نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، ص. ۱۳۶-۱۲۱

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 8, No. 2, Summer 2012, p. 121-136

بهینه سازی فرآیند تولید ماست پروبیوتیک کم‌چرب با استفاده از طرح مرکب (*Combined Design*)

نسرین فرجی [۱*]- محمد علیزاده خالدآبادی [۲]- اصغر خسروشاهی اصل [۳]- سهیلا فرجی [۴]

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۶
تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۱۸

چکیده

با توجه به افزایش سطح آگاهی مردم در خصوص ارتباط بین مصرف زیاد چربی و بیماری‌هایی نظیر چاقی، سخت‌شدن دیواره رگ‌ها، بیماری‌های قلبی – عروقی، افزایش فشارخون، چاقی، آسیب‌های بافتی و سرطان تقاضا در جهت تولید فرآورده‌های غذایی سالم مانند فرآورده‌های لبنی کم‌چرب و پروبیوتیک افزایش چشم‌گیری داشته است. در این پژوهش، به‌منظور بهینه سازی فرمولاسیون ماست پروبیوتیک کم‌چرب تأثیر غلظت‌های مختلف اینولین، کیتوزان و زانتان در سه سطح (۰،۱ و۳ درصد) بر بقای *Lactobacillus acidophilus*، ویسکوزیته ظاهری، ظرفیت نگهداری آب (WHC)، اسیدیته و ارزیابی حسی در طی ۱۵ روز نگهداری مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز داده‌ها نشان داد، افزایش نسبت اینولین و کیتوزان باعث افزایش بقای (La-5)، ویسکوزیته ظاهری، WHC، اسیدیته و ویژگی‌های حسی در طی نگهداری می‌شود. با استفاده از روش‌های بهینهسازی گرافیکی و قرارگرفتن نمودارهای کانتورپلات مربوط به هر ویژگی بر روی هم، نسبت‌های بهینه اینولین۹۳/۴ درصد، کیتوزان ۶ درصد و زانتان ۰/۶ درصد تعیین گردید.

واژه‌های کلیدی: ماست پروبیوتیک کم‌چرب، اینولین، کیتوزان، زانتان، طرح مرکب

مقدمه

در سال‌های اخیر، با توجه به افزایش سطح آگاهی مردم تقاضا برای مصرف غذاهای عملگر[۵] (مواد غذایی که علاوه بر داشتن خواص تغذیه‌ای، حاوی خواص سلامت بخش نیز باشند) از جمله فرآورده‌های لبنی پروبیوتیک و کم‌چرب بسیار گسترش یافته است. پروبیوتیک‌ها بر اساس تعریف FAO/WHO ریززنده‌هایی هستند که اگر به تعداد کافی به صورت زنده مورد استفاده قرار گیرند، اثرات سلامت بخش در میزبان از خود بروز می‌دهند. اگرچه هنوز توافق کلی روی حداقل تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده در فرآورده نهایی وجود ندارد در برخی منابع 10^6 cfu/ml و برخی 10^8 -10^7 cfu/ml اشاره شده است. بقای پروبیوتیک‌ها را می‌توان با کاربرد کربوهیدرات‌های پری بیوتیکی افزایش داد که ترکیب پروبیوتیک و پری بیوتیک، سین بیوتیک نامیده شده است (Ta 2006 *et al.*,؛ Istelen *et al.*,2006؛ rrega Chiavaro *et al.*,2007). *Lactobacillus acidophilus* (*La-5*) به عنوان یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک حاوی اثرات سلامت بخشی مانند: بهبود عدم تحمل لاکتوز، کاهش کلسترول و تنظیم چربی خون، جلوگیری و کنترل سرطان‌ها، درمان زخم معده، درمان التهاب روده، اسهال، بهبود جذب املاح و تقویت سیستم ایمنی بدن می‌باشند (Zhao *et al.*,2007؛ Heenana *et al.*, 2004؛ Aryana *et al*,.2004). از طرفی با توجه به ارتباط میان مصرف غذاهای پرچرب و بیماری‌هایی مانند بیماری‌های قلبی – عروقی، افزایش فشارخون، چاقی، سرطان، استرس و مشکلات گوارشی، تولید فرآورده‌های رژیمی وکم‌چرب رو به رشد می‌باشند. چربی علاوه بر تغذیه، ویژگی‌های رئولوژیکی و حسی غذاها مانند طعم و مزه، احساس دهانی و بافت را تحت تأثیر قرار می‌دهد، از این رو حذف چربی به راحتی امکان پذیر نیست (Akin *et al.*,2007). بنابراین برای فرمولاسیون فرآورده‌های کم‌چرب، استفاده از ترکیباتی که به‌طور نسبی و یا کامل جایگزین چربی شده و ویژگی های چربی را ایجاد می‌کنند پیشنهاد شده است، جایگزین‌های چربی ترکیباتی هستند که می‌توانند روی ویژگی های محصول نظیر طعم، احساس دهانی، بافت ویسکوزیته و سایر ویژگی‌های ارگانولپتیک تأثیر بگذارند. اینولین یک

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
(*- نویسنده مسئول: (Email: Nasrin.faraji88@yahoo.com
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد ورامین

5 -Functional Food

پلی ساکارید ذخیره‌ای طبیعی درگیاهان به شمار می‌آید که شامل زنجیره‌ای خطی از مولکول‌های فروکتوز با اتصالات (۲→۱)β با یک مولکول گلوکز در انتهای زنجیره فروکتوز با اتصال (۲→ ۱)α می‌باشد و دارای درجه پلی مریزاسیون (DP) متفاوت بین ۲ تا ۶۰ می‌باشد. بیشترین میزان اینولین استخراجی از گیاهی به نام کنگرفرنگی بوده است. اینولین از ویژگی‌های بسیار فوق‌العاده‌ای از جمله خاصیت پری بیوتیکی، فیبر رژیمی، بافت دهندگی، جذب کننده مینرال‌ها مانند کلسیم و منیزیم، کاهش کلسترول خون و به ویژه جایگزینی چربی در محصولات مختلف مانند فرآورده‌های لبنی، کیک، سس مایونز و غیره برخوردار می‌باشد (Aryana *et al.,* 2004 ؛ Speigel *et al.*,2007). کیتوزان یک پلی ساکارید ازت دار متشکل از کوپلیمر گلوکزآمین و N– استیل گلوکز آمین بوده است که از داستیله شدن قلیایی کیتین حاصله از پوسته اسکلت خارجی سخت پوستان و جانوران مفصل‌دار مانند پوسته میگو، خرچنگ و کریل مشتق شده است. کیتوزان دارای کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی، داروسازی، کشاورزی، بیوتکنولوژی و دیگر رشته‌ها دارد. کیتوزان حاوی ویژگی‌هایی از جمله خاصیت ضد میکروبی، کاهش دهندگی کلسترول و گلوکز خون، قوام دهندگی و ایجاد بافت مناسب، خواص امولسیفایری می‌باشد. اخیراً تحقیقات زیادی برروی استفاده از کیتوزان در صنایع لبنی انجام شده است (No *et al.*,2007؛ Rodriguez *et al.*,2008). صمغ زانتان یک هیدروکلوئید خنثی بوده است و از نوعی باکتری به نام *Xanthomonas campestris* استخراج می‌شود. ساختار اصلی این پلی ساکارید شامل واحدهای گلوکز با انشعاباتی از زنجیره‌های تری ساکارید شامل ۲ واحد مانوز و ۱ واحد اسید گلوکونیک می‌باشد (Zhao *et al.*,2009) . از خصوصیات مهم آن عبارت است از: ایجاد ویسکوزیته بالا از طریق برهم‌کنش با ترکیبات شیر و دیگر پلی ساکاریدها، پایداری حرارتی فوق العاده و پایداری در شرایط اسیدی می‌باشد (GarcõÂa-Ochoaa *et al.*,2000). هدف این مطالعه، بررسی امکان تولید ماست پروبیوتیک کم‌چرب با سه ترکیب اینولین، زانتان، کیتوزان و ارزیابی برخی ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی و میکروبی نمونه‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

در این پژوهش، شیر کم‌چرب (۰/۵درصد چربی) و شیر خشک بدون چربی از شرکت صنایع لبنی اروم بنیان (سانا) ارومیه تهیه گردیدند. صمغ اینولین (*Frutafit TEX*!) از شرکت*Sensus* هلند تهیه شد و صمغ کیتوزان و زانتان از شرکت *Sigma-Aldrich* خریداری شدند. استارتر تجاری (*LA۱۱*) و استارتر پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* (*La-۵*) از نمایندگی شرکت کریستین هانسن در تهران خریداری شدند.

