نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۱۶۰-۱۵۲

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 2, Summer 2015, p. 152-160

بررسی اثر زیست توده ریزجلبک "*Spirulina platensis*" بر کینتیک اسیدی شدن و ویژگی‌های ریزساختاری ماست

سید امیر توکلی لاهیجانی[۱]- فخری شهیدی[۲*]- مهدی وریدی[۳]- محبت محبی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۷

چکیده

"*Spirulina platensis*" ریزجلبک سبز-آبی با محتوای مواد مغذی منحصر به فرد و دارای اثرات تغذیه ای و درمانی متعددی می‌باشد که در غنی سازی فرآورده‌های غذایی مختلف به کار گرفته شده است. در این پژوهش، تاثیر افزودن سطوح مختلف زیست توده ریزجلبک "*Spirulina platensis*" (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد)، در دو مرحله افزودن (قبل پاستوریزاسیون و همزمان با افزودن باکتری‌های آغازگر) بر ویژگی‌های ریزساختاری و توسعه اسیدی شدن در بازه زمانی تخمیر ماست بررسی شد. نتایج نشان داد که سطوح مختلف زیست توده اسپیرولینا تاثیر معنی داری بر پارامترهای کینتیک توسعه اسیدی نمونه‌های ماست داشت ($p<0.05$). همچنین اثر متقابل سطوح مختلف زیست توده و مراحل افزودن نیز بر مدّت زمان رسیدن به بیشینه سرعت اسیدی شدن معنی دار بود ($p<0.05$). بررسی‌های ریزساختاری در حین تخمیر نشان دهنده کاهش سرعت تجمیع ذرّات پروتئینی در غلظت ۲درصد نسبت به نمونه شاهد بود. مطالعه ریز ساختاری شبکه ژلی ماست با استفاده از تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان دهنده اثرات مثبت مقادیر ۰/۵ و ۱ درصد زیست توده اسپیرولینا بر تقویت تراکم شبکه پروتئینی ماست بود.

واژه‌های کلیدی: زیست توده، اسپیرولینا پلاتنسیس، ماست، کینتیک اسیدی شدن، ریزساختار.

مقدمه

ماست یکی از پرمصرف ترین فرآورده‌های تخمیری است که به علت فواید سلامتی بخش فراوان ناشی از ارزش تغذیه‌ای و ویژگی‌های عملکردی میکروارگانیسم‌های آن محبوبیت فراوانی دارد. امروزه تولید فرآورده‌های متنوع تخمیری بر پایه ماست مثل ماست‌های با میزان چربی کم، ماست‌های پروبیوتیک، بستنی‌های ماستی به منظور جلب رضایت مصرف کنندگان و بالا بردن میزان مصرف فرآورده‌های لبنی توسعه یافته است (Fiszman *et al.,* 1999). در این میان، کاربرد ترکیبات عملگر در ماست علاوه بر بهبود ارزش غذایی، باعث تغییر در ویژگی‌های تکنولوژیکی مرتبط با این فرآورده غذایی می‌گردد. همچنین با تغییر در شرایط فرآوری ماست (مانند فرآیند حرارتی و یا افزودن ترکیباتی همچون مواد جامد و پایدارکننده ها) رشد و تولید اسید توسط باکتری‌های آغازگر در طول دوره تخمیر و نگهداری، بافت و طعم ماست قابل تغییر است (Zare *et al.,* 2011). فاکتورهای مختلفی همچون ترکیبات شیر، چربی، میزان مواد جامد، فرآیند حرارتی، ترکیب باکتری‌های آغازگر، سرعت اسیدی شدن شیر، زمان نگهداری بر بافت و ویژگی‌های حسی ماست تاثیرگذار است (Paseephol *et al.,* 2008). "*Spirulina platensis*" ریزجلبک سبز- آبی است که به علت کیفیت تغذیه ای منحصر به فرد به عنوان ماده غذایی کامل شناخته شده است. مقدار زیاد پروتئین (۶۰ تا ۷۰ درصد وزن خشک)، مقدار کم چربی، مقادیر بالای ویتامین ها بویژه ویتامین B_{12}، آهن، وجود رنگدانه فایکوسینین و اسید چرب ضروری گامالینولنیک اسید، این ریزجلبک را به عنوان ماده غذایی با ارزش تغذیه ای بالا معرفی می‌کند(Belay *et al.,* 1993). به طوریکه سازمان بهداشت جهانی (WHO[۵]) از اسپیرولینا به عنوان برترین ماده غذایی بر روی زمین یاد کرده است و سازمان فضایی آمریکا (NASA[۶]) از زیست توده اسپیرولینا به عنوان غذای

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲، ۳ و ۴-به ترتیب استاد، استادیار و دانشیارگروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول : (Email: niloofar1373@yahoo.com

