نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۳ شماره ۳/ سال ۱۳۹۲

تأثیر افزودن کازئینات سدیم و عصاره نعناع فلفلی بر زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی ماست پروبیوتیک بدون چربی

عزیزه رضایی[۱]، اصغر خسرو شاهی اصل[۲*]، شهین زمردی[۳] و حسن ملکی نژاد[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۲۳

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی-صنایع غذایی دانشگاه ارومیه

[۲] استاد گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۳] استادیار بخش فنی مهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی

[٤] دانشیار گروه فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

[*] مسئول مکاتبه: Email:a.khosrowshahi@gmail.com

خلاصه

تأثیر افزودن کازئینات سدیم (٤- ۰ درصد)، عصاره نعناع فلفلی (۰/۲- ۰ درصد) و مدت زمان نگهداری (۲۰-٤ روز) بر شاخص‌های کیفی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی ماست پروبیوتیک بدون چربی با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی گردید. به این ترتیب مدل درجه دو برای هریک از شاخص های کیفی ارائه شد. نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که مدل‌های درجه دو به خوبی برای پیشگویی داده‌های آزمایش مناسب هستند. عدم برازش غیرمعنی دار و ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده بالا بود. نتایج نشان داد که افزودن کازئینات سدیم بر pH، اسیدیته، سینرزیس، ظرفیت نگهداری آب، ویسکوزیته ظاهری و رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* تأثیر معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین افزودن عصاره نعناع برpH، ویسکوزیته ظاهری، رشد *ل. کازئی* تأثیر معنی‌دار نشان داد ($P<۰/۰۵$). مدت زمان نگهداری بر pH، اسیدیته، سینرزیس، ظرفیت نگهداری آب، ویسکوزیته ظاهری، رشد پروبیوتیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز تأثیر معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$).

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، کازئینات سدیم، عصاره نعناع فلفلی، روش سطح پاسخ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

Effect of addition of sodium caseinate and peppermint extract on viability of *Lactobacillus casei* and physicochemichal properties and antioxidant activity of non-fat probiotic yogurt

A Razaei[1], A Khosrowshahi Asl[2*], Sh Zomorodi[3] and H Malekinajad[4]

Received: September 15, 2012 Accepted: September 14, 2013

[1]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[2]Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Engineering, Agricultural Research Center of West Azarbijan, Urmia, Iran
[4]Assistance Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary, University of Urmia, Urmia, Iran
[*]Corresponding author: Email: a.khosrowshahi@gmail.com

Abstract

Response surface methodology was employed to investigate the combined effects of sodium caseinate (0–4%), peppermint extract (0-0.2 %) and refrigerated storage on functional, chemical and antioxidant activity of nonfat-set yogurt. The second-order polynomial model was fitted to the physicochemical properties of runs as the responses. Analysis of variance revealed that the quadratic models are well adjusted to predict the experimental data. Lack-of-fit tests were not significant and determination coefficients (R^2) and adjust determination coefficient were high. The statistical analysis of the results showed that addition of sodium caseiante had significant effect on syneresis, water holding capacity (WHC), apparent viscosity and *L. casei* counts ($P<0.05$) and also addition of peppermint extract showed significant effect on apparent viscosity, *L. casei* counts ($P<0.05$) and refrigerate storage had significant effect on pH, acidity, syneresis, WHC, apparent viscosity, probiotic count and antioxidant activity ($P<0.05$).

Keywords: Probiotic, Sodium caseinate, Peppermint extract, RSM, Antioxidant activity

مقدمه

در سال‌های اخیر مصرف کنندگان به مسأله سلامتی اهمیت بیشتری داده و به دنبال مصرف مواد غذایی با خاصیت فراسودمندی بالاتر افزون بر ارزش تغذیه ای می‌باشند (اسماچی و همکاران ۲۰۰۰). غذای فراسودمند اصطلاحی است برای معرفی غذاهایی که ترکیبات بیواکتیو طبیعی را برای رژیم غذایی انسان به منظور تأمین مواد مغذی پایه تولید می کنند. این مواد مغذی اغلب برای تأمین سلامتی و جلوگیری از بروز بیماری‌ها مفید هستند (کریس–اترتون و همکاران ۲۰۰٤). غذاهای حاوی پروبیوتیک در این گروه طبقه‌بندی می‌شود. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به تعداد کافی مصرف شوند موجب سلامت مصرف کننده می‌شوند (FAO/WHO ۲۰۰۲). برای این منظور باید تعداد پروبیوتیک‌های زنده مانده حداقل در حدود 10^6 (شاه ۲۰۰۷) 10^7 یا 10^8 کلنی در گرم محصول (لورنزو–هاتینگ ۲۰۰۱) باشند. از میان پروبیوتیک‌ها لاکتوباسیل‌ها بطور وسیعی در محصولات لبنی استفاده شده‌اند و به خاطر تأثیرات مفیدشان بر سلامتی در خور توجه هستند (شاه ۲۰۰۰).

در سال‌های اخیر تقاضای مصرف کننده‌ها برای محصولات کم چرب یا بدون چربی به دلیل تأثیر نامطلوب چربی در سلامتی انسان افزایش یافته است. اما کاهش چربی می‌تواند موجب نقص در بافت و ویژگی حسی ماست شود (پسفول و همکاران ۲۰۰۸).

مطالعات زیادی برای بهبود ویژگی‌های ماست کم چرب انجام گرفته است (میستریو همکاران ۱۹۹۲، هس و همکاران ۱۹۹۷، سانچز و همکاران ۲۰۰۰، ساندووال-کاستیلا و همکاران ۲۰۰٤ و آماتایاکولو همکاران ۲۰۰٦). به طور متداول برای تولید ماست، محتوای مواد جامد شیر را با افزودن پودرهای پروتئینی مانند پودر شیر خشک بدون چربی، پروتئین آب پنیر تغلیظ شده و کازئین، اواپراسیون آب از شیر تحت خلأ و جدا کردن آب با فیلتراسیون غشایی (دمین و همکاران ۲۰۰۹و تمیمه و همکاران ۲۰۰۱) افزایش می‌دهند. به هر حال غنی‌سازی ماست می تواند ویژگی‌های فیزیکی و حسی ماست را تغییر دهد (سادینی و همکاران ۲۰۰۵).

