Archive of SID

مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۹ شماره ۳/ سال ۱۳۹۸/ صفحات ۸۵ تا ۹۷

تأثیر شربت کامبوجا بر زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و خواص کیفی دوغ

شهین زمردی[1*] و لیلا کیانفر[2]

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/٤

[1] دانشیار بخش تحقیقات فنی و مهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه

[2] دانشجوی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه

[*] مسئول مکاتبات: Email: s.zomorodi@areeo.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: شربت کامبوجا ارتباط همزیستی بین مخمرها و باکتری اسید استیک است که با فعالیت متابولیک آنها در چای شیرین، به تولید نوشیدنی ترش دلپذیر با ترکیبات مفید و سلامت بخش منجر می‌شود. هدف در این تحقیق بررسی تأثیر شربت کامبوجا بر زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و خواص کیفی دوغ در طول نگهداری با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) بود. **روش کار:** مقدار شربت کامبوجا در محدوده ۲۰-۰ درصد و و زمان نگهداری در محدوده ٤۱-۵ روز بود. بر روی نمونه‌های دوغ تولیدی، آزمایش‌های شمارش تعداد *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و مقادیر ماده خشک، دانسیته، pH، دوفاز شدن، اندیس‌های رنگ و خواص حسی انجام گرفت. **نتایج:** نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که تعداد *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با افزایش غلظت شربت کامبوجا افزایش و با گذشت زمان نگهداری کاهش یافت ($P<0/05$). همچنین با افزایش مقدار شربت کامبوجا دو فاز شدن و pH بطور معنی‌داری کاهش، اما ماده خشک، پایداری و دانسیته دوغ افزایش پیدا کرد ($P<0/05$). با گذشت زمان نگهداری پایداری، دانسیته، pH و امتیاز پذیرش کلی کاهش و دو فاز شدن افزایش نشان داد ($P<0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** بر اساس نتایج بدست آمده، شرایط بهینه برای تولید دوغ پروبیوتیک، مقدار شربت کامبوجا حدود ۲۰ ٪ و زمان نگهداری ۲۳ روز تعیین شد. در شرایط بهینه، تعداد *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ۷/۲ سیکل لگاریتمی، دانسیته، ماده خشک و دو فاز شدن به ترتیب ۱/۰۲۵، ۸/۱ ٪ و ۲۳ ٪، اندیس‌های *L، *a و *b به ترتیب ۹۲/٦، ۵/٤ و ۵/۳ و امتیاز پذیرش کلی ٤/۵ از ۵ بود.

واژگان کلیدی: *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، پروبیوتیک، شربت کامبوجا، دوغ، روش سطح پاسخ

مقدمه

شربت کامبوجا از تخمیر چای و شکر و همزیستی باکتری‌های اسید استیکی (*استوباکتر زایلینوم، استوباکتر استی و گلوکونوباکتر اکسیدنس*) و مخمر (*ساکارومایسس، زیگوساکارومایسس، ترولوپسیس، پیشیا و برتانومایسس*) به دست می‌آید (سانتوز-جینور و همکاران ۲۰۰۹). ساکارز موجود در چای توسط مخمرها به گلوکز و فروکتوز هیدرولیز می‌شود. سپس گلوکز در ابتدا بوسیله مخمرها به اتانول و دی اکسیدکربن تبدیل شده و در مرحله بعد اتانول توسط استوباکترها به اسید استیک تبدیل می‌شود. غلظت اتانول در کومبوجا به ندرت به بیش از یک درصد

www.SID.ir

Archive of SID

می‌رسد، در حالی‌که اگر مدت زمان تخمیر طولانی شود مقدار اسید استیک می‌تواند به ۳ درصد نیز افزایش یابد. اما به طور معمول مقدار اسید استیک کمتر از یک درصد است (سریرامولو و همکاران ۲۰۰۰). چای سبز و سیاه بهترین سوبسترا برای تولید استیک اسید و گلوکونیک اسید است. پلی فنول‌های چای (اپی گالوکاتچین گالات، اپی کاتچین، اپی گالوکاتچین، تئوفیلین) و اسیدهای آلی اجزای فعال در نوشیدنی چای کومبوجا هستند که اثرات گسترده مفیدی دارند (دیوفریسین و فارنورت ۲۰۰۰). طی فرآیند تخمیر و اکسیداسیون، مجموعه قارچ و مخمر، از قند تغذیه نموده و در مقابل مواد با ارزشی نظیر اسیدهای لاکتیک، استیک، گلوکونیک و گلوکورونیک، اتانول، گلیسرول، ویتامین‌های ب و ث، آمینواسیدها، مواد آنتی‌بیوتیکی و سایر فرآورده‌ها را تولید می‌نمایند (جایابالان و همکاران ۲۰۱۳).

از آنجا که میکروارگانیسم‌های موجود در کومبوجا جزو میکروارگانیسم‌های مفید هستند و مقاومت بالایی خصوصاً در شرایط اسیدی دارند، می‌توانند در دستگاه گوارش جایگزین میکروارگانیسم‌های مضر شوند، بنابراین نوشیدنی کومبوجا را می‌توان در زمره محصولات با خواص پروبیوتیکی و فرآسودمند به حساب آورد (دیوفریسین و فارنورت ۲۰۰۰). از خواص سلامت بخشی شربت کامبوجا می‌توان به تقویت سیستم ایمنی بدن، افزایش هضم مواد غذایی، پیشگیری از سرطان، کاهش چربی خون و جلوگیری از بیماری-های قلبی اشاره کرد (دیوفریسین و فارنورت ۲۰۰۰). همچنین درمان کبد چرب، کاهش علایم دیابتی، کاهش وزن، کاهش فشار و کلسترول خون، کاستن درد آرتروز و تمیز کردن کیسه صفرا نیز از سایر مزایای چای کومبوجا می‌باشد (دیوفریسین و فارنورت ۲۰۰۰). شربت کامبوجا را می‌توان در برخی از سایر انواع چای یا نوشابه‌های غیر الکلی مانند کوکا، آب پنیر و لاکتوز استفاده کرد (لونچار و همکاران ۲۰۰۶). اسپاسنیجا و همکاران (۲۰۱۲) امکان کشت کامبوجا با دو نوع چای سیاه و چای آویشن[1]را در ترکیب با پروبیوتیک‌ها برای تخمیر شیر در دماهای مختلف مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد که تلقیح کشت کامبوجا با انواع چای‌های مختلف می‌تواند برای شیر و محصولات تخمیری در ترکیب با کشت آغازگر پروبیوتیک استفاده شود. دماهای مختلف تخمیر اثر قابل توجهی بر ویژگی‌های شیمیایی محصولات لبنی تخمیری نداشت. اما نوع چای تاثیر قابل توجهی بر ویژگی‌های بافتی محصولات لبنی تخمیری داشت. ویو و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی شرایط بهینه در تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط قارچ کامبوجا گزارش کردند مقدار شکر قهوه‌ای و سطح تلقیح بر تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط قارچ کامبوجا موثر است. شرایط بهینه تولید، ۲۸۰ گرم بر لیتر شکر قهوه‌ای، ٤ گرم بر لیتر پوره چای و ۱ گرم بر لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات[2] دست آمد. تحت این شرایط، مقدار اگزوپلی‌ساکارید تولیدی بعد از ٥ روز ۲/٥٥ گرم بر لیتر بود.

