نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد ششم، شماره دوم، ۹۳
۹۷-۱۱٤
http://ejfpp.gau.ac.ir

بررسی قابلیت زنده مانی باکتری‌های آغازگر در ماست غنی شده با فلاونوئید و روغن استخراج شده از پوست پرتقال

هانیه زاهدی[۱]، *وجیهه فدائی نوغانی[۲] و لیدا خلفی[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران، [۲]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران، [۳]استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۸

چکیده

امروزه گرایش زیادی برای مصرف مواد غذایی فراسودمند به‌وجود آمده است. مواد غذایی فراسودمند موادی هستندکه حداقل یک خاصیت سلامت بخش مشخص به اثبات رسیده علاوه بر خواص تغذیه‌ای پایه داشته باشد. هدف از این پژوهش تولید ماست طعم دار فراسومند از طریق غنی سازی ماست با فلاونوئید و روغن استخراجی از پوست پرتقال و بررسی قابلیت زنده مانی باکتری‌های آغازگر در ماست تولیدی در طی زمان نگهداری ۱۵ روز و تعیین اثر فلاونوئید و روغن استخراجی از پوست پرتقال بر قابلیت زنده مانی باکتری‌های آغازگر در ماست بود. در پژوهش حاضر در دو مرحله صورت گرفت؛ در مرحله اول، فلاونوئید و روغن از پوست پرتقال استخراج گردیدند و در مرحله دوم، ماست طعم دار غنی شده با درصدهای مختلف فلاونوئید (۷، ۸ و ۹ درصد) و روغن (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) استخراجی از پوست پرتقال تولید شد. نتایج نشان داد که افزایش میزان روغن اثر منفی بر رشد باکتری‌های آغازگر ماست، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، داشت.

واژگان کلیدی: ماست طعم‌دار، فلاونوئید، روغن پوست پرتقال، قابلیت زنده‌مانی، باکتری‌های آغازگر

*نویسنده مسئول: vn.fadaei@gmail.com

مقدمه

در حال حاضر، گرایش زیادی به مصرف موادغذایی فراسودمند یعنی غذاهای دارای ارزش دارویی و تغذیه‌ای ویژه علاوه بر خواص تغذیه‌ای پایه به‌وجود آمده است. ماده غذایی فراسودمند، غذایی است که در بردارنده دست کم یک خاصیت سلامت بخش مشخص و به اثبات رسیده، افزون بر خواص تغذیه‌ای پایه باشد (شورت و اوبرین، ۲۰۰۳). امروزه، غنی‌سازی مواد غذایی با این ترکیبات بسیار مورد توجه قرار گرفته است؛ به‌عنوان مثال غنی‌سازی با ویتامین‌ها، املاح، آنتی‌اکسیدان‌ها، پری بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها (اسشفر و نلسون، ۲۰۰۰).

ماست یک محصول تخمیر شده لبنی است که از تخمیر شیر به‌وسیله *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به‌دست می‌آید (کراساکوپت و همکاران، ۲۰۰۳؛ سایتو، ۲۰۰٤). امروزه، این فراورده، رایج‌ترین و پرمصرف‌ترین محصول لبنی تخمیری است (کریتندن و همکاران، ۲۰۰۱؛ خورانا و کاناوجیا، ۲۰۰۷؛ مهدیان و تهرانی، ۲۰۰۷). رضایت مصرف کننده ماست، بیشتر تحت تأثیر خواص حسی نظیر رنگ و بافت ماست قرار دارد و این، در ماست‌های طعم دار تشدید می‌گردد (یامان و همکاران، ۲۰۰٦). ماست بدون طعم افزوده شده، به‌دلیل وجود اسید لاکتیک، طعم اسیدی دارد که این ویژگی در ماست‌های طعم‌دار، با افزودن میوه‌ها، طعم‌دهنده‌ها و شیرین‌کننده‌ها اصلاح می‌شود و بهبود می‌یابد (یامان و همکاران، ۲۰۰٦).

تولید ضایعات حاصل از فراوری میوه‌ها و سبزی‌ها همواره یکی از مشکلات مورد توجه پژوهشگران بوده است. نظر به این که مقادیر بالایی از مرکبات به‌منظور تولید آب میوه، فرآوری می‌شوند و فرآورده جانبی شامل بقایای پوست، غشاء، دانه و ترکیبات دیگر دور ریخته می‌شود، توجه به‌این ضایعات حائز اهمیت است. ضایعات مربوط به تولید آب پرتقال شامل پالپ خشک شده و ملاس،پکتین، روغن‌های تولید شده با پرس سرد، اسانس‌ها، دی-لیمونن، اتانول، روغن دانه، لیمونوئیدها و فلاونوئیدها می‌باشند (اوزاکی و همکاران، ۲۰۰۰). روغن استخراج شده از پوست پرتقال، محصولی فرعی از صنعت آب پرتقال‌گیری است که به‌وسیله تحت فشار قراردادن پوست پرتقال به‌دست می‌آید. این روغن به‌عنوان طعم‌دهنده در غذاها و نوشیدنی‌ها کاربرد دارد و از اسانس آن در تهیه عطرها و روش‌های درمانی با مواد معطر استفاده می‌شود (رئیسی و همکاران، ۲۰۰۸). نود درصد این روغن، دی-لیمونین می‌باشد. لیمونین، ترکیبی است که عطر خاص مرکبات را شامل می‌شود (پینو و همکاران، ۲۰۰٦).

