بررسی تولید آب هویج بستنی پروبیوتیک با تلقیح دو تک‌سویه پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس کازئی*

هانیه غندالی[۱]، علیرضا شهاب لواسانی[۲*]، سارا موحد[۳]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، گروه علوم و صنایع غذایی، ورامین، ایران.

۲. مرکز تحقیقات فناوری های نوین تولید غذای سالم، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، گروه علوم و صنایع غذایی، ورامین، ایران.

***نویسنده مسئول:** *shahabam20@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۱/۰۲

چکیده

این تحقیق به‌منظور تولید فراورده پروبیوتیک آب هویج بستنی در یک طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل طراحی شد. بدین منظور، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (در سطوح 10^8 و 10^9 cfu/ml) به فرمولاسیون آب هویج بستنی اضافه و نمونه‌ها در دمای $-5\ ^{\circ}C$ به مدت ۲۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. در روزهای ۱، ۶، ۱۱ و ۱۶ انبارداری، بقاء باکتری‌ها،pH، اسیدیته، بتاکاروتن، مواد جامد کل، ترکیبات فنلی و درصد بازدارندگی DPPH اندازه‌گیری شدند. در طی زمان نگهداری، تعداد سلول‌های زنده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. بااین‌حال، تعداد *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* تا آخرین روز انبارداری در محدوده توصیه‌شده (cfu/ml 10^6) قرار داشت. بیشترین تعداد سلول‌های زنده مربوط به *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بود. با افزایش سطوح پروبیوتیک ها، میزان pH و درصد مواد جامد کل کاهش یافت. تیمارها و زمان نگهداری اثر معنی‌داری بر مقادیر اسیدیته آب هویج بستنی پروبیوتیک نداشتند.بیشترین میزان ترکیبات فنلی مربوط به 10^9 cfu/ml *لاکتوباسیلوس کازئی* و 10^8 *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بود. در طی دوره نگهداری، مقادیر ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی همه نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. افزایش *ل.کازئی* در فرمولاسیون فراورده موجب کاهش درصد بازدارندگی DPPH گردید، درحالی‌که با افزایش *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در نمونه‌ها، فعالیت ضد رادیکالی افزایش یافت. نمونه‌های حاوی 10^9 cfu/ml *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بیشترین میزان بتاکاروتن را داشتند. طبق آزمایش‌ها، تیمار آب هویج بستنی حاوی 10^9 cfu/ml *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به‌عنوان تیمار برتر معرفی گردید.

کلید واژه ها: آب هویج بستنی، پروبیوتیک، زنده‌مانی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

پیشرفت‌های اقتصادی و اجتماعی اخیر مشکلات زیادی برای سلامتی انسان‌ها ایجاد کرده است. تنش و مشغله زیاد بشر منجر به ایجاد بیماری‌هایی مانند حمله قلبی، فشارخون بالا، اختلالات روده‌ای و انواع مختلف سرطان‌ها شده است (kun et al., 2008). یکی از راه‌کارهای مؤثر در پیشگیری یا حذف این بیماری‌ها مصرف فرآورده‌های پروبیوتیک است که در کشورهای جهان به‌ویژه اروپا، آمریکا و ژاپن رواج چشمگیر یافته است، به‌طوری‌که بیش از ۹۰ فرآورده‌های پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدو باکتریوم بیفیدوم* در سرتاسر جهان تولید می‌شوند. در بسیاری از کشورهای اروپایی، آفریقای شمالی و آسیایی انواع گوناگونی از فرآورده‌های پروبیوتیک شامل شیرهای تخمیری، شیرهای تازه، ماست، دسرهای منجمد و پنیر در حال تولید و مصرف هستند. در دو سه دهه گذشته، فرآورده‌های تجاری پروبیوتیک عرضه‌شده به بازار از رشد جهشی برخوردار بوده‌اند (Granto et al., 2010). پروبیوتیک ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که دارای اثرات مفید در سلامت افراد می‌باشند. در بین پروبیوتیک ها *لاکتوباسیلوس*ها موردتوجه

بیشتری قرار دارند. مهم‌ترین اثرات مفید پروبیوتیک ها مربوط به خاصیت ضدعفونی‌های دستگاه گوارش، کاهش کلسترول سرم، بهبود سرطانی، ضد جهش‌زایی و ضداسهال، بهبود التهاب روده و توقف رشد باکتری *هلیکوباکترپیلوری* است (Yoon et al., 2006; Sanders et al., 2007; Pereira et al., 2011).

تولید آب‌میوه‌های پروبیوتیک اخیراً موردتوجه قرارگرفته است به‌طوری‌که، بسیاری از آن‌ها بانام تجاری شیره یا عصاره سلامت بخش عرضه می‌شوند. بنابراین، آب‌میوه به دلایل زیر از پتانسیل بالایی برای تبدیل‌شدن به محصول پروبیوتیک برخوردار است: (الف) مصرف آن توسط طیف وسیعی از مردم (ب) خواص حسی قابل‌قبول؛ (ج) عدم وجود ترکیبات ناسازگار (مانند لاکتوز). ازاین‌رو هدف از این تحقیق تولید آب هویج بستنی پروبیوتیک بوده است.

