مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال سوم، شماره۱، بهار ۱۳۸۷ ، صفحات ۱۰-۱

تأثیر ترکیب شیر، درصد تلقیح و دمای تخمیر بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5 در ماست پروبیوتیک

پریناز طاهری[۱]، محمدرضا احسانی[۲]، کیانوش خسروی دارانی[۳]، سید هادی رضوی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
۲- استاد گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
۳- نویسنده مسئول: پژوهشگر گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com
۴- دانشیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۶/۶/۵ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: فراورده‌های شیری پروبیوتیک به دلیل داشتن اثرات درمانی و ارزش تغذیه‌ای ویژه، امروزه زمینه ساز تحقیقات گسترده در راستای روش‌های تولید و نگهداری این محصولات و بررسی جنبه‌های تغذیه‌ای و درمانی آن‌ها شده اند. بهبود رشد باکتری‌های پروبیوتیک در شیر، از جمله راهکارهای رفع مشکلات فناوری تولید این فراورده‌ها محسوب می‌شود. این تحقیق، به هدف بررسی تاثیر ترکیب شیر (درصد شیرخشک و پودرآب پنیر)، درصد تلقیح (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و کشت آغازگر ماست) و دمای تخمیر بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5 در ماست پروبیوتیک و تعیین شرایط مناسب برای رسیدن به حداکثر رشد با استفاده از طراحی تاگوچی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، تأثیر پنج متغیر مستقل (در سه سطح) بر رشد باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5، پس از ۶ ساعت گرمخانه‌گذاری در تولید ماست پروبیوتیک، به وسیلهٔ طراحی عاملی کسری تاگوچی (Taguchi) بررسی شد. متغیرهای مورد ارزیابی عبارت بودند از: شیر خشک بدون چربی (w/w٪ ۱۴، ۱۲، ۱۰)، پودر آب پنیر (w/w٪ ۱/۵، ۰/۷۵ و صفر)، میزان تلقیح *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (v/w٪ ۰/۵، ۰/۳ و ۰/۱)، میزان تلقیح کشت ماست (v/v٪ ۰/۸، ۰/۴، ۰/۲) و دمای گرمخانه‌گذاری (°C ۴۳، ۴۰، ۳۷).

یافته‌ها: در میان پنج متغیر مورد بررسی، مقدار تلقیح کشت ماست بیشترین تأثیر معنی‌دار را بر رشد باکتری پروبیوتیک دارد در حالی که اثر درصد تلقیح *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و دمای گرمخانه‌گذاری در تحریک رشد باکتری چندان معنی‌دار ارزیابی نشد. در هر حال، مناسب‌ترین شرایط رشد برای باکتری پروبیوتیک پس از افزودن شیر خشک بدون چربی w/w٪ ۱۰؛ بدون افزودن پودرآب پنیر و با تلقیح *ال.اسیدوفیلوس* و کشت ماست به ترتیب معادل w/v٪ ۰/۱ و v/v٪ ۰/۴ و دمای گرمخانه‌گذاری°C ۳۷ حاصل شد.

نتیجه‌گیری: با تعیین دقیق ترکیب شیر، مقدار تلقیح و دمای گرمخانه‌گذاری می توان به رشد بهینه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و در نتیجه حداکثر تعداد اولیه باکتری پروبیوتیک در محصول دست یافت. داده‌های حاصل، از نظر بهینه‌سازی تولید صنعتی این فراورده دارای اهمیت فراوان است و نشان می‌دهد که می‌توان با حداقل ماده جامد شیر، بدون استفاده از غنی کننده و با درصد تلقیح کشت آغازگر استاندارد و میزان تلقیح پروبیوتیکی حداقل و دمای پایین، محصولی با تعداد مناسب باکتری در میلی‌لیتر تولید نمود.

واژگان کلیدی: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، پروبیوتیک، ماست، غربال متغیرها، روش تاگوچی

• مقدمه

واژهٔ "پروبیوتیک" در زبان یونانی به معنی حیات‌بخش بوده و بنا به تعریف، عبارت است از "میکروارگانیسم‌هایی که در پی مصرف خوراکی باعث بهبود خصوصیات میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش میزبان می‌شوند و اثرات مفیدی بر سلامت مصرف‌کننده به جا می‌گذارند" (۱). تأثیر پروبیوتیک‌ها بر فلور میکروبی دستگاه گوارش و ایفای نقش درمانی آن‌ها به مقدار مصرف روزانه این باکتری‌ها مربوط است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-10]

معمول‌ترین محدوده تعریف شده برای تراکم حضور باکتری‌های پروبیوتیک زنده ۱×۱۰^{۶} تا ۵×۱۰^{۸} cfu در هر گرم فراورده ذکر شده است (۲). بهتر است باکتری پروبیوتیک در حین تخمیر و تولید فراورده تکثیر یابد و به میزان تعریف شده برسد. به این ترتیب، باکتری‌ها ضمن تکثیر با محیط سازگار شده و بقای بیشتری در زمان نیمه عمر فراورده نهایی خواهند داشت (۲).

