر طرفدارترین محصولات شیری ایران است که جای دادن باکتری های پروبیوتیک در چنین محصول پرمصرفی می‌تواند به ارتقای سلامت جامعه کمک شایانی کند.

باکتری‌های پروبیوتیک عبارت از میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که پس از مصرف، در روده ساکن شده و از طریق بهبود میکروفلور طبیعی روده، اثرات مفیدی در سلامتی انسان بر جای می‌گذارند. از اثرات سلامت بخشی پروبیوتیک‌ها می‌توان به تنظیم حرکت دودی معده، کاهش عدم تحمل لاکتوز، کاهش کلسترول، جلوگیری و درمان عفونت‌ها، خواص ضد سرطانی، بهبود پاسخ ایمنی و قابلیت هضم، افزایش ارزش تغذیه‌ای از طریق افزایش جذب ویتامین‌ها و مواد معدنی، جلوگیری از استروپروز، آنتی حساسیت، غیرفعال کردن آنتروتوکسین‌ها و کاهش محصولات کاتابولیک اشاره کرد (۱۵، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۲، ۳۱، ۳۲، ۳۵، ۳۸ و ۴۲). این باکتری‌ها باید متعلق به فلور میکروبی طبیعی میزبان بوده، قادر به تحمل محیط اسیدی باشند (۱۱ و ۳۶). یکی از مهمترین چالش‌های موجود در زمینه تولید و فرآوری محصولات پروبیوتیک پایین بودن قابلیت بقای باکتری‌های پروبیوتیک به دلیل حساسیت به شرایط سخت و دشوار درون محصول غذایی و هم‌چنین شرایط نامساعد دستگاه گوارشی است. این در حالی است که طبق گزارش فائو محصول پروبیوتیک استاندارد، محصولی است که در لحظه مصرف حداقل 10^6-10^7 واحد کلنی[1] بر گرم یا بر میلی لیتر میکروارگانیسم زنده و فعال پروبیوتیک داشته باشد تا در تأمین سلامتی مفید واقع شود (۱۰، ۱۴ و ۳۰). در سال‌های اخیر کپسوله کردن به عنوان ابزار مفید برای تثبیت سلول‌های پروبیوتیک در غذاهای عملگرا اهمیت یافته است. در این روش میکروب‌های حساس، از شرایط نامساعد از جمله مقدار زیاد اسید لاکتیک و اسید استیک، شرایط دستگاه گوارش و دمای فریزر حفظ می‌شوند (۸، ۱۲، ۲۸و ۴۲).

آلگیر و همکاران دز سال ۲۰۱۰ قابلیت زنده مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس (Bb-12) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (LA-5) را در دوغ حاوی فیبر ذرت، پلی دکستروز و اینولین طی مدت ۳۰ روز نگهداری مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که در طول نگهداری تعداد پروبیوتیک ها در حدود ۲ تا ۳ سیکل لگاریتمی کاهش یافت (۷). نتایج تحقیقات کراسیکوپت و همکاران (۲۸) و ادیکاری و همکاران (۶) نشان داد که قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک کپسوله شده در ماست بیشتر از فرم آزاد بود. هم‌چنین کایلاساپاتی در سال ۲۰۰۶ نشان داد که کپسوله کردن تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[2] و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*[3] را به ترتیب دو و یک سیکل لگاریتمی افزایش داد. هم‌چنین در ماست پروبیوتیک مقدار اگزوپلی-ساکاریدهای بیشتری نیز مشاهده شد (۲۵). طاهری و همکاران در سال ۱۳۸۸ نیز نشان دادند که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می‌تواند به بهبود مقبولیت کلی دوغ طی نگهداری کمک نماید (۳). بر اساس بررسی‌های انجام شده، در خصوص استفاده از پروبیوتیک‌های کپسوله شده در دوغ تحقیقاتی چندانی انجام نشده است. لذا در این تحقیق هدف بررسی ماندگاری باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به دو صورت آزاد و کپسوله شده و تأثیر آن بر کیفیت دوغ می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

شیر، تهیه شده از دامداری‌های ارومیه (با ۸۸/۸۱ درصد رطوبت، ۳/۶ درصد چربی، ۳ درصد پروتئین، ۰/۶۴ درصد خاکستر، ۰/۱۲۶ درصد اسیدیته برحسب اسید لاکتیک و pH=۶/۴)، استارتر تجاری ماست YC-X11 (کشت مخلوط *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس*) از شرکت کریستن هانسن دانمارک، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (LAFTI-B94) از شرکت DSM استرالیا، محیط کشت MRS[4]، RCA[1] و M17 از شرکت لیوفیلکوم ساخت کشور ایتالیا بود.

1- Colony Form Unit

2- *Lactoasillus acidophilos*

3- *Bifidobacterium lactis*

4- de Man, Rogosa, Sharpe (MRS)

۲-۲- کپسوله کردن

کپسوله کردن به روش اکستروژن انجام گرفت. مقدار ۰/۰۵ گرم از پودر لیوفیلیزه *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* برای هر کیلوگرم از دوغ (در حدود ۸ سیکل لگاریتمی، محاسبه شده بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده) در ۵ میلی لیتر آب پپتون ۰/۱ درصد (وزنی / حجمی) استریل حل شد و با ۲۰ میلی لیتر محلول آلژینات سدیم ۲ درصد (وزنی/حجمی) استریل (در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) مخلوط شد. سوسپانسیون سلولی حاصل توسط سرنگ استریل با قطر ۰/۲ میلی متر به ظرف حاوی محلول ۰/۰۵ مولار کلرید کلسیم استریل تزریق شد. کپسول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه برای سفت شدن در محلول فوق نگهداشته شدند. پس از آبکشی، تا زمان مصرف در آب پپتون ۰/۱ درصد استریل در دمای ۱±۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۲۸ و ۴۲).