روش کار

در جداول ۱ لیست مواد مورداستفاده برای آماده‌سازی نمونه‌ها در این تحقیق آورده شده است. سوش های باکتری *بیفیدو باکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* از مجمع میکروبی ساختمان غذایی ایران تهیه شدند و سوسپانسیون‌های میکروبی بر اساس روش ارائه‌شده توسط (Daneshi et al., 2013) آماده گردیدند. هویج (واریته Nantes) برای هر تکرار از بازار میوه و تره‌بار خریداری شد و آب هویج‌ها توسط آب‌میوه‌گیری خانگی استخراج شدند. در مرحله بعد، آب هویج‌های حاصل در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند تا محلول شفافی به دست آمد (Bomba et al., 2002). مطابق فرمولاسیون، مخلوط بستنی حاوی ۱۰ درصد چربی شیر، ۱۵ درصد شکر، ۱۱/۵ درصد ماده جامد بدون چربی شیر، ۰/۳ درصد پانیسول (استبیلایزر-امولسیفایر) و ۳۵/۵ الی ۳۷ درصد ماده جامد کل بود. بستنی در داخل مخلوط‌کن ریخته شده و در مرحله بعد آب هویج به‌آرامی به آن اضافه‌شده و مخلوط شد. مخلوط حاصل در فشار ۲۰۰ بار و دمای ۵۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد هموژنیزه گردید و به ظروف شیشه‌ای درب دار ۲۵۰ سی‌سی منتقل‌شده و سپس در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد طی زمان یک دقیقه پاستوریزه و بلافاصله سرد شد (Singh et al., 2006)

جدول ۱- لیست مواد مورداستفاده برای تهیه نمونه‌ها

مواد اولیه	شرکت تولیدکننده	کشور تولیدکننده
هویج	-	ایران
پودر شیر خشک	پگاه	ایران
خامه	پگاه	ایران
شکر	بلورین	ایران
شیر گاو	دامداری لورک	ایران
استارتر لیوفیلیزه بیفیدوباکتریوم لاکتیس	مجمع میکروبی ساختمان غذایی	ایران
استارتر لیوفیلیزه لاکتوباسیلوس کازئی	مجمع میکروبی ساختمان غذایی	ایران
پانیسول	مهر اصفهان	ایران
محیط کشت MRS آگار	Quelab	کانادا

سلول‌های پروبیوتیک در شرایط استریل و به مقادیر بیان‌شده در جدول ۲ به مخلوط آب هویج بستنی اضافه گردیدند. سپس آب هویج بستنی‌ها به ظروف درب دار شیشه‌ای ۱۰۰ سی‌سی استریل منتقل‌شده تا برای هر بار آزمایش به‌طور تصادفی از آن‌ها استفاده گردد و در آخر نمونه‌ها به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل

شدند. طول دوره ماندگاری محصول ۱۶ روز تعیین‌شده و در طی این دوره به فاصله هر ۵ روز، آزمون‌های مربوطه انجام گرفت (Daneshi et al., 2013).

جدول ۲- تیمارهای مورد بررسی در این تحقیق

کدها	توضیحات
A	نمونه شاهد (غیر پروبیوتیک)
B	آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^8 cfu/ml *لاکتوباسیلوس کازئی*
C	آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^9 cfu/ml *لاکتوباسیلوس کازئی*
D	آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^8 cfu/ml *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*
E	آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^9 cfu/ml *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*

بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک

در ابتدا نمونه‌ها در محلول استریل رینگر رقیق‌شده و گونه‌های پروبیوتیک زنده توسط کشت پورپلیت بر روی محیط کشت MRS Agar ارزیابی شدند. *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* به ترتیب بر روی پلیت های حاوی MRS Agar و MRS Agar حاوی ml/l ۵ سیستئین هیدروکلراید کشت داده شدند. پلیت ها در ظروف دربسته به صورت بی‌هوازی گرمخانه گذاری گردیدند. برای کنترل شرایط بی‌هوازی، از یک شناساگر بی‌هوازی استفاده شد. پس‌ازآنکوباسیون ۷۲ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌ها شمارش‌شده و به صورت log cfu/ml بیان گردیدند (Daneshi et al., 2013).

اندازه‌گیری pH

اندازه‌گیری pH تیمارها با استفاده از دستگاه pH متر صورت گرفت. برای این منظور، دستگاه pH متر به ترتیب توسط محلول بافر pH=۴ و محلول بافر pH=۷ کالیبره شد. سپس، مقداری از نمونه در یک بشر خشک و تمیز ریخته شده و الکترود دستگاه pH متر درون آن قرار گرفت. دمای pH متر با توجه به دمای نمونه تنظیم شد. پس از ثابت شدن عدد، pH نمونه خوانده‌شده و ثبت گردید.