امروزه استفاده از اسانس‌های مختلف گیاهی از جمله اسانس نعناع در فراورده‌های لبنی به دلیل ویژگی-های درمانی آنها رو به افزایش است. نعناع متعلق به خانواده لابیاتا[1] است و بالغ بر ۲۵ تا ۳۵ گونه می‌باشد که به صورت گسترده در نواحی مرطوب می‌روید. معمولاً از سه گونه *M. arvensis*، *M. piperite (peppermint)* و *M. Spicata (cornmint)* برای تولید اسانس استفاده می‌شود. این گیاه از نظر ترکیبات پلی-فنلی غنی است. اسانس و عصاره نعناع دارای اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی است (گولوس و همکاران ۲۰۰۷).

هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر افزودن کازئینات سدیم و عصاره نعناع بر شاخص های کیفی و زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در طول دوره نگهداری و ارائه مدل مناسب جهت تعیین تأثیر این فاکتور در ماست پروبیوتیک بدون چربی می‌باشد. همچنین این مطالعه می تواند مقدمه‌ای برای استفاده عملی از عصاره نعناع در صنایع لبنی در آینده نزدیک باشد و نیز گامی در جهت اعتلای بهداشت و ایمنی غذایی جامعه برداشته شود.

[1] Labipata

مواد و روش ها

مواد و روش ها

مواد و تجهیزات

استارتر تجاری YC-350 (کریستین-هانسن، دانمارک)، *لاکتوباسیلوس کازئی* L26 (DSM استرالیا)، MRS[2] آگار (مرک آلمان)، ونکومایسین و DPPH[3] (سیگما، آلدریچ استرالیا)، کازئینات سدیم با ۷۸/۹۵٪ پروتئین (میلاد خراسان) و عصاره آبی-الکلی نعناع فلفلی (زردبند ایران) ،ترازوی حساس (سارتریوس با دقت ۱...۰/ گرم، آلمان)، انکوباتور (ممرت، آلمان)، اتوکلاو (جی ام بی اچ[4]، آلمان)، سانتریفوژ یخچالدار (یونیورسال ۳۲۰، آلمان)، اسپکتروفتومتر (بیکمن، آمریکا)، pH متر (یوتک، سنگاپور)، هانتر لب (مینولتا[5] ، ژاپن)، ویسکومتر (بروکفیلد، آمریکا)، کلنی کانتر (ژاپن) و بن ماری (ممرت، آلمان) مورد استفاده قرار گرفتند.

روش ها

تهیه ماست

برای تهیه ماست از شیر بازسازی شده استفاده شد. شیر خشک در آب حل و ماده خشک آن روی ۱۲٪ تنظیم شد. سپس کازئینات سدیم به شکل هیدراته شده (دمین و همکاران ۲۰۰۹) و عصاره آبی-الکلی نعناع فلفلی (جدول ۱) به شیر بازسازی شده افزوده گردید. مخلوط در دمای ۸۵ ^{o}C به مدت ۳۰ دقیقه پاستوریزه گردید. شیر تا دمای ٤٤-٤۲ ^{o}C سرد شد. پس ازافزودن استارتر ماست و باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*، نمونه-ها در لیوان‌های پلاستیکی ۲۵۰ میلی لیتری استریل پر گردیدند و در گرمخانه با دمای ٤٤-٤۲ ^{o}C تا رسیدن به pH ٤/٦ قرار گرفتند. سپس نمونه ها سریعا تا دمای ٥^{o}C سرد و مدت ۲۰ روز در دمای ٥±۱ ^{o}C نگهداری شدند.

[2] De Man, Rogosa, Sharpe (MRS)
[3] 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
[4] Gmbh
[5] Minoleta CR-400

شمارش *لاکتوباسیلوس کازئی*

از نمونه‌های ماست در شرایط استریل مقدار ۵ گرم توزین شد و با ٤۵ میلی لیتر آب پپتون ۰/۱ درصد استریل همگن شد. سری رقت ها با افزودن یک میلی لیتر از هر رقت به ۹ میلی لیتر آب پپتون استریل تهیه گردید. سپس در محیط کشت MRS آگار حاوی ونکومایسین به صورت پورپلیت کشت داده شد. گرمخانه گذاری در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. پلیت های حاوی۳۰۰-۳۰ کلنی شمارش گردید (راویولا و شاه ۱۹۹۸).

آماده سازی عصاره ماست

۱۰ گرم از نمونه ها با ۲۵میلی لیتر آب مقطر استریل یکنواخت شد. سپس pH آنها توسط اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال روی ٤ تنظیم شد و مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ٤۵ ^{o}C قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰g در دمای ٤ ^{o}C سانتریفوژ گردید. مایع رویی جدا و pH آن توسط سود ۰/۱ نرمال به ۷ رسانده شد و مجدداً با همان شرایط سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و تا زمان آزمایش در دمای ^{o}C ۲۰- نگهداری شد (امیردیوانی و همکاران ۲۰۱۱).

تعیین pH و اسیدیته قابل تیتراسیون کل

برای تعیینpH ماست، بعد از کالیبره کردن دستگاه pHمتر توسط بافر استاندارد ٤ و ۷، الکترود pHمتر مستقیماً در داخل نمونه‌های ماست قرار گرفت و pH قرائت گردید. اسیدیته از طریق تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال در حضور شناساگر فنول فتالئین تا ظهور رنگ ارغوانی تعیین شد (AOAC 1997).

اندازه گیری میزان ویسکوزیته ظاهری

میزان ویسکوزیته ظاهری نمونه ها با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد و نوع اسپیندل LV شماره ٦٤ با سرعت ۳۰ دور در دقیقه اندازه‌گیری شد. قبل از اندازه‌گیری ویسکوزیته، نمونه ها مدت یک دقیقه به صورت دستی هم زده شدند (تاراکچو و میستری ۱۹۹۸).