امروزه با توجه به افزایش سطح آگاهی مردم و اهمیت مسائل تغذیه‌ای و رژیم غذایی و متعاقب آن مشخص شدن اثرات زیان بخش نوشابه‌های گازدار و پرکالری و تأثیر مستقیم آن بر شیوع بیماری‌های مزمن نظیر چاقی و دیابت، تولید صنعتی دوغ رواج زیادی یافته تا آنجا که طی چند سال اخیر مصرف آن در ایران حدود ٤٠ درصد افزایش پیدا کرده است. دوغ به عنوان محصول لبنی اسیدی و بومی ایران، سهم بزرگی از صنعت نوشیدنی را در این کشور به خود اختصاص داده است (جانداکی و همکاران ۲۰۱۳). از طرفی نوشیدنی‌های لاکتیکی از جمله دوغ حامل مناسبی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به بدن انسان است. اما اکثر پروبیوتیک‌ها به دلیل pH پایین و اسیدیته بالای فرآورده‌های تخمیری، قادر نیستند به سرعت در آن‌ها رشد کنند (شاه و همکاران ۲۰۰۱)؛ لذا مطالعات زیادی با

[1] *Thymus serpyllum* (thyme tea)
[2] KH_2PO_4

www.SID.ir

Archive of SID

هدف غنی‌سازی این محصولات با مکمل‌هایی که بتوانند رشد پروبیوتیک‌ها را تسریع کنند انجام گرفته است.

در این تحقیق با توجه به مزایای شربت کامبوجا بر سلامت مصرف کنندگان، هدف بررسی تأثیر شربت کامبوجا بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و خواص کیفی دوغ (pH، ماده خشک، دانسیته، دوفاز شدن، اندیس‌های رنگ و خواص حسی) در طول نگهداری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شیر از دامداری ارومیه (ویژگی‌های شیر عبارت است از: چربی ۳/۳ ٪، پروتئین ۳/۱٦ ٪، ماده خشک ۱۱/٤ ٪ و pH برابر ٦/٦٤)، استارتر تجاری ماست حاوی گونه‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* از شرکت DSM استرالیا، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* از شرکت کریستن هانسن دانمارک بصورت پودر خشک شده انجمادی (DVS)، قارچ کامبوجا محیط کشت RCA [1] ساخت شرکت لیوفیلیکوم ایتالیا، گازپک بی‌هوازی A و آب پپتونه ازشرکت مرک آلمان تهیه شد.

روش تهیه شربت قارچ کامبوجا

حدود ۵۰ گرم چای سیاه، ۵۰۰ میلی لیتر آبجوش و ۱٦۰ گرم شکر در یک قوری چینی ریخته شد و محتویات تا حل شدن کامل شکر همزده شد. چای شیرین شده به مدت ۱۰ دقیقه دم گذاشته شد. سپس در یک ظرف شیشه‌ای صاف گردید و حجم آن به ۲ لیتر رسانده شد. پس از سرد شدن ۲۰۰ میلی لیتر شربت کامبوجا افزوده شد. سپس قارچ کامبوجا (شرکت قارچ ایران زمین، تهران) به آرامی درون ظرف قرار گرفت. لازم است حدوداً ۵ سانتی‌متر از سر ظرف خالی باشد. سپس درب ظرف با پارچه از جنس الیاف طبیعی، پوشانده شد و با کش محکم گردید. در نهایت ظرف در تاریکی، در دمای ۲۸-۲۳ °C به مدت ۱۰-۷ روز قرار داده شد تا تکثیر قارچ انجام شود و شربت کامبوجا آماده شود. در نهایت شربت کامبوجا صاف و مورد استفاده قرار گرفت (بلانچ ۱۹۹٦). ویژگی‌های شربت کامبوجا مصرفی عبارت از بریکس ۸/۵، اسیدیته بر حسب اسید استیک ۰/۸۸٪ و pH برابر ۲/۸۹ بود.

طرح آزمایشی و تیمار آماری

در این تحقیق، از روش سطح پاسخ (RSM)[1] و از طرح مرکب مرکزی وجه (CCF) [2]استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل میزان شربت کامبوجا و زمان نگهداری در ۳ سطح بود. سطوح متغیرها در جدول ۱ آمده است. تعداد نمونه‌های آزمایشی برابر ۱۳ عدد بود که در این میان ۵ آزمون تکرار در نقطه مرکزی بود و از این نقاط برای تعیین خطای آزمایش استفاده شد. داده‌ها توسط نرم افزار SAS ۹/۲ مدل‌سازی شد. آنالیز رگرسیون با مدل درجه دوم زیر انجام گرفت:

$$Y= \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

در این فرمول Y پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 ضریب ثابت، β_1 و β_2 اثرات خطی، β_{11} و β_{22} اثر مربعات و β_{12} اثر متقابل می‌باشد.

جدول ۱- سطوح متغیرها

Table 1- Variable levels

Factors	quantities		
	-1	0	+1
Kombucha syrup (%)	0	10	20
Storage time (day)	5	23	41

روش تهیه دوغ

شیر در دمای ۸۵ °C، به مدت ۱۵ دقیقه در حال هم زدن آرام، در حمام آب گرم پاستوریزه گردید. پس از خنک شدن تا دمای ٤۳ °C، با استارتر ماست و پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* تلقیح شد (لازم به توضیح است که بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، هربسته از باکتری‌های DVS، برای یک تن محصول است تا در محصول نهایی جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در حدود 10^7 Cfu/g بدست آید) و تا رسیدن به pH=٤/۵

[1] Reconstituted Clostriadial Agar

[1]Responese Surface Methodology (RSM)
[2]Central Facecompusite Designe(CCF)

www.SID.ir

Archive of SID

گرمخانه گذاری گردید. پس از سرد کردن، به نسبت‌های مشخص از آب پاستوریزه حاوی نمک و شربت کامبوجا رقیق گردید. سپس دوغ به مقدار ۲۰۰ میلی لیتر در بطری‌ها پر شد. نمونه‌ها در دمای ٤°C به مدت ٤١ روز نگهداری شدند و در فواصل زمانی ٥، ٢٣ و ٤١ روز مورد آزمایش قرار گرفت.