اندازه‌گیری اسیدیته

۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر تازه جوشیده و سرد شده به یک ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل‌شده و نمونه (۲۰ گرم)، به آن اضافه گردید. سپس شناساگر فنل فتالئین (به میزان ۰/۳ میلی‌لیتر فنل فتالئین برای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول نمونه) به آن افزوده و با محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال، تا ایجاد رنگ صورتی کم‌رنگ پایدار (به مدت ۳۰ ثانیه)، تیتر شد. میزان اسیدیته از طریق رابطه شماره (۱) محاسبه گردید:

رابطه (۱)
$$A = \frac{V \times 0.0064 \times 100}{m}$$

که در آن: V: حجم مصرفی هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال برحسب میلی‌لیتر؛ m: وزن نمونه برحسب گرم؛ A: اسیدیته کل برحسب اسیدسیتریک، برحسب گرم در صد گرم.

اندازه‌گیری مواد جامد کل (TSS)

یک بوته چینی تمیز و خشک در کوره الکتریکی با دمای ۵۲۵ درجه سلسیوس به وزن ثابت رسید. سپس خنک شده و به‌وسیله ترازوی حساس آزمایشگاهی توزین گردید. سپس مقدار مناسب نمونه، به بوته منتقل‌شده و درروی حمام آب گرم تبخیر شد. پس از آن، در آون خلاء با دمای ۷۰ درجه سلسیوس تحت‌فشار کمتر از ۲۵۰ میلی‌متر جیوه قرار گرفت تا

نمونه خشک شود. بوته از آون خارج‌شده و در دسیکاتور خنک شده و توزین گردید. این عمل آن‌قدر تکرار شد تا اختلاف دو توزین کمتر یا مساوی ۲ میلی‌گرم شد. سپس مقدار مواد جامد از رابطه شماره (۲) محاسبه گردید:

$$W_3 = \frac{(W_2 - W_1)\times 100}{m}$$ رابطه (۲)

که در آن:W_1: وزن بوته خالی برحسب گرم؛ W_2: وزن بوته با خاکستر برحسب گرم؛ m: وزن نمونه برحسب گرم؛ W_3: خاکستر کل برحسب درصد.

اندازه‌گیری محتوای فنول کل

محتوای فنول کل نمونه‌ها با استفاده از روش فولین-سیوکالتیو ارزیابی شد (Yoon et al., 2005). برای این منظور، ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق‌شده در نسبت ۱ به ۱۰۰ با متانول:آب (۴:۶) با ۱/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین-سیوکالتیو ۱۰ برابر رقیق‌شده و ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصدی مخلوط گردید. مخلوط حاصله به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ nm قرائت گردید. از اسید گالیک به‌عنوان استاندارد استفاده شد. در نهایت نتایج به صورت میلی‌گرم اکی والان اسید گالیک در ۱۰۰ گرم آب‌میوه (mg GAE/100g) بیان گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر طبق روش بیان‌شده توسط انجام گرفت (Brand-Williams et al., 1995). به‌طور مختصر، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه رقیق‌شده در نسبت ۱ به ۱۰۰ با متانول: آب (۶:۴) با ۲ میلی‌لیتر DPPH ۰/۱ میلی مولار در متانول مخلوط شد. مخلوط حاصله به‌شدت تکان داده‌شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه به حال خود گذاشته شد. جذب محلول حاصله در طول موج ۵۱۷ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رابطه شماره (۳) محاسبه شد:

Antioxidant activity (%) = {1-(sample 517 nm/control 517 nm)}× 100

اندازه‌گیری میزان بتا کاروتن

بتا کاروتن نمونه‌ها طبق روش (Chen et al., 1995) با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تعیین مقدار گردید. با قرار دادن سطح زیر منحنی نمونه‌های مجهول در منحنی کالیبراسیون (که با استفاده از استاندارد بتا کاروتن ترسیم شد) غلظت بتاکاروتن نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (Chen et al., 1995).

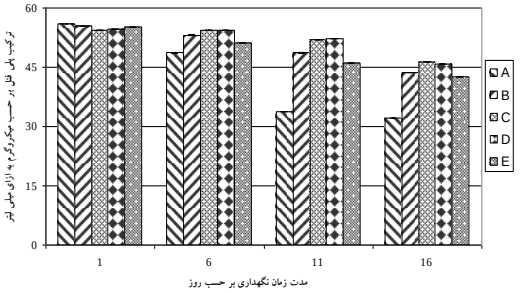
جهت تشخیص معنی‌دار بودن ($p<0.05$) یا عدم معنی‌داری ($p>0.05$) تیمارها از تجزیه واریانس دوطرفه استفاده‌شده و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. رسم نمودارها با نرم‌افزار Office Excel 2013 انجام شد.