شیر و فراورده‌های شیری به علت دارا بودن بسیاری از مواد مغذی ضروری، محیط قابل قبولی برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک است. همچنین، عمل‌آوری این مواد غذایی توسط فعالیت باکتری‌ها به عنوان غذای تخمیری از قدیم مقبولیت و پذیرش لازم را داشته است. با وجود این در پی تلقیح منفرد این باکتری‌ها به شیر، رشد و اسیدسازی بسیار کند است. وجود برخی از مواد مغذی در مقادیر ناکافی یا غیر قابل دسترس، عامل اصلی رشد ضعیف این باکتری‌هاست (۴، ۳). کمبود اسیدهای آمینه و پپتیدها در شیر از یک سو و ضعف این باکتری‌ها در فعالیت‌های پروتئولیتیک از سوی دیگر، کندی رشد و طولانی شدن زمان تخمیر را به دنبال دارد (۵). افزودن پروتئین‌های آب‌پنیر (به شکل هیدرولیز شده، کنسانتره یا پودر) بر سرعت رشد و اسیدسازی مؤثر است. کازئین هیدرولیز شده، رشد را به طور موثر بالا می‌برد و هر چه این هیدرولیز کامل‌تر باشد، اسیدسازی و رشد باکتریای‌ها نیز بیشتر خواهد بود. این مشاهده حاکی از ناتوانی تجزیه پروتئین و نیازمندی پروبیوتیک‌ها به پپتیدها و اسیدهای آمینه موجود در پروتئینِ هیدرولیز شده است (۶، ۱).

یکی از بهترین روش‌های توصیه شده برای افزایش رشد پروبیوتیک‌ها، کوتاه کردن زمان تخمیر و دستیابی به عطر و طعم مطلوب، استفاده از تلقیح همزمان یک کشت کمکی در کنار باکتری‌های پروبیوتیک است (۶). کشت آغازگر ماست می‌تواند رشد پروبیوتیک‌ها را از طریق تولید مواد لازم برای رشد آن‌ها یا کاهش غلظت اکسیژن تقویت کند. بیفیدوباکترها، بی‌هوازی و نسبت به غلظت اکسیژن، بسیار حساس هستند، اما در پی کشت آن‌ها همراه با سویه مناسب *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، می‌توان بقای بیفیدوباکتر و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را بهبود بخشید. *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* نیز به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی خود و از طریق افزایش قابلیت دسترسی به اسیدهای آمینه والین، گلیسین و هیستیدین به رشد و فعالیت پروبیوتیک‌ها کمک می‌کند (۷).

نوع و درصد تلقیح کشت کمکی، ترکیب پایه شیر اولیه (ماده جامد و غنی‌سازی) و دمای گرمخانه‌گذاری، سه عامل مهم در رشد باکتریایی و اسیدسازی شیر تلقیحی طی گرمخانه‌گذاری هستند. تحقیقات Kneifel در سال ۱۹۹۳ نشان داد که افزودن عوامل محرک رشد یا انتخاب دمایی کم‌تر از گرمای مورد نیاز برای تولید ماست، به رشد پروبیوتیک‌ها در ماست کمک می‌کند (۴). به منظور افزایش ارتقای ضریب رشد پروبیوتیک‌ها Dave و Shah در سال ۱۹۹۸ تأثیر افزودن هیدرولیزهای پروتئینی شیر را بر رشد و اسیدسازی این باکتری‌ها بررسی و اعلام کردند که تأثیر این غنی‌کننده‌ها بر افزایش رشد و اسید سازی بیفیدوباکترها کاملاً معنی دار و در مورد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ناچیز است (۳). Gardini نیز در ۱۹۹۹ این یافته‌ها را تأیید و اعلام کرد که غنی‌سازی شیر با پروتئین‌های آب پنیر، بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تأثیری ندارد، ولی رشد و بقای بیفیدوباکترها را افزایش می‌دهد (۸). Diana-Martin در سال ۲۰۰۳ اعلام کرد که کنسانتره[۶] پروتئینی آب پنیر (WPC)، سرعت اسیدسازی را افزایش و زمان تخمیر را کاهش داده و در حالی که بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تأثیر معنی‌دار ندارد و در تحریک رشد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و بیفیدوباکتر موثر است (۹). تحقیقات Janer و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داد که کازئینوماکروپپتید (CMP) و WPC می‌توانند رشد بیفیدوباکترها را در شیر افزایش دهند و تأثیر WPC بیش از CMP است (۱۰). Lucas در سال ۲۰۰۴ اعلام کرد که در صورت استفاده از هیدرولیزهای پروتئینی آب پنیر و کازئین، رشد گونه‌های پروبیوتیک کاهش یافته، رشد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* تسریع می‌شود و اسیدسازی حین تخمیر افزایش می‌یابد (۱۱). Kristo و همکاران در سال ۲۰۰۳ تأثیر ماده جامد شیر، درصد تلقیح و دمای

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-10]

گرمخانه‌گذاری را بر رشد و بقای باکتریایی و اسیدسازی شیرِ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و باکتری‌های ماست، ارزیابی و اعلام کردند که ماده جامد شیر اولیه، بر رشد این باکتری اثر مثبت دارد. دمای گرمخانه‌گذاری هم تأثیر مشخصی بر رشد و اسیدسازی دارد و در کم‌ترین دما (۳۸°C-۳۶) بیش‌ترین رشد مشاهده می‌شود (۱۲). Ostlie در سال ۲۰۰۴ اعلام کرد که از میان دماهای مختلف سرعت رشد شش گونهٔ پروبیوتیک در ۳۷ °C بیش از سایرین مشاهده شد (۵).