تهیه ماست

برای تهیه هرنمونه، یک کیلوگرم شیر کم چرب (۰/۵ درصد چربی) را بر روی حمام بخار قرار داده و بعد از رسیدن به دمای حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد، پودر شیر پس چرخ به آن افزوده و توسط میکسر هم‌زده شد. سپس هیدروکلوئیدهای اینولین، زانتان و کیتوزان مطابق با طرح آزمایشی (جدول۱) افزوده و تا اختلاط کامل هم‌زده شدند. هر کدام از تیمارها در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه شده و پس از خنک شدن تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد استارترهای تجاری و پروبیوتیک *La-۵* به نمونه‌ها اضافه گردیدند. سپس نمونه‌ها به انکوباتور ۴۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. پس از رسیدن pH به ۴/۶ نمونه‌ها به یخچال ۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. پس از طی دوره زمانی معین آزمایش‌های لازم برروی آن‌ها صورت گرفت.

روش‌ها

بررسی شمارش جمعیت *Lactobacillus acidophilus* در نمونه‌های ماست

بدین منظور یک گرم از هر نمونه ماست با ۹ میلی‌لیتر محلول پپتون واتر (۰/۱درصد) مخلوط و کاملا یکنواخت گردید. از هر رقت، یک میلی‌لیتر به پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS-Agar به همراه ۰/۱۵درصد Oxgall-bile منتقل شد. همه پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت به صورت هوازی گرمخانه‌گذاری شدند و سپس تعداد پرگنه‌ها در هر پلیت شمارش گردید (Vinerola *et al.*,1999).

اندازه‌گیری میزان ویسکوزیته ظاهری

ویسکوزیته ظاهری با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد مدل (+Brookfield DVП) ساخت آمریکا و نوع اسپیندل LV۲ شماره (۶۴ و ۶۳) در ۳۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری شد (Chiavaro *et al.,* 2007).

تعیین ظرفیت نگهداری آب

در این روش حدود ۴۰-۳۰ گرم نمونه‌ها با دور g ۱۲۵۰ در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ گردید و WHC حاصل به صورت درصد نسبت رسوب جدا شده بر وزن اولیه نمونه ماست محاسبه گردید (Koegb *et al.,* 1998).

اندازه‌گیری میزان آب‌اندازی (سینرسیس)

در این روش حدود ۴۰-۳۰ گرم از نمونه‌ها با دور g ۲۲۲ در مای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ گردید و سینرسیس حاصل به صورت درصد نسبت حجم فاز مایع شفاف جدا شده بر وزن اولیه نمونه ماست محاسبه گردید (Paranell-clunies *et al.*, 1998).

اندازه‌گیری اسیدیته

اندازه‌گیری اسیدیته ماست طبق استاندارد ملی ایران شماره های ۶۹۵ و ۲۸۵۲ انجام شد.

ارزیابی حسی

آزمون ارزیابی حسی، توسط ۹ داوطلب انجام شد و برای ارزیابی طعم از آزمون هدونیک ۹ سطحی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای مطالعه تاثیر نسبت صمغ‌های مختلف و مقدار آن‌ها و همچنین زمان نگهداری از طرح آماری مرکب (Combined Design) استفاده گردید. مدل مورد نظر ترکیبی از مدل مخلوط (Mixture) درجه دوم و مدل فرآوری با برهم‌کنش درجه دوم می‌باشد. برای طراحی آزمایش و آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SAS ورژن ۹/۱ استفاده گردید (جدول۱).

نتایج و بحث

شمارش جمعیت پروبیوتیک

یکی از فاکتورهای بسیار مهم در فرآورده‌های پروبیوتیکی حفظ تعداد پروبیوتیک در طی نگهداری محصول می‌باشد. با توجه به آنالیز داده‌ها مدل نهایی بقای پروبیوتیک‌ها به صورت معادله ۱ تعیین شد.

$$Ln(probiotic) = (18.19881 \times A) + (13.05168 \times B) + (18.35851 \times C) - (6.16755 \times A \times C) + (0.999369 \times A \times D) - (1.06329 \times A \times E) - (6.21095 \times B \times D) - (4.32853 \times B \times E) + (2.528648 \times C \times D) + (1.483196 \times C \times E) + (8.438838 \times A \times B \times D) + (10.91734 \times A \times B \times E) - (10.5062 \times A \times C \times D) \quad (۱)$$

در معادله ۱، A، B، C، D، E به ترتیب نشانگر مقدار اینولین افزوده شده، مقدار زانتان افزوده شده، مقدار کیتوزان افزوده شده، مقدار کلی صمغ افزوده شده و زمان نگهداری می‌باشند.

با توجه به اینکه مدل فوق از لحاظ آماری معنی‌دار (α= ۰/۰۱) بوده و دارای عدم برازش (Lack of fit) غیر معنی‌دار و ضریب تبیین اصلاح شده بالا (Adj-R^2 = ۰/۸۹۵) می‌باشد، می‌توان برای پیش بینی تعداد پروبیوتیک از آن استفاده کرد. قابل ذکر است که در نمودارهای کانتور پلات ارائه شده، اعداد درج شده بر روی خطوط درون دکانتورها نشان‌دهنده مقدار شاخص‌های مورد مطالعه می‌باشد. شکل۱، منحنی پاسخ سطحی اثر نسبت‌های متفاوت اینولین، زانتان و زمان نگهداری بر شمارش پروبیوتیک در مقادیر ثابت کیتوزان ۳ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر نشان داده شده است، با افزایش نسبت اینولین و کاهش نسبت زانتان میزان رشد *La-5* افزایش یافته و با گذشت زمان میزان رشد *La-5* کاهش داشته است. اینولین به عنوان پری بیوتیک باعث تحریک رشد *La-5* می‌شود و کاهش رشد *La-5* در نتیجه تجمع اسیدهای آلی ناشی از رشد و تخمیر و کاهش میزان مواد مغذی نیازمند برای رشد پروبیوتیک می‌باشد (Donkor *et al.*,2004)، Sadek و همکاران (۲۰۰۴) افزایش بقای پروبیوتیک‌ها به واسطه حضور اینولین به عنوان پری بیوتیک را گزارش کردند. شکل ۲ کانتور پلات دوبعدی اثر نسبت‌های متفاوت اینولین، کیتوزان و زمان نگهداری بر شمارش پروبیوتیک در مقادیر ثابت زانتان ۱/۵ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر نشان داده شده است، علی‌رغم اکثر مطالعات مبنی بر کاهش رشد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در طی دوران نگهداری، به طور جالبی رشد *La-5* در نمونه‌های ما در انتهای دوران نگهداری کاهش چندانی نداشته است و شمارش پروبیوتیک تقریباً در سطح بالای 10^6 و 10^7 نگه‌داشته شده است. مشاهده شده است که در انتهای دوران نگهداری در نسبت‌های تقریبا بالای کیتوزان میزان رشد *La-5* در حد بالایی حفظ شده، بر خلاف تصورات عمومی مبنی بر این که کیتوزان به عنوان یک ماده ضد میکروبی، بر روی رشد *La-5* اثرات بازدارندگی کاملی از خود نشان نداد که احتمالا به علت ایجاد کمپلکس کیتوزان در ژل‌های اسیدی و کمپلکس کیتوازن – کازئین- گلبول های چربی موقعیت‌های اتصالی با سطح میکروارگانیسم کاهش یافته و منجر به کاهش اندکی از رشد پروبیوتیک می شود (Ausar *et al.*, 2002) و یک احتمال دیگر آن که کیتوزان با اثر بازدارندگی از رشد استارترهای ماست، شرایط را برای رشد پروبیوتیک‌ها فراهم می‌کند.

شکل ۳ کانتورپلات اثر نسبت زانتان، کیتوزان و زمان نگهداری بر شمارش پروبیوتیک (La-5) در مقادیر ثابت اینولین ۹۵/۵ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر نشان می‌دهد، با افزایش مدت نگهداری میزان رشد La-5 در سطح تقریباً بالایی حفظ شده است و همچنین افزایش نسبت زانتان و کاهش کیتوزان به ترتیب منجر به کاهش رشد *La-5* می‌شود.

