

فعالیت پروتئولیتیکی *Lactobacillus rhamnosus* GG و *Lactobacillus paracasei* در دسر

نوشیدنی لبنی و تاثیر آن‌ها بر خاصیت آنتی اکسیدانی محصول: مقایسه نوع تخمیری و غیر تخمیری

سیما طاهری^۱، مرتضی خمیری^{۲*}، علی مویدی^۳، مهران اعلمی^۲

۱- کارشناس ارشد، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- دانشیار، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- استادیار، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۰

کلمات کلیدی:

دسر نوشیدنی،

خاصیت آنتی اکسیدانی،

فعالیت پروتئولیتیکی،

Lactobacillus rhamnosus GG*Lactobacillus paracasei*

DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6

* مسئول مکاتبات:

khomeiri@gau.ac.ir

پپتیدهای زیست فعال در طول عمل تخمیر توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک ایجاد می‌شوند که متناسب با توالی اسید آمینه ایجاد شده بعضاً دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت پروتئولیتیک *Lactobacillus paracasei* و *Lactobacillus rhamnosus* GG در مخلوط دسر نوشیدنی حاوی آب پنیر و بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی این نوشیدنی سین‌بیوتیک در دو نوع تخمیری و غیر تخمیری کم لاکتوز کاکائویی است. فعالیت پروتئولیتیک میکروارگانسیم‌ها با اندازه‌گیری گروه‌های آمینواسیدی آزاد با استفاده از معرف OPA به روش جذب سنجی و خاصیت آنتی اکسیدانی دسر نوشیدنی با استفاده از ترکیب DPPH و ارزیابی مهار رادیکال‌های آزاد به روش جذب سنجی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نمونه تخمیر شده، فعالیت پروتئولیتیک *L. paracasei* در طول زمان تخمیر قابل توجه نبود، اما بعد از ۱۷ ساعت گرمخانه گذاری، بیشترین فعالیت پروتئولیتیک را به خود اختصاص داد. در طول مدت ذخیره سازی، بیشترین فعالیت پروتئولیتیک *L. paracasei* در روزهای هفتم و چهارم ($P < 0.05$) و برای *L. rhamnosus* GG یک روز پس از ذخیره سازی بود. در نمونه غیر تخمیری، بیشترین فعالیت *L. paracasei* مربوط به روز اول ذخیره سازی (۰/۵) بود اما فعالیت پروتئولیتیک *L. rhamnosus* GG بسیار کمتر (۰/۱۲) بود و بهروز دوم مربوط بود. فعالیت آنتی اکسیدانی دسر تخمیر شده معنی‌دار نبود که نشان می‌دهد این دو باکتری پروبیوتیک فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی نداشتند. در مقایسه با نمونه تخمیر شده، دسر نوشیدنی تخمیری به دلیل داشتن پودر کاکائو حاوی مولکول آنتی اکسیدان، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری را نشان داد.

۱- مقدمه

پروتئین های شیر دارای اثرات بیولوژیک، فیزیولوژیک، عملکردی و تغذیه‌ای بسیاری هستند. در سال های اخیر اثبات شده است که پروتئین های موجود در محصولات لبنی منبع غنی از پپتیدهای زیست فعال هستند. این پپتیدها به طور بالقوه سطح سلامتی انسان را ارتقاء می‌بخشند و در داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد. چندین نوع پپتید زیست فعال با ویژگی های کاهش دهنده فشار خون، ضد لخته شدن خون، آنتی اکسیدان، تنظیم کننده سیستم ایمنی، ضد میکروبی، ضد سرطان و افزایش دهنده رشد در شیر گاو یافت شده است [۱]. عملکرد پپتیدها بستگی به توالی اسید آمینه های آنها دارد اما تا زمانی که در ساختار پروتئین هستند غیر فعال اند و به ۳ طریق می‌توان آنها را از زنجیره پروتئینی آزاد نمود ۱- هیدرولیز با آنزیم گوارشی (*in vivo*)، ۲- هیدرولیز با میکروارگانیزم های پروتئولیتیک در طی فرآیندهای غذایی (*in vitro*) و ۳- هیدرولیز با آنزیم های پروتئولیتیک مستخرج از میکروارگانیزم ها (*in vivo*) [۲].