رنگدانه‌های طبیعی به‌دلیل اثرات سلامت بخشی بالایی که دارند به‌عنوان ترکیبات فراسودمند (سلامتی بخش) طبقه‌بندی می‌شوند. فلاونوئیدها، رنگدانه‌های طبیعی پلی فنلی می‌باشند؛ طیف رنگی آن‌ها در محدوده زرد تا نارنجی است؛ هسته اولیه همه آن‌ها بنزوپیرنی می‌باشد؛ قابل انحلال در آب بوده و در دماهای بالا پایدار می‌باشند. افزودن رنگ‌های طبیعی به سیستم‌های غذایی از نظر پایداری پائین آن‌ها به فرآیندهای مربوطه و شرایط نگهداری و حضور بوی نامطلوب یا ویژگی‌های طعمی نامناسب در فرآوردهنهایی حائز اهمیت است.استفاده از شکل آسیل شده رنگدانه‌ها برای بهبود پایداری آن‌ها توصیه شده است (گیوستی و ورلستد، ۲۰۰۳). فلاونوئیدها به ۳ دسته فلاونوئید بالا (بیش از ۵ گرم فلاونوئید در هر ۱۰۰ گرم ماده غذایی)، فلاونوئید متوسط (بین ۱ تا ۵ گرم فلاونوئید در هر ۱۰۰ گرم ماده غذایی) و فلاونوئید پایین (کمتر از ۱ گرم در هر ۱۰۰ گرم ماده غذایی) طبقه‌بندی می‌شوند. مرکبات در گروه فلاونوئید بالا قرار دارند. از مهمترین اثرات سلامت بخشی فلاونوئیدها می توان به تسهیل عمل هضم، کمک به بهبود بیماری‌های عفونی، کاهش‌دهنده کلسترول خون و جلوگیری از سرطان اشاره کرد. فلاونوئیدها دارای اثرات محافظت کنندگی بر بیماری‌های قلبی- عروقی و ضد توموری نیز هستند (کائو و همکاران، ۱۹۹۷؛ وال، ۲۰۰٤). میزان فلاونوئیدهای موجود در پوست پرتقالدر قیاس با پالپ آن بسیار بیشتر است. پوست پرتقال منبع غنی از پلی‌متوکسیلات فلاون‌ها می‌باشد (مانتی، ۲۰۰۵). پلی متوکسیلات فلاون‌ها، گروهی از فلاونوئیدها هستند که به‌طور عمده در پوست مرکبات نظیر پرتقال وجود دارند. این ترکیبات دارای دو یا چند متوکسیل روی ساختار فلاونوئیدی پایه خود هستند (جاگر و سابی، ۲۰۱۱). مزایای سلامتی بخش و مفید ترکیبات مذکور در چند سال اخیر مورد توجه بیشتری قرار گرفته است تا جایی که از این رنگدانه‌های طبیعی به منظور افزایش خواص تغذیه‌ای و بهبود ویژگی‌های کیفی مواد غذایی مختلف استفاده می‌گردد (لی و همکاران، ۲۰۱۰).خواص ضدالتهابی (لین و همکاران، ۲۰۰۳؛ آکاوو و همکاران، ۲۰۰۸)، ضدسرطانی (لی و همکاران، ۲۰۰۷)، ضدجهش‌زایی و ضدقارچی این ترکیبات در بسیاری از منابع علمی بیان شده است .همچنین، پلی متوکسیلات فلاون دارای اثرات سلامت بخشی نظیر افزایش ترشح هورمون چربی سوز آدیپونکتین، افزایش ترشح انسولین، کاهش خطر ابتلا به هپاتیت و کاهش وزن در اثر دفع چربی ماده غذایی می‌باشد (لی و همکاران، ۲۰۱۰).

در اکثر پژوهش‌ها به بررسی استخراج فلاونوئیدها و گاه، کاربرد آن‌هاو همچنین، روغن پوست پرتقال در صنعت غذا پرداخته شده است. برونر و همکاران (۱۹۹۵) با استخراج متانولی، اندازه‌گیری و

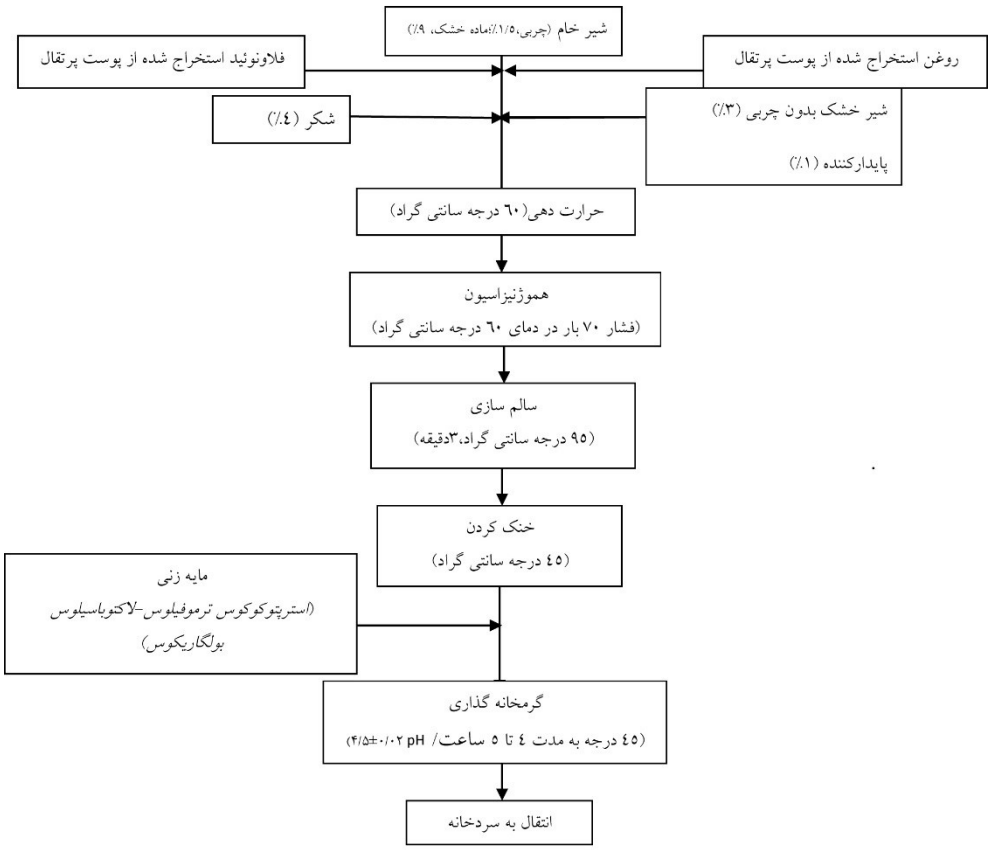
بررسی فلاونوئیدها در پرتقال و گریپ فروت، به حضور بیشتر فلاونوئیدها در پالپ پرتقال پی بردند. جینگ و گیوست (۲۰۰۷) با بررسی اثر چربی بر پایداری شیر غنی شده با فلاونوئیدها به‌این نتیجه رسیدند که میزان چربی اثر محافظت‌کنندگی بر فلاونوئیدهای آسیله شده (حاصل از عصاره ذرت ارغوانی) در شیر دارد.کویسون و همکاران (۲۰۰۵)، با افزودن رنگ آب میوه *Euterpe oleracea* به‌عنوان رنگ فرا سودمند به ماست گزارش کردند که رنگ آب میوه *Euterpe oleracea* (منبع غنی از فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها) در محدوده pH طبیعی ماست پایدار است. حسین و لی (۲۰۰۶)، ترکیبات فنلی را از پوست مرکبات با استفاده از حلال جداسازی کردند. شیمینگ و همکاران (۲۰۰۷)، روش‌های مناسب و کارآمد جهت جداسازی پلی‌متوکسیلات فلاون‌ها از پوست پرتقال را با استفاده از کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی شناسایی کردند. رزورگ و لوکا (۲۰۰۹) روغن پوست پرتقال را به‌عنوان طعم دهنده به نوشیدنی‌ها افزودند. اوانس و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی نقش پلی متوکسیلات فلاون‌ها در درمان مشکلات متابولیکی و فشار خون بالا، حضور این ترکیبات را در داروها در مقادیر مختلف توصیه کردند و همچنین، متوجه بهبود وضعیت متابولیسم بدن در صورت مصرف روزانه تنگریتین و نوبلیتین شدند. پاتیل و همکاران (۲۰۱۱)، روش سریع جداسازی پلی‌متوکسیلات فلاون‌ها از پوست پرتقال را با استفاده از کروماتوگرافی شناسایی کردند.همان‌طورکه ملاحظه می‌شود در هیچکدام از این نتایج، به اثر روغن و فلاونوئید استخراجی از پوست پرتقال بر قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های آغازگر ماست اشاره نشده است. لذا در این پژوهش، اثر روغن و فلاونوئید استخراجی از پوست پرتقال بر قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های آغازگر ماست مورد بررسی قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