اندازه‌گیری میزان آب اندازی و ظرفیت نگهداری آب

در این روش حدود ۳۰ گرم ماست در لوله‌های سانتریفوژ توزین شد و در دستگاه سانتریفوژ به مدت۱۰ دقیقه در دمای ٤ ^{o}C و با سرعت ۲۲۲ g سانتریفوژ گردید. سپس لایه بالای جدا و توزین شد. از نسبت وزن آن به وزن ماست اولیه درصد آب اندازی گزارش شد (کئوگ و کندی ۱۹۹۸).

برای اندازه گیری ظرفیت نگهداری آب حدود ۵ گرم ماست (Y) وزن شد و در دستگاه سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۹٤۹ g در دمای ^{o}C ۱۰ سانتریفوژ گردید. مقدار آب جدا شده توزین شد (W) (ساهان و همکارن ۲۰۰۸). محاسبات با فرمول زیر به روش سادینی و همکاران b۲۰۰۵ انجام شد.

$$WHC=\frac{(Y-W)\times 100}{Y}$$

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماست با استفاده از ارزیابی مهار رادیکال های ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ماست به عنوان توانایی عصاره استخراج شده از ماست برای مهار رادیکال‌های DPPH تعیین شد. برای اینکار محلول ۰/۱ میلی مولار رادیکال DPPH در اتانول ۹۵٪ تهیه شد. ۸۰۰ میکرولیتر از محلول اتانولی DPPH با ۰/۲ میلی لیتر از نمونه یا ۹۵٪ اتانول به عنوان کنترل مخلوط و به خوبی همزده شد و بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق جذب هر نمونه درطول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان درصد DPPH مهار شده گزارش شد که به صورت زیر محاسبه گردید (مک کوئی و همکاران ۲۰۰۵، شوری و همکاران ۲۰۱۱ و امیردیوانی و همکاران ۲۰۱۱).

$$\text{فعالیت آنتی اکسیدانی} = \frac{(\text{جذب نمونه}-\text{جذب کنترل})}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق، از روش سطح پاسخ و از طرح مرکب مرکز وجه[6] استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل میزان کازئینات سدیم، میزان عصاره نعناع فلفلی و مدت زمان نگهداری در ۳ سطح بود (جدول۱).

جدول۱- نمایش طراحی آزمون ها بر اساس روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکز وجه با سه متغیر کازئینات سدیم (A)، عصاره نعناع فلفلی (B) و مدت زمان نگهداری (^oC)

run	سطوح کد شده			سطوح کد نشده		
	A	B	C	A	B	C
۱	−۱	−۱	−۱	۰	۰	٤
۲	−۱	−۱	+۱	۰	۰	۲۰
۳	−۱	+۱	−۱	۰	۰/٤	٤
٤	−۱	+۱	+۱	۰	۰/٤	۲۰
٥	+۱	−۱	−۱	٤	۰	٤
٦	+۱	−۱	+۱	٤	۰	۲۰
۷	+۱	+۱	−۱	٤	۰/٤	٤
۸	+۱	+۱	+۱	٤	۰/٤	۲۰
۹	−۱	۰	۰	۰	۰/۲	۱۲
۱۰	+۱	۰	۰	٤	۰/۲	۱۲
۱۱	+۱	−۱	۰	۲	۰	۱۲
۱۲	۰	+۱	۰	۲	۰/٤	۱۲
۱۳	۰	۰	−۱	۲	۰/۲	٤
۱٤	۰	۰	+۱	۲	۰/۲	۲۰
۱٥	۰	۰	۰	۲	۰/۲	۱۲
۱٦	۰	۰	۰	۲	۰/۲	۱۲
۱۷	۰	۰	۰	۲	۰/۲	۱۲
۱۸	۰	۰	۰	۲	۰/۲	۱۲
۱۹	۰	۰	۰	۲	۰/۲	۱۲
۲۰	۰	۰	۰	۲	۰/۲	۱۲

تعداد نمونه های آزمایشی ۲۰ عدد بود که در این میان ٦ آزمون تکرار در نقطه مرکزی بود که از این تعداد برای تعیین خطای آزمایش استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها نرم افزار SAS V9.2 مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز رگرسیون با مدل درجه دوم زیر انجام گرفت.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3}\beta_i X_i + \sum_{I=1}^{3}\beta_{ij} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2}\sum_{j=i+1}^{3}\beta_{ij} X_i X_j$$

در این فرمول Y پاسخ پیش بینی شده، β_0 ضریب ثابت، β_i اثرات خطی، β_{ii} اثرات مربعات، β_{ij} اثرات متقابلو X_i و X_j متغیرهای مستقل می‌باشند. برازش مدل درجه دوم با ضریب تبیین وضریب تبیین اصلاح شده و معنی‌دار بودن با عدد F بیان شد.