در سال های اخیر، باکتری های اسید لاکتیک در صنایع لبنی بسیار مورد استفاده قرار گرفته اند. پپتیدهای زیست فعال در طول عمل تخمیر توسط آنزیم های پروتئولیتیک تولید شده توسط LAB های مختلف (*L. lactis*, *L. helveticus*) زیرگونه *bulgaricus* *cremoris* FT4 و *L. delbruekii* زیرگونه SS1 ایجاد می‌شوند [۳، ۴]. فعالیت پروتئولیتیک باکتری های اسید لاکتیک به لحاظ آزاد سازی پپتیدهای زیست فعال و تجزیه پروتئین های آب پنیر به خصوص بتا-لاکتوگلوبولین که برخی افراد نسبت به آن حساسیت دارند حائز اهمیت است [۵]. از طرف دیگر فعالیت پروتئولیتیک باکتری ها و تجزیه پروتئین ها موجب تولید پپتیدهایی می‌شود که مسئول عطر و طعم ویژه در محصولات لبنی هستند [۶] همچنین در رسیدن پنیر، رشد سریع در شیر در طی عمل تخمیر و نیز بهبود زندهمانی در طول نگهداری مهم است [۷].

فعالیت پروتئولیتیک باکتری های پروبیوتیک را می‌توان از طریق میزان آمینواسید و پپتیدهای آزاد شده در محصول در اثر فعالیت آنزیم پروتئاز این باکتری ها مورد ارزیابی قرار داد و بدین طریق حضور پپتیدهای زیست فعال با توجه به فعالیت پروتئولیتیک LAB¹ در فرآورده های لبنی مانند ماست،

شیر تخمیر شده، دسر لبنی، نوشیدنی بر پایه آب پنیر و پنیر پخته شده توسط برخی محققین مورد بررسی قرار گرفته است [۵، ۶، ۸].

شواهد علمی نشان می‌دهد بعضی از پپتیدهای آزاد شده با توالی خاصی از آمینواسیدها در فرآورده های تخمیری در نتیجه فعالیت پروتئولیتیک باکتری های اسید لاکتیک و پروبیوتیک خاصیت آنتی اکسیدانی دارند. بر این اساس مطالعات انجام شده توسط هاشمی (2014) نشان داد که *L. rhamnosus* LS5 جدا شده از پنیرهای کردی دارای (۴۹/۶ درصد) فعالیت تخریب رادیکال بود [۹].

در نهایت، استفاده از میکروارگانیزم ها با فعالیت پروتئولیتیک بالا در صنایع لبنی می‌تواند منجر به تولید غذاهای حاوی پپتیدهای بیولوژیک با ارزش غذایی افزوده شود [۱۰]. در بین تحقیقات صورت گرفته اطلاعاتی مبنی بر ارزیابی خاصیت پروتئولیتیک باکتری های پروبیوتیک در طول مدت نگهداری در یخچال همچنین مخلوط های لبنی شبیه به دسرهای نوشیدنی وجود ندارد لذا هدف از این تحقیق ارزیابی فعالیت پروتئولیتیک دو گونه *L. rhamnosus* GG و *L. paracasei* در مخلوط غذایی جدید دسر نوشیدنی حاوی آب پنیر لاکتیک و خاصیت آنتی اکسیدانی آن می‌باشد همچنین به مقایسه این دو ویژگی در نوشیدنی تخمیری و غیر تخمیری پرداخته می‌شود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه دسر نوشیدنی سین بیوتیک غیر

تخمیری کم لاکتوز

در ابتدا آب پنیر بر اساس فرمولاسیون از پیش تعیین شده با نشاسته (Ingredion، آمریکا)، صمغ (Pouratex، بلژیک)، شکر و کاکائو توسط همزن مغناطیسی مخلوط شد و در دمای ۱۱۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه استریل شد. سپس شیر استریل به مخلوط نوشیدنی اضافه شد و توسط همزنایزر با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه همزن گردید (پروب همزنایزر با الکل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه استریل شد). مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده به منظور دستیابی به نوشیدنی کم لاکتوز آنزیم بتاگالاکتوزیداز (*Ha lactase*-Chr-Hansen، دانمارک) به میزان (۲۰۰۰ NLU/L) به

نمونه‌های نوشیدنی تلقیح شده و جذب نمونه نوشیدنی تلقیح شده گزارش گردید.