الف- مواد اولیه: کشت منجمد شده با نام تجاری YF-L904 (شامل باکتری‌های آغازگر ماست *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*) از شرکت کریستین هنسن (دانمارک)، شیر خشک بدون چربی (Nznp، نیوزلند)، شیر خام از شرکت دامداران، شکر از شرکت لیوار (ایران) و پایدارکننده (کربوکسی متیل سلولز، پری ژل، منو و دی گلیسرید اسیدچرب) از شرکت لاکتوپروت (دانمارک) تهیه شدند. مواد آزمایشگاهی مورد نیاز جهت انجام آزمون‌ها از شرکت مرک آلمان خریداری گردید.

ب- روش تهیه نمونه‌های ماست

شماتیک فرآیند تولید در شکل ۱ نشان داده شده است و تیمارهای مورد بررسی در جدول ۱ معرفی شده‌اند.



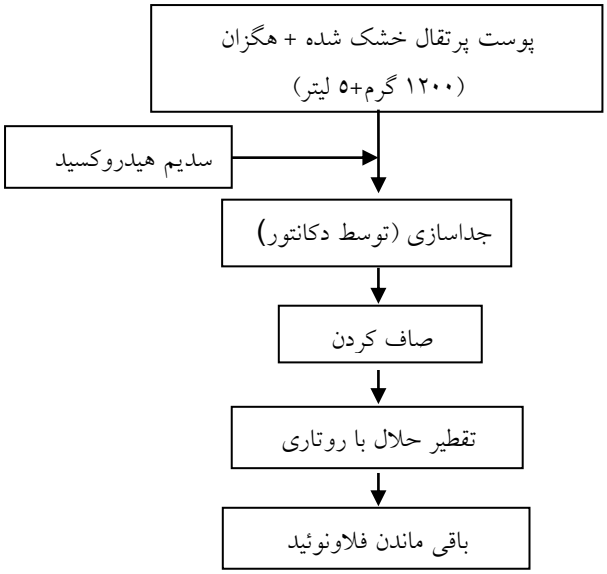
شکل ۱- شماتیک فرایند تولید ماست فراسودمند غنی شده با روغن و فلاونوئید استخراج شده از پوست پرتقال

جدول ۱- معرفی تیمارهای مورد استفاده در پژوهش.

تیمار	روغن (gr/100gr)	فلاونوئید (درصد)
نمونه y_1	۰	۷
نمونه y_2	۰/۵	۷
نمونه y_3	۱	۷
نمونه y_4	۱/۵	۷
نمونه y_5	۰	۸
نمونه y_6	۰/۵	۸
نمونه y_7	۱	۸
نمونه y_8	۱/۵	۸
نمونه y_9	۰	۹
نمونه y_{10}	۰/۵	۹
نمونه y_{11}	۱	۹
نمونه y_{12}	۱/۵	۹

پ- روش استخراج فلاونوئید

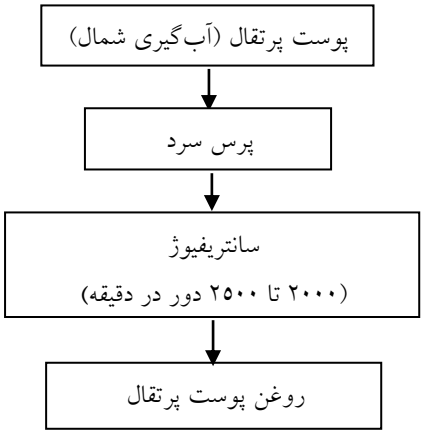
استخراج فلاونوئید در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲- استخراج فلاونوئیدها.

ت- استخراج روغن از پوست پرتقال

نحوه استخراج روغن از پوست پرتقال در شکل ۳ آورده شده است.



شکل ۳- استخراج روغن از پوست پرتقال.

ث- آزمون‌های فیزیکوشیمیایی

pH نمونه‌ها طبق استاندارد شماره ۲۸۵۲، طی تخمیر با استفاده از pH متر (مدل WTW، کشور سازنده آلمان) طی مدت نگهداری اندازه‌گیری شد. اسیدیته قابل تیتر نمونه‌ها طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲، طی مدت نگهداری با تیتر کردن مولکول‌های اسید آلی در نمونه با سود ۰/۱ نرمال و در حضور معرف فنل فتالئین اندازه‌گیری شد، سپس با جایگذاری در رابطه ۱ به درجه درنیک به‌دست آمد.