5- *World Health Organization*
6- National Aeronautics and Space Administration

فشرده در سفرهای فضایی استفاده می‌کند(Khan *et al.,* 2005). استفاده از ریزجلبک ها در فرآورده‌های غذایی به سبب دارا بودن طیف وسیعی از ترکیبات زیست فعال به عنوان منبعی جدید از ترکیبات مغذی و طبیعی در راستای تامین تقاضای روزافزون مصرف کنندگان به منظور دستیابی به غذاهای سلامتی بخش خواهد بود(Shahidi, 2004). مطالعات پزشکی متعددی در زمینه اثرات درمانی اسپیرولینا همچون کاهش میزان کلسترول خون، محافظت در برابر برخی سرطان ها، پیشگیری از ابتلا به بیماری‌های قلبی- عروقی و افزایش مقاومت سیستم ایمنی بدن صورت پذیرفته است(Belay *et al.,* 1993) تاکنون از پودر زیست توده اسپیرلینا پلاتنسیس به منظور تولید فرآورده‌های غذایی مختلف مانند سوپ، سس2، پاستا، اسنک، نوشیدنی، شکلات، آبنبات، بیسکوئیت، نان، کیک و آرد غنی شده استفاده گردیده است(Gouveia *et al.,* 2007; Yamaguchi, 1996). همچنین درکشورآلمان، تعدادی از کارخانه‌های تولیدکننده فرآورده‌های غذایی از ریزجلبک ها و سیانو باکتری ها در فرآورده هایی همچون نان، پاستا، نودل، ماست و نوشیدنی‌های مختلف استفاده کرده اند(Pulz and Gross, 2004). افزودن زیست توده "*Spirulina platensis*" از یک سو باعث افزایش ارزش تغذیه ای و ایجاد رنگ سبز در ماست می‌گردد و از سوی دیگر، به جهت ترکیب شیمیایی پیچیده سبب ایجاد تغییراتی در ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی حسی و میکروبی ماست خواهد شد. مطالعات پیشین نشان داده است که پودر زیست توده اسپیرولینا سبب تقویت رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در محیط کشت سنتتیک، شیر و ماست می‌گردد(de Caire *et al.,* 2000),(Varga *et al.,* 2002). پاراداو همکاران، ۱۹۹۸ افزودن فرآورده‌های خارج سلولی حاصل از فاز لگاریتمی "*S.platensis*" را بر رشد باکتری های اسید لاکتیک مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که رشد باکتری های اسیدلاکتیک افزایش یافت. در این خصوص عنوان شد که "*S.platensis*" دارای اثر تحریک کنندگی بر رشد بوده و به عنوان یک ترکیب پری بیوتیکی عمل می کند. آسوانی- مولنار و همکاران، (۲۰۰۹) به تحقیق در خصوص فرآورده تخمیری لبنی (ماست) غنی شده با اسپیرولینا پرداختند. هدف اصلی آنها بررسی ویژگی‌های میکروبیولوژیکی پودر اسپیرولینای تجاری و پایش تاثیر زیست توده سیانوباکتری ها بر رشد و تولید اسید از باکتریهای مختلف اسید لاکتیک مزوفیل بود. میزان پودر اسپیرولینای مورد استفاده g/lit ۳ بود. اسپیرولینا به صورت معنی داری تولید اسید در طول تخمیر توسط *Lactococcus lactis* spp.*cremoris* و *mesenteroides Leuconostoc* را افزایش داد ($p<0.05$). نتایج غنی سازی با اسپیرولینا نشان داد که تیمار حاوی آغازگرها و*Lactococcus lactis* spp.*cremoris* همراه با ۱۰ درصد ساکارز و ۰/۳ درصد زیست توده اسپیرولینا و ۱/۵ درصد طعم دهنده، بهترین ویژگی های ارگانولپتیکی را نسبت به سایر تیمارها داشت. در طی دو هفته اول نگهداری در دمای ۴±۲ °C زیست توده اسپیرولینا را به طور معنی‌داری بقای باکتری های مزوفیل استارتر را افزایش داد(Parada *et al.,* 1998). در تحقیق دیگر، تاثیر پودر زیست توده ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر فلور میکروبی ماست و شیر اسیدوفیلوس بررسی شد. هدف از تحقیق آنها پایش اثر افزودن زیست توده اسپیرولینا به ماست قالبی و ماست حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر بقای فلور میکروبی در طول دوره نگهداری بود. در پژوهش انجام شده، ماست تحت شرایط بهداشتی تولید گردید و مقادیر pH و اسیدیته آن درطول مدت نگهداری کنترل شد. تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک بالاتر از $6\ cfu\ g^{-1}$ بود، در حالی که این تعداد در نمونه‌های شاهد کمتر مشاهده شد. نتایج نشان داد که افزودن یک درصد پودر اسپیرولینا به ماست تاثیر معنی‌داری بر فعّال بودن باکتری‌های اسید لاکتیک(تولید اسید) نداشت. در حالی که بر بقای آنها (تعداد باکتری ها از طریق شمارش) در طول دوره نگهداری موثر بوده است. (Guldas, 2010). مطالعات فیزیولوژی باکتری‌های آغازگر با بررسی شرایط محیط کشت از طریق کینتیک رشد، اسیدی شدن و بازده(زیست توده یا اسید لاکتیک) امکان پذیر است. به این ترتیب، سرعت تولید اسید با اندازه گیری مقادیر اسید لاکتیک تولید شده یا pH که مهمترین ویژگی باکتری‌های اسیدلاکتیک است قابل اندازه گیری می‌باشد (Walstra, 1999). باربندر و همکاران تاثیر شرایط تولید (افزایش ماده خشک، فرآیند حرارتی، باکتری‌های آغازگر و دمای گرمخانه گذاری) را بر توسعه اسیدی شدن در تخمیر ماست بررسی نمودند (De Brabandere and De Baerdemaeker, 1999). در مطالعه دیگر کریستو و همکاران به مدلسازی ویژگی‌های اسیدی شدن ماست حاوی گونه‌های پروبیوتیک با استفاده از پارامترهای کینتیکی توسعه اسیدی پرداختند (Kristo *et al.,* 2003). میزان توسعه اسیدی شدن در فرآیندهای تخمیر شیر به عنوان فاکتوری بحرانی مطرح است. زیرا اسیدی شدن سریع شیر از یک سو سبب جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های ناخواسته می‌گردد و از سوی دیگر به منظور ایجاد آروما، بافت و طعم فرآورده نهایی لازم است. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر زیست توده اسپیرولینا و مرحله افزودن آن بر کینتیک توسعه اسیدی شدن و ویژگی‌های ریزساختاری ماست تولید شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

شیرپاستوریزه با ۲/۵ درصد چربی و ماده جامد کل (۰/۲ ± ۱۰/۸) و pH ۷/۶ – ۶/۶ از کارخانه شیر پگاه خراسان تهیه شد. پودر زیست توده "*Spirulina platensis*" با۶۲ درصد پروتئین،۶/۷۲

درصد چربی و ۵/۵ درصد رطوبت از شرکت سینا ریز جلبک قشم خریداری شد (M090107). ترکیبات شیمیایی پودر زیست توده اسپیرولینا و شیر خشک پس چرخ در جدول ۱ نشان داده شده است. ترکیب باکتری‌های آغازگر با کد تجاری (Yoflex Advance 200) شامل *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* و *Streptococcus thermophilus* از نمایندگی شرکت کریستسن هانسن دانمارک خریداری شد.

