مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۴۸، شماره ۳، آذر و دی ۱۳۹۶ (ص ۴۰۶-۳۹۹)

بهینه‌سازی تولید دکستران توسط لوکونوستوک مزنتروئیدس و نقش هم‌افزایی لاکتوکوکوس لاکتیس در تولید آن در نوشیدنی لبنی تخمیری

فریبرز آقاجان‌پور وشکی[۱]، سیدهادی رضوی[۲*]، فرامرز خدائیان چگینی[۳]، زینب السادات ابراهیم زاده موسوی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۲. استاد ،گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،کرج

۳. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،کرج

۴. استادیار ، گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۴ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۵/۳- تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۵/۷)

چکیده

برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیکی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تولید می‌کنند که علاوه بر توانایی اتصال با آب و افزایش ویسکوزیته، خصوصیات سلامتی بخش مفیدی از قبیل کاهش کلسترول، ارتقای سیستم ایمنی و نقش پری‌بیوتیکی دارند. در این تحقیق تولید اگزوپلی‌ساکارید دکستران در نوشیدنی لبنی تخمیری توسط باکتری *لوکونوستوک مزنتروئیدس* و نقش هم‌افزایی *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر تولید آن مورد بررسی قرار گرفت. بهینه‌سازی تولید دکستران در شیر با استفاده از روش سطح پاسخ با چهار فاکتور مستقل دمای گرمخانه گذاری (۲۰-۴۰°C)، زمان گرمخانه گذاری (۳۵-۱۵ ساعت)، نسبت تلقیح *ل. مزنتروئیدس* به *ل. لاکتیس* (۱۰:۹۰-۹۰:۱۰) و درصد ساکارز (۶-۰ درصد) انجام شد. بر اساس آزمایشات انجام شده دمای ۲۵°C، زمان ۲۰ ساعت، نسبت تلقیح ۵۰:۵۰ و ساکارز ۴/۵ درصد شرایط بهینه تولید دکستران بودند و نتایج آزمون‌های تجربی مقدار تولید دکستران پیش‌بینی شده توسط مدل در شرایط بهینه را تائید کرد.

واژه‌های کلیدی : اگزوپلی‌ساکارید، دکستران، لوکونوستوک مزنتروئیدس

مقدمه

با توجه به افزایش جمعیت، تغییر الگوی مصرف و اهمیت شیر و فرآورده‌های آن در تغذیه‌ی انسان، مصرف آن‌ها روند افزایشی داشته و در بازار تجارت جهانی رونق فراوانی یافته‌اند. امروزه تعدادی از نوشیدنی‌های بر پایه لبنی در سراسر دنیا به فروش می‌رسد و بازار قابل‌توجهی دارد. مهم‌ترین عوامل مؤثر بر موفقیت و مطلوبیت این محصولات اثرات سلامت بخش، ویژگی‌های تغذیه‌ای مطلوب، خصوصیات حسی منحصربه‌فرد و افزایش ماندگاری نوشیدنی‌های لاکتیکی آن‌هاست. نوشیدنی‌های لاکتیکی فراورده‌هایی هستند که روند تولید آن‌ها شامل تخمیر شیر به‌وسیله باکتری‌های اسید لاکتیکی است. تخمیر از ارزان‌ترین روش‌های نگهداری مواد غذایی است که سبب بهبود ارزش تغذیه‌ای و خصوصیات حسی آن نیز می‌شود و به همین دلیل بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهد. فرآورده‌های لبنی نقش مهمی در توسعه غذاهای فراسودمند دارند و نوشیدنی‌های تخمیری حاوی باکتری‌های پروبیوتیک یا ترکیبات پری‌بیوتیک بخش اصلی نوشیدنی‌های لبنی فراسودمند را تشکیل می‌دهند (Ozer & Kirmaci, 2010).

باکتری‌های اسیدلاکتیکی موجود در شیرهای تخمیر شده، عمدتاً از گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، *استرپتوکوکوس*، *پدیوکوکوس*، *لوکونوستوک* و *لاکتوکوکوس* هستند (Ruas-Madiedo *et al*, 2002). گونه‌های *لوکونوستوک*، غیر متحرک، گرم مثبت، غیراسپورزا، بی‌هوازی اختیاری و مزوفیل هستند. این باکتری‌ها هتروفرمنتاتیو هستند و در کنار تولید لاکتات، دی‌اکسید کربن و ترکیبات آروماتیک هم تولید می‌کنند (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). زمانی که *لوکونوستوک مزنتروئیدس* در محیط غنی از ساکارز رشد می‌کند تولید آنزیم دکستران سوکراز[۱] تحریک می‌شود. ساکارز تنها سوبسترای شناخته‌شده است که این قابلیت را دارد. این آنزیم خارج سلولی از ساکارز به‌عنوان سوبسترا برای تولید دکستران استفاده می‌کند (Purama & Goyal, 2008). سویه‌های

