

اثر دمای تخمیر و نسبت تلکیح باکتری‌های آغازگر بر تولید اسید پروپیونیک در نوشیدنی شیری تخمیر شده با پروپیونیک باکتریوم

شهلا فرهادی^۱، کیانوش خسروی دارانی^۲، مرتضی مشایخ^۳، سید امیر محمد مرتضویان^۳، عبدالرضا محمدی^۳، فرزانه شهراز^۴

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، انتستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، انتستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
بهشتی پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com
۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انتستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، انتستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۷

چکیده

سابقه و هدف: روند روزافزون چاقی و اضافه وزن به شکل‌گیری ایده تولید محصولات غذایی با خاصیت تشدیدکنندگی سیگنال‌های سیری منجر شده است. نقش اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در ایجاد مهمن است. هدف تحقیق حاضر بررسی اثر دو متغیر دمای گرمخانه‌گذاری و نسبت تلکیح باکتری‌های آغازگر بر میزان تولید اسید پروپیونیک در نوشیدنی شیری تخمیری حاوی پروپیونیک باکتریوم پس از تخمیر و طی دوره نگهداری یخچالی است.

مواد و روش‌ها: برای تهیه نوشیدنی شیری تخمیری از کشت مخلوط لاکتوپاسیلیوس اسیدوفیلیوس و پروپیونیک باکتریوم فرئودنریچی بی زیرگونه شرمانی بی به ترتیب، به نسبت‌های ۱ به ۱، ۱ به ۴ و ۱ به ۸ و دمای گرمخانه‌گذاری ۳۰، ۳۵ و ۴۰ °C تا رسیدن به pH = ۴ استفاده شد. میزان اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک تولید شده در کلیه نمونه‌ها بالاصله پس از تخمیر توسط دستگاه HPLC تعیین شد. غلظت اسیدهای تولید شده در نوشیدنی شیری تخمیری حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی اندازه‌گیری شد. ارزیابی حسی محصول تولید شده در پایان دوره تخمیر توسط ۱۱ ارزیاب آموزش دیده با استفاده از روش هدونیک انجام شد.

یافته‌ها: بیشترین میزان اسید پروپیونیک در پی تلکیح با نسبت ۱ به ۴ لاکتوپاسیلیوس/اسیدوفیلیوس به پروپیونیک باکتریوم فرئودنریچی بی زیرگونه شرمانی بی و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C حاصل شد. میزان این اسید طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی از ۰/۷۵ درصد (وزنی/وزنی) در روز صفر به ۱/۲ درصد (وزنی/وزنی) در روز ۲۸ افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: دمای گرمخانه‌گذاری اثر معکوس و معنی‌داری ($P < 0.05$) بر میزان تولید اسید پروپیونیک در محصول داشت.

وازن کلیدی: اسید پروپیونیک، پروپیوتیک، پروپیونیک باکتریوم فرئودنریچی بی زیرگونه شرمانی بی، لاکتوپاسیلیوس/اسیدوفیلیوس، نوشیدنی شیری تخمیری

۴ مقدمه

به علاوه، تولید چنین محصولی فرصتی را برای صنایع غذایی به منظور تأمین نیازهای تغذیه‌ای و تنوع بخشیدن به طیف فراورده‌های تولیدی لبی امکان‌پذیر می‌سازد. عدم توازن انرژی دریافتی و مصرفی به عنوان دلیل اصلی چاقی در نظر گرفته می‌شود. گرچه تأمین تعادل انرژی دریافتی و مصرفی از طریق رژیم غذایی، فعالیت بدنی و اصلاح الگوی رفتاری

روند روزافزون چاقی و اضافه وزن و بار تحمیل شده از سوی چاقی بر سلامت و تندرستی افراد اعم از بیماری‌های قلبی عروقی به واسطه تشدید عوامل خطر فشارخون و کلسترول بالا، دیابت، انواع سرطان و حتی مرگ، به شکل‌گیری ایده تولید محصولات غذایی با خاصیت تشدیدکنندگی سیگنال‌های سیری در سبد غذایی انسان منجر شده است و با گذشت زمان با اهمیت‌تر جلوه می‌کند.

شمارش شده روی این محیط در روز ۳ را که نشان‌دهنده تعداد باکتری‌های اسید لاكتیک است، از تعداد شمارش شده در روز ۷ کم کرد. این اختلاف نمایانگر تعداد پروپیونی-باکتریوم‌ها است. زیرا پروپیونی-باکتریوم‌ها قبلاً از روز ۳ روی این محیط رشد نمی‌کنند (۶).

فوايد پروبيوتيك گونه‌های پروپیونی-باکتریوم به خوبی شناخته شده است. اين باكتري‌ها از طريق توليد اسيدهای چرب کوتاه زنجير بر pH روده اثر كرده و جذب آهن و کلسیم را افزایش می‌دهند (۷، ۸). از طرف ديگر، رشد بيفيد و باكتريوم‌ها را افزایش می‌دهند و از اين طريق، فلور ميکروبی روده را تنظيم می‌کنند و باعث حفظ سلامت دستگاه گوارش می‌شوند. در ضمن، اين باكتري‌ها از فعالیت آنزيم‌های تولید کننده عوامل موთازن جلوگيري و از اين طريق سистем ايمني بدن را تقويت می‌کنند (۹). پروپیونی-باکتریوم‌ها با مهار سنتز كلسترون در کبد از طريق Co.A ممانعت از فعالیت آنزيم هیدروکسی‌متیل-گلوتاریل (۱۰). سنتز و افزایش دفع اسيدهای صفراوي از مدفوع و ميزان كلسترون مصرفی به منظور سنتز مجدد اسيدهای صفراوي، می‌توانند سطح كلسترون پلاسمما را کاهش دهند (۱۱). برخی گونه‌های پروپیونی-باکتریوم قادر به تولید ویتامین‌های B₂ و B₁₂ هستند که اين موضوع به خصوص در کشورهای دچار کمبود و در رژيم افراد گیاهخوار اهمیت دوچندان می‌يابد (۱۲).