نتایج

نتایج بررسی زنده‌مانی پروبیوتیک ها در آب هویج بستنی

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها بیان کرد که اثر تیمارهای مورداستفاده، زمان نگهداری و اثر متقابل تیمار در زمان‌بر لگاریتم تعداد پروبیوتیک ها در آب هویج بستنی ازلحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<0.05$). در شکل ۱، تغییرات میانگین لگاریتم تعداد پروبیوتیک ها در آب هویج بستنی طی زمان نگهداری ۱۶ روزه نشان داده‌شده است. همان‌طوری که در شکل مشاهده می‌شود، افزایش سطح پروبیوتیک های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* در نمونه‌های آب هویج بستنی اثر معنی‌داری بر لگاریتم تعداد پروبیوتیک ها در نمونه‌های تولیدی نداشت. از روز اول تا روز ششم تغییر معنی‌داری در لگاریتم تعداد پروبیوتیک ها در نمونه‌های آب هویج بستنی مشاهده نشد، ولی در طی روزهای پانزدهم تا شانزدهم، لگاریتم تعداد پروبیوتیک ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در کلیه روزهای موردبررسی، لگاریتم تعداد باکتری‌های پروبیوتیک

بیفیدوباکتریوم لاکتیس به‌طور معنی‌داری بالاتر از *لاکتوباسیلوس کازئی* بود. در روز پایانی نگهداری، تیمارهای D و E بیش ترین زنده‌مانی پروبیوتیک ها را داشتند و کمترین تعداد مربوط به تیمار C بود (شکل ۱).



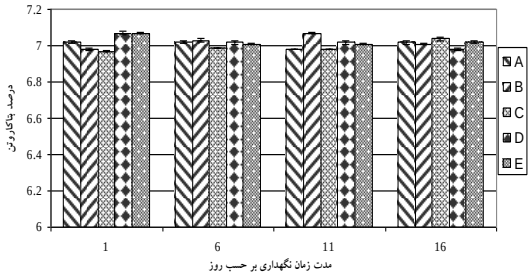
شکل ۲- تغییرات میانگین مقادیر ترکیبات پلی فنلی نمونه‌های آب هویج بستنی پروبیوتیک طی زمان نگهداری

*تیمار A: تیمار شاهد؛ تیمار B: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۸ *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار C: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۹ *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار D: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۸ *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*؛ و تیمار E: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۹ *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*

*تیمارها با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد می‌باشد.

نتایج بررسی محتوای بتاکاروتن آب هویج بستنی پروبیوتیک

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها بیان کرد که اثر تیمارهای مورداستفاده و اثر متقابل تیمار در زمان‌بر محتوای بتاکاروتن آب هویج بستنی ازلحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<0.05$)، ولی زمان نگهداری ازلحاظ آماری اثر معنی‌داری بر محتوای بتاکاروتن آب هویج بستنی نداشته است ($P>0.05$). در شکل ۳، تغییرات میانگین مقادیر بتاکاروتن نمونه شاهد و نمونه‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* طی زمان نگهداری ۱۶ روزه نشان داده‌شده است. همان‌طوری که در شکل مشاهده می‌شود، در روزهای ۱، ۶ و ۱۱، با افزایش سطح *لاکتوباسیلوس کازئی* در فرمولاسیون، محتوای بتاکاروتن کاهش یافت، درحالی‌که در روز آخر انبارداری، با افزایش سطح این باکتری پروبیوتیک در نمونه‌ها، میزان بتاکاروتن افزایش پیدا کرد. در کلیه روزهای موردمطالعه، افزایش سطح *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* اثر معنی‌داری بر محتوای بتاکاروتن آب هویج بستنی نداشت. در طی زمان نگهداری، میزان بتاکاروتن نمونه‌های مختلف موردبررسی کمی تغییر کرد. در روز آخر، بیشترین میزان بتاکاروتن مربوط به تیمارهای C و E بود، که محتوای بتاکاروتن بیشتری نسبت به نمونه شاهد داشتند. در این روز، تیمار D کمترین میزان درصد بتاکاروتن را داشت (شکل ۳).



شکل ۳- تغییرات میانگین مقادیر بتاکاروتن نمونه‌های آب هویج بستنی پروبیوتیک طی زمان نگهداری

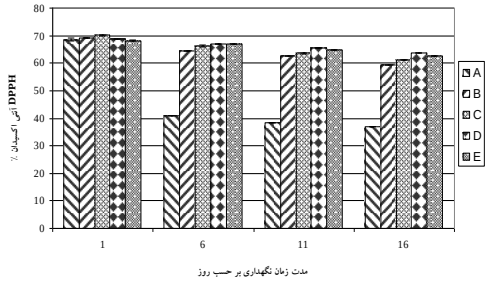
*تیمار A: تیمار شاهد؛ تیمار B: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۸ *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار C: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۹ *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار D: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۸ *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*؛ و تیمار E: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۹ *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*

*تیمارها با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد می‌باشد.

نتایج بررسی فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH آب هویج بستنی پروبیوتیک

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها بیان کرد که اثر تیمارهای مورد استفاده، زمان نگهداری و اثر متقابل تیمار در زمان‌بر میزان فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH آب هویج بستنی ازلحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<0.01$). در شکل ۴، تغییرات میانگین مقادیر فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH نمونه شاهد و نمونه‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* طی زمان نگهداری ۱۶ روزه نشان داده‌شده است.