جدول۱- طرح آزمایش مرکب به کار رفته برای مطالعه اثر نسبت صمغ‌ها، مقدار کل صمغ و زمان نگهداری بر روی شاخص‌های کیفی ماست پروبیوتیک کم چرب

زمان(روز)	مقدارکلی(گرم)	کیتوزان(٪)	زانتان(٪)	اینولین(٪)	شماره
۱	۱	۶	۰	۹۴	۱
۸	۲	۳	۱/۵	۹۵/۵	۲
۱	۳	۰	۳	۹۷	۳
۱	۱	۰	۲	۹۸	٤
۱۵	۱	۲	۳	۹۵	۵
۱۵	۳	۰	۰	۱۰۰	٦
۱	۳	۶	۱	۹۳	۷
۱۵	۳	۶	۳	۹۱	۸
۸	۲	۳	۱/۵	۹۵/۵	۹
۱۵	۳	۶	۰	۹۴	۱۰
۱۵	۳	۶	۰	۹۴	۱۱
۱	۱	۳	۳	۹۴	۱۲
۱۵	۱	۶	۲	۹۲	۱۳
۸	۲	۰	۱/۵	۹۵/۵	۱٤
۱	۱	۰	۰	۱۰۰	۱۵
۱۵	۳	۳	۳	۹۷	۱٦
۸	۳	۶	۱/۵	۹۵/۵	۱۷
۱	۳	۳	۳	۹۱	۱۸
۸	۲	۳	۱/۵	۹۵/۵	۱۹
۱	۳	۰	۰	۱۰۰	۲۰
۱۵	۱	۲	۳	۹۵	۲۱
۱	۳	۰	۳	۹۷	۲۲
۱	۱	۶	۲	۹۲	۲۳
۱۵	۱	۶	۲	۹۲	۲٤
۱۵	۱	۶	۲	۹۲	۲۵
۱۵	۱	۴	۰	۹۶	۲٦
۸	۲	۳	۱/۵	۹۵/۵	۲۷

بنابراین، احتمالا زانتان بر روی رشد *La-5* تاثیر منفی از خود نشان داده است و از طرفی خاصیت پری بیوتیکی کیتوزان نیز به اثبات رسیده است پس می‌تواند نسبت به زانتان تاثیر بهتری بر روی حفظ بیشتر پروبیوتیک در طی زمان نگهداری از خود نشان دهد. Akin و همکاران (۲۰۰۷) گزارش دادند که شمارش *Lactobacillus acidophilus* و *Bifidobacterium. Lactis* با افزودن اینولین زیادتر شد که ناشی از اثرات پری بیوتیکی اینولین می‌باشد (۳). Speigel و همکاران (۲۰۰۴) یافتند که در حضور پری بیوتیک‌های انتخابی بهبودی در فعالیت متابولیکی و زنده مانی گونه لاکتوباسیلی مشاهده شد (۲۷). Donkor و همکاران (۲۰۰۶) همچنین پیشنهاد کردند که در حضور مقادیر بالایی از فاکتورهای ضروری رشد مانند پپتیدها و آمینواسیدها در ماست ممکن است رشد لاکتوباسیلوس. اسیدوفیلوس زیادتر شده و بالاترین مقدار اسیدهای آلی مشاهده شد (۱۰). Klaver و همکاران (۱۹۹۳) و Dave & Shah (۱۹۹۷) گزارش کردند که مهم‌ترین فاکتورهای تاثیرگذار بر روی رشد *Lactobacillus acidophilus* ، اسیدیته و هیدروژن پراکسید هستند که عاملی در کاهش شمارش و رشد لاکتوباسیلوس. اسیدوفیلوس در طی نگهداری می باشد (۷،۱۹).

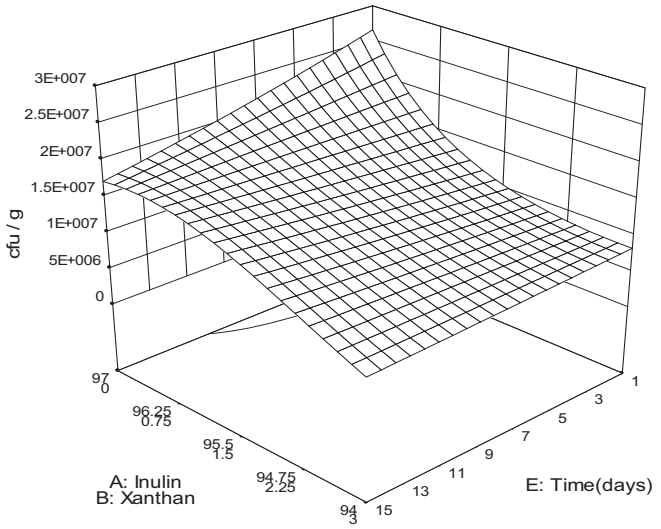
تعیین ویسکوزیته ظاهری

معادله حاصل از آنالیز داده‌ها به شرح زیر می‌باشد.

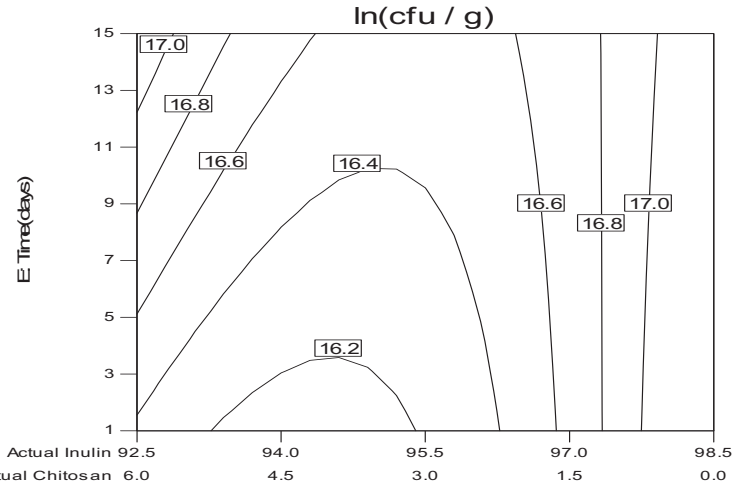
در معادله ۲، A، B، C، D، E به‌ترتیب نشانگر مقدار اینولین افزوده شده ، مقدار زانتان افزوده شده، مقدار کیتوزان افزوده شده، مقدار کلی صمغ افزوده شده و زمان نگهداری می‌باشند.

نتایج حاصل از این تست‌ها نشان می‌دهد که مدل نهایی ارائه شده دارای ضریب تبیین اصلاح شده بالا ($Adj\text{-}R^2$ =۰/۹۸۳) ودارای عدم برازش (Lack of fit) غیر معنی‌دار که بیانگر معنی‌دار بودن مدل فوق بوده و قادر است به‌طور رضایت بخش مقدار ویسکوزیته ظاهری را در نمونه‌ها توجیه کند.

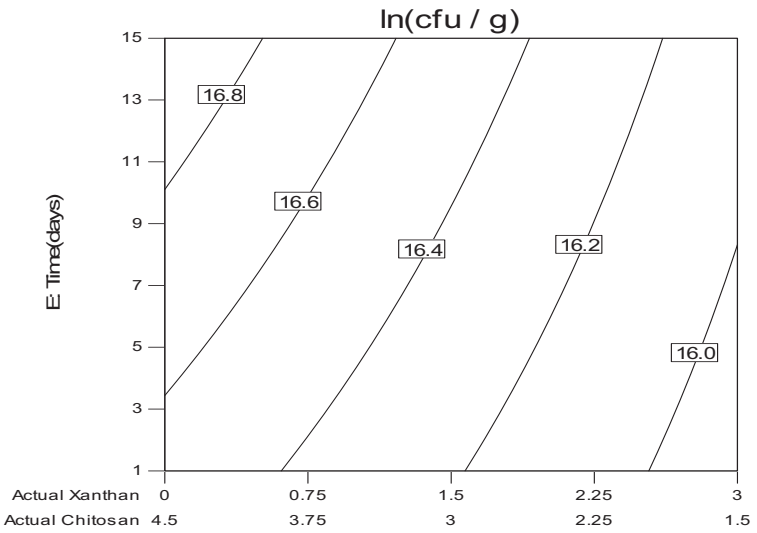
شکل ۴ کانتور پلات اثر نسبت‌های متفاوت اینولین، زانتان و زمان نگهداری بر ویسکوزیته ظاهری در مقادیر ثابت کیتوزان ۳ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر نشان داده شده است. بیشترین ویسکوزیته ظاهری متعلق به سطح ۹۴ درصد اینولین و ۳ درصد زانتان در روزهای اولیه نگهداری می‌باشد و با افزایش مدت زمان نگهداری میزان ویسکوزیته کاهش می‌یابد.