به کارگيري پروپیونی-باکتریوم‌ها در تهیه محصولات لبنی، علاوه بر تامين نيازهای تغذيه‌اي و ايجاد خاصیت سيرکنندگی (به واسطه تحریک ترشح پیتید روده‌ای YY به عنوان مهار کننده اشتها (۱۳-۱۵) و تأخیر تخلیه معدی ناشی از تولید اسيدهای چرب کوتاه زنجير به خصوص اسید پروپیونیک (۱۶)، (۱) فوايد ديگري نيز برای صنعت غذا در بردارد. از اين فوايد می‌توان به افزایش گرانبروي در محصولاتي نظير ماست (از طريق توليد اگزولپي ساکاريدها) (۱۷، ۹، ۱۸) و مهار رشد ميكروارگانيسم‌های نامطلوب در محصول (از طريق توليد اسييد پروپیونیك و باكتريوسین) و در نتيجه، افزایش ماندگاري محصول (۹) اشاره كرده. رشد پروپیونی-باکتریوم تداخلی با رشد باكتري‌های اسید لاكتیک در محصول لبنی ندارد (۹، ۱۹). در مطالعه انجام شده توسط Gurel و Ekinci (۲۰۰۸) از کشت همزمان باكتري‌های آغازگر ماست و تركيبات متفاوت پروپیونی-باکتریوم‌ها شامل پروپیونی-باکتریوم توانی‌بي (Propionibacterium thoenii) و

اغلب به کاهش وزن کوتاه مدت منجر می‌شود، ولی مشکل اصلی، حفظ وزن در طولاني مدت است.

توليد محصولات غذائي با خاصیت تشدید کنندگی سيگنانال‌های سيرى از ارزش ویژه‌اي برخوردار است. در اين ميان، نقش اسيدهای آلى، به خصوص اسيدهای چرب کوتاه زنجير (اسيدهای استيک، پروپیونيك و بوتيريك) در ايجاد سيرى حائز اهميت است (۱). با وجود مطالعات فراوانی که در زمينه استفاده از گونه‌های پروپیونی-باکتریوم در زمينه استفاده در تهيه پنير و Ruijschop (Propionibacterium) به عنوان استارتير در تهيه پنير و ماست انجام شده است، تنها در يك مطالعه که در سال ۲۰۰۸ توسط Ruijschop و همکاران انجام شد، قدرت سيرکنندگی نوشيدنی شيرى تخمیرى حاوی اسید پروپیونيك در مقایسه با نوشيدنی شيرى غير تخمیرى بررسی شد. در پژوهش Ruijschop نوشيدنی شيرى تخمیرى در مقایسه با نوشيدنی شيرى غير تخمیرى احساس گرسنگی و تمایل به خوردن را در افراد مصرف کننده به طور معنی داری کاهش داد (۱).

نتایج مطالعات انجام شده در خصوص شرایط رشد گونه‌های پروپیونی-باکتریوم نشان می‌دهد pH مناسب برای رشد گونه‌های پروپیونی-باکتریوم در دامنه ۶ تا ۷ قرار دارد. حداقل pH برای رشد، معادل ۸/۵ و حداقل ۴/۶ است و در pH کمتر از ۴/۶ حجم تلقيح بيشتری برای رشد مورد نياز است (۲). اين باكتري‌ها در محدوده دماي ۴۵°C - ۷°C رشد می‌کنند، اما دمای مناسب رشد آنها ۳۰°C است (۳). گونه‌های پروپیونی-باکتریوم در شرایط غيرهوازي يا در غلظت‌های پاين اكسيرن رشد می‌کنند (۴). در مورد توانايی تحمل نمک در مورد پروپیونی-باکتریوم فرئوندريرچي يى زير گونه شرمانى يى نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که تعداد باكتري‌ها در محیط حاوی g/Lit بيشتر از محیط فاقد نمک است (۵). به علاوه، بهترین منبع کربن از نظر غلظت نهایي و بهره‌وری اسید پروپیونيك، لاكتات است (۳). گونه‌های پروپیونی-باکتریوم روی محیط کشت سديم لاكتات آگار در شرایط غيرهوازي در دمای ۳۰°C و به مدت ۷ تا ۹ روز کلنی‌هایي قهوه‌ای با حاشيه ۲/۵ mm تشکيل می‌دهند. Lactobacillus acidophilus (اسييدوفييلوس) در صورت رشد روی اين محیط کلنی‌های ۰/۵ ميلی‌متری تشکيل می‌دهد که قابل تشخيص از يكديگر هستند. در صورت رشد باكتري‌های اسید لاكتيك می‌توان تعداد

محلول فسفات بافر سالین و گلیسرول به نسبت ۸۵ به ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شد و سوسپانسیون به دست آمده در ۱۵ ویال استریل ۱ میلی‌لیتری تقسیم شد و در فریزر -80°C - قرار گرفت.

به منظور تعیین تعداد دقیق باکتری موجود در هر ویال، یک ویال در رقت‌های 10^{-12} تا 10^{-6} روی محیط سدیم لاکتات آگار کشت داده شد. برای تهیه محیط کشت سدیم لاکتات آگار از ۱۰ g کازئین، ۱۰ g عصاره مخمر، ۱/۵ لاکتات سدیم، ۲ g پیرووات سدیم، ۲ g گلیسین، ۰/۵ g کلرید سدیم، ۰/۵ g تواین، ۰/۵ g دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات و ۱۲ g آگار در ۱۰۰۰ mL آب قطر استفاده شد. پس از تنظیم pH در دامنه 7 ± 0.2 محیط کشت تهیه شده در دمای 121°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۷ روز در دمای 30°C در شرایط غیرهوایی قرار داده شدند (۶). بر اساس نتایج به دست آمده، سوسپانسیون موجود در هر ویال تهیه شده حاوی 6×10^{10} cfu/mL پروپیونیک‌باکتریوم-فرئوندریچی بی زیرگونه شرمانی بی بود.