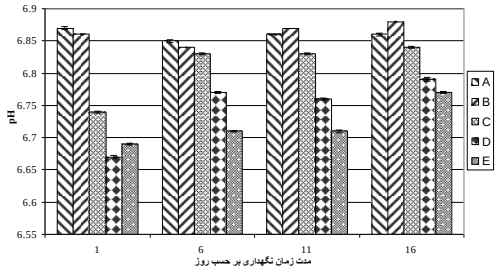
همان‌طوری که در شکل مشاهده می‌شود، افزایش سطح باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در فرمولاسیون آب هویج بستنی موجب افزایش فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH گردید، درحالی‌که با افزایش سطح *لاکتوباسیلوس کازئی*، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری ($P<0.01$) کاهش یافت. در طی زمان نگهداری، میزان فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH همه نمونه‌ها به‌تدریج کاهش یافت. در روز اول بیشترین میزان درصد فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH مربوط به تیمار C بود، درحالی‌که در سایر روزهای موردبررسی، تیمار D بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داد. در کلیه روزهای موردمطالعه، نمونه شاهد کمترین میزان فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH را داشت (شکل ۴).



شکل ۴- تغییرات میانگین مقادیر فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH نمونه‌های آب هویج بستنی پروبیوتیک طی زمان نگهداری
*تیمار A: تیمار شاهد؛ تیمار B: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۸ *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار C: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۹ *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار D: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۸ *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*؛ و تیمار E: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۹ *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*
*تیمارها با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد می‌باشد.

نتایج بررسی میزان pH آب هویج بستنی پروبیوتیک

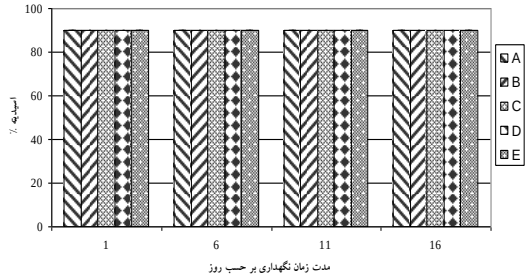
نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها بیان کرد که اثر تیمارهای مورداستفاده، زمان نگهداری و اثر متقابل تیمار در زمان‌بر میزان pH آب هویج بستنی ازلحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<0.01$). در شکل ۵، تغییرات میانگین مقادیر pH نمونه شاهد و نمونه‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* طی زمان نگهداری ۱۶ روزه نشان داده‌شده است. همان‌طوری که در شکل مشاهده می‌شود، در روز اول، بیشترین میزان pH مربوط به نمونه شاهد بود و افزودن پروبیوتیک ها به فرمولاسیون آب هویج بستنی سبب کاهش میزان pH گردید. میزان pH تیمار B نزدیک به شاهد بود. در این روز، تیمار D کمترین میزان pH را داشت. به‌استثنای روز اول، در سایر روزهای موردبررسی، با افزایش سطح باکتری‌های پروبیوتیک در نمونه‌های آب هویج بستنی، میزان pH به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در کلیه روزهای نگهداری، میزان pH در نمونه‌های حاوی *بیفیدوباکتریوم* لاکتیس به‌طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* بود. در نمونه شاهد و نمونه B، در طی دوره نگهداری در ابتدا pH کاهش و سپس افزایش یافت. در نمونه‌های حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و نمونه C، در طی زمان نگهداری میزان pH به‌تدریج افزایش یافت. در روز آخر نگهداری، بیشترین میزان pH مربوط به نمونه شاهد بود و میزان pH تیمار B نزدیک به شاهد بود. تیمار E کمترین میزان pH را داشت (شکل ۵).



شکل ۵- تغییرات میانگین pH نمونه‌های آب هویج بستنی پروبیوتیک طی زمان نگهداری
*تیمار A: تیمار شاهد؛ تیمار B: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۸ *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار C: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۹ *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار D: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۸ *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*؛ و تیمار E: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی cfu/ml ۱۰^۹ *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*
*تیمارها با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد می‌باشد.

نتایج بررسی میزان درصد اسیدیته آب هویج بستنی پروبیوتیک

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها بیان کرد که اثر تیمارهای مورداستفاده، زمان نگهداری و اثر متقابل تیمار در زمان‌بر میزان درصد اسیدیته آب هویج بستنی ازلحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P>0.05$). در شکل ۶، تغییرات میانگین مقادیر درصد اسیدیته نمونه شاهد و نمونه‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* طی زمان نگهداری ۱۶ روزه نشان داده‌شده است. همان‌طوری که در شکل مشاهده می‌شود، در کلیه روزهای موردبررسی، میزان درصد اسیدیته همه نمونه‌های آب هویج بستنی مشابه هم بود. در طی دوره نگهداری نیز میزان درصد اسیدیته کلیه نمونه‌های آب هویج بستنی تغییری نکرد. (شکل ۶).