۲-۴- تهیه محلول OPA

آماده‌سازی محلول OPA مطابق روش Church و همکاران (۱۹۹۳) انجام گرفت [۱۱]. درون یک بالن حجمی، ۲۵ میلی‌لیتر محلول سدیم تترابورات (بوراکس) ۱۰۰ میلی‌مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم دو دیسل سولفات ۲۰ درصد (w/w) ریخته شد. ۴۰ میلی‌گرم ماد خالص OPA توزین و در یک میلی‌لیتر متانول خالص حل شد و به بالن حجمی مذکور افزوده شد. سپس ۵۰ میلی‌گرم DTT^3 به مخلوط اضافه شد و با افزودن آب مقطر حجم محلول به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول در شرایط تاریک نگهداری شد و حداکثر تا ۱ ساعت پس از آماده‌سازی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۵- ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی دسر نوشیدنی

خاصیت آنتی‌اکسیدانی دسر نوشیدنی سین‌بیوتیک تخمیری و غیر تخمیری با استفاده از روش اصلاح شده بر اساس ترکیبی از دو روش Rodrigo و همکاران (۲۰۰۹) و Jemil و همکاران (۲۰۱۴) مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۳، ۱۲]. ۵۰ میکرولیتر نمونه رقیق نشده به طور مستقیم با ۲ میلی‌لیتر محلول DPPH⁴ (۲۴ mg/L methanol) مخلوط شد و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ (۱۰/۵۰۰۰ rpm) دقیقه) شد و سوپرناتانت به یک لوله تمیز منتقل گردید. جذب توسط اسپکتروفتومتر در دمای ۵۱۷ nm قرائت شد. در نمونه شاهد از نوشیدنی تلقیح نشده استفاده شد و متانول نیز به عنوان blank در نظر گرفته شد. درصد بازدارندگی فعالیت رادیکال DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید که در آن As جذب نمونه و Ac جذب شاهد است.

$$\text{بازدارندگی} = \frac{\text{Ac} - \text{As}}{\text{Ac}} \times 100 = \text{درصد بازدارندگی}$$

۲-۶- آنالیز آماری

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ به روش فاکتوریل در قالب طرح کامل

مخلوط نوشیدنی اضافه شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۵ C به مدت ۳ ساعت قرار داده شد. جهت غیرفعال کردن آنزیم، نوشیدنی در دمای ۸۵ C به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه شد. مطابق با دستورالعمل شرکت تولیدکننده استارتر کشت ذخیره پروبیوتیک تهیه گردید و در نهایت ۱ درصد از کشت ذخیره پروبیوتیک از *L.paracasei* (Chr-Hansen)، دانمارک) و *L.rhamnosus*GG (Chr-Hansen)، دانمارک) به صورت جداگانه به مخلوط نوشیدنی با دمای ۵ C ۴ تلقیح شد تا جمعیت اولیه به 10^8 CFU/ml برسد و سپس در دمای یخچال نگهداری شد.

۲-۲- تهیه دسر نوشیدنی سین‌بیوتیک تخمیری

در ابتدا همانند روش تهیه دسر نوشیدنی غیر تخمیری ابتدا مخلوط اولیه دسر نوشیدنی بدون افزودن آنزیم بتاگالاکتوزیداز تهیه شد و در نهایت ۰/۱ درصد از کشت ذخیره پروبیوتیک از *L.paracasei* و *L.rhamnosus*GG به صورت جداگانه به مخلوط نوشیدنی تلقیح شد تا جمعیت اولیه به 10^7 CFU/ml برسد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ C قرار داده شد تا pH به ۵/۲ برسد.

۲-۳- تعیین فعالیت پروتئولیتیکی

فعالیت پروتئولیتیک میکروارگانیسم‌های استفاده شده در تولید نمونه‌ها طبق روش Donkor و همکاران (۲۰۰۷) با اندازه‌گیری گروه‌های آمینواسیدی آزاد شده از طریق واکنش با معرف OPA^۲ ارزیابی شد [۷]. در مرحله اول ۲/۵ میلی‌لیتر از نمونه‌های نوشیدنی درون لوله آزمایش ریخته شد و ۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (TCA) ۵ درصد (w/v) اضافه شد. سپس ورتکس (لابترون، ایران) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ کردن (۱۰/۴۰۰۰ rpm) دقیقه) سوپرناتانت با کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف گردید. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از مایع صاف شده با ۳ میلی‌لیتر معرف OPA مخلوط شد و پس از گذشت ۲ دقیقه در دمای اتاق (۲۰ C) میزان جذب نمونه در طول موج ۳۴۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Jenway، چین) اندازه‌گیری شد. دسر نوشیدنی تلقیح نشده به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد. درجه نسبی پروتئولیز به صورت تفاوت بین میزان جذب