۲-۳- تهیه دوغ پروبیوتیک

شیر در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه پاستوریزه گردید. سپس تا دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد سرد و استارترهای ماست (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن) اضافه گردید و در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به pH=۴/۶ گرمخانه-گذاری شد. پس از سرد کردن، به نسبت ۵۰:۵۰ با آب پاستوریزه حاوی ۰/۸ درصد نمک رقیق گردید. تیمارها در ۲ تکرار تهیه شدند که عبارت بودند از:

۱-تیمار کنترل (C)، بدون پروبیوتیک، ۲-تیمار حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت آزاد (B) و ۳-تیمار حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت کپسوله شده (BC).

لازم به ذکر است که برای تهیه تیمار B مقدار ۰/۰۵ گرم پروبیوتیک لیوفیلیزه برای هر کیلوگرم از نمونه در مقداری دوغ حل و اضافه گردید و برای تولید تیمار BC مقدار لازم از کپسول های تهیه شده (طبق بند ۲-۲) به ازای هر بطری حاوی نمونه توزین و افزوده شد.

نمونه‌های دوغ آماده شده در شرایط استریل در بطری‌های پلاستیکی استریل بسته بندی و در دمای ۱±۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ روز نگهداری شدند. در فواصل زمانی ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز مورد آزمایش قرار گرفت.

۲-۴- روش‌های آزمایش

۲-۴-۱- شمارش پروبیوتیک‌ها و استارترهای ماست

برای تهیه رقت ۰/۱، مقدار ۵ گرم از نمونه دوغ به ۴۵ میلی لیتر سدیم سیترات ۲ درصد استریل افزوده شد. سری بعدی رقت‌ها با افزایش یک میلی لیتر از هر رقت به ۹ میلی لیتر آب پپتون ۰/۱ درصد استریل تهیه گردید.

بیفیدوباکتریوم لاکتیس در محیط RCA[1]، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در محیط MRS آگار که pH آن با استفاده از اسید کلریدریک یک نرمال به ۵/۲ تنظیم شده بود و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در محیط M17 آگار به روش پورپلیت کشت داده شدند (۲۹ و ۳۴). *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در شرایط بی‌هوازی توسط گاز پک و استرپتوکوکوس *ترموفیلوس* تحت شرایط هوازی، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند (۱۳، ۳۳ و ۳۹).

۲-۴-۲- اندازه گیری pH و اسیدیته

pH نمونه‌ها با استفاده از دستگاه pH متر (متروم ساخت سویس) و اسیدیته بر حسب اسید لاکتیک به روش تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال در مجاورت معرف فنل فتالئین اندازه‌گیری شد (۴).

۲-۴-۳- اندازه گیری ویسکوزیته ظاهری

ویسکوزیته ظاهری با استفاده از ویسکومتر (بروکفیلد ساخت امریکا) با سرعت برشی ۲۰ rpm و اسپیندل ۶۱ اندازه‌گیری شد. نمونه‌های دوغ قبل از اندازه‌گیری به مدت ۱ دقیقه هم زده شدند. اندازه‌گیری‌ها با ۲۵۰ میلی‌لیتر نمونه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

۲-۴-۴- اندازه گیری میزان پایداری

مقدار ۵۰ میلی لیتر دوغ درون استوانه‌های مدرج ۵۰ میلی لیتری استریل ریخته شد و با ورق آلومینیوم درب بندی گردید. در روزهای آزمون میزان پایداری آن بر حسب درصد با استفاده از رابطه زیر تعیین شد (۲).

$$\text{٪ پایداری دوغ} = \frac{\text{حجم سرم- حجم اولیه دوغ}}{\text{حجم اولیه دوغ}} \times 100$$

1- Reconstituted Clostriadial Agar (RCA)

۲-٤-۵- ارزیابی حسی

در طی دوره نگهداری طعم، رنگ و بافت نمونه‌های دوغ توسط گروه ارزیاب حسی با استفاده از آزمایش تمایل مصرف کننده و روش هدونیک ۵ نقطه‌ای تعیین شد. تعداد ۱۵ داور از اعضای هیت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی با استفاده از آزمایش تشخیص درجه یا سطح کیفیت انتخاب شدند تا نمونه‌ها را از لحاظ فاکتورهای کیفی که با حواس قابل درک هستند مثل طعم رنگ و بافت مورد بررسی قرار دهند. از هر تیمار تعداد ۱۵ نمونه یکسان تهیه و همراه با فرم مخصوصی که دارای مقیاس هدونیک ۵ نقطه‌ای بود به داوران داده شد تا با توجه به ذائقه خود فرم‌ها را تکمیل کنند. برای این منظور امتیاز ۵ برای کیفیت مطلوب و امتیاز یک برای کیفیت نامطلوب اختصاص داده شد. داوران برای شستشوی دهان خود بین نمونه‌ها از آب استفاده کردند. فرم‌های تکمیل شده شامل ارزیابی کلی مصرف کننده بصورت یک ارزش عددی درآورده شد و تجزیه واریانس گردید (۴۲).

۲-٤-٦-روش طرح آماری

نتایج با استفاده از نرم افزار Minitab تجزیه و تحلیل شد. میانگین-ها با آزمون LSD توسط نرم افزار MSTAT-C در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه گردید.

