مجله تحقیقات مهندسی کشاورزی/جلد ۱۵/ شماره ۳/سال ۱۳۹۳/ص ۲۶-۱۳

ارزیابی خصوصیات میکروبی و فیزیکوشیمیایی نوشیدنی شیرفندق بر پایه آب پنیر تخمیر شده با دانه کفیر

ندا مالکی، فرامرز خدائیان* و سیدمحمد موسوی**

*نگارنده مسئول: کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ص. پ: ۴۱۱۱، تلفن: ۳۲۲۴۸۸۰۴(۰۲۶)، پیام‌نگار: khodaiyan@ut.ac.ir

**به‌ترتیب: دانشجوی کارشناسی ارشد؛ دانشیار؛ و استاد گروه علوم و صنایع غذایی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۹

چکیده

فندق و محصولاتی که از آن به‌دست می‌آید، از جمله شیرفندق، به‌دلیل داشتن اسیدهای چرب غیر اشباع و فیتواسترول‌ها باعث کاهش بیمارهای قلبی و عروقی می‌شوند. تخمیر محصولات با استفاده از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک دانه کفیر سبب افزایش خواص فراسودمندی این محصولات خواهند شد. هدف از این مطالعه، تولید یک نوشیدنی تخمیری جدید از فندق با استفاده از دانه کفیر است. در این مطالعه برای تولید شیرفندق، به‌جای آب از آب پنیر استفاده شد و اثر سطوح مختلف تلقیح دانه کفیر (۲، ۵ و ۸ درصد) و دما (۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سلسیوس) روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی (قدرت آنتی‌اکسیدانی، pH، ویسکوزیته و میزان کفیران) و میکروبی (تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمر) شیرفندق تخمیری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی (۹۱/۸ درصد)، بیشترین میزان کفیران (معادل ۸/۲±۱۵۲/۸میکروگرم گلوکز)، بیشترین ویسکوزیته و بیشترین تعداد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک (باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها) در نمونه‌های با ۸ درصد تلقیح دیده می‌شود. به‌علاوه مشاهده شد که بیشترین تغییرات در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و بیشترین میزان کفیران و در نتیجه ویسکوزیته در دمای ۳۰ درجه سلسیوس ایجاد می‌شود. بنابراین با توجه به پارامترهای فراسودمندی از قبیل توان آنتی‌اکسیدانی، تعداد پروبیوتیک‌ها، میزان کفیران می‌توان میزان تلقیح ۸ درصد و دمای ۲۵ درجه سلسیوس را به‌عنوان مناسب‌ترین شرایط برای تولید شیرفندق تخمیری پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی

آب پنیر، آنتی اکسیدان، پروبیوتیک، دانه کفیر، شیرفندق، کفیران

مقدمه

یافته‌های علمی نشان می‌دهند که یکی از مهمترین علل مرگ و میر و از کار افتادگی انسان در جهان بیماری‌های قلبی – عروقی هستند. بر اساس مطالعات انجام شده، بالا بودن کلسترول خون ارتباط مستقیمی با بروز حملات قلبی دارد. به‌طوری که به ازای کاهش ۱ درصد کلسترول خون خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی ۲ تا ۳ درصد کاهش می‌یابد (Manson *et al.*, 1992). مغزها به‌ویژه فندق به‌دلیل داشتن مقدار فراوانی از اسیدهای چرب غیر اشباع، از جمله اسیدهای چرب امگا ۳، فیتواسترول‌ها و توکوفرول‌ها، نقش مهمی در کاهش سطح کلسترول خون دارند (Fraser *et al.*, 1992; Kris-Etherton *et al.*, 1999; Albert *et al.*, 2002). فندق منبع غنی از ترکیبات

© 2016,The Author(s). Published by Agricultural Engineering Research Institute. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

آنتی‌اکسیدانی فنلی است، این ترکیبات از بدن در مقابل بسیاری از بیماری‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد از جمله انواع سرطان‌ها و جهش‌ها محافظت می‌کند (Shahidi *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2010). بنابراین با توجه به اهمیت تغذیه‌ای و همچنین عطر و طعم خاص و عامه‌پسند فندق، همواره محققان به دنبال تولید فرآورده‌های جدید از این محصول بوده و هستند (Liu *et al.*, 2003; Rizwan & Rousseau, 2006).

امروزه اهمیت فرایند تخمیر در بهبود خصوصیات فراسودمندی مواد غذایی بر کسی پوشیده نیست. کفیر یکی از مهم‌ترین محصولات تخمیری است که از گذشته‌های دور توجه زیادی را به‌خود جلب کرده است. این نوشیدنی قدیمی از تخمیر لاکتیکی- الکلی شیر حاصل می‌شود (Micheli *et al.*, 1999). کفیر از تخمیر شیر بر اثر باکتری‌ها و مخمرهای موجود در دانه کفیر به‌دست می‌آید. بار میکروبی دانه‌های کفیر متشکل از باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و اسید استیک و مخمرهای تخمیرکننده و غیر تخمیرکننده لاکتوز است. باکتری‌ها و مخمرها با شبکه پلی‌ساکاریدی کفیران احاطه می‌شوند. گزارش شده است که این پلی‌ساکارید فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد تومور دارد (Farnworth, 1999). با توجه به حضور میکروارگانیسم های مفید در دانه کفیر، آنچه از آن به‌دست می‌آید می‌تواند یکی از مهم‌ترین مواد غذایی پروبیوتیک به‌حساب آید (Garrote *et al.*, 2000). فواید تغذیه‌ای فراوانی برای کفیر مطرح شده است که از مهم‌ترین آنها خاصیت ضدباکتریایی آن است. بسیاری از لاکتوباسیل‌های موجود در دانه می‌توانند گستره‌ای وسیع از ترکیبات ضد باکتریایی مثل اسیدهای آلی، کربن دی اکسید، هیدروژن پراکسید، اتانول، دی‌استیل و پپتیدها را تولید کنند (Farnworth, 2005; Cevikbas *et al.*, 2006).