رابطه (۱)
$$\text{درصد اسیدیته قابل تیتر (بر حسب اسید لاکتیک)} = \frac{\text{میلی اکی والان گرم اسید لاکتیک} \times \text{نرمالیته سود} \times \text{مقدار سود مصرفی به میلی لیتر}}{\text{وزن نمونه اولیه به گرم}}$$

ج- قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های آغازگر ماست

باکتری‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، میکروارگانیسم‌های گرمادوستی هستند که در زیر میکروسکوپ معمولاً به اشکال میله‌ای کوتاه، و گاهی در فرم‌های بلندتر نیز دیده می‌شوند. این باکتری‌ها گرم مثبت، غیراسپورزا، بدون حرکت و کاتالاز منفی هستند که تحت شرایط شرح داده

شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۷۷۱٤ بر روی محیط کشت MRS آگار با pH اسیدی، کلنی‌های عدسی شکل به قطر ۱ تا ۳ میلی‌متر اغلب با لبه‌های مشخص ایجاد می‌کنند.

باکتری‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، میکروارگانیسم‌های گرمادوستی هستند که در زیر میکروسکوپ به‌صورت یاخته‌های کروی و یا بیضی شکل به قطر ۰/۷ تا ۰/۹ میکرون با آرایش دیپلوکوکسی یا زنجیره‌ای بلند می‌باشند. این باکتری‌ها گرم مثبت، بدون حرکت و کاتالاز منفی هستند و تحت شرایط شرح داده شده در استاندارد ملی ایران به‌شماره ۷۷۱٤ بر روی محیط کشت M17 آگار، کلنی‌هایی به قطر ۲ میلی‌متر ایجاد می‌کنند. قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های آغازگر ماست در روزهای ۰، ۷ و ۱۵ پس از تولید طی نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت.

روش آماری: برای آنالیز داده‌ها از طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی استفاده شد. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در صورت معنی‌دار شدن تفاوت بین تیمارها، جهت مقایسه میانگین‌ها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های مستخرج از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

بررسی نتایج به‌دست آمده از قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های آغازگر ماست در نمونه‌های ماست تولیدی طی زمان نگهداری: بر اساس نتایج آماری (جدول ۲)، تعداد باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* نمونه‌های ماست در تیمارهای مختلف و در طول زمان دارای اختلاف آماری بسیار معنی‌داری می‌باشد (P<۰/۰۰۰۱).

جدول ۲- تجزیه واریانس قابلیت زنده‌مانی *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در نمونه‌های ماست غنی شده با روغن و فلاونوئید استخراج شده از پوست پرتقال در طی زمان نگهداری.

نوع متغیر	درجه آزادی	مجموع مربع‌ها	میانگین مربع‌ها	F	سطح احتمال
استرپتوکوکوس ترموفیلوس	۱۱	۰/۳۲٤۹۳٦٥	۰/۰۲۹٥۳۹۹۷	۷٤/۰۹	<۰/۰۰۰۱
روز	۲	۰/٤٥۱٤۰۲۱٤	۰/۲۲٥۷۰۱۰۷	٥٦٦/۱۲	<۰/۰۰۰۱
*استرپتوکوکوس ترموفیلوس**روز	۲۲	۰/۰٥۳٦۲٤٥۹	۰/۰۰۲٤۳۷٤۸	٦/۱۱	<۰/۰۰۰۱
خطا	۳٦	۰/۰۱٤۳٥۲٥٤	۰/۰۰۰۳۹۸٦۸		
کل	۷۱	۰/۸٤٤۳۱۸۹۲			

مطابق با جدول ۳، بیشترین و کمترین تعداد باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در اولین، هفتمین و پانزدهمین روز نگهداری نمونه‌های ماست به‌ترتیب متعلق به نمونه‌های y_1 (فاقد روغن و ۷ درصد فلاونوئید) و y_{12} (۱/۵ درصد روغن و ۹ درصد فلاونوئید) می‌باشد و بین این نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$).

جدول ۳- قابلیت زنده‌مانی (کلونی در $۱۰^{۵}$) باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در نمونه‌های ماست غنی شده با روغن و فلاونوئید استخراج شده از پوست پرتقال در طی زمان نگهداری (میانگین ± انحراف معیار) *.

تیمار	روز اول	روز هفتم	روز پانزدهم
Y1	٦/٩١± ۰/۰۱^{a}	٦/٩٥± ۰/۰۱^{a}	۷/۰۱± ۰/۰۲^{a}
Y2	٦/٨٧± ۰/۰۱^{ab}	٦/٩٣± ۰/۰۱^{ab}	٦/٩٥± ۰/۰۲^{bc}
Y3	٦/٧٧± ۰/۰۲^{cd}	٦/٨٧± ۰/۰۲^{cd}	٦/٩٥± ۰/۰۱^{cd}
Y4	٦/٧٢± ۰/۰۲^{de}	٦/٨٤± ۰/۰۱^{d}	٦/٩٣± ۰/۰۱^{cd}
Y5	٦/٨٤± ۰/۰۱^{b}	٦/٩٣± ۰/۰۱^{ab}	٦/٩٩± ۰/۰۱^{ab}
Y6	٦/٧٧± ۰/۰۱^{cd}	٦/٨٤± ۰/۰۱^{d}	٦/٩٦± ۰/۰۲^{cd}
Y7	٦/٦٩± ۰/۰۱^{ef}	٦/٨٣± ۰/۰٤^{d}	٦/٩٣± ۰/۰۲^{bc}
Y8	٦/٦٥± ۰/۰٤^{f}	٦/٧٧± ۰/۰۱^{e}	٦/٩۰± ۰/۰۲^{d}
Y9	٦/٨٢± ۰/۰۲^{bc}	٦/٩۰± ۰/۰۲^{bc}	٦/٩٨± ۰/۰۱^{ac}
Y10	٦/٧٢± ۰/۰۲^{de}	٦/٨٦± ۰/۰۱^{d}	٦/٩٧± ۰/۰۱^{ac}
Y11	٦/٦٤± ۰/۰۲^{fg}	٦/٧٧± ۰/۰۱^{e}	٦/٩٤± ۰/۰۲^{cd}
Y12	٦/٦۰± ۰/۰۱^{g}	٦/٧١± ۰/۰۱^{f}	٦/٨۰± ۰/۰۱^{e}

*حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین تیمارها می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

بر اساس نتایج آماری (جدول ٤)، تعداد *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* نمونه‌های ماست در تیمارهای مختلف و در طول زمان نگهداری دارای اختلاف آماری بسیار معنی‌دار می‌باشد ($P<۰/۰۰۰۱$).