شکل۱- نمودار پاسخ سطحی اثر نسبت اینولین، زانتان و مدت نگهداری بر شمارش پروبیوتیک (*La-5*) در مقادیر ثابت کیتوزان۳ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر



شکل۲- نمودارکانتورپلات اثر نسبت اینولین، کیتوزان و زمان نگهداری بر شمارش پروبیوتیک (*La-5*) در مقادیر ثابت زانتان۱,۵٪ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای۱۰۰میلی‌لیتر شیر



شکل۳- نمودارکانتورپلات اثر نسبت زانتان، کیتوزان و زمان نگهداری بر شمارش پروبیوتیک (*La-5*)در مقادیر ثابت اینولین۹۵/۵ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای ۱۰۰ میلی لیتر شیر

$$vis\cos ity = (7640.36\times A)+(21336.99\times B)+(20460.9\times C)-(44265\times A\times B)-(43653.8\times A\times C)-(406709\times A\times D)-(3743.183\times A\times E)-(85058.3\times B\times C)+(6581.509\times B\times D)-(3799.28\times B\times E)-(482.499\times C\times D)+(211917.5\times A\times B\times C)+(4039.298\times A\times B\times D)-(10452.6\times A\times B\times E) \quad (۲)$$

همچنین مشاهده شد، که با افزایش نسبت اینولین و کاهش زانتان میزان ویسکوزیته ظاهری کاهش یافته است ولی با افزایش مدت نگهداری به علت افزایش هیدراته شدن هیدروکلوئیدها میزان ویسکوزیته زیاد شده است؛ یا به عبارتی مربوط به بازآرایی پروتئین‌ها و اتصال پروتئین–پروتئین در طی زمان می‌باشد. در حقیقت آنچه مورد اهمیت می‌باشد، حفظ کیفیت محصول در طی دوران نگهداری می‌باشد. این پژوهش توسط Akin و همکاران (۲۰۰۷) بر روی تاثیر میزان اینولین و قند بر روی ویژگی‌های ماست و بستنی انجام شده است و نتایج نشان داد که افزایش اینولین سبب افزایش ویسکوزیته ترکیبات می‌گردد (۳).Kip و همکارانش (۲۰۰۶) نیز گزارش دادند که با افزایش میزان اینولین، ویسکوزیته ظاهری در ماست کم‌چرب نسبت به نمونه‌های دیگر زیادتر شد و از اینولین به عنوان قوام دهنده نام بردند، که توانایی باند شدن با پلی ساکاریدهای خارج سلولی و پروتئین‌ها را داراست و منجر به ایجاد بافتی سفت‌تر می شود (۱۸). همان‌طورکه شکل۵ مشاهده می‌شود اگر چه با افزایش نسبت اینولین و کاهش کیتوزان میزان ویسکوزیته کم شده ولی با گذشت زمان میزان ویسکوزیته افزایش داشته است بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، کیتوزان و اینولین در حفظ ویسکوزیته موفق بوده‌اند و طی دوران نگهداری فرصت بیشتری برای آرایش مناسب و برهم‌کنش‌های مناسبی با ترکیبات شیر وجود داشته است.Rodriguez و همکاران (۲۰۰۸) در نتیجه به کارگیری کیتوزان، اینولین وفیبر میوه‌ها در تولید ماست، گزارش کردند که کیتوزان باعث افزایش ویسکوزیته ماست می‌شود (۲۴). Toneli و همکاران (۲۰۰۷) تأثیر اینولین بر روی افزایش ویسکوزیته را در محصولات کم‌چرب و بدون چربی در سالادها، شکلات‌ها و ماست‌ها گزارش کردند (۲۹).

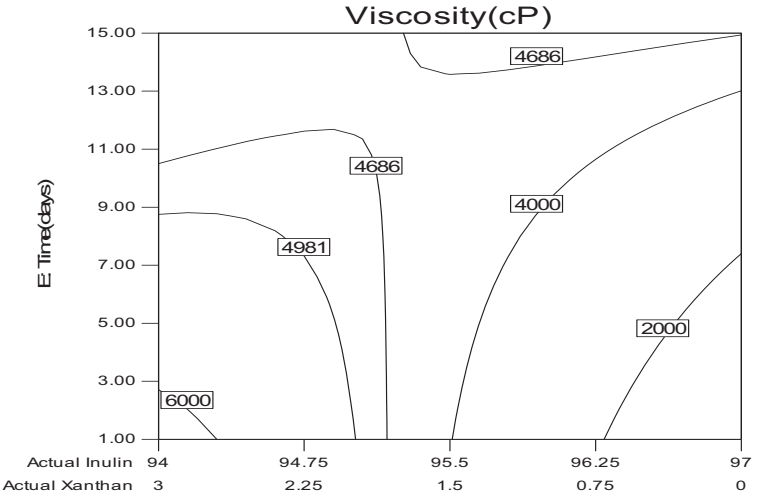
شکل ۶ نشان می‌دهد که با افزایش درصد زانتان و کاهش کیتوزان اثر کوادراتیک (درجه دوم) داشته است ابتدا ویسکوزیته افزایش و سپس کاهش می‌یابد، ولی افزایش مدت نگهداری در افزایش ویسکوزیته موثر بوده است. کاهش ویسکوزیته می تواند ناشی از وجود غلظت بالای زانتان در محیط و ایجاد پدیده خود تجمعی[1] (برهم‌کنش زانتان–زانتان) این پلی ساکارید باشد. همانطور که قبلاً نیز به آن اشاره شد، افزایش ویسکوزیته با گذشت زمان، مربوط به تکامل هیدراته شدن هیدروکلوئیدها، جذب بیشتر آب و ایجاد یک بافت یکنواخت و منسجم‌تر می‌باشد. Guggisberg و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند افزایش نسبت اینولین اثر بسیار فوق العاده‌ای بر خواص رئولوژیکی و حسی داشته است و افزایش اینولین سبب

1 - Self Aggregation

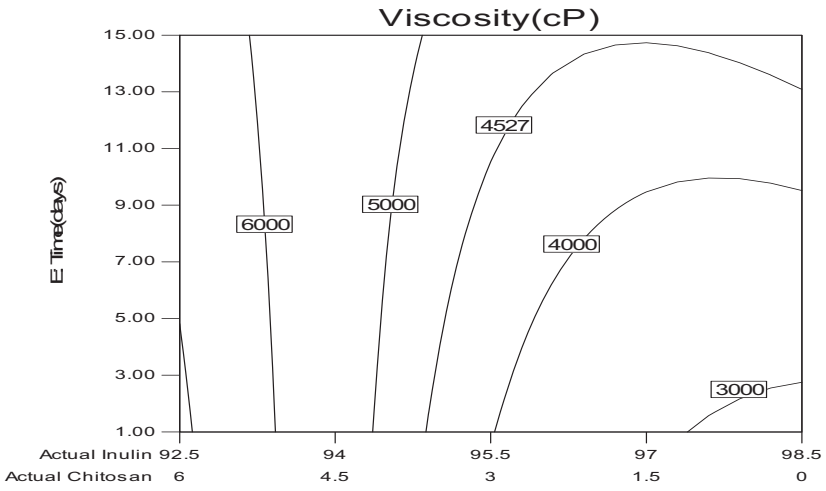
افزایش سفتی و بهبود خامه‌ای شدن در محصول می شود (۱۳). David و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که هیدروکلوئیدهای طبیعی مثل زانتان و گوار سبب افزایش ویسکوزیته می‌شود (۸). EI-Sayed و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که به کارگیری زانتان در سطح ۰/۰۱ درصد بیشترین ویسکوزیته را نشان داد که ناشی از برهم‌کنش زانتان با پروتئین‌های شیر بود (۱۱).

تعیین ظرفیت نگهداری آب

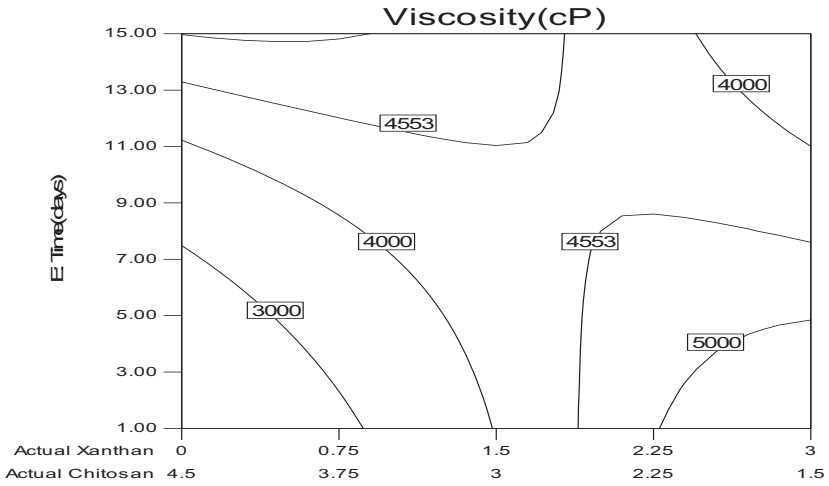
یکی از فاکتورهای مهم در تعیین کیفیت ماست ظرفیت نگهداری آب (WHC) می‌باشد. بسیاری از عوامل بر روی آزاد سازی سرم در ماست تاثیر گذارند از جمله فرایندهای ناقص، اسیدیته بالا، مقدار پروتئین، دمای نگهداری، و غیره. معادله حاصل از آنالیز داده‌ها به شرح زیر می‌باشد.