در این پژوهش، برای اولین بار تاثیر ترکیب شیر، درصد تلقیح (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و کشت آغازگر) و دمای تخمیر بر رشد میکروارگانیسم‌های موجود در ماستِ پروبیوتیکِ حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5 و با استفاده از طرح آزمایشی تاگوچی در آرایه L-18 بررسی و شرایط مناسب تولید ماست پروبیوتیک با حداکثر رشد و بقا تعیین شد. نتایج حاصل از این تحقیق برای ادامه فعالیت در زمینه تولید فراورده‌های پروبیوتیکی شیر سودمند خواهد بود.

• مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه‌ها: محیط کشت MRS و مواد مربوط به آزمون‌های شیمیایی از شرکت *مرک آلمان* خریداری شد. شیر خشک بدون چربی و عاری از آنتی‌بیوتیک از کارخانه *پگاه تهران* و پودر آب پنیر شیرین از کارخانه *پگاه گرگان* تهیه شد. سایر دستگاه‌های مورد نیاز این تحقیق عبارت بودند از: انکوباتور(Memmert آلمان، مدل Wb-14)؛ انکوباتور یخچال‌دار (Gallen-kamp)، اتوکلاو، بن ماری، ترازوی آنالیتیک، pH متر(Crison اسپانیا)، دستگاه هموژن (APV دانمارک)، میلکواسکن، پرگنه شمار، جار بی‌هوازی (مرک آلمان، از نوع گازپک).

میکروارگانیسم‌ها: دو کشت باکتریایی تجاری مورد استفاده شامل کشت ترکیبی ماست (YF-3331) حاوی *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، و کشت تک سویه پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (La-5)، هر دو به صورت خشک شدهٔ انجمادی و از نوع DVS از شرکت دانمارکی کریستین هانسن خریداری شد. دلیل انتخاب *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5 به عنوان سوش پروبیوتیک این بود که بین دو گونهٔ رایج باکتری پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و بیفیدوباکتر) در فراورده‌های شیری پروبیوتیک؛ *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* Bb-12 در pH حدود ۵/۵ بقای مناسبی ندارد، اما *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در این pH به خوبی زنده می‌مانَد (۱۳). عدم سازگاری Bb-12 در دمای ۴۵°C، محیط هوازی و شرایط اسیدی و در عین حال، رشد مطلوب *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5 در این شرایط نشان داده شده است (۱۳). با توجه به شرایط گرمخانه‌گذاری و pH نهایی فراورده، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5 به عنوان باکتری پروبیوتیکی مورد استفاده در این پژوهش انتخاب شد.

طراحی آزمایش: در این تحقیق، چگونگی تأثیر ۵ متغیر (درصد شیر خشک، درصد پودر آب پنیر، نسبت تلقیح آغازگر ماست، تلقیح باکتری پروبیوتیک و دمای گرمخانه‌گذاری) در ۳ سطح بر رشد و بقای باکتری پروبیوتیک، مورد بررسی قرار گرفت. برای کاهش تعداد آزمایش مورد نیاز، کاهش زمان و هزینه تحقیق، افزایش قدرت تفسیر داده‌ها و امکان استخراج حداکثر اطلاعات از حداقل آزمایش‌ها، از طرح عاملی کسری و روش آماری تاگوچی استفاده شد. به کمک این روش، ضمن کاهش تعداد آزمایش، سهم هر متغیر در ایجاد پاسخ نهایی مشخص و شرایط بهینه تعیین می‌شود. ۵ متغیر و سطوح مربوطه برای هر یک در جدول ۱ آورده شده است. با استفاده از برنامه آماری تاگوچی و نرم افزار Qualitek-4، ۱۸ فرمولاسیون، تعریف و در آرایه‌های متعامد ۱۸ گانه، مطابق جدول ۲ چیده شد. آرایه‌های جدول با رعایت اصل تصادفی کردن انجام شد و رشد و بقای باکتری پروبیوتیک به عنوان پاسخ‌های سیستم (متغیرهای وابسته) اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-10]

جدول ۱- متغیرهای مورد بررسی در سه سطح و مقادیر عددی آن‌ها

سطح	شیرخشک بدون‌چربی %w/w	پودر آب پنیر %w/w	کشت آغازگر %w/v	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* %w/v	دما °C
۱	۱۰	۰	۰/۲	۰/۱	۳۷
۲	۱۲	۰/۷۵	۰/۴	۰/۳	۴۰
۳	۱۴	۱/۵	۰/۸	۰/۵	۴۳

جدول ۲- آرایه متعامد L_{18} برای بررسی اثر متغیرهای فیزیکی وشیمیایی بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به روش تاگوچی[a]

نمونه	شیرخشک	پودرآب پنیر	مایه ماست	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*	دما
۱	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۲	۲	۲	۲
۳	۱	۳	۳	۳	۳
۴	۲	۱	۱	۲	۲
۵	۲	۲	۲	۳	۳
۶	۲	۳	۳	۱	۱
۷	۳	۱	۲	۱	۳
۸	۳	۲	۳	۲	۱
۹	۳	۳	۱	۳	۲
۱۰	۱	۱	۳	۳	۲
۱۱	۱	۲	۱	۱	۳
۱۲	۱	۳	۲	۲	۱
۱۳	۲	۱	۲	۳	۱
۱۴	۲	۲	۳	۱	۲
۱۵	۲	۳	۱	۲	۳
۱۶	۳	۱	۳	۲	۳
۱۷	۳	۲	۱	۳	۱
۱۸	۳	۳	۲	۱	۲

[a] سطوح ۱، ۲ و ۳ هر متغیر مطابق با مقادیر کمّی ارائه شده در جدول ۱ تنظیم شده است.