* نویسنده مسئول : srazavi@ut.ac.ir

1. Dextran sucrase

لوکونوستوک به‌صورت همبسته با *لاکتوکوکوس‌های* تولیدکننده اسید رشد می‌کنند و یک ارتباط هم‌افزایی[1] دارند. برای متابولیسم سیترات و تولید ترکیبات آروماتیک توسط *لوکونوستوک*، تولید اسید و کاهش pH توسط *لاکتوکوکوس* ضروری است (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). *لاکتوکوکوس لاکتیس* یکی از مهم‌ترین گروه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک است که در صنعت لبنیات استفاده می‌شود. عملکرد اصلی این‌گونه در تخمیر لبنیات تولید اسیدلاکتیک از لاکتوز، هیدرولیز کازئین و تخمیر اسیدسیتریک است (Samarzija *et al*, 2001). همچنین *ل. مزنتروئیدس* با تولید باکتریوسین مزنتریسین و *ل. لاکتیس* با تولید نیسین اثر ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های عامل فساد دارند (Stiles, 1994, O'sullivan *et al*., 2002).

الزامات عمومی یک نوشیدنی لبنی تخمیری احساس دهانی مطلوب و بافت[2] مناسب است. دو فاز شدن یکی از شایع‌ترین پدیده‌هایی است که در نوشیدنی‌های لبنی اسیدی اتفاق می‌افتد که به دلیل ویسکوزیته و pH پایین و تأثیر آن‌ها بر ترسیب پروتئین‌ها است (Azarikia & Abbasi, 2010) و مطالعاتی در این رابطه و استفاده از استابیلایزرها جهت جلوگیری از این پدیده انجام شده است (Kiani *et al*, 2010, Joudaki *et al*, 2013, Mende *et al*, 2016, Teimouri *et al*, 2017).

برخی از سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک که به‌عنوان آغازگر استفاده می‌شوند، در فرایند تخمیر با تولید اگزوپلی‌ساکارید[3] (EPS) سبب بهبود بافت شیرهای تخمیر شده می‌شوند (Hassan *et al*, 2003). اگزوپلی‌ساکاریدها علاوه بر افزایش ویسکوزیته و حالت خامه‌ای مانند، به دلیل توانایی پیوند با آب سینرزیس را هم کاهش می‌دهند (Mende *et al*, 2013). باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان میکروارگانیسم‌های ایمن[4] در نظر گرفته می‌شوند، بنابراین گونه‌های تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید می‌توانند به‌طور مستقیم به فرآورده‌های لبنی افزوده شوند تا خصوصیات رئولوژیکی و حسی مطلوب را ایجاد کنند (Shao *et al*, 2014). یکی از اگزوپلی‌ساکاریدهایی که توسط سویه‌های *لوکونوستوک* تولید می‌شود، دکستران است. دکستران یک پلیمر گلوکزی با وزن مولکولی بالا است که کاربردهای زیادی در صنایع مختلف از قبیل صنعت دارو و صنایع غذایی به عنوان امولسیفایر، حامل، پایدارکننده و قوام دهنده دارد (Purama & Goyal, 2008).

محققان زیادی در زمینه پایدارسازی نوشیدنی‌های لبنی توسط پایدارکننده‌ها کار کرده‌اند. Koksoy & Kilic (2004) از پایدارکننده های پکتین با متوکسیل بالا، صمغ گوار، صمغ لوبیای لوکاست و ژلاتین در غلظت‌های مختلف برای جلوگیری از دو فاز شدن آیران در طول نگهداری استفاده کردند و خصوصیات حسی، رئولوژیکی و دو فاز شدن نمونه‌ها پس از ۱۵ روز نگهداری در دمای ۴ ^{o}C را مورد بررسی قرار دادند. Azarikia& Abbasi (2010) اثر صمغ تراگاکانت را روی جدا شدن سرم در دوغ و همچنین مکانیسم پایداری سازی آن را از طریق اندازه‌گیری‌های رئولوژیکی بررسی کردند. بر طبق یافته‌ها صمغ تراگاکانت در غلظت ۰/۱ و ۰/۲ درصد از جدا شدن سرم جلوگیری کرد و بر اساس آزمایش‌های ویسکوالاستیک، دوغ‌های حاوی تراگاکانت بافت ویسکوز و رفتار الاستیک داشتند. همچنین پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی به دلیل دارا بودن عملکردهای خاصی چون ویسکوز کنندگی و پایدارکنندگی و ... که دارند در صنعت غذا کاربرد فراوانی دارند به‌نحوی‌که باتاثیر بر روی بافت مواد خواص رئولوژیک و بافتی آن را به‌طور مطلوبی تحت تأثیر قرار می‌دهند به‌علاوه این ترکیبات در بهبود کیفیت محصولات تخمیری نیز اهمیت بسزایی دارند. بدین ترتیب که با افزایش زیست پذیری باکتری‌های اسیدلاکتیکی به بقای آن‌ها تا رسیدن به روده انسان کمک می‌کند. این ترکیبات دارای انواع مختلفی مانند زانتان، ژلان، دکستران و ... می‌باشند که هرکدام از آن‌ها دارای ساختمان و ویژگی‌های خاص خود می‌باشند و از این لحاظ دارای مصارف متفاوتی در صنعت فراوری غذا می‌باشند. Mende *et al*. (2013) اثر افزودن اگزوپلی‌ساکاریدهای خالص‌شده به‌دست‌آمده از *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* را بر خصوصیات رئولوژیکی ژل اسیدی شیر بررسی کردند. آن‌ها اگزوپلی‌ساکاریدهای کپسولی و آزاد تولیدشده توسط *استرپتوکووس ترموفیلوس* ST-143 را جدا و خالص کرده و در مقادیر مشخص به شیر قبل از اسیدی شدن افزودند. مشخص شد که استحکام ژل شیر با افزایش مقدار اگزوپلی‌ساکاریدهای آزاد به‌طور خطی افزایش پیدا می‌کند. Onilude *et.al* (2012) اثر شرایط کشت مختلف بر تولید دکستران توسط *ل. مزنتروئیدس* در یک محیط کشت غنی شده را مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار دادند. بر اساس نتایج آن‌ها دمای گرمخانه‌گذاری ۲۵ °C، pH= ۶/۵ و زمان ۲۰ ساعت برای تولید دکستران شرایط بهینه بودند. همچنین مشخص شد که در بین منابع نیتروژنی استفاده شده کازئین بهترین منبع