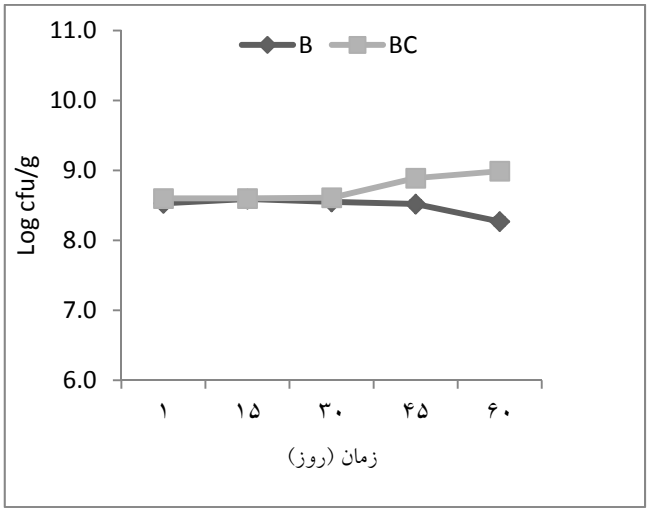
۳-نتایج و بحث

در جدول ۱ ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های دوغ آورده شده است. طبق استاندارد ملی ایران مواد جامد بدون چربی شیری دوغ نباید کمتر از ۳/۲ درصد (وزنی/وزنی، بر پایه مرطوب) و مقدار چربی آن نباید بیشتر از ۵۰ درصد کل ماده خشک بدون چربی شیری، بدون احتساب نمک باشد. مقدار نمک آن نیز باید بین ۲-۱ درصد (وزنی/وزنی، بر پایه مرطوب) باشد (۴). ویژگی‌های نمونه‌های دوغ تولیدی در این بررسی (جدول ۱) نیز با استاندارد مطابقت دارد.

۳-۱- بقای باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*

تعداد *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در دوغ در طول ۶۰ روز نگهداری تغییرات معنی‌داری نشان داد ($P<$ ۰/۰۵). با توجه به شکل ۱ در طول زمان نگهداری تعداد باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* آزاد تا روز ۴۵ ثابت و سپس در حدود ۰/۳ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. در حالی که تعداد باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* کپسوله تا روز ۳۰ ثابت بوده و سپس تا انتهای دوره نگهداری حدود ۰/۴ سیکل لگاریتمی افزایش نشان داد. لذا کپسوله کردن موجب بهبود بقاء *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در دوغ شده است.

دلیل ثبات پروبیوتیک‌ها در دوغ را می‌توان چنین توجیه کرد که استارترهای ماست می‌توانند رشد پروبیوتیک‌ها را از طریق تولید سوبستراهای مطلوب رشد پروبیوتیک‌ها و یا از طریق کاهش فشار اکسیژن تقویت نماید. *بیفیدوباکتریوم‌ها* به اکسیژن بسیار حساس هستند اما با انتخاب سویه‌های مناسب *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، می‌توان بقاء آنها را بهبود بخشید. *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* نیز به واسطه فعالیت پروتئولیتیکی خود و از طریق افزایش قابلیت دسترسی به والین، گلیسین و هیستیدین به رشد و فعالیت پروبیوتیک‌ها کمک می‌کند (۲۰). *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به عنوان مصرف کننده اکسیژن جهت فراهم کردن محیط بی‌هوازی برای *بیفیدوباکتریوم‌ها* مفید است. بر اساس نتایج کک تاش و گوزل سیدیم در سال ۲۰۱۰ نیز باکتری-های پروبیوتیک در دوغ بقای خود را به خوبی حفظ نمودند. آنها دلیل این امر را وجود مواد مغذی و میزان بالای آب موجود در دوغ دانستند که محیط را برای پروبیوتیک‌ها مناسب می‌سازد (۲۷).



شکل ۱- تغییرات تعداد *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در دوغ در طول ۶۰ روز نگهداری.

B (دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت آزاد) و BC (دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت کپسوله)

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های دوغ

دوغ	رطوبت(٪)	خاکستر (٪)	نمک(٪)	پروتئین(٪)	چربی (٪) [۱]	چگالی	MSNF [۲]
C	۹۳/۹۲±۰/۰۵	۱/۱۴±۰/۰۷	۰/۸۸±۰/۰۲	۱/۸۷±۰/۰۸	۴۴/۴±۰/۰۰	۱/۰۲±۰/۰۰۱	۴/۴۸
B	۹۳/۶۷±۰/۰۴	۱/۰۶±۰/۰۶	۰/۹۱±۰/۰۳	۱/۸۳±۰/۰۸	۴۱/۸±۰/۰۰	۱/۰۲۲±۰/۰۰۲	۴/۷۳
BC	۹۳/۷۸±۰/۰۵	۱/۰۷±۰/۰۶	۰/۹۵±۰/۱۱	۱/۸۷±۰/۰۸	۴۳/۵±۰/۰۰	۱/۰۲۱±۰/۰۰	۴/۶۲

[۱] چربی در ماده خشک بدون چربی شیر و بدون احتساب نمک، [۲] مواد جامد بدون چربی

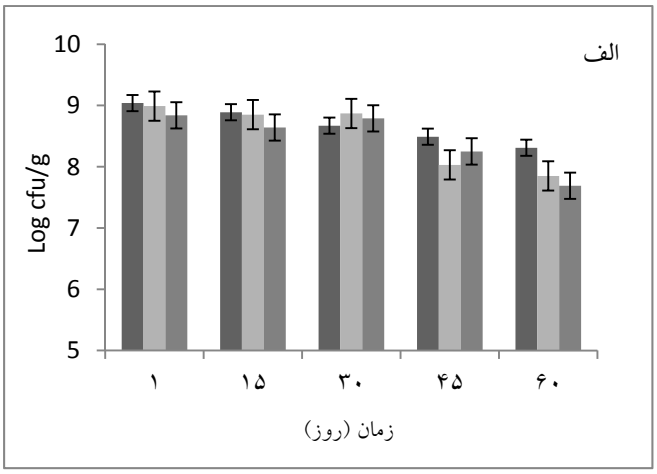
C (دوغ کنترل)، B (دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت آزاد) و BC (دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت کپسوله)