جدول ٤- تجزیه واریانس قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در نمونه‌های ماست غنی شده با روغن و فلاونوئید استخراج شده از پوست پرتقال در طی زمان نگهداری.

نوع متغیر	درجه آزادی	مجموع مربع‌ها	میانگین مربع‌ها	F	سطح احتمال
لاکتوباسیلوس بولگاریکوس	١١	٠/٢٨٥٢٨٧١٤	٠/٠٢٥٩٣٥١٩	٣٨/٧٦	<٠/٠٠٠١
روز	٢	٠/٦٠٠٣٠١٩٧	٠/٣٠٠١٥٠٠٩٨	٤٤٨/٥٤	<٠/٠٠٠١
لاکتوباسیلوس بولگاریکوس×روز	٢٢	٠/٠٦١١٤٢١١	٠/٠٠٢٧٧٩١٩	٤/١٥	<٠/٠٠٠١
خطا	٣٦	٠/٠٢٤٠٩٠٢٨	٠/٠٠٠٦٦٩١٧		
کل	٧١	٠/٩٧٠٨٢١٥٠			

مطابق با جدول ٥، کمترین و بیشترین تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در اولین روز نگهداری نمونه‌های ماست، به‌ترتیب متعلق به نمونه‌های y_8 (١/٥ درصد روغن و ٨ درصد فلاونوئید) و y_1 (فاقد روغن و ٧ درصد فلاونوئید) می‌باشد و بین این نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری ($P<٠/٠٥$) وجود دارد. ضمن این‌که بین نمونه‌های y_9، y_{10} و y_{11} تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($p>٠/٠٥$). کمترین و بیشترین تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در هفتمین روز نگهداری نمونه‌های ماست به‌ترتیب متعلق به نمونه‌های y_4 (١/٥ درصد روغن و ٧ درصد فلاونوئید) و نمونه y_8 می‌باشد و بین این نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری ($P<٠/٠٥$) وجود دارد. کمترین و بیشترین تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در پانزدهمین روز نگهداری نمونه‌های ماست به‌ترتیب متعلق به نمونه‌های y_4 و y_9 (فاقد روغن و ٩ درصد فلاونوئید) می‌باشد و بین این نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری ($P<٠/٠٥$) وجود دارد.

در رابطه با قابلیت زنده‌مانی و بقاء باکتری‌های آغازگر در ماست، گزارش‌های متعددی ارائه شده است که هر یک نتیجه‌ای متفاوت داشته‌اند. به‌عنوان مثال، دییو و شاه (١٩٩٦) بیان داشتند که تعداد باکتری‌های آغازگر ماست در طول ٢٨ روز نگهداری در سرما به‌ترتیب سیر صعودی و نزولی داشته و در روز پایانی، تعداد این میکروارگانیسم‌ها به کمترین میزان رسید. به‌همین ترتیب، لی و همکاران (٢٠٠٧)، کاهش تدریجی تعداد باکتری‌های آغازگر را در ماست غنی شده با روغن گیاهی تا پایان روز پانزدهم گزارش نمودند.

جدول ۵- قابلیت زنده‌مانی (کلونی در 10^{5}) باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در نمونه‌های ماست غنی شده با روغن و فلاونوئید استخراج شده از پوست پرتقال در طی زمان نگهداری (میانگین ± انحراف معیار)*.

تیمار	روز اول	روز هفتم	روز پانزدهم
Y1	٦/٨١± ۰/۰۲^{a}	٦/٨٧± ۰/۰۳^{ab}	٦/٩١± ۰/۰۱^{ac}
Y2	٦/٧٤± ۰/۰۲^{bc}	٦/٨۰± ۰/۰۱^{cd}	٦/٨٧± ۰/۰۲^{c}
Y3	٦/٦۰± ۰/۰۱^{ef}	٦/٧٣± ۰/۰۳^{ef}	٦/٨١± ۰/۰۳^{d}
Y4	٦/٥٤± ۰/۰٤^{fg}	٦/٧١± ۰/۰۲^{f}	٦/٧٩± ۰/۰۱^{d}
Y5	٦/٧٩± ۰/۰۱^{ab}	٦/٨٨± ۰/۰۱^{a}	٦/٩٥± ۰/۰۱^{a}
Y6	٦/٦٩± ۰/۰۱^{cd}	٦/٨٢± ۰/۰۱^{bd}	٦/٩١± ۰/۰۱^{ac}
Y7	٦/٦٥± ۰/۰٤^{de}	٦/٧٨± ۰/۰۲^{de}	٦/٩١± ۰/۰۲^{ac}
Y8	٦/٥٣± ۰/۰۳^{g}	٦/٧٢± ۰/۰۱^{f}	٦/٨٢± ۰/۰۳^{d}
Y9	٦/٧٢± ۰/۰۲^{bd}	٦/٨٦± ۰/۰۱^{ab}	٦/٩٦± ۰/۰۱^{a}
Y10	٦/٧١± ۰/۰۱^{cd}	٦/٨٥± ۰/۰۱^{ac}	٦/٩٥± ۰/۰۲^{a}
Y11	٦/٧۰± ۰/۰۲^{cd}	٦/٨١± ۰/۰۳^{cd}	٦/٩۰± ۰/۰۱^{bc}
Y12	٦/٥٦± ۰/۰٦^{fg}	٦/٧٤± ۰/۰۱^{ef}	٦/٩٣± ۰/۰۱^{ab}

*حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین تیمارها می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

در مورد شمارش تعداد باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، در کل دوره زمانی مورد بررسی، تیمار y_1 (فاقد روغن و ۷ درصد فلاونوئید) دارای بالاترین شمارش زنده‌مانی در ماست بود و کمترین تعداد به تیمار y_{12} (۱/۵ درصد روغن و ۹ درصد فلاونوئید) تعلق داشت.