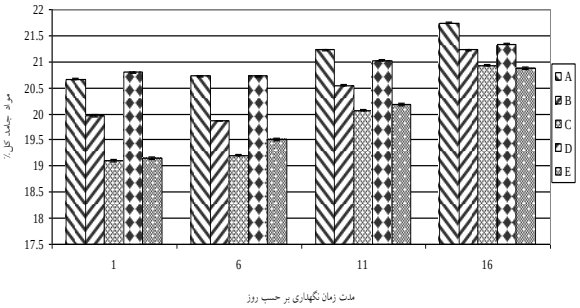
شکل ۶- تغییرات میانگین مقادیر درصد اسیدیته نمونه‌های آب هویج بستنی پروبیوتیک طی زمان نگهداری

*تیمار A: تیمار شاهد؛ تیمار B: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^8 cfu/ml *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار C: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^9 cfu/ml *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار D: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^8 cfu/ml *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*؛ و تیمار E: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^9 cfu/ml *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*

*تیمارها با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد می‌باشد.

نتایج بررسی میزان درصد مواد جامد کل آب هویج بستنی پروبیوتیک

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها بیان کرد که اثر تیمارهای مورداستفاده، زمان نگهداری و اثر متقابل تیمار در زمان‌بر میزان درصد مواد جامد کل آب هویج بستنی ازلحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<0.01$). در شکل ۷، تغییرات میانگین مقادیر درصد مواد جامد کل نمونه شاهد و نمونه‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* طی زمان نگهداری ۱۶ روزه نشان داده‌شده است. همان‌طوری که در شکل مشاهده می‌شود، بیشترین میزان درصد ماده جامد کل مربوط به نمونه شاهد بود و با افزایش سطح باکتری‌های پروبیوتیک در فرمولاسیون آب هویج بستنی، میزان درصد ماده جامد کل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، به‌طوری‌که کمترین میزان درصد ماده جامد کل مربوط به نمونه‌های حاوی بالاترین سطح باکتری‌های پروبیوتیک بود. باگذشت زمان، میزان درصد ماده جامد کل نمونه‌های مختلف آب هویج بستنی به‌تدریج افزایش یافت. در روز آخر نگهداری، نمونه شاهد بیشترین میزان مواد جامد کل را داشت و میزان ماده جامد کل تیمار B نزدیک به شاهد بود. تیمار E و به دنبال آن تیمار C کمترین میزان ماده جامد کل را داشتند (شکل ۷).



شکل ۷- تغییرات میانگین مقادیر درصد مواد جامد کل نمونه‌های آب هویج بستنی پروبیوتیک طی زمان نگهداری

*تیمار A: تیمار شاهد؛ تیمار B: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^8 cfu/ml *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار C: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^9 cfu/ml *لاکتوباسیلوس کازئی*؛ تیمار D: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^8 cfu/ml *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*؛ و تیمار E: آب هویج بستنی پروبیوتیک حاوی 10^9 cfu/ml *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*

*تیمارها با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد می‌باشد.

بحث

به‌طورکلی نتایج نشان داد که افزایش سطح پروبیوتیک ها اثر معنی‌داری بر میزان زنده‌مانی آن‌ها نداشت. در طی زمان نگهداری تعداد سلول‌های زنده باکتریایی کاهش یافت، ولی همواره تعداد آن‌ها در حد قابل‌پذیرش بود. *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* قابلیت زیستی بهتری نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی* از خود نشان داد. در طی زمان نگهداری میزان ترکیبات فنلی کلیه نمونه‌ها کاهش یافت، ولی میزان آن در نمونه‌های حاوی سویه‌های پروبیوتیک بیشتر از نمونه شاهد بود. نمونه‌های حاوی بالاترین سطح دو باکتری پروبیوتیک، بیشترین میزان بتاکاروتن را داشتند. افزایش سویه‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به ترتیب سبب کاهش و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های آب هویج بستنی گردید. در طی زمان نگهداری به دلیل کاهش محتوای ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی کاهش پیدا کرد. بیشترین میزان مواد جامد کل مربوط به نمونه شاهد بود و با افزایش سطح پروبیوتیک ها در فرمولاسیون، میزان آن کاهش یافت. باگذشت زمان، میزان مواد جامد کل نمونه‌های آب هویج بستنی افزایش پیدا کرد. تیمارهای مورداستفاده و زمان نگهداری اثر معنی‌داری بر میزان اسیدیته قابل تیتراسیون آب هویج بستنی نداشتند. بااین‌حال، با افزایش سطوح باکتری‌های پروبیوتیک در نمونه‌ها، میزان pH کاهش یافت و در نمونه‌های حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به دلیل قابلیت زیستی بالاتر، میزان pH کمتر از نمونه‌های حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* بود. بر اساس استانداردهای موجود و ازلحاظ تغذیه‌ای، زنده‌مانی سویه‌های پروبیوتیک و فعالیت عمل‌گرایی آن‌ها در طی دوره ماندگاری محصولات، اهمیت زیادی دارد. برخی از سویه‌های پروبیوتیک قادر به رشد در شیر نیستند. در برخی موارد، حضور مواد گیاهی ممکن است سبب بهبود رشد استارترهای پروبیوتیک در شیر مانند آب گوجه‌فرنگی، شیر بادام‌زمینی، شیر سویا، آب هویج و آب کلم گردد (Nadal et al., 2010). عوامل متعددی مقدار ترکیبات فنلی موجود در بافت‌های گیاهی را تحت تأثیر قرار می‌دهند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، درجه رسیدگی در زمان‌برداشت، شرایط محیطی، آب و هوا، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری اشاره کرد. به علت اکسیداسیون ساختمان چند غیراشباعی کاروتنوئیدها، میزان آن‌ها در طی دوره نگهداری کاهش می‌یابد (Quitao-Teixeira et al., 2009). الهامی راد و همکاران (۱۳۹۳) نیز در بررسی تغییرات محتوای بتاکاروتن طی دوره نگهداری آب هویج بیان کردند که در طی زمان نگهداری، میزان بتاکاروتن آب هویج کاهش یافت و سرعت کاهش آن در روزهای پایانی نگهداری بیشتر از روزهای ابتدایی بود. Pereira و همکاران (2013) در بررسی ثبات انبارداری نوشیدنی پروبیوتیک حاصل از آب سیب تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس کازئی* بیان کردند که در تیمارهای تخمیر شده با باکتری پروبیوتیک، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری بالاتر از نمونه شاهد بود. در طی زمان نگهداری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت، ولی سرعت کاهش آن در نمونه‌های غیرتخمیری بیشتر از نمونه‌های تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس کازئی* بود که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت. در این تحقیق، رابطه مثبتی بین محتوای ترکیبات پلی فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی آب سیب مشاهده گردید (Di Cagno *et al*. 2011). اثر تخمیر اسیدلاکتیکی بر خواص آنتی‌اکسیدانی اسموتی[1]قرمز و سبز را بررسی کرده و گزارش نمودند که در نمونه‌های تخمیر شده میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت و در طی دوره نگهداری ۳۰ روزه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی حفظ گردید. مطالعات نشان