۳-۲-بقای میکروارگانیسم‌های استارتر

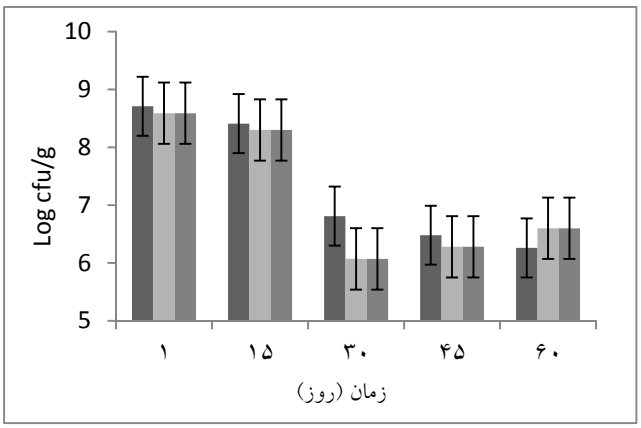
همان طور که از شکل ۲ (ب) مشخص است لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در تمام نمونه‌ها در طول زمان نگهداری کاهش یافت که این کاهش در نمونه کنترل ۲/۴ سیکل لگاریتمی (بیشترین کاهش) و در نمونه‌های حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس به صورت آزاد و کپسوله شده حدود ۲ سیکل لگاریتمی بود. دلیل کاهش بیشتر لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در نمونه کنترل شاید نیازمندی این باکتری به اسیدآمینه‌های آزاد و پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین باشد و کاهش کمتر آن در نمونه‌های پروبیوتیک شاید بدلیل اثر همزیستی باکتری‌های پروبیوتیک با این باکتری باشد که از طریق افزایش قابلیت دسترسی مواد مغذی به رشد و فعالیت یک دیگر کمک می‌نمایند.

استرپتوکوکوس *ترموفیلوس نیز* در تمام نمونه‌ها کاهش داشت (شکل ۲ الف)، بطوریکه این کاهش در نمونه‌های حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت آزاد و کپسوله شده در حدود ۱ سیکل لگاریتمی (بیشترین مقدار) و در نمونه‌های کنترل حدود ۰/۶ سیکل لگاریتمی بود. شاید متابولیت های تولیدی توسط بیفدوباکتریوم لاکتیس روی *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* تأثیر نامطلوبی دارد. واندرولا و همکاراندر سال ۲۰۰۲ نیز گزارش کردند که متابولیت‌های تولیدی توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، ممکن است روی استارترهای ماست تأثیر نامطلوبی داشته باشد (۴۰).

هم چنین در تیمارهای مختلف دوغ کاهش تعداد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* کمتر از *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* بود که با نتایج کوک تاش و گوزل سیدیم در سال ۲۰۱۰ مطابقت دارد. آنها نیز بقای بیشتر *استرپتوکوکوس‌ها* نسبت به *لاکتوباسیل‌ها* را در نمونه‌های دوغ تولیدی گزارش کردند (۲۷).



ب

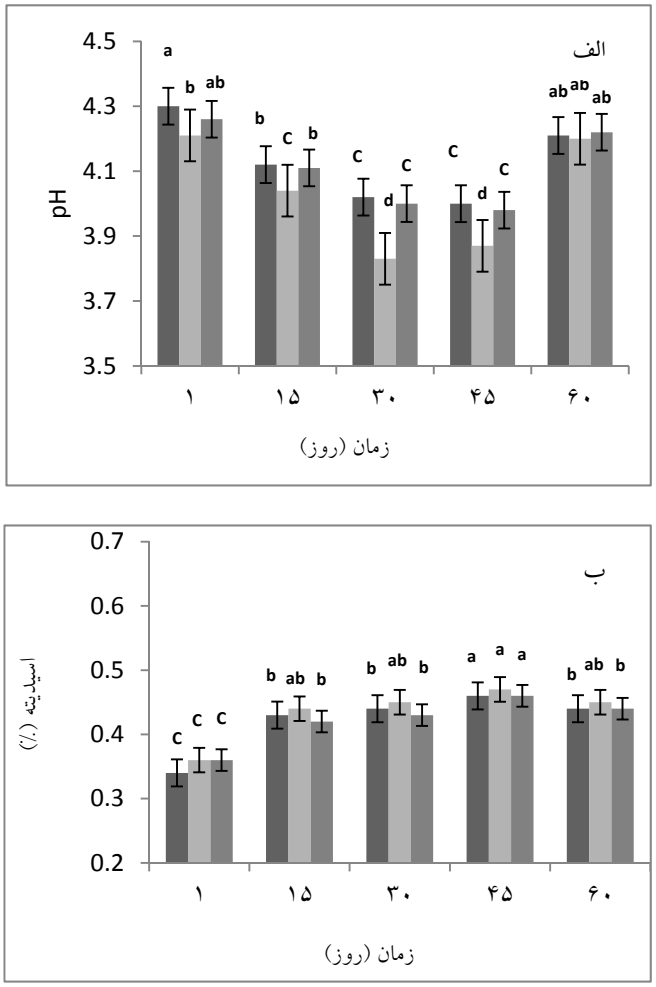


شکل ۲- تغییرات تعداد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (الف) و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* (ب) در نمونه‌های دوغ پروبیوتیک در طول ۶۰ روز نگهداری.