جدول۱- ترکیبات شیمیایی ریزجلبک اسپیرولینا و پودر شیر خشک پس چرخ

نوع نمونه	خاکستر (%)	چربی (%)	پروتئین کل (%)	ماده جامد (%)
پودر زیست توده اسپیرولینا	۶/۹	۷/۵۸	۶۴/۷	۹۴/۵
پودر شیر خشک پس چرخ	۷/۹	۰/۴۸	۳۱/۶	۹۷/۲

روش‌ها

به منظور تهیه ماست، شیر پاستوریزه با ماده جامد کل (۱۱درصد) با پودر زیست توده "*Spirulina platensis*" در ۴ سطح (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد وزنی/ وزنی) و در دو مرحله افزودن مختلف (قبل از پاستوریزاسیون و همزمان با افزودن باکتری‌های آغازگر) به شیر اضافه گردیدند. عملیات هموژن کردن به منظور توزیع یکنواخت زیست توده اسپیرولینا در شیر با استفاده از هموژنایزر مدل (Armfield Ltd. FT9) و در فشار ۷۰ بار هموژن و فرآیند حرارتی پاستوریزاسیون در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۰ دقیقه و در حمام آب گرم مجهز به سیستم تنظیم دمایی انجام شد. آماده سازی باکتری‌های آغازگر (ترکیبی از دو باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس و استربپتوکوکوس ترموفیلوس) به میزان ۲ درصد به مخلوط اضافه گردید. مخلوط بدست آمده در ظروف پلاستیکی توزیع گردید. سپس عملیات گرمخانه گذاری در دمای ۴۳ درجه سانتی گراد در انکوباتور مجهّز به سیستم گرمایش، سرمایش و اندازه گیری همزمان تغییرات pH و تا رسیدن pH نمونه به ۴/۶ ادامه پیدا کرد. سپس با تغییر دمای انکوباتور به ۴ درجه سانتی گراد، فرآیند سرمایشی نمونه ها به منظور توقف رشد باکتری‌های آغازگر اعمال گردید.

اندازه گیری pH

اندازه گیری تغییرات pH در مدت زمان تخمیر با استفاده از pHمتر در بازه‌های زمانی ۵ دقیقه توسط انکوباتور قابل برنامه ریزی مجهز به پایش آنلاین pH اندازه گیری شد. برای این منظور پروب‌های pH متر در داخل نمونه‌های ماست قرار داده شد. داده‌های حاصل از تغییرات pH در حافظه دستگاه ثبت گردید. کالیبراسیون الکترودها با بافرهای سری (۴ و ۷) و در دمای ۴۳ درجه سانتی گراد و اندازه گیری ها مطابق با دستورالعمل استاندارد ملی ایران انجام گرفت (استاندارد ملی شماره ۲۸۵۲).

کینتیک توسعه اسیدی در طول دوره تخمیر

به منظور تعیین کینتیک اسیدی شدن در طول تشکیل ژل نمونه‌های ماست از روش اندازه گیری پیوسته pH و با روش پیشنهادی اسپینلر و همکاران استفاده گردید (Spinnler and Corrieu, 1989). ۳ پارامتر کینتیکی شامل: میزان بیشینه اسیدی شدن (V_m)(واحد بر دقیقه)، مدت زمان رسیدن به میزان بیشینه اسیدی شدن با واحد ساعت (T_m) و مدت زمان رسیدن به pH=۴/۵ ($T_{pH4.5}$) با استفاده از منحنی‌های pH حاصل از اندازه گیری پیوسته pH در طول دوره تخمیر بدست آمد. میزان اسیدی شدن یا توسعه اسیدی با استفاده از رابطه ذیل بدست آمد. که در این رابطه مقادیر pH اندازه گیری شده با X، زمان با t و زمان اندازه گیری با n نشان داده شده است:

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{tn} = \frac{(X_{tn+1}) - (X_{tn-1})}{(t_{n+1}) - (t_{n-1})}$$

مورفولوژی در دوره تخمیر

بررسی مرفولوژی و ریز ساختار ماست در مدت زمان فرآیند تخمیر با روش پیشنهادی سینگ و همکاران (Singh and Kim, 2009) و توسط میکروسکوپ نوری مدل (OLYMPUS, BX41) با قابلیت ایجاد فاز متضاد[1] و زمینه تاریک[2] و مجهز به سیستم دوربین دیجیتال (DP12) انجام شد. به منظورافزایش کیفیت تصاویر، ۰/۵ میلی لیتر رنگ رودامین طبق روش(Kiani *et al.*, 2010) با غلظت ۰/۰۵ وزنی حجمی به ۹/۵ میلی لیتر از نمونه ماست اضافه و سپس با آب بدون یون ۱۰ برابر رقیق شد. رودامین با پروتئین ها واکنش غیر کوالان داده، باعث شفاف شدن و تمایز آن ها در زیر نور معمولی می‌گردد. به منظور بررسی توسعه یافتن فرآیند آگلومره شدن، آماده سازی نمونه توسط قرار دادن مقداری از محلول در بین تیغه شیشه ای و لامل انجام گرفت. مشاهده نمونه ها بلافاصله پس از رنگ آمیزی صورت گرفت. کنتراست[3] و روشنایی تصاویر گرفته شده با استفاده از نرم افزار فوتوشاپ تغییر داده شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی[4] (SEM)

به منظور مشاهده ساختار میکروسکوپی شبکه ژلی ماست بعد از گرمخانه گذاری از میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل LEO 1450

1 Phase contrast
2 Dark field
3 Brightness
4 Scanning Electron Microscopy

VP، ساخت کشور آلمان) با تابش الکترونی 10 Kv استفاده شد. نمونه برداری از بخش زیرین سطح ماست انجام گرفت. نمونه ها به وسیله دستگاه پوشش دهنده (مدل 7620 SC ساخت انگلستان) با لایه ای از طلا-پالادیم پوشش داده شدند.