³Dithiothreitol
42,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

²ortho-phthalaldehyde

تصادفی مورد تحلیل آماری قرار گرفت. میانگین داده‌ها با روش Duncan مقایسه شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های

پروبیوتیک در دسر نوشیدنی تخمیری

جدول ۱ فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های پروبیوتیک را در نمونه تخمیری در طول ۲۴ ساعت زمان تخمیر و ۲۱ روز نگهداری در یخچال نشان می‌دهد. درجه نسبی پروتئولیز در تمامی نمونه‌ها در مقایسه با زمان صفر به عنوان کنترل تفاوت قابل توجهی نداشت. در طول زمان تخمیر *L. paracasei* فعالیت پروتئولیتیک نداشت اما *L. rhamnosus* GG در روز هفتم بیشترین فعالیت پروتئولیتیک را داشت ($P < 0.05$). در بررسی‌های انجام شده توسط سایر محققین روند پروتئولیز در طول زمان تخمیر افزایشی و بسیار بیشتر از نتایج به دست آمده در مورد *L. paracasei* و *L. rhamnosus* GG بود. به طور مثال Donkor و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های آغازگر ماست و باکتری‌های پروبیوتیک را مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند در تمامی موارد فعالیت پروتئولیتیک در ۲۴ ساعت زمان تخمیر روند افزایشی داشت و پس از ۲۴ ساعت از بین باکتری‌های پروبیوتیک بیشترین کمترین میزان پروتئولیز به ترتیب مربوط به *L. casei* (۱/۸۲) و *B. longum* (۰/۳) بود و در مورد آغازگرهای ماست هر دو باکتری *L. bulgaricus* و *Streptococcus thermophilus* به یک میزان فعالیت پروتئولیتیک (۰/۷) داشتند [۷]. این امر نشان دهنده فعالیت پروتئولیتیک اندک

باکتری‌های تلقیح شده (*L. rhamnosus* GG و *L. paracasei*) در دسر نوشیدنی می‌باشد. در طول نگهداری بیشترین میزان فعالیت *L. paracasei* مربوط به روز هفتم (۰/۲۳) و در مورد *L. rhamnosus* GG مربوط به روز اول (۰/۱) بود اما باز هم نسبت به نتایج سایر محققین در مورد سایر باکتری‌های پروبیوتیک فعالیت پروتئولیز بسیار اندک بود. نتایج Ramchandran و Shah (۲۰۰۹) نشان داد در روز اول نگهداری ماست در یخچال *L. thermophilus* ۰/۵ شاخص OPA فعالیت پروتئولیتیک داشت و نیز بیان کردند با افزایش دوره نگهداری میزان فعالیت پروتئولیتیک افزایش یافته به طوری که در روز ۲۸ نگهداری این مقدار به ۰/۹ رسید [۱۴]. شاکریان و همکاران (۱۳۹۲) میزان فعالیت پروتئولیتیک *L. acidophilus* و *B. animalis* را در ماست پروبیوتیک بدون اینولین ۰/۶۸ و در حضور ۱ درصد اینولین ۰/۶ گزارش کردند [۱۵]. آن‌ها همچنین بیان کردند مقادیر مختلف چربی و غلظت کشت آغازگر نیز بر میزان فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک تاثیر می‌گذارد به عبارت دیگر فعالیت پروتئولیتیک نه تنها به نوع نژاد باکتری بستگی دارد بلکه به ترکیبات موجود در محصول پروبیوتیک نیز وابسته است و رفتار باکتری‌های پروبیوتیک در محیط‌ها و شرایط مختلف متفاوت است. این امکان وجود دارد که با وجود پپتیدها و آمینواسیدهای حاصل از آب پنیر موجود در دسر نوشیدنی این باکتری‌ها تمایلی به صرف انرژی در جهت پروتئولیز و آزاد سازی پپتید و آمینواسید نداشته باشند و از پپتیدهای موجود در نمونه استفاده کرده باشند زیرا همانطور که جدول ۱ نشان می‌دهد پس از افزایش میزان آمینواسیدها در اثر پروتئولیز نسبی، این میزان در برخی نقاط به صفر رسیده است.