(به ترتیب از چپ به راست : دوغ کنترل، دوغ حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس به صورت آزاد و دوغ حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس به صورت کپسوله)

۳-۳- تغییرات pH و اسیدیته

تاثیر متقابل زمان نگهداری و نوع تیمار بر میزان pH و اسیدیته معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). همانطوریکه از شکل ۳ مشاهده می‌شود در دوغ مقدار pH نمونه‌ها تا روز ۴۵ کاهش (حدود ۸/۵ درصد) و اسیدیته افزایش (حدود ۴۵ درصد) یافت. اما از روز ۴۵ به بعد pH افزایش و اسیدیته کاهش نشان داد. در طی نگهداری میکروارگانیسم‌های موجود در ماست با تخمیر لاکتوز، اسید لاکتیک تولید می‌کنند و اسیدیته را افزایش و pH را کاهش می‌دهند (۲۴ و ۳۷). اما با پایان رسیدن منابع قندی، میکروارگانیسم‌ها پروتئین‌های موجود در محیط و نیز اسیدهای آلی را مصرف کرده و این باعث افزایش pH و کاهش اسیدیته محصول می‌گردد (۲۴).



شکل۳- تغییرات pH (الف) و درصد اسیدیته (ب) دوغ در طول ۶۰ روز نگهداری

(به ترتیب از چپ به راست : دوغ کنترل، دوغ حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس به صورت آزاد و دوغ حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس به صورت کپسوله)

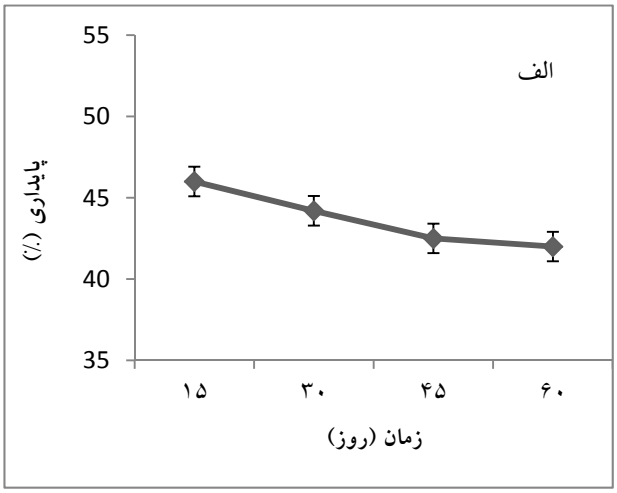
بر اساس نتایج بدست آمده باکتری‌های آزاد در طول نگهداری بطور معنی‌داری موجب کاهش pH و افزایش اسیدیته نسبت به حالت کپسوله شده‌اند. بدلیل قرار گرفتن پروبیوتیک‌ها در داخل کپسول فعالیت اسیدی کمتری داشته و در نتیجه pH دوغ-های حاوی پروبیوتیک کپسوله استفاده شده، بالاتر از فرم آزاد بود. هم‌چنین نمونه‌های حاوی پروبیوتیک به صورت آزاد دارای اسیدیته بیشتر و pH کمتر از نمونه کنترل بود. زیرا بیفیدوباکتریوم‌ها توسط آنزیم فروکتو ۶-فسفات می‌توانند از لاکتوز اسید استیک و اسید لاکتیک تولید کنند (۴۲). وثوق و همکاران نیز نشان دادند، تولید اسید توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در نمونه‌های دوغ حاوی عرق نعناع در طول نگهداری در یخچال بیشتر از دوغ معمولی می‌باشد (۶) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

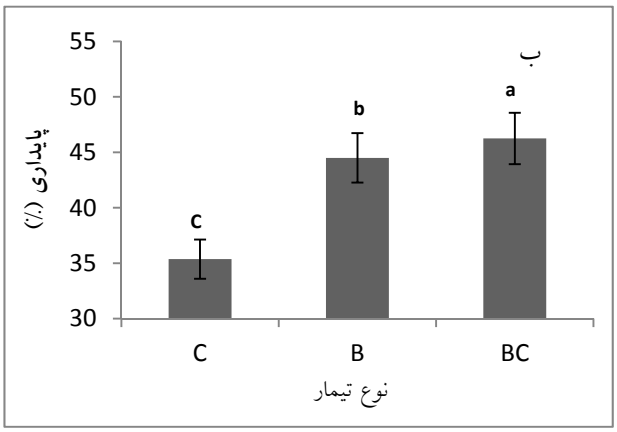
۳-٤- میزان پایداری

یکی از عمده ترین مشکلات دوغ، دو فاز شدن آن طی نگهداری است که این مسئله از گرانروی پایین، pH پایین و تاثیر آنها بر رسوب کردن پروتئین‌ها ناشی می‌شود. نتایج این بررسی نشان داد که میزان پایداری دوغ در طول زمان نگهداری به مدت ۶۰ روز بطور معنی‌داری کاهش داشت ($P<۰/۰۵$) (شکل۴ الف). در این فرآورده به دلیل pH پایین، پروتئین‌ها به نقطه ایزوالکتریک خود نزدیک می‌شوند و در نتیجه شروع به تجمع و رسوب می‌کنند که این امر سبب ناپایداری و ایجاد حالت دو فازی، بعد از تولید و در حین نگهداری می‌شود (حدود ۵۰-۴۰ درصد جداسازی فازی طی یک ماه). در شرایط عادی، آب انداختن دوغ، ارزش غذایی آن را کم نمی‌کند ولی ظاهر طبیعی آن را نامطلوب می‌سازد (۱ و ۹).

با توجه به شکل ۴(ب)، بین تیمارهای مختلف دوغ از نظر میزان پایداری اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) وجود داشت. بطوریکه میزان پایداری BC (بیشترین مقدار) و تیمار کنترل (کمترین مقدار) بود. بر اساس نتایج حاصله؛ *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* پایداری دوغ را بطور معنی‌داری افزایش داد که این افزایش در تیمار حاوی پروبیوتیک کپسوله شده نسبت به حالت آزاد نیز بطور معنی‌داری بیشتر بود. ممکن است یونهای سدیم در ژل آلژینات با یون کلسیم، جایگزین و این پدیده می تواند موجب افزایش ثبات

لخته ماست گردد. یک رابطه میان pH ، مقدار پروتئین شیر و تعامل با آلژینات سدیم گزارش شده است (۲۵).



