

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 پروبیوتیک تهیه شده با آغازگرهای *ل. اسیدوفیلوس*، ب. لاکتیس و باکتری‌های سنتی ماست در دو سطح بررسی شد.

یافته‌ها: بالاترین میزان CLA با افزودن ۲٪ شیر خشک بدون چربی، زمان افزودن روغن گلرنگ بعد از رسیدن به pH = ۶، مقدار روغن گلرنگ افزوده شده $10^{-3} \times 1/4$ (v/v) درصد و دمای گرمخانه‌گذاری 37°C در زمان رسیدن به pH = ۴/۸ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: در بهترین شرایط، مقدار CLA در ماست پروبیوتیک با $32/2$ درصد افزایش از $10^{-3} \times 7/07$ (w/w) درصد در ماست شاهد به $10^{-3} \times 9/23$ (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 در حیوانات نشخوار کننده (با اصلاح رژیم غذایی دام به منظور افزایش تولید CLA در معده چهارم حیوان 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

اسید لینولئیک را بررسی کردند (لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس و / استرپتوکوکوس سالیاریوس زیر گونه ترموفیلوس). میزان اسید لینولئیک اضافه شده به محیط کشت به ترتیب ۱ و ۵ میلی گرم در هر میلی لیتر محیط کشت و زمان گرمخانه گذاری (صفر تا ۴۸ ساعت) در محیط شیر خشک بدون چربی استریل شده بود. نتایج نشان داد همه باکتری های مورد بررسی، توانایی تبدیل اسید لینولئیک به CLA را دارند. تولید این اسید چرب توسط لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس در حضور ۱ mg/ml اسید لینولئیک پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، افزایش معنی داری نشان داد؛ اما افزایش میزان اسید لینولئیک تا ۵ mg/ml و طولانی کردن زمان تا ۴۸ ساعت، بی اثر بود (۸).

Kim و همکاران در سال ۲۰۰۲ افزایش میزان CLA چربی شیر با استفاده از باکتری های لاکتیکی را بررسی کردند. هدف آنها تعیین عوامل و روش های موثر در افزایش میزان این اسید چرب در فراورده های شیری تخمیری بود. در مطالعه آنها ۱۴ گونه باکتری لاکتیکی بررسی شد و روغن آفتابگردان به عنوان سوبسترا به کار رفت. در بین گونه های مورد بررسی، لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتراریوم، لاکتوکوکوس کازئی و لاکتوکوکوس لاکتیس در شیر کامل و محیط MRS توانایی تولید اسید لینولئیک 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 اسید لینولئیک در ارتباط بود و به دنبال رشد باکتری در شیر و کاهش pH (در اثر غیرفعال شدن آنزیم ایزومراز) متوقف شد. به دنبال تماس باکتری ها با سوبسترای چرب در فاز سکون، تجمع CLA مشاهده شد. در حالی که این تجمع در سلول های فاز لگاریتمی، کندتر انجام شد. سن باکتری در فرایند بیهیدروژناسیون کشت مخلوط و خالص، مؤثر بود (۹).

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

پس از تخمیر فراورده های شیر افزایش می یابد (۴). Aneja و همکاران در سال ۱۹۹۰ به بررسی میزان CLA در نوعی فراورده 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 میلی گرم 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 خشک بدون چربی (به عنوان دهنده هیدروژن) و اکشن ایزومریزاسیون در مرحله نخست بیهیدروژناسیون و تبدیل رادیکال های اسید لینولئیک به CLA را تسریع می کند. همچنین، افزایش دما در عملیات فراوری از ۷۰ °C به ۸۵ °C با افزایش تشکیل رادیکال های اسید لینولئیک، مقدار CLA را در پنیر چدار افزایش می دهد.

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

بسیاری از گونه های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس و استرپتوکوکس قادر به تولید CLA از اسید لینولئیک در محیط های ویژه یا شیر پس چرخ 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 باکتری های لاکتیکی در تولید CLA در محیط حاوی

• 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 90°C پاستوریزه و تا رسیدن به حرارت 35°C خنک شد. یک بسته کشت آغازگر ABY-I (حاوی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم لاکتیس، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بلگاریکوس) به شیر بازساخته، افزوده و ضمن هم‌زدن آهسته توسط مگنت به مدت ۱۵ دقیقه مخلول شد.