شمارش *بیفیدباکتریوم بیفیدوم*

برای تهیه رقت اول، مقدار ۱ میلی لیتر نمونه همگن شده دوغ به ۹ میلی لیتر آب پپتون ۰/۱ ٪ استریل اضافه شد. سری رقت‌ها با اضافه کردن یک میلی لیتر از هر رقت به ۹ میلی لیتر آب پپتون ۰/۱ ٪ استریل تهیه شد. سپس در محیط RCA آگار به صورت پور پلیت کشت داده شد و تحت شرایط بی‌هوازی توسط گاز پک A در جار بی‌هوازی، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. سپس تعداد کلنی‌ها شمارش گردید (کراسکوپ و همکاران ۲۰۰۳).

بررسی خصوصیات کیفی دوغ

pH با استفاده از pH متر دیجیتال (متروهم ٦٩١، ساخت سویس) کالیبره شده با بافر تجاری ٤ و ٧ اندازه‌گیری شد. ماده خشک از طریق خشک کردن آون (ممرت، ساخت آلمان) در دمای ۱۰۳±۲ °C تا حصول وزن ثابت و دانسیته با استفاده از پیکنومتر تعیین شد (استاندارد ملی ایران شماره ٢٤٥٣). به منظور تعیین دو فاز شدن دوغ از لوله‌های مدرج ۵۰ میلی‌لیتری استریل استفاده شد. بدین صورت که مقدار ۵۰ میلی‌لیتر دوغ درون لوله‌ها ریخته و درب بندی شد و در ۵±۱ °C نگهداری گردید. در روزهای آزمون میزان دو فاز شدن آن بر حسب درصد تعیین شد (ابراهیم‌زادگان و زمردی ۱۳۹۳).

ارزیابی رنگ نمونه‌ها با تعیین فاکتورهای رنگ‌سنجی شامل b* (نشان دهنده طیف رنگی آبی تا زرد)، a* (نشان دهنده طیف رنگی سبز تا قرمز) و L* (نشان دهنده طیف سیاه تا سفید) با استفاده از روش رنگ سنجی دیجیتالی با دوربین المپیوس ۱۲ مگاپیکسل و نرم افزار image J انجام شد. عکس برداری از نمونه‌ها در داخل جعبه‌ای به ابعاد ۵۰×۵۰×۵۰ سانتی‌متری با زمینه‌ای به رنگ سفید انجام گرفت (زمردی ۱۳۹۱).

پذیرش کلی نمونه‌ها توسط گروه ارزیاب حسی با استفاده از آزمایش تمایل مصرف کننده و روش هدونیک ۵ نقطه‌ای توسط ۱۵ داور آموزش دیده از اعضای هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی تعیین شد. از هر تیمار تعداد ۱۵ نمونه یکسان تهیه و همراه با فرم مخصوصی که دارای مقیاس هدونیک ۵ نقطه‌ای بود به داوران داده شد تا با توجه به ذائقه خود فرم‌ها را تکمیل کنند. برای این منظور امتیاز ۵ برای کیفیت مطلوب و امتیاز ۱ برای کیفیت نامطلوب اختصاص داده شد. داوران برای شستشوی دهان خود در بین نمونه‌ها از آب استفاده کردند (زمردی، ۱۳۹۱).

نتایج و بحث

تاثیر تیمارها بر زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در دوغ

یکی از فاکتورهای بسیار مهم در فرآورده‌های پروبیوتیکی حفظ تعداد پروبیوتیک‌ها در طول نگهداری محصول می‌باشد. با توجه به نتایج تجزیه آماری داده‌ها، تاثیر خطی شربت کامبوجا و زمان نگهداری و تاثیر متقابل آنها بر زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). در شکل ۱ تاثیر شربت کامبوجا بر تغییرات تعداد باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در دوغ در طول نگهداری در دمای ۵±۱ °C آورده شده است. همان طور که از شکل ۱ مشخص است تعداد باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با افزایش شربت کامبوجا افزایش و با گذشت زمان نگهداری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$).

دلیل کاهش تعداد پروبیوتیک در طول نگهداری را می‌توان به حساسیت بیشتر این جنس نسبت به اکسیژن، اسیدیته بالا و pH پایین، نیاز به مکمل‌های

www.SID.ir

Archive of SID

رشد یعنی ازت آلی کوچک مولکول و ویتامین‌ها و نیاز به پتانسیل احیای پایین نسبت داد (کراسکوپ و همکاران ۲۰۰۳).

شکل ۱- تاثیر شربت کامبوجا بر تغییرات *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در دوغ در طول نگهداری.

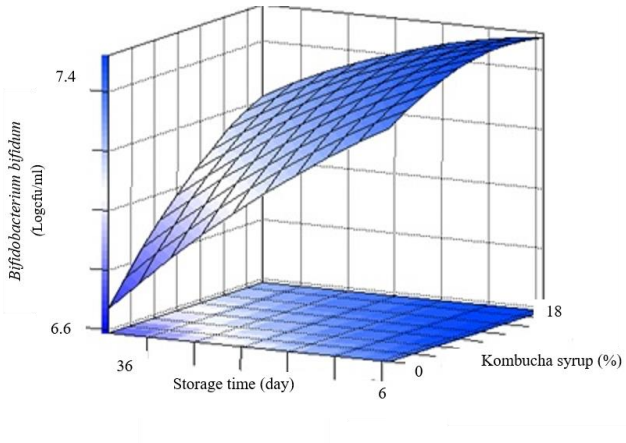


Figure 1- Effect of kombucha syrup on variability of *bifidobacterium bifidum* in doogh during storage

قابلیت زیستی و بقاء پروبیوتیک‌ها در فرآورده‌های غذایی در درجه اول اهمیت قرار دارد. در فرآورده‌های لبنی تخمیری، فاکتورهایی نظیر گونه مورد استفاده، شرایط کشت، اسیدیته نهایی، مواد جامد شیر، مواد مغذی موجود، اکسیژن محلول (بویژه برای بیفیدوباکتریوم)، سطح تلقیح و درجه حرارت آن و زمان تخمیر از مهمترین عوامل موثر بر بقاء پروبیوتیک‌ها می‌باشند.

