

## تولید نوشیدنی تخمیری بر پایه آب پنیر با استفاده از انواعی از میکروفلور کفیر و بررسی ویژگی‌های شیمیایی و ارگانولپتیک آن

فرزانه عبدالملکی<sup>۱</sup>، مهناز مظاهری اسدی<sup>۲</sup>، مهشید جهادی<sup>۱</sup>

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات  
۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران پست الکترونیکی: mxmazaheriassadi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۹

تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۲۴

### چکیده

**سابقه و هدف:** کفیر یکی از قدیمی‌ترین نوشیدنی‌هایی است که از تخمیر لاکتیک - الکی شیر به دست می‌آید و آب پنیر، حاوی مقادیر عظیمی ترکیبات ارزشمند است که در ایران در حال حاضر، نه تنها استفاده کاملی از آن به عمل نمی‌آید، بلکه محیط اطراف واحدهای تولیدی و به خصوص آب‌های سطحی و زیرزمینی را آلوده می‌کند. در این تحقیق، با استفاده از سویه‌های بومی کفیر در ایران از آب پنیر در تهیه نوشیدنی تخمیری استفاده شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق، از آب پنیر اسیدی برای تهیه نوشیدنی تخمیری استفاده شد به این ترتیب که از هر یک از سویه‌های خالص کفیر (باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌های اسید استیک و مخمرها) با نسبت‌های متفاوت، مایه کشت تهیه شد و از مایه کشت‌های مذکور در تولید نوشیدنی با کیفیت مطلوب استفاده شد. با ثابت نگه‌داشتن عوامل زمان و دمای تخمیر (۲۴ ساعت و ۲۵°C)، نوع سوستر (آب پنیر پاستوریزه)، میزان تلقیح (۳٪ تا ۵٪) و دور همزن (۹۰ rpm)، نمونه‌هایی با نسبت‌های متفاوت از مایه‌های میکروبی تولید شد که از نظر میزان پروتئین، چربی، قند، الکل، ریبوفلاوین، دی‌اکسیدکربن، اسیدیته، دانسیته، ماده خشک و خاکستر آنالیز شدند. نمونه‌های به دست آمده پس از افزودن سه اسانس نعنا، شوید و آویشن مورد ارزیابی حسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** در بررسی آزمایش‌های شیمیایی (اسیدیته و CO<sub>2</sub>)، نمونه‌های حاصل از تلقیح تک تک سویه‌ها، مجموعه لاکتوباسیلوس‌ها با هم، مجموعه کوکوس‌ها با هم، مجموعه مخمرها با هم، از میزان تلقیح ۳٪ استفاده شد و بعد از یافتن بهترین نسبت‌ها بین لاکتوباسیلوس‌ها با هم، کوکوس‌ها با هم و مخمرها با هم، در نمونه‌های حاصل از تلقیح مجموعه باکتری‌ها و مخمرها از میزان تلقیح ۳٪ و ۵٪ استفاده شد. در نهایت، از میان ۶۱ نمونه، ۸ نمونه از نظر آزمایش‌های ارگانولپتیک و اندازه‌گیری‌های شیمیایی مطلوب بودند.

**نتیجه‌گیری:** اسانس نعنا از نظر رنگ، طعم و بو بهترین اسانس بود و نمونه‌های حاصل از تلقیح باکتری‌های لاکتیک و استوباکتر به میزان ۳٪ و مخمرها به میزان ۲٪ از نظر کیفیت و پذیرش عمومی مطلوب شناخته شدند.

**واژگان کلیدی:** نوشیدنی بر پایه آب پنیر، میکروفلور کفیر، آب پنیر تخمیر شده

### • مقدمه

نام *آیران* (Ayran) تهیه می‌کردند. دانه‌های سفید رنگی که به صورت نامنظم در سطح داخلی کیسه‌ها قرار داشتند، عامل این فرمانتاسیون بودند. این شیر اسیدی و گاز دار و حاوی الکل بعدها کفیر نامیده شد. (۲۳)

سرزمین مادری این فراورده، پستی و بلندی‌های شمالی قفقازیه (Caucasian) تلقی می‌شود. از زمان‌های بسیار دور، مردمی که در این کوهستان‌ها زندگی

کفیر یکی از قدیمی‌ترین نوشیدنی‌هایی است که از تخمیر لاکتیک - الکی شیر به دست می‌آید (۲). این محصول، بسته به نوع مایه، نوع شیر و مدت تخمیر دارای ۰/۱ تا ۳/۵ درصد گاز کربنیک، ۰/۱ تا ۲ درصد الکل، ۰/۶ تا ۱/۱ درصد اسیدیته و کمتر از ۲/۷ درصد پروتئین شیری است. اهالی قفقاز شمالی از تخمیر شیر حیوانات در کیسه‌های پوستی (پوست حیوانات) نوعی نوشیدنی به

لاکتوز و غیر تخمیرکننده لاکتوز تقسیم می‌شوند و انواع باکتری‌های اسید استیک نیز وجود دارند. با تحقیقات *Rosi* و *Rossi* در سال ۱۹۷۸ میکروفلورهای کفیر شامل باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌های اسید استیک و مخمرها است باکتری‌های اسید لاکتیک شامل باسیل‌های مزوفیل (*Lactobacillus brevis*) و *Lactobacillus casei* استرپتوکوک‌های مزوفیل (*Leuconostoc mesenteroides*) و استرپتوکوک‌های ترموفیل است. باکتری‌های اسید استیک شامل *Acetobacter aceti* و مخمرها شامل *Saccharomyces cerevisiae* و *Saccharomyces fragilis* هستند (۲۳).

آب پنیر مایعی زرد مایل به سبز است که پس از انعقاد شیر به وسیله اسید یا آنزیم پروتئولیتیک (*Proteolytic enzyme*) در مرحله آب‌گیری از دلمه شیر جدا می‌شود و بسته به روش تولید و درصد ماده خشک پنیر ۶۰ تا ۹۰ درصد وزن شیر را تشکیل می‌دهد (۲۲) آب پنیر مواد آلی مفیدی دارد که در فرایند تولید پنیر، از شیر وارد آن می‌شود. به دلیل وجود این مواد، آب پنیر دارای *COD* (Chemical Oxygen Demand) بسیار بالا و حدود ۷۶۰۰۰ ppm و *BOD* (Biological Oxygen Demand) در حدود ۴۰۰۰۰ ppm است که به عنوان پساب بسیار آلوده در نظر گرفته می‌شود (۳۰، ۲۰).

از آب پنیر برای تولید انواع نوشیدنی‌های تخمیری و غیر تخمیری استفاده می‌شود. در تولید نوشیدنی در صورتی که مرحله تغلیظ آب پنیر حذف شود، تولید نوشیدنی از نظر اقتصادی، توجیه‌پذیر است؛ اما در تولید بعضی از نوشیدنی‌ها علاوه بر تغلیظ، فرایند دیگری نیز در تولید آنها پیشنهاد شده است که تولید آنها را از نظر اقتصادی غیر قابل قبول می‌کند (۲۸). بیشتر تحقیقات انجام شده در زمینه تولید نوشیدنی در کشورهای اروپایی و روسیه صورت گرفته است و مصرف نوشابه‌های تولید شده در این کشورها تا حدی رایج شده است. در سال‌های اخیر، تولید نوشیدنی از آب پنیر در سطح تجارتي در چند کشور اروپایی (آلمان، هلند، سوئیس) گسترش قابل ملاحظه‌ای یافته است (۱۵، ۱).

می‌کردند، ساختن نوشابه‌ای مفرح از شیر گاو و بز را بلد بودند. و آغازگری را که برای ساختن این نوشابه نشاط‌آور به کار برده می‌شد، دانه‌های کفیر نامیدند. (۲۳)

*Metchnikoff* در سال ۱۹۰۶ تأثیر کفیر را بر بیماری‌های مختلفی (اگزما، انسداد رگ‌ها و سرطان) بررسی کرد و نتایج خوبی به دست آورد. طبق گزارش *Davidov* و همکاران مصرف کفیر به علت حضور دی‌اکسید کربن و نمک‌های کلسیمی، ادرار را افزایش می‌دهد و دیگر فراورده‌های متابولیسم نیتروژن، کلریدها و فسفات‌ها نیز تا حد زیادی دفع می‌شود، طعم اسیدی کفیر و میکروفلورهای شاخص آن، ترشح بزاق آنزیم‌ها در معده و پانکراس را تسهیل می‌کند و حرکات دودی دستگاه گوارش را افزایش می‌دهد. کفیر در حرکت یکنواخت‌تر غذا در روده نقش دارد و حضور اسید لاکتیک و اسید استیک و مواد آنتی‌بیوتیکی از بروز عفونت در روده کوچک پیشگیری می‌کند (۲۳).