تولید پروبیوتیک: برای تولید ماست پروبیوتیک، ابتدا ۱۸ پایه حاوی مقادیر مشخص شیر خشک و پودر آب پنیر تهیه شد (طبق جدول‌های ۱ و ۲). فرایند حرارتی $95^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه، برای کلیه پایه‌ها اِعمال شد. پس از خنک شدن پایه‌ها و تلقیح، گرمخانه‌گذاری در دماهای مختلف و نسبت‌های تلقیح‌های متفاوت مطابق جدول‌های ۱ و ۲ صورت پذیرفت. هر نمونه شیر تلقیح شده به دو حجم ۱۰۰ میلی‌لیتری تقسیم شد و آزمون‌های شمارش میکربی بر روی نمونه‌های شیر قبل (A) و بعد از گرمخانه‌گذاری(B) انجام شد.

آزمون میکروبی: برای هر فرمولاسیون (با سه تکرار براساس طراحی آزمایش)، نمونه‌های A و B مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور از ml ۱ نمونه، سری رقت تهیه شد و کشت به روش پورپلیت روی محیط MRS-Bile آگار انجام شد (۱۴). شمارش پرگنه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بعد از ۷۲ ساعت

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-10]

گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C و در شرایط هوازی انجام گرفت. با تفاضل میانگین شمارش شده A و بعد B به عنوان لگاریتم رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* برای هر فرمولاسیون، مطابق رابطه (۱) محاسبه و به صورت cfu در میلی لیتر شیر گزارش شد.

(رابطه۱):

$$lgcfu/ml(B)- lgcfu/ml(A)= lgcfu/ml(growth)$$

با شمارش پرگنه باکتری‌ها در رقت‌های مختلف، میزان رشد باکتری پروبیوتیک در فراوردهٔ نهایی هر آرایه از رابطه۲ بر حسب cfu/ml محاسبه شد:

(رابطه۲):

$$cfu/ml=[(c_1+c_2)/(n_1+n_2)/10]\times 1/d$$

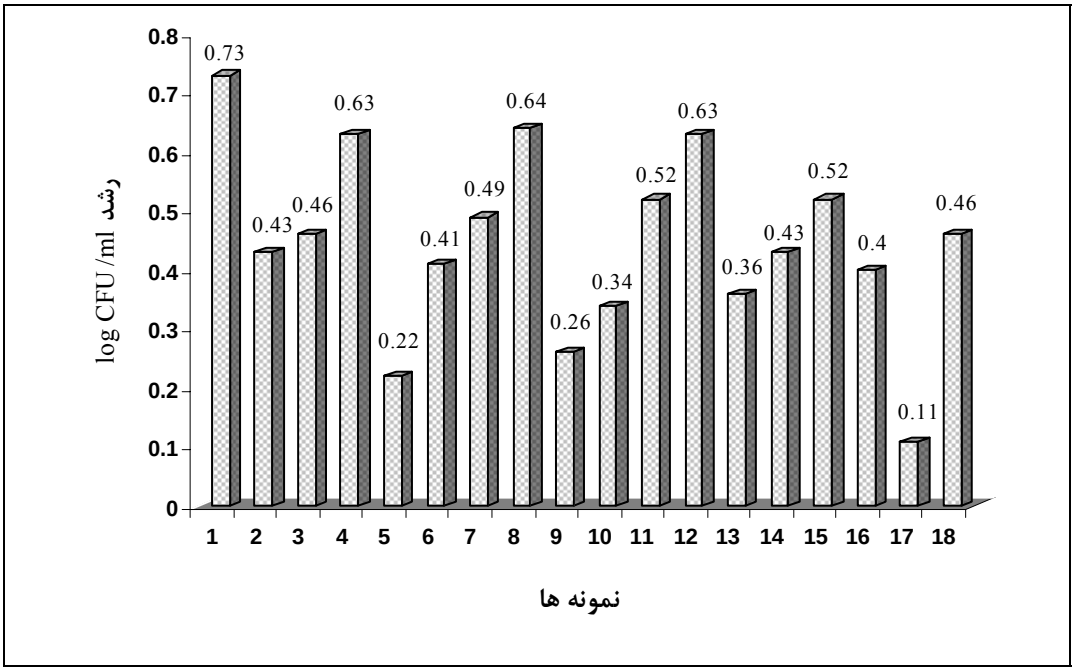
که در آن C_1 و C_2 شمارش حاصل از رقت d با تکرارهای n_1 و n_2 است.

آنالیز آماری: همان‌گونه که بیان شد، طراحی آزمایش و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار Qualitek-4 و برنامه آماری تاگوچی در آرایه L_{18} انجام شد و سطح بهینه هر متغیر و سهم مشارکت آن بر پاسخ نهایی (شمارش میکربی به عنوان متغیر مستقل) تعیین شد.