1. Synergistic
2.Body
3. Exopolysaccharide
4. Generally recognized as safe (GRAS)

نیتروژن است. یکی از پرکاربردترین روش‌های بررسی فاکتورهای مؤثر در تولید اگزوپلی‌ساکاریدها و بهینه‌سازی تولید آن‌ها روش سطح پاسخ است که به‌وسیله یافتن ارتباط بین فاکتور و پاسخ در طرح آزمایشی، بهینه‌سازی را انجام می‌دهد. هدف از این مطالعه تولید دکستران در نوشیدنی لبنی تخمیری توسط *ل. مزنتروئیدس*، بهینه‌سازی تولید دکستران به‌وسیله روش سطح پاسخ و بررسی اثر هم‌افزایی *ل. لاکتیس* در تولید دکستران است.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل پودر شیر خشک بدون چربی (پس چرخ) از شرکت لبنیات پگاه (تهران)، محیط‌های کشت MRS، TSB و عصاره مخمر از شرکت Quelab کانادا و تری‌کلرواستیک اسید از شرکت Bio Basic کانادا بود. همچنین باکتری *ل. مزنتروئیدس* زیرگونه مزنتروئیدس ATCC 10830 و *ل. لاکتیس* زیرگونه لاکتیس ATCC 11454 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه خریداری شد.

آماده‌سازی مایه تلقیح

برای ذخیره‌سازی، سویه‌ها در دمای ۱۸- °C همراه با ۴۰ درصد گلیسرول نگهداری شدند. محیط مورد استفاده برای فعال‌سازی *ل. مزنتروئیدس*، MRS غنی‌شده با ۳ درصد ساکارز و محیطی که برای *ل. لاکتیس* استفاده شد، TSB+ ۰/۳٪ عصاره مخمر بود. محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد و پس از سرد شدن تا دمای محیط، تلقیح انجام شد. جهت تهیه مایه تلقیح ابتدا یک کشت خطی تهیه شده و از آن یک کلنی به محیط براث منتقل شد. پس از ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری از این محیط دوباره به محیط کشت براث جدید انتقال داده شد. گونه‌های *ل. مزنتروئیدس* در دمای ۲۵ °C و *ل. لاکتیس* در دمای ۳۰°C گرمخانه‌گذاری شدند (Bellengier *et al*, 1997, Onilude *et.al*, 2012).

آماده‌سازی پیش‌کشت

پس از تلقیح باکتری‌ها در محیط کشت، در فاز لگاریتمی رشد، محیط کشت در دمای ۲۵ °C در ۶۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مابع رویی دور ریخته و سلول‌ها توسط سرم فیزیولوژی شسته شد (Duenas *et al*, 2003). زیست‌توده به‌دست‌آمده برای تلقیح به پیش‌کشت استفاده شد. پیش‌کشت از شیر بازساخته بدون چربی با ماده خشک ۸ درصد، ۱ درصد ساکارز و ۰/۵ درصد عصاره مخمر تهیه شد (Bellengier *et al*, 1997). پس از استریل شدن توسط اتوکلاو و سرد شدن تا دمای محیط *ل. مزنتروئیدس* و *ل. لاکتیس* به‌طور جداگانه به پیش‌کشت تلقیح شدند. پیش‌کشت حاوی *ل. مزنتروئیدس* پس از ۹ ساعت و *ل. لاکتیس* پس از ۶ ساعت سانتریفیوژ گردید، مایع رویی دور ریخته شد و از زیست‌توده رسوب شده برای تلقیح به شیر استفاده شد.