از سویی، تخمیر به‌ویژه بر اثر دانه کفیر سبب بهبود خصوصیات آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی می‌شود (Liu *et al.*, 2005; Sirirat & Jelena, 2010).

پس از رسوب و جداسازی کازئین به‌هنگام تولید پنیر، آب پنیر به‌دست می‌آید. این محصول جانبی ۹۰-۸۵ درصد حجم شیر و ۵۵ درصد مواد مغذی شیر را به‌خود اختصاص می‌دهد. در بین این مواد مغذی، لاکتوز (۵-۴/۵ درصد وزنی/حجمی)، پروتئین‌های محلول (۰/۸-۰/۶ درصد وزنی/حجمی)، لیپیدها و مواد معدنی بیشترین میزان را دارند (Dragone *et al.*, 2009). آب پنیر با تولید جهانی حدود 10^8 تن در سال و دارا بودن میزان مواد آلی بالا و لذا نیاز به اکسیژن بیولوژیکی گسترده[1] (۴۰۰۰۰-۶۰۰۰۰ قسمت در میلیون) مشکلات زیست محیطی را در پی دارد. بنابراین، تاکید سازمان‌های حفاظت محیط زیست از یک سو و ارزش تغذیه‌ای بالای آب پنیر از سوی دیگر صنعت لبنیات را وادار کرد که به آب پنیر نه به‌عنوان ماده‌ای زاید بلکه به‌عنوان ماده اولیه غنی توجه کند (Guimarães *et al.*, 2010).

محققان زمینه‌های کاربردی بسیاری را برای استفاده از آب پنیر گزارش داده‌اند که از آن جمله می‌توان تولید پروتئین تک یاخته، اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید پروپیونیک، آنزیم‌ها، گلوکز، الیگوساکاریدها، متان، اتانول، نوشیدنی‌های مختلف تخمیری و غیرتخمیری، غنی‌سازی علوفه دام و بسیاری اهداف دیگر را نام برد (Paraskevopoulou *et al.*, 2003; Koutinas *et al.*, 2009). اما در این میان کمتر دیده شده است حرکت به‌سمت تولید محصولاتی باشد که پاسخگوی حجم تولید بالای آب پنیر باشند، هزینه‌ای کمتر بر دوش صنعت تخمیر تحمیل کند و محصولی به‌دست دهند که مورد پسند و پذیرش گسترده مصرف‌کنندگان باشد و ارزش تغذیه‌ای مناسبی داشته باشد.

1- Biological Oxygen Demand (BOD)

هدف از این مطالعه، امکان‌سنجی تولید نوشیدنی فراسودمند شیرفندق با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا بر پایه آب پنیر و دانه کفیر است. در این مطالعه، اثر سطوح مختلف میزان تلقیح دانه کفیر و دما بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیرفندق تخمیری بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از مغز فندق واریته پرسیکا استفاده شد. دانه‌های کفیر از یک فروشنده خانگی در تهران خریداری و آب پنیر از کارگاه لبنیات گروه صنایع غذایی دانشگاه تهران تهیه شد. ۲- دی فنیل پیکریل هیدرازیل[1] (DPPH) و فنل از شرکت سیگما (امریکا) و متانول، اسید سولفوریک غلیظ و محیط کشت‌های MRS و PDA از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

تهیه شیرفندق

برای تهیه شیرفندق ابتدا مغزهای فندق به‌مدت ۱۲ ساعت در آب خیسانده شدند تا پوست قهوه‌ای سطح آنها جدا شود، مغزهای پوست‌گیری شده به‌همراه آب پنیر (با نسبت ۵ گرم فندق در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب پنیر) در یک مخلوط‌کن آسیاب شدند و دوغاب حاصل با دو لایه پارچه متقال فیلتر شد. شیرفندق حاصل در ظروف شیشه‌ای دردار ریخته و در بن‌ماری مدرج در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه پاستوریزه شد. شیرفندق داخل ظرف‌ها پس از سرد شدن تا دمای محیط، با ۲، ۵ یا ۸ درصد دانه کفیر تلقیح و به‌مدت ۴۸ ساعت در یکی از سه دمای ۲۰، ۲۵ یا ۳۰ درجه سلسیوس گرماخانه‌گذاری (انکوباسیون) شد. همین‌جا اضافه می‌شود که در دماها و درصدهای تلقیح بالاتر، بوی ناخوش در نمونه‌ها احساس شد. در انتهای زمان تخمیر، دانه‌های کفیر با آب کش پلاستیکی از نوشیدنی‌ها جدا شدند و آنالیزهای بعدی روی آنها اجرا شد.

اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی شیرفندق‌های تخمیر شده در شرایط مختلف، ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌ها را در داخل لوله آزمایش ریخته و در دور g×۶۰۰۰ به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد تا رسوبات نامحلول و سلول‌های میکروبی جدا شوند. برای ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های آماده شده از روش خنثی‌کنندگی رادیکال DPPH استفاده شد (Burda & Oleszek, 2001). برای این منظور در داخل لوله‌های آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر نمونه (۰/۵ گرم بر میلی‌لیتر)، سه میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بنفش رنگ اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه گرماخانه‌گذاری (انکوباسیون) در دمای اتاق محلول حاصل در سانتریفوژ با دور g×۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد، در ادامه، میزان جذب محلول‌های شفاف با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد خنثی‌کنندگی رادیکال DPPH توسط نمونه‌ها با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد. درمحلول شاهد به‌جای نمونه اصلی آب مقطر وارد شد.

