تاثیر افزودن نوشیدنی کامبوچا بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، حسی و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک شیر تخمیری

علیرضا شهاب لواسانی[a,c*]، محدثه زندی[b]، لیلا ناطقی[c]

[a] *مرکز تحقیقات فناوری‌های نوین تولید غذای سالم، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران*
[b] *دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران*
[c] *دانشیارگروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین -پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۵/۱۲
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1401.20.1.8.2 DOI: 10.30495/jftn.2022.23849.10682

چکیده

مقدمه :کامبوچا یک نوشیدنی حاصل از تخمیر چای و شکر توسط نوعی مخمر به همراه باکتری است که گاهی طعم دهنده نیز به آن اضافه می‌گردد. این نوشیدنی به شکل طبیعی کمی گازدار و سرشار از پروبیوتیک‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین‌های گروه ب و سایر مواد مغذی دیگر است. در این تحقیق تأثیر چای کامبوچا مخلوط شده با شیر تخمیری در غلظت‌های مختلف بر قابلیت زنده‌مانی سویه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و خواص فیزیکوشیمیایی و حسی شیر تخمیری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: پس از کشت باکتری‌های پروبیوتیک مقدار 10^7 cfu/ml از آن‌ها به شیر پاستوریزه اضافه گردید. سپس چای کامبوچا در سطوح ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی لیتر در لیتر به مخلوط اضافه و در روزهای سوم، هفتم، چهاردهم و بیست و هشتم نگهداری در دمای ۱± ۵ درجه سانتی‌گراد آزمون‌های تعیین میزان پروتئین، اسیدیته، pH، اسید استیک، درصد ترکیبات آنتی اکسیدانی و میزان بقای باکتری‌ها بر روی نمونه‌ها انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد درصد پروتئین، اسیدیته، اسید استیک و فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش میزان کامبوچای در طول دوره‌نگهداری به طور میانگین به ترتیب ۰/۱۲، ۰/۰۲، ۱۵/۶۹۴و ۰/۱۶افزایش اما میزان pH و جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک به طور معنی‌داری ($p<0.05$) به ترتیب به میزان ۰/۷۹ و ۰/۰۴۶ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. در طی دوره نگهداری میزان زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک به طور معنی‌داری کاهش یافت ولی بالاتر از حد استاندارد قابل قبول محصولات پروبیوتیک بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق نشان داد افزودن کامبوچای در سطح ۵ درصد در بهبود ویژگی‌های حسی تخمیری نقش مؤثری داشته و به عنوان تیمار برتر انتخاب شد.

واژه‌های کلیدی: *باکتری‌های پروبیوتیک، چای کامبوچا، شیر تخمیری، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: shahabam20@yahoo.com

مقدمه

مطالعات بسیاری نشان داده است که دریافت برخی از مواد غذایی ارتباط مستقیم با کاهش بعضی از بیماری‌ها دارد. استفاده از این نوع اقلام غذایی و یا استخراج ماده موثر آنها و افزودن آن به سایر فراورده‌های غذایی در صنعت غذا رویکرد جدیدی است که افزون بر داشتن ارزش تغذیه ای پایه، حداقل دارای یک خاصیت مشخص و به اثبات رسیده نظیر ارتقا سلامت، پیشگیری کننده و یا کاهش دهنده بیماری هستند و شامل مجموعه متنوعی مانند غذاهای فرمول‌بندی شده کودکان، مکمل‌های غذایی، غذاهای غنی شده با ویتامین‌ها و مواد معدنی، پروبیوتیک‌ها و غذاهای حاوی مواد موثر نظیر فیبر، آنتی اکسیدان‌ها، پروتئین سویا، اسیدهای چرب ضروری می‌باشند (Mousavi *et al*., 2015). از جمله این غذاها می‌توان غذاهای فراسودمند پروبیوتیک مانند فراورده‌های لبنی پروبیوتیک را نام برد. پروبیوتیک‌ها باکتری‌های زنده‌ای هستند که با تغییر فلورمیکروبی بدن تاثیر مثبتی بر میزبان می‌گذارند و سلامتی میزبان را افزایش می‌دهند (Vojdani *et al*., 2003). *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[1]، *لاکتوباسیلوس کازئی*[2]، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*[3]، *بیفیدوباکتریوم لانگوم*[4] و *بیفیدوباکتریوم بروی*[5] را می‌توان به‌عنوان سویه‌های پروبیوتیک نام برد (Khodavaisy *et al*., 2016). نوشیدنی کامبوچای حاوی فراورده‌هایی حاصل از واکنش‌های میکروبی است و این فراورده‌ها نقش حیاتی را در واکنش‌های بیوشیمیایی اندام‌های بدن ایفا می‌کنند. گزارش‌های متعددی مبنی بر اینکه کامبوچای ممکن است از بیماری‌های قلبی پیشگیری کند و دارای ویژگی‌های مفید برای سلامت انسان از جمله کاهندگی قند خون، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و کاهندگی چربی خون وجود دارد (Chakavorty *et al*., 2016). برخی مطالعات علمی نقش کامبوچای را در کمک به سنتز ویتامین از جمله ویتامین‌های B، C و اسید فولیک را در طی فرایند تخمیر تایید می‌کند (Jayabalan *et al*., 2014) از مزایای مهم پروبیوتیک‌ها می‌توان به خاصیت ضد میکروبی، کاهش عدم تحمل لاکتوز، کاهش سطح کلسترول سرم خون، فعالیت ضدجهشی[6] و ضد سرطانی[7] و نیز تحریک سیستم ایمنی اشاره کرد. پروبیوتیک‌ها با تولید اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک و اسید استیک حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها، pH روده را کاهش داده و مانع فعالیت باکتری‌های مضر می‌شوند و از رشد و فعالیت پاتوژن‌ها جلوگیری می‌نمایند. از طرفی با رقابت در به دست آوردن مواد غذائی و توانائی اتصال و تشکیل کلونی در روده به نحو مؤثری سبب جلوگیری از اثرات نامطلوب پاتوژن‌ها بر سلامتی فرد می‌شوند (Benno *et al*., 1992). پروبیوتیک‌ها یا بطور طبیعی در مواد غذایی حضور دارند یا به آنها اضافه می‌گردند (Saarela, 2007). با توجه به نقش و اهمیت شیر و فرآورده‌های لبنی در رژیم غذایی در سال‌های اخیر اغلب از پروبیوتیک‌ها جهت غنی سازی فراورده‌های آن استفاده می‌کنند. کامبوچا نوعی نوشیدنی تخمیری گیاهی است که توسط کشت همزمان مخمرها و باکتری‌ها تهیه می‌شود. کامبوجا یا قارچ چای از دو قسمت، لایه سلولزی شناور بر روی سطح و مایع ترش تخمیر شده تشکیل شده است (Greenwalt *et al*., 2000). حاوی انواعی از مخمرها و باکتری‌ها می‌باشد که شامل باکتری‌های *Bacterium xylinum*، *Acetobacter ketogenum*، *Bacterium gluconicam* و مخمرهایی از انواع شیزوساکارومیسس، ساکارومیسس، تورولا و... هستند. بنابراین اضافه کردن فراورده‌های پروبیوتیکی به فرآورده‌های شیری تخمیری منجر به حفاظت شیر با تولید اسیدلاکتیک و ترکیبات ضد میکروبی و افزایش ارزش تغذیه‌ای آنها می‌گردد (Parvez *et al*., 2006). از جمله ترکیبات تغذیه‌ای تولید شده در ترکیب این دو نوع محصول، ویتامین‌های E، C، ویتامین‌های گروه B (B_1 تا B_{12})، آنتی‌اکسیدان‌ها، اسیدفولیک و استیک اسید[8] است که خواص ضد باکتریایی دارد (Reiss, 1994).

کامبوچای یک نوشیدنی تخمیر شده است که حاوی چای سیاه و قند (از منابع متفاوتی نظیر نیشکر، میوه یا عسل) می‌باشد و به عنوان یک غذای پروبیوتیک کاربردی استفاده می‌شود.بعد از تخمیر، کامبوچا به صورت کربن در می‌آید و حاوی سرکه، ویتامین‌های B، آنزیم‌ها، پروبیوتیک‌ها و غلظت بالای (اسید استیک، گلوکونیک و

[1] *Lactobacillus acidophilus* [2] *Lactobacillus acidophilus* [3] *Bifidobacterium bifidium* [4] *Bifidobacterium Lungum*
[5] *Bifidobacterium Bervi* [3] *Anti motaghenic* [7] *Anticancer* [8] Acetic acid

لاکتیک) می‌شود. این باکتری‌ها به عنوان "باکتری تولید کننده سلولز" شناخته می‌شوند، به این معنی که سلولز تولید می‌کنند و به عنوان یک سپر برای سلول‌ها عمل می‌کنند. برخی از اثرات سلامتی بخش کامبوچای می‌توان به کاهش فشار خون، تسکین ورم مفاصل، تقویت سیستم ایمنی و جلوگیری و پیشرفت سرطان را اشاره نمود (Reiss, 1994). اثرات مفید این محصول روی سلامتی، مصرف این محصول را افزایش داده است، بیان شده که کامبوچای می‌تواند موجب کاهش فشار خون، تسکین ورم مفاصل و تقویت سیستم ایمنی شده و نیز از ابتلا و پیشرفت سرطان جلوگیری نماید (Dufresne and Farnworth, 2000). از آنجا که میکروارگانیزم‌های موجود در کامبوچای جزو میکروب‌های مفید هستند و مقاومت بالایی خصوصا در شرایط اسیدی دارند، می‌توانند در دستگاه گوارش جایگزین میکروارگانیزم‌های مضر شوند، بنابراین کامبوچای را می‌توان جزو محصولات با خواص پروبیوتیکی به حساب آورد این اثرات علاقه به مصرف پروبیوتیک را افزایش می‌دهد (Reiss, 1994). کامبوچای یک نوشیدنی با درصد الکل پایین و حاوی ترکیبات زیست فعال مشتق شده از مواد گیاهی (چای، آب میوه و عصاره گیاهان) و فعالیت متابولیک میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌های اسید استیک، باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها) می‌باشد. در حال حاضربه دلیل خواص ارتقاء دهنده سلامت، مصرف کنندگان بیشماری را به خود جذب نموده است. کامب.چای را به عنوان یک نوشیدنی با محتوای بالای ترکیبات زیست فعال و خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی قوی می‌شناسند، عواملی که بر این فعالیت‌ها تاثیر می‌گذارند، نوع چای و پارامترهای‌های دم کردن و تخمیر می‌باشند (Antolak *et al*., 2021).