Table 1 Proteolytic activity of *L. rhamnosus* GG and *L. paracasei* in fermented sample during fermentation and storage time (OD)

Time (hour/day)	<i>L. paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i> GG
0	0 ^{aB}	0 ^{aA}
17h	0.03±0.01 ^{bB}	0.11±0.04 ^{aA}
24h	0 ^{aB}	0.07±0.08 ^{aA}
1d	0.07±0.02 ^{aB}	0.1±0.1 ^{aA}
7d	0.23±0.12 ^{aA}	0.04±0.03 ^{bA}
14d	0.21±0 ^{aA}	0 ^{bA}
21d	0 ^{aB}	0 ^{aA}

The results are expressed as mean values ± SD (n = 3).

The uppercase letters represent a significant difference (P < 0.05) in each column

The lowercase letters represent a significant difference (P < 0.05) in each row

۳-۲-فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های

پروبیوتیک در دسر نوشیدنی غیر تخمیری

جدول ۲ فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های پروبیوتیک را در دسر نوشیدنی غیر تخمیری در دمای یخچال نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین فعالیت *L. paracasei*(5/0) و مربوط به روز اول نگهداری در یخچال

است. اما فعالیت *L.rhamnosus*GG بسیار کمتر (۰/۱۲) و مربوط به روز دوم نگهداری می‌شود. در تطابق با نتایج حاصله Moura و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش کردند که در طول دوره نگهداری دسر لبنی در دمای یخچال فعالیت پروتئولیتیکی *L. acidophilus* افزایش می‌یابد اما میزان فعالیت پروتئولیتیکی آن بسیار بیشتر از دو باکتری مورد آزمون این تحقیق و از ۰/۶ تا ۰/۸ بود [۱۶].

Table 2 Proteolytic activity of *L.rhamnosus* GG and *L. paracasei* in non-fermented sample during storage time

Time (day)	<i>L. paracasei</i> (OD)	<i>L.rhamnosus</i> GG(OD)
0	0 ^{ab}	0 ^{ab}
1	0.52±0.01 ^{aA}	0 ^{ab}
2	0 ^{ab}	0.12±0.12 ^{aA}
4	0 ^{ab}	0.01±0.01 ^{ab}
7	0 ^{ab}	0 ^{ab}

The results are expressed as mean values ± SD (n = 3)

The uppercase letters represent a significant difference (P < 0.05) in each column

The lowercase letters represent a significant difference (P < 0.05) in each row

۳-۳-خاصیت آنتی اکسیدانی دسر نوشیدنی

تخمیری

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود در زمان تلقیح و پیش از گرمخانه‌گذاری هر دو نمونه ۵ درصد خاصیت آنتی اکسیدانی داشتند. این به این دلیل است که محصول دسر نوشیدنی حاوی آب پنیر است. آمینواسیدهایی مانند سیتئین و تیروزین به همراه آلفا-لاکتالبومین و بتا-گلوبولین موجود در آب پنیر باعث ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی در آن می‌شوند [۱۷]. از طرف دیگر فرآیند پاستوریزاسیون در حین فرآوری آب پنیر نیز احتمالاً خاصیت آنتی اکسیدانی را افزایش می‌دهد. Taylor و Richardson (۱۹۸۰) گزارش کردند که تیمار حرارتی (۱۳۰-۷۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه) باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آب پنیر می‌شود [۱۸]. خاصیت آنتی اکسیدانی دسر نوشیدنی حاوی *L. paracasei* در طول دوره تخمیر و یک روز پس از نگهداری در یخچال به طور معنی داری تغییر کرده است (P < ۰/۰۵) و از مقدار اولیه ۵/۲۷ درصد در زمان تلقیح به ۲۸/۳۵ درصد افزایش یافت و پس از آن تا پایان ۲۱ روز روند نزولی داشت. در نمونه حاوی *L.rhamnosus*GG پس از ۱۷ ساعت گرمخانه‌گذاری

