DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/JIFT.2019.3637.1874

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، دوره ۷، شماره ۲، صفحه ۲۵۵-۲۴۳، زمستان ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

تولید شیر تخمیری فراسودمند توسط لاکتوباسیل‌های جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران

فاطمه باقری[۱]، سعید میردامادی[۲*]، مهتا میرزایی،[۳] سید ملیحه صفوی[۴]

۱. دانشجوی دکتری زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۲. استاد پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

۴. استادیار پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۷، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۸/۴/۱۹، تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۱۱)

چکیده

باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای سابقه طولانی در تولید محصولات لبنی تخمیری هستند و به‌واسطه توانایی پروتئولیز، اهمیت بالایی نیز در تولید پپتیدهای زیست‌فعال و بنابراین افزایش اثرات سلامت بخشی محصولات لبنی ایفا می‌کنند. در تحقیق حاضر توانایی دو سویه باکتری اسیدلاکتیک بعد از جداسازی از محصولات لبنی بومی ایران از نظر توانایی تخمیر، خواص پروتئولیتیک، تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان و ایجاد خواص حسی مورد قبول در شیر تخمیری مورد سنجش و مقایسه قرار گرفتند. دو سویه جداسازی شده شامل *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (PTCC 1929) و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (PTCC1930) بر اساس توانایی تخمیر قندها و آنالیز ۱۶ S rRNA شناسایی شدند. نتایج نشان دادند علیرغم رشد بهتر باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در ۲۴ h آغازین، اسیدیفیکاسیون اولیه در *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بیشتر است. میزان pH در ۲۴ h اولیه در نمونه حاوی *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به کمتر از ۴ رسید در صورتیکه این میزان برای *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بعد از ۷۲ h به‌دست آمد. در کشت توام مراحل کاهش pH با اسیدیفیکاسیون اولیه *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و سپس با اسیدیفیکاسیون ثانویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به میزان حدود ۳/۶۳ رسید. نتایج نشان دادند که علیرغم توانایی پروتئولیز بیشتر لاکتوباسیلوس هلوتیکوس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه حاوی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* حدود ۱/۵ تا ۱/۷ برابر بیشتر است. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در همه نمونه‌ها در زمان ۲۴ h اولیه مشاهده شد و افزایش پروتئولیز باعث افزایش تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان نشد. نتایج ارزیابی خواص حسی نمونه‌های تخمیری در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ h نشان داد که *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در شیر تخمیری در زمان ۲۴ h به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) دارای امتیاز طعم و مقبولیت کمتری نسبت به سایر نمونه‌ها است و اختلاف آماری معنی‌داری ($p>۰/۰۵$) بین سایر نمونه‌ها مشاهده نشد. مجموع نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که کشت توام دو سویه توانایی بهتری در تولید متابولیت‌ها و پپتیدهای زیست‌فعال آنتی‌اکسیدان با پذیرش کلی مناسب داشته و پتانسیل تولید محصول لبنی تخمیری با خواص سلامت بخش را داراست.

واژه‌های کلیدی: شیر، باکتری‌های اسید لاکتیک، تخمیر، فعالیت آنتی اکسیدانی، نوشیدنی فرا سودمند.

* نویسنده مسئول: mirdamadi@irost.ir

۱. مقدمه

در سال‌های اخیر با گسترش آگاهی در زمینه ارتباط مستقیم بین غذا و سلامت، تمایل مصرف‌کنندگان به مصرف محصولات غذایی فراسودمند افزایش یافته است. محصولات لبنی همیشه نقش مهمی را در رژیم غذایی افراد ایفا کرده‌اند و در سال‌های اخیر توجه بسیاری به بهبود ارزش تغذیه‌ای و سلامت‌بخشی آن‌ها شده است. تخمیر یکی از موثرترین روش‌ها برای افزایش ارزش تغذیه‌ای و سلامت بخشی محصولات لبنی است و گزارشات متعددی مبنی بر نقش سلامت‌بخشی باکتری‌های اسید لاکتیک مانند اثرات ضد میکروبی، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی و ضد سرطانی وجود دارد[۱].

پروتئین به‌عنوان یکی از اجزاء اصلی شیر و به‌عنوان یک ماکرومولکول مهم، علاوه بر نقش تغذیه‌ای رایج، منبع غنی از توالی‌های اسیدهای آمینه در ساختار خود می‌باشد که با عنوان پپتیدهای زیست فعال شناخته شده و دارای خواص زیستی متفاوتی نظیر خواص آنتی اکسیدانی، ضد فشار خونی، ضد میکروبی و غیره می‌باشند[۲]. گرچه پپتیدهای زیست فعال از منابع پروتئینی مختلفی جداسازی و شناسایی شده‌اند، اما کازئین وپروتئین آب پنیر منبعی مهم از توالی‌های پپتیدی با خواص زیستی مختلف هستند که در اثر پروتئولیز پروتئین‌های شیر توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک باکتری‌های استارتر تولید می‌شوند و بنابراین محصولات لبنی در میان محصولات فراسودمند مختلف، به‌عنوان یک منبع با ارزش از پپتیدهای زیست‌فعال شناخته می‌شوند[۳].

به‌دلیل عدم توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در سنتز اسید آمینه‌های ضروری برای رشد، سیستم‌های آنزیمی آبکافت پروتئین‌ها و تبدیل آن‌ها به پپتیدها یا اسیدهای آمینه در طی فرایند تخمیر توسعه یافته است. آمینواسیدهای آزاد و پپتیدهای با اندازه کوچک به‌عنوان منبع پروتئینی توسط میکروارگانیسم‌ها استفاده و پپتیدهای باقیمانده در محیط در صورت ایفای فعالیت زیستی مورد قبول، باعث بهبود ارزش تغذیه‌ای فراورده لبنی می‌شوند. پارامترهای مختلف نظیر نسبت آنزیم/سوبسترا، ترکیب محیط، تیمار حرارتی، دما، pH، نسبت کربن/نیتروژن، ممکن است بر بیان و فعالیت سیستم پروتئولیتیکی باکتری‌ها و بنابراین تولید پپتیدهای زیست فعال موثر باشند [۲، ۴].

خواص پپتیدهای زیست فعال وابسته به ترکیب و توالی آمینواسیدی آن‌ها است و گاهی پپتیدهای تولید شده دارای خواص چندگانه می‌باشند [۵]. در میان خواص مختلف گزارش شده، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها به دلیل گسترش بیماری‌های ناشی از استرس‌های اکسیداتیو نظیر آلزایمر، سرطان، پیری وغیره افزایش یافته است[۶]. جعفری و همکاران ۳۰ نمونه شیر تخمیر نشده و تخمیر شده را بررسی و نشان دادند که شیرهای تخمیری دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به شیرهای تخمیر نشده هستند [۷]. محقین بسیاری حضور پپتیدهای آنتی اکسیدان در محصولات لبنی تخمیری مختلف مانند انواع پنیرها [۸]، ماست [۹] ، شیر ترش [۱۰] ،کفیر [۱۱] و چال [۱۲] را گزارش کرده اند و در مطالعات دیگری، نقش فرایند تخمیر در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است [۱۵-۱۳].

در تحقیق حاضر، پتانسیل دو سویه باکتریایی جداسازی و خالص سازی شده از محصولات لبنی سنتی ایران برای تولید محصول لبنی تخمیری با خواص فیزیکوشیمیایی، حسی، پروتئولیتیک و آنتی‌اکسیدانی مورد قبول در طی زمان‌های مختلف تخمیر مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفته است.

۱. مواد و روش‌ها

۲.۱. مواد

شیر گاو استریلیزه کم چرب از شرکت کاله ،تهران-ایران خریداری شد. محیط کشت MRS و آلبومین سرم گاوی از شرکت مرک آلمان و سایر مواد مورد استفاده با گرید آزمایشگاهی، از شرکت سیگما خریداری شدند.