عملیات تلقیح در کنار شعله و در شرایط سترون انجام شد. از مایه تلقیح تولید شده به میزان (۷/۷) 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 آغازگر 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 شیر 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°C) تا فعالیت باکتری‌ها متوقف شده و از افت بیشتر pH و افزایش اسیدیته، جلوگیری شود. در انتها، میزان CLA در ماست پروبیوتیک 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، ماده 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).

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 ماست بدون چربی حاوی ۰/۱ درصد اسیدلینولئیک شد. علت این افزایش به اثر "هم‌افزایی" باکتری‌های سنتی ماست و باکتری پروبیوتیک نسبت داده شد (۱۱).

آقاجانی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۳ 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 ۰/۲ میلی لیتر مایه تلقیح، افزودن ۱۰ میکرولیتر روغن پس از دو ساعت، دمای گرمخانه‌گذاری 40°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 میلی گرم در هر گرم چربی می‌رساند (۱۲).

در تحقیق حاضر، برای اولین بار، اثر افزایش میزان CLA از کشت مخلوط ABY-I (حاوی/استرپتوکوکوس سالیوار/یوس 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 شیر خشک بدون چربی افزود شده به شیر کامل نیز بر میزان تولید CLA در ماست پروبیوتیک بررسی و شرایط مناسب تولید تعیین شد.

پاسخ، توسط نرم افزار به دست آمد. برای ارزیابی حسی ماست پروبیوتیک حاوی روغن گلرنگ در مقایسه با ماست پروبیوتیک شاهد، از نظر طعم، بافت و مزه هر دو نمونه ماست به ۳۰ ارزیاب آموزش ندیده ارائه شد. از آزمون ناپارامتری کولموگراف - اسمیرنوف و نرم افزار SPSS^{11.5} برای جمع بندی نتایج استفاده شد.

روش های آماری: طراحی آزمایش ها 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 داده ها به روش تاگوچی و با نرم افزار Qualitek-4 انجام شد. به این ترتیب، ضمن بررسی اثر هر متغیر بر پاسخ سیستم، شرایط بهینه موضعی در محدوده تغییر سطح متغیرها برای رسیدن به بهترین

جدول ۱- آرایه متعامد L₈ 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	۳۷	۰	۵
۲	۲	۴۰	۱/۴	۴/۸
۳	۲	۳۷	۱/۴	۴/۸
۴	۲	۴۰	۰	۵
۵	۴	۳۷	۰	۴/۸
۶	۴	۴۰	۱/۴	۵
۷	۴	۳۷	۱/۴	۵
۸	۴	۴۰	۰	۴/۸

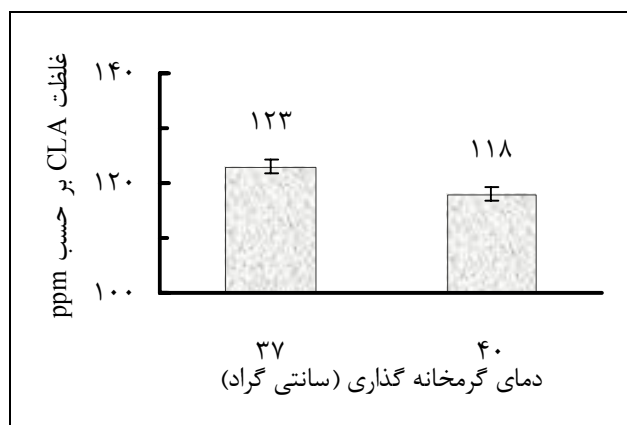
دمای محیط، ۶ ml محلول ۴ درصد اسید کلریدریک در متانول به محلول فوق اضافه شد و ۲۰ دقیقه در حمام آب ۶۰°C قرار گرفت تا عملیات صابونی شدن و متیله شدن اسیدهای چرب انجام شود. سپس به نمونه ۲ ml آب دو بار تقطیر، افزوده و ۱۵ دقیقه به شدت هم زده شد (برای آزاد شدن متیل استر به لایه آبی). سپس با افزودن ۵ ml n-هگزان و ۱۵ دقیقه هم زدن شدید، متیل استر از لایه آبی، وارد لایه آلی شد. پس از دو بار شست و شو با ۲ ml، به لایه آلی خالص ۱ گرم سولفات سدیم 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 ۰/۲۲ mm و ضخامت فیلم ۰/۲۵ mm، 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) (۶، ۸، ۱۱).