(۱) درصد خنثی‌کنندگی = [۱ - (جذب نمونه/جذب شاهد)] ×۱۰۰

اندازه‌گیری pH و کفیران

pH نمونه‌ها با استفاده از pH متر (Metrohm، آلمان) کالیبره اندازه‌گیری و برای اندازه‌گیری میزان کفیران از روش پیرماریا و همکاران (Piermaria *et al.*, 2008) استفاده شد. بعد از خارج کردن دانه‌های کفیر از نمونه‌ها، شیرفندق‌های تخمیر شده به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب جوشان قرار داده شدند تا کفیران متصل به سلول‌ها و دیگر مواد جامد حل و آنزیم‌های هیدرولیزکننده پلی ساکارید غیرفعال شوند. سپس نمونه‌ها در دور g×۱۰۰۰۰ و دمای ۲۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ

1- 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl

شدند تا مواد نامحلول جدا شوند. در ادامه، برای رسوب دادن کفیران محلول، هم حجم نمونه مورد استفاده اتانول سرد (با دمای ۲۰- درجه سلسیوس) اضافه و مخلوط حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای جداسازی کفیران، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور g×۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند و رسوب حاصل (کفیران) مجدد در آب مقطر داغ حل و فرایند دو بار تکرار و در نهایت میزان کفیران با استفاده از روش فنل- اسید سولفوریک اندازه‌گیری شد (Dubois *et al*., 1956).

اندازه‌گیری ویسکوزیته

ویسکوزیته نمونه‌ها در دمای اتاق با ویسکومتر چرخان بروکفیلد (مدل LVDV-II + Pro) دارای حجم مخزن ۲۰ میلی‌لیتر مجهز به اسپیندل شماره ۶۰ با سرعت چرخش ۴۲ دور در دقیقه اندازه‌گیری و برحسب واحد سانتی‌پواز گزارش شد.

شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها

تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک از طریق کشت پورپلیت رقت مناسب در محیط کشت MRS در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۷۲ ساعت و تعداد مخمرها از طریق کشت سطحی رقت مناسب در محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت اندازه‌گیری و نتایج به‌صورت تعداد کلنی حاصل از هر میلی‌لیتر شیرفندق (تعداد کلنی در هر میلی لیتر) گزارش شد.

آنالیز آماری

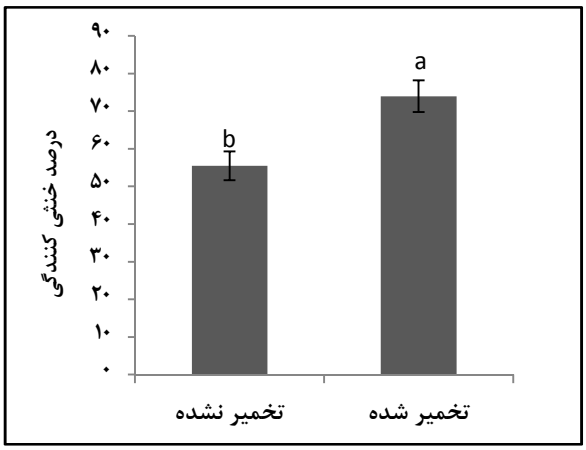
تمام اندازه‌گیری‌ها سه بار تکرار شد. اختلاف بین تیمارهای مختلف بر اساس طرح آماری فاکتوریل کاملا تصادفی با استفاده از تحلیل واریانس (ANOVA) در سطح احتمال ۵ درصد تعیین و میانگین‌های داده‌ها بر اساس آزمون دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

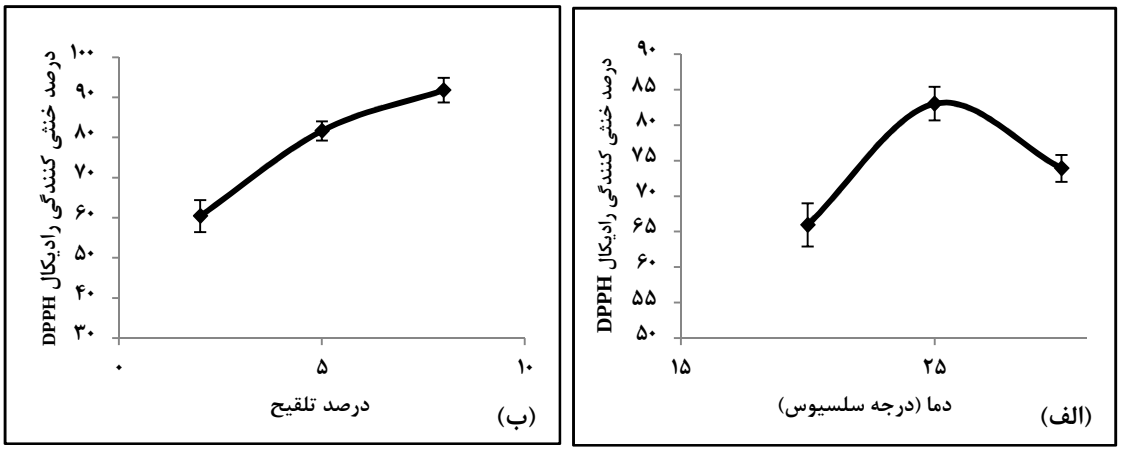
قدرت آنتی‌اکسیدانی

برای ارزیابی توان خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد از DPPH به‌طور گسترده استفاده می‌شود زیرا روشی ساده و سریع برای ارزیابی خصوصیت آنتی‌اکسیدانی است. رادیکال‌های DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارای جذب نوری هستند ولی زمانی که با عوامل خنثی‌کننده مواجه می‌شوند رنگ بنفش خود را از دست می‌دهند. با استفاده از این ویژگی قدرت خنثی‌کنندگی شیرفندق‌ها ارزیابی شد. مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی شیرفندق تخمیر نشده (۳/۸±۵۵/۵ درصد) و تخمیر شده (۷/۰±۷۴/۱ درصد) بعد از ۴۸ ساعت نشان داد که تخمیر سبب بهبود توان آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها می‌شود (شکل ۱).