از اواخر قرن گذشته، میکروبیولوژی دانه‌های کفیر، توجه چندین محقق به نام‌های *Bijerink*، *Freudenreich* و *Oral-Jensen* را به خود جلب کرد. تاکنون، مشخص شده است که میکروارگانیزم‌های تشکیل دهنده دانه‌های کفیر از یک طرف، باکتری‌های لاکتیک و از طرف دیگر، مخمرها هستند. تحقیقات نشان داده است که دانه‌های کفیر، میکروفلورهای بسیار متغیری دارند. (۲۳)

*Foster* و همکاران دریافتند که *Streptococcus lactis* و *Lactobacillus bulgaricus* در اتحاد با مخمرها قادر به تخمیر لاکتوز هستند اما *Kaminski* در سال ۱۹۵۵ قبلاً این ترکیبات پیچیده را پیدا کرده بود *Streptococcus cremoris*، *Streptococcus lactis*، *Lactobacillus bulgaricus*، *Leuconostoc dextranicum*، *Saccharomyces cerevisiae* و *Saccharomyces fragilis* (۳، ۲۳).

اخیراً مشخص شده است که میکروفلورهای کفیر متشکل از گونه‌های لاکتیکی مزوفیل و ترموفیل و باسیلوس بیشتری نسبت به استرپتوکوکوس است. علاوه بر این، مخمرهایی که به دو گروه مخمرهای تخمیرکننده

شد (۲۱) و آزمون‌های شمارش کلی میکروب‌ها و کلیفرم‌ها صورت گرفت (۱۴).

تهیه و آماده سازی کشت‌های میکروبی: کلیه میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون بخش بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (PTCC Persian Type Culture Collection) تهیه شد. کلیه میکروارگانیسم‌های خالص دانه کفیر به صورت آمپول، حاوی محیط کشت حاوی شیر بدون چربی (skim milk) و گلیسرول در فریزر  $70^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. این میکروارگانیسم‌ها عبارت بودند از:

الف) باکتری‌های لاکتیک شامل: لاکتوباسیل‌های مزوفیل *L. brevis*, *L. kefir*, *L. plantarum*, *L. casei* استرپتوکوک *Str. lactis* لوکونوس *Leu. mesenteroides*

ب) باکتری‌های استیک *A. aceti*

ج) مخمرها شامل: *Sacc. lactis*, *Sacc. fragilis*, *Can. kefir*

بعد از تهیه کشت‌های تازه میکروبی، برای نگهداری کوتاه مدت جهت کشت مخمرها از محیط کشت Malt extract Agar و گرمخانه‌گذاری در  $26^{\circ}\text{C}$ ، برای لاکتوباسیلوس‌ها و استرپتوکوکوس‌ها از محیط کشت MRS Agar و گرمخانه‌گذاری در  $30^{\circ}\text{C}$ ، برای لوکونوس‌توک‌ها از محیط کشت Tomato juice Agar و گرمخانه‌گذاری در  $26^{\circ}\text{C}$  و برای استوباکتر از محیط کشت Manitol Agar و گرمخانه‌گذاری در  $26^{\circ}\text{C}$  استفاده شد (۵).

در این تحقیق سعی شده است که از آب پنیر، در تهیه نوشیدنی تخمیری با حداقل الکل (کمتر از ۰/۵ درصد) استفاده شود. نوشابه به دست آمده از آب پنیر علاوه بر شباهت مزه با انواع دوغ‌های گازدار موجود در کشور، به علت اینکه گاز  $\text{CO}_2$  موجود در آن تخمیری بوده و حاصل واکنش تخمیری میکروارگانیسم‌های موجود در نوشابه است، نیازی به تزریق  $\text{CO}_2$  ندارد و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است.

هدف این تحقیق، استفاده از آب پنیر برای تهیه نوشیدنی تخمیری با الکل کمتر از ۰/۵ درصد بود. بنابراین، از هر یک از سویه‌های باکتری‌های لاکتیک و استوباکتر و مخمرها به تنهایی و به صورت مخلوط‌های دو، سه، چهار، پنج تایی و بیشتر، با نسبت‌های متفاوت، مایه کشت تهیه شد. لازم به ذکر است که در نمونه‌های حاصل از تلقیح تک تک سویه‌ها، مجموعه لاکتوباسیلوس‌ها با هم، مجموعه کوکوس‌ها با هم و مجموعه مخمرها با هم، از تلقیح ۳٪ استفاده شد و بعد از یافتن بهترین نسبت‌ها بین لاکتوباسیلوس‌ها با هم، کوکوس‌ها با هم و مخمرها با هم، در نمونه‌های حاصل از تلقیح مجموعه باکتری‌ها و مخمرها از تلقیح ۳٪ و ۵٪ استفاده شد. نمونه‌هایی تولید شده از نظر میزان پروتئین، چربی، قند، ریوفلاوین، الکل، دی‌اکسیدکربن، اسیدیته، دانسیته، ماده خشک و خاکستر آنالیز شدند.

### • مواد و روش‌ها

در این تحقیق، برای تهیه نوشیدنی از آب پنیر با ترکیبات شیمیایی مطابق با جدول ۱ از کارخانه کالبر اراک، استفاده شد و سپس ترکیبات آب پنیر استاندارد

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی نمونه‌های آب پنیر

ترکیبات	pH	دانسیته	خاکستر (%)	ماده خشک (%)	لاکتوز (%)	پروتئین (%)	چربی (%)
محدوده	۴/۷-۴/۸	۱/۰۰۵-۱/۰۰۲	۰/۴۰-۰/۵۲	۵/۷-۶/۲	۴/۰۱-۴/۶۲	۰/۷۵-۰/۹۵	۰/۴۵-۰/۶۱

بعد از گذشت ۸ ساعت، مخمرها یا مخمرها و باکتری‌های استیک تلقیح می‌شدند. باکتری استوباکتر/ستی توانایی تخمیر قند لاکتوز را ندارد. بنابراین، زمانی می‌تواند در محیط‌های حاوی لاکتوز رشد کند که لاکتوز به وسیله باکتری‌های لاکتیک هیدرولیز شده باشد. در ضمن، تجمع اسید لاکتیک، شرایط مطلوب‌تری را برای رشد آنها ایجاد می‌کند. به همین دلیل، در مرحله دوم تخمیر به نوشیدنی‌های تخمیری اضافه شد (۵).

**روش انجام آزمون‌های شیمیایی:** اسیدیته نمونه‌های آب پنیر و نوشیدنی‌ها بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۹۷۵/۰۵، چربی نمونه‌ها بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۰۰۰/۱۸، پروتئین نمونه‌ها بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۹۷۵/۱۷ و ماده خشک نمونه‌ها بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۹۰/۱۹ AOAC اندازه‌گیری شد (۶).

خاکستر نمونه‌ها بر اساس روش سوزاندن در کوره الکتریکی (۲۹)، لاکتوز نمونه‌ها با روش لین - آینون (۲۹) و وزن مخصوص نمونه‌ها بر اساس استفاده از پیکنومتر (۲۹) اندازه‌گیری شد.

ریبوفلاوین نمونه‌ها با روش فتوفلوریمتری (۱۷) و CO<sub>2</sub> نمونه‌ها با استفاده از دستگاه CO<sub>2</sub> متر مدل Oxybaby M CO<sub>2</sub> ساخت شرکت Witt کشور انگلستان اندازه‌گیری شد (۱۲).

برای اندازه‌گیری میزان دقیق الکل نوشیدنی‌ها از دستگاه گاز کروماتوگراف مدل Shimadzu GC-15A ساخت شرکت Shimadzu ژاپن استفاده شد.