طرح آماری

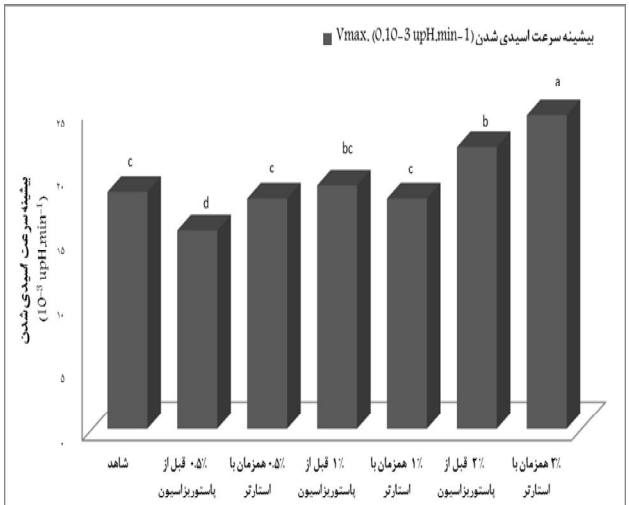
آنالیز آماری نمونه ها بر پایه طرح آزمایش کاملا تصادفی فاکتوریل و در دو تکرار انجام شد. آنالیز واریانس با استفاده از نرم افزار (Minitab نسخه ۱۳/۲۰) و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار (Mstat.c نسخه ۱/۴۲) انجام شد. رسم منحنی‌های حاصل از کینتیک توسعه اسیدی نیز با استفاده از نرم افزار(Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۰) انجام شد.

نتایج و بحث

فرآیند تخمیر اسید لاکتیک از طریق تولید و دفع باکتریایی اسید لاکتیک در محیط و کاهش pH انجام می‌گیرد. در طول دوره تخمیر، تولید اسیدلاکتیک توسط باکتری‌های آغازگر سبب کاهش مقادیر pH می‌گردد. تغییراتpH طی دوره زمانی تخمیر به صورت روندی نزولی و ناشی از تولید یون های H^+ در مخلوط است. با توجه به بررسی داده‌های حاصل از پارامترهای کینتیک اسیدی، نتایج ذیل بدست آمد. نمودار ۱ مقادیر بیشینه نرخ اسیدی شدن در نمونه‌های مختلف ماست را نشان می‌دهد. محدوده بیشینه نرخ اسیدی شدن نمونه ها (V_m) بین ۱۵/۵ تا ۲۴/۵ بود. بیشینه نرخ اسیدی شدن، مربوط به نمونه ۲٪ همزمان با استارتر بود، درحالیکه کمترین نرخ اسیدی شدن در مورد نمونه ۰/۵ درصد اسپیرولینا افزوده شده قبل از پاستوریزاسیون مشاهده گردید. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که سطوح مختلف زیست توده تاثیر معنی داری برپارامترهای بیشینه نرخ اسیدی شدن، مدت زمان رسیدن به بیشینه نرخ اسیدی ومدت زمان رسیدن بهpH=۴/۵ نمونه‌ها داشت($p<۰/۰۵$). با افزایش سطوح زیست توده اسپیرولینا، نرخ اسیدی شدن در نمونه‌های ماست افزایش یافت. همچنین مدت زمان رسیدن به بیشینه نرخ اسیدی شدن با واحد ساعت (Tm) در محدوده ۲/۳۳ تا ۳/۵۴ بود.

مدت زمان رسیدن به بیشینه میزان اسیدی شدن در نمونه حاوی ۲ درصد زیست توده، افزوده شده همزمان با افزودن باکتری‌های آغازگر کمتر از سایر نمونه ها مشاهده شد که احتمالا ناشی از فعالیت بیشتر باکتری‌های آغازگر است به طوریکه در مدت زمان کوتاهتر، pH ماست را به میزان بیشتری کاهش دادند. نتایج آنالیز واریانس حاکی از معنی دار بودن اثر متقابل مرحله افزودن و غلظت زیست توده بر مدت زمان رسیدن به بیشینه نرخ اسیدی بود ($p<۰/۰۵$).

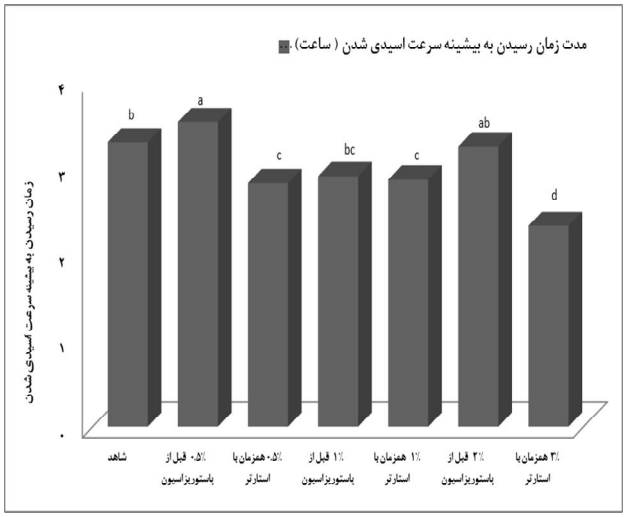
افزایش نرخ تولید اسید در هنگام تخمیر را می‌توان به حضور مواد مغذی متنوع از جمله پپتیدها و اسیدهای آمینه موجود در زیست توده اسپیرولینا دانست. لاکتوباسیل ها نیازمندی‌های رشد پیچیده ای دارند که از آن جمله می‌توان به وجود کربوهیدرات قابل تخمیر، پروتئین‌ها و فرآورده‌های ناشی از شکست این ترکیبات، ویتامین‌های گروه B، اسید نوکیئیک، اسیدهای چرب غیر اشباع و موادمعدنی ازجمله منیزیم ، منگنز و آهن اشاره نمود(De Vuyst, 2000). با توجه به مقادیر بالاتر بیشینه نرخ اسیدی شدن در تیمارهای بعد از پاستوریزاسیون، اینگونه به نظر می‌رسد که فرآیند حرارتی سبب ایجاد تغییراتی در ترکیب شیمیایی زیست توده می‌گردد، به طوری که افزودن زیست توده همزمان با افزودن با باکتری‌های آغازگر اثر مثبتی بر افزایش نرخ اسیدی شدن در نمونه ها داشت. مطالعات انجام شده در مورد تاثیر زیست توده اسپیرولینا بر رشد باکتری‌های اسید لاکتیک نشان دهنده اثر تقویت کنندگی رشد و افزایش زنده مانی آنها در طول دوره نگهداری است. در این راستا گزارش شده است که زیست توده اسپیرولینا باعث افزایش معنی داری تعداد سلولهای فعال



نمودار ۱- تاثیر سطوح مختلف زیست توده و مراحل افزودن برمقدار بیشینه سرعت اسیدی شدن (Vmax) بر حسب (10^{-3} upH.min-1).