خاصیت آنتی اکسیدانی کاهش یافته است و تا پایان ۲۱ روز به میزان تقریباً ۲ درصد نوسان داشت. *L.rhamnosus* GG قادر به استفاده از لاکتوز و پروتئین کازئین شیر نمی‌باشد از این رو وجود پپتیدها و آمینواسیدهای آزاد برای رشد و بقای چنین باکتری ضروری است [۱۹]. کاهش خاصیت آنتی اکسیدانی ۱۷ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری نیز احتمالاً به دلیل استفاده این باکتری از آمینواسیدهای آب پنیر موجود در نوشیدنی است. در تطابق با نتایج مربوط به نمونه حاوی *L. paracasei* نتایج Virtanen و همکاران (۲۰۰۶) نیز نشان می‌دهد در طول عمل تخمیر خاصیت آنتی اکسیدانی افزایش یافته است [۲۰]. سایر محققین نتایج متفاوتی گزارش کردند. ابوبکر و همکاران (۲۰۱۲) باکتریهای اسیدلاکتیک را از منابع مختلف جداسازی کردند و پس از شناسایی ایزوله‌های پروتئولیتیک نتایج آنها نشان داد سوپرناتانت شیر پس چرخ تخمیر شده توسط نژادهای مختلف ۱۴/۷ درصد تا ۵۰/۸ درصد فعالیت آنتی اکسیدانی داشتند [۲۱]. Osuntoki و Korie (۲۰۱۰) خاصیت آنتی اکسیدانی شیرهای تخمیری حاوی *L.brevis*، *L.casei*، *L.delbruekii*، *L.plantarum*، لاکتوباسیلوس فرمتوم و مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش کردند فعالیت آنتی

آمینواسیدهای آبگریز والین یا لوسین و در توالی خود دارای پرولین، هیستیدین یا تریپتوفان هستند [۲۴]. بر این اساس خاصیت آنتی اکسیدانی شدیداً به نوع نژاد باکتری بستگی دارد [۷]. گزارش شده است که هرچه باکتری خاصیت پروتئولیتیک و رشد بیشتری داشته باشد خاصیت آنتی اکسیدانی محصول تولیدی توسط آن نیز خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری دارد [۲۱]. بنابراین با توجه به اینکه *L.rhamnosus*GG و *L. paracasei* باکتری‌های پروتئولیتیک خوبی نیستند، فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی نیز نداشتند.

اکسیدانی بین ۲/۸ درصد تا ۳۱/۵ درصد متغیر بود و بیشترین و کمترین فعالیت به ترتیب مربوط به *L.brevis* و *L.delbruekii* بود [۲۲]. آزمون‌های پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک و اختصاصی بودن آن‌ها برای پروتئین‌های شیر نقش مهمی را در تولید پپتیدهای زیست فعال ایفا می‌کند [۲۳]. این مکانیسم در بین میکروارگانیسم‌های تخمیر کننده شیر متفاوت است که پروتئین‌های شیر را در سطوح مختلفی هیدرولیز می‌کنند و پپتیدهای زیست فعال متفاوتی آزاد می‌شود پپتیدهای آنتی اکسیدان در N-ترمینال خود دارای انشعاب

Table 3 Antioxidant capacity of fermented sample during fermentation and storage time

Time (hour/day)	<i>L. paracasei</i> (%)	<i>L.rhamnosus</i> GG(%)
0	5.27±0.8 ^{ad}	5.66±2.14 ^{aAB}
17h	9.92±2.41 ^{aC}	2.23±0.62 ^{bD}
24h	19.32±2.5 ^{aB}	11.35±0.44 ^{ba}
1d	28.35±0.80 ^{aA}	7.69±1.25 ^{cBC}
7d	9.83±0.89 ^{aC}	9.21±1.69 ^{aAB}
14d	4.56±2.41 ^{bD}	5.81±1.52 ^{bC}
21d	8.58±0.53 ^{aC}	8.85±1.69 ^{aAB}

The results are expressed as mean values ± SD (n = 3).