آنالیز میکروبی: کشت ABY-1 حاوی باکتری های /س. ترموفیلوس، ال. دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس، ال. /اسیدوفیلوس و ب. لاکتیس بود. برای شمارش انتخابی هر

آنالیزهای شیمیایی برای استخراج و جداسازی CLA: مطابق روش Lin و همکاران (۶، ۸، ۱۱)، 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 ۲۸۰۰ rpm و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۸°C و ۴۰۰۰ rpm 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 ۰/۳ گرم 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 دکانتی کردن از سولفات سدیم جدا و توسط تبخیر کننده دَوَرانی، تغلیظ شد. این عملیات تا خشک شدن کامل حلال های (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



شکل ۲- اثر دمای گرمخانه گذاری 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 (شکل های ۳ و ۴). با توجه به نتایج سایر محققان در زمینه فراورده های شیری تخمیری، ارتباط مستقیمی بین مقدار اسید لینولئیک و اسیدلینولئیک مزدوج وجود دارد. بهترین زمان برای پایان گرمخانه گذاری ماست، رسیدن به pH=۴/۸ به دست آمد. زیرا در این شرایط، ضمن حفظ بقای باکتری های پروبیوتیک و ایجاد رایحه و طعم مناسب در ماست پروبیوتیک، از تخریب اسیدلاکتیکی حاصل از *ال. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* جلوگیری می شود (شکل ۵). چنین نتیجه ای توسط Kim در سال ۲۰۰۲ نیز گزارش شده بود (۹).

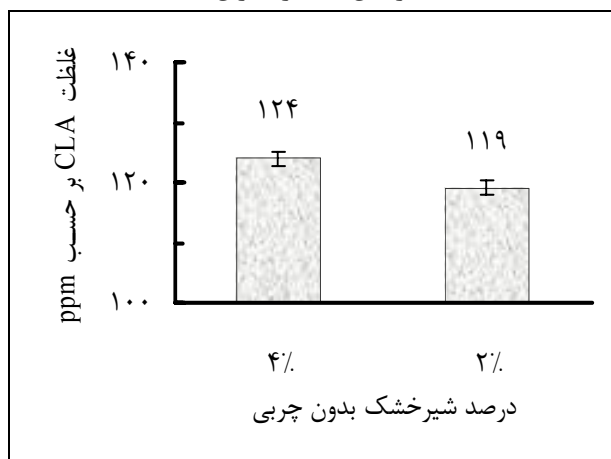
در ضمن، استفاده از روغن گلرنگ و کشت مخلوط باکتری های پروبیوتیک *ال. اسیدوفیلوس* و *ب. لاکتیس* به همراه باکتری های سنتی ماست (شامل *اس. سالیواریوس* زیرگونه *ترموفیلوس* و *ال. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*) سبب افزایش میزان CLA شد.

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

یک از این دوگونه پروبیوتیک در کشت های 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 باکتری های سنتی ماست جلوگیری شود). گرمخانه گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۷۲ ساعت در شرایط هوازی، منجر به رشد *ال. اسیدوفیلوس* و در شرایط بی هوازی به رشد *بیفیدوباکتر* شد (۱۳).