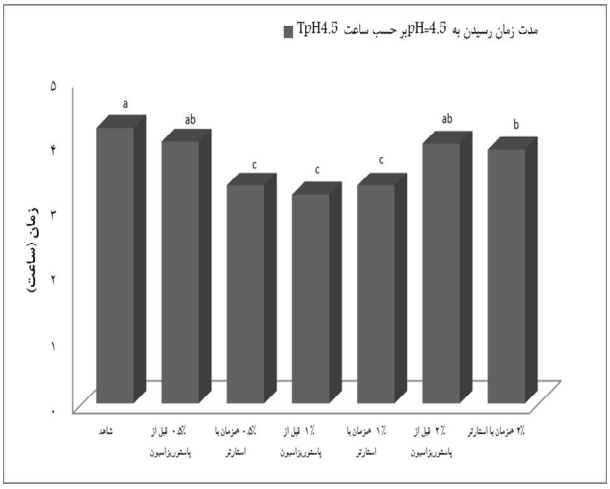
Lactobacillu bulgaricus در ماست می‌گردد(Akalın *et al.*, 2009) همچنین افزایش معنی دار در تولید اسید در طول تخمیر توسط برخی گونه‌های باکتریهای اسید لاکتیک در حضور پودر زیست توده اسپیرولینا به میزان g/lit ۳ گزارش شده است(Ásványi-Molnár et al., 2009). تاثیر سطوح مختلف زیست توده و مراحل افزودن بر مدت زمان رسیدن به بیشینه سرعت اسیدی شدن بر حسب ساعت، در نمودار۲، نشان داده شده است. با افزایش سطوح زیست توده، مدت زمان رسیدن به بیشینه سرعت اسیدی شدن کاهش یافت. بطوریکه نمونه ماست حاوی ۲ درصد زیست توده در مدت زمان

کوتاهتری به بیشینه نرخ اسیدی شدن دست یافت که با مشاهدات بدست آمده از پارامترهای قبلی مطابقت داشت. به نظر می‌رسد که مقادیر بیشتر ریزمغذی‌های موجود در زیست توده اسپیرولینا نقش تقویت کنندگی و محرک بر تولید و رهاسازی بیشترین مقدار اسید لاکتیک در محیط داشته اند.



نمودار۲- تاثیر سطوح مختلف زیست توده و مراحل افزودن بر مدت زمان رسیدن به بیشینه سرعت اسیدی شدن (بر حسب ساعت).

تاثیر سطوح مختلف زیست توده و مراحل افزودن بر مدت زمان مرحله تخمیر(TpH4:5) در نمودار ۳ نشان داده شده است. مدت زمان گرمخانه گذاری در نمونه‌های حاوی۰/۵ و ۱ درصد زیست توده افزوده شده همزمان با افزودن باکتری‌های آغازگر نسبت به سایر نمونه ها کمتر بود که بیانگر تخمیر سریعتر این نمونه ها می‌باشد، در حالی که بیشترین مدت زمان گرمخانه گذاری مربوط به نمونه شاهد بود. نکته قابل توجه در مورد این پارامتر، مقادیر بیشتر آن در خصوص نمونه‌های حاوی ۲ درصد اسپیرولینا بود به طوریکه با وجود دارا بودن بیشنه میزان اسیدی شدن، مدت زمان تخمیرطولانی تر و مشابهی با نمونه شاهد داشت. در واقع مولفه بیشینه سرعت اسیدی شدن از اندازه گیری مقادیر کاهش pH در فواصل زمانی معین بدست می آید و بیانگر شدت کاهش pH در زمانی خاص در طول دوره تخمیر است. اما مدت زمان رسیدن به pH=۴/۵ یا نقطه پایان تخمیر به نوعی بیانگر سرعت متوسط تخمیر است. زمان تخمیر در نمونه های ۲ درصد با نمونه شاهد اختلاف معنی داری ندارد. زمان گرمخانه گذاری در تولید ماست اهمیت بسیاری دارد، به طوریکه تخمیر کند باعث افزایش آب اندازی و افت اثرات همزیستی بین باکتری‌های آغازگر می‌شود(Tamime and Deeth, 1980). تاکنون مطالعات بسیاری در مورد بررسی تاثیر ترکیبات پروتئینی مختلف به عنوان جانشین پودر شیر خشک و افزایش ماده جامد خشک شیر در تولید ماست صورت پذیرفته است. در همین رابطه (Isleten *et al.*, 2006) ایسلتن و همکاران گزارش کردند که غنی سازی شیر با باپروتئین‌های لبنی شامل پودر شیر خشک پس چرخ، کازئینات سدیم، ایزوله پروتئین آب پنیر و بهبود دهنده‌های بافتی تاثیری بر زمان رسیدن به pH معادل ۴/۷ نداشته، تنها بر ویژگی‌های حسی و فیزیکی ماست اثرگذار است. به طوری که کازئینات سدیم و بهبود دهنده‌های بافتی تنها باعث افزایش ویژگی‌های کیفی ماست می‌گردند (Isleten and Karagul-Yuceer, 2006)، درحالی که نتایج متفاوتی توسط دمین و همکاران گزارش شد بطوری که افزایش میزان پودر شیر خشک پس چرخ در تولید ماست باعث افزایش زمان گرمخانه گذاری و کازئینات سدیم سبب کاهش زمان گرمخانه گذاری گردید(Damin *et al.*, 2009).