**انتخاب نمونه مطلوب با توجه به ذائقه و پذیرش عمومی افراد جامعه:** برای انتخاب نمونه مطلوب به توجه به ذائقه و پذیرش عمومی، نوشیدنی‌های تولیدی را پس از بسته‌بندی در بطری‌های تیره ۲۸۰ میلی‌لیتری و بعد از مدت زمان لازم جهت رسیدن، توسط ۶ داور مورد آزمون ارگانولپتیک قرار دادیم. ابتدا ۲۰ نفر انتخاب شدند و پس از بیان هدف آزمون حسی و تعریف ویژگی‌های مورد ارزیابی، نمونه‌های مورد نظر در چند نوبت و با غلظت‌های مختلف به آنها ارائه شد. در نهایت ۶ نفر که بیشترین دقت ارزیابی را داشتند، جهت داوری آزمون نهایی انتخاب شدند (۱۶).

**تولید نوشیدنی:** برای تولید نوشیدنی از آب پنیر پاستوریزه استفاده شد که قبل از افزودن مایه، دمای آب پنیر به حدود ۲۵-۲۲°C رسانده شد. در این روش از این غلظت‌های میکروبی استفاده شد:

مخمرها ۱۰<sup>۸</sup>-۱۰<sup>۷</sup> سلول در میلی‌لیتر، لاکتوباسیلوس‌ها ۱۰<sup>۸</sup>-۱۰<sup>۷</sup> سلول در میلی‌لیتر، استرپتوکوکوس‌ها ۱۰<sup>۸</sup> سلول در میلی‌لیتر، لاکونوستوک‌ها ۱۰<sup>۸</sup>-۱۰<sup>۷</sup> سلول در میلی‌لیتر و استوباکتر ۱۰<sup>۶</sup>-۱۰<sup>۵</sup> سلول در میلی‌لیتر (۲۹).

در این تحقیق با ثابت نگه داشتن عوامل زمان و دمای تخمیر (۲۴ ساعت و ۲۵°C)، نوع سوبسترا (آب پنیر پاستوریزه)، میزان تلقیح (۳٪ تا ۵٪) و دور همزن (۹۰ rpm) نمونه‌های تولید شده فقط با تغییر نسبت‌های مختلف کشت‌های مایه‌های میکروبی بررسی شد (۵). به این ترتیب که هر یک از سویه‌های میکروبی به تنهایی و به صورت مخلوط‌های دو، سه، چهار، پنج تایی و بیشتر، با نسبت‌های مختلف به آب پنیر تلقیح شدند. لازم به ذکر است که در نمونه‌های حاصل از تلقیح تک تک سویه‌ها، مجموعه لاکتوباسیلوس‌ها با هم، مجموعه کوکوس‌ها با هم و مجموعه مخمرها با هم، از تلقیح ۳٪ استفاده شد و بعد از یافتن بهترین نسبت‌ها بین لاکتوباسیلوس‌ها با هم، کوکوس‌ها با هم و مخمرها با هم، در نمونه‌های حاصل از تلقیح مجموعه باکتری‌ها و مخمرها از تلقیح ۳٪ و ۵٪ استفاده شد. لازم به ذکر است که تولید کلیه نمونه‌ها طی تکرارهای متوالی صورت پذیرفت (۵).

سپس ارلن‌های محتوی آب پنیر و مایه تلقیح شده در شیکر در دمای ۲۵°C و دور ۹۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، pH و خصوصیات ارگانولپتیک مورد بررسی قرار گرفت. سپس دمای نمونه‌ها به سرعت به دمای ۸-۶°C رسانده شد. به منظور یکنواخت شدن نمونه‌ها آنها را با صافی معمولی صاف کرده و در بطری‌های شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ به نسبت مساوی با آب مخلوط شدند. نمک و شکر هر کدام به میزان ۱٪ به آن افزوده و نهایتاً دربندی شدند. برای رسیدن محصول (agening) نمونه‌ها به مدت یک هفته در دمای اتاق گذاشته و در دمای ۵-۲°C نگهداری شدند. لازم به ذکر است که در نمونه‌های حاصل از تلقیح باکتری‌ها و مخمرها ابتدا باکتری‌های لاکتیک و سپس

و ترکیب میکروبی نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط چهارتایی سویه‌ها و مقادیر گاز کربنیک و اسیدیته آنها در جدول ۵ ملاحظه می‌شود.

با بررسی نتایج مربوط به نمونه‌های حاصل از تلقیح سویه‌های منفرد، مخلوط دوتایی سویه‌ها، مخلوط سه‌تایی سویه‌ها و مخلوط چهارتایی سویه‌ها، نسبت‌های مناسب میان ۴ لاکتوباسیلوس، ۲ کوکسی و ۳ مخمر مشخص شد.

در مرحله بعد، نمونه‌های حاصل از تلقیح باکتری‌های لاکتیک و مخمرها از نظر شیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند. درصد و ترکیب میکروبی این نمونه‌ها و همچنین مقادیر  $CO_2$  و اسیدیته آنها در جدول ۶ مشاهده می‌شود.

بررسی نمونه‌های حاصل از تلقیح باکتری‌های لاکتیک و مخمرها نشان داد که تلقیح ۳٪ جهت مطلوبیت نمونه‌ها از نظر اسیدیته و گاز کربنیک مناسب نیست. به همین دلیل از تلقیح ۵٪ (۳٪ باکتری‌ها و ۲٪ مخمرها) استفاده شد که نتایج آن در جدول ۷ گنجانده شده است.

بررسی آزمایش‌های شیمیایی نمونه‌های حاصل از تلقیح سویه‌های منفرد (اسیدیته و  $CO_2$ )، مخلوط دوتایی سویه‌ها، مخلوط سه‌تایی سویه‌ها، مخلوط چهارتایی سویه‌ها، مخلوط باکتری‌های لاکتیک و مخمرها با درصد تلقیح ۵٪ و ۳٪ نشان داد که از میان ۶۱ نمونه، ۸ نمونه از نظر آزمایش‌های ارگانولپتیک و اندازه‌گیری‌های شیمیایی مطلوب بودند. در این نمونه‌ها از تلقیح ۵٪ (۳٪ مخلوط باکتری‌ها و ۲٪ مخلوط مخمرها) استفاده شده که نسبت‌های میکروبی به کار رفته در جدول ۸ مشخص شده است.

بررسی نمونه‌های حاصل از تلقیح باکتری‌های لاکتیک و مخمرها نشان داد که تلقیح ۳٪ جهت مطلوبیت نمونه‌ها از نظر ارگانولپتیک و همچنین اسیدیته و گاز کربنیک مناسب نیست. به همین دلیل از میزان تلقیح ۵٪ (۳٪ باکتری‌ها و ۲٪ مخمرها) استفاده شد. در نهایت ۸ نمونه، به‌عنوان نمونه‌هایی نهایی در نظر گرفته شدند و مورد ارزشیابی حسی (Taste Panel) قرار گرفتند.

درجه مطلوبیت هریک از این ویژگی‌های کیفی را با اعداد ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ به ترتیب برای خیلی خوب، خوب، متوسط، بد و بسیار بد نشان دادیم و برای ارزیابی نتایج از روش رتبه‌ای استفاده کردیم.

**تجزیه و تحلیل آماری نتایج:** در این تحقیق برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از طرح فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی (Randomized complete Block Design) و طرح آماری کاملاً تصادفی (Compeletly Randomized Design) با استفاده از نرم افزار آماری SAS و SPSS استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (Duncan) صورت گرفت.

### • یافته‌ها

ابتدا نمونه‌های حاصل از تلقیح ۹ سویه میکروبی (باکتری‌های لاکتیک و مخمرها) به تفکیک مورد بررسی قرار گرفت. درصد، ترکیب میکروبی نمونه‌ها، مقادیر اسیدلاکتیک و گاز کربنیک این نمونه‌ها در جدول ۲ مشخص شده است.

سپس نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط دو سویه باکتری‌های لاکتیک و همچنین مخلوط دو سویه مخمرها با نسبت‌های مساوی ۱:۲ و ۲:۱ مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۳ مشخص شده است.

با توجه به نتایج آزمایش‌های نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط دوتایی سویه‌ها، یک سری از نمونه‌ها حذف شدند و نمونه‌های مطلوب برای مرحله بعد (مخلوط سه تایی سویه‌ها) انتخاب شدند. به عبارت دیگر نسبت‌های میکروبی به کار رفته در این مرحله با توجه به نتایج تلقیح مخلوط دوتایی سویه‌ها تعیین شد. در این مرحله باکتری‌های لاکتوباسیلوس هموفرماتاتیو با هم و همچنین مخلوط باکتری‌های لاکتوباسیلوس هتروفرماتاتیو در کنار یکدیگر مورد بررسی قرار گرفتند. درصد و ترکیب میکروبی نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط سه تایی سویه‌ها و همچنین مقادیر اسیدیته و گاز کربنیک آنها در جدول ۴ مشخص شده است.