در رابطه با آغازگر دیگر ماست یعنی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس*، نظم خاصی در بین تیمارها همانند آنچه که برای *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* اتفاق افتاد، وجود داشت. در هفته دوم نگهداری نمونه‌های ماست، تیمار y_5 (فاقد روغن و ۸ درصد فلاونوئید) دارای بیشترین تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس* بود. در مقابل، تیمار y_9 (فاقد روغن و ۹ درصد فلاونوئید) بالاترین تعداد را در آخرین روز نگهداری به خود اختصاص داد. ظاهراً با افزایش روغن پوست پرتقال، رشد باکتری اخیر تحت تأثیر قرار گرفت و نقش فلاونوئید در این مورد کم رنگ تر بود.

می‌توان نتجه‌گیری کرد که با افزایش میزان روغن پوست پرتقال، زنده‌مانی و قابلیت بقاء باکتری‌های آغازگر در ماست کاهش می‌یابد. اثر بازدارندگی روغن پوست پرتقال بر *اشریشیا کلی* تأیید

شده است. احتمال می‌رود روغن پوست پرتقال بر قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* نیز اثر منفی داشته است.در تأیید این نتیجه می‌توان به تحقیقی اشاره داشت که در آن مشخص گردید تعداد باکتری‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* به‌عنوان آغازگرهای ویژه ماست در ماست طعم‌دار غنی شده با روغن ماهی سالمون (به‌میزان یک میلی‌لیتر در ۳/۸ لیتر) همانند نمونه کنترل(ماست بدون هیچ‌گونه افزودنی) می‌باشد (استرادا و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین، در تحقیقی دیگر که نانو امولسیون با اجزاء ماست منجمد به‌منظور تولید ماست منجمد محتوی روغن سبوس برنج ارغوانی نانوامولسیون مخلوط گردید و ماست منجمد ساده و ماست منجمد حاوی کازئینات سدیم (۵ درصد) نیز به‌عنوان نمونه کنترل (شاهد) در نظر گرفته شد، مشخص گردید که تعداد باکتری‌های لاکتیک در تمام نمونه‌های ماست مشابه می‌باشد (سانابریا و آلسونو، ۲۰۱۲). ایرلی (۱۹۹۲) نیز اظهار نمود که افزودن طعم میوه اثر معنی‌داری بر شمارش کل باکتریایی و تعداد کلی فرم‌ها در ماست ندارد.از طرفی، گزارش شده که افزودن ۲ درصد وزنی- حجمی از روغن گیاهی و حیوانی موجب کاهش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک به‌میزان دو سیکل لگاریتمی در ماست تا پایان دوره نگهداری می‌شود که این امر پایداری کم باکتری‌های آغازگر را در طول نگهداری فرآورده نشان می‌دهد (استرادا و همکاران، ۲۰۱۱).گرچه بویچوا و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که تعداد باکتری‌های آغازگر در ماست غنی شده با آب توت فرنگی بالاتر از نمونه ماست شاهد می‌باشد.

در ضمن، لازم به ذکر است زمان گرمخانه‌گذاری برای رسیدن به pH ٤/٥±٠/٠٢ در تیمارهای حاوی روغن پوست پرتقال در قیاس با تیمارهای بدون روغن طولانی‌تر بود (داده‌های مربوط به زمان گرمخانه‌گذاری تیمارها ثبت نشده‌اند)؛ که خود مؤید اثر منفی روغن بر فعالیت استارترها و در نتیجه، کاهش کندتر pH در طول زمان گرمخانه‌گذاری می‌باشد.

در راستای تأیید افزایش یا کاهش فعالیت باکتری‌های آغازگر ماست در نمونه‌های ماست تولیدی با مقادیر متفاوت فلاونوئید و روغن استخراج شده از پوست پرتقال، pH و اسیدیته نمونه‌های ماست تولیدی به شرح زیل مورد بررسی قرار گرفت:

کمترین میزان اسیدیته در روزهای اول و هفتم مربوط به تیمار y_4 و در روز پانزدهم متعلق به تیمارy_{12}بود. به‌عبارتی ماست حاوی ۱/۵ درصد روغن و ۷ و ۹ درصد فلاونوئید کمترین میزان اسیدیته را کسب نمود. در کل، تغییرات اسیدیته با افزایش زمان ماندگاری نمونه‌های ماست، روند صعودی

داشت. این نتیجه به پدیده پس اسیدسازی باکتری‌های آغازگر در ماست ساده و ماست طعم‌دار نسبت داده می‌شود (بیل و همکاران، ۱۹۹۹). بالاترین میزان اسیدیته در کل دوره زمانی مورد بررسی به تیمار y_5 (فاقد روغن و ۸ درصد فلاونوئید) تعلق داشت. به‌عبارتی، فقدان روغن و وجود ۸ درصد رنگدانه فلاونوئید در ماست موجب افزایش اسیدیته و، همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد،افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های آغازگر در مقایسه با سایر نمونه‌های ماست داشت (جدول ٦).

جدول ٦- مقادیر اسیدیته (گرم اسید لاکتیک در لیتر) نمونه‌های ماست غنی شده با روغن و فلاونوئید استخراج شده از پوست پرتقال در طی زمان نگهداری (میانگین ± انحراف معیار) *.

تیمار	روز اول	روز هفتم	روز پانزدهم
Y1	۰/۸۰± ۰/۰۱^{f}	۰/۸٦± ۰/۰۱^{d}	۰/۹۲ ± ۰/۰۱^{b}
Y2	۰/۷۹± ۰/۰۱^{g}	۰/۸۱± ۰/۰۰٤^{f}	۰/۹۰± ۰/۰۲^{b}
Y3	۰/۷۳± ۰/۰۱ ^{j}	۰/۸۰± ۰/۰۳^{i}	۰/۸۷± ۰/۰۱^{de}
Y4	۰/۷۲± ۰/۰۱^{i}	۰/۷۳± ۰/۰۱^{g}	۰/۸٦± ۰/۰٤^{de}
Y5	۰/۹۵± ۰/۰۲^{a}	۰/۹۷± ۰/۰٤^{a}	۱/۰۰± ۰/۰۱^{a}
Y6	۰/۹۳± ۰/۰۳^{b}	۰/۹۷± ۰/۰۱^{b}	۰/۹۹± ۰/۰۱^{a}
Y7	۰/۹۲± ۰/۰۱^{b}	۰/۹۳± ۰/۰۳ ^{a}	۰/۹۹± ۰/۰۱^{a}
Y8	۰/۸۷± ۰/۰۲^{c}	۰/۸۷± ۰/۰٤^{c}	۰/۸۹± ۰/۰۳^{c}
Y9	۰/۸۵± ۰/۰۱^{d}	۰/۸٦± ۰/۰۱^{d}	۰/۸۸± ۰/۰٤^{cd}
Y10	۰/۸۲± ۰/۰۲^{e}	۰/۸۵± ۰/۰۱^{e}	۰/۸٦± ۰/۰۳^{e}
Y11	۰/۸۰±۰/۰٤^{f}	۰/۸۲± ۰/۰۲^{f}	۰/۸٤± ۰/۰۲^{f}
Y12	۰/۷۷± ۰/۰۱^{h}	۰/۷۹± ۰/۰۲^{h}	۰/۸۰± ۰/۰۲^{g}