1Smoothies

می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین سویه‌های پروبیوتیک در مورد مقاومت آن‌ها در برابر اسید وجود دارد (Sheehan et al., 2007) و ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیکی را به تجمع مواد بازدارنده‌ای مثل ااسیدلاکتیک تولیدشده در طی تولید و کاهش pH و نگهداری در سرما مربوط دانسته‌اند (Nualkaekul et al., 2011). Yoon و همکاران (2005) گزارش کردند که اسیدیته اولیه آب چغندر ۰/۱۳ بود و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* باعث افزایش اسیدیته تا ۰/۵۶ بعد از ۷۲ ساعت تخمیر شد، درحالی‌که این مقدار در مورد *لاکتوباسیلوس کازئی* ۰/۲۵ بود. همچنین Yoon و همکاران (2006) سه باکتری اسیدلاکتیکی شامل *لاکتوباسیلوس کازئی*، *پلانتاروم* و *دلبروکی* را از جهت توانایی‌شان برای تولید نوشیدنی پروبیوتیک کلم مورد آزمایش قراردادند و مشاهده کردند که هم *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و هم *پلانتاروم* نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی*، اسیدیته قابل تیتراسیون بیشتری به صورت اسیدلاکتیک تولید کردند. Naga Sivudu و همکاران (2016) در بررسی خواص کیفی نوشیدنی‌های پروبیوتیک آب گوجه‌فرنگی و آب هویج حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی* طی دوره نگهداری ۷۲ ساعته مشاهده کردند که در طی زمان تخمیر، در هر دو نوع نوشیدنی پروتیک، میزان مواد جامد کل کاهش یافت که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت نداشت. Khatoon و Gupta (2015) گزارش کردند که در آب‌لیمو ترش حاوی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس* طی دوره نگهداری، کاهش جزئی در میزان مواد جامد کل مشاهده گردید. درنهایت، با توجه به بالاتر بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قابلیت زیستی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی*، سویه *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به‌عنوان سویه برتر جهت تولید آب هویج بستنی پروبیوتیک انتخاب گردید و تیمار E (آب هویج بستنی حاوی 10^9 cfu/ml *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*) به‌عنوان بهترین تیمار معرفی شد.

منابع

۱. الهامی راد، امیر حسین.، جعفری سواره، شادی.، استیری، سید حسین و آرمین، محمد. (۱۳۹۳). ارزیابی تأثیر روش آنزین بری بر پایداری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آب هویج در حین نگهداری. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی، سال ششم، شماره ۲، صفحات ۳۲-۲۳.

۲. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۷۱). آب‌میوه ها- روش های آزمون. استاندارد شماره ۲۶۸۵.

3. Bomba, A., Nemcova, R., Mudronova, D., Guba, P. 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. Trends in Food Sci. and Technol. 13: 121-126.

4. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci. and Technol. 28: 25–30.

5. Chen, B.H., Peng, H.Y., Chen, H.E. 1995. Changes of carotenoids, color and vitamin A contents during processing of carrot juice. J. Agri. Food Chem. 43: 1912-1918.