ویندیرولا و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که pH=٤/٥ یا کمتر از آن تأثیر منفی بر زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در ماست، در دمای نگهداری ٥ °C داشت که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. تحقیقات گسترده نشان داده است، که تعداد باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی نگهداری سرد و در pH اسیدی، کاهش می‌یابد. بر طبق توصیه فدراسیون بین‌المللی لبنیات، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده و فعال تا انتهای تاریخ انقضای محصول حداقل باید Cfu/g ۱۰^۷ باشد. اگرچه این تعداد در استاندارد بین المللی ایران Cfu/g ۱۰^۶ و در برخی از منابع دیگر Cfu/g ۱۰^۹ –۱۰^۸ ذکر شده است.

راهکارهای بهبود زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک حین نگهداری عبارت از انتخاب گونه‌های مقاوم به اسید و صفرا، درصد تلقیح، ریزپوشانی و افزودن پری‌بیوتیک‌ها می‌باشد. در این تحقیق برای بهبود بقاء *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* از شربت کامبوجا به عنوان ترکیب پری‌بیوتیکی استفاده شد که افزایش آن موجب افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک گردید.

دلیل افزایش زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در اثر افزایش شربت کامبوجا را می‌توان چنین توجیح نمود که طی فرآیند تخمیر و اکسیداسیون در شربت کامبوجا، قارچ‌ها و مخمرها، قند را مصرف کرده و موادی با ارزش نظیر گلیسرول، برخی ویتامین‌های گروه B (B_1، B_2، B_6، B_{12}) و ویتامین C، برخی از مواد معدنی، اسیدهای آمینه و سایر فرآورده‌ها را در شربت کامبوجا تولید می‌کنند (جایابالان و همکاران ۲۰۱٤). احتمالاً بعضی از این ترکیبات از جمله ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه موجب حفظ زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در دوغ شده است (گومز و مالکاتا ۱۹۹۹). عدم برازش داده‌ها[1] بالاتر از ۰/۰۵ نشان دهنده درستی مدل است. ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده بالاتر از ۷۰ ٪ نشان دهنده این است که داده‌های آزمایش با مدل به خوبی تطبیق داشته و مدل دارای اهمیت بالایی است. با توجه به جدول ۲، در این بررسی، این ویژگی قادر است بطور رضایت بخشی تغییرات ویژگی‌های مورد آزمون را توجیه کند. مدل پیش‌بینی شده زیر، برای زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در دوغ، بر اساس پردازش داده‌ها بدست آمد که در آن A شربت کامبوجا و B زمان نگهداری است.

B. bifidum=7.56+0.003***A**-0.022***B**+0.0007***AB**

[1] Lack of Fit

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- عدم برازش داده‌ها،ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده پروبیوتیک و خواص کیفی

Table 2- Lack of Fit, R-square (R^2), Adjusted R-square (R^2_{Adj}) and Coefficient of Variation (CV) of probiotic and quality properties

Title	*B. bifidum*	Dry Matter	Density	Syneresis	pH
Lack of Fit	0.923	0.186	0.001	0.829	0.896
R^2	92.99	95.47	87.60	85.44	76.00
R^2_{Adj}	87.98	92.23	78.75	75.04	71.20
CV	1.237	2.803	0.169	6.77	0.668

تاثیر تیمارها بر تغییرات ماده خشک و وزن مخصوص

اثر خطی شربت کامبوجا بر ماده خشک و وزن مخصوص دوغ معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). همانطوری‌که از شکل ۲ مشخص است با افزایش مقدار شربت کامبوجا ماده خشک و وزن مخصوص بطور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۵). دلیل آن مربوط به بالا بودن بریکس شربت کامبوجا است. از آنجایی که در تولید شربت کامبوجا از شکر استفاده شده، در نتیجه بریکس آن در حدود ۸ است. لذا افزایش شربت کامبوجا موجب افزایش ماده خشک و وزن مخصوص نمونه‌های دوغ شده است. لازم به توضیح است که افزایش ماده خشک دوغ موجب افزایش وزن مخصوص و ویسکوزیته دوغ می‌گردد (جانداکی و همکاران ۲۰۱۳). اسپاسینیجا و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که ویژگی بافتی از جمله ویسکوزیته شیرهای تخمیری به طور قابل توجهی در نمونه تولید شده با شربت کامبوجا با چای سیاه بالاتر از نمونه کنترل بود. این نتایج تاثیر مثبت مواد تشکیل دهنده چای سیاه را بر روی ژل نمونه‌ها در طول نگهداری را نشان می‌دهد.

با توجه به جدول ۲ ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده ماده خشک و وزن مخصوص از ۷۰ ٪ بالاتر است اما فقط عدم برازش داده‌های ماده خشک غیرمعنی‌دار است. لذا مدل پیش بینی شده زیر، برای ماده خشک بدست آمد که در آن A شربت کامبوجا است.

Dry Matter= 6.225 + 0.099*A

تاثیر تیمارها بر تغییرات دوفاز شدن

به دلیل pH اسیدی در دوغ، پروتئین‌ها به نقطه ایزوالکتریک خود نزدیک شده و در نتیجه رسوب می‌کنند که این امر سبب ناپایداری و ایجاد حالت دو فازی، بعد از تولید و طی نگهداری می‌شود. در شرایط عادی، آب انداختن دوغ، ارزش غذایی آن را کم نمی‌کند ولی ظاهر طبیعی آن را نامطلوب می‌سازد (جانداکی و همکاران ۲۰۱۳).

نتایج خلاصه تجزیه واریانس نشان داد که تاثیر خطی شربت کامبوجا و زمان نگهداری بر دو فاز شدن معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). با توجه به شکل ۳، دو فاز شدن دوغ با افزایش شربت کامبوجا کاهش اما با گذشت زمان نگهداری افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۵).