*حروف لاتین متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن میانگین تیمارها می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

تیمار y_5 (فاقد روغن و دارای ۸ درصد فلاونوئید) در تمام دوره زمانی مورد آزمایش، پایین‌ترین میزان pH را کسب نمود و تیمار y_{12} (حاوی ۱/۵ درصد و ۹ درصد فلاونوئید) دارای بیشترین میزان pH در روز هفتم و نیز پانزدهم بود. همان‌گونه که مشاهده می‌شود رابطه بین اسیدیته و pH، رابطه معکوس ولی دارای تناسب خاصی است. تیمار y_5 که فاقد روغن پوست پرتقال بود، در کل دوره زمانی مورد بررسی، بالاترین اسیدیته و کمترین pH را کسب نمود (جدول ۷).

جدول ۷- مقادیر pH نمونه‌های ماست غنی شده با روغن و فلاونوئید استخراج شده از پوست پرتقال در طی زمان نگهداری (میانگین ± انحراف معیار) *.

تیمار	روز اول	روز هفتم	روز پانزدهم
Y1	٤/٣٨ ± ٠/٠٣^{a}	٤/٢٥± ٠/٠٢^{bc}	٤/١٨± ٠/٠١^{bd}
Y2	٤/٤٧± ٠/٠٤^{c}	٤/٣٠± ٠/٠٥^{bc}	٤/٢٥± ٠/٠٤^{ac}
Y3	٤/٥٠± ٠/٠٣^{d}	٤/٣١± ٠/٠٨^{c}	٤/٢٧± ٠/٠٨^{de}
Y4	٤/٧١± ٠/٠١^{bc}	٤/٣٢± ٠/٠١^{ab}	٤/٣٠± ٠/٠٥^{ab}
Y5	٤/٢١± ٠/٠٢^{g}	٤/١٥± ٠/٠٣^{d}	٤/٠٤± ٠/٠٣^{f}
Y6	٤/٢١± ٠/٠٤^{ef}	٤/١٨± ٠/٠٣^{d}	٤/٠٦± ٠/٠٢^{f}
Y7	٤/٢٠± ٠/٠١^{g}	٤/١٩± ٠/٠٢^{d}	٤/٠٧± ٠/٠٢^{f}
Y8	٤/٣٨± ٠/٠٢^{de}	٤/٢٩± ٠/٠٢^{c}	٤/٢١± ٠/٠٣^{ce}
Y9	٤/٢٩± ٠/٠٢^{de}	٤/٢٧± ٠/٠١^{c}	٤/١٨± ٠/٠٢^{e}
Y10	٤/٣١± ٠/٠١^{f}	٤/٢٩± ٠/٠٤^{c}	٤/٢٨± ٠/٠١^{ac}
Y11	٤/٣٥± ٠/٠٣^{ef}	٤/٣٢± ٠/٠٣^{bc}	٤/٢٩± ٠/٠١^{ab}
Y12	٤/٥٢± ٠/٠٢^{b}	٤/٤١± ٠/٠١^{a}	٤/٣٣± ٠/٠١^{a}

*حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میانگین تیمارها می‌باشد ($P<٠/٠٥$).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش میزان روغن پوست پرتقال در نمونه‌های ماست تولیدی، اسیدیته کاهش و متعاقباً pH افزایش یافت. از طرفی، افزایش میزان روغن پوست پرتقال باعث کاهش زنده مانی و قابلیت بقاء باکتری‌های آغازگر در ماست شد.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از آزمایشگاه کشت دانه‌های روغنی و آزمایشگاه کارخانه شکلی به‌دلیل در اختیار قرار دادن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش اعلام می‌دارند.

منابع

Akao, Y., Itoh, T., Ohguchi, K., Linuma, M., and Nozawa, Y. 2008. Intraction effects of polymethoxy flavones from citrus on cell growth inhibition in human

neuroblastoma SH-SYSY cell. Bioorganic and Medical Chemistry.16: 2803-2810.

Beal, C., Martin, N.C., Skokanova, J., Latrille, E., and Corrieu, G. 1999. Influence of fermentation and storage conditions on the sensory properties of plain low fat stirred yogurts. Journal of Sensory Study.14: 139-160.

Boycheva, S., Dimitrov, T., Naydenova, N., and Mihaylova, G. 2011. Quality characteristic of yogurts from Goat's milk, supplemented with fruit juice. Czech Journal of Food Science. 29(1): 24-30.

Bronner, W.E., and Beecher, G.R. 1995. Extraction and measurement of prominent falconoids in orange and grape fruit juice concentrates. Journal of chromatography A. 705: 247-256.

Cao, G., Sofic, E., and Prior, R. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure- Activity relationship. Free radical biology and medicine. 22(5): 749-760.

Coisson, J.D., Travaglia, F., Capasso, M., and Arlorio, M. 2005. Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yoghurt. Food research international. 38: 893-897.

Crittenden, R., Laitila, A., Forssell, P., Matto, J., Saarela, M., and Mattila-Sandholm, T. 2001. Adhesion of Bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. Applied and Environmental Microbiology. 67: 3469-3475.

Dave, R., and Shah, N. 1996. Evaluation of media for selective enumeration of streptococcus thermophillus, Lactobacillus delbueckii subsq.bulgaricus, Lactobacillus acidophilus and bifidobacteria. Journal of Dairy Science. 79: 1529-1536.

Early, R. 1992. The technology of dairy products. International Thomson Publishers. Britain. Pp: 156.