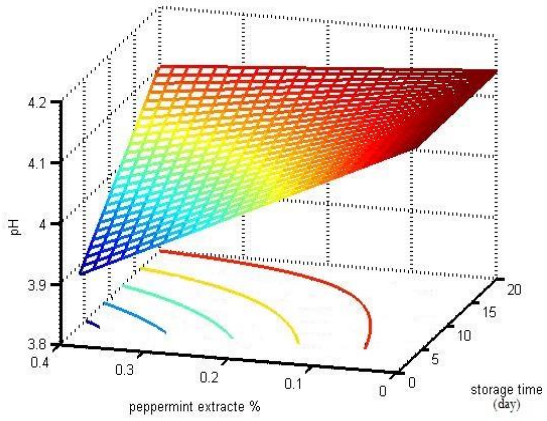
نتایج و بحث

pH و اسیدیته قابل تیتراسیون کل

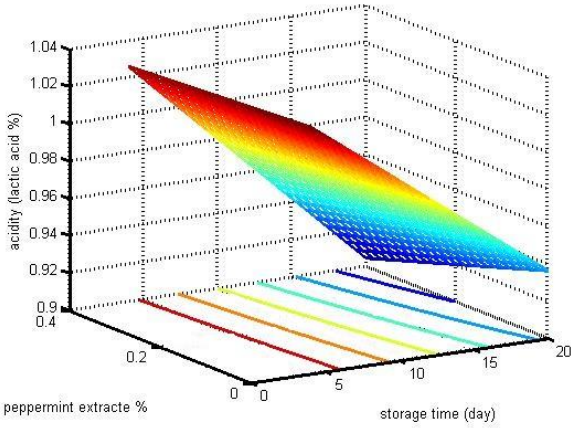
نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد (جدول ۲) که اثر خطی کازئینات سدیم و عصاره نعناع و تاثیر متقابل زمان و عصاره بر pH و اثر خطی کازئینات سدیم و زمان نگهداری و اثر متقابل زمان نگهداری و میزان عصاره بر درصد اسیدیته معنی دار بود ($P<0.05$). با افزایش مقدار عصاره نعناع pH کاهش و اسیدیته افزایش یافت (شکل‌های ۱ و ۲). به نظر می‌رسد حضور عصاره نعناع فعالیت متابولیکی باکتری های ماست را افزایش داده است (امیردیوانی و همکاران ۲۰۱۱).

در زمان‌های نخست نگهداری با افزایش مقدار عصاره نعناع و به دنبال آن افزایش سوبسترای در دسترس جهت رشد میکروارگانیسم‌ها (وای-یی و همکاران ۲۰۱۰) فعالیت متابولیکی باکتری افزایش یافته و موجب کاهش pH و افزایش اسیدیته در نمونه های حاوی عصاره می‌شود. بعلاوه عصاره نعناع افزوده شده دارای pH اسیدی می‌باشد که خود می تواند بر میزان pH نمونه های حاوی عصاره موثر باشد. اما در اواخر دوره نگهداری با افزایش مقداره عصاره نعناع pH تغییر چندانی نشان نمی‌دهد. علت آن شاید به دلیل تفاوت در ظرفیت بافری شیرهای مخلوط شده باشد (آماتایاکول و همکاران ۲۰۰٦).

[6] Central Composite Face (CCF)



شکل ۱- تاثیر درصد عصاره نعناع بر pH در طول ۲۰ روز نگهداری



شکل ۲- تاثیر درصد عصاره نعناع بر اسیدیته در طول ۲۰ روز نگهداری

همچنین با افزایش مقدار کازئینات سدیم pH افزایش پیدا کرد. با مصرف مواد قندی و اسیدهای آلی (جای ۱۹۹۰) میکروارگانیسم شروع به استفاده از منابع جایگزین می‌کنند. *ل. کازئی* و باکتری‌های آغازگر ماست دارای ویژگی های پروتئولیتیکی هستند (وولراد و بوکلمن ۱۹۹۲، لاو و آنا دریکمن ۱۹۹۷، شیحاتا و شاه ۲۰۰، دونکر و همکاران ۲۰۰۷). طبق مطالعات جیلارد (۱۹۹۵) وقتی میزان آمینواسیدهای آزاد و پپیتدها کم باشد، لاکتیک اسید باکتری ها که به سیستم پروتئولیک وابسته هستند با هیدرولیز کافی پروتئین های شیر این نیاز را تامین می‌کنند. این عمل سبب افزایش ناگهانی میکروارگانیسم ها شده و در نتیجه افزایش ناگهانی در رشد باکتریایی موجب افزایش غلظت اسیدها و کاهش در pH می شود. در این مطالعه pH افزایش یافت که ممکن است به دلیل افزایش گروه های آمینو اسیدی آزاد باشد (دونکر و همکاران ۲۰۰۷).

معادله پیشگویی زیر به ترتیب برای مقدار pH و اسیدیته در ماست پروبیوتیک بدون چربی با استفاده از جدول ۲ و برازش داده‌ها به دست آمد.

$$pH= 4.14 +0.062A-0.77B+0.034BC$$
$$Acidity = 1.06+0.07A-0.006C-0.004CB$$

که در آن مقادیر A، B و C به ترتیب نشان دهنده مقدار کازئینات سدیم، عصاره نعناع فلفلی و مدت زمان نگهداری می باشد.

آب اندازی و ظرفیت نگهداری آب

آب اندازی یکی از معایب مهم در ماست می‌باشد و با عنوان وجود پروتئین آب پنیر روی سطح ژل تعریف می‌شود. آب اندازی از پارامترهایی است که ویژگی کیفی محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برای این منظور از پایدار کننده‌هایی تحت عنوان هیدروکلوئیدها یا صمغ‌ها برای بهبود ظرفیت جذب آب و جلوگیری از آب اندازی استفاده می‌شود (سایرب و همکاران ۱۹۹۸). اما باید به این نکته توجه شود که برهمکنش هیدروکلوئیدها با پروتئین‌های شیر گاهی می‌تواند منجر به افت ویژگی ماست گردد.

در این تحقیق اثر خطی و مربعی کازئینات سدیم و مدت زمان نگهداری بر درصد آب اندازی واثر خطی و مربعی زمان نگهداری و اثر متقابل کازئینات سدیم و زمان نگهداری بر میزان ظرفیت نگهداری آب معنی‌دار بود ($P<0.05$). اما عصاره نعناع تأثیر معنی‌داری بر درصد سینرزیس و میزان ظرفیت نگهداری آب نداشت.

با افزایش مقدار کازئینات سدیم درصد سینرزیس و ظرفیت نگهداری آب کاهش یافت (شکل ۳ و ٤). علت آن افزایش ماده خشک شیر در اثر افزودن کازئینات سدیم می‌باشد. مطالعه تأثیر ماده خشک و محتوای پروتئینی

بر ویژگی‌های ماست به طور جداگانه مشکل است (دامین و همکاران ۲۰۰۹). پرینتیک و همکاران (۱۹۹۲) بهبود بافت ماست را با افزایش مقدار پروتئین گزارش کردند.