با توجه به نتایج مربوط به نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط سه تایی سویه‌ها، نسبت‌های میکروبی مورد نظر جهت تلقیح مخلوط چهارتایی سویه‌ها تعیین شد. درصد

جدول ۲- نتایج اندازه گیری اسیدیته و CO<sub>2</sub> در نمونه‌های حاصل از تلقیح سویه‌های منفرد

شماره نمونه	درصد تلقیح	ترکیب میکروب	اسیدیته (% اسیدلاکتیک)	%CO <sub>2</sub>
۱	۳	<i>L. brevis</i>	۰/۶۶۳ <sup>bc</sup>	۲/۴۰۰ <sup>bc</sup>
۲	۳	<i>L. kefir</i>	۰/۶۶۳ <sup>bc</sup>	۲/۴۰۰ <sup>bc</sup>
۳	۳	<i>L. casei</i>	۰/۶۸۷ <sup>b</sup>	۲/۱۰۰ <sup>dc</sup>
۴	۳	<i>L. plantarum</i>	۰/۶۹۰ <sup>b</sup>	۲/۱۰۰ <sup>dc</sup>
۵	۳	<i>Str. lactis</i>	۰/۷۴۷ <sup>a</sup>	۱/۸۰۰ <sup>d</sup>
۶	۳	<i>Leu. mesenteroides</i>	۰/۶۴۷ <sup>c</sup>	۲/۵۶۷ <sup>b</sup>
۷	۳	<i>Can. kefir</i>	۰/۵۸۰ <sup>d</sup>	۳/۳۶۷ <sup>a</sup>
۸	۳	<i>Sacc. lactis</i>	۰/۶۰۰ <sup>d</sup>	۲/۶۷ <sup>a</sup>
۹	۳	<i>Sacc. fragilis</i>	۰/۶۰۳ <sup>d</sup>	۳/۳۰۰ <sup>a</sup>

جدول ۳- نتایج اندازه گیری اسیدیته و CO<sub>2</sub> در نمونه‌های حاصل از تلقیح دوتایی سویه‌ها

شماره نمونه	درصد تلقیح	ترکیب میکروبی	نسبت میکروبی	اسیدیته (% اسیدلاکتیک)	%CO <sub>2</sub>
۱	۳	<i>L. plantarum: L. casei</i>	۱:۱	۰/۷۳۰ <sup>d</sup>	۱/۹۰ <sup>kl</sup>
۲	۳	<i>L. plantarum: L. casei</i>	۲:۱	۰/۸۷۳ <sup>a</sup>	۱/۷۰ <sup>l</sup>
۳	۳	<i>L. plantarum: L. casei</i>	۱:۲	۰/۸۲۳ <sup>bc</sup>	۱/۷۰ <sup>l</sup>
۴	۳	<i>L. brevis: L. casei</i>	۱:۱	۰/۶۶۳ <sup>e</sup>	۲/۳۰ <sup>jhi</sup>
۵	۳	<i>L. brevis: L. casei</i>	۲:۱	۰/۶۶۳ <sup>e</sup>	۲/۹۰ <sup>ef</sup>
۶	۳	<i>L. brevis: L. casei</i>	۱:۲	۰/۶۹۳ <sup>e</sup>	۲/۷۰ <sup>fg</sup>
۷	۳	<i>L. kefir: L. casei</i>	۱:۱	۰/۶۶۷ <sup>e</sup>	۲/۷۰ <sup>fg</sup>
۸	۳	<i>L. kefir: L. casei</i>	۲:۱	۰/۶۶۰ <sup>e</sup>	۲/۷۰ <sup>fg</sup>
۹	۳	<i>L. kefir: L. casei</i>	۱:۲	۰/۶۸۷ <sup>e</sup>	۲/۸۸ <sup>ef</sup>
۱۰	۳	<i>L. brevis: L. plantarum</i>	۱:۱	۰/۷۳۰ <sup>d</sup>	۲/۱۰ <sup>igk</sup>
۱۱	۳	<i>L. brevis: L. plantarum</i>	۲:۱	۰/۸۰۰ <sup>c</sup>	۲/۲۳ <sup>hij</sup>
۱۲	۳	<i>L. brevis: L. plantarum</i>	۱:۲	۰/۸۷۰ <sup>a</sup>	۲/۰۰ <sup>jkl</sup>
۱۳	۳	<i>L. kefir: L. plantarum</i>	۱:۱	۰/۷۴۳ <sup>d</sup>	۲/۲۷ <sup>hij</sup>
۱۴	۳	<i>L. kefir: L. plantarum</i>	۲:۱	۰/۷۶۳ <sup>d</sup>	۲/۵۰ <sup>gh</sup>
۱۵	۳	<i>L. kefir: L. plantarum</i>	۱:۲	۰/۸۵۷ <sup>ab</sup>	۲/۳۰ <sup>hij</sup>
۱۶	۳	<i>L. kefir: L. brevis</i>	۱:۱	۰/۶۸۷ <sup>e</sup>	۲/۵۰ <sup>gh</sup>
۱۷	۳	<i>L. kefir: L. brevis</i>	۲:۱	۰/۶۹۰ <sup>e</sup>	۲/۳۳ <sup>hij</sup>
۱۸	۳	<i>L. kefir: L. brevis</i>	۱:۲	۰/۶۸۳ <sup>e</sup>	۲/۴۳ <sup>ghi</sup>
۱۹	۳	<i>Leu. mesenteroides: Str. Lactis</i>	۱:۱	۰/۶۹۰ <sup>e</sup>	۲/۲۰ <sup>jk</sup>
۲۰	۳	<i>Leu. mesenteroides: Str. Lactis</i>	۲:۱	۰/۶۸۰ <sup>e</sup>	۳/۱۳ <sup>cde</sup>
۲۱	۳	<i>Leu. mesenteroides: Str. Lactis</i>	۱:۲	۰/۷۴۳ <sup>d</sup>	۲/۲۰ <sup>hijk</sup>
۲۲	۳	<i>Sacc. lactis: Candida kefir</i>	۱:۱	۰/۶۰۰ <sup>fgh</sup>	۳/۴۷ <sup>ab</sup>
۲۳	۳	<i>Sacc. lactis: Candida kefir</i>	۲:۱	۰/۵۸۰ <sup>ghi</sup>	۳/۵۰ <sup>ab</sup>
۲۴	۳	<i>Sacc. lactis: Candida kefir</i>	۱:۲	۰/۵۶۳ <sup>hi</sup>	۳/۵۰ <sup>ab</sup>
۲۵	۳	<i>Sacc. fragilis: Candida kefir</i>	۱:۱	۰/۶۱۳ <sup>fg</sup>	۳/۲۷ <sup>bcd</sup>
۲۶	۳	<i>Sacc. fragilis: Candida kefir</i>	۲:۱	۰/۶۰۰ <sup>fgh</sup>	۳/۴۰ <sup>abc</sup>
۲۷	۳	<i>Sacc. fragilis: Candida kefir</i>	۱:۲	۰/۵۵۷ <sup>i</sup>	۳/۶۰ <sup>a</sup>
۲۸	۳	<i>Sacc. fragilis: Sacc. lactis</i>	۱:۱	۰/۶۲۳ <sup>f</sup>	۳/۱۰ <sup>cde</sup>
۲۹	۳	<i>Sacc. fragilis: Sacc. lactis</i>	۲:۱	۰/۶۲۰ <sup>f</sup>	۳/۰۳ <sup>de</sup>
۳۰	۳	<i>Sacc. fragilis: Sacc. lactis</i>	۱:۲	۰/۶۱۳ <sup>fg</sup>	۳/۳۰ <sup>abcd</sup>

جدول ۴- نتایج اندازه گیری اسیدیته و CO<sub>2</sub> در نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط سه تایی سویه ها