The uppercase letters represent a significant difference (P < 0.05) in each column

The lowercase letters represent a significant difference (P < 0.05) in each row

غیرتخمیری عامل فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار بالای آن است. پودر کاکائو بطور متوسط ۷۵ درصد خاصیت آنتی اکسیدانی دارد. اپی کاتچین^۵ و کاتچین^۶، بیشترین پلی فنل مونومری آنتی اکسیدان موجود در کاکائو هستند [۲۵]. جامعه شیمی آمریکا (۱۹۹۹) خاصیت آنتی اکسیدانی محصولات شکلاتی و کاکائویی را مورد ارزیابی قرار دادند و بیان کردند که خاصیت آنتی اکسیدانی شکلات تلخ بیشتر از شیر کاکائو و آن هم بیشتر از پودر شکلات داغ است [۲۶]. قابل توجه است که خاستگاه لوبیا کاکائو و روش استخراج کاکائو (آبی یا الکلی) در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آن تاثیر دارد به طوری که Othman و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند کاکائو غنا نسبت به مالزی، ساحل عاج و سولوسی و عصاره الکلی بیشتر از عصاره آبی خاصیت آنتی اکسیدانی دارد [۲۷].

۳-۴- خاصیت آنتی اکسیدانی دسر نوشیدنی

غیر تخمیری

خاصیت آنتی اکسیدانی دسر نوشیدنی غیر تخمیری در طول ۷ روز نگهداری در یخچال مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد بیشترین میزان آنتی اکسیدانی در هر دو نمونه مربوط به زمان صفر و ۶/۲۸ درصد در مورد *L. paracasei* و ۷۱/۳۶ درصد در مورد *L.rhamnosus*GG بود اما تفاوت معنی داری بین نمونه‌های حاوی *L.rhamnosus*GG و *L. paracasei* وجود نداشت (جدول ۴). همچنین در طول نگهداری ۷ روزه نیز تفاوت معنی داری در خاصیت آنتی اکسیدانی مشاهده نشد (P > ۰/۰۵) این موضوع به این دلیل است که باکتری‌های مورد استفاده خاصیت پروتئولیتیکی قوی ندارند که پیش از این به آن اشاره شد. اما در تمامی موارد خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های غیرتخمیری بسیار بیشتر از نمونه‌های تخمیری بود. کاکائو موجود در دسر نوشیدنی

5. Epicatechin

6. Catechin

Table 4 Antioxidant capacity of non-fermented sample during storage time

Time (day)	<i>L. paracasei</i> (%)	<i>L.rhamnosus</i> GG(%)
0	67.28±13.34 ^{aA}	71.36±10.78 ^{aA}
1	59.74±14.1 ^{aA}	69.74±15.8 ^{aA}
2	54.91±11.5 ^{aA}	49.74±14.74 ^{aA}
4	60.67±17.89 ^{aA}	66.74±20 ^{aA}
7	55.69±55.61 ^{aA}	51.94±7.68 ^{aA}

The results are expressed as mean values ± SD (n = 3).

The uppercase letters represent a significant difference (P < 0.05) in each column

The lowercase letters represent a significant difference (P < 0.05) in each row

subsp. *cremoris* FT4. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 3898–3904.

[4] Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., and Takano, T. (1995). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78: 777–783.

[5] Pescuma, M., Hébert, E. M., Mozzi, F. and de Valdez, G. F. (2010). Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 73-81.

[6] Gomes, A.A., Braga, S.P., Cruz, A.G., Cadena, R.S., Lollo, P.C.B. Carvalho, C., Amaya-Farfán J., Faria, J. A. F. and Bolini, H. M. A. (2011). Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. *Journal of Dairy Science*, 94: 4777–4786.

[7] Donkor, O., Henriksson, A., Vasiljevic, T. and Shah, N. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait*, 87: 21–38.

[8] Moura, C. S., Lollo, P. C. B., Morato, P. N., Esmerino, E. A., Margalho, L. P., Santos-Junior, V. A., Coimbra, P. T., Cappato, L. P., Silva, M. C., Garcia-Gomes, A. S., Granato, D., Bolini, H. M. A., Sant'Ana, A. S., Cruz, A. G. and Amaya-Farfán, J. (2006). Assessment of antioxidant activity, lipid profile, general biochemical and immune system responses of Wistar rats fed with dairy dessert containing *Lactobacillus acidophilus* La-5. *Food Research International*. Clare, D. and Swaisgood, H. 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science* 83(6): 1187-95.