برای تعیین بهترین شرایط تخمیر به‌منظور بهبود خصوصیات آنتی‌اکسیدانی شیرفندق، قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های تخمیر شده در شرایط مختلف ارزیابی شد. نتایج نشان می‌دهد که در بین نمونه‌های تلقیح شده با سه سطح تلقیح، بیشترین توان خنثی‌کنندگی مربوط به نمونه با ۸ درصد تلقیح و از میان نمونه‌های تخمیر شده در دماهای مختلف، بالاترین توان آنتی‌اکسیدانی مربوط به نمونه‌های تخمیر شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس است (شکل ۲).



شکل ۱- مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی شیرفندق تخمیر شده و تخمیر نشده



شکل ۲- تغییرات توان آنتی‌اکسیدانی شیرفندق‌های تخمیر شده
(الف) در دماهای مختلف و (ب) با درصدهای مختلف تلقیح بر حسب درصد خنثی‌کنندگی رادیکال DPPH

برهم‌کنش تاثیر این دو فاکتور نیز مورد ارزیابی و بررسی آماری قرار گرفت، نتایج حاصل نشان می‌دهد که بهترین وضعیت تخمیر برای رسیدن به بالاترین توان آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های تخمیر شده، مربوط به شیرفندق‌های با ۸ درصد تلقیح است که در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شده‌اند (جدول ۱).

بهبود خصوصیات آنتی‌اکسیدانی با انجام فرایند تخمیر توسط محققان بسیاری به اثبات رسیده است و علت این فرایند بیشتر به بیوپپتیدهای حاصل از فعالیت میکروارگانیسم‌ها، ترشحات خارج سلولی میکروارگانیسم‌ها و فعال شدن ترکیبات فنلی موجود در مواد نسبت داده شده است (Nishino *et al*., 2000; Kim *et al*., 2005; McCue & Shetty, 2005).

جدول ۱- برهم‌کنش تاثیر شرایط مختلف تخمیر بر خواص آنتی‌اکسیدانی شیرفندق

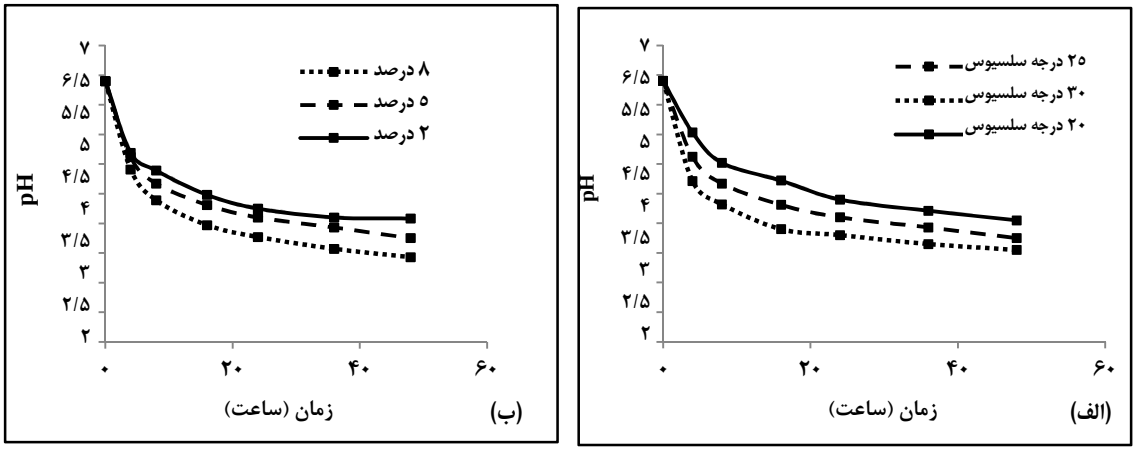
تیمار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
درصد تلقیح	۲	۲	۲	۵	۵	۵	۸	۸	۸
دما (درجه سلسیوس)	۲۰	۲۵	۳۰	۲۰	۲۵	۳۰	۲۰	۲۵	۳۰
درصد بازدارندگی	۶۳/۴۷±۳/۳۷^{e*}	۷۲/۹۱±۴/۱۹^{c}	۶۸/۹۰±۴/۵۷^{d}	۶۸/۳۲±۳/۴۸^{d}	۷۸/۷۵±۱/۹۴^{b}	۷۳/۸۸±۰/۴۹^{c}	۷۵/۰۲±۴/۷۳^{c}	۸۵/۴۳±۳/۱۷^{a}	۷۸/۹۸±۴/۲۴^{b}

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

*میانگین± انحراف معیار

تغییرات pH

pH یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی است که کیفیت هر محصول تخمیری را در فرایند تخمیر به‌شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد. در تولید شیرفندق اولیه، از آب پنیر به‌جای آب استفاده شد و در این حالت لاکتوز اصلی‌ترین منبع کربنی برای رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید اسید لاکتیک است. در فرایند تخمیر، میکروارگانیسم‌ها با تبدیل لاکتوز به اسید لاکتیک و تولید دیگر اسیدهای آلی سبب کاهش pH می‌شوند (Bensmira & Jiang, 2011). pH نمونه‌ها طی زمان تخمیر ارزیابی شد که نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که pH نمونه‌ها در ۲۴ ساعت اولیه تخمیر به‌شدت افت کرده و در ادامه تخمیر در ۲۴ ساعت بعد، تغییرات مختصر است زیرا با گذشت زمان و مصرف سوبسترهای موجود در محیط و کاهش شدید pH رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها مختل می‌شود و آنها وارد فاز سکون می‌شوند، بنابراین تغییرات pH محیط کند است. این نتایج با یافته‌های لندرو و همکاران (Londero *et al.*, 2012) مطابقت دارد.