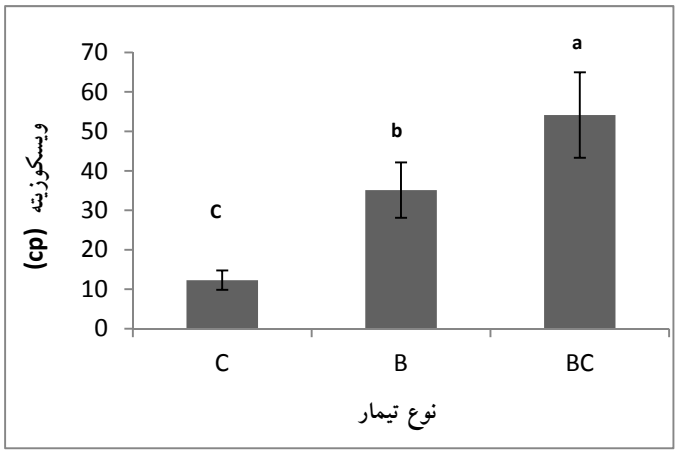


شکل ٤-تغییرات پایداری دوغ‌های تولیدی در طول نگهداری (الف) و تاثیر نوع تیمار بر میزان پایداری دوغ (ب).

C (دوغ کنترل)، B (دوغ حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس به صورت آزاد) و BC (دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت کپسوله)

۳-۵- تغییرات ویسکوزیته

از فاکتورهای بسیار مهم و تاثیر گذار بر کیفیت محصول، ویسکوزیته می‌باشد که وابسته به عواملی از جمله ترکیبات شیر (نسبت کازئین به پروتئین سرمی)، دمای انکوباسیون، نوع استارتر مورد استفاده و توانایی در تولید اگزوپلی‌ساکارید می‌باشد (۴۱). نتایج حاصل از این بررسی حاکی از افزایش معنی‌دار میزان ویسکوزیته در طول زمان است ($P<0/05$). بطوریکه در طول نگهداری مقدار ویسکوزیته از cP ۲۳ در روز ۳۰ به cP ۳۸ در روز ۶۰ رسید.



شکل۵- تأثیر نوع تیمار بر میزان ویسکوزیته نمونه‌های دوغ

C (دوغ کنترل)، B (دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت آزاد) و BC (دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت کپسوله)

دلیل آن را می‌توان به بازآرایی پروتئین‌ها و اتصالات پروتئین-پروتئین در طی زمان نسبت داد (۳۵) که نتایج ما را تایید می‌کنند.

در شکل ۵ تأثیر نوع تیمار بر میزان ویسکوزیته نمونه‌های دوغ آورده شده است. همان طوریکه از شکل ۵ مشخص است استفاده از *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* موجب افزایش معنی‌دار ویسکوزیته نسبت به نمونه کنترل گردید. فرم کپسوله آن نیز بطور معنی‌داری موجب افزایش ویسکوزیته نسبت به فرم آزاد آن شد ($P<0/05$). افزایش ویسکوزیته را می‌توان به تولید اگزوپلی‌ساکاریدها توسط پروبیوتیک‌ها نسبت داد. انتظار می‌رود که تشکیل اگزوپلی-ساکاریدها توسط پروبیوتیک به پیشگیری از سینرزیس، افزایش ویسکوزیته و احساس دهانی بهتر کمک کند. کایلاساپاتی در سال ۲۰۰۶ نشان داد که ماست با کشت پروبیوتیک در مقایسه با بدون کشت پروبیوتیک اگزوپلی ساکاریدهای بیشتری داشت (۲۵). گریفین و همکارانز سال ۱۹۹۶ نیز گزارش کردند که تولید پلی ساکارید توسط باکتری‌های ماست بر ویسکوزیته و بافت ماست مهم می‌باشد. تورم کپسول‌ها نیز به افزایش ویسکوزیته کمک می-کند (۲۱). ترکیب پلی مرهای مورد استفاده در کپسوله کننده باکتری‌ها نه تنها موجب افزایش قابلیت زیستی باکتری‌ها می‌شود بلکه ممکن است موجب بهبود خصوصیات ویسکوزیته ماست نیز گردد (۲۳). اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی به عنوان استابلیزر، تثبیت کننده، امولسیفایر و ژل کننده به صورت افزودنی‌های غذایی در حد وسیعی در غذاهای مختلف بکار گرفته می‌شوند. این

ترکیب برای بهبود پیکره، بافت و ویسکوزیته محصولات تخمیری استفاده می‌شود (۱۶).

۳-٦- خواص حسی

خواص حسی از عوامل اساسی پذیرش بسیار ی از فراورده‌ها و کسب رضایت از مصرف آنها است. با توجه به اهمیت این خواص، بررسی و شناخت عوامل موثر بر آنها به منظور دستیابی به خواص حسی بهینه و جلوگیری از ایجاد خواص حسی نامطلوب ضروری است.