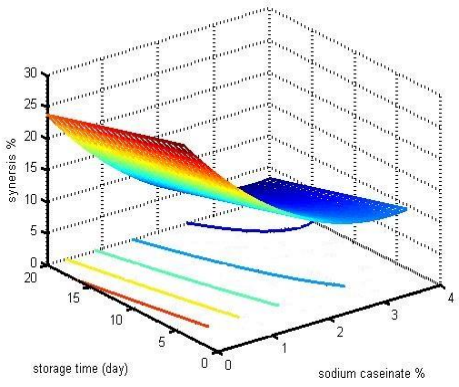
جدول ۲- خلاصه تجزیه واریانس داده‌ها

منابع متغیر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		pH	اسیدیته	ظرفیت نگهداری آب	سینرزیس	ویسکوزیته	پروبیوتیک	DPPH
رگرسیون	۹	۰/۰۳٤۵۸**	۰/۰۳۷۳**	۲۲٦/۵۱۷**	۱۵۵/۷۷۹***	۱٦×۱۰^٦***	۰/۲۰۷***	۷٤۷/٤۱
خطی	۳	۰/۰۷٤۱***	۰/۰۵۵۳***	۲۹۸/٦۸٤**	۳۸۹/۹۱٦***	٤۵×۱۰^٦***	۰/۳٤۳**	۱٦۰۳/۲۱***
درجه دو	۳	۰/۰۱۵۳	۰/۰۰٦۷	۲۱۰/۵٦۸۳**	٦۷/۸٤٦**	۱۵×۱۰^۵**	۰/۱۸۷*	۵۳٤/۸٤٤**
عرض از مبدا	۳	۰/۰۱٤٤	۰/۰۱۹۷	۱۵۵/۳	۹/۵۷۵	۱۰×۱۰^۵	۰/۰۹۱۵	۱۱٤/۱۷۸۱
عدم برازش داده‌ها	۵	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۷	٤۱/۷۹۱	۱٤/۷٤٤	۱۰×۱۰^٦	۰/۰۵	۸۵/۲۹٤
خطای خالص	۵	۰/۰۱۰۳۱	۰/۰۰۱۹	۱۵/۱۹۱	٤/۱٦٤	۵٤×۱۰^٦	۰/۰۱۵۷	۲۲/۱۲۲
ضریب تبیین	–	۰/۸٤٤	۰/۸٤۵	۰/۸۷۵	۰/۹۳٦	۰/۹۷۳	۰/۸۵	۰/۹۳٦
ضریب تبیین اصلاح شده	–	۰/۷۰۲	۰/۷۰۵	۰/۷٦۲	۰/۸۸۰	۰/۹٤۷	۰/۷٦۵	۰/۸٦

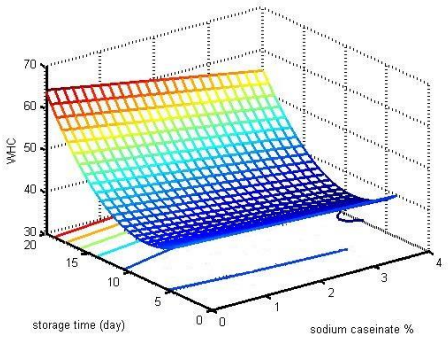
معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ * معنی دار در سطح ۰/۰۰۱

طبق مطالعه عزیزنیا و همکارن (۲۰۰۸) با افزایش ماده خشک ماست سینرزیس کاهش یافت. افزایش غلظت ماده خشک (مادلر و کالب ۱۹۸۳ و مادلر و همکاران ۱۹۸۳)، موجب افزایش اتصال آب (تراکو و مستری ۱۹۹۸) و موجب کاهش سینرزیس می‌شود که نتایج این بررسی را تایید می کند.

حداقل میزان آب اندازی در بیشترین مقدار کازئینات سدیم و مدت زمان نگهداری بیشتر مشاهده شد. افزایش ماده خشک شیر تا ۱۵ الی ۱٦٪ برای جلوگیری از سینرزیس متداول می باشد (آماتایاکول ۲۰۰٦). تأثیر کازئینات سدیم در کاهش میزان آب اندازی بیشتر بود. استفاده از ترکیباتی بر پایه پروتئین مانند کازئینات سدیم و کلسیم و شیر خشک موجب کاهش سینرزیس می‌شود (مادلر ۱۹۸۳ و گنزالز ۲۰۰۰).



شکل ۳-تاثیر مقدارکازئینات سدیم بر درصد آب اندازی در طول ۲۰ روز نگهداری



شکل ۴- تاثیر مقدارکازئینات سدیم بر درصد ظرفیت نگهداری آب در طول ۲۰ روز نگهداری

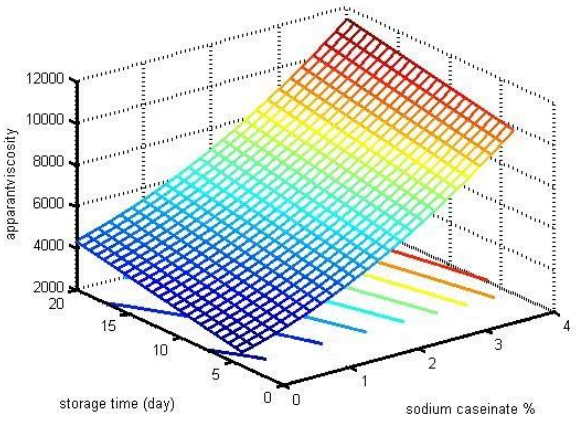
.....نتایج مشابهی برای میزان ظرفیت نگهداری آب مشاهده شد. با هیدرولیز پروتئین‌ها در طول زمان اسیدهای آمینه آزاد و پلی پپتیدهای کوتاه زنجیر تولید می‌شود که هیدروفیلیک بوده و باعث بهبود ظرفیت نگهداری آب می‌شوند (کومبی و همکاران ۲۰۰۸). البته دناتوره شدن پروتئین‌ها ممکن است تأثیر عکس (سودینی و همکاران ۲۰۰۶) و یا مثبت (ایسلتن و همکاران ۲۰۰۶) بر میزان ظرفیت نگهداری آب و آب-اندازی داشته باشد. همانطور که از جدول ۱ مشاهده می شود تأثیر زمان بر میزان ظرفیت نگهداری آب قوی‌تر از سایر فاکتورها است.