شماره نمونه	درصد تلقیح	ترکیب میکروبی	نسبت میکروبی	اسیدیته (% اسیدلاکتیک)	%CO <sub>2</sub>
۱	۳	<i>L.brevis</i> : ( <i>L.plantarum</i> + <i>L.casei</i> )	۱:۱	۰/۸۹۳ <sup>a</sup>	۲/۴۰۰ <sup>bc</sup>
۲	۳	<i>L.brevis</i> : ( <i>L.plantarum</i> + <i>L.casei</i> )	۲:۱	۰/۸۷۳ <sup>a</sup>	۲/۱۰۰ <sup>c</sup>
۳	۳	<i>L.kefir</i> : ( <i>L.plantarum</i> + <i>L.casei</i> )	۱:۱	۰/۷۳۰ <sup>d</sup>	۲/۱۰۰ <sup>c</sup>
۴	۳	<i>L.kefir</i> : ( <i>L.plantarum</i> + <i>L.casei</i> )	۲:۱	۰/۷۱۳ <sup>d</sup>	۲/۱۳۳ <sup>c</sup>
۵	۳	<i>L.casei</i> : ( <i>L.kefir</i> + <i>L.brevis</i> )	۱:۱	۰/۸۷ <sup>ab</sup>	۲/۲۰۰ <sup>c</sup>
۶	۳	<i>L.casei</i> : ( <i>L.kefir</i> + <i>L.brevis</i> )	۱:۲	۰/۸۵۷ <sup>ab</sup>	۲/۱۳۳ <sup>c</sup>
۷	۳	<i>L.plantarum</i> : ( <i>L.kefir</i> + <i>L.brevis</i> )	۱:۱	۰/۸۳۳ <sup>b</sup>	۲/۶۰۰ <sup>b</sup>
۸	۳	<i>L.plantarum</i> : ( <i>L.kefir</i> + <i>L.brevis</i> )	۱:۲	۰/۷۸۳ <sup>c</sup>	۲/۷۰۰ <sup>b</sup>
۹	۳	<i>Candida kefir</i> : ( <i>Sacc.fragilis</i> + <i>Sacc.lactis</i> )	۱:۱	۰/۶۰۰ <sup>e</sup>	۳/۵۰۰ <sup>a</sup>
۱۰	۳	<i>Candida kefir</i> : ( <i>Sacc.fragilis</i> + <i>Sacc.lactis</i> )	۲:۱	۰/۵۹۷ <sup>e</sup>	۳/۶۰۰ <sup>a</sup>

جدول ۵- نتایج اندازه گیری اسیدیته و CO<sub>2</sub> در نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط چهار تایی سویه ها

شماره نمونه	درصد تلقیح	ترکیب میکروبی	نسبت میکروبی	اسیدیته (% اسیدلاکتیک)	%CO <sub>2</sub>
۱	۳	( <i>L.plantarum</i> + <i>L.casei</i> ): ( <i>L.kefir</i> + <i>L.brevis</i> )	۱:۱	۰/۷۵ <sup>b</sup>	۲/۴
۲	۳	( <i>L.plantarum</i> + <i>L.casei</i> ): ( <i>L.kefir</i> + <i>L.brevis</i> )	۱:۲	۰/۸۱ <sup>a</sup>	۲/۵

جدول ۶- نتایج اندازه گیری اسیدیته و CO<sub>2</sub> در نمونه‌های حاصل از تلقیح باکتری‌های لاکتیک و مخمرها

شماره نمونه	درصد کل تلقیح	درصد تلقیح باکتری‌های لاکتیک	نسبت لاکتوباسیلوس‌ها به کوکوس‌ها	درصد تلقیح مخمرها	اسیدیته (% اسیدلاکتیک)	%CO <sub>2</sub>
۱	۳	۲	۱:۱	۱	۰/۷۳ <sup>a</sup>	۲/۲ <sup>b</sup>
۲	۳	۲	۱:۲	۱	۰/۶۹ <sup>b</sup>	۲/۶ <sup>ab</sup>
۳	۳	۲	۲:۱	۱	۰/۷۳ <sup>a</sup>	۲/۴ <sup>ab</sup>
۴	۳	۲	لاکتوباسیل‌ها	۱	۰/۸۱ <sup>c</sup>	۲/۹ <sup>a</sup>

جدول ۷- نتایج اندازه گیری اسیدیته و CO<sub>2</sub> در نمونه‌های تولید شده نهایی

شماره نمونه	درصد باکتری‌ها	نسبت لاکتوباسیلوس‌ها به کوکوس‌ها	درصد تلقیح مخمر	باکتری استوباکتر استی	اسیدیته (% اسیدلاکتیک)	%CO <sub>2</sub>
۱	۳	۲:۱	۲	—	۰/۷۸	۲/۸
۲	۳	۱:۱	۲	—	۰/۷۷	۲/۶
۳	۳	۱:۲	۲	—	۰/۷۹	۲/۷
۴	۳	۱:۰	۲	—	۰/۷۵	۳/۲
۵	۲/۵	۲:۱	۲	۰/۵	۰/۸۰	۳
۶	۲/۵	۱:۱	۲	۰/۵	۰/۷۸	۲/۶
۷	۲/۵	۱:۲	۲	۰/۵	۰/۸۱	۲/۸
۸	۲/۵	۱:۰	۲	۰/۵	۰/۷۸	۲/۹

جدول ۸- نتایج آزمایش‌های شیمیایی انجام شده بر روی نمونه‌های تولیدی

شماره نمونه	ترکیبات شیمیایی									
	اسیدیته	چربی	پروتئین	لاکتوز	خاکستر	ماده خشک	CO <sub>2</sub>	الکل (درجه الکلی)	وزن مخصوص	ریبوفلاوین
	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	CO <sub>2</sub>	w/w%		(mg/100g)
۱	۰/۷۸۰ <sup>bc</sup>	۰/۵۵ <sup>a</sup>	۰/۸۱ <sup>b</sup>	۱/۱۷	۰/۴۰۰ <sup>c</sup>	۲/۸۴۷ <sup>b</sup>	۲/۶۰۰ <sup>c</sup>	۰/۶۷۱ <sup>c</sup>	۱/۰۰۲۸	۰/۰۸۹ <sup>ab</sup>
۲	۰/۷۶۶ <sup>bc</sup>	۰/۵۱۰ <sup>b</sup>	۰/۸۲ <sup>b</sup>	۱/۱۵	۰/۴۰۷ <sup>bc</sup>	۲/۴۰۳ <sup>e</sup>	۲/۸۰۰ <sup>abc</sup>	۰/۷۲۱ <sup>b</sup>	۱/۰۰۲۶	۰/۰۸۸ <sup>ab</sup>
۳	۰/۷۸۷ <sup>ab</sup>	۰/۵۰۰ <sup>b</sup>	۰/۸۴ <sup>b</sup>	۱/۲۰	۰/۳۹۷ <sup>c</sup>	۲/۸۱۷ <sup>b</sup>	۲/۷۰۰ <sup>bc</sup>	۰/۶۵۲ <sup>d</sup>	۱/۰۰۳۰	۰/۰۹۱ <sup>a</sup>
۴	۰/۷۵۳ <sup>c</sup>	۰/۵۴۶ <sup>a</sup>	۰/۹۰ <sup>a</sup>	۱/۰۵	۰/۴۵۰ <sup>ab</sup>	۲/۵۰۳ <sup>dc</sup>	۳/۱۹۷ <sup>a</sup>	۰/۷۸۱ <sup>a</sup>	۱/۰۰۲۴	۰/۰۸۵ <sup>b</sup>
۵	۰/۸۰۰ <sup>a</sup>	۰/۴۵۳ <sup>c</sup>	۰/۹۱ <sup>a</sup>	۱/۳۰	۰/۴۸۷ <sup>a</sup>	۲/۹۴۰ <sup>a</sup>	۲/۶۰۰ <sup>c</sup>	۰/۳۷۰ <sup>f</sup>	۱/۰۰۲۸	۰/۰۷۹ <sup>c</sup>
۶	۰/۷۸۰ <sup>abc</sup>	۰/۴۶۰ <sup>c</sup>	۰/۹۲ <sup>a</sup>	۱/۲۴	۰/۴۵۷ <sup>a</sup>	۲/۵۴۷ <sup>c</sup>	۳/۰۳۳ <sup>ab</sup>	۰/۳۷۲ <sup>f</sup>	۱/۰۰۲۸	۰/۰۷۵ <sup>c</sup>
۷	۰/۸۰۶ <sup>a</sup>	۰/۵۴۷ <sup>a</sup>	۰/۹۰ <sup>a</sup>	۱/۳۱	۰/۴۴۷ <sup>ab</sup>	۲/۵۹۳ <sup>c</sup>	۲/۸۳۳ <sup>abc</sup>	۰/۳۱۴ <sup>g</sup>	۱/۰۰۳۰	۰/۰۷۸ <sup>c</sup>
۸	۰/۷۸۰ <sup>abc</sup>	۰/۵۰۷ <sup>b</sup>	۰/۸۴ <sup>b</sup>	۱/۲۳	۰/۴۶۰ <sup>a</sup>	۲/۴۵۳ <sup>be</sup>	۲/۹۰۰ <sup>abc</sup>	۰/۳۹۱ <sup>e</sup>	۱/۰۰۲۶	۰/۰۷۴ <sup>c</sup>