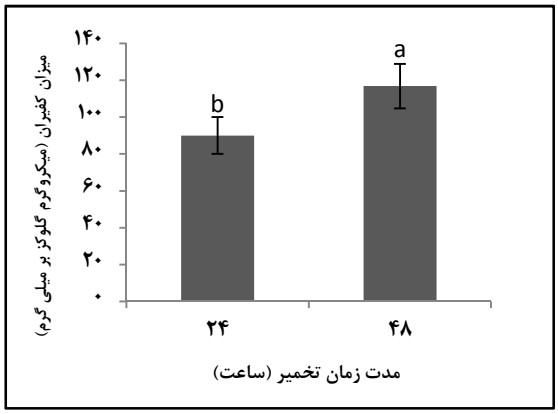
شکل ۳- تغییرات pH شیرفندق‌ها طی تخمیر (الف) در دماهای مختلف و (ب) با درصدهای مختلف تلقیح

تغییرات pH در نمونه‌های تخمیر شده نیز در شرایط مختلف، از جمله سطوح مختلف دما و تلقیح دانک کفیر مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). با افزایش دمای تخمیر، pH نمونه‌ها کاهش بیشتری می‌یابد به گونه‌ای که کمترین pH مربوط به شیرفندق‌های تخمیر شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس است. از طرف دیگر، با افزایش درصد

تلقیح میزان و شدت تغییرات pH بیشتر شده است به‌طوری که پایین‌ترین pH در میزان دانه ۸ درصد مشاهده می‌شود.

اندازه‌گیری میزان کفیران

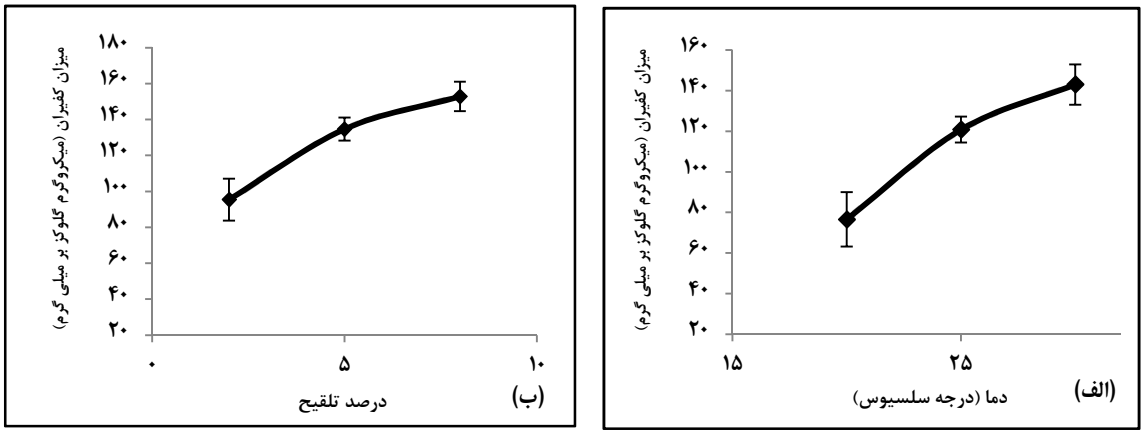
نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان کفیران تولیدی در شیرفندق در اثر تخمیر با دانه کفیر نشان می‌دهد که بیشتر کفیران تولیدی (۸/۲±۷۷/۱ درصد) طی فرایند تخمیر در ۲۴ ساعت اولیه فرایند تخمیر حاصل شده است (شکل ۴). طبق یافته‌های ریمادا و همکاران (Rimada *et al.*, 2001) در pHهای خیلی پایین تولید کفیران که حاصل فعالیت میکروارگانیسم‌هاست مختل می‌شود، pH مطلوب برای فعالیت میکروارگانیسم‌های تولیدکننده کفیران حدود ۵ است (Yokoi & Watanabe, 1992).



شکل ٤- میزان کفیران تولیدی طی تخمیر شیرفندق توسط دانه کفیر بر حسب استاندارد گلوکز

با توجه به اهمیت تغذیه‌ای و ارگانولپتیکی کفیران، یافتن شرایطی که در آن بیشترین میزان تولید این پلی‌ساکارید امکان‌پذیر باشد، بسیار اهمیت دارد. بر همین اساس تاثیر شرایط مختلف تخمیر بر میزان کفیران تولیدی بررسی شد؛ یافته‌های حاصل به‌صورت نمودار در شکل ۵ نشان داده شده است. در نمونه‌های با بیشترین میزان تلقیح، بالاترین میزان کفیران مشاهده می‌شود و در نمونه‌های انکوبه شده در دماهای مختلف اگرچه بیشترین میزان کفیران مربوط به شیرفندق‌های تخمیر شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس است، ولی در بررسی وضعیت دانه‌های کفیر پس از فرایند تخمیر کاهش وزن و اندازه دانه‌ها مشاهده می‌شود. طبق یافته‌های لندرو و همکاران (Londero *et al.*, 2012)، در دماهای بالا دانه کفیر توانایی حفظ پلی‌ساکارید را در ساختار خود از دست می‌دهد، لذا کفیران بیشتری وارد محیط تخمیر می‌شود.

برهم‌کنش هم‌زمان دماهای مختلف تخمیر و سطوح مختلف تلقیح در تولید پلی‌ساکارید کفیران مورد ارزیابی قرار گرفت و همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده شرایطی که در آن بیشترین میزان کفیران در محیط تخمیر تولید شده مربوط به نمونه‌های با ۸ درصد تلقیح است که در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تخمیر شده‌اند. اما در بررسی وضعیت دانه‌های کفیر در انتهای فرایند تخمیر مشخص می‌شود که این دما اثر مخرب بر دانه کفیر دارد و بنابراین برای محافظت از دانه‌های کفیر در تمام مراحل تخمیر و امکان استفاده مجدد از آن، استفاده از ترکیب دما و درصد تلقیح (۲۵ درجه سلسیوس- ۸ درصد) مناسب‌تر خواهد بود.