۲.۲. جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتیکی از نمونه‌های لبنی

دو سویه از لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از محصولات لبنی (ماست) بومی مربوط به مناطق گردنه حیران دراردبیل، نواحی بهبهان وروستای حسین آباد درخوزستان انتخاب و بر اساس خواص بیوشیمیایی شامل تست کاتالاز و تخمیر قندها و خواص مولکولی شامل آنالیز توالی 16 S rRNA مورد شناسایی قرار گرفتند [۱۶]. علاوه بر آن، فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌ها با اندازه‌گیری قطرهاله تجزیه پروتئین در محیط شیرخشک بدون چربی (Skim milk) مطابق روش شرح داده شده توسط پلین و

همـــکاران ارزیابی شـــد [۱۷]. در این روش، از محـــیط ۱۰٪ شیر خشـک بدون چربی در آب و حـــاوی ۱ ٪ آگار استـــفاده شـــد. کشت باکتـــری‌ها پس از ۴۸ h بر روی محـــیط کشـت De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) در دمای ۳۷ °C تهیه و ۵۰ µL از سوپرناتانت آن به هر چاهک اضافه شد. بعد از ۲۴ h، قطر هاله ناشی از پروتئولیز پروتئین اندازه‌گیری گردید.

۳.۲. آماده سازی کشت ذخیره و تولید شیر تخمیری

از باکتری‌های رشد یافته در محیط MRS برای تهیه نمونه فریزری استفاده و باکتری‌ها در فریزر ۸۰°C- و در حضور گلیسرول ۳۰٪ v/v و شیر خشک بدون چربی ۱۰٪ W/V نگه‌داری شدند [۱۸]. برای تهیه نمونه پیش کشت، ۱mL از نمونه فریزری به ۱۰ mL محیط استریل اضافه و در دمای ۳۷ °C گرماگذاری شد. پس از رسیدن رشد به انتهای فاز لگاریتمی بر اساس منحنی رشد، کشت‌ها در دور ۵۰۰۰ g برای ۱۰ min سانتریفوژ و سلول‌ها جدسازی شدند. جمعیت مایه تلقیح با استفاده از نمونه نیم مک فارلند استاندارد و نسبت تلقیح ۱ حجم سوسپانسیون باکتری به ۱۰ حجم شیر در نظر گرفته شد. اثر تخمیر باکتری‌های فوق در شیر گاو کم چرب استریل در سه تیمار مختلف ارزیابی شد. بنابراین تیمارهای به کار رفته شامل نمونه‌های حاوی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و ترکیب دو سویه بودند. در تیمار ترکیبی یاکشت توام، از تلقیح همزمان دو باکتری به نسبت ۱:۱ و با حجم برابر استفاده شد. شیرهای تلقیح شده برای مدت ۷۲ hr در دمای ۳۷ °C نگه‌داری شدند و با فاصله ۲۴ h ، نمونه برداری انجام و از نظر pH، پروتئولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفتند[۱۲].

۴.۲.تعیین ویژگی‌های شیر تخمیری

۱.۴.۲. pH شیر تخمیری

pH نمونه‌های شیر تخمیری با استفاده از pH متر و بر اساس استاندارد AOAC 2002 به شماره۹۴۷,۰۵ اندازه‌گیری شد[۱۹].

۲.۴.۲. میزان پروتئین شیر تخمیری

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین محلول در نمونه‌ها و گزارش فعالیت زیستی بر اساس میزان پروتئین محلول برای هر نمونه، از روش لوری اصلاح شده توسط هارتری و همکاران استفاده شد. ابتدا ۰/۵ mL از نمونه پروتئینی ب ا۲/۵ mL از محلول A شامل سود ۰/۲N، کربنات سدیم ۰/۴٪، سولفات مس ۱٪ وسدیم پتاسیم تارتارات ۲٪ مخلوط و بلافاصله ورتکس شد. پس از ۱۰ دقیقه نگه‌داری در شرایط تاریکی، ۲۵۰µL محلولB شامل فولین رقیق شده با آب V/V :۱/۱ به هر نمونه اضافه، ورتکس و بعد از گذشت ۲۰ min میزان جذب در طول موج ۷۳۴ nm خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد ترسیم شده با آلبومین سرم گاوی در غلظت‌های ۴۰۰-۰ µg/mL، غلظت پروتئین محلول در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد [۲۰].

۳.۴.۲. میزان هیدرولیز پروتئین‌های شیر

شدت پروتئولیز با استفاده از روش نورسنجی ارتو-فتال دی آلدهید (OPA(O-phetaldialdehyde بر اساس روش چارچ و همکاران اندازه‌گیری شد. برای این منظور محلول تازه OPA شامل۲۵ mL سدیم تتراهیدروبورات ۱۰۰ mM، ۲/۵ mL محلول SDS ۲۰٪، ۴۰ mg OPA در ۱ mL متانول محلول و ۱۰۰ µl مرکاپتواتانول با آب مقطر به حجم نهایی ۵۰ mL رسانده و ۱ mL از آن به ۲۵µL نمونه اضافه شد و بعد از ۲ دقیقه نگه‌داری در دمای اتاق، میزان جذب نور در طول موج ۳۴۰ nm اندازه‌گیری شد. از محلول L-لوسین با غلظت ۴-۰/۱ mg/mL برای رسم منحنی استاندارد و تعیین میزان آمین‌های آزاد استفاده گردید[۲۱].

۴.۴.۲. فعالیت آنتی اکسیدانی شیر تخمیری

فعالیت آنتی اکسیدانی محصول تخمیر شیر به‌وسیله دو سویه باکتری مورد تحقیق از طریق دو مکانیسم مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS بررسی شد.

۱.۴.۴.۲.فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH

برای ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، ۸۰ µl از سرم نمونه‌های شیر تخمیر شده یا آب، به عنوان کنترل به ۷۲۰ µL محلول ۰/۰۰۲ درصد (W/V) DPPH در اتانول اضافه شده، برای۱۰ ثانیه مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه دردمای اتاق و در تـــاریکی نگه‌داری شدند. میـــزان جذب محـــلول حاصل در ۵۱۷ nm اندازه‌گیری و درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال با

استفاده از فرمول (۱) محاسبه گردید.

(۱)

$$\text{درصد فعالیت مهار کنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه}-\text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

از منحنی استاندارد ترولوکس ۰-۲۵۰ µM برای بیان فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب µMTE/mg protein استفاده شد[۲۲].

۲.۴.۴.۲. فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

رادیکال ABTS با مخلوط کردن محلول ۷mM ABTS و پرسولفات پتاسیم ۲/۴۵ mM تولید و بعد از ۱۲ تا ۱۶ h نگه‌داری در شرایط تاریکی، محلول تهیه شده با استفاده از بافر فسفات ۵mM با PH=۷/۴ رقیق شد تا میزان جذب در ۷۳۴ nm به ۰/۷±۰/۰۲برسد. نمونه مورد آزمایش به میزان ۲۵µL به ۱ mL محلول ABTS اضافه و بعد از ۶ دقیقه میزان جذب نمونه در طول موج ۷۳۴ nm اندازه‌گیری شد. درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS با استفاده از فرمول (۲) محاسبه گردید[۲۳].

(۲)

$$\text{درصدفعالیت مهار کنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه}-\text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

از منحنی استاندارد ترولوکس با غلظت ۰ تا ۴۰۰ µM برای بیان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب µMTE/mg protein استفاده شد.