Vukic و همکاران در سال ۲۰۱۴ در بررسی ارتباط ریزساختارها با ویسکوزیته و خصوصیات بافتی شیر تخمیری حاوی کامبوچا در مقایسه با ماست پروبیوتیک نشان دادند، وجود کلاسترهای[1] با ظاهری شبیه میسل‌های کازیینی در شبکه‌ی تخمیری اطراف میسل‌ها باعث اختلاف در ویسکوزیته و خصوصیات بافتی نمونه‌ها می‌شوند (Vukic *et al*., 2014). همچنین در بررسی امکان تخمیر کشت کامبوچا با انواع مختلف گونه چای(چای سیاه و آویشن) بر روی شیر تخمیری نشان داد، کامبوچای کشت داده شده بر روی چای سیاه بهتر از انواع دیگر رشد می‌کند (Vukic *et al*., 2014). امروزه، فراورده‌های شیر تخمیری مثل ماست، کفیر و دوغ کره مورد توجه فراوانی قرار گرفته اند. این محصولات دارای خواص سلامت بخشی هستند که با افزودن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک خواص سودمند انها افزایش می‌یابد خواص سلامت بخش پروبیوتیک‌ها حداقل برای فراهم کردن 10^6 cfu/ml مقدار سلول زنده در شیرهای تخمیری تا لحظه مصرف در محصول ضروری می‌باشد، رسیدن به این ادعا بسیار دشوار می‌باشد و این می‌تواند به دلیل رشد ضعیف باکتری‌ها در شیر و تاثیرات اسیدهای آلی، هیدروژن بر اکسید، اکسیژن محلول و افزودنی‌ها، شرایط مضر محیطی در این محصولات مانند سدیم کلراید و شکر باشد (محمدی و مرتضویان، ۱۳۸۹).تحقیقات زیادی در مورد کامبوچای صورت پذیرفته و دارای نتایج بسیار قابل توجهی نیز می‌باشند ولی در مورد تاثیر افزودن کامبوجا در شیر تخمیری پروبیوتیک و ارزیابی قابلیت زنده مانی سویه پروبیوتیک در این محصولات تا کنون سابقه تحقیقی وجود نداشته است بدین رو این تحقیق دارای وجه تمایز و نوآوری در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده است.

Neff-Skocinska و همکاران در سال ۲۰۱۷، مقادیر اسیدیته و تاثیر شرایط تخمیر نوشیدنی چای کامبوچای را روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی بررسی نمودند و دریافتند شرایط بهینه تخمیر نوشیدنی چای کامبوچای در دمای ۲۵°C در طی مدت ده روز می‌باشد که سبب تولید محصولی با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میکروبیولوژیکی و حسی مطلوب گردید. یکی از نکات مهم این تحقیق بررسی تولید مخلوط کامبوچا و شیر تخمیری پروبیوتیک به عنوان یک محصول جدید و ارزیابی ویژگی‌های کیفی و حسی آن دز طی ماندگاری می‌باشد. یک انتخاب مناسب از شاخص‌های تخمیر تولید یک محصول با کیفیت مطلوب در یک سطح پایدار غنی از اجزای سلامت بخش را امکان‌پذیر می‌سازد (Neff-Skocinska *et al*., 2017). نوع چای تاثیر قابل توجهی روی عوامل مرتبط با پتانسیل آنتی اکسیدانی، pH، مقادیر اسید استیک، الکل و یا قند دارد. چای قرمز و چای

[1] Clusters

سبز دارای منابع قابل توجهی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به ویژه پلی فنل‌ها ازجمله فلاونوئیدها می‌باشند، بنابراین چای سیاه و قرار دادن این نوع چای در معرض تخمیراز نظر خواص سلامت بخش کامبوچای مفید به نظر می‌رسد (Jakubczyk *et al*., 2020).

تخمیر کامبوچای با باقی مانده‌های چای، فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و محتوای پلی‌فنل را در نوشیدنی‌های کامبوچای افزایش می‌دهد. تخمیر با باقی مانده چای به طور قابل توجهی فعالیت آنتی اکسیدانی و غلظت پلی‌فنلی کامبوچای را افزایش می‌دهد. علاوه بر این باقی مانده چای سبز اثر قوی تری نسبت به باقی مانده چای سیاه نشان داد. تخمیر با بقایای چای راه کار بهتری برای تولید نوشیدنی‌های کامبوچای غنی از پلی فنل می‌باشد (Dan-Zhou *et al*., 2022). تاثیر زمان تخمیربر فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ترکیب فنلی و کیفیت حسی کامبوچای تخمیر شده از چای‌های مختلف (سبز، سیاه و اولانگ) و میوه‌ها (انگور، دراگون و گواوا) نشان دادفعالیت آنتی اکسیدانی کامبوچای انگور به دلیل افزایش غلظت پلی‌فنل‌ها در مقایسه با کامبوچای چای سبز به طور قابل توجهی بهبود یافته است (Li *et al*., 2022).

بنابراین هدف از تحقیق بررسی اثرات ترکیب چای کامبوچا و شیر تخمیری حاوی سویه‌های پروبیوتیک بر ویژگی‌های کیفی، حسی و بقای باکتری‌های محصول فراسودمند تولیدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- آماده‌سازی باکتری‌های آغازگر و شیر پروبیوتیک

پرورش و فعال نمودن باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (ATCC 4356)، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (ATCC 55916) و *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* (ATCC 29521) از کپسول تجاری پروبیوتیک به شکل لیوفیلیزه تهیه شده از شرکت نچرال فاکتورز[1]، آمریکا در محیط‌کشت MRS[2] مایع استریل ساخت مرک آلمان و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. محیط‌کشت MRS مایع حاوی منابع کربن، نیتروژن و ویتامین‌ها برای حمایت از رشد لاکتوباسیل‌ها هستند. باکتری‌های اسید لاکتیک رشد خوبی در محیط‌کشت MRS مایع داشته اما ممکن است بعضی از سویه‌ها به کندی رشد کنند. باکتری‌ها در محیط حاوی ۱۶ درصد (حجمی /حجمی) گلیسرول استریل توسط نیتروژن مایع منجمد شده و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد برای استفاده درطول زمان انجام پژوهش نگهداری شدند. باکتری‌های پروبیوتیک در محیط‌کشت MRS استریل طی ۱۶ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد فعال شد و سپس به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت از این کشت جهت تهیه کشت تازه باکتری و سپس افزودن آن به مخلوط استفاده شد (Abghari *et al*., 2008). سپس به شیر پاستوریزه گاو تهیه شده از شرکت اسپوتای ایران (۲/۲٪ چربی، ۳ ٪ پروتئین و ۴/۶۵٪ لاکتوز) تعداد 10^7 cfu/ml مخلوط باکتری‌های پروبیوتیک اضافه و شیر محتوی باکتری‌های پروبیوتیک تهیه شد. شیرهای تلقیح شده برای مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و pH شیرهای تلقیح شده بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد از ۳/۸۳ تا ۳/۷ در تیمارهای مختلف کاهش نشان داد.برای تهیه سوسپانسیون محیط MRS برات محتوی کشت تازه باکتری با دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و با سرم فیزیولوژی شستشو گردید. از باکتری ته‌نشین شده برای تهیه سوسپانسیونی معادل ۰/۵ مک فارلند در لوله محتوی آب مقطر استریل استفاده گردید. جهت شمارش باکتری از روش شمارش صفحه‌ای Standard plate count و تکنیک Pour plating استفاده شد (Omidi *et al*., 2010).

تیمارهای مورد استفاده در تحقیق در جدول ۱، آورده شده است.

جدول ۱- تیمارهای تحقیق

Table 1- Treatments of research

Treatments	Percentage of kambucha tea added to milk
T0 (Control)	0
T1	5
T2	10
T3	15
T4	20

- آماده سازی کامبوچای

کامبوچای سوش بومی متعلق به گونه استوباکتر از مرکزکلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های ایران (PTCC)[3]

[1] Natural Factors [2] De man, Rogosa and Sharpe [3] Persian Type Culture Collection

خریداری شد. برای تهیه چای کامبوچا به این ترتیب عمل شد که ابتدا به آب جوشیده شده ۰/۵ درصد وزنی حجمی چای سیاه مربوط به شرکت گلستان ایران ،افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه دم کردن در دمای ۶۵ درجه سلسیوس، چای به وسیله کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف شد. مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از محلول‌ها در ۵ ارلن ۲۵۰ میلی لیتری در ۳ تکرار ریخته شد و پس از سرد شدن به هر کدام از ارلن‌ها ۵ درصد از لایه کامبوچای (قارچ کامبوچا به صورت یک توده هم زیست از مخمر و باکتری بوده که به صورت یک صفحه مسطح، صاف و لزج است. با هر فرآیند تخمیر یک لایه جدید بر روی این صفحه ایجاد می‌شود که قابل جدا شدن از لایه قبل می‌باشد. این قارچ ابتدا به صورت ورقه نازکی بر روی سطح چای قارچ قرار می‌گیرد و سپس ضخیم می‌شود.) تهیه شده با سوبسترای شکرسفید به همراه ۱۰ میلی لیتر کامبوچای تهیه شده با شکر افزوده شد. پس از پوشاندن درب ارلن‌ها با پارچه کتانی فرآیند تخمیر دور از تابش مستقیم نور در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی گراد انجام شد. آزمون‌های مورد نظر روی این نمونه‌ها انجام گرفت (Malbaša *et al*., 2009).

- روش تولید شیر تخمیری

مطابق با جدول ۱ (آماده سازی باکتریهای آغازگر و شیر پروبیوتیک) سوسپانسیون باکتری‌های پروبیوتیک تهیه گردید. سپس از هر سه باکتری پروبیوتیک به میزان 10^{7} cfu/ml از این سوسپانسیون به شیر پاستوریزه تلقیح شد. اسیدیته شیرهای آماده شده نهایی از ۱۴ تا ۱۸ درجه دورنیک متغیر بود. ظرف حاوی شیر تلقیح شده به گرمخانه ۳۷ $^{\circ}$c دارای ۵٪ CO_2 منتقل شد (Ferdowsifard *et al*., 2011). کامبوچای آماده سازی شده مطابق با روش ۲-۲ در سطوح ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی لیتر/لیتر به شیر پروبیوتیک اضافه گردید تا عمل تخمیر به اتمام برسد و در فواصل روزهای سوم، هفتم و چهاردهم و بیست و هشتم در دمای ۱± ۵ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت (Malbaša *et al*., 2009).

- اندازه‌گیری pH وتعیین میزان اسیدیته

مقادیر pH با استفاده از pH متر الکترونیکی مدل (Iskra, Kranj, Slovenia) با اندازه گیری یون H^{+} شیر و تعیین میزان اسیدیته به روش تیتراسیون و با استفاده از محلول استاندارد هیدروکسید سدیم (شرکت مرک آلمان) و فنل فتالئین(شرکت مرک آلمان) به عنوان معرف و برحسب درجه دورنیک اندازه گیری شد (AOAC, 1995).