تولید فرآورده

شیر خشک بدون چربی با افزودن آب تا ماده خشک ۸ درصد بازسازی شد. پس از افزودن ۳ درصد ساکارز به آن در دمای ۹۰°C به مدت ۱۵ دقیقه در یک حمام آب دارای همزن مغناطیسی حرارت داده شد (Kiani *et al*, 2010). بعد از خنک شدن، *ل. مزنتروئیدس* و *ل. لاکتیس* به میزان ۱۰ درصد (حجمی/حجمی) از پیش‌کشت به شیر اصلی تلقیح شدند و سپس گرمخانه‌گذاری گردید. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، نمونه‌برداری و اندازه‌گیری دکستران انجام شد. سپس شیر کشت داده شده برای کاهش pH با حجم برابر از ماست تهیه شده توسط استارتر لاکتینا بلغارستان مخلوط و در دمای ۴۲ °C گرمخانه‌گذاری شد تا pH آن به ۴/۲ برسد. سپس فرآورده با آب تا ماده خشک ۵ درصد رقیق شده، به‌وسیله هموژنایزر (ULTRA-TURRAX,T25D, IKA®-Werke GmbH & Co) همگن و در دمای ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه پاستوریزه شد (Yilmaz *et al*, 2015).

استخراج و اندازه‌گیری دکستران

برای به دست آوردن مقدار دکستران ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه شیر تخمیر شده توسط *ل. مزنتروئیدس* و *ل. لاکتیس*، ابتدا جهت غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها همراه با همزنی جوشانده شد. پس از سرد شدن به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g و دمای ۴ °C سانتریفیوژ (Sigma 8KS، کشور آلمان) گردید تا سلول‌ها و پروتئین‌های لخته شده جدا شود. مایع رویی نگه‌داشته و رسوبات دور ریخته شد. پس از جمع‌آوری قسمت مایع، به آن تا غلظت ۴ درصد تری‌کلرواستیک اسید اضافه گردید و به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۴ °C نگهداری شد تا پروتئین‌های محلول نیز رسوب کند. سپس در دمای ۴ °C به مدت ۲۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوبات دور ریخته و مایع رویی جمع‌آوری و به آن ۲ حجم اتانول ۹۵ درصد سرد اضافه گردید. یک شب در یخچال نگهداری و به دنبال آن در ۱۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ مایع رویی دور ریخته شده و رسوبات در آون تحت خلا (townson & mercer انگلستان) خشک شده و وزن آن توسط ترازوی آزمایشگاهی (دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد (Enikeev,

(2012; Ai *et al*,2008).

طراحی آزمایشات

جهت یافتن شرایط بهینه برای تولید دکستران در شیر تخمیری، دسته‌ای از آزمون‌ها بر اساس روش سطح پاسخ با استفاده از نرم‌افزار Design-Expert (trial version 7.1.6, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) انجام شد. تعداد ۳۰ آزمون توسط طرح مرکب مرکزی با ۴ فاکتور غیر وابسته شامل دمای گرمخانه‌گذاری، زمان گرمخانه‌گذاری، نسبت تلقیح *ل. مزنتروئیدس* به *ل. لاکتیس* و درصد ساکارز در ۵ سطح از هر متغیر انجام شد. دامنه متغیرها، سطوح متغیرها و نماد آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. طرح کامل مرکب مرکزی به‌صورت کد همراه با پاسخ‌های آزمون در جدول ۲ نشان داده شده است. از جدول آنالیز واریانس برای تعیین معنی‌داری اثر متغیرهای فرآیند روی پاسخ استفاده شد و شرایط بهینه برای تولید حداکثر دکستران تعیین گردید.

جدول ۱. سطوح متغیرها

فاکتور	نماد	+۲	+۱	۰	−۱	−۲
دمای گرمخانه‌گذاری (°C)	A	۴۰	۳۵	۳۰	۲۵	۲۰
زمان گرمخانه‌گذاری (ساعت)	B	۳۵	۳۰	۲۵	۲۰	۱۵
نسبت تلقیح *ل. مزنتروئیدس* به *ل. لاکتیس*	C	۹۰:۱۰	۷۰:۳۰	۵۰:۵۰	۳۰:۷۰	۱۰:۹۰
ساکارز (٪w/v)	D	۶	۴٫۵	۳	۱٫۵	۰

نتایج و بحث

بهینه‌سازی توسط روش سطح پاسخ

پس از انجام تیمارهای روش سطح پاسخ، نتایج به‌دست‌آمده در هر یک از شرایط تعریف شده در جدول ۲ گزارش شد.

پس از بررسی و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار مدل درجه دوم مناسب برای پاسخ‌ها در نظر گرفته شد که به‌صورت زیر است:

$$\text{دکستران} = ۰/۹۷ - ۰/۳۲A - ۰/۰۵۹B + ۰/۰۷۲C + ۰/۲۷D + ۰/۰۲۴AB + ۰/۰۰۰۶۲۵AC - ۰/۱۶AD + ۰/۰۱۳BC - ۰/۰۸۲BD + ۰/۰۲۲CD - ۰/۱۴A^۲ - ۰/۰۳۹B^۲ - ۰/۰۹۲C^۲ - ۰/۰۹۶D^۲ \quad (۱)$$