تولید نمونه‌ها: شیر مورد استفاده برای تولید نوشیدنی از طریق بازسازی پودر شیر خشک بی‌چربی و پس از استاندارد کردن ماده خشک (معادل $1/4$ ٪) تهیه شد. شیر تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 85°C حرارت داده شد. سپس از کشت مخلوط لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و پروپیونیک‌باکتریوم فرئوندریچی بی زیرگونه شرمانی بی به نسبت‌های ۱ به ۲، ۱ به ۴ و ۱ به ۸ و دمای گرمخانه‌گذاری 30°C ، 35°C و 40°C تا رسیدن به $\text{pH} = 4$ برای تهیه نوشیدنی شیری استفاده شد. طی تخمیر در انکوباتور شاخص‌های pH، اسیدیته قابل تیتر و پتانسیل احیا اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری میزان اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک: پس از هموزن کردن محصول توسط دستگاه اولتراتراکس 20 mL اسید‌سولفوریک $1/1$ مولار به 5 rpm نمونه تهیه شده اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت 3500 سانتریفوژ شد. فاز شفاف رویی به کمک فیلتر سرسرنگی $45\mu\text{m}$ فیلتر شد. 2 mL از محلول حاصل برای تزریق به دستگاه به کار رفت. میزان اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک تولید شده در محصول با استفاده از دستگاه HPLC مجهز به ستون ODS-5 اندازه‌گیری شد. برای آنالیز از فاز متحرک شامل اسید سولفوریک 10 g مولار (فاز متحرک A) و متانول (فاز متحرک B) و سرعت جريان

پروپیونیک‌باکتریوم جنسه‌نی بی (*Propionibacterium jensenii*) با میزان تلچیح 2% حجمی در تمامی نمونه‌ها برای تهیه ماست استفاده شد. براساس نتایج مطالعه و *Ekinici* و *Gurel* فعالیت پروپیونیک‌باکتریوم‌ها با آغازگرهای لاکتیک تداخلی نداشت و پروپیونیک‌باکتریوم‌ها به علت تولید اگزوبلی‌ساکارید، گرانروی محصول نهایی را افزایش دادند. در مطالعه آن‌ها به دلیل استفاده از باکتری‌های آغازگر ماست و کم بودن مدت زمان گرمخانه‌گذاری (به دلیل افت ناگهانی pH) میزان اسید پروپیونیک تولید شده در محصول قابل ملاحظه نبود (۹).

از آن جا که در زمینه تولید نوشیدنی شیری تخمیری حاوی اسید پروپیونیک در ایران، نه تنها در مقیاس صنعتی بلکه در مقیاس آزمایشگاهی نیز مطالعه‌ای انجام نشده است و با توجه به رشد روزافزون مصرف نوشیدنی‌های شیری تخمیری، هدف تحقیق حاضر به کارگیری پروپیونیک‌باکتریوم *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii* در تهیه نوشیدنی شیری تخمیری بود. با انجام این تحقیق، تولید نوعی غذای فراسودمند شیری امکان‌پذیر می‌شود که علاوه بر تأمین نیازهای تغذیه‌ای، خاصیت سیرکنندگی (satiety) نیز برای مصرف کننده دارد.

• مواد و روش‌ها

کشت آغازگر: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۵ La-5 از شرکت کریستین هنسن (Chr-Hansen) تهیه شد. پروپیونیک‌باکتریوم فرئوندریچی بی زیرگونه شرمانی بی (DSM 20270) نیز به صورت لیووفیلیزه از DSMZ خردباری و در محیط مایع پروپیونیک‌باکتریوم کشت و هر ماه پاساز داده شد. این محیط کشت شامل 1% کازئین، 0.5% عصاره مخمر و 1% لاکتات سدیم در 1000 mL آب قطر بود که پس از تهیه و تنظیم pH در دامنه $7 - 7/2$ در دمای 121°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. به منظور آماده‌سازی پروپیونیک‌باکتریوم فرئوندریچی بی زیرگونه شرمانی بی برای تلچیح 1 mL سوسپانسیون مادر حاوی 10^9 cfu/mL در 250 mL محیط مایع پروپیونیک‌باکتریوم پاساز داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور 30°C قرار داده شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت 250 mL محیط مایع در دمای 4°C و با سرعت 3000 g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از جدا کردن فاز رویی، به رسوب حاصل 25 mL فسفات بافر سالین اضافه و دوباره با سرعت g در دمای 4°C برای 15 دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب به دست آمده از این مرحله با 15 mL

اختصاری tc) از کنار هم قرار گرفتن دو متغیر در سه سطح بررسی شود. در مجموع ۹ تیمار تولید شده و هر تیمار در سه تکرار تهیه و آزمون شد. بنابراین، تعداد کل تیمارها ۲۷ به دست آمد. وجود تفاوت معنی دار میان میانگین داده های حاصل از تیمارهای اعمال شده، با استفاده از آزمون ANOVA در سطح معنی دار ۰/۰۵ با نرم افزار SPSS بررسی شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم شد.

• ماقته‌ها

تغییرات pH طی دوره تخمیر: شکل ۱ روند تغییرات pH طی دوره تخمیر را نشان می‌دهد. با گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها در دمای 30°C سه مرحله تا خیر، رشد لگاریتمی و سکون رشد مشخص است، ولی با افزایش دما از 30°C به 40°C تنها دو مرحله رشد لگاریتمی و سکون در نمودارها نمایان است. غلظت اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک در پایان دوره تخمیر: غلظت اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک تولید شده در نمونه‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در کلیه نمونه‌ها مقدار اسید استیک بیشتر از میزان اسید لاکتیک است. بیشترین میزان اسید پروپیونیک در نمونه تهیه شده با استفاده از نسبت لاکتوبراسیللوس/اسیدوفیلوس به پروپیونیک/اکترویوم فرئوندریچی برابر معادل ۱ به ۴ و گرمخانه‌گذاری در دمای 30°C تولید شد و این مقدار معادل $77/0$ درصد (وزنی/وزنی) بود. کمترین میزان اسید پروپیونیک متعلق به نمونه تهیه شده با استفاده از نسبت لاکتوبراسیللوس/اسیدوفیلوس به پروپیونیک/اکترویوم فرئوندریچی برابر معادل ۱ به ۲ و گرمخانه‌گذاری در دمای 40°C بود و این مقدار معادل $25/0$ درصد (وزنی/وزنی) است.