- اندازه گیری پروتئین محلول

جهت اندازه گیری پروتئین محلول در نمونه‌ها از روش برادفورد بر اساس تشکیل کمپلکس بین رنگ آبی کماسی G-250 (شرکت مرک، آلمان) و پروتئین موجود در شیر و اندازه گیری ماکزیمم جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر مدل Double Beam Camspec M 350 ساخت کشور انگلستان انجام شد (Sreeramulu *et al*., 2000).

- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی برحسب روش احیا رادیکال‌های آزاد (DPPH)با استفاده از روش Pasha و Reddy (۲۰۰۵) به شرح ذیل اندازه گیری شد. از سه محلول شامل محلول۱: بافر (۱/۵۵ میلی لیتر استات سدیم (شرکت مرک آلمان) و ۸ میلی لیتر اسیداستیک غلیظ (شرکت مرک آلمان) که با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانده شدند، محلول۲:کلرید آهن(شرکت مرک آلمان) و ۲۷۰ میلی گرم کلرید آهن III (شرکت مرک آلمان)است که با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد و محلول ۳: تری آذین (۴۷ میلی گرم تری آذین (شرکت مرک آلمان) که در ۴۰ میلی لیتر هیدروکلریک اسید(شرکت مرک آلمان) ۴۰ میلی مولار حل شده بود. محلول کار با افزودن ۱۰ میلی لیتر محلول شماره ۱، یک میلی لیتر محلول شماره۲ و یک میلی لیتر محلول شماره ۳ تهیه شد. ۲۵ میکروگرم از نمونه به محلول کار اضافه شده و ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد سپس جذب نوری در طول موج ۵۹۳ نانومتر ثبت شد (Pasha & Reddy, 2005).

- اندازه گیری اسید استیک به وسیله HPLC

مقدار اسیداستیک نمونه‌های کامبوچای به‌وسیله دستگاه HPLC سری Shimadzu DGU-28 ژاپن مجهز به شناساگر اری فتودیودSPD-20A انجام شد که در ۲۱۰ نانومتر برای شناسایی اسیدها تنظیم شده بود و جداسازی با

استفاده از یک ستون فازمعکوس C_{18} فنومنکس (Phenomenex) به ابعاد ($5\mu m \times 150\ mm \times 4.6\ mm$) انجام شد حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود و استاندارد خارجی برای اسید استیک از شرکت سیگما آلدریچ آمریکا تهیه شد و همه نمونه‌ها قبل از تزریق به HPLC با استفاده از کاغذ واتمن ۰/۴۵ میکرومتر صاف شدند (Miranda *et al.*, 2016).

- ارزیابی زنده مانی پروبیوتیک‌ها

نمونه‌ها بعد از ۷۲ ساعت از تخمیر در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. نمونه برداری از نمونه‌ها در فواصل روزهای سوم، هفتم، چهاردهم و بیستم و هشتم انجام شد و قابلیت زنده مانی کشت‌های پروبیوتیک در محیط کشت MRS استریل اندازه‌گیری شد (Puspawati *et al.*, 2010). برای تهیه رقت ۵ گرم نمونه همگن شد و با ۴۵ میلی‌لیتر سیترات سدیم ۲٪ توزین و همگن گردید. سری رقت‌ها با افزایش یک میلی لیتر از هر رقت به ۹ میلی لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد استریل تهیه شد. باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در محیط‌کشت MRS bile agar با روش پورپلیت کشت داده شدند. گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها در شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انجام شد (Oliveira *et al.*, 2009). برای تشخیص و شمارش لاکتوباسیلوس رامنوسوس از محیط‌کشت MRS استفاده شد. کشت به صورت آمیخته انجام شده و پلیت‌ها در شرایط هوازی- بی هوازی در حضور گاز دی اکسید کربن با غلظت ۵٪ و در دمای گرمخانه‌گذاری ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شدند و شمارش زنده بیفیدوباکتر بیفیدوم با استفاده از محیط کشت MRS agar در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان حداقل ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد شرایط بی هوازی با کاربرد جار بی هوازی و گاز پک تیپ A ایجاد شد(Rouhi *et al.*, 2015). در نهایت کلنی‌ها شمارش شده و حاصلضرب تعداد کلنی در عکس رقت تعداد باکتری‌های پروبیوتیک مشخص می‌نماید.

- ارزیابی حسی

جهت انجام این آزمون از یک تیم ۱۵ نفره نیمه آموزش دیده در ارزیابی و شناسایی کیفی محصولات غذایی استفاده گردید. آزمون ارزیابی حسی (عطرو بو، طعم و مزه و پذیرش کلی) به روش امتیازدهی انجام شد (Bagheri *et al.*, 2019).

- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی هر تیمار با سه تکرار انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۹۵ درصد دسته بندی می‌شوند. تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزاری آماری (SAS) نسخه ۹ در سطح معنی داری ۰/۰۵ درصد انجام شد. داده‌های حاصل از ارزیابی حسی با استفاده از آزمون ناپارامتری فریدمن مورد ارزیابی قرار گرفتند (Spasenija *et al.*, 2012).

یافته ها

- تأثیر افزودن کامبوچای بر میزان پروتئین شیر تخمیری

نتایج آزمون تعیین پروتئین در شکل ۱، نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین میانگین تیمارها از نظر شاخص درصد پروتئین وجود دارد ($P<۰/۰۵$). به طور کلی با افزایش درصد کامبوچای در فرمولاسیون شیر تخمیری درصد پروتئین شیر تخمیری با یک روند افزایشی مواجه بود و بالاترین میزان درصد پروتئین متعلق به تیمار دارای پروبیوتیک و کامبوچای به میزان ۲۰ میلی لیتر (T4) بود. با توجه به نمودار ۳-۱، تاثیر زمان بر روی شاخص درصد پروتئین تیمارها معنی دار بود ($P<۰/۰۵$) و با افزایش زمان نگهداری یک روند افزایشی در میزان درصد پروتئین تیمارها وجود داشت ($P<۰/۰۵$). به طوری که کمترین میزان درصد پروتئین متعلق به روز سوم نگهداری و بالاترین میزان آن به روز چهاردهم نگهداری بود. نتایج نشان داد بعد از روز چهاردهم نگهداری تا انتهای روز بیست و هشتم کاهش معنی‌داری در درصد پروتئین تیمارها مشاهده گردید ($P <۰/۰۵$).

- تأثیر افزودن کامبوچای بر میزان اسیدیته شیر تخمیری

نتایج شکل۲، نشان داد اختلاف معنی‌دار بین میزان اسیدیته تیمارهای شیر تخمیری با افزایش درصد استفاده از

کامبوچا وجود دارد ($P<۰/۰۵$). به طوریکه با افزایش میزان کامبوچا روند افزایشی بین میزان اسیدیته تیمارها مشاهده گردید. بالاترین میزان اسیدیته در تیمار دارای ۲۰ درصد کامبوچای و کمترین آن نیز در تیمار شاهد ملاحظه گردید ($P<۰/۰۵$). از طرفی با افزایش زمان نگهداری میزان اسیدیته نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). بالاترین میزان اسیدیته درروز بیست و هشتم نگهداری و کمترین آن نیز در روز سوم نگهداری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

همانطور که در جدول ۲، ملاحظه می‌شود با افزایش میزان کامبوچای در فرمولاسیون، کاهش معنی‌داری در میزان pHتیمارها وجود داشت ($P<۰/۰۵$). بالاترین میزان pH متعلق به تیمار شاهد و کمترین میزان آن به تیمار دارای ۲۰ درصد کامبوچای و پروبیوتیک تعلق داشت ($P<۰/۰۵$). از طرفی با افزایش زمان نگهداری میزان pH به طور معنی داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). حداقل میزان pH در انتهای روز بیست و هشتم نگهداری و حداکثر آن نیز در روز سوم مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

- تأثیر افزودن کامبوچای بر میزان pH شیر تخمیری

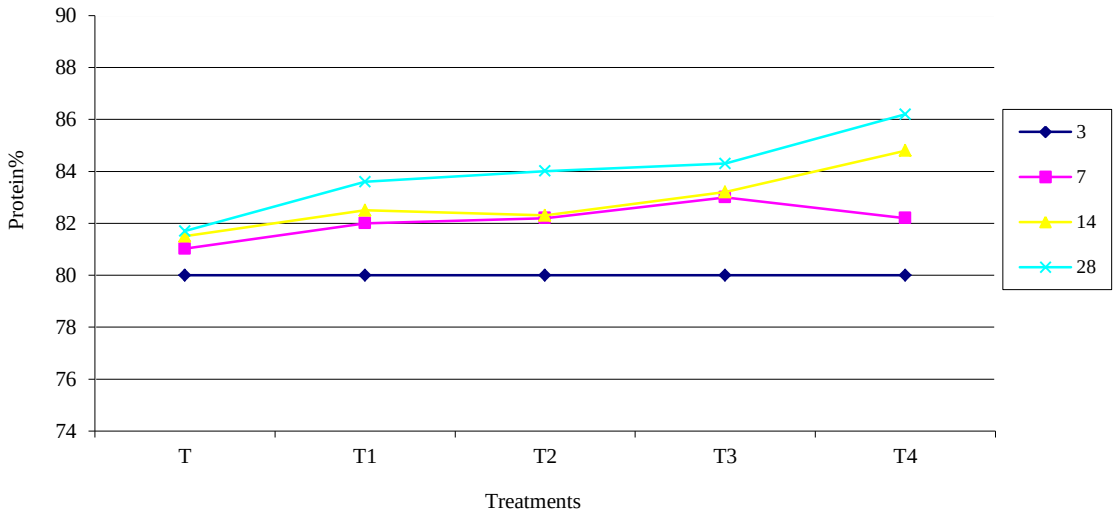

Figure 1- Effect of different levels of kombucha* on fermented milk protein content during 28 days at 5±1 ˚C
*Treatments T_0, T_1, T_2, T_3 and T_4 contain 0, 5, 10, 15 and 20% of kambucha added to fermented milk respectively.