6. Daneshi, M., Ehsani, M.R., Razavi, S.H., Labbafi, M. 2013. Effect of refrigerated storage on the probiotic survival and sensory properties of milk/carrot juice mix drink. J Biotech. 16: 1-12.

7. Di Cagno, R.D., Minervini, G., Rizzello, C.G., Angelis, M.D., Gobbetti, M. 2011. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. J. Food Microb. 28: 1062-1071.

8. Faller, A.L.K., Fialho, E. 2009. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic coking. Food Res. Int. 42: 210-215.

9. Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G., Faria, A.F. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food

development: Trends, concepts, and products. *Comprehen.* Rev. Food Sci. Food Saf. 9*:* 292-302.

10. Khatoon, N., Gupta, R.K. 2015. Probiotics Beverages of Sweet Lime and Sugarcane juices and its Physiochemical, Microbiological & Shelf life Studies. J Pharma, 4: 25-34.

11. Kun, S., Rezessy-Szabó, J.M., Nguyen, Q.D., Hoschke, A. 2008. Changes of microbiological population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. J Proc. Biochem. 43: 816-821.

12. Nadal, E., Barbera, E., Lopez, J., Álvarez, J. 2010. Food formulation to increase probiotic bacteria action or population. p342.In: WATSON, R.R. and PREEDY, V.C. (eds.), *Bioactive foods in promoting health: Probiotics and Prebiotics*. Academic Press, Elsevier, London, UK.

13. Naga Sivudu, S., Ramesh, B., Umamahesh, K., Vijaya Sarathi Reddy, O. 2016. Probiotication of Tomato and Carrot Juices for Shelf-life Enhancement using Micro-encapsulation. J Food Biosci. Technol. 6: 13-22.

14. Nualkaekul, S., Salmeron, I., Charalampopoulos, D. 2011. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. Food Chem. 129: 1037-1044.

15. Pereira, A.L.F., Maciel, T.C., Rodrigues, S. 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus casei. Food Res. Int. 44: 1276-1283.

16. Pereira, A.L.F., Almedia, F.D.L., de Jesus, A.L.T., da Costam J.M.C., Rodrigues, S. 2013. Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. Food Biopro. and Technol. 6: 3155-3165.

17. Quitao-Teixeira, L.J., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R.S., Mota-Ramos, A., Martin-Belloso, O. 2009. Comparative study on antioxidant properties of carrot juice stabilized by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. J. Agri. Sci. 89: 2636-2642.

18. Sanders, M. 2003. Probiotics: Considerations for human health. Nutrition Rev.61: 91-99.

19. Sheehan, V.M., Ross, P., Fitzgerald, G.F. 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. Inno. Food Sci. and Emerged Technol. 8: 279-284.

20. Singh, C., Grewal, K.S., Sharma, H.K. 2006. Effect of incorporation of carrot juice in the preparation of flavored milk. J. Food Sci Technol. 43: 80-82.

21. Singleton, V.L., Rossi, J.L. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. American J. of Enolo.Vat.16: 144-158.

22. Yoon, K.Y., Woodams, E.E., Hang, Y.D. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. Leben. Wiss Technol. 37: 73-75.

23. Yoon, K.Y., Woodams, E.E., Hang, Y.D. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. Biores. Technol. 97: 1427-1430.

The study of the production of mixture of Carrot juice and ice cream containing *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei*

Ghandali H[1], Shahab Lavasani A[2*], Movahed S[3]

1. Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Innovative Technologies in Functional Food Production Research Center, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

3. Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

***Corresponding author:** *shahabam20@yahoo.com*

Received: 23 December 2017 Accepted: 22 March 2018

Abstract

This study was performed to produce a probiotic carrot juice-ice cream beverage. Designed in a random factorial CRD manner. For this purpose, both *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* (at 10^8 and 10^9 cfu/ml levels) were added to beverage formulation. The samples were stored at -5ºC for 21 days. Survival of bacteria, pH, titrable acidity (%), beta-carotene (%), total solids contents (%), phenolic components (µg/ml) and DPPH (%) were measured at 1, 6, 11, 16 days of storage. The number of viable cells were significantly decreased during the storage time. However, the number of *L. casei* and *Bf. lactis* were in the recommended range (10^6 cfu/ml) until last day of storage. The highest number of viable cells was for *Bf. lactis*. By increment the probiotics levels, the pH and total solids values were decreased. Treatments and storage time did not show any significant effect on the acidity of probiotic carrot juice-ice cream. The highest amounts of phenolic components were for 10^9 cfu/ml *L. casei* and 10^8 *Bf. Lactis*. During storage period, the phenolic compounds and antioxidant activity of all samples were significantly decreased. Increment the concentration of *L. casei* in beverage formulation leads to decreased DPPH percentage inhibitory, while, by increasing the *Bf. lactis* in samples, the antiradical activity was increased. Samples containing 10^9 cfu/ml *L. casei* and *Bf. Lactis* had the highest amounts of beta-carotene. According to obtained results, treatment E which contained 10^9 cfu/ml *bifidobacteriun lactis* was the best among other treatments.

Keywords: Antioxidant activity, Carrot juice-ice cream, Probiotic, Survival.