شکل٤- نمودارکانتور پلات اثر نسبت اینولین، زانتان و زمان نگهداری در مقادیر ثابت کیتوزان۳ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر



شکل۵- نمودارکانتورپلات اثر نسبت اینولین، کیتوزان و زمان نگهداری بر ویسکوزیته ظاهری در مقادیر ثابت زانتان ۱/۵درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر



شکل٦- نمودارکانتور پلات اثر نسبت زانتان و کیتوزان و زمان نگهداری بر ویسکوزیته ظاهری در مقادیر ثابت اینولین ۹۵/۵ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر

$$Ln(WHC) = (4.28476229 \times A) - (6.12383 \times B) + (3.72435 \times C) + (12.38757 \times A \times B) - (0.19509 \times A \times D) - (0.28153 \times A \times E) + (15.54215 \times B \times C) - (0.65574 \times B \times D) - (1.11994 \times B \times E) + (0.3340662 \times C \times E) + (2.88076 \times A \times B \times E) \quad (۳)$$

در معادله ۳، A ، B، C، D، E به‌ترتیب نشانگر مقدار اینولین افزوده شده، مقدار زانتان افزوده شده، مقدارکیتوزان افزوده شده، مقدار کلی صمغ افزوده شده و زمان نگهداری می‌باشند.

مدل ارائه شده دارای Lack of fit (عدم برازش) آن غیر معنی‌دار و ضریب تبیین اصلاح شده ($Adj\ R^2$) آن برابر ۰/۸۸۸ می‌باشد که نشان دهنده رضایت بخشی و کارامدی مدل فوق می‌باشد که می‌توان برای پیش بینی مقدار ظرفیت نگهداری آب از آن استفاده کرد. در کل، افزایش میزان WHC در انتهای دوران نگهداری مانند ویسکوزیته ظاهری، مربوط به افزایش میزان هیدراته شدن و کامل شدن هیدراته شدن هیدروکلوئیدها می‌باشد. شکل۷، کانتور پلات اثر نسبت‌های متفاوت اینولین، زانتان و زمان نگهداری بر ظرفیت نگهداری آب در مقادیر ثابت کیتوزان ۳ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر نشان داده شده است، که نشان می‌دهد در هر نسبت از هر صمغ به کار رفته ، تغییرات WHC با گذشت زمان در طی دوران نگهداری دارای روند نسبتا ثابت بوده و تاثیر معنی‌داری نداشته است و در محدود ۹۶/۲۵-۹۵/۵ درصد اینولین و ۱/۵-۰/۷۵ درصد بیشترن میزان WHC مشاهده شد. در شکل۸، تغییرات بسیار پیچیده‌تر است و با افزایش مدت نگهداری، میزان WHC بیشتر می‌شود. از طرفی با افزایش نسبت اینولین و کاهش نسبت کیتوزان تغییرات چندان قابل توجهی در میزان WHC نشان داده نشده است ، بنابراین می‌توان علت آن را افزایش هیدراسیون هیدروکلوئیدها و ظرفیت نگهداری بالاتر آب دانست. در نسبت های بالای کیتوزان نسبت به اینولین میزان WHC نسبتاً بالاتر بوده است. که مربوط به اثرات سینرژیستی هیدروکلوئیدها با همدیگر می‌باشد. همان طورکه در شکل۹ کانتور پلات اثر نسبت‌های زانتان، کیتوزان و زمان نگهداری بر میزان WHC در مقادیر ثابت اینولین ۹۵/۵ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵گرم به ازای۱۰۰میلی‌لیتر شیر را نشان داده شده است، در نسبت‌های بالای زانتان و کیتوزان میزان WHC کاهش داشته است و در سطح حدوداً ۱ درصد زانتان و ۳/۲۵ درصد کیتوزان میزان WHC در انتهای دوران نگهدار بالاترین بوده است. افزایش نسبت اینولین و کاهش زانتان ابتدا سبب افزایش و سپس کاهش WHC شده و افزایش مدت نگهداری در افزایش WHC تاثیر داشت که احتمالاً به دلیل کامل شدن هیدراته شدن هیدروکلوئیدها در طی مدت نگهداری و قابلیت نگهداری بیشتر آب است. Kip و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که اینولین به عنوان یک عامل ساختار آب[1] می‌باشد.

تغییرات اسیدیته قابل تیتراسیون

اسیدیته طبیعی در حضور کازئین‌ها، فسفات‌های اسیدی و

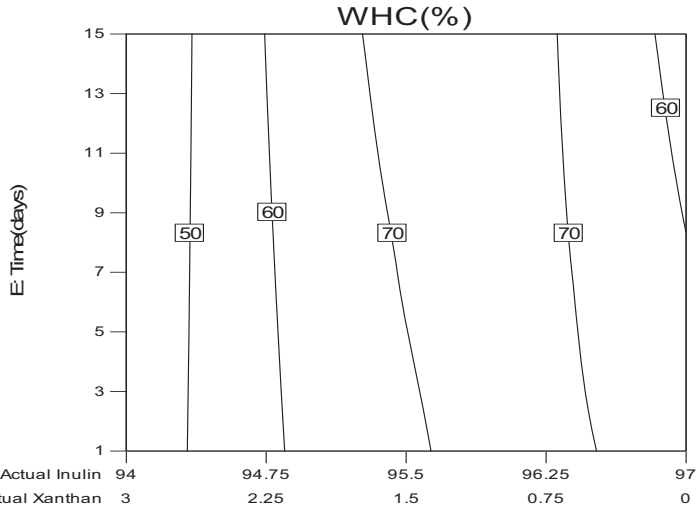
1 - Water-structuring agent

سیترات‌های موجود در شیر می‌باشد. در حالیکه اسیدیته توسعه‌یافته ناشی از تولید اسید لاکتیک توسط استارترها هست.

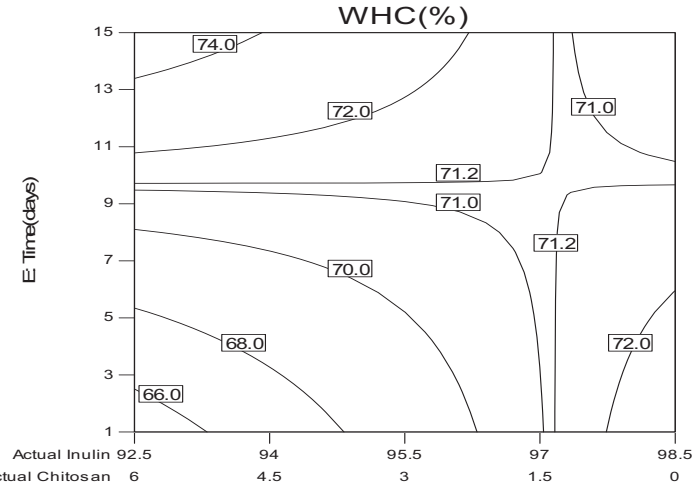
آنالیز داده‌ها آزمایش نشان داد که اسیدیته قابل تیتراسیون در نمونه‌های ماست کم‌چرب پروبیوتیک را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

در معادله ۴، A ، B ،C ،D ،E به ترتیب نشانگر مقدار اینولین افزوده شده ، مقدار زانتان افزوده شده، مقدار کیتوزان افزوده شده، مقدار کلی صمغ افزوده شده و زمان نگهداری می‌باشند.

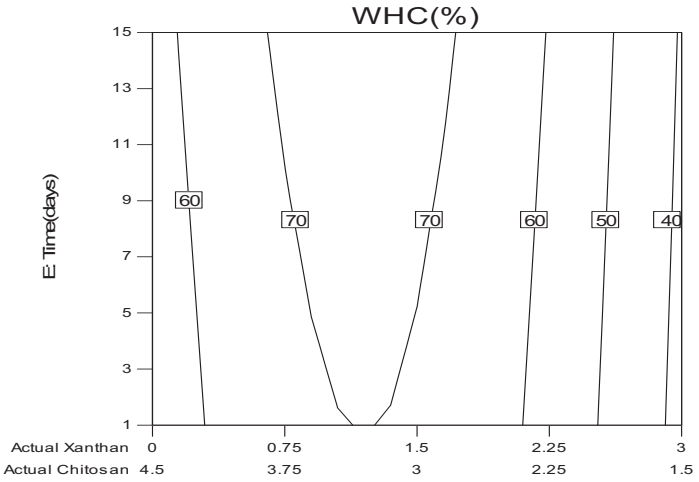
با توجه به اینکه مدل فوقp-value کم‌تر از ۰/۰۰۰۱ هست و همچنین به علت داشتن عدم برازش (Lack of fit) غیر معنی دار و ضریب تبیین اصلاح شده (Adj-R^2 = ۰/۹۸۸) در کل نشانگر معنی‌دار بودن مدل تغییرات اسیدیته قابل تیتراسیون می‌باشد.