شکل۱- اثر مقادیر متفاوت کامبوچای روی مقدار پروتئین شیر تخمیر شده در طی ۲۸ روز در دمای ˚C ۱±۵

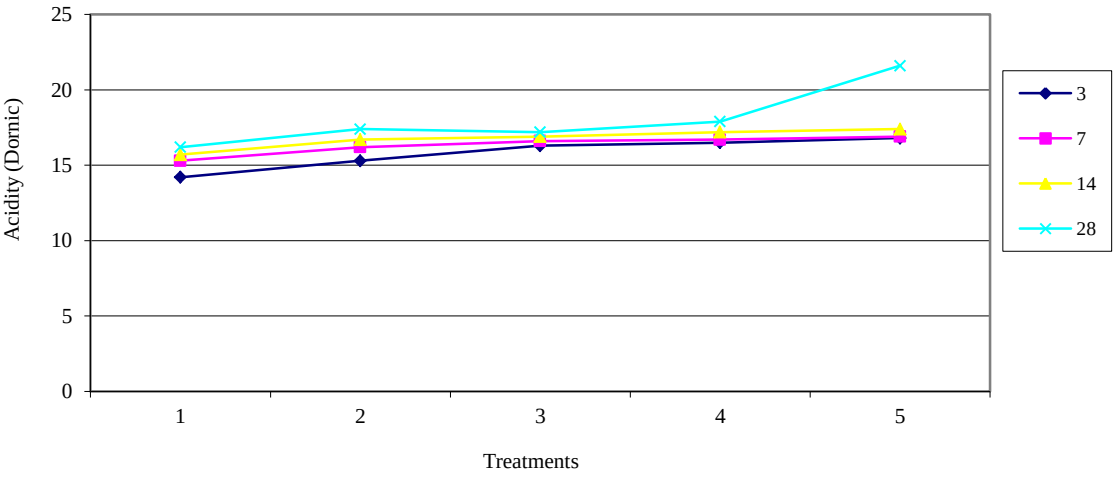

Figure 2- Effect of different levels of kombucha* on the acidity content of fermented milk during storage at 5±1 ˚C
*Treatments T_0, T_1, T_2, T_3 and T_4 contain 0, 5, 10, 15 and 20% of kambucha added to fermented milk respectively.

شکل۲- اثر مقادیر متفاوت کامبوچای* روی مقدار اسیدیته شیر تخمیر شده در طی ۲۸ روز در دمای ˚C ۱±۵

- تأثیر افزودن کامبوچای بر میزان استیک اسید شیر تخمیری

با توجه به جدول ۳، اختلاف معنی داری بین تیمارهای شیر تخمیری از نظر درصد اسید استیک وجود داشت ($P<$۰/۰۵). بطوریکه با افزایش میزان درصد کامبوچای در فرمولاسیون تیمارها، میزان اسید استیک تیمارها به طور معنی داری افزایش یافت ($P <$۰/۰۵). بالاترین میزان اسید استیک به تیمار ۲۰ میلی لیتر چای کامبوچای تعلق داشت و کمترین میزان اسید استیک نیز به تیمار شاهد تعلق داشت ($P<$۰/۰۵). نتایج نشان داد اختلاف معنی داری بین میانگین تیمارهای شیر تخمیری بر اساس زمان نگهداری وجود دارد و در طی بیست و هشت روز نگهداری میزان اسید استیک تیمارهای شیر تخمیری به طور معنی داری افزایش یافت ($P <$۰/۰۵). به طوریکه بالاترین میزان اسید استیک در انتهای روز بیست و هشتم نگهداری و کمترین میزان اسید استیک در روز اول نگهداری مشاهده گردید.

- تأثیر افزودن کامبوچای بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی شیر تخمیری

با توجه به شکل ۳، فعالیت آنتی اکسیدانی تیمارها با افزایش درصد استفاده از کامبوچای در فرمولاسیون شیر تخمیری روند افزایشی نشان داده و با افزایش درصد کامبوچای بر میران فعالیت آنتی اکسیدانی آن افزوده گردید به طوری که تیمار دارای ۲۰ سی سی کامبوچای (تیمار T4) دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری در مقایسه با تیمار شاهد و سایر تیمارها بود ($P<$۰/۰۵). تیمار شاهد درای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها بود ($P<$۰/۰۵). تاثیر زمان نگهداری نیز بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی تیمارها معنی دار بود و با افزایش مدت زمان نگهداری بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزوده شد ($P<$۰/۰۵). به طوری که بالاترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی متعلق به روز بیست و هشتم نگهداری و کمترین آن نیز به روز سوم تعلق داشت ($P<$۰/۰۵).

جدول ۲- اثر مقادیر متفاوت کامبوچای روی pH شیر تخمیر شده در طی ۲۸ روز در دمای ۵±۱ °C

Table 2- The effect of different levels of kombucha* on the pH of fermented milk during storage time at 5±1 °C**

Treatments	Thirdday	Seventh day	The fourteenth day	Twenty-eighth day
T0	3.38 $\pm^{Dc}$ 0.06	3.83 $\pm$0.01^{Aa}	3.67 $\pm$0.02^{Bb}	3.55 $\pm$0.04^{Cc}
T1	3.83 $\pm^{Aa}$ 0.01	3.83 $\pm$0.02^{Aa}	3.81 $\pm$0.01^{Aa}	3.78 $\pm^{Ba}$ 0.01
T2	3.71 $\pm$0.01^{Ab}	3.7$\pm$0.01^{Bb}	3.68 $\pm$0.02^{Cb}	3.62 $\pm$0.05^{Db}
T3	3.79 $\pm$0.03^{Aa}	3.65$\pm^{Bc}$ 0.01	3.55$\pm$0.01^{Cc}	3.44 $\pm^{Dd}$ 0.02
T4	3.7 $\pm$0.04^{Ab}	3.45$\pm^{Bd}$ 0.02	3.35$\pm$0.01^{Cd}	3.23 $\pm^{De}$ 0.01

* Uppercase letters indicate a significant difference in each row and lowercase letters indicate a significant difference (P <0.05) in each column.
** Treatments T_0, T_1, T_2, T_3 and T_4 contain 0, 5, 10, 15 and 20% of kambucha added to fermented milk respectively.

جدول ۳- اثر مقادیر متفاوت کامبوچای روی درصد اسید استیک شیر تخمیر شده در طی ۲۸ روز در دمای ۵±۱ °C

Table 3-Effect of different levels of kombucha* on the percentage of acetic acid in fermented milk during storage at 5±1 °C**

Treatments	Third day	Seventh day	The fourteenth day	Twenty-eighth day
T0	0	30 $\pm$0.41^{Ce}	33.1 $\pm$0.4^{Be}	35.4 $\pm$0.3^{Ae}
T1	30.3 $\pm^{Dd}$ 0.6	32.45 $\pm$0.25^{Cd}	35.1 $\pm$0.3^{Bd}	40.42 $\pm^{Ad}$ 0.6
T2	40.4 $\pm$0.5^{Dc}	44.65$\pm$0.34^{Cc}	48.06 $\pm$0.2^{Bc}	50.33 $\pm$0.35^{Ac}
T3	44.3 $\pm$0.6^{Db}	47.32$\pm^{Cb}$ 0.4	53.08$\pm$0.25^{Bb}	55.31 $\pm^{Ab}$ 0.16
T4	48.3 $\pm$0.6^{Da}	51.32$\pm^{Ca}$ 0.4	56.08$\pm$0.5^{Ba}	60.31 $\pm^{Aa}$ 0.24

* Uppercase letters indicate a significant difference in each row and lowercase letters indicate a significant difference (P <0.05) in each column.
** Treatments T_0, T_1, T_2, T_3 and T_4 contain0, 5, 10, 15 and 20% of kambucha added to fermented milk respectively.

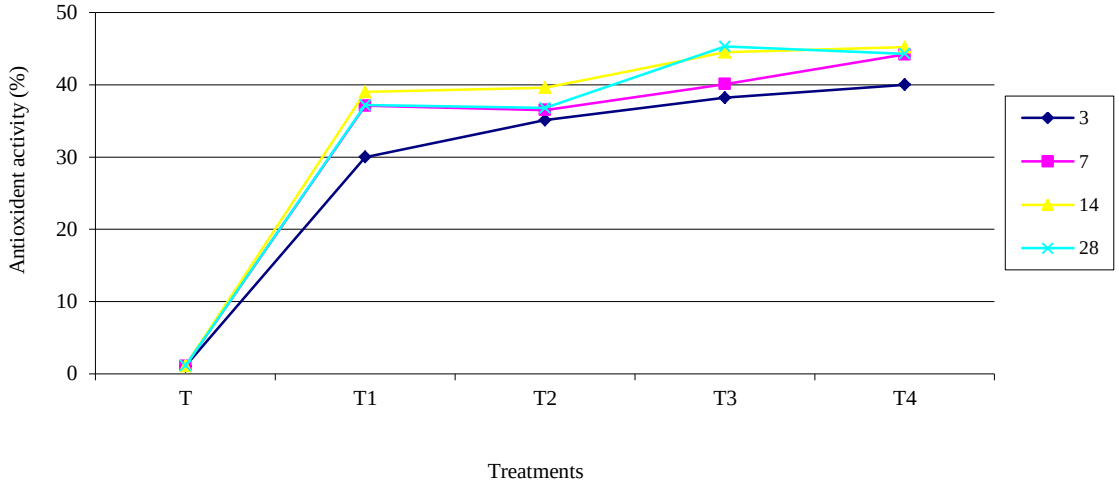

Figure 3- Effect of different levels of kombucha* on the level of antioxidant activity of fermented milk in terms of percentage during storage

* Treatments T_0, T_1, T_2, T_3 and T_4 contain 0, 5, 10, 15 and 20% of kambucha added to fermented milk respectively.

شکل ۳- اثر مقادیر متفاوت کامبوچای* روی فعالیت آنتی اکسیدانی شیر تخمیر شده برحسب درصد در طی نگهداری

- تأثیر افزودن کامبوچای بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک شیر تخمیری

مطابق استاندارد ملی ایران محصولات پروبیوتیک بایستی حاوی حداقل ۱۰ کلنی در گرم(log 6 cfu/g) باکتری زنده باشد (استاندارد ملی ایران، شماره ۱۱۳۲۵، ۱۳۹۱).با توجه به جدول ۴، ملاحظه گردید که اختلافات معنی داری بین میزان بقای باکتری‌های پروبیوتیک با افزایش کامبوچای و زمان نگهداری در شیر تخمیری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). بالاترین میزان جمعیت پروبیوتیک متعلق به تیمار T1 در روز سوم و کمترین میزان جمعیت پروبیوتیک مربوط به تیمار شاهد در روز بیست و هشتم بود ($P<۰/۰۵$). با افزایش میزان کامبوچای از ۵ درصد به ۲۰ درصد یک روند کاهشی در جمعیت باکتریهای پروبیوتیک مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). کمترین میزان بقای جمعیت پروبیوتیک متعلق به روز بیست و هشتم نگهداری (تیمار شاهد) بود ($P<۰/۰۵$). در روز سوم تیمار شیر تخمیری دارای ۲۰ درصد کامبوچای در مقایسه با تیمار شاهد دارای مقادیر زنده مانی کمتری از باکتری‌های پروبیوتیک است ($P<۰/۰۵$) با این حال، با گذشت زمان نگهداری این روند تغییر می‌یابد. بطور کلی نتایج نشان داد، افزایش میزان استفاده از کامبوچای و افزایش مدت زمان نگهداری به طور معنی‌داری بر جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک در شیر تخمیری موثر می‌باشد ($P< ۰/۰۵$).