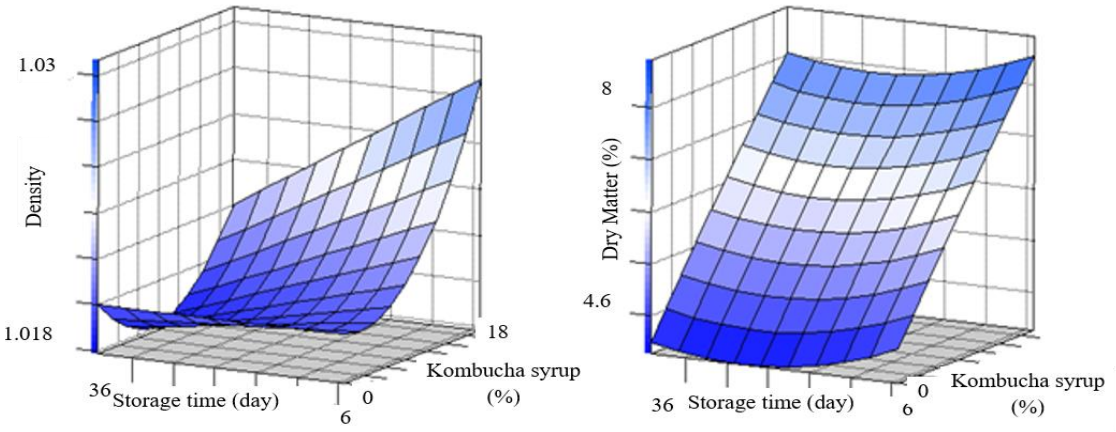
وو و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که قارچ کامبوجا قادر به تولید اگزوپلی‌ساکارید است و مقدار شکر بر تولید آن موثر است. از طرفی افزایش ماده خشک نیز موجب کاهش دو فاز شدن می‌گردد، لذا افزایش ماده خشک دوغ در اثر افزایش شربت کامبوجا و وجود اگزوپلی‌ساکاریدها در شربت، دلیل کاهش آب اندازی دوغ در اثر افزودن شربت کامبوجا می‌باشد. دلیل افزایش دو فاز شدن در طول نگهداری نیز احتمالاً در اثر تغییرات دما باشد که موجب کاهش پایداری فیزیکی دوغ شده است (اشمیدت و اسمیت ۱۹۹۲).

مدل پیش‌بینی شده زیر، برای دو فاز شدن در دوغ بر اساس پردازش داده‌ها بدست آمد که در آن A شربت کامبوجا و B زمان نگهداری است.

Syneresis=24.065-0.570***A**+ 0.161***B**+0.016***A**^{2}

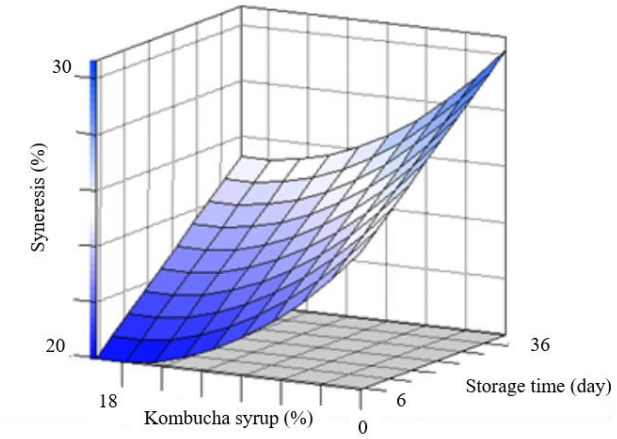
www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- تاثیر شربت کامبوجا بر تغییرات ماده خشک و وزن مخصوص دوغ در طول نگهداری

Figure 2. Effect of Kombucha syrup on dry matter and density of Doogh during storage



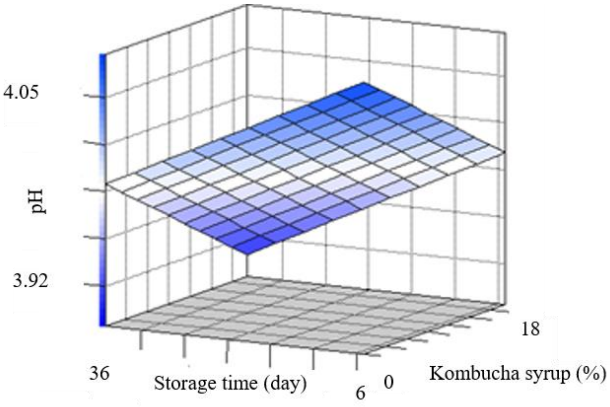
شکل ۳- تاثیر شربت کامبوجا بر تغییرات دوفاز شدن دوغ طول زمان نگهداری

Figure 3- Effect of kombucha syrup on syenersis of doogh during storage

تاثیر تیمارها بر تغییرات pH

نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که تاثیر خطی شربت کامبوجا و زمان نگهداری بر pH معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). همانطوری‌که از شکل ٤ مشخص است با افزایش شربت کامبوجا و با گذشت زمان نگهداری مقدار pH کاهش یافت (P<۰/۰۵).

دلیل کاهش pH در طول نگهداری را می‌توان چنین توجیه نمود که در طی نگهداری دوغ، استارترهای ماست (*لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس*) و پروبیوتیک‌ها حتی در دمای یخچال هم فعال هستند و با تخمیر لاکتور، اسید لاکتیک تولید می‌کنند (کایلاسپاتی ۲۰۰٦) در نتیجه pH کاهش و اسیدیته افزایش می‌یابد. از طرفی pH شربت کامبوجا در این تحقیق در حدود ۲/۸۹ بود. لای و همکاران (۱۹۹٦) نشان دادند که pH شربت کامبوجا در طول ٦ روز تخمیر از ٥ به ۲/٥ رسید.



شکل ۴- تاثیر شربت کامبوجا بر تغییرات pH دوغ در طول نگهداری

Figure 4- Effect of kombucha syrup on pH of doogh during storage

کاهش pH می‌تواند در اثر افزایش غلظت اسید استیک و مقدار کمی اسیدهای لاکتیک، گلوکونیک و گلوکورونیک تولید شده در اثر تخمیر توسط باکتری‌ها و مخمرهای موجود در قارچ چای باشد. اگر مدت زمان تخمیر طولانی شود مقدار اسید استیک می‌تواند به ۳ ٪ نیز افزایش یابد. اما به طور معمول مقدار اسید استیک کمتر از یک درصد می‌باشد (سرامالو و همکاران ۲۰۰۰). لذا

www.SID.ir

Archive of SID

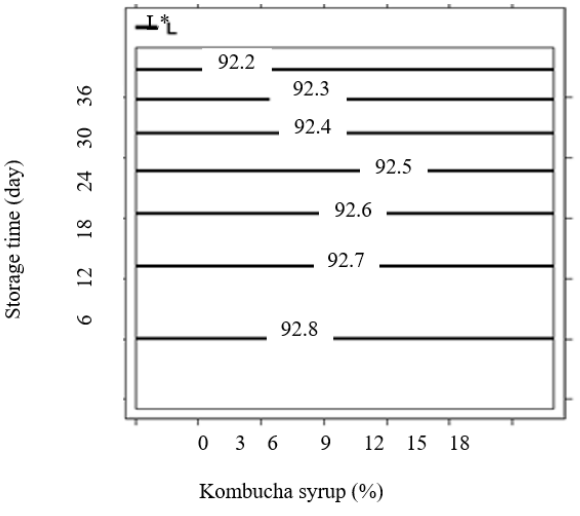
در اثر افزودن این شربت به دوغ کاهش pH امری واضح است.