• یافته‌ها

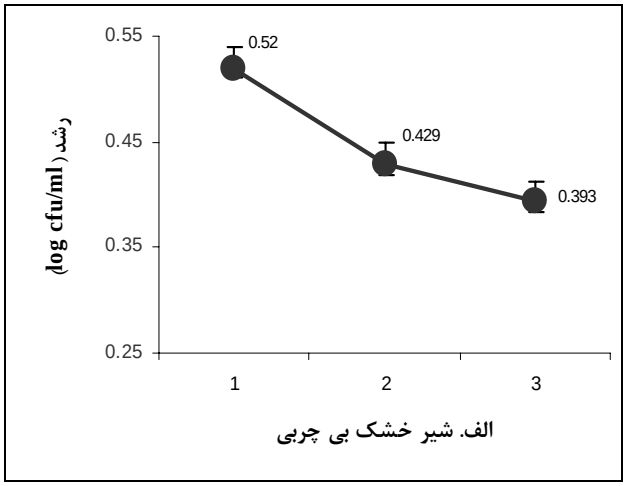
نتایج حاصل از رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (مربوط به طراحی ۱۸ گانه جدول ۲) در شکل۱ به صورت ستونی نشان داده شده است. لگاریتم رشد باکتری پروبیوتیک بر حسب cfu/ml و با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد. طبق این شکل، کم‌ترین و بیش‌ترین رشد باکتری در تیمار ۱۷ و ۱ جدول ۲ (معادل ۰/۱۱ و ۰/۷۳ lgcfu/ml) به دست آمد.

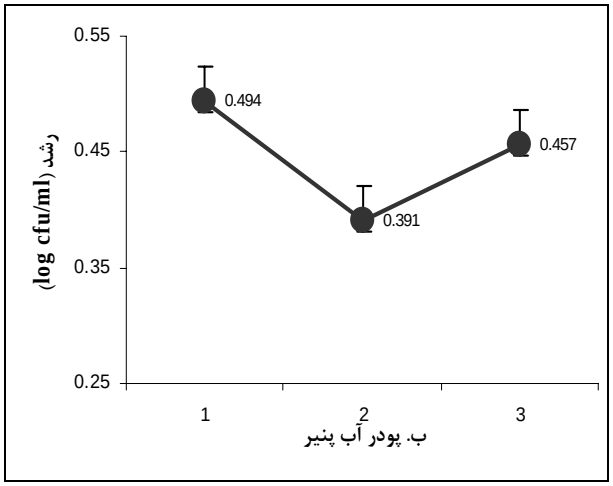
شکل ۲ به ترتیب تأثیر جداگانه متغیرهای شیرخشک بدون چربی، پودر آب پنیر، درصد تلقیح آغازگر ماست، درصد پروبیوتیک و دما را در ۳ سطح بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نشان می‌دهد. شکل ۲-الف، حاکی از آن است که افزودن شیر خشکِ بدون چربی در غلظت ۱۰٪ نسبت به مقادیر ۱۲٪ و ۱۴٪ به رشد بیشتر باکتری پروبیوتیک منجر شده و حداکثر میانگین رشد، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* معادل ۰/۵۲logcfu/ml حاصل شد. کمترین رشد معادل ۰/۳۹۳ log cfu در میلی‌لیتر فراورده، پس از افزودن ۱۴٪ وزنی شیر خشک بدون چربی حاصل شد.

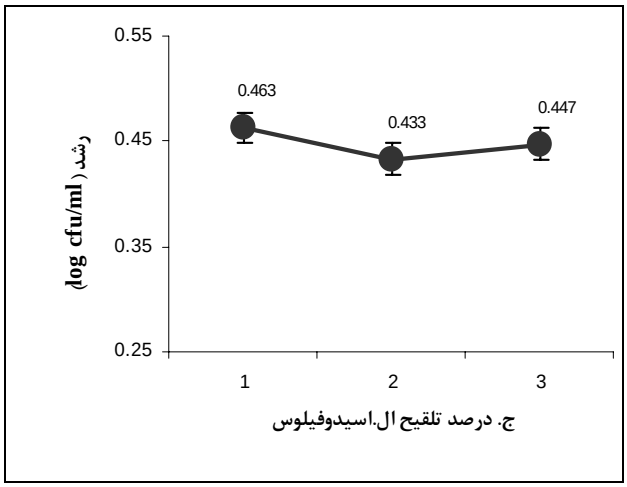


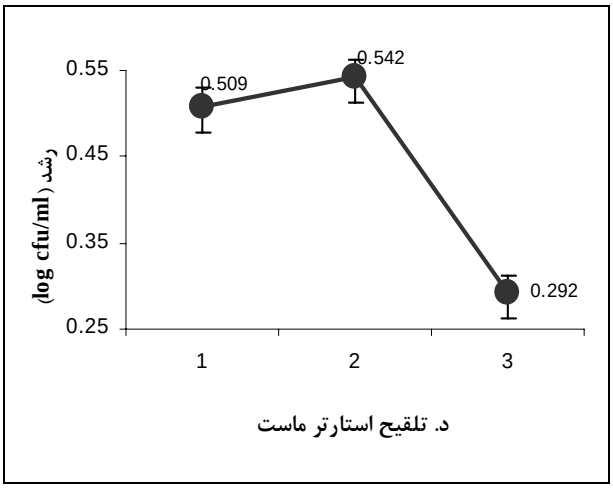
شکل ۱- میزان رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در اثر تغییرات متغیرهای فیزیکی و شیمیایی طی ۶ ساعت گرمخانه‌گذاری