در جدول ۲ تاثیر نوع تیمارها بر خواص حسی نمونه‌های دوغ آورده شده است. با توجه به نتایج ارزیابی خواص حسی دوغ، امتیاز عطر و طعم در انتهای زمان نگهداری (پس از ۶۰ روز) بطور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). رابطه مستقیمی بین فعالیت مخمرها، ترش شدن و بد طعم شدن دوغ وجود دارد که احتمالاً با گذشت زمان، در نتیجه فعالیت اندک مخمرها، متابولیت‌های جدیدی در دوغ حاصل می‌شود که منجربه ترش شدن، بد طعم شدن، تند مزه شدن و تلخ شدن دوغ می‌شود (۲۴). هم‌چنین نوع تیمار تاثیر معنی‌داری بر عطر و طعم دوغ داشت ($P<۰/۰۵$). جدول ۲ تاثیر نوع تیمارها را بر خواص حسی نمونه‌های دوغ نشان می‌دهد. با توجه به جدول ۳، تیمار حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به صورت آزاد بطور معنی‌داری بیشترین امتیاز طعم را کسب کرد. علت آن ممکن است در اثر فعالیت اسیدی بیفیدوباکتریوم لاکتیس باشد. زیرا در دوغ ترش بودن یکی از فاکتورهای اساسی در پذیرش آن می‌باشد. این نتایج با نتایج کوک تاش و گوزل-سیدیم در سال ۲۰۱۰ مطابقت دارد (۲۷). آنها خاطر نشان کردند که در دوغ کنترل مقدار استالدئید و استوئین و در حالی که در دوغ‌های پروبیوتیک غلظت دی استیل و استون نیز به مقدار قابل توجهی بالا بود. اسید لاکتیک و کربونیل در ترکیب با استالدئید در طعم نهایی دوغ مؤثر است. بر اساس نتایج آنها نیز بین دوغ کنترل با دوغ‌های پروبیوتیک از نظر طعم، عطر و مواد تشکیل دهنده تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

هم‌چنین بر اساس نتایج، بین تیمارهای کنترل و تیمار حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس به صورت کپسوله از نظر طعم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. دلیل آن قرار داشتن پروبیوتیک‌ها در داخل کپسول می‌باشد که فعالیت اسیدی کمتری داشته و در نتیجه امتیاز طعم دوغ‌هایی که از پروبیوتیک کپسوله استفاده شده بطور معنی داری کمتر از فرم آزاد بود.

جدول ۲- امتیاز خواص حسی دوغ‌های تولیدی

دوغ	رنگ	طعم
C	۴/۲۹±۰/۱۵[a]	۳/۸۷±۰/۲[C]
B	۴/۲۹±۰/۲۱ [a]	۴/۲±۰/۱۵[b]
BC	۴/۳۳±۰/۱۸ [a]	۳/۷۹±۰/۲۴[c]

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف مشترک در یک سطح آماری قرار دارند (آزمون LSD در سطح احتمال ۰/۰۵)

C (دوغ کنترل)، B (دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* آزاد) و BC (دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* کپسوله)

٤- نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که کپسوله کردن پروبیوتیک‌ها منجر به افزایش قابلیت زیستی این باکتری‌ها در مقایسه با فرم آزاد آنها در دوغ گردید. هم چنین تعداد نهایی باکتری‌های پروبیوتیک به هر دو صورت آزاد و کپسوله شده بعد از ۶۰ روز نگهداری در دمای ۱±۵ درجه سانتی‌گراد در نمونه‌های دوغ بیشتر از حداقل مقدار توصیه شده لازم برای ایجاد اثرات درمانی در سلامتی انسان ($۱۰^{۷}$-$۱۰^{۶}$واحد کلنی در گرم) بود. در طول نگهداری مقدار ویسکوزیته افزایش، pH و درصد اسیدیته به ترتیب ابتدا کاهش و افزایش و سپس افزایش و کاهش نشان داد. بین مقدار pH، درصد اسیدیته، پایداری و ویسکوزیته نمونه‌های مختلف دوغ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. پروبیوتیک‌هایی که به صورت آزاد استفاده شده بودند بطور معنی داری موجب کاهش pH و افزایش اسیدیته نسبت به فرم کپسوله شدند. پایداری در تیمارهای حاوی پروبیوتیک بیشتر بود و در بین آنها نیز کپسوله‌ها پایداری بیشتری داشتند. افزودن پروبیوتیک‌ها هم چنین منجر به افزایش ویسکوزیته دوغ شد. بر اساس نتایج ارزیابی حسی هیچ اختلافی از نقطه نظر رنگ بین تیمارها مشاهده نشد. اما از نظر طعم نمونه‌های دوغ حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بالاترین امتیاز طعم را کسب کردند ($P<۰/۰۵$). بر اساس نتایج این بررسی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* نه تنها تأثیر نامطلوب بر خواص فیزیکوشیمیایی و حسی نداشت بلکه موجب بهبود ویسکوریته، پایداری و طعم دوغ گردید. لذا دوغ می‌تواند حامل خوبی برای *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* باشد. در بازارهایی که رقابت زیادی میان کالاهای در حال فروش شرکت-

های گوناگون وجود دارد، تولید این دوغ پروبیوتیک با خواص کیفی مطلوب نوعی فرصت مناسب به شمار می‌رود.

۵- سپاس گزاری

نگارندگان مقاله از همکاری آزمایشگاه صنایع غذایی بخش فنی و مهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی به دلیل قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

٦- منابع

۱. آذری‌کیا، ف.، عباسی، س. و عزیزی، م. ۱۳۸۸. بررسی کارائی و سازوکار برخی ترکیبات هیدروکلوئیدی در جلوگیری از دو فاز شده دوغ. *مجله علوم و صنایع غذائی ایران* ، جلد ۴، شماره۱، ۲۲-۱۱.

۲. امیری عقدایی، س. س. و اعلمی، م. ۱۳۹۰. تأثیر موسیلاژ دانه ریحان بر ویژگی‌های رئولوژیکی و پایداری دوغ. *مجله علمی پژوهشی علوم و فناوری غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار*.جلد ۳، شماره ۳، ۲۴-۱۷.

۳. طاهری، پ.، احسانی، م. ر. و خسروی دارانی، ک. ۱۳۸۸. تأثیر باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*La-5 بر ویژگی های میکروبیولوژیک، خواص حسی و پایداری بافتی دوغ پروبیوتیک طی نگهداری یخچالی. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*. جلد ۴، شماره۳، ۱۵-۲۴.