مدل پیش‌بینی شده زیر، برای pH دوغ، بر اساس پردازش داده‌ها بدست آمد که در آن A شربت کامبوجا و B زمان نگهداری است.

$$pH=4.09 - 0.004*\mathbf{A} - 0.002*\mathbf{B}$$

اندیس‌های رنگ

رنگ غذا اولین پارامتر کیفی است که توسط مصرف کننده ارزیابی می‌گردد و در پذیرش محصول نقش اساسی دارد. رنگ به همراه طعم و بافت نقش مهمی در مقبولیت غذا ایفا می‌کند و اولین عاملی است که موجب افزایش جلب توجه مشتری می‌شود. در این تحقیق اندیس‌های رنگ نمونه‌ها تعیین شد. با توجه به نتایج تجزیه آماری داده‌ها فقط تاثیر مربعی زمان بر اندیس L* معنی‌دار بود اما تاثیر شربت کامبوجا بر این اندیس معنی‌دار نبود. همانطوری که از شکل ۵ مشخص است اندیس L* با گذشت زمان نگهداری کاهش یافت. مقدار کل پرتوهای برگشت داده شده با شاخص L*[1] مشخص می‌شود که شاخص روشنی ماده غذایی است.



شکل ۵- تاثیر شربت کامبوجا و زمان بر اندیس L* دوغ
Figure 5- Effect of kombucha syrup on L* of doogh during storage

افزایش در مقدار نورهای برگشتی موجب افزایش در سفیدی نمونه‌ها خواهد شد. دامنه L* از صفر تا ۱۰۰ است (میندازا و همکاران ۲۰۰۶). احتمالاً با گذشت زمان نگهداری، کاهش pH و رسوب پروئئین‌ها، مانع انعکاس نور شده و منجر به کاهش سفیدی نمونه‌ها گردیده است. همچنین نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که تاثیر خطی شربت کامبوجا بر اندیس b* و a* معنی‌دار بود ($P<0.05$).

با توجه به شکل ٦، افزایش شربت کامبوجا موجب کاهش اندیس b* و افزایش اندیس a* گردید. با توجه به اینکه پارامترها a* (از سبز تا قرمز) و b* (از آبی تا زرد) اجزای رنگی بوده که مرز دامنه آن‌ها نامحدود است ولی در اغلب مقالات محدوده آنها بین ۱۲۰ تا ۱۲۰- ذکر شده است (میندازا و همکاران ۲۰۰٦). بنابراین افزایش شربت کامبوجا موجب کاهش زردی و افزایش قرمزی نمونه‌های دوغ شده است.

به دلیل اینکه در تهیه شربت کامبوجا از چای سیاه استفاده شده و رنگ اصلی چای سیاه، قرمز است. زیرا در اثر تجزیه ترکیبات موجود در برگ چای از جمله کلروفیل‌ها، پروتئین‌ها، پکتین‌ها، قندها و ترکیبات فنلی در فرایند تخمیر، در چای سیاه، تئوفلاوین[2] و تئوروبیگین‌ها[3] در نسبت‌های مختلف تولید شده و در سطح چای تجمع می‌یابند. این ترکیبات بسته به درجه تخمیر موجب ایجاد رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای تا سیاه می‌شود (چاتیرویدیلا و پراکاش ۲۰۱۱). به همین علت افزودن شربت کامبوجا موجب افزایش اندیس a* (شدت رنگ قرمز) و کاهش اندیس b* شده است.

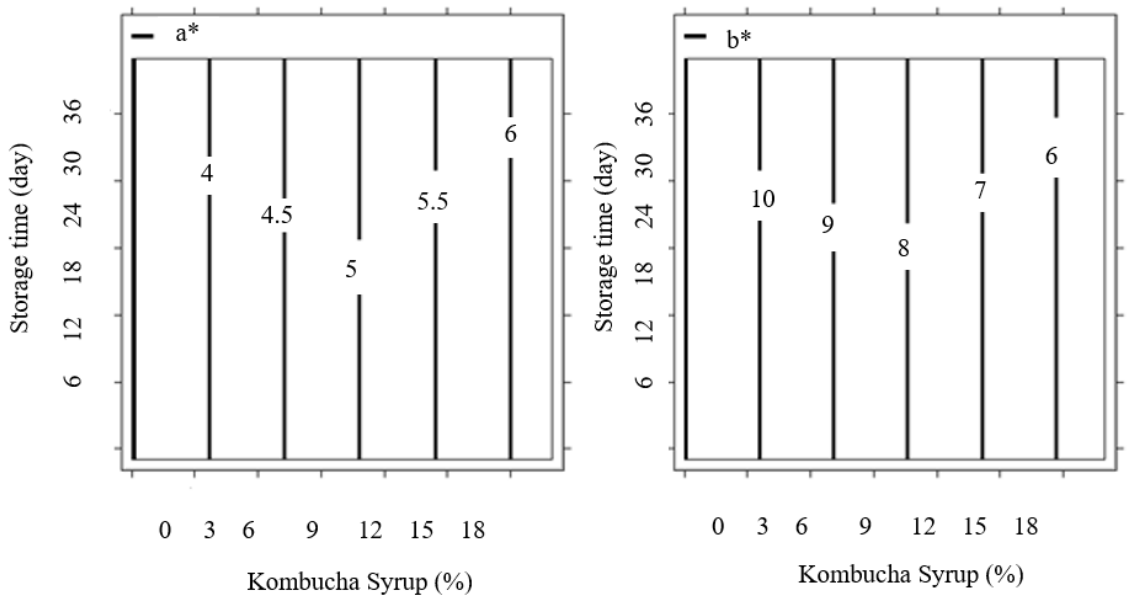
با توجه به جدول ۳، داده‌های اندیس‌های رنگ با مدل به خوبی تطبیق نداشته و مدل دارای اهمیت نمی‌باشد. لذا در این بررسی این ویژگی‌ها قادر نیستند بطور رضایت بخشی تغییرات ویژگی‌های مورد آزمون را توجیه کنند و در مرحله پیشگویی قابل استفاده نمی‌باشند.