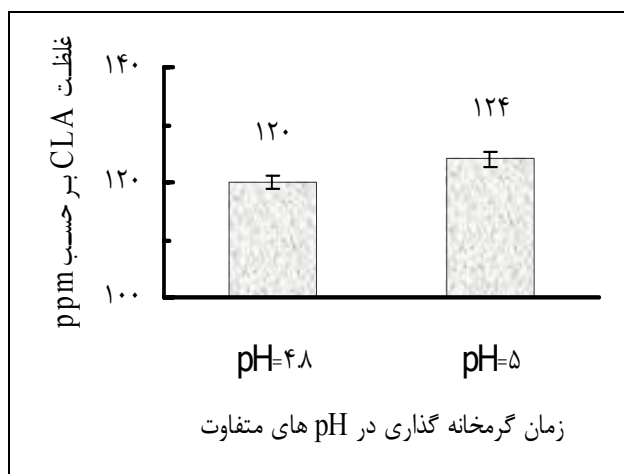
• یافته ها

بر اساس نتایج به دست آمده، مقدار CLA با افزودن شیر خشک بدون چربی به شیر کامل، افزایش یافت. شکل ۱ نشان می دهد که افزودن ۲٪ شیر خشک بدون چربی به شیر کامل، منجر به افزایش معنی دار میزان CLA شد. با توجه به نقش پروتئون دهی پروتئین ها در مکانیسم اکسیداسیون و تشکیل رادیکال اسیدلینولئیک می توان 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.

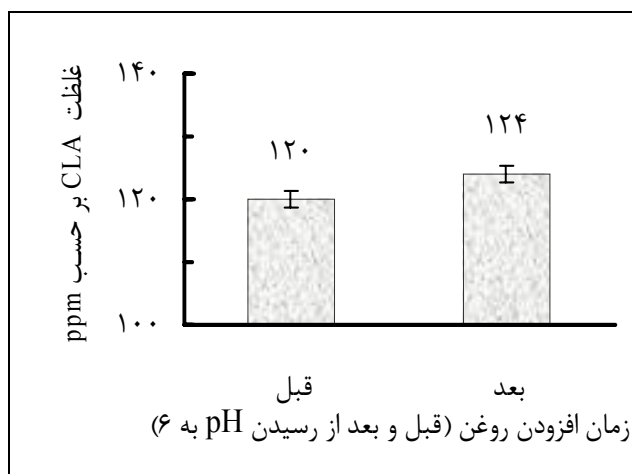


شکل ۱- اثر شیر خشک بدون چربی در افزایش CLA

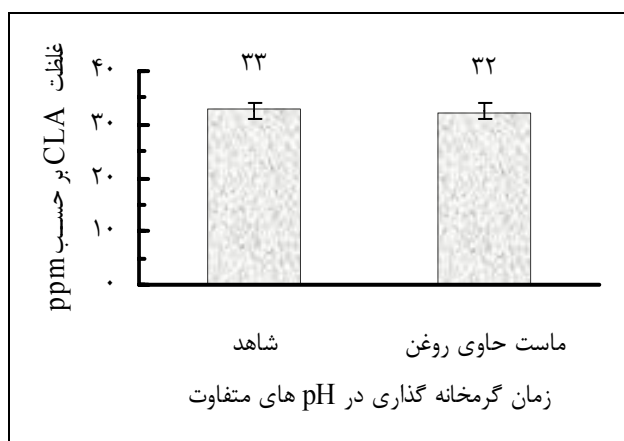
شکل ۲ نشان می دهد که دمای ۳۷°C برای افزایش CLA در ماست پروبیوتیک مؤثرتر بود. در فرایند تولید ماست پروبیوتیک با افزایش دما، شرایط رشد باکتری *ال. بولگاریکوس* که یک اسیدساز قوی محسوب می شود، مساعدتر شد و تجمع اسید لاکتیک تولید شده بر CLA تولید شده، اثر تخریبی داشت.



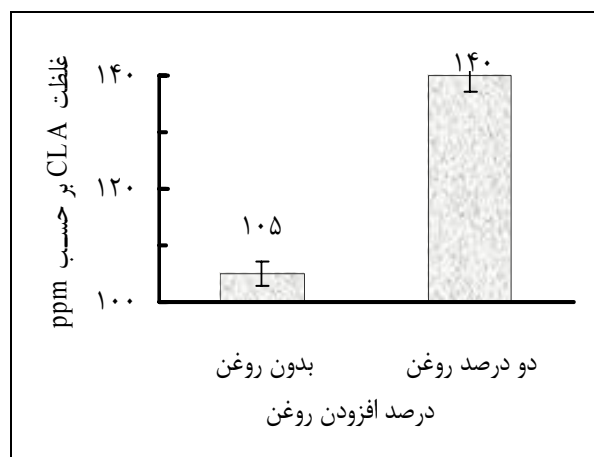
شکل ۵- اثر زمان پایان گرمخانه گذاری در تولید CLA