شکل۷- نمودارکانتور پلات اثر نسبت‌های اینولین، زانتان و زمان نگهداری بر WHC در مقادیر ثابت کیتوزان۳ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵گرم به ازای۱۰۰میلی‌لیتر شیر



شکل۸- نمودار کانتور پلات اثر نسبت‌های اینولین، کیتوزان و زمان نگهداری برWHC در مقادیر ثابت زانتان ۱/۵ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای۱۰۰میلی‌لیتر شیر



شکل۹ -نمودار کانتور پلات اثر نسبت‌های زانتان، کیتوزان و زمان نگهداری بر WHC در مقادیر ثابت اینولین ۹۵/۵ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای ۱۰۰میلی‌لیتر شیر

$$Acidity = (92.46793\times A) - (20.9002\times B) + (52.71073\times C) + (189.4538\times A\times B) + (135.0193\times A\times C) + (6.265086\times A\times D) + (3.796164\times A\times E) + (326.7748\times B\times C) + (22.9777\times B\times E) + (5.339638\times C\times E) - (394.415\times A\times B\times C) \quad (۴)$$

در شکل ۱۰، کانتور پلات اینولین، زانتان و مدت نگهداری بر تغییرات اسیدیته در مقادیر ثابت کیتوزان۳ درصد و مقدار صمغ ۱/۵ گرم را نشان داده شده است. با گذشت زمان میزان اسیدیته زیاد شده است و همچنین افزایش نسبت اینولین و کاهش زانتان در افزایش اسیدیته تاثیر داشته است. به عبارتی افزودن اینولین سبب تحریک رشد *La-5* شده و در نتیجه فعالیت پروتئولیتیکی و رهاسازی اسیدهای آمینه آزاد سبب افزایش اسیدیته قابل تیتراسیون می‌شود، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت میان اسیدیته قابل تیتراسیون و اسیدهای آمینه آزاد رابطه مستقیمی وجود دارد (Sendra *et al.,* 2008). با افزایش نسبت اینولین و کاهش کیتوزان ابتدا افزایش و سپس کاهش اسیدیته مشاهده شده است که مجددا با گذشت دوره نگهداری میزان اسیدیته زیادتر شده است (شکل ۱۱). علت افزایش اسیدیته فرایند پس- اسیدی ساز[1] که ناشی از ادامه فرایند تخمیر لاکتوز توسط استارترهای سنتی و پروبیوتیک ماست در دمای یخچال می‌باشد (Donkor *et al.,* 2006). همان‌طورکه اشاره شد به علت افزایش فعالیت پروتئولیتیکی، اسیدیته زیاد می‌شود، از طرفی *Lactobacillus acidophilus* تمایل به افزایش بیشتر اسیدیته دارد و همچنین پری بیوتیک‌ها باعث کنترل فرآیند پس- اسیدی ساز پروبیوتیک‌ها می‌شوند و از اسیدیته بیش از حد جلوگیری می‌کنند. De Souza Oliveira و همکاران (۲۰۰۹) پیشنهاد کردند، افزودن الیگوفروکتوز خصوصاً پلی دکستروز مانند پری بیوتیک به شیر باعث بهبود پایداری آن در طی نگهداری در شرایط سرد و کاهش فرایند اسیدی کردن بعدی می‌شود (۹). در شکل ۱۲ نشان داده شده است که با افزایش نسبت زانتان و کاهش کیتوزان میزان اسیدیته کاهش داشته است که می‌توان نتیجه گرفت صمغ زانتان در تولید اسیدیته نقشی ندارد و مجدداً با گذشت زمان نگهداری میزان اسیدیته زیادتر شده است.

تعیین پذیرش کلی

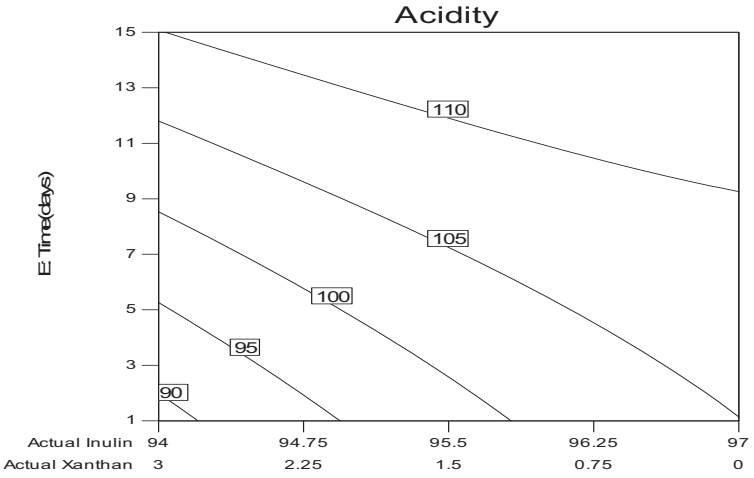
ارزیابی حسی نقش تعیین‌کننده در مقبولیت فرآورده‌های غذایی دارد. پس از آنالیز داده‌های آزمایش معلوم شد که بین پذیرش کلی و متغیرهای فراوری ماست کم‌چرب پروبیوتیک رابطه زیر برقرار است:

در معادله ۵، A ، B، C، D، E به ترتیب نشانگر مقدار اینولین افزوده شده ، مقدار زانتان افزوده شده، مقدار کیتوزان افزوده شده، مقدار کلی صمغ افزوده شده و زمان نگهداری می‌باشند.

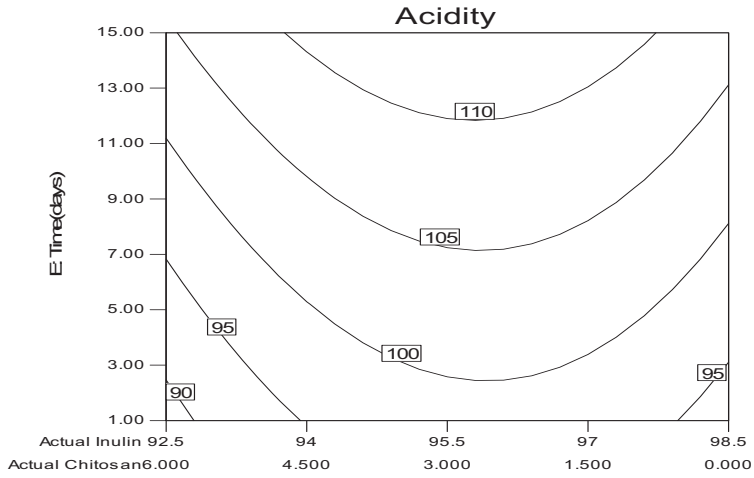
این مدل معنی‌دار بوده و دارای ضریب تبیین اصلاح شده بالا ($Adj\text{-}R^2$ = ۰/۹۳۶) و عدم برازش (Lack of fit) غیر معنی‌دار می‌باشد. شکل ۱۳،کانتور پلات اینولین، زانتان و زمان نگهداری بر پذیرش کلی در مقادیر ثابت کیتوزان ۳ درصد و مقدار کلی صمغ

1- Post-acidification

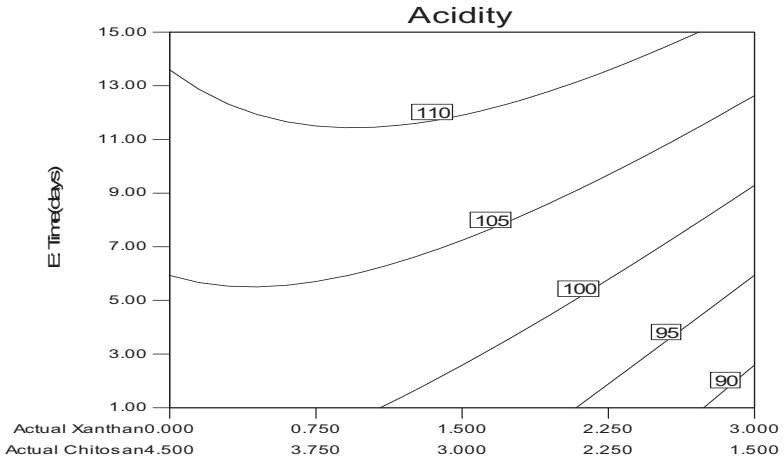
۱/۵گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر را نشان داده است. با افزایش نسبت اینولین و کاهش زانتان میزان ارزیابی حسی اثر درجه دوم متغیرها را نشان می‌دهد که ابتدا افزایش و سپس کاهش داشته است، احتمالاً به دلیل استفاده از غلظت‌های بالای اینولین در محصول می‌باشد که سبب ایجاد بافتی شنی و طعم بسیار شیرین در محصول می‌گردد و همچنین، با افزایش زمان در طی دوران نگهداری میزان پذیرش کلی زیادتر شده است. شکل ۱۴ و ۱۵ همچنین نشان می‌دهند که افزایش مدت نگهداری در افزایش پذیرش کلی نمونه‌ها تاثیر مثبتی داشته است. به عبارتی با افزایش زمان طی دوران نگهداری، میزان پذیرش کلی زیادتر شده است که احتمالا به علت، آزاد سازی مواد معطره در طی دوران نگهداری می‌باشد (Flamme *et al.*, 2000).