شکل ۵- میزان کفیران تولیدی توسط دانه کفیر در شیرفندق‌ها تخمیر شده در (الف) دماهای مختلف و (ب) با درصدهای مختلف تلقیح برحسب استاندارد گلوکز

جدول ۲- برهم‌کنش سطوح مختلف تلقیح و دما بر میزان کفیران تولیدی توسط دانه کفیر در شیرفندق‌ها

تیمار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
درصد تلقیح	۲	۲	۲	۵	۵	۵	۸	۸	۸
دما (درجه سلسیوس)	۲۰	۲۵	۳۰	۲۰	۲۵	۳۰	۲۰	۲۵	۳۰
میزان کفیران (میکروگرم گلوکز بر میلی‌گرم)	۶۲/۴±۶/۷^{f}	۱۰۱/۴±۳/۱^{d}	۱۲۲/۶±۰/۸^{c}	۸۱/۲±۰/۹^{e}	۱۱۹/۲±۵/۴^{c}	۱۴۲/۶±۶/۴^{b}	۱۱۶/۲±۲/۷^{c}	۱۴۱/۶±۰/۹^{b}	۱۶۲/۸±۰/۶^{a}

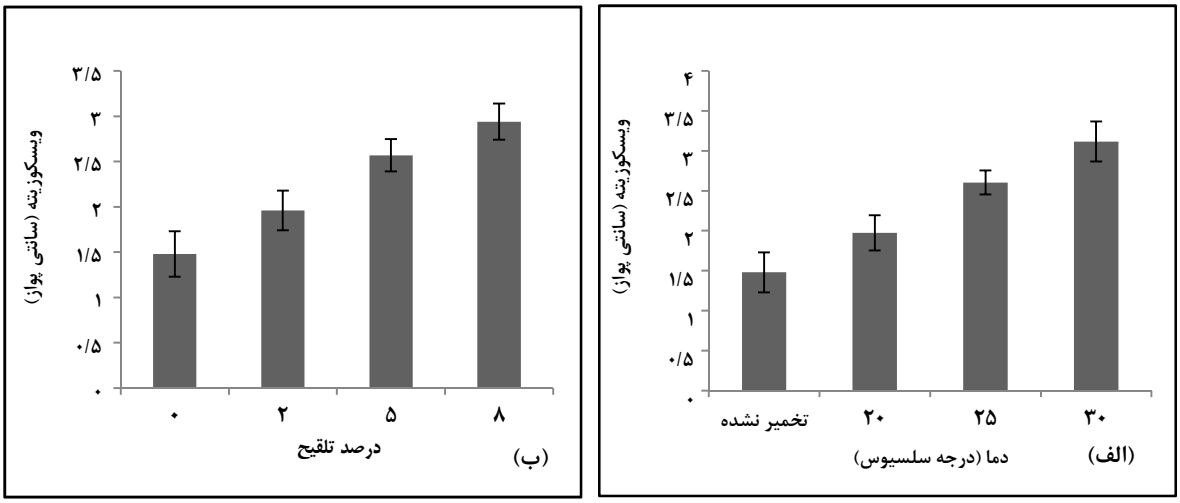
ویسکوزیته

یکی از فاکتورهای مهم و موثر بر خصوصیات ارگانولپتیکی و بازارپسندی نوشیدنی‌ها، ویسکوزیته آنهاست. شکل ۶ نشان می‌دهد که بالاترین ویسکوزیته، در سطح تلقیح ۸ درصد و دمای ۳۰ درجه سلسیوس ایجاد می‌شود. طی فرایند تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های دانه کفیر، متابولیت‌های مختلفی همچون اگزوپلی ساکارید کفیران، اسیدهای آلی و غیره تولید و وارد محصول می‌شوند، این ترکیبات و اثر متقابل آنها می‌تواند باعث تغییر ویسکوزیته نوشیدنی‌ها شود (Garrote *et al.*, 1998). در این میان کفیران به‌عنوان یک هیدروکلوئید آب‌دوست و غلیظ‌کننده نقشی مهم به‌عهده دارد. مقایسه تغییرات ویسکوزیته با روند تغییرات کفیران تولیدی در شکل ۶ همبستگی این دو ویژگی را به‌خوبی نشان می‌دهد.

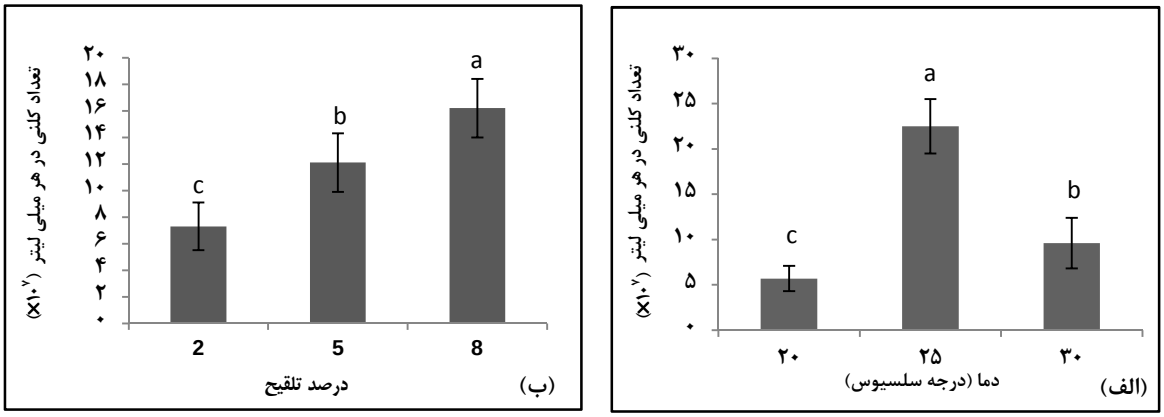
شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک

وجود تعداد فراوانی از باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک در دانه کفیر توسط تعدادی از محققان تایید شده است (Garrote *et al.*, 2000; Farnworth, 2005). بر همین اساس پس از اتمام فرایند تخمیر و خارج کردن دانه‌های کفیر از داخل نوشیدنی، تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک، موجود در نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۷ اثر شرایط مختلف فرایند را بر تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک نوشیدنی نشان می‌دهد. بیشترین تعداد باکتری در نوشیدنی تخمیر شده با سطوح مختلف تلقیح، مربوط به

نمونه‌های با ۸ درصد تلقیح است و در دماهای مختلف، نمونه‌های تخمیر شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بیشترین تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک را دارند. نتایج مشابهی را مظاهری اسدی و همکاران (Mazaheri Assadi *et al.*, 2008) در تخمیر آب پنیر با دانه کفیر به‌دست آورده‌اند.