شکل ۳- اثر زمان افزودن روغن گلرنگ در تولید CLA



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



شکل ۴- اثر مقدار روغن گلرنگ افزوده در تولید CLA

جدول ۲- تغییر pH ماست در دوره گرمخانه گذاری 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

بر اساس پژوهش انجام شده، بهترین شرایط برای افزایش میزان CLA در ماست پروبیوتیک، افزودن شیر خشک بدون چربی به میزان ۲٪ حجمی، دمای گرمخانه گذاری ۳۷ °C، مقدار روغن گلرنگ اضافه شده ۰/۱ درصد حجمی، زمان افزودن روغن گلرنگ در pH=۶ و پایان گرمخانه گذاری 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 $9/23 \times 10^{-3}$ و $7/07 \times 10^{-3}$ درصد وزنی چربی کل بود.

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

جدول ۴- ویژگی‌های شیمیایی فراورده نهایی در ماست پروبیوتیک با بالاترین میزان CLA

ویژگی	مقدار CLA		اسیدیته	PH	ماده خشک	چربی
	در ابتدا	پس از یک هفته	گرم بر صد گرم (بر حسب اسید لاکتیک)		بدون چربی (درصد وزنی)	(گرم در صد گرم)
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 خشک بدون چربی به شیر کامل، منجر به افزایش میزان CLA می‌شود، اما در غلظت ۴٪ تغییر معنی داری مشاهده نمی‌شود. افزودن شیر 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 در افزایش 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. تغییرات pH و اسیدیته ماست در محدوده pH طبیعی شیر تا ۴/۵ دارای همبستگی معکوس تقریباً خطی هستند. جدول‌های ۲ و ۳ تغییرات pH ماست حاوی ۲ و ۴ درصد وزنی شیر خشک بدون چربی را در دوره گرمخانه‌گذاری در دو دمای مختلف نشان می‌دهد. 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 مرحله رشد لگاریتمی، بالاتر بود و افزودن سوپسترای چرب غنی از اسیدلینولئیک در pH=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

تخریبی حاصل از اسیدلاکتیک تولیدی توسط *ا. 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 ا. 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 37°C ، افزودن $(10^{-3}\% \text{ v/v})$ ۱/۴ روغن گلرنگ در $\text{pH}=6$ و زمان پایان گرمخانه‌گذاری در $\text{pH}=4/8$ غلظت CLA تولیدی در چربی استخراج شده از ۲/۵ ml ماست، پس از انحلال در ۵ ml حلال برابر ۱۴۰/۱۹ ppm 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 در محصولات تخمیری، تولید ماست پروبیوتیک با سایر گونه‌های 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.

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 لگاریتمی رشد، بیشترین میزان است (۹).

تاثیر دمای گرمخانه‌گذاری در افزایش میزان CLA: تشکیل CLA (در ماست پروبیوتیک تهیه شده با آغازگرهای *ا. اسیدوفیلوس* و *ب. لاکتیس* به همراه باکتری‌های سنتی) در دمای 37°C در مقایسه با دمای 40°C بیشتر بود. با افزایش دما از 37°C به 40°C باکتری *ا. 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 $\text{pH}=4/6$ ، 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 (۸، ۱۱). همچنین آفاجانی در سال ۱۳۸۳ نشان داد با افزودن ۰/۱ درصد حجمی روغن آفتابگردان به شیر برای تولید ماست معمولی با آغازگرهای *ا. دلبروکی* زیر گونه بولگاریکوس و *ا. سالیاریوس* زیر گونه 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: شکل ۵ نشان می‌دهد که پایان گرمخانه‌گذاری در $\text{pH}=4/8$ 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

• 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، [پایان نامه کارشناسی ارشد]. تهران: دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران؛ ۱۳۸۲.