۴. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۷۱. دوغ پروبیوتیک، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. استاندارد ملی ایران، شماره ۱۱۳۲۴، چاپ اول.

۵. وثوق، ا. ص.، خمیری، م.، کاشانی نژاد، م. و جعفری، س. م. ۱۳۸۸. اثر عرق نعناع بر قابلیت بقای باکتری‌های پروبیوتیک در نوشیدنی سنتی ایرانی (دوغ). *مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی*. *۱۶*.

6. Adhikari, K., Mustapha, A., Gruen, I. U. and Fernando, L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 83: 1946-1951.

7. Allgeyer, L. C., Miller, M. J. and Lee, S.Y. 2010. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *Journal of Dairy Science,* 93: 4471-4479.

8. Anal, A. K. and Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 240-251.

9. Aysel, k. and Meral, k. 2004. Use of hydrocolloids in textural stabilization of yoghurt drink, ayran. *Food Hydrocolloids*, 18:593-600

10. Blanchette, L., Roy, D., Belanger, G. and Gauthier, S. F. 1996. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria*. Journal of Dairy Science*, 79: 8-15.

11. Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B. and Reinheimer, J. A. 2004. Incorporation of *bifidobacterium* into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14: 375-387.

12. Champagne, C. P. and Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology,* 18:184-190.

13. Dave, R. I. and Shah, N. P. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal,* 7: 31-41.

14. De Vuyst, L. 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 38:105-112.

15. Drago, L., Gismondo, M. R., Lombardi, A., De Haen, C. and Gozzini, L. 1997. Inhibition of `in vitro`growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* strains of human intestinal origin. *FEMS Microbiol Lett*, 153:455-63

16. Faber, E. J. 2000. *Investigation of the structure of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria*. Veenenal Universal Press (p. 160).

17. Fonden, R., Mogensan, G., Tanaka, R. and Salminen, S. 2000. Effect of culture containing dairy products on intestinal micro flora, human nutrition and health-current knowledge and future perspectives. *IDF Bull,* 352:4-30.

18. Fuller, R. and Gibson, G. R. 1997. Modification of intestinal microflora using probiotics and prebiotics.*Scand. J. Gastroenterol,* 222:28-31.

19. Gibson, G. R. and Wang, X. 1994. Bifidogenic properties of different types of fructooligosacharides. *Food microbial,* 11:491-498.

20. Gomes, M. P., Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus aciduphilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics*. Trends in Food Science & Technology*, 10:139-157.

21. Griffin, A. M., Morris, V. J. and Gasson, M. J. 1996. The cps ABCDE genes involved in polysaccharide production in *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* strain NCBF 2393. *Gene.* 83:23–27.

22. Guarner, F. and Schaasfsma, G. J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology,* 39:237-238.
23. Hassan, A. N., Frank, J. F., Schmidt, K. A. and Shalabi, S. I. 1996. Textural properties of yoghurt made with encapsulated non-ropy lactic cultures. *Journal of Dairy Science,* 79, 2098–2103.
24. Jai, J. M. 1990. *Modern Food Microbiology*. Chapman and Hall.
25. Kailasapathy, k. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT*, 39:1221–1227.
26. Kiani, H., Mousavi, S. M. A. and Emam-Djomeh, Z. 2008. Rheological Properties of Iranian Yoghurt drink, Doogh. *International Journal of Dairy Science,* 3:71-78.
27. Kök Taş, T. and Güzel-Seydim, Z. 2010. Çeşitli Yağ İkame Maddeleri Ve Probiyotik Kullaniminin Ayran Kalite Kriterleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. *GIDA,* 35:105-111.
28. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. Evalution of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal,* 13:3-13.
29. Krasaekoopts, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal,* 14:737-743.
30. Kurman, J. A. and Rasic, R. L. 1991. *The health potential of products containing bifidobacteria. In: Therapeutic properties of fermented milks*. (Editors: R. K. Robinson) London, Elsevier Applied Food Science Series, pp. 117-158.
31. Mishra, V. and Prasad, D. N. 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology,* 103:109-115.
32. Ouwehand, A. C., Salvadori, B., Fonden, R., Mogensen, G., Salminen, S. and Sellars, R. 2003. Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans. *Bulletin of the International Dairy Federation,* 380:4-19.
33. Ozer, B., Avni Kirmaci, H., Shenel, E., Atamer, M. and Hayaloglu, A. 2009. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum BB-12* and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, 19:22–29.
34. Ravula, R. R. and Shah, N. P. 1998. Viability of probiotic bacteria in fermented dairy deserts. *Food Australia*, 50:136-139.
35. Roinson, R. 2002. *Dairy Microbiology Handbook*. Third Edition. John Wiley and Sons, Inc., New York.
36. Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K. and Stanton, C. 2002. Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57: 71-78.
37. Shah, N. P., Lankaputhra, W. E. V., Britz, M. and Kyle, W. S. A. 1995. Survival of Lactobacillus *acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5:515–521.
38. Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T. and Mierau, I. 1999. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of Dairy Science,* 82:2530-2535.
39. Tharmaraj, N. and Shah, N.P. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacteria*. *Journal of Dairy Science,* 86:2288–2296.
40. Vinderola, C. G., Mocchiutti, P. and Reinheimer, J. A. 2002. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*; 85: 721–729.
41. Wroblewska, B., Kolakowski, P. and Pawlikowska, K. 2009. Influence of the addition of transglutaminase on the immunoreactivity of milk proteins and sensory quality of kefir. *Food Hydrocolloids,* 23: 2434-2445.
42. Zomorodi, Sh., Khosrowshahi Asl, A., Razavi Rohani, S. M. and Somayieh Miraghaei, S. 2011. Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. *International Journal of Dairy Technology*, 64:84-91.