[1] Lightness

[2] theoflavins
[3] thearubigins

www.SID.ir

Archive of SID



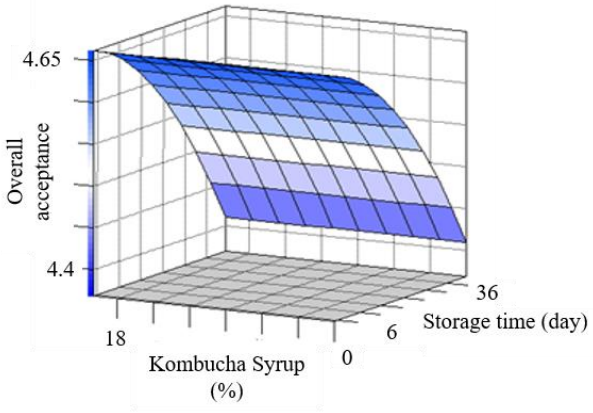
شکل ۶- تاثیر شربت کامبوجا و زمان نگهداری بر اندیس‌های a* و b* دوغ

Figure 6- Effect of kombucha syrup and storage time on b* and a* of doogh

جدول ۳-عدم برازش داده‌ها،ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده اندیس‌های رنگ و پذیرش کلی

Table 3 - Lack of Fit, R-square (R^2), Adjusted R-square (R^2_{Adj}) and Coefficient of Variation (CV) of color indexes and Overall acceptability

Title	b*	L*	a*	Overall acceptability
Lack of Fit	0.001	0.996	0.806	0.91
R^2	73.47	64.87	65.47	66.86
R^2_{Adj}	54.51	39.78	42.23	43.18
CV	6.77	1.069	5.83	7.91



شکل ۷-تاثیر کامبوجا و زمان نگهداری بر امتیاز پذیرش کلی دوغ

Figure 7- Effect of Kombucha syrup and storage time on overall acceptance of doogh

ارزیابی حسی

تاثیر مربعی زمان نگهداری بر امتیاز پذیرش کلی معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). با توجه به شکل ۷ امتیاز پذیرش کلی دوغ با گذشت زمان نگهداری کاهش یافت. زیرا رابطه مستقیمی بین فعالیت مخمرها، ترش شدن و بدطعم شدن دوغ وجود دارد که احتمالاً با گذشت زمان، در نتیجه فعالیت اندک مخمرها، متابولیت‌های جدیدی در دوغ حاصل می‌شود که منجربه ترش شدن، بدطعم شدن، تندمزه شدن و تلخ شدن دوغ می‌شود.

بهینه‌سازی

برای بهینه‌سازی، کانتور پلات‌های مختلف بر روی هم قرار گرفته و منطقه‌ای که مشخصات تمامی پاسخ‌ها را برآورده کرد، به عنوان منطقه بهینه معرفی گردید. مبنای بهینه‌سازی به حداکثر رساندن شربت کامبوجا، زمان نگهداری، ماده خشک و به حداقل رساندن مقدار جداسازی سرم بود. بر این اساس نقاط بهینه برای دوغ شامل مقدار شربت کامبوجا حدود ۲۰ ٪ و زمان

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری ۲۳ روز تعیین شد. در شرایط بهینه، تعداد *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ۷/٦ log cfu/g، وزن مخصوص، ماده خشک، دوفاز شدن و pH به ترتیب ۱/۰۲۵، ۸/۲۱ ٪، ۲۹ ٪ و ۳/۹۵ و امتیاز طعم ٤/٥ از ٥ بود.

نتیجه گیری کلی

با توجه به مدل تجربی به دست آمده توسط روش سطح پاسخ ارتباط بین متغییرهای مورد مطالعه مناسب تشخیص داده شد. بر اساس نتایج حاصله افزایش شربت کامبوجا موجب افزایش قابلیت زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* شد (P<۰/۰٥). همچنین با افزایش مقدار این شربت، مقدار دو فاز شدن و pH بطور معنی‌داری کاهش و ماده خشک، پایداری، دانسیته دوغ افزایش پیدا کرد (P<۰/۰٥). از طرفی شربت کامبوجا تاثیر منفی بر امتیاز پذیرش کلی دوغ نداشت. لذا می‌توان از شربت کامبوجا به مقدار ۲۰ ٪ با موفقیت در تهیه دوغ پروبیوتیک بهره برد.

منابع مورد استفاده

ابراهیم‌زادگان س و زمردی ش، ۱۳۹۳. زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (LAFTI-L10) و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (LAFTI-B94)و تاثیر آنها بر خواص کیفی و ریزساختاری دوغ. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲٤، ٤٥٤-٤٤۳.

بی نام، ۱۳۸۷. استاندارد ملی ایران، شماره۲٤٥۳. دوغ ساده- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

زمردی ش، ۱۳۹۱. ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی، رئولوژیکی و حسی ماست میوه‌ای غنی شده با فیبر گندم. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ٤، ٥٤۱-٥۳۱.

Blanc P J, 1996. Characterization of the tea fungus metabolites. Biotechnology Letters 18:139-142.

Cavusoglu K and Guler P, 2010. Protective effect of kombucha mushroom (KM) tea on chromosomal aberrations induced by gamma radiation in human peripheral lymphocytes in-vitro. Journal of Environmental Biology 31: 851-856.

Chaturvedula V S P and Prakash I, 2011. The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea . Journal of Medicinal Plants Research 5(11): 2110-2124.

Che-Chu S and Chen C, 2006. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. Food Chemistry 98: 502–507.

Dufresne C and Farnworth E, 2000. Tea, Kombucha, and health: a review. Food Research International 33 (6): 409-421.

Gomes M P and Malcata F X, 1999. Bifidobacterium spp. and *Lactobacillus aciduphilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science and Technology 10: 139-157.

Jayabalan R, Malbasa R V, Loncar E S, Vitas J S and Sathishkumar M, 2014. A Review on Kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 13: 538-550.

Joudaki H, Mousavi M, Safari M, Razavi S H, Emam-Dojmeh Z and Taghi Charibzahedi S M, 2013. Scrutinizing the different pectin types on stability of an Iranian traditional drink Doogh. International Journal Biological Macromolecules 6: 375-382.

Kailasapathy K, 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT 39: 1221–1227.

Krasaekoopt W, Bhandari B and Deeth H, 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal 13: 3–13.

www.SID.ir

Archive of SID

Liu CH, Hsu W H, Lee FL and Liao CC, 1996. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. Food Microbiology 13: 407-415.

Lončar E, Đurić M, Malbaša R, Kolarov Lj, Klašnja M, 2006. Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. Food Bioproducts Processing 84 (C3): 186-192.

Mendoza F, Dejmekb P and Aguileraa J, 2006. Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis. Journal of Postharvest and Biology and Technology 41(3): 285-295.

Santos Júnior R J, Batista R A, Rodrigues S A, Xavier Filho L and Lim A S, 2009. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kombucha Colonies. Journal of Microbial & Biochemical Technology 01(01): 72-78.

Schmidt K A and Smith D E, 1992. Milk reactivity of gum and milk protein solutions. Journal of Dairy Science 75: 3290-3295.

Shah N P, 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. Food Technology 55: 46-53.

Spasenija M, Katarina K, Vladimir V, Dajana H, Mirela I, Marjan R and Maja M, 2012. Physicochemical and textural properties of kombucha fermented dairy products. African Journal of Biotechnology 11: 2320-2327.