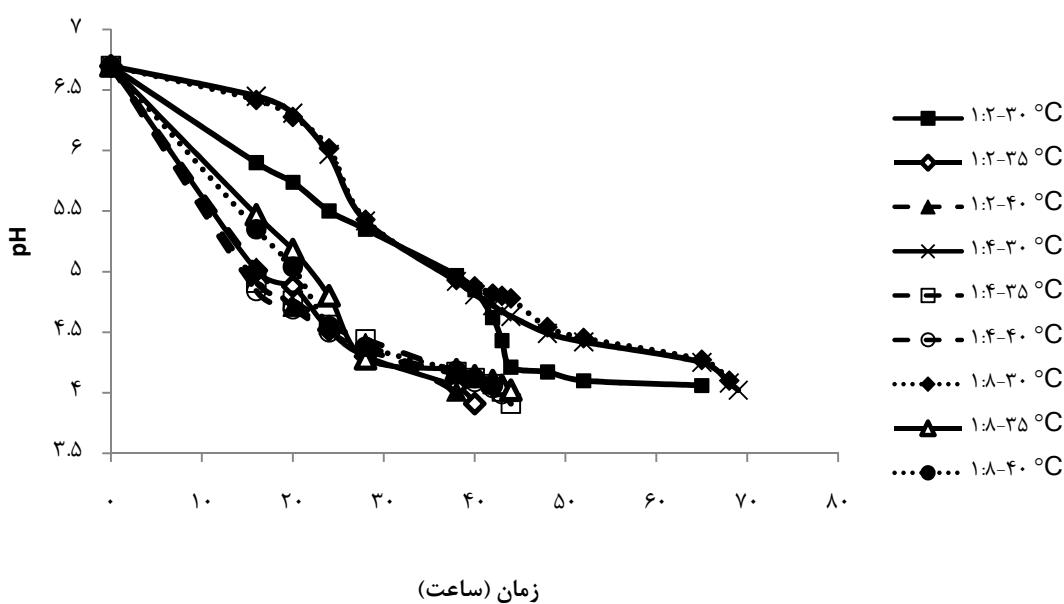
نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که میان میزان اسید پروپیونیک و اسید استیک تولید شده با دمای گرمخانه گذاری ارتباط معکوس و معنی‌داری ($P < 0.05$) وجود دارد؛ به طوری که در نسبت ثابت میکروارگانیسم‌های تلقیح شده، با افزایش دمای گرمخانه گذاری از 40°C به 30°C میزان اسیدهای پروپیونیک و استیک تولید شده کاهش یافت. بهترین نسبت تلقیح در هر یک از دماهای به کار رفته از نظر دستیابی به بیشترین میزان اسید پروپیونیک در محصول، به ترتیب $1:4$ ، $1:8$ و $1:2$ بود.

۱ استفاده و آنالیز اسیدهای مذکور در طول موج آشکارساز معادل 210 nm انجام شد. محلول استاندارد اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک در آب مقطر تهیه شد. زمان بازماند (retention time) پیک مربوط به اسیدهای لاکتیک، استیک و پروپیونیک به ترتیب $2/42$ ، $2/53$ و $4/39$ دقیقه بود. نمونه حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک، برای تعیین غلظت اسیدهای تولید شده طی نگهداری یچالی به مدت $28\text{ روز در دمای } 4^{\circ}\text{C}$ نگهداری شد.

تیین قابلیت زیستی میکروارگانیسم های پروپوتوک: قابلیت زیستی لاکتوباسیلوس /سیدوفیلوس از MRS طریق کشت محصول تولید شده روی محیط کشت آگار و گرمخانه گذاری در دمای 37°C و در شرایط هوایی به مدت ۷۲ ساعت در رقت های 10°C تا 37°C و قابلیت زیستی پروپوونی باکتریوم فرئودنریچی بی زیر گونه شرمنی بی از طریق کشت روی محیط سدیم لاکتان آگار و گرمخانه گذاری در دمای 30°C و در شرایط غیرهوایی به مدت ۷ روز در رقت های 10°C تا 37°C بررسی شد (۶). شرایط بی هوایی با استفاده از جار بی هوایی و گاز پک ایجاد شد. ضریب نسبت بقا (Growth Proportion Index) GPI از تقسیم تعداد نهایی باکتری های پروپوتوک بر تعداد اولیه آن ها به دست آمد (۲۱).

از زیبایی حسی: ارزیابی حسی محصول تولید شده با استفاده از آزمون هدوانیک ۵ نقطه‌ای انجام شد (صفر: غیر قابل مصرف، ۱: غیر قابل قبول، ۲: قابل قبول، ۳: رضایت بخش، ۴: عالی). محصولات تولید شده حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک در پایان دوره تخمیر توسط ۱۱ ارزیاب آموزش دیده بررسی شد. ویژگی‌های طعم (مزه و بو)، ظاهر (رنگ و همگنی بافت)، بافت دهانی و گرانبروی غیردهانی (چشمی) مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از انجام ارزیابی حسی و محاسبه میانگین امتیاز داده شده به هر یک از شاخص‌های مورد نظر، مجموع امتیازها از طریق حاصل ضرب میانگین امتیاز داده شده در ضرایب مربوط به هر یک از شاخص‌ها (ضریب طعم: ۶/۵، ضریب بافت دهانی: ۳/۵، ضریب ظاهر (رنگ و همگنی بافت): ۲ و ضریب گرانبروی غیر دهانی: ۱) به دست

طراحی و ارزیابی آماری: در این تحقیق اثر دو متغیر دما و نسبت تلقیح بر میزان تولید اسید پروپیونیک با استفاده از طرح فاکتوریل کامل بررسی شد. تعداد کل 3^3 آزمایش انجام شد تا همه حالات ترکیبی ممکن (ترکیب تیمار با عالمت



شکل ۱. روند تغییرات pH طی تخمیر در نمونه‌های تولید شده

جدول ۱- غلظت اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک (درصد وزنی / وزنی) تولید شده در نوشیدنی شیری تخمیری در پایان دوره تخمیر*

| شاخص‌ها | | | تیمار | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------|---------------|--|
| اسید استیک (درصد وزنی / وزنی) | اسید لاکتیک (درصد وزنی / وزنی) | اسید پروپیونیک (درصد وزنی / وزنی) | دما (°C) | نسبت تلقیح | |
| ۰/۲۲ ^b | ۰/۲۵ ^b | ۰/۴۹ ^c | ۳۰ | ۲ به ۱ | |
| ۰/۲۹ ^c | ۰/۲۱ ^d | ۰/۳۵ ^d | ۳۵ | ۲ به ۱ | |
| ۰/۲۱ ^c | ۰/۱۸ ^e | ۰/۲۵ ^c | ۴۰ | ۲ به ۱ | |
| ۰/۳۵ ^a | ۰/۲۷ ^a | ۰/۷۷ ^a | ۳۰ | ۴ به ۱ | |
| ۰/۳۲ ^b | ۰/۲۳ ^c | ۰/۴۶ ^c | ۳۵ | ۴ به ۱ | |
| ۰/۲۷ ^d | ۰/۲۵ ^b | ۰/۳۴ ^d | ۴۰ | ۴ به ۱ | |
| ۰/۲۳ ^b | ۰/۲۶ ^{ab} | ۰/۶۰ ^b | ۳۰ | ۸ به ۱ | |
| ۰/۳۰ ^c | ۰/۱۸ ^e | ۰/۳۶ ^d | ۳۵ | ۸ به ۱ | |
| ۰/۲۶ ^d | ۰/۲۰ ^d | ۰/۳۲ ^{de} | ۴۰ | ۸ به ۱ | |

* میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند ($P < 0.05$).