از نتایج آنالیز واریانس که در جدول ۳ گزارش شده برای بررسی معنی‌داری فاکتورها استفاده شد. برای هر یک از عبارات مدل یک مقدار P مشخص شده که هر چه قدر مقدار آن کمتر باشد عبارت مورد نظر تأثیر بیشتری در میزان پاسخ و درواقع میزان معنی‌داری بیشتری دارد و ازآنجاکه مقدار ۹۵ درصد به‌عنوان سطح اطمینان در نظر گرفته شده اگر P بزرگ‌تر از ۰/۰۵ باشد به این معنی است که عبارت مورد نظر معنی‌دار نیست. ضریب همبستگی (R^2) متغیر دیگری است که هرچه به یک نزدیک‌تر باشد نشان دهنده انطباق بیشتر داده‌ها با مدل ارائه شده است و مدل دقت بالاتری دارد. در این آزمایش ضریب همبستگی برای پاسخ مقدار دکستران ۹۰ درصد است. همچنین عبارت عدم برازش به‌نوعی معرف عدم پوشش نتایج با مدل است و هرچه P آن بزرگ‌تر باشد نشان‌دهنده خطای پایین‌تر آزمایش است.

جدول ۲. طرح مرکب مرکزی

متغیرهای مستقل					پاسخ
Std	A	B	C	D	دکستران (٪وزنی/حجمی)
۱	−۱	−۱	−۱	−۱	۰/۴۵
۲	۱	−۱	−۱	−۱	۰/۰۳
۳	−۱	۱	−۱	−۱	۰/۴۷
۴	۱	۱	−۱	−۱	۰/۰۶
۵	−۱	−۱	۱	−۱	۰/۵۵
۶	۱	−۱	۱	−۱	۰/۱۹
۷	−۱	۱	۱	−۱	۰/۵۱
۸	۱	۱	۱	−۱	۰/۲۴
۹	−۱	−۱	−۱	۱	۱/۴
۱۰	۱	−۱	−۱	۱	۰/۲۵
۱۱	−۱	۱	−۱	۱	۰/۸۲
۱۲	۱	۱	−۱	۱	۰/۰۸
۱۳	−۱	−۱	۱	۱	۱/۴۶
۱۴	۱	−۱	۱	۱	۰/۴۸
۱۵	−۱	۱	۱	۱	۱/۲۷
۱۶	۱	۱	۱	۱	۰/۱۷
۱۷	−۲	۰	۰	۰	۱/۱
۱۸	۲	۰	۰	۰	۰
۱۹	۰	−۲	۰	۰	۱/۰۲
۲۰	۰	۲	۰	۰	۰/۹۱
۲۱	۰	۰	−۲	۰	۰/۶۵
۲۲	۰	۰	۲	۰	۰/۸۶
۲۳	۰	۰	۰	−۲	۰
۲۴	۰	۰	۰	۲	۱/۴۸
۲۵	۰	۰	۰	۰	۰/۸۸
۲۶	۰	۰	۰	۰	۱/۲
۲۷	۰	۰	۰	۰	۰/۸۱
۲۸	۰	۰	۰	۰	۱/۱۲
۲۹	۰	۰	۰	۰	۰/۸۵
۳۰	۰	۰	۰	۰	۰/۹۷

بنابراین با بررسی جدول آنالیز واریانس برای تولید دکستران مشخص است که مدل مورد نظر معنی‌دار بوده و از بین فاکتورهای مستقل، دمای گرمخانه گذاری و درصد ساکارز با داشتن P پایین‌تر از ۰/۰۵ بیشترین اثر را در تولید دکستران دارند اما فاکتورهای زمان گرمخانه گذاری و نسبت تلقیح *ل. مزنتروئیدس* به *ل. لاکتیس* در تولید دکستران معنی‌دار نیستند. همچنین عبارت عدم برازش چون P بالاتر از ۵ درصد دارد، معنی‌دار نیست.

جدول ۳. آنالیز واریانس برای دکستران

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P
مدل	۵/۶۸	۱۴	۰/۴۱	۹/۸۹	۰/۰۰۰۱ >
A	۲/۴۳	۱	۲/۴۳	۵۹/۱۱	۰/۰۰۰۱ >
B	۰/۰۸۳	۱	۰/۰۸۳	۲/۰۲	۰/۱۷۵۸
C	۰/۱۲	۱	۰/۱۲	۳/۰۴	۰/۱۰۱۷
D	۱/۷	۱	۱/۷	۴۱/۴۶	۰/۰۰۰۱ >
AB	۰/۰۰۹۵	۱	۰/۰۰۹۵	۰/۲۳	۰/۶۳۷۲
AC	۰	۱	۰	۰/۰۰۰۱	۰/۹۹۰۳
AD	۰/۳۹	۱	۰/۳۹	۹/۶	۰/۰۰۷۴
BC	۰/۰۰۲۷	۱	۰/۰۰۲۷	۰/۰۶۷	۰/۷۹۹
BD	۰/۱۱	۱	۰/۱۱	۲/۶۱	۰/۱۲۶۸
CD	۰/۰۰۷۶	۱	۰/۰۰۷۶	۰/۱۹	۰/۶۷۱۹
A^2	۰/۵۶	۱	۰/۵۶	۱۳/۶۷	۰/۰۰۲۱
B^2	۰/۰۴۲	۱	۰/۰۴۲	۱/۰۳	۰/۳۲۶۱
C^2	۰/۲۳	۱	۰/۲۳	۵/۶۳	/۰۳۱۵
D^2	۰/۲۵	۱	۰/۲۵	۶/۱	۰/۰۲۶
باقی مانده	۰/۶۲	۱۵	۰/۰۴۱		
عدم برازش	۰/۴۹	۱۰	۰/۰۴۹	۱/۹۹	۰/۲۳۱۳
خطای خالص	۰/۱۲	۵	۰/۰۲۵		
R^2: ۰/۹۰۲۲					