جدول ۹- تجزیه واریانس ارزشیابی حسی نمونه‌های نهایی

منابع تغییر	درجات آزادی	میانگین مربعات		
		بو	رنگ	طعم
تکرار	۵	۱/۸۹۰۲۸ **	۱/۶۹۰۳ **	۰/۹۴۰۳ **
اسانس	۲	۱/۱۷۳۶۱ *	۰/۹۲۳۶ **	۱/۸۸۱۹ **
نمونه	۷	۰/۵۲۲۸	۰/۱۴۱۸۶	۱/۶۵۷۷ **
اسانس نمونه	۱۴	۰/۱۱۸۰۵	۰/۱۲۹۹۶	۰/۱۹۹۴
خطا	۱۱۵	۰/۲۰۹۸۴	۰/۱۷۷۲۳	۰/۲۰۹۸
ضریب تغییرات %		۱۱/۴۳۲	۱۳/۵۴۳	۱۲/۲۳۳۰

\* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ %

\*\* معنی‌دار در سطح احتمال ۱ %

## • بحث

در این تحقیق، ابتدا نمونه‌های حاصل از تلقیح ۹ سویه میکروبی (باکتری‌های لاکتیک و مخمرها) به تفکیک مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی آزمایش‌های شیمیایی در نمونه‌های حاصل از تلقیح سویه‌های منفرد با توجه به جدول ۲ نشان می‌دهد که تلقیح میکروارگانیسم‌های مورد نظر هیچ کدام به تنهایی نمی‌تواند در تولید محصول مطلوب، نقش داشته باشند. غلظت این نمونه‌ها نامطلوب است و از نظر طعم و بو برخی از میکروارگانیسم‌ها اثرات مثبت و تعدادی دیگر نیز اثرات منفی به جا می‌گذارند. از نظر اسیدیته، مخمرها اسید کمتر و باکتری‌های لاکتیک، اسید بیشتری تولید می‌کنند. از نظر گاز کربنیک، مخمرها گاز بیشتر و باکتری‌های لاکتیک گاز کمتری تولید می‌کنند. نتایج این تحقیق، مشابه تحقیقات دانشمندان زیر مشابه نتایج می‌باشد.

جدول ۱۰- مقایسه میانگین ارزشیابی حسی اسانس‌ها

نوع اسانس	رنگ	بو	طعم
اسانس نعنا	۴/۴۵۸ <sup>a</sup>	۴/۲۲۹ <sup>a</sup>	۴/۲۰۸ <sup>a</sup>
اسانس شوید	۴/۴۳۷ <sup>a</sup>	۴/۰۸۳ <sup>ab</sup>	۴/۰۰۰ <sup>b</sup>
اسانس آویشن	۴/۲۰۸ <sup>b</sup>	۳/۹۱۷ <sup>b</sup>	۳/۸۱۲ <sup>c</sup>

جدول ۱۱- مقایسه میانگین ارزشیابی حسی نمونه‌ها

شماره نمونه	رنگ	بو	طعم
۱	۴/۳۳۳	۴/۰۰۰	۴/۱۶۷ <sup>abc</sup>
۲	۴/۴۲۲	۴/۱۱۱	۴/۰۰۰ <sup>c</sup>
۳	۴/۴۴۴	۳/۱۴۴	۳/۶۱۱ <sup>d</sup>
۴	۴/۳۳۳	۴/۳۳۳	۴/۳۸۹ <sup>a</sup>
۵	۴/۴۴۴	۴/۲۲۲	۳/۹۴۴ <sup>c</sup>
۶	۴/۵۰۰	۴/۲۲۲	۴/۳۳۳ <sup>ab</sup>
۷	۴/۳۳۳	۳/۸۸۹	۳/۵۵۶ <sup>d</sup>
۸	۴/۳۳۳	۳/۸۸۹	۴/۰۵۶ <sup>bc</sup>

*Reiter* در فرایندی برای تولید نوشیدنی از مخمر *Geotrichum* استفاده کرد و مدت ۵ الی ۹ ساعت نوبه را در  $28^{\circ}\text{C}$  نگهداری کرد تا مراحل تخمیر پایان یابد (۲۴). سپس نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط دوسویه باکتری‌های لاکتیک و همچنین مخلوط دو سویه مخمرها با نسبت‌های مساوی ۲:۱ و ۱:۲ مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط دوتایی سویه‌ها (جدول ۳) نشان می‌دهد که نسبت‌های مساوی لاکتوباسیلوس‌های هموفرماتاتیو، نسبت‌های مساوی و ۲:۱ لاکتوباسیلوس‌های هتروفرماتاتیو به هموفرماتاتیو، نسبت‌های مساوی لاکتوباسیلوس‌های هتروفرماتاتیو، نسبت مساوی لاکتوباسیلوس‌های هتروفرماتاتیو و همچنین نسبت‌های مساوی و ۲:۱ کاندیدا/کفیر با هریک از مخمرهای ساکارومیسس لاکتیس و ساکارومیسس فراژیلیس از نظر ارگانولپتیک مطلوب هستند. از نظر اسیدیته، استفاده از مخلوط دوتایی باکتری‌های لاکتیک مناسب‌تر بوده و از نظر گاز کربنیک، مخمرها با نسبت‌های به کار برده شده گاز بیشتری تولید می‌کنند.

*Guan* برای تهیه نوشیدنی به آب پنیر غیر اسیدی و شیر پس چرخ گاو ۲/۵ درصد ساکارز افزود. سپس مقدار ۵ الی ۱۰ درصد از *Str. lactis* یا *Lactobacillus bulgaricus* و *Klosteromyces lactis* به آن افزوده و در دمای  $26^{\circ}\text{C}$  نگهداری کرد تا زمانی که اسیدیته قابل تیتراسیون تا ۱٪ افزایش یابد (۹).

با توجه به نتایج آزمایش‌های نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط دوتایی سویه‌ها، یک سری از نمونه‌ها حذف شدند و نمونه‌های مطلوب برای مرحله بعد که مخلوط سه‌تایی سویه‌ها به کار می‌رود، انتخاب شدند. به عبارت دیگر، نسبت‌های میکروبی به کار رفته در این مرحله با توجه به نتایج تلقیح مخلوط دوتایی سویه‌ها تعیین شد.

در مورد نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط سه‌تایی سویه‌ها (جدول ۴) لازم به ذکر است که نسبت‌های مساوی هریک از لاکتوباسیلوس‌های هتروفرماتاتیو با دو لاکتوباسیلوس هموفرماتاتیو، همچنین نسبت‌های مساوی هریک از لاکتوباسیل‌های هموفرماتاتیو با دو لاکتوباسیل هتروفرماتاتیو و همچنین نسبت ۲:۱ کاندیدا

کفیر به دو مخمر دیگر از نظر ارگانولپتیک مطلوب است. از نظر اسیدیته، اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ها در سطح احتمال ۰/۰۱ مشاهده می‌شود و مخلوط سه‌تایی لاکتوباسیل‌ها در مقایسه با مخلوط دوتایی اسید بیشتری تولید می‌کنند، ولی در مورد مخمرها تغییر خاصی ملاحظه نمی‌شود. از نظر گاز کربنیک، اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ها در سطح احتمال ۰/۰۱ مشاهده می‌شود و نتایج مانند نمونه‌های حاصل از تلقیح سویه‌های منفرد و مخلوط دوتایی سویه‌ها است. با توجه به این نتایج، نسبت‌های میکروبی مورد نظر جهت تلقیح مخلوط چهارتایی سویه‌ها تعیین می‌شود.

بررسی نمونه‌های حاصل از تلقیح مخلوط چهارتایی سویه‌های لاکتوباسیل (جدول ۵) نشان می‌دهد که نسبت مساوی دو لاکتوباسیلوس هموفرماتاتیو به دو لاکتوباسیلوس هتروفرماتاتیو از نظر ارگانولپتیک مطلوب است و از نظر میزان اسیدیته، مناسب است این نمونه‌ها از نظر گاز کربنیک، تفاوتی با نمونه‌های قبلی ندارند.