شکل۱۰- نمودار کانتورپلات اثر نسبت های اینولین، زانتان و مدت نگهداری بر میزان اسیدیته در مقادیر ثابت کیتوزان ۳ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵گرم به ازای۱۰۰میلی‌لیتر شیر

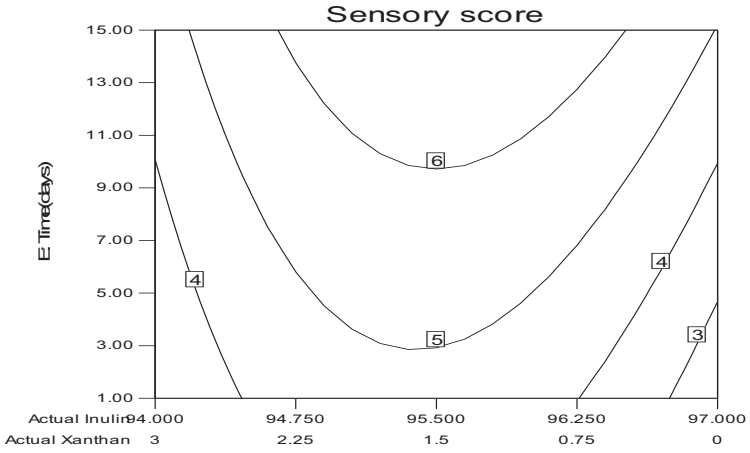


شکل۱۱- نمودار کانتورپلات اثر نسبت‌های اینولین، کیتوزان و مدت نگهداری بر میزان اسیدیته در مقادیر ثابت زانتان ۱/۵درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای۱۰۰میلی‌لیتر شیر



شکل۱۲- نمودار کانتورپلات اثر نسبت زانتان، کیتوزان و مدت نگهداری بر میزان اسیدیته در مقادیر ثابت اینولین ۹۵/۵ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵گرم به ازای۱۰۰میلی‌لیتر شیر

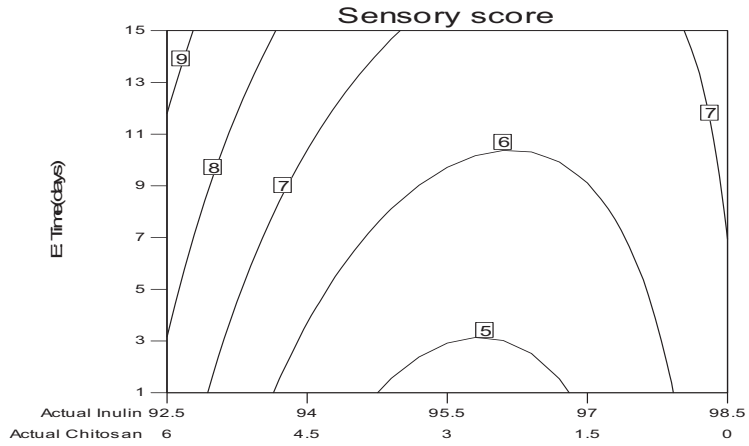
$$Sensory = (8.7154 \times A) - (18.8345 \times B) + (23.2491 \times C) + (20.9700 \times A \times B) - (44.6724 \times A \times C) - (0.2560 \times A \times D) + (0.2861 \times A \times E) - (34.0549 \times B \times C) + (2.9668 \times C \times D) + (0.3864 \times C \times E) + (157.2781 \times A \times B \times C) - (14.9282 \times A \times C \times D) + (4.5469 \times A \times C \times E) \quad (۵)$$



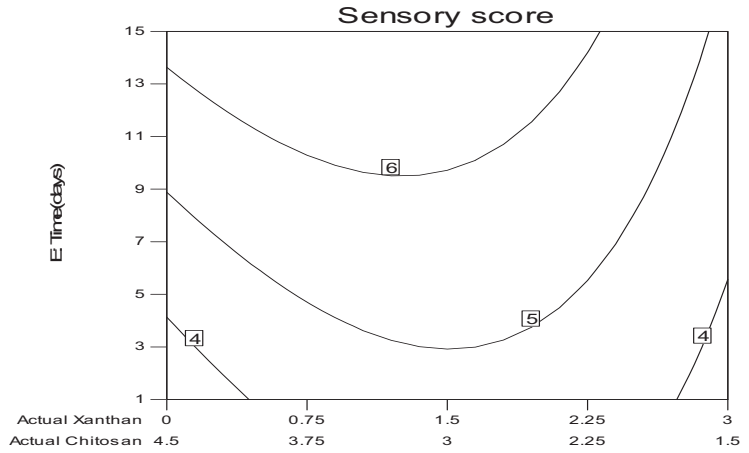
شکل۱۳- نمودار کانتورپلات اثر نسبت اینولین، زانتان و مدت نگهداری بر میزان پذیرش کلی در مقادیر ثابت کیتوزان ۳ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای۱۰۰ میلی‌لیتر شیر

بهینه سازی شرایط تولید

شرایط بهینه برای تک تک پاسخ‌ها را نمی‌توان به عنوان الگـوی مناسب جهت تولید ماست پروبیوتیک کم‌چـرب در نظـر گرفـت. زیـرا شرایط بهینه برای یک پاسخ، ممکن است برای پاسـخ دیگـر شـرایط نامساعدی ایجاد کند. بنابراین باید شرایطی را به عنوان الگوی ساخت معرفی کرد که تا حد امکان تمامی پاسخ‌ها را به نحو رضـایت‌بخـشی بهینه نماید.



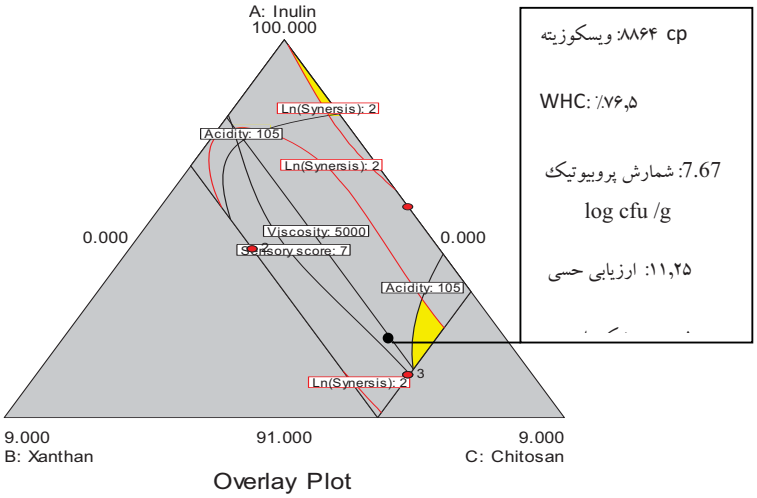
شکل ١٤ - نمودار کانتورپلات اثر نسبت اینولین، کیتوزان و مدت نگهداری بر میزان پذیرش کلی در مقادیر ثابت زانتان ۱/۵ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵ گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر



شکل ۱۵- نمودار کانتورپلات اثر نسبت زانتان، کیتوزان و مدت نگهداری بر میزان پذیرش کلی در مقادیر ثابت اینولین ۹۵/۵ درصد و مقدار کلی صمغ ۱/۵گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر

روش بهینه‌سازی گرافیکی ابزاری برای تعیین کردن شرایط اپتیمم فرایند می‌باشد. در این روش کانتورپلات‌های مختلف بر روی هم قرار گرفته و منطقه‌ای که مشخصات و تمامی پاسخ‌ها را برآورده می‌کند، به عنوان منطقه بهینه معرفی می‌گردد و بهینه‌سازی با هدف بالاترین شمارش پروبیوتیک، حداکثر میزان ویسکوزیته ظاهری، حداکثر میزان قابلیت نگهداری آب، حداکثر امتیاز حسی و اسیدیته در محدوده ۱۰۰-۸۰ درجه درنیک با در نظر گرفتن حداکثر زمان نگهداری انجام گردید.

قسمت‌هایی که در شکل ۱۶ با رنگ زرد مشخص شده است، نشانگر منطقه بهینه با مشخصات مقدار بهینه هیدروکلوئید ۱ گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر و ترکیب بهینه هیدروکلوئید در حدود ۹۳/۴ درصد اینولین، ۰/۶ درصد زانتان و ۶ درصد کیتوزان می باشد. با توجه به این نتایج، شرایط بهینه و مناسب برای تولید ماست پروبیوتیک کم‌چرب در جدول ذیل آورده شده است.