اثر متغیرهای مستقل بر تولید دکستران

در شکل ۱ در هر نمودار به‌طور مجزا اثر متقابل دو متغیر مستقل بر تولید دکستران نشان داده شده‌است، درحالی‌که بقیه متغیرها ثابت و در نقطه مرکزی در نظر گرفته شده‌اند. شکل ۱-الف اثر دمای گرمخانه‌گذاری و نسبت تلقیح *ل. مزنتروئیدس* به *ل. لاکتیس* بر مقدار تولید دکستران را نشان می‌دهد. با افزایش دما تا °C ۳۰ تولید دکستران افزایش، اما بالاتر از °C ۳۰ مقدار تولید کاهش یافت. چون از دمای بهینه رشد *لوکونوستوک* که تولیدکننده دکستران است فاصله گرفته و رشد *لاکتوکوکوس* که در دمای بالاتری می‌تواند فعالیت کند، بیشتر شد (amasaki *et al.*, 2003) باکتری‌های *لوکونوستوک مزنتروئیدس*، *لوکونوستوک سیتروووم* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* را از گوشت پخته فاسد شده جدا کردند و با کشت آن‌ها در دماهای مختلف به این نتیجه رسیدند که دمای رشد *لوکونوستوک* از *لاکتوکوکوس* پایین‌تر بوده و *لوکونوستوک* حتی در دمای °C ۱۰ هم رشد کرد. همچنین بیشترین تولید دکستران در نسبت تلقیح ۵۰:۵۰ *لوکونوستوک* به *لاکتوکوکوس* به دست آمد. با زیاد شدن نسبت *ل. مزنتروئیدس* به *ل. لاکتیس* به دلیل کاهش اثر هم‌افزایی تولید دکستران کمتر شد؛ که این مطابق با نتایج Boquien *et al.* (1988) بود که سرعت رشد *لوکونوستوک* و *لاکتوکوکوس* را در کشت خالص و مخلوط بررسی و مقایسه کردند.

مطابق شکل ۱-ب با افزایش دما تا °C ۴۰ به دلیل اینکه *ل. مزنتروئیدس* توان رشد در این دما را نداشت مقدار دکستران کاهش یافت. حداکثر تولید نیز در حدود زمان ۲۵ ساعت بود و با گذشت زمان مقداری از آن کم شد که این کاهش می‌تواند به این دلیل باشد که با اتمام منبع کربنی، باکتری‌ها از اگزوپلی‌ساکاریدها به‌عنوان منبع کربن استفاده کرده باشند (Welman, 2014). در این رابطه Pham *et al.* (2000) طی مطالعه‌ای تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط *لاکتوباسیلوس رامنسوس* و تجزیه آنزیمی آن در طول تخمیر طولانی‌مدت را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک با اتمام منبع کربنی، با تولید آنزیم‌های گلوکوهیدرولاز، اگزوپلی‌ساکاریدها را تجزیه و از آن به‌عنوان منبع کربن استفاده کردند.