- تأثیر افزودن کامبوچای بر ویژگی‌های حسی شیر تخمیری

- عطر و بو

با توجه به نتایج مقایسه میانگین آزمون‌های حسی در شکل۴، مشخص گردید که با افزایش درصد کامبوچای امتیاز صفت عطر و بو در شیر تولیدی کاهش یافته اما در سطح ۱۰ درصد (T1) تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نداشته است. به طوری که بالاترین امتیاز عطر و بو از نظر ارزیاب‌ها متعلق به تیمار شاهد و کمترین امتیاز متعلق به تیمار ۲۰ درصد کامبوچای بود. تیمارهای شیر تخمیری در روز سوم دارای مطلوبیت بالاتری نسبت به روز بیست و هشتم نگهداری بودند و با افزایش مدت زمان نگهداری افت کلی در امتیازات ارزیاب‌ها ملاحظه گردید ($P<۰/۰۵$).

- طعم و مزه

با توجه به شکل ۵، نیز ملاحظه گردید که اختلافات معنی‌داری بین شاخص طعم ومزه تیمارها از نظر ارزیاب‌ها وجود داشت ($P<۰/۰۵$). ارزیاب‌ها تفاوت معنی داری بین طعم تیمار شاهد و تیمار دارای ۱۰ درصد چای کامبوچا و پروبیوتیک قائل نشدند ($P<۰/۰۵$). اما میزان مطلوبیت طعم و مزه تیمارها با افزایش میزان درصد استفاده از چای کامبوچای به طور معنی داری کاهش یافت تیمار دارای ۲۰ درصد کامبوچای دارای کمترین میزان مطلوبیت از نظر

طعم و مزه بود. تیمارهای شیر تخمیری در روز سوم دارای مطلوبیت بالاتری نسبت به روز بیست و هشتم نگهداری بودند و با افزایش مدت زمان نگهداری افت کلی در امتیازات طعم و مزه ارزیاب‌ها ملاحظه گردید($P<$۰/۰۵).

- **پذیرش کلی**

نتایج شکل ۶ نشان داد، اختلافات معنی‌داری بین شاخص پذیرش کلی تیمارها از نظر ارزیاب‌ها وجود داشت ($P<$۰/۰۵). بطور کلی تفاوت معنی‌داری بین پذیرش کلی تیمار شاهد و تیمار دارای ۱۰ درصد چای کامبوچا و پروبیوتیک وجود نداشت ($P<$۰/۰۵). اما میزان مطلوبیت نهایی تیمارها با افزایش میزان درصد استفاده از چای کامبوچای به طور معنی داری کاهش یافت تیمار دارای ۲۰ درصد کامبوچای دارای کمترین میزان مطلوبیت نهایی از نظر طعم و مزه بود. تیمارهای شیر تخمیری در روز سوم دارای مطلوبیت نهایی بالاتری نسبت به روز بیست و هشتم نگهداری بودند و با افزایش مدت زمان نگهداری افت کلی در امتیازات ملاحظه گردید ($P<$۰/۰۵). در انتهای روز بیست و هشتم نگهداری نیز تیمار T1 دارای بالاترین میزان مطلوبیت را دارا بود.

جدول ٤- اثر مقادیر متفاوت کامبوچای روی میزان زنده مانی باکتری‌ها در شیر تخمیر شده در طی دوره نگهداری (Log cfu/ml)

Table 4- Effect of different levels of kombucha* on the survival of fermented milk bacteria during storage (Log cfu / ml)**

Treatments	Thirdday	Seventh day	The fourteenth day	Twenty-eighth day
T0	$7.00 \pm^{Aa} 0.01$	6.90 ± 0.01^{Aab}	6.77 ± 0.001^{Cc}	6.65 ± 0.001^{Ed}
T1	$7.00 \pm^{Aa} 0.01$	7.00 ± 0.01^{Aa}	6.95 ± 0.001^{Db}	$6.91 \pm^{Ac} 0.01$
T2	6.90 ± 0.01^{Aa}	6.89 ± 0.01^{Aab}	6.88 ± 0.01^{Aa}	6.87 ± 0.001^{Bd}
T3	6.88 ± 0.001^{Ba}	$6.88 \pm^{Aa} 0.01$	6.88 ± 0.01^{Aa}	$6.86 \pm^{Cb} 0.002$
T4	6.86 ± 0.01^{Ca}	$6.86 \pm^{Aab} 0.01$	6.84 ± 0.01^{Ea}	$6.82 \pm^{Db} 0.01$

* Uppercase letters indicate a significant difference in each row and lowercase letters indicate a significant difference (P <0.05) in each column.

** Treatments T_0, T_1, T_2, T_3 and T_4 contain 0, 5, 10, 15 and 20% of kambucha added to fermented milk respectively.

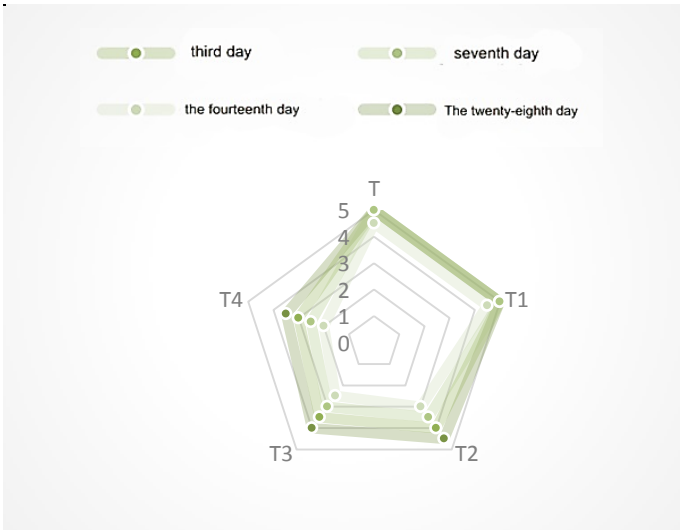

Figure 4- The effect of different levels of kombucha* on the odour of fermented milk during storage

*Treatments T_0, T_1, T_2, T_3 and T_4 contain 0, 5, 10, 15 and 20% of kambucha added to fermented milk respectively.

شکل ٤- تاثیر مقادیر مختلف کامبوچای روی عطر و بوی شیر تخمیر شده در طی دوره نگهداری

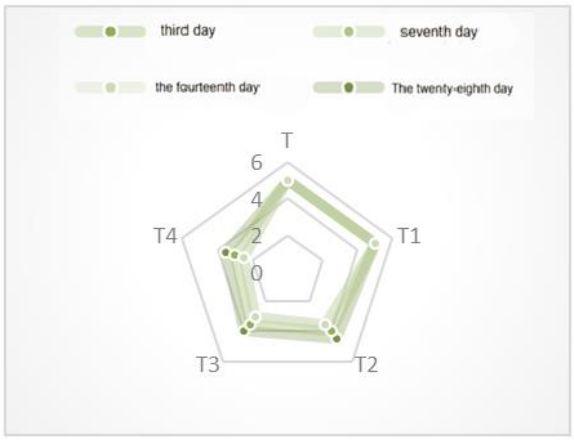

Figure 5- The effect of different levels of kombucha* on the flavor of fermented milk during storage
*Treatments T_0, T_1, T_2, T_3 and T_4 contain 0, 5, 10, 15 and 20% of kambucha added to fermented milk respectively.

شکل ۵- تاثیر مقادیر مختلف کامبوچای روی طعم شیر تخمیر شده در طی دوره نگهداری

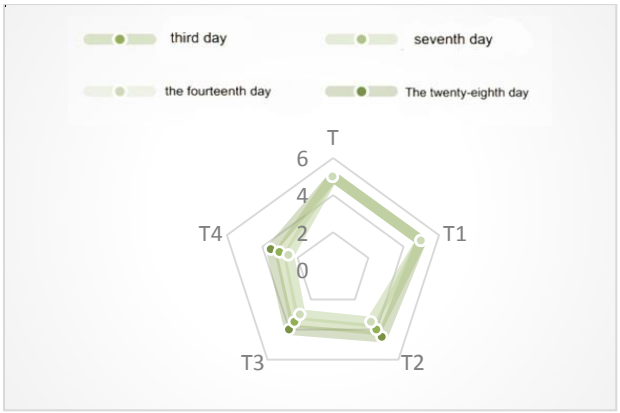

Figure 6- The effect of different levels of kombucha* on the overall acceptability of fermented milk during storage
*Treatments T_0, T_1, T_2, T_3 and T_4 contain 0, 5, 10, 15 and 20% of kambucha added to fermented milk respectively.

شکل ٦- تاثیر مقادیر مختلف کامبوچای روی پذیرش کلی شیر تخمیر شده در طی دوره نگهداری

بحث

- تأثیر افزودن کامبوچای بر میزان پروتئین شیر تخمیری

چای کامبوچا به عنوان منبع نیتروژنی محسوب می‌شود که باعث افزایش آمینو اسیدها و سطوح نیتروژن توسط باکتری‌ها می‌شود بطوریکه پروتئین‌های خارج سلولی توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها در طی فرآیند تخمیر تولید می‌شوند (Sreeramulu *et al.*, 2000). بنابراین میزان تولید پروتئین در طی چهارده روز فرآیند تخمیر به طور معنی‌داری افزایش یافت که به جهت افزایش استفاده از منابع نیتروژنی توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها و تولید ترکیبات پروتئینی خارج سلولی می‌باشد. طی زمان نگهداری به جهت تکمیل دوره تخمیر تا انتهای روز چهاردهم، افزایش میزان غلظت ترکیبات پروتئینی ناشی از فرآیند تخمیر اتفاق می‌افتد و با افزایش زمان نگهداری به دلیل مصرف ترکیبات کاهش می‌یابد همچنین علت افزایش غلظت ترکیبات پروتئینی می‌تواند بواسطه فعالیت کشت آغازگر و تولید اسیدهای آمینه قابل توجیه باشد (Dufresne *et al.*, 2000). بلوردی و همکاران (۱۳۸۸) در بررسی تولید نوشیدنی کامبوجا با استفاده از اینولین غده گیاه سیب زمینی ترشی نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. اینولین به عنوان ترکیب پری بیوتیک سبب افزایش تحریک سنتز آمینواسید و فراکسیون‌های نیتروژنی می‌گردد. نتایج آنها نشان داد میزان تولید پروتئین در چای کامبوچا ارتباط مستقیمی با میزان جمعیت باکتریایی آن دارد که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت (Balvardi *et al.*, 2009). همچنین