Sreeramulu G, Zhu Y and Knol W, 2000. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(6): 2589-2594.

Vinderola C G, Costa G A, Regenhardt S and Reinheimer J A, 2002. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. International Dairy Journal, 12: 579–589.

Wu Y, Chen Q, Ruan H and He G, 2013. Optimization of liquid fermentation process for improved exo-polysaccharides production by kombucha ZJU1. Advance Journal of Food Science and Technology. 5: 217-224.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Kombucha syrup on the survival of *Bifidobacterium Bifidum* and quality indexes of Doogh

Sh Zomorodi[1*] and L Kianfar[2]

Received: April 18, 2018 Accepted: September 26, 2018

[1]Associate Professor, Department of Engineering Research, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Urmia, Iran
[2]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran
[*]Corresponding author: Email: s.zomorodi@areeo.ac.ir

Introduction: Kombucha syrup is obtained by fermentation of tea and sugar and the symbiotic coexistence of acetic acid bacteria and yeasts (Santos-Jinor et al. 2009). Kombucha syrup is considered as product with probiotic and functional properties. The health benefits of Kombucha syrup include boosting immune system, increasing digestion, cancer prevention, fat, blood pressure and cholesterol reduction, prevention of heart disease, treatment of fatty liver, reduction of diabetic symptoms and weight loss (Dufresne and Farnworth E 2000). Kombucha syrup can be used in some other types of tea or soft drinks such as coca, whey and lactose (Lončar et al. 2006). Spasenija et al. (2012) investigated the possibility of cultivating Kombucha with two types of black tea and thyme tea in combination with probiotics for fermenting milk at different temperatures. The results showed that inoculation of Kombucha culture with different types of tea in combination with probiotic starter culture can be used for milk and fermented products. Since the microorganisms present in Kombucha are highly beneficial and resistant especially in acidic conditions, they can replace harmful microorganisms in the gastrointestinal tract. Therefore, Kombucha beverage can be considered as a probiotic and functional product (Dufresne and Farnworth 2000). Regarding the benefits of Kombucha syrup for consumer's health, the aim of this study was to evaluate the effect of Kombucha syrup on the survival of *Bifidobacterium bifidum* as well as quality of Doogh during storage.

Materials and methods: Kombucha syrup was prepared by method described by Blanc (1996), and added to Doogh in the level of 0-20%. Doogh was prepared by the method described by Ebrahimzadegan and Zomorodi (2014). Then Doogh samples were kept at 4°C cold room for 41 days and were analyzed at intervals of 5, 23 and 41 days during storage. Count of *bifidobacterium* was performed in RCA agar culture medium under anaerobic conditions prepared by gas pack A in anaerobic jar and incubated at 37°C for 72 hours (Krasaekoopt et al. 2003). The pH was measured using a digital pH meter calibrated with commercial buffers of 4 and 7, dry matter was obtained by drying the samples in oven at 103 ± 2°C until a constant weight, density was measured using a picnometer (National Iranian Standard No. 2453) and syneresis of Doogh determined by the method descirbed by Ebrahimzadegan and Zomorodi (2014). The color evaluation of the samples was determined by determining colorimetric factors including b*, a*, and L* using digital colorimetric method and image J software (Zomorrodi, 2012). The overall acceptance of the samples was determined using consumer liking and preference experiment and 5-point Hedonic method by 15 trained panelists. For this purpose, the score of 5 represented the desirable quality and 1 indicated undesirable quality (Ebrahimzadegan and Zomorodi 2014).

Results and discussion: According to Fig.1, the number of *Bifidobacterium bifidum* bacteria increased by increasing Kombucha syrup and decreased during storage time ($P < 0.05$). The reason for the increase in the survival of *Bifidobacterium bifidum* by increasing level of Kombucha syrup can be such justified that during the fermentation and oxidation process of Kombucha syrup, the fungi and yeasts consumed sugar, and produced valuable substances such as glycerol, some B group

www.SID.ir

Archive of SID

vitamins (B_1, B_2, B_6, B_{12}) and vitamin C, some minerals, amino acids and other products (Jayabalan et al. 2014). Probably, some of these compounds, including vitamins and amino acids, have been caused to maintain survival of probiotic bacteria in Doogh (Gomez and Malcata 1999). The reason for the decrease in probiotic count during storage can be attributed to more sensivity of this genus to oxygen, high acidity and low pH, the need for growth supplements, namely small molecules organic nitrogen and vitamins, as well as, the need for low reduction potential (Krasaekooptet al. 2003). Vinderolaet al. (2002) reported that pH 4.5 or less had a negative effect on the survival of *bifidobacteriumbifidum* in yogurt stored at of 5 °C, which is in consistent with the results of this research. According to the recommendation of the International Dairy Federation, the number of live and active probiotic bacteria at the end of the expiration date of the product must be at least 10^7Cfu/g. Also, by increasing the level of Kombucha syrup, the dry matter and specific gravity increased significantly ($P < 0.05$). This is due to the high brix of the Kombucha syrup. Spasenija et al. (2012) reported that the viscosity of fermented milk produced with Kombucha syrup made of black tea was significantly higher than that of control sample. These results show the positive effect of black tea ingredients on sample gel during storage. Syneresis of Doogh decreased with increasing Kombucha syrup level ($P < 0.05$). Wu et al. (2013) reported that the Kombucha fungus is able to produce exopolysaccharide. Therefore, increase of dry matter of Doogh due to the increasing Kombucha syrup level and the presence of exopolysaccharides in the syrup, is the reason of the syneresis reduction in Doogh. Also, with increasing kombucha syrup level, the pH decreased ($P < 0.05$). Because in this research the pH of kombucha syrup was about 2.89. The pH reduction can be due to the increased concentration of acetic acid and a small amount of lactic acid, gluconic and glucuronic acids produced by bacteria and yeast in tea fungus (Sreeramulu et al. 2000). Also, due to the use of black tea in the production of the kombucha syrup, addition of this syrup to Doogh, caused to decrease yellowness and to increase redness. On the other hand, Kombucha syrup had no negative effect on overall acceptance score of Doogh.

Conclusion: According to the experimental model obtained by the response surface method, the correlation between the studied variables detected appropriate. The results of this research showed that, the optimum points for production of Doogh was determined kombucha syrup level 20% and storage time 23 days. In optimum conditions, the number of *Bifidobacterium bifidum*, 7.6 log cfu/g, specific gravity, dry matter, syneresis and pH were 1.025, 8. 21. 29% and 3.95 respectively. The score of overall acceptance was 4.5 of 5.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, Doogh, Kombucha syrup, Probiotic, Response Surface Methodology

www.SID.ir