Estrada, J.D., Boeneke, C., Bechtel, P., and Sathivel, S. 2011. Developing a strawberry yogurt fortified with marine fish oil. Journal of Dairy Science. 94: 5760-5769.

Evans, C., Aboott, N., Kuhnle, M., Youdim, K., and Dobbie, M. 2003.Intraction between flavonoids and the blood-brain-barrier: in vitro studies. Journal of Neurochemistry. 85: 180-192.

Giusti, M., and Wrolstad, R. 2003. Acylated antocyanin from edible sources and their application in food systems. Biochemical Engineering Journal. 14: 217-225.

Hossain, M., and Smith, Li. 2006. Extraction of phenolic from citrus peels. Solvent extraction method. Separation and Purification technology. 48: 182-188.

Khurana, H.K., and Kanawjia-Shurts, K. 2007. Recent trends in development of fermented milks. Bentham science publisher. 3: 91-108.

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

Jager, A., and Saaby, L. 2011. Flavonoids and the CNS. Journal of Mouleculs, 16: 1471-1485.

Jing, P., and Giusti, M. 2007. Effect of extraction conditions on improving the yield and quality of an antocyanin-rich purpule corn color extract. Journal of Food Science. 72(7): 363-368.

Lee, Y., Charles, A., Kung, H., Ho, C., and Huang, T. 2010. Extraction of nobiletin and tangeritin from citrus depressa hayata by super critical carbon dioxide with ethanol as modifier. Industrial crops and products. 31: 59-64.

Li, S., Sang, S., Pan, M., Lai, C., Lo, C., and Yang, C. 2007. Anti-inflammatory property of the urinary metabolism of nobiletin in mouse. Bioorganic and Medical Chemistry. 17: 5177-5181.

Lin, N., Sato, T., Takayama, Y., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M., and Ito, A. 2003. Novel anti-inflamatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy falavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. Biochemical Pharmacology journal. 65: 2065-2071.

Mahdian, E., and Tehrani, M. 2007. Evaluation the effect of milk total solids on the relationship between growth and activity of starter culture and quality of concentrated yoghurt. *American-Eurasian* Journal of Agricultural and Environmental Sciences. 2(5): 587-592.

Manthey, J.A. 2005. Cholosterol-Reducing flavonoids found in citrus peels. Agriculture Research Magazine, 306: 293-299.

Ozaki, Y., Ayano, S., Inaba, N., Miyake, M., Berhow, M.A., and Hasegawa, S. 2000. Limonoid Glucosides in Fruit, Juice and processing by-products of Satsuma mandarin (citrus unshia flarcov). Journal of Food Science. 60: 186-189.

Patill, B., Jayaprakasha, K., and Uckoo, R. 2011. Rapid separation method of polymethoxy flavones from citrus using flash chromatography. Separation and Purification Technology. 81: 151-158.

Pino, J., Munoz, Y., and Quijano, C. 2006. Analysis of cold pressed mandarin peel oil from cuba. Journal of Essential Oil-bearing Plants. 10(6): 504-509.

Raeissi, S., Diaz, S., Espinosa, S., Peters, C., and Bringnole, E. 2008. Ethane as an alternative solvent for super critical extraction of orange peel oils. Journal of Supercritical Fluids. 45: 306-313.

Rezzoug, S., and Louka, N. 2009. Thermomechanical process intensification for oil extraction from orange peel. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 10(4): 530-536.

Saito, T. 2004. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the lactobacillus acidophilus group and their application in functional food. Animal Science Journal. 75: 1-13.

Sanabria, A., and Alonso, L. 2012. Development of a Frozen Yogurt Fortified with a Nano-Emulsion Containing Purple Rice Bran Oil. Louisiana State University, Food Science Department, page of Electronic Thesis and Dissertation.

Schafer, E., and Nelson, D. 2000. What you need to know about new food words-phytochemical, Functional Foods and Nutraceuticals, The U.S department of agriculture (USDA). 1846: 202-207.

Shiming, L., Min-Husiung, P., Ching-shu, L., Chih-Yu, L., Dushenkov, S., and Chi-Tang, H. 2007. Isolation and synthesis of polymethoxy flavones and hydroxylated polemethoxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines. Bioorganic and Medicinal Chemistry.15: 3381-3389.

Shortt, C., and Obrien, J. 2003. Handbook of Functional dairy products. Chemical Rubber Company press. London. Pp: 15-19.

Walle, T. 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. Free Radical Biology and Medicine. 36(7): 829-837.

Yaman, H., Cetinkaya, A., Elmali, M., and Karadagoglu, G. 2006. Prediction of consumer acceptability of flavored yoghurts by sensory measures in Turkey. Pakistan Journal of Nutrition. 5(1): 93-96.

EJFPP, Vol. 6 (2): 97-114
http://ejfpp.gau.ac.ir

Investigating viability of starter bacteria in yogurt enriched with oil and flavonoid extracted from orange peel

H. Zahedi[1], *V. Fadaei Noghani[2] and L. Khalafi[3]

[1]M.Sc. Student, Dept. of Food Science and Technology, Agricultural Faculty, shahr-e-Qods Branch, and Islamic Azad University, Tehran, Iran, [2]Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Agricultural Faculty, shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, [3]Assistant Prof., Dept. of Chemistry, shahr-e-Qods Branch, Faculty of Science, Islamic Azad university, Tehran, Iran.

Received: 22 /06/ 2014; Accepted 20/10 /2014

Abstract

Nowadays, it has been excised lots of tendency among people for using functional foods. Functional foods are kind of foods which have at least one defined and proven health benefits in addition to basic nutritional value. This study aims at producing flavored functional yogurt enriched with flavonoid and oil extracted from orange peel and also, assessing the viability of yogurt starter culture during 15-days of storage. This study was carried out in two stages: in the first stage; flavonoid and oil were extracted from orange peel, and secondly, flavored functional yogurt enriched with different percentages of extracted flavonoid (7, 8 and 9%) and oil (0, 0.5, 1 and 1.5%) from orange peel, was produced. The results showed that increasing the orange peel oil had a negative effect on the growth of yogurt starter culture, *Streptococcustermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*.

Keywords*:* Flavored yogurt, Flavonoid, Orange peel oil, Starter bacteria, Viability

*Corresponding author; vn.fadaei@gmail.com