معادله پیشگویی زیر برای میزان آب اندازی و ظرفیت نگهداری آب با استفاده از جدول ۲و برازش داده‌ها به دست آمد.

$$Syneresis=31.31-11.25A-0.386C+1.53A^2$$
$$WHC=49.73-2.763C-0.117AC+0.174C^2$$

ویسکوزیته ظاهری

یکی از فاکتورهای مهم و تأثیرگذار در کیفیت محصول، ویسکوزیته ظاهری است که ویژگی یک ماده در مقابل تغییر شکل را نشان می دهد. ترکیب شیر و مقدار ماده خشک آن در کنار عواملی مانند دما، زمان حرارت دهی و نوع استارتر مورد استفاده و شرایط نگهداری از عوامل موثر در ویژگیهای رئولوژیکی محصول نهایی هستند (جرارد و همکاران ۲۰۰۷). در این تحقیق اثر خطی مدت زمان نگهداری، کازئینات سدیم، عصاره نعناع فلفلی و تأثیر مربعی کازئینات سدیم بر مقدار ویسکوزیته معنی‌دار بود ($P<0.05$). با افزایش میزان کازئینات سدیم، عصاره نعناع و مدت زمان نگهداری ویسکوریته ظاهری افزایش یافت. شکل ۵ اثر میزان کازئینات سدیم و مدت زمان نگهداری را بر ویسکوزیته ظاهری نشان می‌دهد. همانطور که از شکل فوق مشاهده می‌شود ماست حاوی مقدار بالای کازئینات بیشترین ویسکوزیته را دارد.



شکل ۵- تاثیر مقدار**کازئینات سدیم بر ویسکوزیته در طول ۲۰ روز نگهداری**

طبق مطالعات پرنتیس (۱۹۹۲) افزایش مقدار پروتئین، یک فاکتور اصلی مؤثر در بافت است و غنی سازی شیر باعث توسعه و تجمع میسل های کازئین می‌شود. سدیم کازئینات و افزودنی های بهبود دهنده ماست ویژگی-های کیفی ماست را افزایش می‌دهند (دمین و همکاران ۲۰۰۹). مادلر (۱۹۸۳) و گنزالز (۲۰۰۳) گزارش کردند استفاده از ترکیباتی بر پایه پروتئین مانند کازئینات سدیم و کلسیم و شیر خشک موجب افزایش ویسکوزیته می شود. اثر کازئینات سدیم بر ویسکوزیته بیشتر از سایر فاکتورها مؤثر بود. همچنین دونکر و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند ماست حاوی *ل. کازئی* به دلیل

تولید EPS[1] نسبت به نمونه‌های دیگر دارای ویسکوزیته بیشتری می باشد.

معادله پیشگویی زیر برای ویسکوزیته ظاهری با استفاده از جدول ۳ و برازش داده ها به دست آمد.

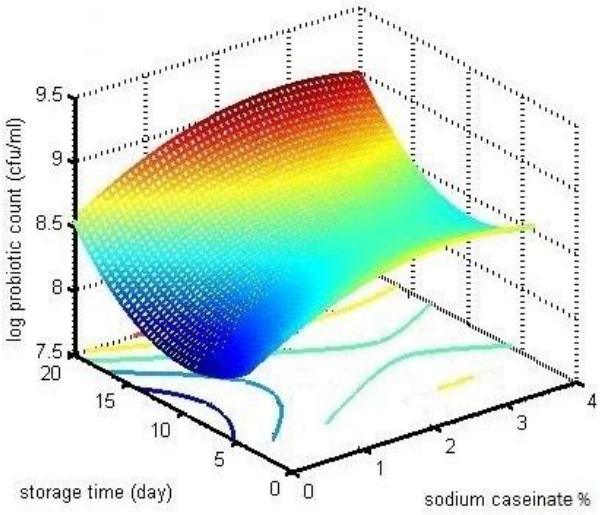
ویسکوزیته ظاهری= $2247+852.9A+3109B+102.5C+229.9A^2$

تغییرات *لاکتوباسیلوس کازئی*

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر خطی کازئینات سدیم، عصاره نعناع و مدت زمان نگهداری و اثرات مربعی کازئینات سدیم و زمان و اثر متقابل عصاره نعناع و زمان نگهداری بر میزان رشد این باکتری معنی دار بود ($P<0.05$).

با افزایش مقدار کازئینات سدیم و عصاره نعناع تعداد این باکتری افزایش یافت (شکل ٦). علت آن ممکن است به دلیل افزایش مواد در دسترس برای رشد *ل. کازئی* باشد باکتری‌های آغازگر ماست و *ل. کازئی* آنزیم‌هایی خارج و داخل سلولی تولید می‌کنند که قادرند پپتیدهای فعال بیولوژیکی و بردی کینین را هیدرولیز کنند. این آنزیم به دلیل محتوای پرولینی بالا یکی از مهم‌ترین آنزیم های باکتریایی مورد استفاده در صنایع لبنی است (دونکر و هکاران ۲۰۰۷). لذا *ل. کازیی* کازئینات سدیم را مورد مصرف قرار داده و با تبدیل آن به پپتیدهای جدید (دونکر و همکاران ۲۰۰۷) و به خصوص مواد بیواکتیو، مواد مغذی در دسترس برای رشد افزایش یافته و منجر به افزایش رشد ل. کازئی شده است (گنزالز و همکاران ۲۰۱۱). بشترین رشد پروبیوتیک در میزان کازئینات بالاتر و اواخر دوره نگهداری مشاهده شد.