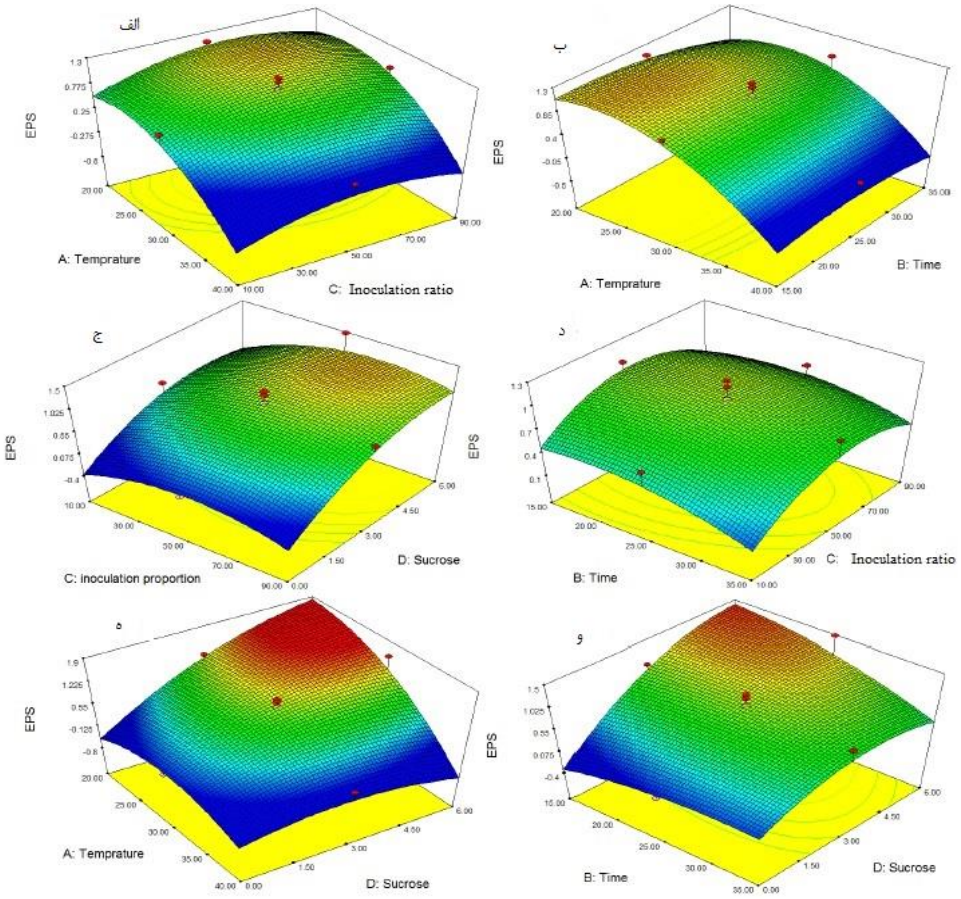
شکل ۱- ج اثر متقابل نسبت تلقیح و درصد ساکارز را نشان می‌دهد، که با افزایش مقدار ساکارز به‌عنوان پیش‌ماده آنزیم دکستران سوکراز، تولید دکستران هم افزایش یافت. همان‌طور که پیداست مقدار دکستران با افزایش مقدار ساکارز روند صعودی داشت اما عامل محدودکننده در تحقیق حاضر خصوصیات حسی و طعم فرآورده تولید شده بود که در مقادیر بالاتر ساکارز، طعم شیرین غالب شده و محصول از نظر حسی مطلوبیت خود را از دست داد.

بر اساس شکل ۱-د که اثر زمان و نسبت تلقیح را نشان می‌دهد نیز نقطه مرکزی این فاکتورها یعنی زمان ۲۵ ساعت و نسبت *ل. مزنتروئیدس* به *ل. لاکتیس* ۵۰:۵۰ شرایط بهینه و مطلوب تولید دکستران بود.

شکل ۱-ه اثر دمای گرمخانه‌گذاری و درصد ساکارز بر تولید دکستران در مقادیر ثابت زمان گرمخانه‌گذاری و نسبت تلقیح *ل. مزنتروئیدس* به *ل. لاکتیس* را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل بیشترین مقدار دکستران در دمای °C ۲۵ و مقدار شکر ۶ درصد تولید شد. بر اساس نتایج Onilude *et al.* (2013) که اثر شرایط کشت بر تولید دکستران توسط *ل. مزنتروئیدس* در یک محیط کشت انتخابی را بررسی کردند نیز دمای بهینه

گرمخانه‌گذاری برای تولید دکستران $^{\circ}C$ ۲۵ بود.

مطابق شکل ۱-و که اثر متقابل زمان گرمخانه‌گذاری و درصد ساکارز را نشان می‌دهد با افزایش مدت‌زمان گرمخانه‌گذاری تا ۲۵ ساعت مقدار دکستران افزایش یافته اما پس از آن افزایشی مشاهده نشد. همچنین با افزایش درصد ساکارز افزوده شده در دما و نسبت تلقیح ثابت، مقدار دکستران تولید شده نیز روند افزایشی داشت. Majumder *et al.* (2009) تولید دکستران در یک محیط کشت را توسط روش سطح پاسخ بهینه سازی کردند. آنان در طول بهینه سازی مقدار ۱ تا ۶ درصد ساکارز را مورد بررسی قرار دادند که طبق یافته‌های آن‌ها غلظت بهینه ساکارز ۵ درصد بود و در شرایط بهینه ۱/۲ درصد دکستران تولید شد.



شکل ۱. اثر متغیرهای مستقل بر تولید اگزوپلی‌ساکارید (دکستران)