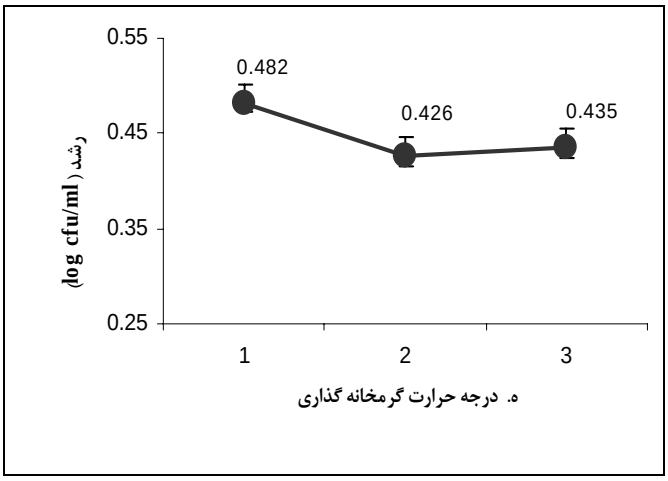
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-10]











شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف متغیرهای فیزیکی و شیمیایی محیط کشت بر شمارش میکروبی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی مدت گرمخانه‌گذاری. سطوح ۱ تا سه هر متغیر مطابق مقادیر تعریف شده در جدول ۱ است.

الف) شیر خشک بدون چربی؛ ب) پودر آب پنیر؛ ج)درصد تلقیح *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*؛ د) میزان تلقیح کشت آغازگر ماست؛ه)دمای گرمخانه‌گذاری

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-10]

شکل ۲-ب، بیانگر تأثیر پودر آب پنیر در سه سطح (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ درصد وزنی) بر رشد باکتری است. اگر چه پودر آب پنیر به عنوان غنی‌کننده به شیر اضافه شد، اما نقش مثبتی در تحریک رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نشان نداد و در سطح ۱ (عدم حضور آن در فراورده) حداکثر رشد در حدود ۰/۵۰ log cfu در میلی‌لیتر فراورده مشاهده شد. کمترین رشد در سطح دوم (پودر آب پنیر به میزان ۰/۷۵) مشاهده شد، اما رشد پس از افزودن آب پنیر با غلظت ۱/۵٪ (سطح سوم) تا حدودی افزایش یافت.

تأثیر درصد تلقیح *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر رشد باکتری در شکل ۲-ج آمده است. درصدهای مختلف تلقیح، تاثیر معنی‌داری بر میزان رشد نداشت. تلقیح درصد کم باکتری به رشد مناسب‌تری منتج شد. میزان تلقیح کم باعث می‌شود که مواد غذایی مورد نیاز (به ویژه منبع نیتروژن) به میزان کافی در اختیار جمعیت میکروبی قرار بگیرد و تولید توده‌ٔ سلولی افزایش یابد. در حالی که با افزایش درصد تلقیح، گرچه در شروع فرایند، تعداد میکروارگانیسم‌ها به سرعت افزایش می‌یابد، اما تنگ شدن میدان رقابت جهت دستیابی به منابع غذایی، منجر به ظهور زودرس فاز سکون رشد باکتری می‌شود. چنین پدیده‌ای در مورد میزان درصد تلقیح در فرآیندهای زیست‌فناوری مشابه نیز گزارش شده است (۱۵).

مطابق شکل ۲-د کشت آغازگر ماست در میزانی معادل ۰/۴٪ (سطح ۲) رشد لاکتوباسیلوس را حداکثر تا ۰/۵۴۲ logcfu در هر میلی‌لیتر فراورده افزایش داد که حداکثر رشد مشاهده شده نسبت به سایر غلظت‌های انتخاب شده کشت آغازگر ماست در این تحقیق بود. افزایش نسبت تا ۰/۸٪ (سطح سوم)، نه تنها افزایش رشد را به دنبال نداشت، بلکه به کاهش معنی‌دار آن منجر شد. توجیه مناسب این مشاهده می‌تواند به فعالیت پروتئولیتیکی مثبت *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و مصرف اکسیژن توسط *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و فراهم آمدن شرایط رشد مطلوب برای باکتری‌های پروبیوتیک مربوط باشد. با وجود این، در تحقیق حاضر مشخص شد که با افزایش بیش از حد تعداد باکتری‌های مایه ماست در واحد حجم و فعالیت آن‌ها، رشد *لاکتوباسیلوس* اسیدوفیلوس به طور معنی‌دار کاهش می‌یابد. این مسئله می‌تواند به ایجاد رقابت بر سر منابع کربن و نیتروژن موجود از یک طرف و از طرف دیگر افزایش اسیدیته محیط در اثر فعالیت *لاکتوباسیلوس بلگاریکوس* مرتبط باشد (۱۶). پس درصد پیشنهادی برای کشت آغازگر ماست، به منظور دستیابی به بیشترین رشد باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، سطح دوم یعنی ۰/۴٪ حجمی (معادل درصد تلقیح پیشنهادی شرکت سازنده استاتر) است.

شکل ۲-ه بیانگر تاثیر دمای گرمخانه‌گذاری بر رشد باکتری پروبیوتیک است. درجه حرارت از عوامل مهم در سرعت رشد و فعالیت باکتری‌ها است. مطلوبیت سطح اول (۳۷°C) در رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، ویژگی میانه‌دوستی (mesophile) آن را به اثبات می‌رساند. در دماهای ۴۰ و ۴۳ درجه سانتی‌گراد، کاهش ملایمی در رشد باکتری مشاهده شد.