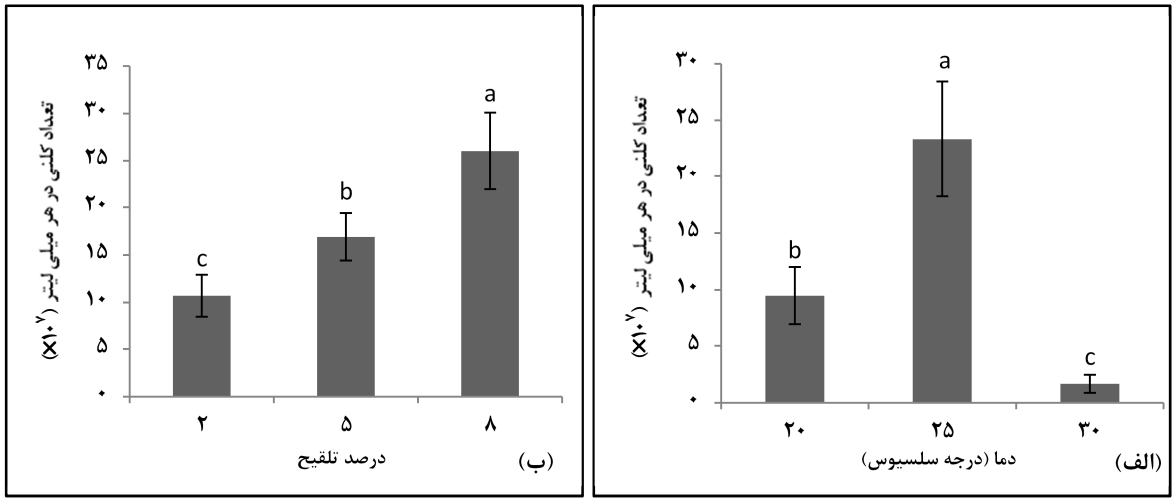
شکل ٦- مقایسه ویسکوزیته شیرفندق تخمیر نشده با نمونه‌های تخمیر شده در (الف) دماهای مختلف و (ب) با درصدهای مختلف تلقیح



شکل ۷- شمارش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک در شیرفندق تخمیر شده (الف) در دماهای مختلف و (ب) با درصدهای مختلف تلقیح

شمارش مخمرها

مطالعات اخیر در خصوص میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌های کفیر نشان می‌دهد که علاوه بر باکتری‌های اسید لاکتیک، بسیاری از مخمرهای دانه کفیر نیز جز پروبیوتیک‌ها هستند (Lourens & Viljoen, 2001; Kumura *et al.*, 2004). نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیشترین تعداد مخمرهای راه یافته از دانه کفیر به شیرفندق تخمیری در نمونه‌های تخمیر شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و سطح ۸ درصد تلقیح است (شکل ۸).



شکل ۸ - شمارش تعداد مخمرها در نوشیدنی تخمیر شده (الف) در دماهای مختلف و (ب) با درصدهای مختلف تلقیح

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت غذاهای تخمیری به‌ویژه انواع پروبیوتیک و حضور این میکروارگانیسم‌ها در دانه کفیر، نوشیدنی جدیدی با خصوصیات فراسودمندی بالا با استفاده از شیرفندق و دانه کفیر تولید شد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که دما، زمان و درصد تلقیح دانه کفیر اثر معنی‌داری روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیرفندق نهایی دارد. به گونه‌ای که بیشترین تغییرات ویسکوزیته (به‌دلیل میزان کفیران تولیدی بیشتر) و بالاترین توان آنتی‌اکسیدانی (به‌منظور تولید متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی بیشتر) در تلقیح ۸ درصد مشاهده می‌شود و در بین دماهای مختلف، بیشترین کاهش pH به‌دلیل تولید اسید لاکتیک و بیشترین کفیران در نوشیدنی‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس حاصل شده است. بهترین وضعیت آنتی‌اکسیدانی و شمارش میکروبی برای شیرفندق‌ها در محیط با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌دست آمده است. در مجموع، نتایج این بررسی نشان می‌دهد که برای رسیدن به نوشیدنی فراسودمند پروبیوتیکی با خواص آنتی‌اکسیدانی بالا می‌توان از دمای ۲۵ درجه سلسیوس و حجم تلقیح ۸ درصد استفاده کرد. بدین ترتیب با انتخاب مناسب‌ترین شرایط تخمیری می‌توان به محصولی با خصوصیات تغذیه‌ای و ارگانولپتیکی قابل قبول دست یافت.

مراجع

Albert, C. M., Gaziano, J. M., Willett, W. C., Manson, J. E. and Hennekens, C. H. 2002. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the physicians health study. Internal Med. 162, 1382-1387.

Bensmira, M. and Jiang, B. 2011. Organic acids formation during the production of a novel peanut-milk kefir beverage. Dairy Sci. 2, 18-22.

Burda, S. and Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J. Agr. Food Chem. 49, 2774-2779.

Cevikbas, A., Yemni, E., Ezzedenn, F. W., Yardimici, T., Cevikbas, U. and Stohs, S. J. 2006. Antitumoral, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. Physiother. Res. 8, 78-82.

Delgado, T., Malheiro, R., Pereira, J. A. and Ramalhosa, E. 2010. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) kernals as a source of antioxidants and their potential in relation to other nuts. Ind. Crop. Prod. 32, 621-626.

Dragone, G., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M. and Teixeira, J. A. 2009. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. Food Chem. 112, 929-935.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 38, 350-352.

Farnworth, E. R. 1999. Kefir: From folklore to regulatory approval. J. Nutraceut. Function. Med. Foods. 1, 57-68.

Farnworth, E. R. 2005. Kefir: A complex probiotic. Food Sci. Technol. Bulletin: Functional Foods. 2, 1-17.