پروتئولیز فاکتورهای رشد ضروری را به صورت پپتیدها و اسیدهای آمینه برای بهبود رشد و زنده مانی باکتری های پروبیوتیک در محصولات فراهم می‌آورد (رامچاندران ۲۰۱۰). نیلسن و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که پروتئازها در طول دوره نگهداری در یخچال نیز فعال می باشند. رامچاندران و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند ماست حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* و اینولین پروتئولیز بالایی داشتند.



شکل ۶-.تاثیر مقدار کازئینات سدیم بر رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* در طول ۲۰ روز نگهداری

امیردیوانی و همکاران (۲۰۱۱) افزایش رشد استارترها را با افزایش میزان عصاره نعناع گزارش کردند. شاید به دلیل محدودیت میزان لاکتوز در محیط مورد استفاده باکتری های آغازگر قرار گرفته که در نتیجه آن میزان رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* کاهش یافته است اما با گذشت زمان و استفاده از منابع جایگزین و همینطور افزایش رشد باکتری های آغازگر و اثر سینرژیستیکی آن بر رشد پروبیوتیک ها طبق گزارش سامونا و همکاران (۱۹۹٤) تعداد *لاکتوباسیلوس کازئی* افزایش یافت.

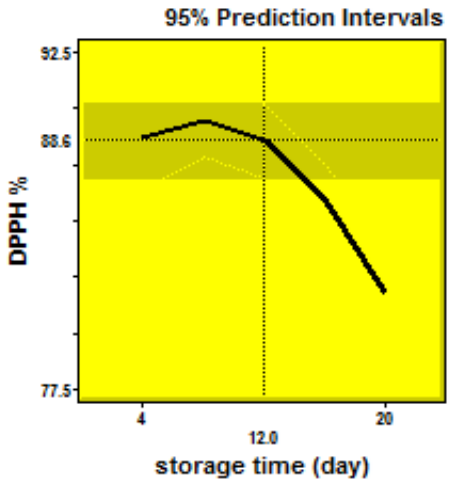
معادله پیشگویی زیر برای تعداد باکتری ل. کازئی با استفاده از جدول ۳ و برازش داده ها به دست آمد.

$$\log probiotic\ count=8.742+0.355A-1.27B-0.143C-0.061A^2+0.089BC+0.006C^2$$

[1]Exopolysaccharide

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

تولید ماست گیاهی[1] به گسترش محصولات لبنی شامل مواد فیتوشیمیایی گیاهی کمک خواهد کرد. از آنجایی که ماست هم بعضی از خواص عملکردی گیاهان را نشان می‌دهد (بیطرف و همکاران ۲۰۱۰). در این تحقیق توانایی افزودن این گیاهان برای افزایش ارزش عملکردی ماست مورد بررسی قرار گرفت. بیماری‌های قلب و عروق بیماری‌های وابسته به استرس مزمن است (سردولا و همکاران ۱۹۹٦)، و بنابراین ممکن است مصرف مقدار کافی آنتی اکسیدان ها استراتژی مهمی را جهت کنترل اثرات مخرب بعدی در این بیماری ها شکل دهد (تامسون و همکاران ۱۹۹۵). مواد فنولیک متابولیت-های با منشأ گیاهی هستند که قسمتی مهم از رژیم غذایی انسان و حیوان را تشکیل می دهند (شتی و همکاران ۲۰۰۵). با توجه به جدول ۲، تنها اثر خطی و مربعی زمان نگهداری بر فعالیت آنتی اکسیدانی معنی دار بود ($P<0.05$). همانطوریکه شکل ۷ نشان می دهد که با گذشت زمان فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یافت.



شکل ۷- تاثیر مقدار عصاره نعناع فلفلی بر درصد فعالیت آنتی اکسیدانی در طول ۲۰ روز نگهداری

معادله پیشگویی زیر برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از جدول ۳ و برازش داده ها به دست آمد.

فعالیت آنتی اکسیدانی $=34.81+2.27C-0.21C^2$

بهینه سازی

با توجه به تحلیل نمودارها و این نکته که شرایط بهینه‌ی یک پاسخ، ممکن است برای پاسخ دیگر نامساعد باشد. بنابراین باید الگوی ساختی را معرفی کرد که تاحد امکان تمامی پاسخ ها را به نحو رضایت بخشی بهینه نماید. برای این منظور کانتور پلات های مختلف بر روی هم قرار گرفت و منطقه ای که مشخصات تمامی پاسخ ها را برآورد کرد، به عنوان منطقه بهینه معرفی گردید. مبنای بهینه سازی ماکزیمم کردن مدت زمان نگهداری، ویسکوزیته، خاصیت آنتی اکسیدانی، ظرفیت نگهداری آب و تعداد *لاکتوباسیلوس کازئی* و به حداقل رساندن میزان آب اندازی، میزان کازئینات سدیم و عصاره نعناع می‌باشد. در شرایط بهینه، میزان کازئینات سدیم ۲ درصد، عصاره نعناع ۰/۲ درصد و زمان نگهداری ۸ روز تعیین گردید. در این شرایط تعداد *لاکتوباسیلوس کازیی* ۸/۳٦ سیکل لگاریتمی، ظرفیت نگهداری آب ۳٦/۸۹ درصد، میزان آب اندازی ۱۱/۸۲ درصد، میزان ویسکوزیته ٦۳۱٤ سانتی پوآز و DPPH ۹۸/۲۸ درصد تعیین شد.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله مراتب سپاس خود را از همکاری آقایان پروفسور فرهادی، شب بو امیردیوانی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

[1]Vegetable yogurt

منابع مورد استفاده

Amatayakul T, Sherkat F and Shah N P, 2006. Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratio and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. Food Hydrocolloids, 20:314-324.

Amirdivani Sh and Salihin Baba A, 2011. Change in yogurt fermentation characteristic and antioxidant potential and in vivo inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. Food Science and Technology, 44:1458-1464

AOAC, 1997. Official methods for analysis 16 th ed. 3 rd rev. AOAC Arlington, VA.