سطح بهینه موضعی متغیرها (local optimum) (بهینه در بین سطوح بررسی شده در این تحقیق) و میزان عددی هر یک از آن‌ها در رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدول ۳ نشان داده شده است. علاوه بر آن، میزان مشارکت هر متغیر در ایجاد پاسخ نهایی یا شمارش میکروبی نیز در این جدول محاسبه شده است. طبق نتایج جدول ۳ درصد مایه تلقیح ماست، موثرترین متغیر شناخته شد. در حالی که کمترین تاثیر بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* درصد تلقیح باکتری پروبیوتیک و دمای گرمخانه‌گذاری بود.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-10]

جدول ۳- سطح بهینه و میزان مشارکت تاثیر متغیرهای فیزیکی وشیمیایی بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی گرمخانه‌گذاری

متغیرها	میزان مشارکت (٪)	سطح	مقدار عددی
شیر خشک بی چربی	۲۷/۵۰	۱	۱۰
پودر آب پنیر	۱۷/۶۲	۱	۰
میزان تلقیح *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*	۵/۷۴	۱	۰/۱
میزان تلقیح ماست	۳۶/۰۱	۲	۰/۴
دما	۱۳/۰۲	۱	۳۷

آزمون تایید نهایی: یکی از مزایای مهم روش تاگوچی این است که علاوه بر تعیین سطح مناسب برای هر متغیر، می‌تواند پاسخ نهایی سیستم را در بهترین شرایط پیش‌بینی کند. در حالی که آرایه بهینه ممکن است در میان آرایه‌های جدول متعامد طرح آزمایشی وجود نداشته نباشد؛ نرم افزار Qualitek-4 می‌تواند علاوه بر تعیین تیمار ترکیبی، پاسخ را شبیه‌سازی کند و تخمین را گزارش دهد (۱۷). اگر شرایط بهینه موضعی پیش گویی شده در جدول تیمارها وجود نداشته باشد، لازم است که آزمایش تاییدی انجام و صحت پاسخ نهایی سیستم (در اینجا رشد باکتری‌ها) بررسی شود. هرقدر سهم خطا کم‌تر، عوامل مداخله‌گر محدودتر و دقت آزمایشگر بیش‌تر باشد، پاسخ تخمینی نرم افزار با پاسخی که از طریق آزمایش به دست می‌آید، نزدیک‌تر خواهد بود. در این تحقیق، شرایط بهینه موضعیِ به دست آمده در جدول متعامد L_{18} (مطابق جدول ۲) وجود ندارد و پاسخ سیستم برابر ۰/۸۴ log cfu/ml پیش بینی شد. از این رو، آزمون مطابق تیمار بهینه انجام شد. پس از انجام تیمار بهینه، میزان رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La5، log ۰/۸۹ cfu/ml به دست آمد. نزدیک بودن پاسخ های تئوری و عملی (α کمتر از ۰/۰۵) حاکی از کم بودن میزان خطا در آزمایش از یک سو (به دلیل کافی بودن تعداد تکرار و دقت آزمایشگر) و عدم وجود برهم کنش بین متغیرها از سوی دیگر است (۱۶).

• بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که درصد پودر شیر خشک اضافه شده (به منظور افزایش ماده جامد اولیه شیر) رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را کاهش می‌دهد. این مشاهده را می‌توان به فعالیت پروتئولیتیک محدود باکترهای پروبیوتیک و تمایل آن‌ها به پتانسیل اکسیداسیون و احیاء کم و شرایط بی‌هوازی نسبت داد. به عبارت دیگر، افزایش درصد پودر شیر خشک (که با هدف یکسان نگه داشتن پایه شیر و به حداقل رساندن تغییر در ترکیب شیر، یکی از متغیرهای این تحقیق بود) به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی شدید باکتری‌های آغازگر ماست، نوعی شرایط رشد انتخابی برای آن‌ها فراهم می‌آورد. البته طبق گزارش *کریستو* و همکاران در سال ۲۰۰۳ افزایش درصد ماده جامد اولیه شیر بر رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* مناسب ارزیابی شده است (۱۲).

پودر آب پنیر، در این تحقیق به عنوان یک غنی کننده و با هدف بررسی امکان استفاده از این فراورده جانبی کارخانجات شیر کشور در تولید فراورده‌های پروبیوتیک و بررسی اثر آن بر رشد و بقای باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاکی از کاهش رشد از سطح اول به دوم و افزایش نسبی در پی رسیدن از سطح دوم به سوم بود. می‌توان پیش‌بینی کرد که افزایش بیشتر درصد این ماده غنی کننده بتواند رشد باکتری‌ها را افزایش دهد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-10]

افزایش درصد بخش پروتئینی آب پنیر، عامل اصلی رشد مطلوب *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است (۱۶). با این حال، تحقیقات دیو و *شاه* در سال ۱۹۹۸ نشان داد که افزودن فراورده‌های هیدرولیز پروتئین شیر و آب پنیر، در مقایسه با سیستئین، کنسانتره پروتئینی آب پنیر، هیدرولیز اسیدی کازئین و تریپتون، بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تاثیر معنی‌دار ندارد (۳). *مارتین* نیز در سال ۲۰۰۳ نشان داد که کنسانتره پروتئینی آب پنیر، بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بی‌تاثیر است (۹).

نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که افزایش درصد تلقیح *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر رشد نهایی باکتری تاثیر معنی‌دار ندارد. اما اثر تحریکی میزان تلقیح باکتری‌های ماست بر رشد باکتری پروبیوتیک جالب توجه است. طبق گزارش‌های علمی موجود، باکتری‌های ماست باید بتوانند از طریق ایجاد شرایط مناسب و تولید ترکیبات ساده و قابل دسترس رشد پروبیوتیک‌ها را افزایش دهند (۱۳). در این تحقیق مشخص شد که افزایش حضور باکتری‌های ماست از سطح اول به دوم (۲٪ به ۴٪) رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را افزایش می‌دهد، اما زمانی که تعداد باکتری‌های ماست از این حد بیشتر شود (۴٪ به ۸٪) افت ناگهانی در رشد باکتری‌ها پروبیوتیک مشاهده می‌شود. بنابراین تنظیم درصد تلقیح باکتری‌ها در این نوع پژوهش بسیار حائز اهمیت است.

رشد مطلوب *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در دمای ۳۷°C مؤید خاصیت میانه دوستی این باکتری است. بنابراین، طبق پیشنهاد *کنیفل* در سال ۱۹۹۳ می‌توان با تنظیم دمای گرمخانه‌گذاری در حدود ۳۷°C شرایط رشد را برای باکتری پروبیوتیک مناسب و رشد سایر باکتری‌ها را محدود کرد (۴).

در این تحقیق، استفاده از طراحی عاملی کسری، بررسی تأثیر پنج متغیر در سه سطح بر رشد باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در مدت گرمخانه‌گذاری ماست پروبیوتیک را امکان‌پذیر کرد. به این ترتیب با استفاده از شیر خشک بدون چربی w/w٪ ۱۰؛ بدون افزودن پودرآب پنیر؛ میزان تلقیح *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* w/v٪ ۰/۱ میزان تلقیح کشت آغازگر ماست v/v٪ ۰/۴ و دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷°C می‌توان به حداکثر تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست پروبیوتیک (برابر ۰/۸۹ log cfu/ml) دست یافت.

برای ادامه کار و استفاده از نتایج این تحقیق، پیشنهاد می‌شود که ضمن استفاده از سایر سوش‌های پروبیوتیک و بررسی بقاء و ویژگی‌های فراوردهٔ حاصل، امکان فرموله کردن فراوردهٔ مشابه، اثر ترتیب متفاوت تلقیح پروبیوتیک و کشت آغازگر و اجزای مختلف پروتئینی آب پنیر مطالعه شود. همچنین، ارزیابی روند تولید ترکیبات موثر در عطر و طعم فراورده، تولید فراورده مشابه با طعم شیرین و استفاده از آب‌میوه‌جات برای رقیق‌سازی و ارزیابی پذیرش آن توسط دانش‌آموزان پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-10]

• References

1. Shortt C. The probiotic century: historical and current perspectives. Trends Food Sci Technol 1999; 10 (12): 411-417.

2. International Dairy Federation. Fermented milks: science and technology. IDF Bulletin 1998; 227.

3. Dave RI, & Shah NP. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. J Dairy Sci 1998; 81: 2804-2816.

4. Kneifel W, Jaros D, Erhard F Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. Int J Food Microbiol 1993; 18: 179-189.

5. Ostlie HM, Helland MH, Narvhus JA. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. Int J Food Microbiol 2003: 87: 17-27.

6. Hatting AL, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. Int Dairy J 2001; 11: 1-17.

7. Gomes MP, Malcata FX. Bifidobacterium spp. and *Lactobacillus aciduphilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends Food Sci Technol 1999; 10: 139-157.

8. Gardini F, Lanciotti R, Guerzoni ME, Torriani S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. Int Dairy J 1999; 9: 125-134.

9. Martin-Diana, AB, Janer C, Pelaez C, Requena T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. Int Dairy J 2003; 13: 827-833.

10. Janer C, Pelaez C, Requena T. Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. Food Chem 2004; 86: 263-267.

11. Lucas A, Sodini I, Monnet C, Jolivet P, Corrieu G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. Int Dairy J 2004; 14: 47-53.

12. Kristo E, Biliaderis CG, Tzanetakis N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. Int Dairy J 2003; 13: 517-528.

۱۳. مویدنیا ن، احسانی م ر. تولید شیر تخمیر شده پروبیوتیکی با استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و بیفیدوباکتریوم. گروه صنایع غذایی، [پایان‌نامه کارشناسی ارشد] تهران: دانشگاه آزاد اسلامی؛ ۱۳۸۳.

14. International Dairy Federation. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus* culture media. IDF Bulletin 1995; 306: 23-33.

15. Khosravi-Darani K, Vasheghani-Farahani E, Shojaosadati SA. Application of the taguchi design for production of poly(β-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*, Iran. J Chem Chem Eng 2004; 23: 131-136.

۱۶. طاهری پ، احسانی م ر، خسروی دارانی ک، رضوی س ه. بررسی امکان تولید و نگهداری نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک با استفاده از کشت باکتریایی گرمادوست و میاندوست، گروه صنایع غذایی، [پایان نامه کارشناسی ارشد] تهران: دانشگاه آزاد اسلامی ۱۳۸۵.

17. Logothetis N, Wynn HP. In: Quality through design: Experimental design, off line quality control and Taguchi's contribution. Clarendon press. Oxford; New York, USA, 1989.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-10]