نتایج Zhao و Shah در سال (۲۰۱۴) اثرات عصاره چای سیاه را بر روی زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لانگوم*[1] در طی تخمیر شیر سویا بررسی نمودند نتایج نشان داد بالا بودن میزان عصاره چای سیاه در فرمولاسیون شیر سویا با میزان تولید پروتئین در طی فرآیند تخمیر ارتباط معنی‌داری دارد که علت آن تخریب ماتریکس پروتئنی توسط باکتری‌های مذکور بودند (Zhao & Shah, 2014). با این حال احتمالا علت ثابت ماندن درصد پروتئین در روز سوم نگهداری مربوط به دوره کمون یا نهفته باکتری‌ها می‌باشد که از منابع نیتروژنی استفاده نکرده و در نتیجه میزان پروتئین ثابت باقی ماند (Zhao & Shah, 2014). بلوردی و همکاران در سال (۱۳۹۰) به هنگام استفاده ازدرصدهای مختلف منبع قندی مشاهده نمودند که با افزایش درصد اینولین اولیه میزان پروتئین محلول افزایش می‌یابد، ولی در مورد کامبوجای تهیه شده با شکر تا ۶ درصد قند میزان پروتئین افزایش یافته و پس از آن کاهش می‌یابد. محتوی پروتئین محلول در کامبوجای حاصل از سوبسترای اینولین احتمالاً به علت رشد بهتر میکروارگانیزم‌ها در حضور این سوبسترا بود؛ که در نتیجه میزان بیشتری آنزیم‌های برون سلولی و پروتئین‌های محلول توسط این میکروارگانیزم‌ها به درون مایع ترشح می‌شود. اختلاف معنی دار در میزان پروتئین این دو محصول می‌تواند ناشی از اثراتِ تشدیدکنندگیِ احتمالیِ اینولین یا محصولات متابولیکی آن بر روی سیستم ماشین ترجمه میکروارگانیزم‌ها در کامبوجا باشد. خاصیت بافری بالا در کامبوجای تهیه شده از اینولین ناشی از غلظت بالای پروتئین‌های ایجاد شده طی تخمیر است. در حقیقت اختلاف در خاصیت بافری بین دو نمونه کامبوجا، ناشی از گروه‌های بافری کننده است. پروتئین‌ها به علت داشتن تعداد زیادی گروه‌های قابل یونیزه شدن می‌توانند خاصیت بافری زیادی را اعمال نمایند (Gilson, 2004).

- تأثیر افزودن کامبوچای بر میزان اسیدیته شیر تخمیری

افزایش اسیدیته مرتبط با فعالیت مخمرها (انواع شیزوساکارو میسس، ساکارومیسس، تورولا) و باکتری‌های موجود در نوشیدنی می‌باشد. در اثر فعالیت مخمرها و باکتری‌ها طی فرایند تخمیر الکلی، گاز ایجاد گردیده است که این گاز به معلق ماندن مخمرها و باکتری‌ها کمک می‌نماید و درنتیجه افزایش اسیدیته را در بر دارد از طرفی کاهش و افزایش گاز موجب نوسان اسیدیته خواهد شد تا زمانیکه میکروارگانیسم‌ها فعال هستند و گاز تولید می‌کنند باعث افزایش اسیدیته محیط می‌شود اما با کاهش فعالیت آنها اسیدیته کل نوشیدنی کاهش می‌یابد و با شروع رشد میکروارگانیسم‌ها مجددا اسیدیته زیاد می‌گردد (Chen *et al*., 2000). Velicansk و همکاران در سال ۲۰۱۳ در بررسی خصوصیات تخمیر کمبوچا بر روی گیاهان دارویی خانواده لامیناسه نیز به نتایج مشابهی دست یافتند (Velićanski *et al*., 2013). ماده اولیه مورد استفاده برای تولید کامبوچای معمولا چای شیرین شده با شکر می‌باشد. ساکارز موجود در چای توسط مخمرها به گلوکز و فروکتوز هیدرولیز می‌شود، گلوکز در ابتدا به وسیله مخمرها به اتاتول و دی اکسیدکربن تبدیل می‌شود (Blanc, 1996)، در مرحله بعد اتانول توسط استوباکترها به اسید استیک تبدیل می‌شود و در نتیجه اسیدیته افزایش می‌یابد. بلانک در سال ۱۹۹۶ متابولیت‌های حاصل از تخمیر چای را با استفاده از قارچ کامبوچای در درصدهای مختلف شکر اندازه گیری نمودو میزان ساکارز، اتانول، اسیداستیک، اسیدلاکتیک و اسید گلوکونیک موجود در کامبوچای در طول فرایند تخمیر با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد نتایج نشان داد اسیدیته محصول به طور معنی‌داری $p<0.05$ در طول تخمیر افزایش نشان داد(Blanc, 1996).احیاء کربوهیدرات‌ها و تبدیل آن‌ها به اسیدهای آلی به وسیله میکرورگانیسم‌ها سبب افزایش اسیدیته در نوشیدنی کامبوچای گردید. مقادیر اسیدیته مشاهده شده با نتایج بدست آمده توسط دیگر محققانی که در تحقیقاتشان از کشت‌های آغازگر متفاوت و دم کرده‌های مختلفی از چای سبز و سیاه استفاده نموده بودند مطابقت داشت (Tsuru *et al*., 2021).

- تأثیر افزودن کامبوچای بر میزان pH شیر تخمیری

اندازه‌گیری pH عاملی است که مدت مناسب تخمیر را کنترل می‌کند و برای تعیین پایان فرایند تخمیر استفاده می‌شود (Malbaša *et al*., 2008). علاوه بر

[1] *Bifidobacterium longum*

این، غلظت یون هیدروژن عاملی است که می‌تواند رشد گونه‌های میکروارگانیسم‌های موجود در غذا را فعال یا متوقف کند. باکتری‌های اسید لاکتیک اسیدیته محیط را در محدوده pH، ۳/۶ تا ۶/۳ تحمل می‌کند pH بالای ۵/۴ رشد گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک را تسهیل می‌کند. pH بهینه مخمرها بستگی به جنس و گونه آنها دارد اما به طور متوسط در محدوده ۴/۵ تا ۶/۵ قرار دارد (Antolak & Kregiel, 2015). با افزایش میزان استفاده از کامبوچا ترکیبات پلی فنولی و اسیدی ناشی از فرآیند تخمیر که با متابولیزه شدن ساکارز همراه است افزایش می‌یابد که در نتیجه آن کاهش میزان pH را بهمراه دارد (Reiss, 1994). حیاء کربوهیدرات‌ها و تبدیل آن‌ها به اسیدهای آلی به وسیله میکرورگانیسم‌ها سبب کاهش pH در نوشیدنی کامبوچای گردید. یکی از مهمترین مشکلات در مصرف کامبوچای pH پایین و میزان بالای اسید استیک است، افزایشpH و کاهش میزان اسید استیک در این محصول می‌تواند حائز اهمیت باشد. این کار از طریق تغییر شرایط تخمیر از جمله تغییر نوع سوبسترا و یا تغییر گونه‌های میکروبی موجود در کشت کامبوچای امکان پذیر است (Balverdi *et al*., 2009). محققین نشان دادند pH در طی تخمیر تمام نوشیدنی‌های کامبوچای از ۳ به ۲/۶۰ کاهش یافت (Neffe Skocinska *et al*., 2017) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. pH پایین سبب کاهش کیفیت حسی محصول به سطح غیرقابل قبول می‌گردد (Chu & Chen, 2006). در طی فرایند تخمیر کامبوچای حاوی قند، دی ساکاریدها تحت تاثیر آنزیم‌ها و اسیدها به قندهای ساده مانند مونوساکاریدها تجزیه می‌شوند و نقش مخمرها در فرایند تخمیر تبدیل قند به الکل و دی اکسید کربن می‌باشد. به طور همزمان باکتری‌های اسید استیک روی قسمت‌های سلولزی کشت آغازگر کامبوچای زندگی می‌کنند و دارای نقش بسیار مهم در فرایند تخمیر می‌باشند و مسئول ایجاد لایه‌های سلولزی هستند علاوه بر آن این باکتری‌ها الکل تولید شده به وسیله مخمرها را به اسیدهای آلی متابولیزه می‌کنند. به غیر از اسیدهای آلی، متابولیت‌های ابتدایی در فرایند تخمیر کامبوچای قندهای ساده، دی اکسیدکربن و اتانل می‌باشند. اسیدهای گلوکورونیک و گلوکونیک فراورده‌های سلامت بخش اصلی نوشیدنی کامبوچای هستند که از ساکارز و چای سیاه

در یک فرایند تخمیر بهینه و تحت کنترل تولید می‌شوند. انتخاب صحیح شرایط تخمیر و انتخاب کشت‌های آغازگر کامبوچای، تولید یک نوشیدنی با بالاترین مقدار اسیدهای آلی سلامت بخش از جمله اسید گلوکورونیک را میسر می‌سازد. اسید گلوکورونیک بعد از اسید استیک یکی از اسیدهای آلی اصلی حاصل از تخمیر می‌باشد (Jayabalan *et al*., 2007). نتایج حاصل از تحقیق فوق با نتایج بدست آمده از سایر محققین که در مطالعاتشان از کشت‌های آغازگر متفاوت و دم کرده‌های مختلف چای سبز و سیاه استفاده نمودند مطابقت داشت (Tsuru *et al*., 2021)

- تأثیر افزودن کامبوچای بر میزان استیک اسید شیر تخمیری

اسید استیک محصول متابولیسم اتانل به وسیله باکتری‌های اسید استیک می‌باشد. مخمرهای موجود در کشت آغازگر قندها را به اسیدهای آلی، CO_2 و اتانل تبدیل می‌کنند سپس اتانل تولید شده به وسیله باکتری‌های موجود در کشت آغازگر به اسید استیک اکسید می‌شوند (Tsuru *et al*., 2021). تغییرات میزان اسید استیک به عنوان شاخص فرآیند تخمیر چای کامبوچا ارتباط مستقیم و معنی‌داری با منابع کربنی و میزان ساکارز مورد استفاده در سیستم دارد (Zhao & Shah, 2014). به طور کلی یک روند افزایشی در میزان ترکیبات اسید استیک موجود در شیر تخمیری دارای چای کامبوچا با افزایش میزان غلظت استفاده از چای کامبوچا وجود داشت. اسید استیک باکتری‌ها یکی از متابولیت‌های اصلی حاصل از تخمیر چای کامبوچا می‌باشد. با رشد باکتری‌ها در طی فرآیند تخمیر خصوصا در سه روزه ابتدایی فرآیند تخمیر که به دوره کمون معروف می‌باشد، بیشترین میزان اسید استیک از تخمیر ساکارز تهیه می‌شود (Blanc, 1996). با افزایش میزان غلظت کامبوچا در شیر تخمیری ، میزان ساکارز موجود در شیر تخمیری نیز به نسبت افزایش می‌یابد که به نوبه خود باعث افزایش میزان اسید استیک می‌گردد. همچنین غلظت‌های بالاتر چای کامبوچا دارای میزان بالاتری از جمعیت استوباکتر بوده که باعث افزایش میزان

متابولیت‌های اسیدی ناشی از تخمیر ساکارز و تولید مقادیر قابل ملاحظه‌ای از اسید استیک و ساکارینیک اسید می‌شود که درصد اسید استیک را در شیر تخمیر به طور قابل ملاحظه‌ای بالا می‌برد. Spasenija و همکاران (۲۰۱۲) در تولید نوشیدنی شیر تخمیری کم کالری کمبوچا نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. آنها ترکیبی از استارتر پروبیوتیک و تلقیح کامبوچای کشت شده بر روی چای سیاه و چای تایلندی را برای تخمیر شیر استفاده نمودند. نتایج آنها نشان داد که میزان تولید اسید استیک در روزهای ابتدایی به طور معنی داری بالاتر از انتهای فرآیند تخمیر بوده و منابع کربنی مورد استفاده نقش مهمی در تولید میزان اسید استیک تولیدی و همچنین میزان فعالیت میکروارگانیسم دارد که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت داشت (Spasenija *et al*., 2012). محققین نشان دادند غلظت اسید استیک در طی فرایند تخمیر به علت استفاده از گلوکز به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک افزایش یافت که با نتیجه تحقیق حاضر مطابقت داشت (Neffe Skocinska *et al*., 2017). Jaybalan و همکاران در سال ۲۰۱۴گزارش داد اسیدهای آلی متنوعی از جمله استیک، گلوکونیک، سیتریک، L – لاکتیک، مالیک، تارتاریک، اگزالیک و سوکسینیک در کامبوچای موجود است (Jaybalan *et al*., 2014).