به طور معنی‌دار ($P < 0.05$) با دمای گرمخانه‌گذاری ارتباط داشت؛ به‌طوری‌که با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۴۰ °C در هر یک از نسبت‌های تلقیح شده، قابلیت زیستی این بacterی کاهش یافت. بیشترین تعداد زنده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در نوشیدنی تهیه شده با استفاده از نسبت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به پروپیونیک-بacterیوم فرئودنریچی بیشترین قابلیت زیستی در دمای ۳۵ °C مشاهده شد.

قابلیت زیستی میکرووارگانیسم‌های پروپیوکتیک: قابلیت زیستی پروپیونیک-بacterیوم فرئودنریچی بیشترین شرمانی‌یی ولاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در پایان دوره تخمیر در جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین قابلیت زیستی پروپیونیک-بacterیوم فرئودنریچی بیشترین شرمانی‌یی در نوشیدنی تهیه شده با استفاده از نسبت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به پروپیونیک-بacterیوم فرئودنریچی بیشترین قابلیت زیستی پروپیونیک-بacterیوم فرئودنریچی بیشترین شرمانی‌یی در دمای ۳۰ °C به دست آمد. قابلیت زیستی پروپیونیک-بacterیوم فرئودنریچی بیشترین شرمانی‌یی

جدول ۲. قابلیت زیستی و نسبت بقای رشد باکتری‌های پروپیوتیک در نوشیدنی شیری تخمیری در پایان دوره تخمیر*

| | | | | تعداد نهایی باکتری‌های پروپیوتیک پس از تخمیر (log cfu/mL) | | تیمار | |
|-------|-------|----------------------|--------------------|---|-------------------|----------|------------|
| | | ضریب نسبت بقاء (GPI) | | | | | |
| P + A | A | P | P + A | A*** | P** | دما (°C) | نسبت تلقیح |
| ۲/۵۳ | ۴/۹۰ | ۱/۲۸ | ۷/۸۸ ^d | ۷/۶۹ ^b | ۷/۴۱ ^c | ۳۰ | ۲ به ۱ |
| ۴/۸۰ | ۶/۰۳ | ۰/۶۰ | ۸/۱۶ ^{bc} | ۷/۷۸ ^{ab} | ۷/۰۸ ^c | ۳۵ | ۲ به ۱ |
| ۳/۵۰ | ۱۰/۲۰ | ۰/۰۵ | ۸/۰۲ ^{cd} | ۸/۰۱ ^{ab} | ۶/۰۳ ^d | ۴۰ | ۲ به ۱ |
| ۱۰/۵۰ | ۱۱/۵۰ | ۱۰/۰۰ | ۸/۷۲ ^a | ۸/۰۶ ^{ab} | ۸/۶۰ ^a | ۳۰ | ۴ به ۱ |
| ۳/۴۰ | ۱۳/۸۰ | ۰/۶۶ | ۸/۲۳ ^{bc} | ۸/۱۴ ^a | ۷/۴۲ ^c | ۳۵ | ۴ به ۱ |
| ۲/۸۲ | ۱۲/۹۰ | ۰/۲۹ | ۸/۱۵ ^{bc} | ۸/۱۱ ^{ab} | ۷/۰۶ ^c | ۴۰ | ۴ به ۱ |
| ۲/۶۰ | ۱۲/۰۰ | ۱/۴۰ | ۸/۳۷ ^b | ۸/۰۸ ^{ab} | ۸/۰۵ ^b | ۳۰ | ۸ به ۱ |
| ۱/۸۹ | ۱۴/۴۰ | ۰/۲۹ | ۸/۲۳ ^{bc} | ۸/۱۶ ^a | ۷/۳۶ ^c | ۳۵ | ۸ به ۱ |
| ۱/۵۶ | ۱۳/۲۰ | ۰/۰۴ | ۸/۱۴ ^{bc} | ۸/۱۲ ^{ab} | ۶/۴۷ ^d | ۴۰ | ۸ به ۱ |

* میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند ($p < 0.05$).

** پروپیونیک‌باکتریوم فرئوونریچی بی زیر گونه شرمنی بی

*** لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس

از ۰/۰ درصد (وزنی / وزنی) در روز صفر به ۱/۲ درصد (وزنی / وزنی) در روز ۲۸ افزایش یافت.
ارزیابی حسی: نتایج حاصل از ارزیابی حسی نوشیدنی‌های حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک و نمونه شاهد در جدول ۴ آورده شده است. بیشترین میزان مطلوبیت در نمونه تهیه شده با استفاده از نسبت لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس به پروپیونیک‌باکتریوم فرئوونریچی بی معادل ۱ به ۴ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک بود، این نمونه به مدت ۲۸ روز در دمای ۴ °C نگهداری و تغییرات pH، اسیدیته قابل تیتر و غلظت اسیدهای تولید شده در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ تعیین شد.

روندهای تغییرات pH، اسیدیته و غلظت اسیدهای تولید شده طی نگهداری یخچالی: با توجه به این که نوشیدنی تهیه شده با استفاده از نسبت لاکتوباسیلوس / اسیدوفیلوس به پروپیونیک‌باکتریوم فرئوونریچی بی معادل ۱ به ۴ و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک بود، این نمونه به مدت ۲۸ روز در دمای ۴ °C نگهداری و تغییرات pH، اسیدیته قابل تیتر و غلظت اسیدهای تولید شده در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ تعیین شد.