Fraser, G. E., Sabate, J., Beeson, W. L. and Strahan, M. A. 1992. Possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. Arch. Intern. Med. 152, 1416-1424.

Garrote, G. L., Abraham, A. G. and De Antoni, G. L. 1998. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. J. Dairy Res. 65, 149-154.

Garrote, G. L., Abraham, A. G. and De-Antoni, G. L. 2000. Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. Food Protect. 63, 364-369.

Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A. and Domingues, L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. Biotechnol. Adv. 28, 375-384.

Kim, H. S., Chae, H. S., Jeong, S. G., Ham, J. S., Im, S. K., Ahn, C. N. and Lee, J. M. 2005. Antioxidant activity of some yogurt starter cultures. Anim. Sci. 18, 255-258.

Koutinas, A. A., Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Katechaki, E., Bekatorou, A. and Bosnea, L. A. 2009. Whey valorisation: a complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. Bioresource Technol. 100, 3734-3739.

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E. and Hilpert, K. F. 1999. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. Am. J. Clin. Nutr. 70, 1009-1015.

Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T. and Shimazaki, K. 2004. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. Dairy Sci. 87(12): 4050-4056.

Liu, J., Wang, Y., Tian, Z. and Yuan, Y. 2003. Study on hazelnut milk fermented with bifidobacterium bifidum and fermentation characteristics. J. Jilin Agriculture University. 25(2): 221-223, 227.

Liu, J. R., Lin, Y. Y., Chen, M. J., Chen, L. J. and Lin, C. W. 2005. Antioxidative activities of kefir. Anim. Sci. 18, 567-573.

Londero, A., Hamet, M. F., Antoni, G. L. D., Garrote, G. L. and Abraham, A. G. 2012. Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterization. Dairy Res. 79, 262-271.

Lourens, A. and Viljoen, B. C. 2001. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. Food Res. Int. 34(9): 791-796

Manson, J. E., Nathan, D. M., Krolewski, A. S., Stampfer, M. J., Willett, W. C. and Hennekens C. H. 1992. A prospective study of exercise and incidence of diabetes among US male physicians. JAMA-J. AM. MED. ASSOC. 268, 63- 67.

Mazaheri Assadi, M., Abdolmaleki, F. and Mokarrame, R. R. 2008. Application of whey in fermented beverage production using kefir starter culture. Nutr. Food Sci. 38(2): 121-127.

McCue, P. P. and Shetty, K. 2005. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using kefir cultures. Process Biochem. 40, 1791-1797.

Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C. and Crescenzi, V. 1999. Isolation and characterization of a ropy lactobacillus strain producing the exopolysaccharide quefiran. Applied Microbiol. 53, 69-74.

Nishino, T., Shibahara-Sone, H., Kikuchi-Hayakawa, H. and Lshikawa, F. 2000. Transit of radical scavenging activity of milk products prepared by Maillard reaction and Lactobacillus casei strain Shirota fermentation through the hamster instestine. J. Dairy Sci. 83, 915-922.

Oliveira, I., Sousa, A., Sa Morais, J., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L. M. and Pereira, J. A. 2008. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. Food Chem. Toxicol. 46, 1801-1807.

Paraskevopoulou, A., Athanasiadis, I., Blekas, G., Koutinas, A. A., Kanellaki, M. and Kiosseoglou, V. 2003. Influence of polysaccharide addition on stability of a cheese whey kefir-milk mixture. Food Hydrocolloid. 17, 615-620.

Piermaria, J. A., De La Canal, M. L. and Abraham, A. G. 2008. Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. Food Hydrocolloid. 22, 1520-1527.

Rimada, P. S. and Abraham, A. G. 2001. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. J. Dairy Res. 68, 653-661.

Rizwan, S. K. and Rousseau, D. 2006. Hazelnut oil migration in dark chocolate-kinetic, thermodynamic and structural considerations. Lipid Sci. Technol. 108(5): 434-443.

Shahidi, F., Alasalvar, C. and Liyana-Pathirana, C. M. 2007. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. Agr. Food Chem. 55, 1212-1220.

Sirirat, D. and Jelena, P. 2010. Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced from thai jasmine rice milk. Biotechnol. 9, 332-337.

Yokoi, H. and Watanabe, T. 1992. Optimum culture conditions for production of kefiran by Lactobacillus sp. KPB-167B isolated from kefir grains. J. Ferment. Bioeng. 74, 327-329.

Journal of Agricultural Engineering Research/Vol.15/No.3/2014/P:13-26

Evaluation of Physicochemical and Microbial Properties of Hazelnut Whey-Based Beverage Fermented with Kefir Grain

N. Maleki, F. Khodaiyan* and M. Mousavi

* Corresponding Author: Associated Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tehran, P. O. Box: 4111, Karaj, Iran. Email: khodaiyan@ut.ac.ir
Received: 18 June 2013, Accepted: 8 February 2014

The presence of unsaturated fatty acids and phytosterols in hazelnuts and hazelnut products, including hazelnut milk, are useful for health, especially for preventing cardiovascular disease. Fermentation with probiotic microorganisms present in kefir grain increases the functional properties of the products. Hazelnut milk is nutritious and can be used in drinks in addition to whey. The present study produced a novel kefir-like beverage using hazelnut and whey. The effects of fermentation, type of kefir grain, milk ratio and fermentation temperature on the antioxidant power, acidity, kefiran content, apparent viscosity and microflora composition were evaluated to determine the most appropriate functional and organoleptical properties. Results showed that fermentation using kefir grains changed these properties in hazelnut milk; the amount of change increased as the kefir grain content increased. Hazelnut milk fermented with 8% kefir grain at 25°C showed the highest functional properties, especially in antioxidant power and probiotic count. Although the highest concentration of polysaccharide in the media was observed at 30°C, this temperature has a destructive effect on the kefir grain.

Keywords: Antioxidant, Hazelnut Milk, Kefiran, Kefir Grain, Probiotic, Whey