Bitaraf M S, Khodaiyan F, Mohhamadifar M A and Mousavi S M, 2010.Application of Response Surface Methodology to improve yogurt containing *Lactobacillus Reuteri*. Food Bioprocess Technology DOI 10.1007/s11947-010-0433-2.

Cumby N, Zhong Y, Naczk M and Shahidi F, 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. Food Chemistry, 109:144–148.

Damin M R, Alcantara M R, Nunes A P and Oliveira M N, 2009. Effects of supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium casinate on acidification kinetics, rheological properties and stracture of nonfat stirred yogurt. Food Science and Technology, 42:1744-1750.

Donkor O N, Henriksson A, Singh T K, Vasilijevic T and Shah N P, 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. International Dairy Journal, 17:1321-1331.

Food and Agricultural Organization (FAO)/World Health Organization (WHO), 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in foods. London ON, Canada.

Girard M and Schaffer-Lequart C, 2007. Gelation of skim milk containing anionic exopolysaccharides and recovery of texture after shearing. Food Hydrocolloids, 21:1031-1040.

Golluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A, Ozken H, 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from MenthalongifoliaL.ssp.longifolia. Food Chemistry, 103:1449-1456.

Gonzalez-Gonzalez C R, TuohyK M and Jauregi P, 2011. Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. International Dairy Journal, 21:615-622.

Guzman-Gonzale M, Morais F and Amigo L, 2000. Influence of skimmed milk concentrates replacement by dry dairy products in alow-fat set-type yoghurt model system. II: Use of caseinates, coprecipitate and blended dairy powders. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80:433–438.

Hess S J, Roberts R F and Ziegler G R, 1997. Rheological properties of non-fat yoghurt stabilised using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* producing exopolysaccaride or using commercial stabiliser system. Journal of Dairy Science, 80:252–263.

Isleten M and Karagul-Yuceer Y, 2006. Effects of dried dairy ingredients on physical and sensory properties of nonfat yogurt. Journal of Dairy Science, 8:2865-2872.

Jai J M, 1990. Modern Food Microbiology. Chapman and Hall, Vol: 1, 2.

Keogh M K, O Kennedy B T, 1998. Rheology of stirred yogurt as affected by add milk fat, protein, and hydrocolloeids. International of Food Science, 63:108-112

Kris-Etherton P M, Lefevre M, Beecher G R, Gross M D, Keen C L and Etherton T D, 2004. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. Annual Reviews of Nutrition, 24:511-538.

Kristo E, Biliaderis C G, and Tzanetakis N, 2003.Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. International Dairy Journal, 13: 517–528.

Lourens-Hattingh A and Viljeon C B, 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. International Dairy Journal, 11:1–17.

McCuea P P and Shetty K, 2005. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. Process Biochemistry, 40:1791-1797

Mistry V V and Hassan H N, 1992. Manufacture of non-fat yogurt from high milk protein powder. Journal of Dairy Science, 75:947–957.

Modler H W, Larmond M E, Lin C S, Froehlich D and Emmons D B, 1983. Physical and sensory properties of yogurt stabilized with milk proteins. Journal of Dairy Science, 66:422–429.

Nielsen M S, Martinussen T, Flambard B, Sørensen K I and Otte J, 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. International Dairy Journal, 19:155–165.

Passephol T, Small D M and Sherkat F, 2008. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. Journal of Texture Studies, 39:617–634.

Pihlanto A, Virtanen T and Hannu k, 2010. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. International Dairy Journal, 20:3-10

Ramchandran L and Shah N P, 2010. Characterization of functional, biochemical and textural properties of synbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. Food Science and Technology, 43:819-827.

Ravula R R and Shah N P, 1998.Selection enumeration of *Lactobacillus casei* from yoghurts and fermented milk drinks. Biotechnology Techniques, 12: 819–822.

Sahan N, Yasar K and Hayaloglu A A, 2008. Physical, chemical and flavor quality of non-fat yogurt as affected by a b-glucan hydrocolloidal composite during storage. Food Hydrocolloids, 22:1291–1297.

Samona A and Robinson R K, 1994. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. Journal of Society of Dairy Technology, 47:58–60.

Sanchez C, Zuiga-Lopez R, Schmitt C, Despond S and Hardy J, 2000. Microstructure of acid-induced skim milk locust bean gum xanthan gels. International Dairy Journal, 10:199–212.

Sandoval-Castilla O, Lobato-Calleros C, Aguirre-Mandujano E and Vernon-Carter E J, 2004. Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. International Dairy Journal, 14:151–159.

Serdula M K, Byers M H, Simoes E, Mendlein M L and Coates R J, 1996. The association between fruit and vegetable intake and chronic disease risk factors. Epidemiology, 7:161-165.

Shah N P, 2000. Some beneficial effects of probiotic bacteria. Bioscience Microflora, 19: 99–106.

Shah N P, 2007. Functional cultures and health benefits. International Dairy Journal, 17:1262–1277.

Shetty K, Clydesdale F and Vattem D, 2005. Clonal screening and sprout based bioprocessing of phenolic phytochemicals for functional foods. In K.

Shori A B and Baba A S, 2011. Cinnamomumverum improved the functional properties of bio yogurts made from camel and cow milks. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 10:101-107.

Sodini I, Lucas A, Tissier J P and Corrieu G, 2005. Physical properties and microstructure of yoghurts supplemented with milk protein hydrolysates. International Dairy Journal, 15:29–35.

Sodini I, Mattas J and Tong P S, 2006. Influence of pH and heat treatment of whey on the functional properties of whey protein concentrates in yoghurt. International Dairy Journal 12:1464-1469.

Syrbe A, Bauer W J and Klostermeyer H, 1998. Polymer science concept in dairy system –an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. International Dairy Journal, 8:179-193.

Thompson K H and Godin D V, 1995. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. Nutrition Research, 15:1377-1410.

Trachoo N and Mistry V V, 1998. Application of ultrafiltered sweet buttermilk and sweet buttermilk powder in the manufacture of non-fat and low-fat yogurts. Journal of Dairy Science, 81:3163–3171.