۵.۲. ارزیابی خواص حسی شیر تخمیری

از گروه ۱۶ نفره از افراد آموزش ندیده برای ارزیابی خواص حسی شیرهای تخمیری، نمونه‌های آماده شده بعد از ۲۴ و ۴۸ h تخمیرشده و مطابق روش زانگ و همکاران استفاده شد [۲۴]. نمونه‌ها به‌صورت اتفاقی در اختیار افراد قرار داده شدند. ۶ نمونه کد گذاری شده شامل نمونه‌های تخمیر شده به مدت ۲۴ و ۴۸ h به‌وسیله سویه‌های تک و ترکیب دو سویه بعد از سرد شدن در یخچال در اختیار افراد قرار گرفتند. از ارزیاب‌ها خواسته شد بعد از آزمودن هر نمونه، دهان خود را با آب شست و شو دهند. خواص حسی محصول شامل طعم، بو، بافت، رنگ و مقبولیت کلی با مقیاس هدونیک ۵ نقطه به‌وسیله ارزیاب‌ها امتیازدهی شد (۰= خیلی بد، ۵= خیلی خوب).

۶.۲. آنالیز آماری

تمام مراحل تخمیر برای دو سویه باکتریایی وترکیب دو سویه، همچنین آزمون‌های مربوط به خواص تکنولوژیکی مورد بررسی نیز در سه تکرار انجام و داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. به منظور بررسی اختلاف میانگین بین داده‌ها از جدول تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد و در صورت معنی‌دار بودن آزمون مقایسه میانگین دانکن به کار رفت. از نرم افزار گراف پد (ورژن ۶) برای رسم گراف‌ها و آنالیز داده‌ها استفاده شد. برای آنالیز نتایج آزمون حسی از روش غیر پارامتریک و آزمون friedmans two-way ANOVA استفاده شد و داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ارزیابی شدند.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. شناسایی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده

دو سویه باکتری اسید لاکتیک از محصولات لبنی بومی ایران جدا سازی و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفته و در مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های ایران (PTCC) ثبت گردیدند. مطابق نتایج حاصل، دو سویه شناسایی شده شامل *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (PTCC 1929) و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (PTCC 1930) بودند.

مطالعه منابع تحقیقاتی مختلف نشان می‌دهد هر دو سویه باکتریایی دارای کاربرد فراوانی در تولید محصولات لبنی تخمیری هستند. گونه *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک استارتر ترموفیل با تخمیر همگن در ساخت پنیر-هایی نظیر پنیر سوئیسی و پنیرهای سخت ایتالیایی کاربرد دارد [۲۵]. این گونه حاوی پروتئازهای دیواره سلولی و پپتیدازهای درون سلولی است که می‌توانند نقش موثری در تولید پپتیدهای زیست فعال از پروتئین‌های شیر داشته باشند. در بسیاری از مطالعات از آن به‌عنوان یک باکتری پروبیوتیک نام برده شده است [۲۵، ۲۶] و دو نوشیدنی تخمیری تجاری با خاصیت ضد فشار-خون شامل اولوس (Valio Ltd, Valio, Finland) وکلپیس (Calpis Food Industry Co. Ltd. Japan) با استفاده از آن تولید شده‌اند [۲۷]. *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* نیز یک گونه لاکتوباسیلوس با تخمیر ناهمگن اجباری موجود در دستگاه گوارش است و در صنایع لبنی به‌عنوان استارتر استفاده می‌شود و همچنین در انواعی از غذاهای تخمیری بر پایه غلات وجود

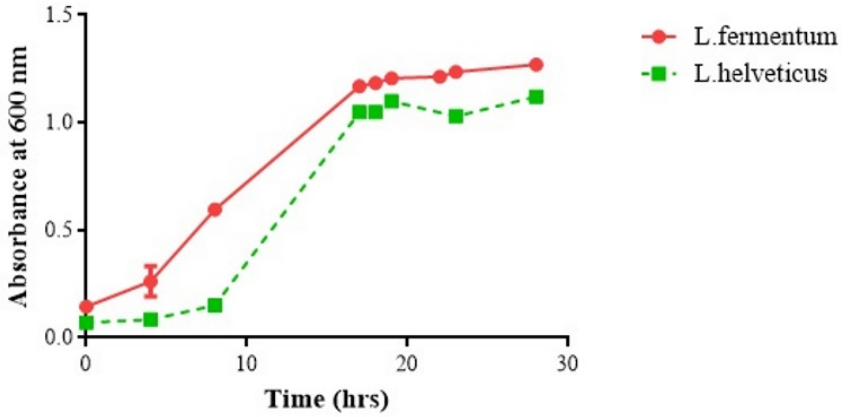
دارد[۱۶]. با وجود مطالعات بسیاری که بر روی این سویه باکتریایی انجام شده است اما هنوز خواص تکنولوژیک آن‌ها بخصوص در مورد *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* کمتر مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است[۲۸]. علاوه بر آن توانایی دو سویه برای تولید شیر تخمیری با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد مقایسه قرار نگرفته است.

۲.۳. بررسی رشد باکتری‌ها

رشد باکتری‌های جدا سازی شده شامل *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در محیط کشت MRS و در طی h ۲۸ مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (شکل۱) و نتایج نشان‌دهنده تاخیر رشد *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* نسبت به *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* است. باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* جزء پرتوقع‌ترین باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند و دارای سیستم اگزوتروف چند آمینواسیدی می‌باشند. برای تامین نیاز غذایی در زمان رشد در شیر، باکتری از سیستم پروتئولیتیکی استفاده می‌کند که قادر است پپتیدهای کوچکی را تولید کند و آمینواسیدهای مختلفی را از ماتریکس کازئین به محیط آزاد کند. این موضوع توجیه کننده رشد با تاخیر این باکتری نسبت به سایر سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌باشد[۲۵].

۳.۳. بررسی توانایی کاهش pH شیر

pH جزء پارامترهای شاخص برای انجام تخمیر به‌وسیله کشت میکروبی است[۱۴]. توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده برای تولید اسید در طی فرایند تخمیر شیر، با اندازه‌گیری pH مورد بررسی قرار گرفت. (شکل ۱) مطابق انتظار، تمام سویه-های باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) دارای توانایی قابل ملاحظه برای اسیدی کردن شیر خام و پاستوریزه هستند و این قابلیت با توانایی آن‌ها برای شکستن قندهای شش کربنه و تبدیل به اسید لاکتیک مرتبط می‌باشد. همانطورکه نتایج بررسی تغییرات pH در طی زمان تخمیر نشان می‌دهند، بیشترین شیب کاهش pH برای هر دو باکتری به صورت تک و توام، در طی hr ۲۴ اولیه رخ داد و میزان کاهش pH در شیر تخمیر شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بیشتر از شیر تخمیر شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بود. به‌طوری‌که pH نمونه حاوی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بعد از hr ۲۴ تخمیر به‌ترتیب به مقادیر ۰/۰۲±۳/۹۶ و ۰/۰۴±۴/۸۴ رسید و بعد از آن کاهش pH برای هر دو باکتری با سرعت کمتری پیش رفت. به‌طوری‌که بعد از hr ۷۲، pH هر دو نمونه به مقدار مشابه ۳/۸۷ رسید. محققین دیگر نیز گزارش کردند که از بین سویه‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم مورد بررسی ۳۶ و ۴۷٪ از آن‌ها به‌ترتیب دارای خاصیت اسیدی کردن سریع و متوسط هستند به‌طوری‌که باعث کاهش ۲ واحدی pH خمیر ذرت در طی hr ۹ تا ۱۲ تخمیر می‌شوند. اما ۱۷٪ از سویه‌های مورد بررسی هرگز قادر به کاهش ۲ واحدی pH نبودند[۲۸]. دیگر محققین نیز کاهش pH از مقادیر ۶/۴۶ به ۳/۷۲ را در شیر تخمیری بعد از hr ۱۲ تخمیر به‌وسیله سویه‌های تک و ترکیب *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* گزارش