- تأثیر افزودن کامبوچای بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی شیر تخمیری

آنتی اکسیدان‌ها از مواد موجود در مواد غذایی هستند که خاصیت دفاعی سلول را بالا می‌برند و از صدمات اکسیدان‌ها (رادیکال‌های آزاد) به سلول‌های بدن جلوگیری می‌کنند (Ranjbar nadamani *et al*., 2012). فلاونوئیدها و فنل ها نیز مانند دیگر ترکیبات ثانویه طبیعی به طور فعال باعث کاهش بیماری‌های قلبی – عروقی و سرطان می‌شود و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی می‌باشند. میزان این مواد علاوه بر نوع واریته به‌عواملی چون فصل رشد و محل رویش گیاه نیز بستگی دارد (Ranjbar nadamani *et al*., 2012). با افزایش مدت زمان نگهداری بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزوده شد دلیل عمده این تغییرات مربوط به ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در کامبوچا مانند پلی‌فنول‌ها و کاتچین‌ها می‌باشد (Ranjbar nadamani *et al*., 2012). چای سیاه یک منبع مهمی از ترکیبات پلی‌فنولی به ویژه فلاونوئیدهاست. مهمترین فلاونوئید موجود در چای کاتچین‌ها است که خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی آن را نیز به همین کاتچین‌ها می‌دهند (Nikjoo & Nowriyan, 2013). پلی‌فنول‌ها مهم ترین عوامل ایجاد خواص آنتی‌اکسیدانی در چای می باشند که گروه کاتچین‌ها در آنها به وفور یافت می شوند. کاتچین‌ها در غلظت بالا در چای سیاه وجود دارند و بطور کلی به گروهی از سازنده‌ها تعلق دارند که به فلاونوئیدها معروفند. یکی ازمنابع مهم آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برگ سبز چای است که حاوی گروه‌هایی از آنتی‌اکسیدان‌های پلی فنلی می‌باشد (Nikjoo & Nowriyan, 2013). در طی زمان نگهداری نیز به دلیل افزایش تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی ناشی از تکمیل دوره بیست و هشت روز تخمیر چای کامبوچا توسط استوباکترها بر میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی شیر تخمیری نیز افزوده می‌شود (Nikjoo & Nowriyan, 2013). نتایج تحقیقات Duenas و همکاران در سال (۲۰۰۷) نشان داد که ترکیبات پلی فنولیک بیوفعال ترکیبات لنتین به جهت کاربرد آنزیم‌هایی مانند فیتات، آلفاگالاکتوزیداز و تاناز می‌باشد که باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی چای کامبوچا می‌باشد. همچنین تغییرات آنزیمی آزاد شده توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها در طی تخمیر چای کامبوچا می‌تواند عامل احیاء ترکیبات پلی فنولی پیچیده به مولکول‌های کوچک باشد که باعث افزایش ترکیبات پلی فنولیک کل شود (Duenas *et al*., 2007). با افزایش زمان نگهداری به جهت ناپایداری نسبی ترکیبات پلی فنولی تا حدودی از فعالیت آنتی اکسیدانی نیز کاسته می‌شود.Amarasinghe و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند به طور کلی خاصیت جاذب بودن DPPH نمونه چای کامبوچای تخمیر شده با افزایش زمان تخمیر به طور معنی‌داری $P<0.05$ افزایش یافت این موضوع بیانگر این است که فعالیت آنتی اکسیدانی در اصطلاح پتانسیل جاذب رادیکال DPPH به طور معنی داری $P<0.05$کاهش یافت (Amarasinghe *et al*., 2018).

- تأثیر افزودن کامبوچای بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک شیر تخمیری

کاهش شدید pH با افزودن کامبوچای منجر به کاهش قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک شده است. از طرفی با افزایش زمان نگهداری نیز از روز سوم به روز بیست و هشتم جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک کاهش یافت. در روز سوم هنوز مقدار قابل توجهی مواد مغذی برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک در محیط وجود دارد که منجر افزایش نرخ زنده مانی شمارش باکتری‌های پروبیوتیک می‌شود ولی با گذشت زمان به علت مصرف سوبسترا (مواد مغذی) جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک باقیمانده کاهش می‌یابد و مسئله مهم دیگر تغییرات فاز رشد باکتری از فاز لگاریتمی رشد به فاز سرعت یکنواخت و پیر شدن باکتری‌های پروبیوتیک باعث افت جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک با گذشت زمان می‌گردد (Zhao & Shah, 2014). بقای پروبیوتیک مربوط به تولید ترکیبات لاکتیکی و پروتئینی ناشی از فرآیند تخمیر چای کامبوچا می‌باشد زیرا ترکیبات لاکتیکی و پروتئینی به عنوان سوبسترا عمل می‌کنند و باعث تقویت رشد و بقای باکتری‌های پروبیوتیک می‌گردند از آنجا که تولید این ترکیبات ناشی از فرآیند تخمیر چای کامبوچا می‌باشد افزایش میزان جمعیت پروبیوتیک وابسته به غلظت کامبوچای و فرآیند تخمیر دارد (Balvardi *et al*., 2009). غلظت‌های بالای کامبوچا به دلیل افزایش شدت فرآیند تخمیر، افزایش میزان اسیدیته و کاهش میزان pH را در برداشته به عنوان سوبسترا عمل می‌کنند و باعث کاهش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک می‌گردد (Abghari *et al*., 2008; Naemi *et al*., 2013). از طرفی با افزایش درصد چای کامبوچا به جهت بالا رفتن ترکیبات تانن و همچنین اسید گالیک و ترکیبات پلی فنولی غشای سلولی دیواره‌های باکتری دچار پلاسمولیز و نشت ترکیبات درون سلولی به خارج شده و از میزان بقای آن‌ها کاسته می‌شود (Dufresne *et al*., 2000). از طرفی در طی زمان نگهداری با کاهش منابع غذایی و همچنین تجمع ترکیبات متابولیت ناشی از متابولیسم باکتری‌ها، افزایش دی سولفید ناشی از تخمیرهای بالا در انتهای روز بیست و هشتم و دی اکسید گوگرد که به منزله سم برای چرخه کربس و تولید ATP می‌باشد، میزان زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک به طور معنی‌داری کاهش می‌یابند (Dufresne *et al*., 2000).

- تأثیر افزودن کامبوچای بر ویژگی‌های حسی شیر تخمیری

بررسی نتایج ارزیابی خصوصیات حسی نشان داد که استفاده از ترکیبات چای کامبوچا در مقادیر بالاتر از ۵ درصد در شیر تخمیر شده باعث کاهش امتیازات ارزیاب‌ها گردید. به نظر می‌رسد که یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی خصوصیات شیر تخمیری ، میزان اسیدیته و pH آن می‌باشد. از آن جایی که در مقادیر بالای استفاده از چای کامبوچا در فرمولاسیون شیر تخمیری (تیمارهای T2 حاوی ۱۰درصد و T3 حاوی ۱۵ درصد چای کامبوچا) میزان اسیدیته به شدت افزایش می‌یابد ، از نظر ارزیاب‌ها مورد تایید نبوده و امتیازات آن به طور معنی داری کاهش می‌یابد . همچنین در طی نگهداری نیز به دلیل افت میزان اسیدیته به مقادیر بالاتر در انتهای روز بیست و هشتم نگهداری و همچنین کامل شدن فرآیند تخمیر میزان مقبولیت طعم و مزه به طور معنی‌داری کاهش یافت. عطر و طعم محصول نیز به طور معنی داری با افزایش میزان تخمیر و به جهت افزایش حجم گاز و حباب‌های هوای ناشی از فرآیند تخمیر کامبوجا و افزایش میزان ورود هوا به درون ترکیبات شیر و تولید ترکیبات دی سولفیدی و اسید ساکارینیک خصوصا در انتهای روز چهاردهم و بیست و هشتم نگهداری به طور معنی داری کاهش می‌یابد که باعث کاهش میزان امتیازات عطر و طعم محصول می‌گردد (Milanović *et al*., 2008).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق با بررسی اثرات آن بر روی میزان زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک ملاحظه گردید که استفاده از کامبوچا در مقادیر ۵ درصد به طور معنی داری باعث کاهش میزان زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک و بهبود فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و بهبود ویژگی‌های حسی گردید اما در مقادیر بالای ۵ درصد به دلیل کاهش امتیازات ارزیابی حسی و افزایش اسیدیته استفاده از آن چندان مورد توجه نبوده و پذیرفته نمی شود. نتایج نشان داد میزان پروتئین، اسیدیته، اسید استیک و فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش میزان کامبوچای در طول دوره نگهداری افزایش اما میزان pH و جمعیت پروبیوتیک باکتری‌ها به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$). کاهش یافت.در طی دوره نگهداری

میزان زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک به طور معنی داری کاهش یافت ولی بالاتر از حد استاندارد قابل قبول محصولات پروبیوتیک بود. همچنین مشخص گردید، افزودن کامبوچای در سطح ۵ درصد، تیمار T_1 می‌تواند در بهبود اکثر ویژگی‌های حسی نقش مؤثرتری داشته باشد به عنوان تیمار برتر انتخاب شد.

منابع

Amarasinghe, H., Serwandika Weerakkody, N. & Viduranga, Y. (2018). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha "Tea Fungus" during extended periods of fermentation. Journal of Food Science & Nutrition, 00, 1-7.

Abghari, A., Mahmood sheikh zeinoaldin, M., Soleiman nejad, S. & Dokhani, Sh. (2008). Evaluation of survival of Lactobacillus acidophilus in a non-fermented ice cream. 18th National Congress of Food Science and Industry, Mashhad, Iran. [In persian]

Antolak, H., Pichota, D. & Kucharska, A. (2021). Kombucha tea- a double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts(SCOBY). Journal of Antioxidents, 10(10), 1-21.