روندهای تغییرات pH، اسیدیته، غلظت اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک در نوشیدنی شیری تخمیری حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک، طی ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ °C در جدول ۳ آورده شده است. طی نگهداری یخچالی، pH کاهش و اسیدیته قابل تیتر افزایش یافت. همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، میزان اسید پروپیونیک از هفته دوم نگهداری یخچالی به طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان این اسید طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی

جدول ۳. تغییرات pH، اسیدیته، غلظت اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک در نوشیدنی شیری تخمیری حاوی بیشترین

میزان اسید پروپیونیک طی نگهداری یخچالی*

| شاخص | روز صفر | روز ۷ | روز ۱۴ | روز ۲۱ | روز ۲۸ |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| pH | | | | | |
| اسیدیته قابل تیتر (درجه دورنیک) | ۴/۰۵ | ۴/۰۰ | ۳/۹۱ | ۳/۸۲ | ۳/۷۵ |
| اسید پروپیونیک (درصد وزنی / وزنی) | ۴۴/۱۰ | ۴۵/۰۰ | ۴۵/۹۰ | ۴۷/۲۵ | ۴۷/۷۰ |
| اسید لاکتیک (درصد وزنی / وزنی) | ۰/۷۵ ^D | ۰/۷۶ ^D | ۰/۸۷ ^C | ۱/۰۲ ^B | ۱/۲۰ ^A |
| اسید استیک (درصد وزنی / وزنی) | ۰/۲۸ ^C | ۰/۳۱ ^C | ۰/۳۷ ^B | ۰/۴۵ ^A | ۰/۴۴ ^A |
| اسیدوفیلوس (درصد وزنی / وزنی) | ۰/۳۵ ^C | ۰/۴۰ ^A | ۰/۳۸ ^B | ۰/۴۸ ^A | ۰/۳۷ ^B |

* میانگین‌هایی که در یک ردیف با حروف متفاوت بزرگ نشان داده شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند ($p < 0.05$).

جدول ۴. نتایج حاصل از ارزیابی حسی نوشیدنی‌های حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک و نمونه شاهد*

| شاخص‌های حسی | | | | | نمونه |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|--------|
| مجموع امتیاز | بافت دهانی | گرانروی غیر دهانی | طعم | ظاهر (رنگ و همگنی بافت) | |
| ۳۱/۳۱ ^b | ۲/۸۲ ^a | ۸/۵۹ ^a | ۱۴/۴۵ ^b | ۵/۴۵ ^a | ۳۰ °C |
| ۲۶/۸۵ ^d | ۲/۲۷ ^d | ۷/۹۵ ^c | ۱۱/۴۵ ^d | ۵/۱۸ ^b | ۳۰ °C |
| ۳۱/۶۳ ^a | ۲/۵۴ ^b | ۸/۲۷ ^b | ۱۵/۸۲ ^a | ۵/۰۰ ^c | ۳۰ °C |
| ۲۹/۶۸ ^c | ۲/۴۵ ^c | ۸/۵۹ ^a | ۱۳/۶۴ ^c | ۵/۰۰ ^c | شاهد** |

*میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، به طور معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند ($p < 0.05$).

** نوشیدنی تهیه شده با استفاده از لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به‌نهایی و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C

• بحث

حاوی بالاترین قابلیت زیستی پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی-یی زیرگونه شرمانی‌یی (نمونه: ۱ به ۴ و ۳۰ °C) تولید شد. در کلیه نمونه‌ها مقدار اسید استیک تولید شده بیشتر از میزان اسید لاکتیک موجود در نمونه‌هاست. علت این موضوع می‌تواند مصرف اسید لاکتیک و تولید اسید استیک توسط پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی باشد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد در تخمیر انجام شده توسط این باکتری ۳ مول اسید لاکتیک به ۲ مول اسید پروپیونیک، ۱ مول اسید استیک و ۱ مول CO_2 تبدیل می‌شود (۲۴).

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، بین میزان اسیدهای پروپیونیک و استیک، تولید شده در محصول با دمای گرمخانه‌گذاری ارتباط معکوس و معنی‌داری ($P < 0.05$) وجود دارد؛ به طوری که در نسبت ثابت تلقیح، با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۴۰ °C میزان اسید پروپیونیک و اسید استیک تولید شده کاهش می‌یابد. علت این موضوع می‌تواند رشد سریع تر لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در دماهای ۳۵ و ۴۰ °C نسبت به دمای ۳۰ °C باشد که در نتیجه آن، سرعت افت pH افزایش و مدت زمان گرمخانه‌گذاری کاهش می‌یابد و در نتیجه، پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی فرصت کافی برای رشد نخواهد داشت. در روند تغییرات pH طی تخمیر (شکل ۱) نیز مشخص است که در نمونه‌های تهیه شده در دمای ۳۰ °C سه مرحله مشخص کمون، رشد لگاریتمی و سکون رشد باکتریایی نمایان است، ولی با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۴۰ °C تنها دو مرحله رشد لگاریتمی و سکون در نمودارها قابل تشخیص است که تأیید کننده رشد سریع تر لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در دماهای ۳۵ و ۴۰ °C نسبت به دمای ۳۰ °C است. در سایر مطالعات انجام شده نیز گزارش شده که دمای مناسب رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در محدوده ۳۵ تا ۴۰ °C است (۲۳). بر اساس مطالعات انجام شده دمای مناسب رشد پروپیونی‌باکتریوم‌ها ۳۰ °C است (۲، ۳)، که منجر به تولید بیشتر اسیدهای پروپیونیک و استیک در این دما می‌شود. بنابراین، مقادیر بیشتر اسیدهای پروپیونیک و استیک نشانگر رشد بهتر پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی است. در این مطالعه حداقل میزان اسیدهای پروپیونیک و استیک در نمونه

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، بین میزان اسیدهای پروپیونیک و استیک، تولید شده در محصول با دمای گرمخانه‌گذاری ارتباط معکوس و معنی‌داری ($P < 0.05$) وجود دارد؛ به طوری که در نسبت ثابت تلقیح، با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۴۰ °C میزان اسید پروپیونیک و اسید استیک تولید شده کاهش می‌یابد. علت این موضوع می‌تواند رشد سریع تر لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در دماهای ۳۵ و ۴۰ °C نسبت به دمای ۳۰ °C باشد که در نتیجه آن، سرعت افت pH افزایش و مدت زمان گرمخانه‌گذاری کاهش می‌یابد و در نتیجه، پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی فرصت کافی برای رشد نخواهد داشت. در روند تغییرات pH طی تخمیر (شکل ۱) نیز مشخص است که در نمونه‌های تهیه شده در دمای ۳۰ °C سه مرحله مشخص کمون، رشد لگاریتمی و سکون رشد باکتریایی نمایان است، ولی با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری از ۳۰ به ۴۰ °C تنها دو مرحله رشد لگاریتمی و سکون در نمودارها قابل تشخیص است که تأیید کننده رشد سریع تر لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در دماهای ۳۵ و ۴۰ °C نسبت به دمای ۳۰ °C است. در سایر مطالعات انجام شده نیز گزارش شده که دمای مناسب رشد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در محدوده ۳۵ تا ۴۰ °C است (۲۳). بر اساس مطالعات انجام شده دمای مناسب رشد پروپیونی‌باکتریوم‌ها ۳۰ °C است (۲، ۳)، که منجر به تولید بیشتر اسیدهای پروپیونیک و استیک در این دما می‌شود. بنابراین، مقادیر بیشتر اسیدهای پروپیونیک و استیک نشانگر رشد بهتر پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی است. در این مطالعه حداقل میزان اسیدهای پروپیونیک و استیک در نمونه