شکل (۱) منحنی رشد دو سویه باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و لاکتوباسیلوس فرمنتوم در طی ۲۸ روز رشد در محیط کشت MRS-broth و دمای ۳۷°C. داده‌ها میانگین سه بار تکرار هستند

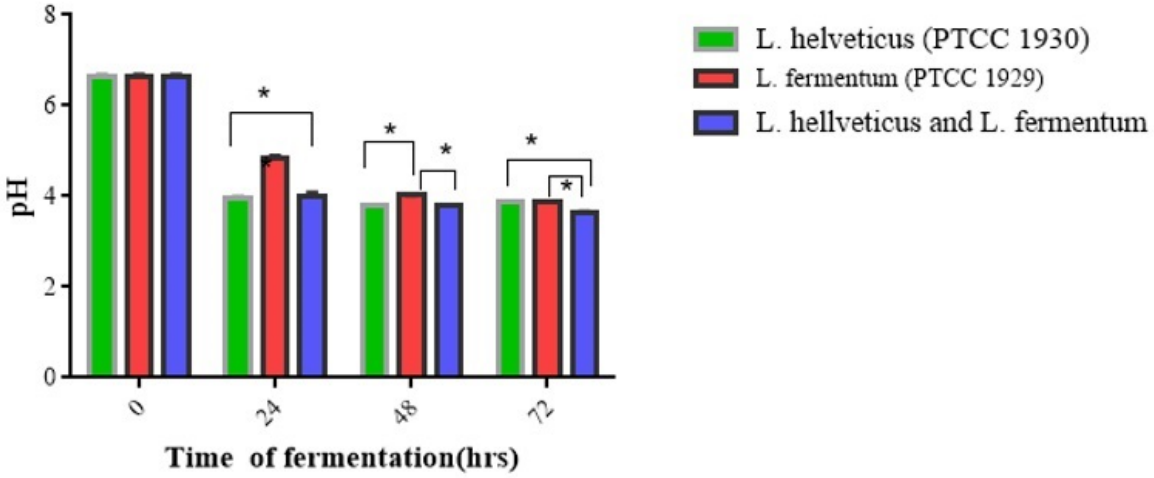
Fig. 1. The growth curve of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus fermentum* during 28 days growth in MRS-broth, at 37 ºC. Data are presented as mean of three replications

کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد درصد بالاتری از سویه‌های *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* مورد بررسی دارای قدرت بالاتر تولید اسید هستند در حالی‌که اکثر سویه‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مورد بررسی دارای ویژگی متوسط در اسیدی کردن می‌باشند[۲۹]. تفاوت در مقادیر pH اندازه‌گیری شده بعد از ۲۴ h برای دو سویه باکتری ممکن است به دلیل تفاوت در سرعت رشد و مسیر متابولیسمی متفاوت برای دو باکتری باشد. به‌طوری‌که *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* دارای مسیر تخمیر لاکتیکی همگن و دارای رشد تاخیری به‌دلیل نیازهای رشد بیشتر و قدرت بالاتر تولید اسید است در حالی‌که *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* دارای مسیر تخمیری ناهمگن، سرعت ملایمتر تولید اسید و رشد سریع‌تر است [۲۵, ۳۰]. بر اساس نتایج حاصل از منحنی رشد و تغییرات pH به نظر می‌رسد رشد سریع‌تر *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* نسبت به *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* در ساعات اولیه توجیه کننده عدم کاهش شدید pH در نمونه‌های حاوی سویه‌های ترکیبی باشد و بعد از آن با آغاز رشد *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* با قدرت اسید سازی بالاتر، کاهش pH در نمونه‌ها تشدید شده و بعد از ۷۲ hr تخمیر، به‌دلیل تبدیل کامل لاکتوز بعنوان سوبسترا به اسید، pH نهایی در همه نمونه‌ها به حدود مشابه رسیده است به‌طوری‌که اختلاف آماری معنی داری بین آن‌ها مشاهده نشد (p> ۰/۰۵).

۴.۳. بررسی فعالیت پروتئازی سویه‌های جدا سازی شده

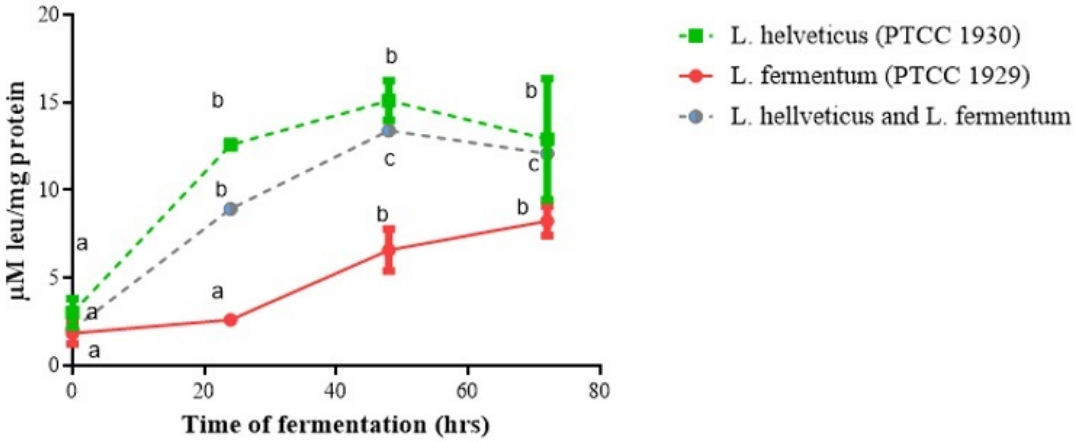
ارزیابی درجه پروتئولیز یک پارامتر کلیدی برای بررسی میزان آزادسازی پپتیدها در جریان فرایند تخمیر می‌باشد. در طی تخمیر، پروتئین‌های شیر به‌وسیله پروتئینازهای خارج سلولی لاکتوباسیلوس‌ها، هیدرولیز می‌شوند[۱۴] .

توان پروتئازی دو سویه باکتری مورد بررسی درنمونه شیر تخمیری با استفاده از محیط آگار حاوی شیر بدون چربی ارزیابی و قطرهاله ناشی از فعالیت پروتئو لیتیک باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند هر دو سویه باکتریایی مورد آزمون دارای توانایی پروتئولیز پروتئین‌های شیر هستند و میانگین قطرهاله پروتئولیز برای دو سویه باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به‌ترتیب ۱۷ و ۱۵mm اندازه‌گیری شد که دارای اختلاف آماری معنی داری نبودند (قطر چاهک ۵mm) (p> ۰/۰۵) .علاوه بر آن فعالیت پروتئولیتیک دو باکتری در جریان فرایند تخمیر در شیر و با استفاده از روش *OPA* نیز مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. اساس این روش اندازه‌گیری گروه‌های آمین آزاد تولید شده در جریان فرایند تخمیر می‌باشد. نتایج ارائه شده در شکل (۳) نشان دهنده پیشرفت هیدرولیز آنزیمی در طول زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h از تخمیر به‌ترتیب برای *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و ترکیب دو



شکل(۲) تغییرات pH شیر تخمیر شده توسط دو سویه باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و ترکیب دو سویه در طی ۷۲ h تخمیر در دمای ۳۷ °C. نتایج میانگین سه تکرار هستند. میانگین اعداد به دست آمده برای هر سویه باکتریایی در طی زمان تخمیر در همه نمونه‌ها معنی دار (p< ۰/۰۵) بود و علامت ستاره نشاندهنده وجود اختلاف آماری معنی دار (p<۰/۰۵) برای هر زمان تخمیر بین سویه‌های باکتریایی می باشد.