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق پس از بهینه سازی تولید دکستران در نوشیدنی لبنی تخمیری دمای گرمخانه‌گذاری $^{\circ}C$ ۲۵، زمان تخمیر ۲۰ ساعت، نسبت تلقیح ۵۰:۵۰ *ل. مزنتروئیدس* به *ل. لاکتیس* و مقدار ۴/۵ درصد ساکارز به‌عنوان شرایط بهینه توسط نرم‌افزار معرفی شدند. بر طبق نتایج به‌دست‌آمده مقدار ساکارز و دمای تخمیر بیشترین اثر را در تولید اگزوپلی‌ساکارید در محیط شیر داشتند. مقدار ۱/۶ درصد به‌عنوان درصد تولید دکستران در شرایط بهینه توسط مدل پیش‌بینی شد که با توجه به آزمون‌های تأییدی انجام شده در شرایط بهینه مشخص شد که مقادیر دکستران تولیدشده در آزمون تجربی با پیش‌بینی مدل ارائه شده نتایج نزدیکی داشت. با توجه به اینکه شیر محیط مناسبی برای رشد باکتری های اسید لاکتیکی است استفاده از این باکتری ها که توانایی تولید اگزوپلی ساکارید داشته باشند می تواند گزینه مناسبی جهت بهبود خصوصیات بافتی و سلامتی بخشی محصولات لبنی تخمیری باشد. همچنین پیشنهاد می شود که تولید دکستران توسط *ل. مزنتروئیدس* در نوشیدنی هایی که ساکارز جزئی از فرمولاسیون آنها است و به دلیل مطلوب بودن طعم شیرین در آنها نسبت به تحقیق حاضر مقدار ساکارز بیشتری می توان افزود نیز مورد بررسی قرار گیرد.

REFERENCES

Ai, L., Zhang, H., Guo, B., Chen, W., Wu, Z., & Wu, Y. (2008). Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W. *Carbohydrate Polymers*, *74*(3), 353-357.

Azarikia, F., & Abbasi, S. (2010). On the stabilization mechanism of Doogh (Iranian yoghurt drink) by gum tragacanth. Food Hydrocolloids, 24(4), 358-363.

Bellengier, P., Richard, J., & Foucaud, C. (1997). Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. *Journal of Dairy Science*, *80*(8), 1520-1527.

Boquien, C. Y., Corrieu, G., & Desmazeaud, M. J. (1988). Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 in pure and mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(10), 2527-2531.

Duenas, M., Munduate, A., Perea, A., & Irastorza, A. (2003). Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *87*(1), 113-120.

Enikeev, R. (2012). Development of a new method for determination of exopolysaccharide quantity in fermented milk products and its application in technology of kefir production. *Food Chemistry*, *134*(4), 2437-2441.

Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., & Morita, H. (2003). Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(6), 3668-3671.

Hassan, A. N., Ipsen, R., Janzen, T., & Qvist, K. B. (2003). Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, *86*(5), 1632-1638.

Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, *14*(6), 467-494.

Joudaki, H., Mousavi, M., Safari, M., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., & Gharibzahedi, S. M. T. (2013). Scrutinizing the different pectin types on stability of an Iranian traditional drink "Doogh". *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 375-382.

Kiani, H., Mousavi, M. E., & Mousavi, Z. E. (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.

Koksoy, A., & Kilic, M. (2004). Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. *Food hydrocolloids*, 18(4), 593-600.

Mende, S., Peter, M., Bartels, K., Dong, T., Rohm, H., & Jaros, D. (2013). Concentration dependent effects of dextran on the physical properties of acid milk gels. *Carbohydrate Polymers*, *98*(2), 1389-1396.

Mende, S., Rohm, H., & Jaros, D. (2016). Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal*, 52, 57-71.

O'sullivan, L., Ross, R. P., & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84(5), 593-604.

Onilude, A. A., Olaoye, O., Fadahunsi, I. F., Owoseni, A., Garuba, E. O., & Atoyebi, T. (2013). Effects of cultural conditions on dextran production by *Leuconostoc spp*. *International Food Research Journal*, *20*(4).

Özer, B. H., & Kirmaci, H. A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, *63*(1), 1-15.

Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., & Cerning, J. (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(6), 2302-2310.

Purama, R. K., & Goyal, A. (2008). Identification, effective purification and functional characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Bioresource Technology*, *99*(9), 3635-3642.

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, *12*(2), 163-171.

Samaržija, D., Antunac, N., & Havranek, J. L. (2001). Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo*, *51*(1), 35-48.

Shao, L. I., Wu, Z., Zhang, H., Chen, W., Ai, L., & Guo, B. (2014). Partial characterization and immunostimulatory activity of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* KF5. *Carbohydrate Polymers*, *107*, 51-56.

Stiles, M. E. (1994). Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *Journal of Dairy Science*, 77(9), 2718-2724.

Teimouri, S., Abbasi, S. and Scanlon, M. G. (2017), Stabilisation mechanism of various inulins and hydrocolloids: Milk–sour cherry juice mixture. *Int J Dairy Technol*. doi:10.1111/1471-0307.12376.

Welman, A. D. (2014). Exopolysaccharides from fermented dairy products and health promotion. *Advances in Fermented Foods and*

fermentation kinetics. *Journal of Dairy Science*, *98*(3), 1604-1624.

Majumder, A., Bhandari, S., Purama, R. K., Patel, S., & Goyal, A. (2009). Enhanced production of a novel dextran fromLeuconostoc mesenteroides NRRL B-640 by Response Surface Methodology. *Annals of Microbiology*, *59*(2), 309-315.

Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits, 23.

Yilmaz, M. T., Dertli, E., Toker, O. S., Tatlisu, N. B., Sagdic, O., & Arici, M. (2015). Effect of in situ exopolysaccharide production on physicochemical, rheological, sensory, and microstructural properties of the yogurt drink ayran: An optimization study based on