اسید پروپیونیک طی ۲۸ روز نگهداری یخچالی از ۰/۷۵ درصد (وزنی/ وزنی) در روز صفر به ۱/۲ درصد (وزنی/ وزنی) در روز ۲۸ افزایش یافت. میزان این اسید در هفته اول نگهداری یخچالی تقریباً ثابت بود و از هفته دوم در حد قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. احتمالاً علت عدم افزایش قابل - ملاحظه اسید پروپیونیک در هفته اول ناشی از کاهش قابل ملاحظه در قابلیت زیستی پروپیونی باکتریوم فرئودنریچی بی‌زیرگونه شرمانی بی در این مدت است.

بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی حسی، بیشترین میزان مطلوبیت در نمونه تهیه شده با استفاده از نسبت لاکتوپاسیلوس اسیدوفیلوس به پروپیونی باکتریوم فرئودنریچی بی زیرگونه شرمانی بی معادل ۱ به ۴ و گرمانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C ۳۰ دیده شد. اگرچه ترکیبات آلی مختلفی در محصولات شیری تخمیری مانند ماست شناسایی شده‌اند، اما فقط تعداد کمی از آن‌ها اثر قابل ملاحظه‌ای روی طعم محصول دارند. به طوری که مهم‌ترین ترکیب معطر ماست استالدئید است (۲۶). مطالعه انجام شده توسط Ekinci و Gurel (۲۰۰۸) نشان داد که به کارگیری پروپیونی باکتریوم در تهیه ماست به افزایش میزان استالدئید تولید شده در روز اول منجر می‌شود (۹). با وجود این، در مطالعه انجام شده توسط Ruijschop و همکاران مشاهده شد که نوشیدنی تهیه شده با استفاده از کشت همزمان لاکتوپاسیلوس اسیدوفیلوس و پروپیونی باکتریوم فرئودنریچی بی و حاوی ۰/۹۸ درصد (وزنی/ وزنی) اسید پروپیونیک طعم ترش و مطلوبیت پایینی در میان افراد مصرف کننده داشت (۱). این اختلاف مشاهده شده می‌تواند ناشی از تفاوت در میزان اسید پروپیونیک تولید شده و زیرگونه پروپیونی باکتریوم مورد استفاده باشد.

با توجه به دستیابی به میزان نسبتاً بالای اسید پروپیونیک در نمونه تولید شده، افزایش این مقدار طی نگهداری یخچالی و تعلق بالاترین مقبولیت حسی در میان نمونه‌های تولید شده به نمونه حاوی بیشترین میزان اسید پروپیونیک می‌توان نتیجه‌گیری کرد انجام این تحقیق تولید نوعی غذای فراسودمند را میسر ساخته است. البته، بررسی دقیق اثرات سیرکنندگی این محصول در قالب یک مطالعه تغذیه‌ای توصیه می‌شود.

در سطوح متفاوت، بهمنظور رسیدن به حداکثر میزان رشد و تولید اسید پروپیونیک بررسی نشد. به علاوه، تغییرات میزان اسید پروپیونیک طی نگهداری یخچالی مورد مطالعه قرار نگرفته است.

نتایج به دست آمده در مطالعه *Ruijschop* و همکاران نشان داد که نوشیدنی شیری تخمیری در مقایسه با نوشیدنی شیری غیر تخمیری احساس پرشدگی معده را افزایش و احساس گرسنگی و تمایل به خوردن را کاهش می‌دهد. با این حال، تفاوت معنی‌داری میان نوشیدنی شیری تخمیری و نوشیدنی حاوی پروپیونات کلسیم، اضافه شده به صورت دستی و به میزان ۰/۶ درصد (وزنی/ وزنی)، وجود نداشت. این نتیجه، تأیید می‌کند که پروپیونات جزء فعال ایجاد کننده سیری است. در مطالعه *Ruijschop* و همکاران میزان اسید پروپیونیک تولید شده در دمای ۳۰ °C در مدت ۷ روز گرمانه‌گذاری ۰/۹۸ درصد (وزنی/ وزنی) بود (۱) در صورتی که در مطالعه حاضر ۰/۷۷ درصد (وزنی/ وزنی) اسید پروپیونیک در مدت ۶۹ ساعت گرمانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C در نوشیدنی تولید شد. این اختلاف مشاهده شده می‌تواند ناشی از تفاوت در نسبت تلقيق و زیرگونه پروپیونی باکتریوم مورد استفاده در مطالعه *Ruijschop* با مطالعه حاضر باشد. به طوری که در مطالعه *Ruijschop* و همکاران از پروپیونی باکتریوم فرئودنریچی بی زیرگونه فرئودنریچی بی و در مطالعه حاضر از پروپیونی باکتریوم فرئودنریچی بی زیرگونه شرمانی بی استفاده شد. به علاوه، pH اولیه شیر پس‌چرخ در مطالعه *Ruijschop* (حدود ۵/۸) با مطالعه حاضر (حدود ۶/۷) متفاوت بود که می‌تواند به تفاوت میزان اسید پروپیونیک تولید شده منجر شده باشد. در مطالعه *El-Hagarawy* و همکاران نیز مشاهده شد که گونه‌های پروپیونی باکتریوم در pH اولیه بالاتر رشد بهتری دارند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان اسیدهای پروپیونیک و استیک تولید شده طی دو روز گرمانه‌گذاری در pH اولیه معادل ۶/۶ به طور معنی‌داری بیشتر از pH=۵/۲ است (۲۵). طی نگهداری یخچالی، pH کاهش و اسیدیته قابل تیتر، افزایش یافت که احتمالاً ناشی از تولید اسیدهای آلی توسط لاکتوپاسیلوس اسیدوفیلوس و پروپیونی باکتریوم فرئودنریچی بی زیرگونه شرمانی بی طی این دوره است. میزان