Fig. 2. The change of pH in milk fermented by *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus fermentum* and co-culture of two strains during 72 hours of fermentation at 37 ºC. Data are mean of three replications. The mean values of pH for each strain during the time of fermentation was significant (p>0.05) for all samples. Star sign indicates the significant difference (p<0.05) between different strains and for each time of fermentation.



شکل (۳) تغییرات مقدار گروه‌های آمین آزاد بر حسب µM Leu/mg protein در شیر تخمیر شده توسط دو سویه باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و ترکیب دو سویه در طی ۷۲ h تخمیر در دمای ۳۷ °C. نتایج میانگین سه تکرار هستند. حروف انگلیسی کوچک متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار ($p< ۰/۰۵$) برای هر سویه باکتریایی در طی زمان تخمیر می باشد. حروف انگلیسی بزرگ متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار ($p< ۰/۰۵$) برای دو سویه باکتریایی در هر زمان تخمیر می باشد

Fig. 3. The changes in free amino groups content (µM Leu/mg protein) in milk fermented by *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus fermentum*, co-culture of two strains during 72 hours of fermentation at 37°C. Data are the mean of three replications. Different small english letters show the significant differences (P<0.05) between the results of each strain during the fermentation time. Different capital english letters show the significant differences (P<0.05) between the results of different strains for each time of fermentation.

سویه بود. میزان پروتئولیز برای باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* شدیدتر از *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ارزیابی شد. این مشاهده تایید کننده فعالیت پروتئولیتیک قوی‌تر این باکتری به‌دلیل نیاز بیشتر به اسیدهای آمینه ضروری است[۲۵] و با نتایج بررسی رشد دوسویه باکتری نیز مطابقت دارد. میزان پروتئولیز در نمونه حاوی کشت توام دو سویه در زمان ۲۴ h، کمتر از نمونه تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بود. رقابت اولیه دو سویه در شروع تخمیر، پروتئولیز کمتر را در نمونه حاوی کشت توام توجیه می کند. اما با گذشت زمان، پروتئولیز کمتر در کشت توام جبران شده به‌طوری‌که تفاوت آماری معنی‌داری بین دو نمونه مشاهده نشد($p>۰/۰۵$).

منشاء اصلی آمینواسیدها و پپتیدهای تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، از کازئین می‌باشد. هیدرولیز کازئین توسط LAB با فعالیت پروتئازهای سلولی وابسته به غشاء یا Cell envelop proteinaseشروع می‌شود که پروتئین‌ها را به الیگوپپتیدها تبدیل می‌کنند. این آنزیم متعلق به خانواده سابتیلیسین است و یک سرین پروتئیناز می باشد. بر خلاف بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک که فقط یک CEP دارند گزارش شده است که *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* دارای حداقل دو CEP است. شامل: PrtH1 و PrtH2 و این دو از سایر CEPهای تولید شده توسط سایر LAB متفاوت هستند. حضور ژن‌های مختلف کد کننده سیستم پروتئولیتیک باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* تایید کننده موثرتر بودن سیستم پروتئولیتیک آن می‌باشد[۲۵, ۳۱]. باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای اختصاصیت-های هیدرولیتیک متفاوتی روی پروتئین‌ها هستند. شناسایی تنوع ژن‌های لاکتوباسیلوس‌ها نشان دهنده پتانسیل گونه‌های لاکتوباسیلوس برای تولید طیف گسترده‌ای از پپتیدهای مختلف می‌باشد.

۵.۳ . فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS

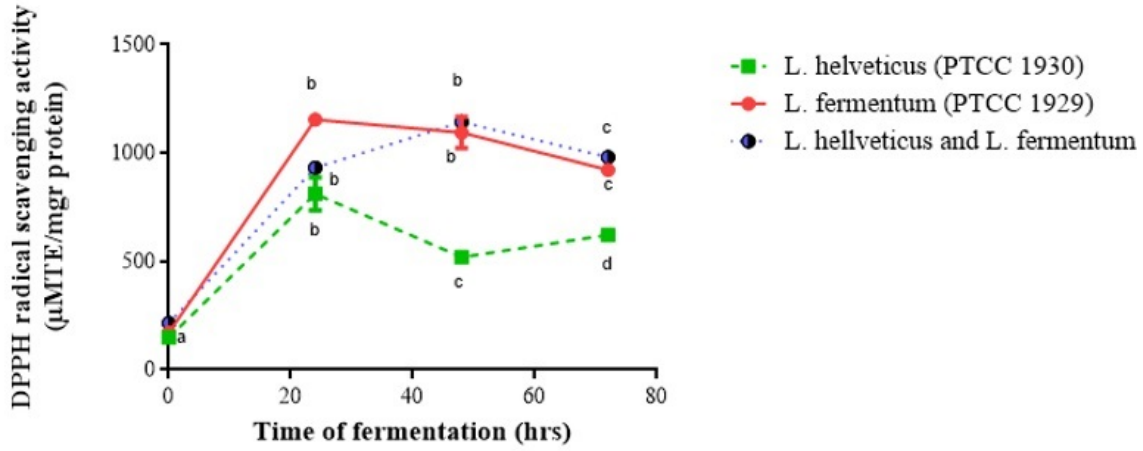
فعالیت آنتی اکسیدانی در سوپرناتانت شیر تخمیری تهیه شده توسط باکتری‌های تک سویه و تر کیب دو سویه بر اساس فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH (شکل۴) و ABTS (شکل۵) اندازه‌گیری و ارائه شده‌اند. به‌طورکلی بر اساس فاکتورهای مختلف، مانند ترکیب ماتریکس ماده غذایی، پروفایل پپتیدی

ماده غذایی و ترکیب آمینواسیدی هر کدام از پپتیدها، ممکن است نتایج متفاوتی برای این دو آزمون به دست آید[۱۴].

نتایج نشان می‌دهند که هر دو سویه باکتریایی مورد بررسی دارای توانایی تولید متابولیت‌ها و پپتیدهای آنتی اکسیدان در شرایط تخمیر فراهم شده بوده‌اند. به‌طوری‌که شیرهای تخمیر شده به مدت ۲۴ h توسط باکتری‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به‌ترتیب دارای فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH به میزان µMTE/mg protein ۲۰/۴۴±۱۱۵۴/۶۶۰ و ۷۶/۰۱±۸۱۱/۷۹۹ و رادیکال ABTS به میزان µMTE/mg protein ۱۳۸/۴۱±۳۲۴۲/۸۹۸ و ۲۱۸/۷۵±۱۸۷۳/۹۵۴ می‌باشند.