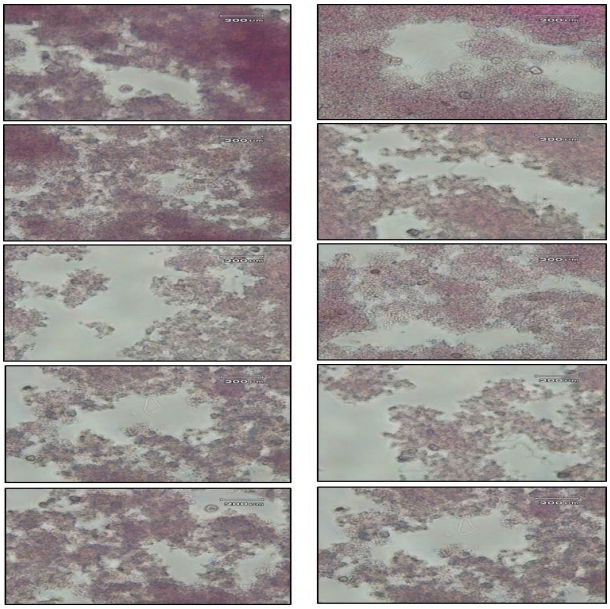


نمودار۳- تاثیر سطوح مختلف زیست توده و مراحل افزودن بر مدت زمان رسیدن به pH=٤/٥ (بر حسب ساعت).

روند توسعه ریزساختاری در حین فرآیند تخمیر

تشکیل شبکه ژلی توسط پروتئین‌های شیر مرحله مهم در فرآیند تولید ماست به شمار می‌آید .تشکیل شبکه پروتئین در طول دوره تخمیر ناشی از تجمع ذرات کازیین در pH=۴/۶ است که بر اثر تولید اسیدلاکتیک و کاهش pH محیط صورت می‌پذیرد(Benezech and Maingonnat, 1994). ماست از لحاظ ریزساختاری به صورت شبکه ایی سه بعدی از زنجیره ها و تجمعات میسل‌های کازئین است(Kalab *et al.*, 1975). درطول زمان گرمخانه گذاری، کاهش pH سبب ایجاد تغییرات قابل ملاحظه ای در سیستم ژلی ماست می‌گردد. امکان استفاده از میکروسکوپ نوری به علت بزرگ بودن شبکه سه بعدی است، به طوری که امکان پایش وضعیت ریزساختاری سیستم ژلی را امکان پذیر می‌نماید. روند توسعه شبکه پروتئینی ماست حاوی ۱ درصد زیست توده و نمونه شاهد در بازه زمانی تخمیر در شکل۱ نشان داده شده است. روند تجمیع

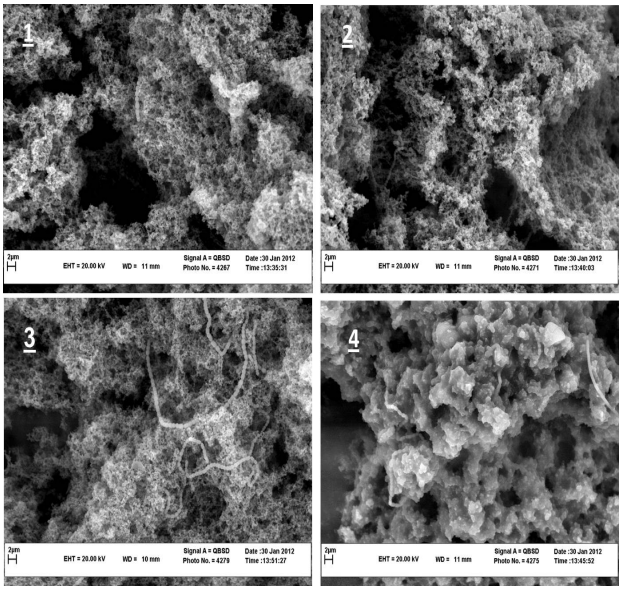
ریزساختاری در هر دو مرحله افزودن بررسی گردید. در شروع فرآیند گرمخانه گذاری، توزیع یکنواخت ذرات مخلوط مشاهده شد، تغییرات تا ۱ ساعت ابتدایی تخمیر محسوس نبود. از ساعت اول تا ساعت دوم تخمیر، فرآیند جمع شدن، به هم پیوستن و افزایش اندازه ذرات مشاهده شد. افزایش تجمیع ذرات از سومین ساعت سبب ایجاد ساختارهای منسجم تر پروتئینی گردید. افزایش تدریجی اندازه و تغییرات ظاهری ذرات بیانگر آغاز تجمع بود. ذرات تجمع یافته از فضاهای غیر انعکاس دهنده نور (سرم) جدا شدند که نشان دهنده تشکیل شبکه سه بعدی می‌باشد در این مرحله انقباض توده ها که منجر به شکل گیری گسترده فضاهای غیر انعکاسی بود مشاهده گردید و خوشه‌های پروتئین که از طریق رشته‌های نازک متصل شدند، شبکه خوبی را تشکیل دادند. مشاهدات نشان داد که وجود زیست توده اسپیرولینا در نمونه حاوی ۱ درصد که همزمان با افزودن باکتری‌های آغازگر به ماست اضافه شده بود، باعث تجمیع سریعتر و متراکم تر ذرات نسبت به نمونه شاهد گردید. نتایج بدست آمده از مشاهدات ریزساختاری با نتایج بدست آمده از کینتیک اسیدی شدن همخوانی داشت. بطوریکه نمونه حاوی ۱ درصد زیست توده سریعتر از نمونه شاهد به تراکم نهایی شبکه پروتئینی دست یافت . روند توسعه ریزساختاری در حین فرآیند تخمیر به کمک میکروسکوپ نوری به عنوان پارامتری کیفی مطرح است و امکان مطالعه بیشتر در حوزه ریزساختاری به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی بوده که در ادامه نشان داده شده است.