• References

1. Ruijschop RMAJ, Boelrijk AEM, te Giffel MC. Satiety effects of a dairy beverage fermented with propionic acid bacteria. *Int Dairy J* 2008; 18: 945-50.
2. Sheehan JJ, Wilkinson MG, McSweeney PLH. Influence of processing and ripening parameters on starter, non-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. *Int Dairy J* 2008; 18: 905-17.
3. Coral J, Karp SG, Porto de Souza Vandenberghe L, Parada JL, Pandey A, Soccol CR. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. *Appl Biochem Biotechnol* 2008; 151: 333-41.
4. Quesada-Chanto A, Schmid-Meyer AC, Schroeder AG, Carvaiho-Jonas MF, Blanco I, Jonas R. Effect of oxygen supply on biomass, organic acids and vitamin B12 production by *Propionibacterium shermanii*. *World J Microbiol Biotechnol* 1998; 14: 843-6.
5. Marshall DL, Odame-Darkwah JK. Influence of pH and NaCl on growth and survival of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, *Bacillus pumilus*, and *Saccharomyces cerevisiae* in broth media. *Food Sci Technol* 1995; 28: 222-6.
6. Tharmaraj N, Shah NP. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2288-96.
7. Bougle D, Vaghefi-Vaezzadeh N, Roland N, Bouvard G, Arhan P, Bureau F, et al. Influence of short-chain fatty acids on iron absorption by proximal colon. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1008-11.
8. Trinidad TP, Wolever TM, Thompson LU. Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 754-8.
9. Ekinci FY, Gurel M. Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *J Dairy Sci* 2008; 91: 892-9.
10. Demigne C, Morand C, Levrat MA, Besson C, Moundras C, Remesy C. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr* 1995; 74: 209-19.
11. Hara H, Haga S, Aoyama Y, Kiriyama S. Short chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *J Nutr* 1999; 129: 942-8.
12. Leblance JG, Rutten G, Bruinenberg P, Sesma F, Savoy de giori G, Smid EJ. A novel dairy product fermented with *Propionibacterium freudenreichii* improves the riboflavin status of deficient rats. *Nutrition* 2006; 22: 645-51.
13. Batterham RL, Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, Herzog H, et al. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell metabolism* 2006; 4: 223-33.
14. Cherbut C, Ferrier L, Roze C, Anini Y, Blottiere H, Lecannu G, et al. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *Am J Physiol* 1998; 275: 1415-22.
15. Dockray G. Gut endocrine secretions and their relevance to satiety. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 557-60.
16. Liljeberg HG, Bjorck IM. Delayed gastric emptying rate as a potential mechanism for lowered glycemia after eating sourdough bread: studies in humans and rats using test products with added organic acids or an organic salt. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 886-93.
17. Deutsch SM, Falentin H, Dols-Lafargue M, Lapointe G, Roy D. Capsular exopolysaccharide biosynthesis gene of *propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*. *Int J Food microbiol* 2008; 125: 252-8.
18. Gorret N, Maubois JL, Ghoul M and Engasser JM. Exopolysaccharide production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 779-87.
19. Kerjean JR, Condon S, Lodi R, Kalantzopoulos G, Chamba JF, Suomalainen T, et al. Improving the quality of European hard-cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionibacteria. *Food Res Int* 2000; 33: 281-7.
20. Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J* 2001; 11: 1-17.
21. Mortazavian AM, Khosrokhavar R, Rastegar H, Mortazaei GR. Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of doogh (Iranian fermented milk drink). *Ital J Food Sci* 2010; 22: 98-104.
22. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Yogurt – Specifications and test methods. ISIRI no 695. 4th revision, Karaj: ISIRI; 2008 [In Persian].
23. Gomes AMP, Malcata FX. Bifidobacterium spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic bacteria. *Trends Food Sci Technol* 1999; 10: 139-57.
24. Zhang A, Yang S. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. *Process Biochem* 2009; 44: 1346-51.
25. El-Hagarawy IS, Slatter WL, Harper WJ. Organic acid production by propionibacteria: Effect of strains, pH, carbon source and intermediate fermentation products. *J Dairy Sci* 1957; 10: 579-87.
26. Law BA. The formation of aroma and flavor compounds in fermented dairy products. *Dairy Sci Abstr* 1981; 43:143-54.

Effect of incubation temperature and inoculation ratio of starter culture on propionic acid production in dairy beverage fermented with *propionibacterium*

Farhadi Sh¹, Khosravi-Darani K^{*2}, Mashayekh M³, Mortazavian AM³, Mohammadi A³, Shahraz F⁴

1- M.Sc. in Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- *Corresponding author: Assistant Prof (in Research), Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E-mail: kiankh@yahoo.com

3- Assistant prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- M.Sc in Microbiology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received 28 May, 2011

Accepted 4 Sept, 2011

Background and Objective: Increasing trends of overweight and obesity prevalence have prompted food producers to develop products that can enhance satiety signals. The role of short-chain fatty acids as satiety-inducing triggers seems to be of interest in this regard. The objective of this research was to investigate the impact of two process variables, namely, incubation temperature and inoculation ratio of starter bacteria, on propionic acid production in the fermented dairy beverages containing *Propionibacterium* immediately after fermentation and during cold storage.

Materials and Methods: Fermented dairy beverage (FDB) samples were prepared using mixed cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* at a ratio of 1:2, 1:4 and 1:8, respectively, at incubation temperatures of 30, 35 and 40°C, until the pH reached 4.0 ± 0.1. Propionic, lactic and acetic acid contents of the samples were measured immediately after fermentation using HPLC. The FBD samples were refrigerated for 28 days and the concentrations of the acids in the samples with the highest propionic acid content were measured. Sensory evaluation of the samples produced was made by 11 trained panelists using the hedonic scale.

Results: The maximum propionic acid content (w/w%) was observed in a mixed culture of *L. acidophilus* and *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* at a ratio of 1:4 and an incubation temperature of 30 °C. It increased from 0.75 at day 0 to 1.2 at day 28 during storage at 4 °C.

Conclusion: The incubation temperature had a statistically significant inverse effect ($P<0.05$) on the propionic acid production in the fermented dairy beverages.

Keywords: Propionic acid, Probiotic, *Propionibacterium freudenreichii* ssp.*shermanii*, *Lactobacillus acidophilus*, Fermented dairy beverage