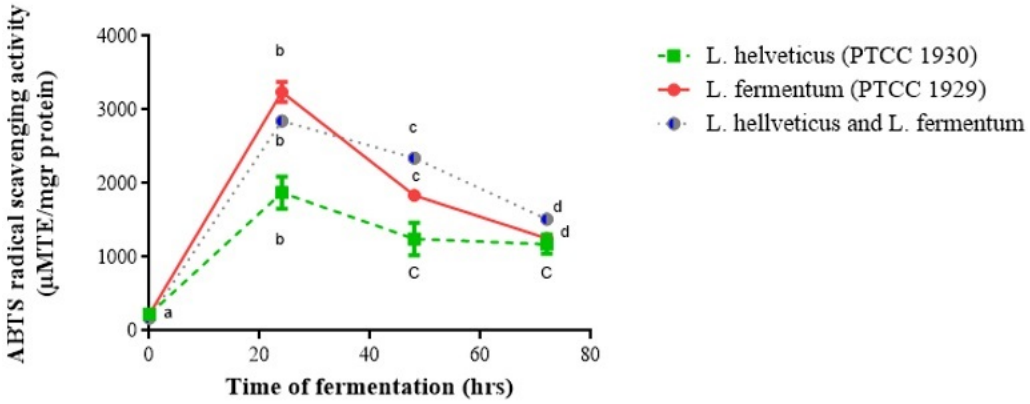
علاوه بر آن نتایج نشان دادند که با افزایش زمان تخمیر تا ۲۴h فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هر دو روش و برای هر دو سویه باکتریایی و ترکیب آن‌ها به‌طور قابل توجهی افزایش و بعد از آن تا ۷۲ h کاهش یافته و یا بدون تغییر باقی مانده‌اند. سلیمانزاده و همکاران نیز افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی شیر گاو تخمیر شده به‌وسیله ۹ سویه باکتری اسید لاکتیک را در طی ۲۴h از زمان تخمیر گزارش کردند [۱۲]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده در طی ۲۴ h تخمیر، همزمان با افزایش میزان گروه‌های آمین آزاد (شکل۳) بیانگر ارتباط بین فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌ها و توانایی آن‌ها برای تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد. اگر چه مجموعه‌ای از متابولیت‌ها و پپتدهای آنتی‌اکسیدان در جریان تخمیر می‌توانند عامل افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی باشند، اما در مطالعات بسیاری این فعالیت به حضور پپتیدهای انتی اکسیدان مرتبط دانسته شده است[۳۲]. گروه دیگری از محققین نیز افزایش در فعالیت آنتی اکسیدانی را در طی تخمیر سرم شیر توسط سویه‌های باکتری اسید لاکتیکی و ارتباط مستقیم بین پیشرفت پروتئولیز به‌وسیله *لاکتوباسیلوس لاکتیس*، *لوکونوستوک کرموریس* و *لاکتوباسیلوس جنسنی* و فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌ها را گزارش کردند[۱].

کاهش یا عدم تغییر مشاهده شده بعد از۲۴ hr برای هر دو سویه باکتریایی و هر دو مکانیسم آنتی‌اکسیدانی با وجود پروتئولیز افزایشی در طی این مرحله، بیانگر این است که احتمالا در اثر فعالیت پروتئولیز بیشتر باکتری‌ها، پپتیدهایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی دچار تغییر ساختار و یا آبکافت بیشتر شده و بنابراین فعالیت آن‌ها کاهش یافته است. علاوه بر آن، نتایج تحقیق ما نشان داد با وجود فعالیت پروتئولیتیکی بالاتر باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* نسبت به *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ، اما میزان متابولیت‌ها و پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تولید شده در طی ۲۴h اول از تخمیر در شیر تخمیر شده به‌وسیله باکتری



شکل (۴) تغییرات در فعالیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH) در شیر تخمیر شده توسط دو سویه باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و ترکیب دو سویه در طی ۷۲ h تخمیر در دمای ۳۷ °C. نتایج میانگین سه تکرار هستند. حروف انگلیسی کوچک متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار ($p<0.05$) برای هر سویه باکتریایی در طی زمان تخمیر می باشد. حروف انگلیسی بزرگ متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار ($p<0.05$) برای دو سویه باکتریایی در هر زمان تخمیر می باشد

Fig.4. The change in DPPH radical scavenging activity of milk fermented *by Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus fermentum* and co-culture of strains during 72 hr of fermentation at 37°C. Data are the mean of three replications. Different small english letters show the significant differences ($p<0.05$) between the results of each strain during the fermentation time. Different capital english letters show the significant differences ($p<0.05$) between the results of different strains for each time of fermentation.



شکل (۵) تغییرات در فعالیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال ABTS) در شیر تخمیر شده توسط دو سویه باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و ترکیب دو سویه در طی ۷۲ h تخمیر در دمای ۳۷ °C نتایج میانگین سه تکرار هستند. حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار ($p< ۰/۰۵$) برای هر سویه باکتریایی در طی زمان تخمیر می باشد.

Fig.5 The change in ABTS radical scavenging activity of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus fermentum* and co-culture of strains during 72 hr of fermentation at 37°C. Data are the mean of three replications. Different small english letters show the significant differences ($p<0.05$) between the results of each strain during the fermentation time. Different capital english letters show the significant differences ($p<0.05$) between the results of different strains for each time of fermentation.

لاکتوباسیلوس فرمنتوم بالاتر از مقدار آن در شیر تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بوده است. آسپری و همکاران، نیز در مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی شیر الاغ تخمیر شده به‌وسیله دو سویه باکتریایی *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس JM1001* و *انتروکوکوس فاشیوم DM33* ، فعالیت پروتئولیتکی بالاتر اما تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان کمتری را برای *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس JM1001* گزارش کردند و نتیجه‌گیری کردند که فعالیت اختصاصی آنزیم‌های تولید شده توسط باکتری‌ها نقش مهم‌تری نسبت به میزان فعالیت پروتئولیتیکی آن‌ها در تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان دارد[۶]. اما گروه دیگری از محققین گزارش کردند نمونه‌های شیر بوفالو تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به مدت ۸ h در دمای ۳۷°C، فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS بیشتری نسبت به نمونه‌های تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در شرایط مشابه دارد[۳۳]. وانگ و همکاران نیز به اهمیت بیشتر نوع سویه‌های باکتریایی نسبت به زمان تخمیر در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان اشاره کردند و عنوان کردند ترکیبات مهارکننده رادیکال می‌توانند جزء متابولیت‌های میکروبی ویا محصول تجزیه پروتئین‌های شیر باشند [۳۴]. ویرتانن و همکاران نیز با بررسی فعالیت پروتئولیتیکی و آنتی اکسیدانی سرم شیر تخمیر شده به‌وسیله ۶ سویه باکتری اسید لاکتیکی، ارتباط مستقیمی بین پروتئولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شیر تخمیری و اختصاصی بودن آن را برای هر سویه باکتریایی مورد بررسی گزارش کردند. اما نتایج آن‌ها نشان داد که لزوما با افزایش شدت پروتئولیز فعالیت آنتی-اکسیدانی افزایش نمی‌یابد [۱]. آن‌ها همچنین گزارش کردند افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شیر تخمیری تهیه شده به‌وسیله *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* دارای بیشترین ارتباط با رشد باکتری و فعالیت پروتئولیز آن در مقایسه با سایر سویه‌های باکتریایی مورد بررسی می‌باشد. همچنین ترکیب سویه‌های باکتریایی باعث افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS در محصول تخمیری شد.

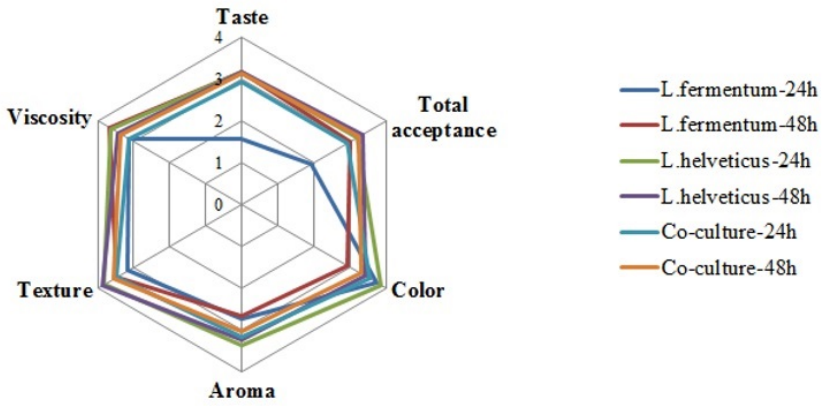
کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده بعد از ۲۴ h از شروع تخمیر می‌تواند ناشی از تجزیه توالی‌های آنتی اکسیدان در طی تخمیر باشد. در مطالعات قبلی اثر آمینوپپتیدازهای PepN و PepX موجود در CNRZ32 *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بر تولید پپتیدهای با خاصیت ضد فشار خون در طی تخمیر شیر بررسی و گزارش شده است که شیر تخمیر شده با سویه جهش یافته باکتری فاقد پپتیداز، حاوی پپتیدهای ضد فشار خون بالاتری در مقایسه با سویه‌های حاوی پپتیداز می باشد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها با نوع اسیدهای‌آمینه و توالی آن‌ها در ساختار پپتید مرتبط است. به‌طوری‌که تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که محتوای بالای آمینواسیدهای هیدروفوب مسئول اصلی پتانسیل مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد اجزاء پپتیدی هستند. فعالیت اختصاصی آنزیم‌های پروتئولیتیک تولیدشده

توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک نقش مهمی در آزادسازی توالی‌های پپتیدی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. در مورد محصولات هیدرولیز پروتئینی و پپتیدها، افزایش در میزان هیدروفوبیسیتی، باعث افزایش غلظت آن‌ها در سطح بین آب-چربی می‌شود و بنابراین مهار رادیکال‌های مشتق شده از چربی‌ها را افزایش می‌دهد. علاوه بر وزن مولکولی هیدروفوبیسیتی پپتیدها، حضور و تعدادی از آمینواسیدهای آروماتیک مانند: تیروزین، هیستدین، فنیل آلانین و تریپتوفان و آمینواسیدهای دارای زنجیره آلیفاتیک همچون آلانین، والین و لوسین و آمینواسیدهای متیونین و گلایسین نیز در توالی پپتیدی در فعالیت‌آنتی اکسیدانی آن‌ها موثر است[۳۵].

ویرتانن و همکاران گزارش کردند استفاده ترکیبی از *لوکونوستوک کرموریس*، *لاکتوباسیلوس لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس* درسرم شیر گاو باعث تشدید فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود [۱] و همچنین محققین دیگر نیز افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی شیر سویای تخمیر شده به‌وسیله باکتری-های اسید لاکتیک شامل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *بیفیدوباکتری‌ها* را نسبت به نمونه‌های تخمیر شده با سویه‌های تک گزارش نمودند[۳۴]. نتایج ارائه شده در شکل‌های ۵-۳ نشان دادند استفاده همزمان از دو سویه باکتریایی مورد آزمون، باعث تشدید فعالیت پروتئولیزنشد و فعالیت پروتئولیتیکی مشاهده شده برای ترکیب دو باکتری در نهایت به سویه *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* رسید. علاوه بر آن، استفاده ترکیبی از دو باکتری باعث تقویت اثر آنتی-اکسیدانی نیز نشد.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی شیرهای تخمیری تهیه شده با هر دو سویه باکتریایی نشان داد پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تولید شده فعالیت مهارکنندگی بیشتری بر رادیکال‌های ABTS در مقایسه با رادیکال DPPH دارند. در مطالعات دیگری نیز تفاوت مشاهده شده با ویژگی محلول بودن رادیکال DPPH درحلال‌های آلی و رادیکال ABTS در آب توضیح داده شده است به نحوی که در تست DPPH تنها فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای هیدروفوب و در تست ABTS، فعالیت هر دو نوع پپتیدهای هیدروفیل و هیدروفوب اندازه‌گیری می‌شوند[۶]. نتایج تحقیق حاضر بر اساس خواص هیدروفوب و هیدروفیل رادیکال‌های ABTS و DPPH نشان داد پپتیدهای تولید شده در جریان تخمیر شیر احتمالا دارای هر دو خاصیت هیدروفیل و هیدروفوب بوده و در نتیجه قدرت مهارکنندگی آن‌ها بر رادیکال ABTS بالاتر از رادیکال DPPH بوده است. نامداری و نجاتی نیز بر اساس خواص رادیکال‌های فوق برای شیر تخمیر شده به‌وسیله *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* نتیجه‌گیری کردند که بیشتر پپتیدهای تولید شده دارای خاصیت هیدروفوبیک هستند[۱۴].



شکل (۶) نتایج ارزیابی حسی نمونه‌های شیر تخمیر شده توسط دو سویه باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و ترکیب دو سویه در طی ۴۸ h تخمیر در دمای ۳۷ °C.

Fig. 6. The results of organoleptic analysis of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus fermentum* and co-culture of two strains during 48 hours of fermentation at 37°C.

۶.۳. نتایج آنالیز خواص حسی

نتایج بررسی ویژگی‌های حسی نشان دادند که نمونه‌های تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و ترکیب دو سویه به‌ترتیب دارای امتیاز طعم ۳/۱۸، ۳/۱۸-۱/۵۶ ، ۳/۱۲۵-۲/۹۳ بودند و شیر تخمیر شده به مدت ۲۴ h با سویه باکتریایی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، دارای مطلوبیت طعم کمتری نسبت به سایر نمونه‌های تخمیری بود. از نظر مطلوبیت کلی نمونه‌های تخمیری به‌ترتیب دارای امتیاز ۳/۳۷-۳/۱۸، ۳-۳/۱،۲۵/۹۳-۲/۹۳ بودند و نمونه تخمیر شده به مدت ۲۴h با سویه باکتریایی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مطلوبیت کلی کمتری را نسبت به سایر نمونه‌های تخمیرشده نشان داد. از نظر سایر ویژگی‌های مورد بررسی تفاوت معنی داری ($p>0/05$) بین نمونه‌ها مشاهده نشد.

Zhou و همکاران گزارش کردند استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به‌عنوان مکمل استارتر ماست، باعث کاهش امتیاز حسی مربوط به طعم و بافت نمونه‌ها اما بهبود فعالیت زیستی در مقایسه با نمونه کنترل فاقد این باکتری می‌شود[۳۶]. نتایج تحقیق حاضر نیز بهبود فعالیت زیستی نمونه تخمیری با این سویه باکتری را تایید نمود. فورچون و همکاران گزارش نمودند خواص حسی شیر تخمیری سنتی آفریقا به نام نونو، تهیه شده با سویه‌های باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و ترکیب دو سویه *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، نسبت به نمونه‌های تخمیر شده با تک سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بهتر است[۲۹] که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت.

۴. نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد دو سویه باکتری لاکتیکی جداسازی شده از محصولات لبنی بومی ایران، دارای پتانسیل تولید نوشیدنی تخمیری با خواص آنتی‌اکسیدانی مورد قبول و کاربرد به‌عنوان استارتر در تولید محصولات لبنی تخمیری با خواص سلامت بخش هستند. سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* با خواص آنتی اکسیدانی بالاتر و سویه *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* با خواص پروتئولیتیک مناسبتر و خواص حسی مورد قبول در مجموع استارتر کالچر تولید کننده نوشیدنی تخمیری با مقبولیت کلی مناسب و اثرات زیستی سلامت بخش و فراسودمند هستند. لازم به ذکر است کاربرد دو سویه باکتریایی به‌عنوان استارتر نیاز به بررسی‌های دقیق تر و آزمایشات تکمیلی خواهد داشت.

منابع

[1] Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S. Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *J.Appl.Microbiol*., *102*(1), 106-115.

[2] Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L. Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Res. Int*., *63*, 71-80.

[3] Benkerroum, N. (2010). Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *Int. J. Dairy Technol*., *63*(3), 320-338.

[4] Agyei, D. Danquah, M.K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol.Adv*., *29*(3), 272-277

[5] Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M.R., Aminlari, M. Hosseini, E. (2015). Purification and identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptide from Saccharomyces cerevisiae protein hydrolysate. *J. Funct. Foods*, *19*, 259-268.

[6] Aspri, M., Leni, G., Galaverna, G. , Papademas, P. (2018). Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem*., *268*, 476-484.