شکل۱- روند توسعه ریزساختاری در حین فرآیند تخمیر در نمونه‌های شاهد (سمت راست) و ۱ درصد (سمت چپ) زیست توده اسپیرولینا افزوده شده همزمان با افزودن باکتری‌های آغازگر (ترتیب تجمیع ذرات از بالا به پایین نشان داده شده است).

تصاویر ریز ساختاری میکروسکوپ الکترونی روبشی

تشکیل ژل ماست با توزیع اولیه میسل‌های کازئین و تجمع تدریجی آنها صورت می‌گیرد(Ozcan *et al.*, 2008). تصاویر ریز ساختاری نمونه ای ماست حاوی غلظت‌های متفاوت زیست توده اسپیرولینا در شکل۲ نشان داده شده است. شبکه پروتئینی ژل ماست از میسل‌های کروی شکل کازئین تشکیل شده است. همچنین موقعیت حفرات حاوی فاز مایع و لاکتوباسیلوس ها و استرپتوکوک ها در شبکه ژلی ماست مشهود است. چنین ساختاری در ماست غنی شده با اسپیرولینا با یافته‌های پیشین درباره ماست شباهت دارد که حاکی از پیوستگی زیست توده و سایر اجزای شبکه ژلی دارد.



شکل۲- تصاویر ریز ساختاری نمونه‌های ماست بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM). ۱- ماست شاهد ۲- ماست حاوی ۰/۵ درصد اسپیرولینا ۳- ماست حاوی ۱ درصد اسپیرولینا ٤- ماست حاوی ۲ درصد اسپیرولینا

شبکه پروتئینی با افزایش مقدار زیست توده تا ۱ درصد سبب تراکم بیشتر و کاهش فضاهای خالی می‌گردد. اما غلظت ۲ درصد اسپیرولینا باعث ایجاد تغییر شکل توده‌های کازئین گردید به طوری که با وجود پیوستگی بیشتر شکل ظاهری ذرات با نمونه‌های دیگر متفاوت بود. به نظر می رسد که تاثیر مثبت مقادیر کم اسپیرولینا بر بهبود ویژگی‌های ژل ماست احتمالا به علت بازآرایی بهتر و تحرک مولکولی ساختار میسل کازئین است که به افزایش اتصالات عرضی در شبکه ژلی ماست کمک می‌کند. در مقابل، مقادیر بالاتر سبب کاهش انسجام و به نوعی تغییر شبکه کازئینی می‌گردد. به عبارت دیگر ساختار متراکم‌تر با حفرات خالی کمتر منجر به قدرت بیشتر شبکه ژلی و افزایش ظرفیت نگهداری آب

می‌گردد(Puvanenthiran, 2002). از آنجا که پودراسپیرولینا به عنوان یک ماتریکس چندین جزئی است، کاوش ریزساختار نمونه ها امکان پایش بهتر و دقیق تر برهمکنش های پروتئین-پروتئین و آرایش های موجود در شبکه ژلی ماست را فراهم می کند. به همین علت، وضعیت ریزساختاری شبکه پروتئینی در ماست به نوعی بیانگر کیفیت ویژگی های فیزیکوشیمیایی فرآورده خواهد بود.

نتیجه گیری

استفاده از زیست جلبک ها در فرآورده‌های غذایی در دهه اخیر روند روبه رشدی داشته است. طراحی و توسعه این محصولات مستلزم بررسی‌های پایه ای بیشتری می‌باشد. تاثیر زیست توده ریزجلبکها در سیستم‌های غذایی وابسته به شرایط عملیاتی، نوع و شدت فرآیند (حرارتی، مکانیکی) و برهمکنش با سایر ترکیبات مواد غذایی (پروتئین، پلی ساکارید، لیپید، نمک، قند) است که مطالعه در این زمینه موجب بهبود روند طراحی و توسعه فرآورده‌های غنی شده با ریزجلبک ها می‌گردد. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که جایگزینی سطوح مختلف زیست توده اسپیرولینا با پودر شیرخشک پس چرخ و همچنین مرحله افزودن زیست توده در تولید ماست سبب ایجاد تغییراتی در کینتیک توسعه اسیدی شدن و ویژگی‌های ریز ساختاری ماست گردید. وجود طیف وسیعی از ریزمغذی ها در زیست توده اسپیرولینا مانند پپتیدها و اسیدهای آمینه می‌تواند در کاهش زمان تخمیر موثر باشند. این مسئله در مورد باکتری‌های پروبیوتیک اهمیت بیشتری دارد. چون رشد باکتری‌های پروبیوتیک در شیر به علت کمبود فعالیت پروتئولیتیک کند است به همین علت روش مرسوم در تولید ماستهای پروبیوتیک، استفاده از باکتریهای آغازگر متداول ماست است(Dave and Shah, 1998). علی رغم افزایش میزان اسیدی شدن و دارا بودن بیشینه میزان اسیدی شدن در ماست حاوی غلظت ۲ درصد زیست توده اسپیرولینا، ویژگی‌های ریزساختاری ضعیف تری مشاهده شد. درحالی که استفاده از مقادیر ۰/۵ و ۱ درصد زیست توده در فرمولاسیون ماست، اثرات مثبتی بر ویژگی‌های اسیدی شدن و ریزساختاری ماست نشان داد. به طور کلی افزودن ریزجلبک اسپیرولینا در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد به ماست علاوه بر افزایش ارزش تغذیه ای ماست سبب تعدیل طعم زیست توده ناشی از فرآیند تخمیر می‌گردد. فرآورده فراسودمند بدست آمده، به منظور پیشگیری از سوء تغذیه و دریافت ریزمغذی‌های اساسی مورد نیاز بدن به خصوص در مناطق محروم کشور قابل استفاده می‌باشد.

منابع

استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲، ۱۳۷۳. روش تعیین اسیدیته کل و pH در شیر و فرآورده‌های آن.چاپ دوم

Akalın A, Ünal G, Dalay M. 2009. Influence of Spirulina platensis biomass on microbiological viability in traditional and probiotic yogurts during refrigerated storage. Italian Journal of Food Science 21(3):357-364.