Antolak, H. & Kręgiel, D. (2015). Acetic acid bacteria – taxonomy, ecology,and industrial application. Zywnosc Nauka Technologia Jakosc, 4(101), 21–35.

Anon. (2013). Probiotic yoghurt. Institute of Standards and Industrial Research Iran. National Standard of Iran, No.11325. [In Persian]

AOAC. (1995). Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, Unites States.

Bagheri, F., Mirdamadi, S., Mirzaee, M. & Safavi, S. M. (2019). Production of beneficial fermented milk by lactobacilli isolated from traditional Iranian dairy products. Journal of Innovative Food Technologies, 7(2), 243-255. [In persian]

Balvardi, M., Safari, M., Habibi Rezaee, M., Hoseini, S. M. H., Rezaee, K. & Mousavi Movahedi, A. A. (2009). Production of kambucha drink using inulin gland of pickled potato. Journal of Food Science and Technology, 8(29), 89-100. [In persian]

Benno, Y. & Mitsuoka, T. (1992). Evaluation of the anaerobic method for the analysis of fecal microflora of beagle dogs. Journal of Veterinary Medicine Sciences, 54, 1039-1041.

Blanc, P. J. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. Biotechnology letters, 18(2), 139-142.

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D. & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. International Journal of Food Microbiology, 220, 63–72.

Chen, C. & Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. Journal of applied microbiology, 89(5), 834-839.

Chu, S. C. & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. Journal of Food Chemistry, 98(3), 502-507.

Dan-Zhou, D., Saimaiti, A., Luo, M., Huang, S. Y., Xiong, R. G., Shang, A., Gan, R. Y. & Li, H. B. (2022). Fermentation with tea residues enhances antioxidant activities and polyphenol contents in kombucha beverages. Journal of Antioxidants, 11(1), 1-17.

Dueñas, M., Hernández, T. & Estrella, I. (2007). Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. Journal of Food Chemistry, 101(1), 90-97.

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

Ferdowsifard, M., Fazeli, M. R. Samadi, N. & Jamalifar, H. (2011). Stability of fermented and non-fermented probiotic milk prepared using three native species of Lactobacillus. Journal of Food Science and Nutrition, 8(4), 13-20. [In persian]

Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H. & Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. Journal of Food Protection, 63(7), 976-981.

Greenwalt, C. J., Ledford, R. A., & Steinkraus, K. H. (1998). Determinationand characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. Food Science and Technology, 31, 3291–3296 .

Gilson, M. K. (2004). Multiple-site titration and molecular modeling: Two rapidmethods for computing energies and forces for ionizable

groups in proteins. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics,15(3), 266 - 282.

Jakubczyk, K., Kaldunska, J., Kochman, J. & Janda, K. (2020). Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. Antioxidents, 9, 1-15.

Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J. & 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.

Jayabalan, R., Marimuthu, S. & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. Journal of Food Chemistry, 102(1), 392-398.

Khodavaisy, S., Fakhim, H., Oliya, S., Mehrnaz, M., Behnam, H. & Badali, H. (2016). Probiotics and antibiotics in medicine. Tabari Journal of Preventive Medicine, 2(2), 44-53. [In persian]

Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L. & Liao, C. C. (1996). The isolation andidentification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, andtheir interactions during Haipao fermentation. Food Microbiology, 13,407–415 .

Li, S., Zhang, Y., Gao, J., Li, T., Li, H., Mastroyannis, A., He, S., Rahaman, A. & Chang, K. (2022). Effect of fermentation time on physicochemical properties of kombucha produced from different Teas and Fruits: Comparative study. Journal of Food Quality, 1, 1-10.

Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S. & Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. Journal of Food chemistry, 127(4), 1727-1731.

Malbaša, R. V., Milanović, S. D., Lončar, E. S., Djurić, M. S., Carić, M. Đ., Iličić, M. D. & Kolarov, L. (2009). Milk-based beverages obtained by Kombucha application. Journal of Food Chemistry, 112(1), 178-184.

Malbaša, R. V., Lončar, E. S. & Djurić, M. (2008). Comparison of the productsof Kombucha fermentation on sucrose and molasses. Food Chemistry, 106, 1039–1045.

Milanović, S. D., Lončar, E. S., Đurić, M. S., Malbaša, R. V., Tekić, M. N., Iličić, M. D. & Duraković, K. G. (2008). Low energy kombucha fermented milk-based beverages. Acta Periodica Technologica, (39), 37-46.

Miranda, B., Lawton, N. M., Tachibana, S. R., Swartz, N. A. & Hall, W. P. (2016). Titration and HPLC characterization of Kombucha fermentation: A Laboratory Experiment in Food Analysis. Journal of Chemical Education, 93, 1770-1775.

Mohammadi, R. & Mortazavian, S.A.M. (2002). Technology and stability of probiotics in fermented milk products. First National Conference of Probiotic and Functional Foods.Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Mousavi, S. Z., Mohamadzadeh Milani, J. & Rouzbeh Nasiraee, L. (2015). Qualitative properties of picoli pasta fortified with wheat bran. Journal of Food Research, 26(1), 1-11. [In persian]

Naemi, H., Mortazavi, S. A., Milani, A. & Koocheki, A. (2013). The effect of inulin addition and microencapsulation process on the survival rate of Lactobacillus casei during the storage period of synbiotic ice cream yogurt. Iranian Journal of Food Science and Technology,10(40), 27-36. [In persian]

Neffe-Skocinska, K., Sionek, B., Scibisz, I. & Kolozyn-Krajewska, D. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. CYTA-Journal of Food, 15(4), 601-607.

Nikjoo, R. & Nowriyan, N. (2013). An overview of the antioxidant properties of green tea. Twenty-first National Congress of Food Science and Technology, Shiraz, Shiraz University, Iran. [In persian]

Omidi, B., Fazeli, M., Amozegar, M. A. & Jamalifar, H. (2010). Probiotic enrichment of Iranian yellow carrot juice (turmeric) by four species of Lactobacillus. Journal of Microbiological Knowledge, 2(6), 51-58. [In persian]

Pasha, C. & Reddy, G. (2005). Nutritional and medicinal improvement of black tea by yeast fermentation. Journal of Food chemistry, 89(3), 449-453.

Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S. & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, 100(6), 1171-1185.

Puspawati, Ni. N. & Arihantana, Ni. M. I. H. (2016). Viability of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kombucha tea against low pH and bile salt, Media. Ilmiah Teknologi Pangan, 3(1), 18-25.

Ranjbar nadamani, A. & Sadeghi Mahonak, A. R. (2012). Comparison of antioxidant properties of rosemary and oak green tea as a synthetic antioxidant alternative. The first national conference on strategies for achieving sustainable development, pp. 34-40. [In persian]

Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 198(3), 258-261.

Rouhi, M., Mohammadi, R., Sarlak, Z., Taslimi, A., Zabih zadeh, M. & Mortazavian, A. M. (2015). Investigation of biochemical, microbiological and sensory properties of synbiotic chocolate milk. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Industry, 10(2), 47-58.

Saarela, M. (Ed.). (2007). *Functional dairy products*. Elsevier. USA.pp. 127-132. [In persian]

SAS Institute (1988) SAS/STAT User's Guide Cary, NC, SAS Institute

Spasenija, M., Katarina, K., Vladimir, V., Dajana, H., Mirela, I., Marjan, R. & Maja, M. (2012). Physicochemical and textural properties of kombucha fermented dairy products. African Journal of Biotechnology, 11(9), 2320-2327.

Sreeramulu, G., Zhu, Y. & Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. Journal of agricultural and food chemistry, 48(6), 2589-2594.

Suciati, F., Nurliyani, N. & Indratiningsih, I. (2019). Physicochemical, Microbiology and Sensory properties of fermented whey using Kombucha Inoculum. Bulletin of Animal Science, 43(1), 52-57.

Tsuru, V. H., Gomes, R. J., Silva, J. R., Prudencio, S. H. & Costa, G. N. (2021). Physicochemical, antioxidant and sensory properties of kombucha beverages obtained from oolong or yerba mate tea fermentation. Journal of Research, Society and Development, 10(11), 1-12.

Velićanski, A., Cvetković, D. & Markov, S. (2013). Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. Romanian Biotechnological Letters, 18(1), 8034-8042.

Vojdani, R. & Zali, M.R. (2003). Probiotics and their mechanism of action in the prevention and treatment of human diseases. Journal of Medical Research, 27(4), 319-330.

Vukic, V. R., Hrnjez, D. V., Kanuric, K. G., Milanovic, S. D., Iličic, M. D., Torbica, A. M. & Tomic, J. M. (2014). The effect of kombucha starter culture on the gelation process, microstructure and rheological properties during milk fermentation. Journal of Texture Studies, 45(4), 261-273.

Zhao, D. & Shah, N. P. (2014). Influence of tea extract supplementation on bifidobacteria during soymilk fermentation. International journal of food microbiology, 188, 36-44.

The Effect of Addition of Kombucha Drink on Physicochemical, Sensory Characteristics and Viability of Probiotic Bacteria of Fermented Milk

A. Shahab Lavasani [a, c *], M. Zandi [b], L. Nateghi [c]

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

[b] MSc Student of the Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

[c] Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

Received: 12 February 2022 Accepted: 3 August 2022

Abstract

Introduction: Nowadays, the selection of probiotics has an important role in the development of the country's food industry and the production of probiotic dairy products is the main indicator of this progress, on the other hand, the quality, sensory and viability characteristics of probiotics in manufactured products are the main problems of most industrial factories. In this study, the effect of different concentrations of kombucha drink on the viability of *Lactobacillus acidophilus, bifidobacterium bifidum, Lactobacillus Rhamnosus* was studied and physicochemical and sensory characteristics of fermented milk were measured.

Materials and Methods: Different levels of Kombucha tea 0, 5, 10, 15 and 20 ml/L were added to probiotic fermented milk containing *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *L. Rhamnosus* bacteria (Cfu/ml 10^7) .Viability rate of probiotic bacteria, pH, percentages of protein, acidity (Dornic), acetic acid, antioxidant compounds were measured during 3, 7, 14 and 28th of storing period at 4 $^{\circ}$C.

Results: The results showed that higher amounts of kombucha caused higher content of protein, acidity, acetic acid and antioxidant activity. The average amounts of theses parameters were respectively 0.12, 0.02, 15.694 and 0.16. however, pH and viability of probiotic bacteria significantly decreased during the storage period (p<0.05) and average amounts of these parameters were respectively0.79 and 0.046, However, the mentioned indices were higher than the acceptable standard of probiotic products.

Conclusion: It was concluded that the addition of kombucha up to 5% might be more effective in improving sensory characteristics. Hence, a treatment containing 5% of kambucha was selected as the best among others.

***Keywords**: Fermented Milk, Kombucha, Probiotic Bacteria, Physicochemical Characteristics.*

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