با بررسی نتایج مربوط به نمونه‌های حاصل از تلقیح سویه‌های منفرد، مخلوط دوتایی، سه‌تایی و چهارتایی سویه‌ها، نسبت‌های مناسب میان ۴ لاکتوباسیلوس، ۲ کوکسی و ۳ مخمر مشخص می‌شود. در مرحله بعد، نمونه‌های حاصل از تلقیح باکتری‌های لاکتیک و مخمرها از نظر ارگانولپتیک و شیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج نمونه‌های حاصل از تلقیح باکتری‌های لاکتیک و مخمرها (جدول ۶) نشان می‌دهد که نسبت ۲:۱ لاکتوباسیل‌ها به کوکسی‌ها همراه با تلقیح ۱٪ مخمرها از نظر ارگانولپتیک مطلوب است. اسیدیته این نمونه هم مناسب است. نمونه‌ای که از تلقیح ۲٪ لاکتوباسیلوس‌ها به همراه ۱٪ مخمرها حاصل شده است، گاز کربنیک بیشتری تولید می‌کند. باکتری‌های لاکتیک در pH پایین در تولید گاز کربنیک مؤثر هستند که البته انواع هتروفرماتاتیو نقش بیشتری دارند.

جداسازی سویه‌های میکروبی بومی کفیر در ایران، امکان تهیه مایه‌های کشت را فراهم آورد و در این تحقیق از نسبت‌های مختلف مایه‌های کشت (۶۱ نمونه) طی تکرارهای متوالی جهت تولید نوشیدنی استفاده شد.

الف) از نظر رنگ، اسانس نعنا و شوید در رتبه اول و اسانس آویشن در رتبه دوم قرار دارد ( $\alpha = 0/01$ ).  
 ب) از نظر بو، اسانس نعنا در رتبه اول و اسانس آویشن در آخرین رتبه قرار دارد ( $\alpha = 0/01$ ) بنابراین، اسانس‌های مختلف روی بو تأثیر دارند.  
 ج) از نظر طعم، اسانس نعنا در رتبه اول و اسانس آویشن در آخرین رتبه قرار دارد ( $\alpha = 0/01$ ) بنابراین، اسانس‌های مختلف، روی طعم تأثیر دارند.  
 با توجه به نسبت‌های مختلف کشت‌های میکروبی مشخص می‌شود که:

الف) هیچ اختلاف معنی‌داری در رنگ نمونه‌ها مشاهده نمی‌شود ( $\alpha = 0/01$ ) بنابراین، نسبت‌های مختلف کشت‌های میکروبی تأثیری روی رنگ نوشیدنی‌ها ندارد.  
 ب) اختلاف معنی‌داری در بوی نمونه‌ها مشاهده نمی‌شود ( $\alpha = 0/05$ ) بنابراین، نسبت‌های مختلف کشت میکروبی تأثیری روی بو ندارد.

ج) از نظر طعم، نمونه ۴ در رتبه اول و نمونه‌های ۳ و ۷ در آخرین رتبه قرار می‌گیرند ( $\alpha = 0/01$ ). بنابراین، نسبت‌های مختلف کشت‌های مایه میکروبی می‌تواند روی طعم محصولات اثر بگذارد. نسبت‌های مختلف تلقیح سویه‌های میکروبی کفیر روی رنگ و بوی نوشیدنی بی‌تأثیر ولی بر طعم نوشیدنی موثر هستند. این نتایج مطابق با نتایج بررسی Duitschaever و همکاران (۱۱) است. این محقق توانست با تلقیح نسبت‌های مختلف سویه‌های میکروبی کفیر در شیر، نوشیدنی مناسبی تهیه کند.

**اندازه‌گیری شیمیایی:** با توجه به نتایج اندازه‌گیری‌های شیمیایی (جدول ۸) براساس طرح آماری کاملاً تصادفی، مشخص می‌شود که:

۱- از نظر اسیدیته، نمونه‌های ۷ و ۵ در رتبه اول و نمونه ۴ در آخرین رتبه قرار می‌گیرند ( $\alpha = 0/05$ ) بنابراین، نسبت‌های مختلف کشت‌های میکروبی، روی اسیدیته نوشیدنی‌ها تأثیر می‌گذارند و باکتری‌های اسیدلاکتیک و اسیداستیک نقش مؤثرتری دارند. این نتایج مطابق با تحقیقات /سدی (۵) و همکاران در سال ۲۰۰۰ است. در

استفاده از کشت‌های مخلوط نسبت به کشت‌های مجزا برتری دارد. به عنوان مثال، در بررسی انجام شده توسط Besserezhnor در سال ۱۹۶۹ برای تهیه نوشیدنی مناسب، از مخلوط لاکتوباسیلوس‌ها (*L.bulgaricus*، *L.acidophilus*، *L.casei*، *L.helveticus*) و همچنین استرپتوکوک (*St.thermophilus*) استفاده شد (۲۵، ۸).  
 Kar در سال ۱۹۹۸ برای تهیه نوشیدنی مطلوب از مخلوط ۲٪ هر کدام از باکتری‌های *Lactobacillus bulgaricus* و *Streptococcus thermophilus* استفاده کرد (۱۸).

نتایج کار این محققان نشان داد که باکتری‌های لاکتیک یا استرپتوکوک‌ها یا مخمرها به تنهایی نمی‌توانند به عنوان کشت مایه، برای تولید محصول مطلوب مورد استفاده قرار گیرند، بنابراین، باید مخلوط این سه گروه از میکروارگانیسم‌ها به کار برده شود. بررسی‌های انجام شده توسط سایر محققان نیز مؤید این مطلب است (۲۸، ۲۷).

در این تحقیق هم از مخلوط باکتری‌های لاکتیک و مخمرها به عنوان مایه جهت تولید کفیر استفاده شد. نتایج آزمایش‌های ارگانولپتیک و شیمیایی نمونه‌های حاصل از تلقیح باکتری‌ها و مخمرها به میزان ۳٪ نشان می‌دهد که این نمونه‌ها از نظر طعم و بو نامطلوب، ولی از نظر غلظت، مطلوب هستند. از نظر اسیدیته، ترشی ملایمی دارند و همچنین حاوی مقدار کمی گاز کربنیک هستند. بنابراین، تلقیح ۳٪ جهت تولید کفیر با کیفیت مطلوب، مناسب نیست. به همین دلیل از میزان تلقیح ۵٪ استفاده شد.

در نمونه‌های حاصل از میزان تلقیح ۵٪ (۳٪ باکتری‌ها و ۲٪ مخمرها) نتایج آزمایش‌های شیمیایی مطلوب بود و در نهایت ۸ نمونه، به عنوان نمونه‌هایی نهایی در نظر گرفته شدند و مورد ارزشیابی حسی و آزمایش‌های شیمیایی قرار گرفتند.

ارزشیابی حسی: با توجه به نتایج ارزشیابی حسی، (جدول ۱۰) ۸ نمونه نهایی با سه اسانس (نعنا، شوید و آویشن) بر اساس طرح آماری فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی مشخص می‌شود که:

*Gambelli* مشابه این نتایج است. این محققان برای تهیه کفیر، ۵٪ دانه کفیر را به شیر اضافه کردند (۱۳).  
 ۷- از نظر گاز کربنیک، نمونه ۴ در رتبه اول و نمونه‌های ۲ و ۶ در رتبه آخر قرار می‌گیرند ( $\alpha = 0/01$ ) بنابراین، نسبت‌های مختلف تلقیح سویه‌های میکروبی روی گاز کربنیک نوشیدنی‌ها تأثیر می‌گذارند و باکتری‌های اسیدلاکتیک، به ویژه لاکتو باسیل‌های هتروفرمات‌تاتیو تأثیر بیشتری دارند.  
 ۸- از نظر دانسیته، هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود ( $\alpha = 0/05$ ) بنابراین، نسبت‌های مختلف تلقیح سویه‌های میکروبی بر دانسیته تأثیری ندارد.  
 ۹- از نظر ریپوفلاوین، نمونه ۳ در اولین رتبه و نمونه‌های ۵، ۷، ۶ و ۸ در آخرین رتبه قرار می‌گیرند ( $\alpha = 0/01$ )، بنابراین، در نوشیدنی تخمیری با تلقیح باکتری‌های اسیدلاکتیک میزان ریپوفلاوین کاهش می‌یابد که این نتیجه مطابق گزارش *Duitschaever* و همکاران است (۱۱).  
 با جمع‌بندی نتایج فوق می‌توان گفت که از لحاظ آنالیز شیمیایی، نمونه‌های ۵ و ۷ در اولین رتبه قرار می‌گیرند.  
 مقایسه نتایج اندازه‌گیری‌های شیمیایی نشان می‌دهد که این نتایج مطابق با نتایج بررسی مظاهری/اسدی و همکاران (۴) در ایران است. این محقق با استفاده از دانه‌های کفیر از شیر، یک نوشیدنی تخمیری تهیه و با تلقیح درصدهای مختلفی از دانه‌های کفیر، نوشیدنی مناسبی از نظر ترکیبات شیمیایی تهیه نمود.  
 نتایج کار این بررسی نشان داد که لاکتوباسیلوس‌ها یا استرپتوکوک‌ها یا مخمرها به تنهایی نمی‌توانند به عنوان مایه کشت برای تولید محصول مطلوب مورد استفاده قرار گیرند و استفاده از کشت‌های مخلوط نسبت به کشت‌های مجزا برتری دارد. بنابراین، در این تحقیق از مخلوط باکتری‌های لاکتیک و مخمرها به عنوان مایه جهت تولید نوشیدنی استفاده شد.

این تحقیق از ۵٪ دانه کفیر که به شیر اضافه شده است، برای تهیه کفیر استفاده شد.  
 ۲- از نظر چربی، نمونه‌های ۱، ۴ و ۷ در رتبه اول و نمونه‌های ۵ و ۶ در رتبه آخر قرار می‌گیرند ( $\alpha = 0/01$ ). همچنین، چربی آب پنیر اولیه کاهش یافته است. نتایج بررسی محققانی مانند *Alm* (۱)، *Gambelli* (۱۳) *Yun* و همکاران (۱۰) مشابه این نتایج است. این محققان از شیر برای تهیه کفیر استفاده کردند و علت کاهش چربی را مربوط به لیپاز تولید شده به وسیله میکروارگانیسم‌ها دانستند.  
 ۳- از نظر پروتئین، نمونه‌های ۶، ۵، ۴ و ۷ در رتبه اول و نمونه‌های ۳، ۸، ۲ و ۱ در رتبه دوم قرار می‌گیرند ( $\alpha = 0/01$ ). بنابراین، نسبت‌های مختلف کشت‌های میکروبی بر مقدار پروتئین نمونه‌ها تأثیر دارد و میزان پروتئین سلول میکروارگانیسم‌ها روی پروتئین نوشیدنی موثر است. نتایج تحقیقات *Gambelli* (۱۳). مشابه این نتایج است.  
 ۴- از نظر خاکستر، نمونه‌های ۵، ۸ و ۶ در رتبه اول اولین رتبه و نمونه‌های ۱ و ۳ در رتبه آخر قرار می‌گیرند ( $\alpha = 0/01$ ). این نتایج مطابق نتایج *Duitschaever* و همکاران است (۱۱).  
 ۵- در لاکتوز نمونه‌ها هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود ( $\alpha = 0/01$ ) بنابراین، نسبت‌های مختلف تلقیح سویه‌های میکروبی روی میزان مصرف لاکتوز طی تخمیر تأثیر نمی‌گذارند. همچنین، مقدار لاکتوز آب پنیر اولیه به میزان ۲۰ تا ۲۵٪ درصد کاهش می‌یابد این یافته‌ها با تحقیقات *اسدی* (۵) و همکاران در سال ۲۰۰۰ مطابقت دارد. در این تحقیق از ۵٪ دانه کفیر که به شیر اضافه شده است. برای تهیه کفیر استفاده شد. همچنین، نتایج تحقیقات *Alm* (۱) مشابه این نتایج است.  
 ۶- از نظر ماده خشک، نمونه ۵ در اولین رتبه و نمونه ۲ در آخرین رتبه قرار می‌گیرند ( $\alpha = 0/01$ ) نتایج تحقیقات

## • References

1. Alm L. Effect of fermentation on milk fat of Swedish fermented milk products. *J. Dairy Sci* 1982; 65: 521–532.
2. Anliag A, Gracigla LD. Characterization of kefir grains grown in cows milk and in soya milk . *J. Dairy Res* 1999; 66: 327-333.
3. Angulo L, Lopez E, Lena Cesar E. Microflora present in kefir grains of the Galician region (north – west of Spain). *J. Dairy Res* 1993; 60: 263-267.
4. Assadi MM, Jazayeri H, Rashedi H. Formulation and design of kefir fermented beverage production of whey [dissertation]. Tehran: Science & industry University. Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology; 1999 [in Persian] .
5. Assadi MM, Pourahmad R, Moazami N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World J. microbiol. Biotechnol* 2000;16: 541 – 543.
6. Association of official analytical chemists. official methods of analysis . AOAC: Association of Official Analytical Chemists; Washington , Dc . 2000.
7. Bambha PP, Setty PAS, Nambudripad VKN. "Whevit" – anourishing soft drink. *Indi. Dairyman* 1972; 24(7): 153.
8. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeast characteristics and identification, 2nd ed. Cambridge University press; 1990.
9. Buch Kristensc JM. Utilization of the components of milk in the food Industry .*J. Dan. Dairy Food Ind* 1988 :215-221.
10. Ching-Yun K, Ching-Wen L. taiwanese kefir grains: Their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. *Aus. J. Dairy Technol* 1999; 54: 19–23.
11. Duitschaever CL, Kemp N, Emmons D. pure culture formulation and procedure for the production of kefir. *Milch. schaft* 1987; 42: 80-82 .
12. Egan H, Hirk S, Sawyer R. Pearsons chemical analysis of food. 8th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone 1988; p. 432-506.
13. Gambelli L, Manzi P, Panfili G, Vivanti V, Pizzoferrato L. Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialized in Italy. *Food Chem* 1999; 66: 353–358.
14. Grace V, Hought GA, Rudnick H, Whaley K, Lindamood J. Sampling Dairy and Related products: In RT, editor. Marshal. Standard method for the examination of dairy products. Washington DC: American Public Health Association; 1992; p. 59-84.
15. Holsinger VH, Posati LP, Devilbiss ED. whey beverage: a review. *J. Dairy Sci* 1984;57(8): 849-859.
16. IDF. Sensory Evaluation of Dairy product standard 99: A, International Dairy Federation, Brussels 1987.
17. Jelen P. The importanse of whey and whey components in food and Nutrition. *Int. dairy J* 2003;13: 564-575.
18. Kar T. Enhancement and stabilization of flavour in fermented whey beverage. *Food sci. technol. Today* 2000;14(1): 29-32.
19. Klupsch HJ. Method of making kefir. *European Patent Appl.* 1985. Vol 1, EP 0148 300 A1, p.16.
20. Maiorella BL, Castillo FJ. Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste abatement. *process Biochem* 1984: 157-161.
21. Motaghi MM, Mazaheri Assadi M, Moazami N, Farkhondeh A, Fooladi A, Goltapeh EM. Kefir production in Iran. *World J. Microbiol. Biotechnol* 1997;13: 579-581.
22. Pablo S.R and Analia G.A. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 2001. 68: 653-661.
23. Rehm HJ, Reed G. *Biotechnology*. 1st Edition. Weinheim, Elsevier, 1983. p.315-363.
24. Reiter F. Production of imitation beer and other drinks from whey using the Moltra process. *Neue Molk. Hildesh* 1947;2(11):105.
25. Robinson RK. Therapeutic properties of fermented milks. London: Elsevier; 1991. p. 160-161.
26. Schulz ME. The stability of vitamin C in acid whey beverages. *Deut: Molk* 1942; 63: 492.
27. Schulz ME, Drache KD. Fruit whey beverages. *Milchwissen schaft* 1942; 2: 276.
28. Schulz ME, Fackelmeier K. Fermentation beverages from plant extracts and whey. *Brauwissenschaft*, P. 43: *Chem Abstr.* 1948.44: 6572c.
29. Vida P. Quality control and chemical experiments of food products. Tehran: Tehran University. Press; 1995. p 70-110. [in Persian]
30. Zall RR. Source and Composition of whey and permeate In: Zadow, JG editor. whey and lactose processing England :Elsevier; 1992 P. 1-72.