Ásványi-Molnár N, Sipos-Kozma Z, Tóth Á, Ásványi B, Varga L. 2009. Development of functional dairy food enriched in spirulina (Arthrospira platensis). Tejgazdaság 69(2):15-22.

Belay A, Ota Y, Miyakawa K, Shimamatsu H. 1993. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. Journal of Applied Phycology 5(2):235-241.

Benezech T, Maingonnat JF. 1994. Characterization of the rheological properties of yoghurt—A review. Journal of Food Engineering 21(4):447-472.

Damin MR, Alcântara MR, Nunes AP, Oliveira MN. 2009. Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. LWT - Food Science and Technology 42(10):1744-1750.

Dave R, Shah N. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. Journal of Dairy Science 81(11):2804-2816.

De Brabandere AG, De Baerdemaeker JG. 1999. Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. Journal of Food Engineering 41(3–4):221-227.

de Caire GZ, Parada JL, Zaccaro MC, de Cano MMS. 2000. Effect of Spirulina platensis biomass on the growth of lactic acid bacteria in milk. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16(6):563-565.

De Vuyst L. 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. Food Technology and Biotechnology 38(2).

Fiszman SM, Lluch MA, Salvador A. 1999. Effect of addition of gelatin on microstructure of acidic milk gels and yoghurt and on their rheological properties. International Dairy Journal 9(12):895-901.

Gouveia L, Batista AP, Miranda A, Empis J, Raymundo A. 2007. Chlorella vulgaris biomass used as colouring source in traditional butter cookies. Innovative Food Science & Emerging Technologies 8(3):433-436.

Guldas M., Irkin R. 2010. Influence of Spirulina platensis powder on the microflora of yoghurt and acidophilus milk. Mljekarstvo, 60:237-243.

Isleten M, Karagul-Yuceer Y. 2006. Effects of Dried Dairy Ingredients on Physical and Sensory Properties of Nonfat Yogurt. Journal of Dairy Science 89(8):2865-2872.

Kalab M, Emmons DB, Sargant AG. 1975. Milk-gel structure. IV. Microstructure of yoghurts in relation to the presence

of thickening agents. Journal of Dairy Research 42(03):453-458.
Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS. 2005. Nutritional and Therapeutic Potential of Spirulina. Current Pharmaceutical Biotechnology 6(5):373-379.
Kiani H, Mousavi ME, Mousavi ZE. 2010. Particle Stability in Dilute Fermented Dairy Drinks: Formation of Fluid Gel and Impact on Rheological Properties. Food Science and Technology International 16(6):543-551.
Kristo E, Biliaderis C, 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(7):517-528.
Ozcan T, Lucey JA, Horne DS. 2008. Effect of Tetrasodium Pyrophosphate on the Physicochemical Properties of Yogurt Gels. Journal of Dairy Science 91(12):4492-4500.
Parada J.L., Zulpa de Caire G., Zaccaro de Mulé M.C., Storni de Cano M.M. (1998). Lactic acid bacteria growth promoters from Spirulina platensis. International journal of Food Microbiology, 45:225-228.
Paseephol T, Small DM, Sherkat F. 2008. Rheology and Texture of Set Yogurt as Affected by Inulin Addition. Journal of Texture Studies 39(6):617-634.
Pulz O, Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology 65(6):635-648.
Puvanenthiran A., Williams R.P.W., Augustin M.A. (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. International Dairy Journal, 12:383-391.
Shahidi F. 2004. Functional Foods: Their Role in Health Promotion and Disease Prevention. Journal of Food Science 69(5):R146-R149.
Singh M, Kim S. 2009. Yogurt Fermentation in the Presence of Starch–Lipid Composite. Journal of Food Science 74(2):C85-C89.
Spinnler HE, Corrieu G. 1989. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. Journal of Dairy Research 56(05):755-764.
Tamime A, Deeth H. 1980. Yogurt technology and biochemistry. Journal of Food Protection 43(12):939-977.
Varga L, Szigeti J, Kovács R, Földes T, Buti S. 2002. Influence of Spirulina platensis Biomass on the Microflora of Fermented ABT Milks During Storage (R1). Journal of Dairy Science 85(5):1031-1038.
Walstra P. 1999. Dairy technology: principles of milk properties and processes: CRC Press.
Yamaguchi K. 1996. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. Journal of Applied Phycology 8(6):487-502.
Zare F, Boye JI, Orsat V, Champagne C, Simpson BK. 2011. Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour. Food Research International 44(8):2482-2488.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 2, Summer 2015, p. 152-160

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۱۶۰-۱۵۲

The effect of "*spirulina platensis*" biomass on acidification kinetics and microstructural charactrisitics of yogurt

S.A.Tavakoli lahijani[1]- F. Shahidi [2]*- M.Varidi[3] – M. Mohebbi[4]

Received: 15-07-2012
Accepted: 28-11-2013

Abstract

Spirulina platensis is a blue-green microalga with unique nutrient content and several therapeutic aspects which has been used for fortification of different foods. In this study, the effect of *Spirulina platensis* powder in different levels (0, 0.5, 1 and 2 percent), added in two stages (before pasteurization and at same time with starter culture) was studied on the microstructure and acidification characteristics of yogurt during fermentation time. The results showed that different levels of *Spirulina* biomass had significant effect on acidification kinetics parameters of yogurt samples ($p<0.01$). The interactive effect between different levels of biomass and stage of addition had significant impact on the time needed for reaching to the maximum acidification rate ($p<0.05$). Microstructure study of particles aggregation during fermentation time represented a slowdown trends in yogurt containing 2% of *Spirulina* compared to the control sample. SEM images of yogurt gel network in micrographs also demonstrated the positive effects of *Spirulina* biomass in the range of 0.5 and 1 percent on the strength of yogurts protein network.

Keywords: *Spirulina platensis*, Biomass, Yogurt, Acidification kinetics, Microstructure.

1. Former M.Sc. Department of Food Science and Technology, Agricultural Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
2,3 and 4- Professor , Assistant professor and Associate Professor of Department of Food Science and Technology, Agricultural Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, respectively.
(*-Corresponding Author Email: niloofar1373@yahoo.com)