شکل۱۶- کانتور پلات توام شرایط بهینهسازی فرایند تولید ماست پروبیوتیک کم چرب در روز ۱۵ و مقدار صمغ 1mg/100ml

جدول۲-نتایج بهینهسازی شرایط تولید

A(%)	B(%)	C(%)	D(mg/100ml)	E(days)	Viscosity	Acidity	N probiotic	Sensory score	Desirability
۹۳/۴۳	۰/۶	۶/۰۰	۱/۰۰	۱۵	۸۸۶۳/۸۲	۱۰۰	۷/۶۷ log cfu /g	۱۱/۲۶	۰/۸۰

جدول۳- دادههای آزمایشی و پیشبینی شده در فرمولاسیونهای بهینهسازی ماست پروبیوتیک کم چرب

Response variables	Predicted values	Experimental values
counts of La-5	۷/۶۷± ۰/۲۶ log cfu /g	۷/۶۳ log cfu /g
Apparent viscosity	۸۸۶۴± ۱۱۷۴ cp	۸۵۰۰ cp
WHC	۷۶±۱۴/۵۴ %	۷۷%
acidity	۱۰۰±۳/۷۶ °D	۹۵°D
Overall acceptability score	۱۱/۲۵±۱/۷۶	۱۱

بررسی و تصدیق شرایط بهینه پیشبینی شده

به منظور ارزیابی مدلها و تایید کردن صحت شرایط بهینهسازی پیش بینی شده، ترکیب بهینه متغیرها باید مورد آزمایش قرار میگرفت. بدین منظور نمونههایی مطابق با شرایط ذکر شده در پنج تکرار تهیه و مورد آزمایش قرار گرفت. در جدول۳ مقایسه میانگین اعداد آزمایش شده و پیش بینی شده، نشان میدهد که مدلهای ساخته شده معتبر و قابل استناد میباشند.

نتیجهگیری

طرح مرکب (Combined design)، به عنوان یک طرح کارامد در مدلسازی سیستمهای پیچیده غذایی و تعیین ترکیب بهینه هیدروکلوئیدها در ماست پروبیوتیک کمچرب شناخته شد. به طورکلی با توجه به آنالیز و بهینهسازی دادهها، مقدار بهینه هیدروکلوئید ۱ گرم به ازای ۱۰۰ میلیلیتر شیر و ترکیب بهینه هیدروکلوئید ۹۳/۴ درصد اینولین، ۰/۶ درصد زانتان و ۶ درصد کیتوزان تعیین گردید. ویسکوزیته، اسیدیته،WHCو جمعیت پروبیوتیک ماست تولید شده در شرایط بهینه بعد از گذشت ۱۵ روز بهترتیب برابر ۸۸۶۴ سانتی پوآز، ۱۰۰ درجه درنیک، ۷۶/۵ درصد و ۷/۶۷ log cfu /g پیش بینی گردید. بنابراین میتوان از اینولین و کیتوزان به همراه مقدار کمتری زانتان جهت بهبود ویژگیهای ماست پروبیوتیک کمچرب استفاده کرد.

منابع

استاندارد ملی ایران، شماره ۶۵۹ : شیر و فرآورده‌های آن- ماست- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

استاندارد ملی ایران، شماره ۲۸۵۲ : شیر و فرآورده‌های آن- تعیین اسیدیته و pH ، موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

Akin, M.B., Akin, M.S. and Kirmaci, Z., 2007, Effects of inulin and sugar levels on the viability yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. Food Chemistry,104,93-99.

Aryana, K.J., Plauche, S., Rao, R.M., Mcgrew, P. and Shah, N.P., 2007, Fat-Free Plain Yogurt Manufactured with Inulins of Various Chain Lengths and Lactobacillus acidophilus. Journal of Food Science,72,79-84.

Ausar, S. F., Passalacqua, N., Castagna, L.F., Bianco, I.D. and Beltramo, D.M., 2002, Growth of milk fermentative bacteria in the presence of chitosan for potential use in cheese making. International Dairy Journal,12,899-906.

Chiavaro, E., Vittadini, E. and Corradini, C., 2007, Physicochemical characterization and stability inulin gels. Europe Food Research Technology,225,85 –94.

Dave, R.I. and Shah, N.P.,1997, Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commericial starter cultures. International Dairy Journal,7,31-41.

David, W. E. and Rosalind, E. M., 2005, Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. International Dairy Journal, 15, 1175–1183.

De Souza Oliveira, R.P., Perego, P., Converti, A. and De Oliveira, M.N.,2009, Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with Streptococcus thermophilus. Journal of Food Engineering,91,133–139.

Donkor, O.N ., Nilmini, S.L.I ., Stolic, P. , Vasiljevic, T. and Shah, N.P. ,2007, Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. International Dairy Journal, 17, 657–665.

El-Sayed, E.M., Abd El-Gawad, I.A., Murad, H.A. and Salah, S.H.,2002, Utilization of laboratory-produced xanthan gum in the manufacture of yogurt and soy yogurt. Europe Food Research Technoogyl,215,298 –304.

GarcõÂa-Ochoaa,F., Santosa, , V.E. Casasb, J.A. and GoÂmez, E., 2000, Xanthan gum: production recovery, and properties. Biotechnology Advances, 18 ,549-579.

Guggisberg, D., Cuthbert-Steven, J., Piccinali, P., tikofer, U. Bu. and Eberhard, P., 2009, Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. International Dairy Journal, 19,107–115.

Guven, M., Yasar, K., Karaca, O.B. and Hayaloglou, A. A., 2005,The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. International Journal of Dairy Technology.58:180-184.

Harwalkar, V.R. & Kalab, M., 1986, Food Microstructure, 5,287.

Heenana, C.N., Adamsa, M.C., Hoskena, R.W. and Fleet, G.H., 2004, Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. LWT,37,461-466.

Isleten, M. and Karagul-Yuceer, Y., 2006, Effects of Dried Dairy Ingredients on Physical and Sensory Properties of Nonfat Yogurt. Journal of Dairy Science, 89,2865 –2872.

Kip, P., Meyer, D. and Jellema, R.H., 2006, Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. International Dairy Journal,16,1098 –1103.

Klaver, F.A., Kingma, F. and Weerkamp, A.H.,1993, Growth and survival of bifidobacteria in milk. Netherlands Mil and Dairy Journal,47,151-164.

Koegb, M.K. and Okennedy, B.T.,1998, Rheoligy of stirred yoghurt as affected by added milk fat، protein and hydrocolloids. Journal of Food Science,3,108 -110.

No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W. and XU, Z., 2007, Applications of Chitosan for Improvementof Quality and Shelf Life of Foods: A Review. Journal of Food Science 72:R87-R100.

Ozer, D., Akin, S. and Ozer, B., 2005, Effect of inulin and lactulose on survival of Lactobacillus acidophilus La-5 and Bifidobacterium bifidum BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. Food Science and Technology International ,11(1), 19 –24.

Parnell-Clunies, E., Kakuda, Y., deMan, J. M. and Cazzola, F.,1988, Gelation profiles of yoghurt as affected by heat treatment of milk. Journal of Dairy Science, 71, 582–588.

Rodriguez, M.S., Montero, M., Dello Staffolo, M., Bevilacqua, A. and Albertengo, A.,2008, Chitosan influence on glucose and calcium availability from yogurt: In vitro comparative study with plants fibre. Carbohydrate Polymers, 74,797 –801.

Sadek, Z.I., El-Shafei, K. and Murad, H.A.,2004, Utilization of xanthan gum and inulin as prebiotics for lactic acid bacteria. Egyptian Conference for Dairy Science and Technology, Egyptian Society of Dairy Science, pp,269 – 275.

Sendra, E., Fayos, F., Lario, Y., Ferna´ndez-Lo´pez,J., Sayas-Barbera´ ,E. and Pe´rez-Alvarez, J.A. 2008, Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. Food Microbiology, 25,13−21.

Spiegel, J.E., Rose, R., Karabell, P., Frankos, V.H. and Schmitt, D.F., 2004, Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. Food Technology, 48,61 –65.

Ta´ rrega, A. and Costel, E., 2006, Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat- free starch-based dairy desserts. International Dairy Journal,16,1104 –1112.

Toneli, J.T.C.L., Mu¨ rr, F.E.X., Martinelli, P., Fabbro, I.M.D. and Park, K.J., 2007, Optimization of a physical concentration process for inulin. Journal of Food Engineering, 80,832−838.

Zhao, R., Sun, J., M.O.H. and Zhu, Y.,2007, Analysis of functional properties of Lactobacillus acidophilus. World Journal of Microbiology and Biotechnolog,23,195 –200.

Zhao, Q., Zhao, M., Yang, B. and Chun Cui, A., 2009, Effect of xanthan gum on the physical properties and textural characteristics of whipped cream. Food Chemistry,116,624 –628.

Vinerola, C.G. and Reinhemir, J.A., 1999, Culture media enumeration of Bifidobacterium bifium and lactobacillus acidophilusin the presence of yoghurt bacteria, International Dairy Journal,9,497-505.