[7] Jafari, M., Jahed Khaniki ,G., Roshanzamir, M., Sadighara, P. (2017). Antioxidant activity of raw milk and dairy products commonly consumed in Fars province, Iran. *J. Food. Safe Hyg.,*3(1-2),21-6.

[8] Huma, N., Rafiq, S., Sameen, A., Pasha, I. Khan, M.I. (2018). Antioxidant potential of buffalo and cow milk Cheddar cheeses to tackle human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Asian. Austral. J. Anim*., *31*(2), 287.

[9] Aloğlu, H.Ş., Öner, Z. (2011). Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *J. Dairy Sci*., *94*(11), 5305-5314.

[10] Conway, V., Gauthier, S.F., Pouliot, Y. (2012). Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. *J. Agric. Food Chem*., *61*(2), 364-372.

[11] De Lima, M.D.S.F., da Silva, R.A., da Silva, M.F., da Silva, P.A.B., Costa, R.M.P.B., Teixeira, J.A.C., Porto, A.L.F., Cavalcanti, M.T.H. (2018). Brazilian Kefir-fermented sheep's milk, a source of antimicrobial

Technological characterization of lactic acid bacteria protease isolated from traditional chinese fermented milk. *J. Food Qual*., *37*(6),395-402. [25]Griffiths, M.W. , Tellez, A.M. (2013). Lactobacillus helveticus: the proteolytic system. *Front. Microbiol*., *4*, 30.

[26] Taverniti, V., Guglielmetti, S. (2012). Health-promoting properties of Lactobacillus helveticus. *Front. Microbiol*., *3*, 392.

[27]Moser, A., Berthoud, H., Eugster, E., Meile, L. , Irmler, S . (2017). Detection and enumeration of Lactobacillus helveticus in dairy products. *Int. Dairy. J*., *68*, 52-59.

[28] Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Akabanda, F. ,Jespersen, L.(2015). Technological properties and probiotic potential of Lactobacillus fermentum strains isolated from west african fermented millet dough. *BMC Microbiol*., *15*(1), 261.

[29] Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J.,Tano-Debrah, K., Parkouda, C. and Jespersen, L. (2014). The use of lactic acid bacteria starter culture in the production of Nunu, a spontaneously fermented milk product in Ghana. *Int. J. Food Sci.*, Article ID 721067.

[30] Dickson, E.M., Riggio, M.P. , Macpherson, L. (2005). A novel species-specific PCR assay for identifying Lactobacillus fermentum. *J. Med. Microbiol*., *54*(3), 299-303.

[31] Savijoki, K., Ingmer, H. ,Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., *71*(4), 394-406.

[32] Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., Mirzaei, M., Kianirad ,M. (2019).Novel β-casein derived antioxidant and ACE-inhibitory active peptide from camel milk fermented by Leuconostoc lactis PTCC1899: Identification and molecular docking**.** *Int. Dairy J.* https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.012.

[33]Tak, L., Bais, B., Singh, R. and Singh, S. (2018). Study of the anti-oxidant potential of buffalo milk using Lactobacillus helveticus and Lactobacillus fermentum. *IJFFT.*, *8*(1), 69-74.

[34] Wang, Y.C., Yu, R.C. ,Chou, C.C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol*., *23*(2), 128-135.

[35] Kim, S.K. ed. (2013). *Marine proteins and peptides: biological activities and applications*. John Wiley & Sons., 393-397.

[36]Zhou, T., Huo, R., Kwok, L.Y., Li, C., Ma, Y., Mi, Z., Chen, Y. (2019). Effects of applying Lactobacillus helveticus H9 as adjunct starter culture in yogurt fermentation and storage. *J. Dairy Sci. 02*(1), 223-235.

and antioxidant Peptides. *Probiotics. Antimicrob Proteins*., *10*(3), 446-455.

[12] Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., Kianirad, M. (2016). Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal). *Dairy. Sci. Technol*., *96*(4),443-457.

[13] Rahmawati, I., Suntornsuk, W. (2016). Effects of fermentation and storage on bioactive activities in milks and yoghurts. *Procedia Chem*.,18, 53-62

[14] Namdari,A., *Nejati*,F. (2016). Development of antioxidant activity during milk fermentation by wild isolates of Lactobacillus helveticus. *Appl. Food Biotechnol*.,3(3),178-86.

[15]Ayyash, M., Al-Dhaheri A.S., Mahadin, S. Al., Kizhakkayil, J., Abushelaibi, A. (2018). In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *J. Dairy. Sci.*,101(2),900-11.

[16] Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2. *Williams & Wilkins*.

[17]Pailin, T., Kang, D.H., Schmidt, K. , Fung, D.Y.C. (2001). Detection of extracellular bound proteinase in Eps producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Lett. Appl. Microbiol*., *33*(1), 45-49.

[18] Oh, S., Kim, S.H., Worobo, R.W. (2000). Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, Lactobacillus acidophilus 30SC. *J. Dairy Sci*., *83*(12), 2747-2752.

[19] AOAC. (2002).Official Methods of Analysis. USA: Arlington,VA.

[20] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. , Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*., *193*, 265-275.

[21] Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. and Catignani, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci*., *66*(6), 1219-1227.

[22] Son, S. ,Lewis, B.A.(2002). Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure− activity relationship. *J.Agric.Food Chem*., *50*(3), 468-472.

[23] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radi.Biol.Med*., *26*(9-10), 1231-1237.

[24] Zhang, S., Zhang, L., Jiao, Y., Luo, X., Li, H., Xin, L., Xue, C., Zhang, Y., Yi, H., Han, X. Ma, C. (2014).

Research Article

Production of Functional Fermented Milk by Isolated *Lactobacill* from Traditional Iranian Dairy Products

Fatemeh Bagheri[1], Saeed Mirdamadi[2*], Mahta Mirzaei[3], Maliheh Safavi[4]

1. Ph.D student, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

2. Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

Abstract

Lactic acid bacteria have a long history in the production of fermented dairy products. They are of great importance in the production of bioactive peptides and increasing the health effects due to their proteolytic ability. In the present study, the ability of two strains of Lactic acid bacteria were investigated after isolation from Iranian dairy products and were compared in terms of fermentation ability, proteolytic properties, and production of fermented milk with antioxidant and acceptable sensory properties.

Two isolated strains, including *Lactobacillus fermentum* (PTCC 1929) and *Lactobacillus helveticus* (PTCC1930) were identified based on the ability of sugar fermentation and 16S rRNA sequence analysis. The results showed that in spite of the better growth of *Lactobacillus fermentum* bacteria in the first 24 hours, the initial acidification was higher in *L. helveticus*. The pH value in the *Lactobacillus helveticus* sample was less than 4 in the early 24 hours, while this value was achieved after 72 hours in *L. fermentum*. In the co-culture, the pH reduction steps reached at a minimum level of 3.63 with the initial and secondary acidifications of *Lactobacillus helveticus* and *L. fermentum*, respectively. The results showed that, despite the higher proteolysis ability of *Lactobacillus helveticus*, the antioxidant activity of the sample containing *Lactobacillus fermentum* was 1.5 to 1.7 times higher. The highest antioxidant activity was observed in all samples at the first 24 hours. Increase in proteolysis did not cause an increase in the production of antioxidant peptides. Milk fermented by *Lactobacillus fermentum for* 24 hours was significantly lower in taste and acceptability score compared to the other samples (P<0.05). In general, the results showed that two strains co-culture has a better ability to produce antioxidant bioactive peptides with a suitable overall acceptance and has the potential for the production of fermented dairy products with healthy properties.

Keywords: Milk, Lactic Acid Bacteria, Fermentation, Antioxidant Activity, Functional drink.

[*] Corresponding author: mirdamadi@irost.ir