۴- نتیجه گیری

فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک برای تولید غذاهایی فراسودمند حاوی پپتیدهای زیستی مهم است. در این مطالعه، فعالیت پروتئولیتیک *L.rhamnosus*GG و *L. paracasei* را در یک نوشیدنی جدید سین‌بیوتیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این فرمولاسیون مورد بررسی قرار گرفت. *L. paracasei* و *rhamnosus*GG در هر دو نمونه تخمیری و غیر تخمیری فعالیت پروتئولیتیک اندکی داشتند. به علت وجود آب پنیر در فرمولاسیون، نمونه‌های تخمیری در زمان تلقیح ۵ درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشتند، اما اختلاف معنی داری در میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی بین نمونه‌های حاوی *L. paracasei* و *L. rhamnosus*GG در هر دو شکل تخمیری و غیر تخمیری مشاهده نشد. نتایج نشان داد از آنجا که دسر نوشیدنی غیر تخمیری حاوی پودر کاکائو بود به لحاظ خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه مطلوب‌تری است.

۵- منابع

- [1] Nagpal, R., Behare, P., Rana, R., Kumar, A., Kumar, M., Arora, S., Morotta, F., Jaing, S., and Yadav, H. (2011). Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food & Function*, 1.
- [2] Mohanty, D.P., Mohapatra, S., Misra, S. and Sahu, P.S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Science*, 23 (5): 577-583.
- [3] Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F. and Addeo F. (2002). Production of angiotensin-I converting enzyme-inhibitory peptides in fermented milk started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactobacillus lactis*

- [18] Taylor, M. J. and Richardson, T. (1980). Antioxidant Activity of Skim Milk: Effect of Heat and Resultant Sulfhydryl Groups. *Journal of Dairy Science*, 63(11): 1783–1795.
- [19] Saxena, S. N., Mital, B. K. and Garg, S. K. (1994). Effect of casitone and fructose on the growth of *Lactobacillus acidophilus* and its survival during storage. *International Journal of Food Microbiology*, 21: 271-276.
- [20] Virtanen, T. Pihlanto, A. Akkanen, S. and Korhonen, H. (2006). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of applied Microbiology*, 102: 1106-115.
- [21] Abubakr, M. A. S., Hassan, Z., Muftah, M. Imdakim A. and Sharifah, N. R. S. A. (2012). Antioxidant activity of lactic acid bacteria (LAB) fermented skim milk as determined by 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ferrous chelating activity (FCA). *African Journal of Microbiology Research*, 6(34): 6358-6364.
- [22] Osuntoki, A. and Korie, I. (2010). Antioxidant activity of whey from milk fermented with *Lactobacillus* species isolated from Nigerian fermented foods. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4): 505-511.
- [23] Korhonen, H. J. (2009). Bioactive Components in Bovine Milk. Wiley-Blackwell, Ames, IA.
- [24] Chen, H.M., Muramoto, K., and Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidant peptides from soybean b-conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 574–578.
- [25] Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C. Y., Mchale, N. L., Flanagan, J. A. and Hurst, W. J. (2006). Antioxidant Activity and Polyphenol and Procyanidin Contents of Selected Commercially Available Cocoa-Containing and Chocolate Products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4062-4068.
- [26] American Chemical Society. (1999). Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Cocoa, Dark Chocolate, and Milk Chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- [27] Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A. and Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100:1523–1530.
- [9] Hashemi, S.M.B., Shahidi, F., Mortazavi, S.A., Milani, E. and Eshaghi, Z. (2014a). Potentially probiotic *Lactobacillus* strains from traditional Kurdish cheese. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 6, 22–31.
- [10] Savijoki, K., Ingmer, H. and Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 394–406.
- [11] Church, F. C., Swaisgood, H. F. and Porter, G. L. (1993). Spectrophotometric Assay using o-Phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 66: 1219-1227.
- [12] Rodrigo, P.F., Maria, N.B., Marilda, M.P., Ana, T.S., Catarina, M.D, Luis, V.B. and Maria, R.B. (2009). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Moscatel Dessert Wines from the Setúbal Region in Portugal. *Food Analytical Method*, 2:149-161.
- [13] Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R. B., Mehiri, M. and Nasri, M. (2014). Functional antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from meat fermented by *Bacillus subtilis* is A26. *Process Biochemistry*, 49(6): 963-972.
- [14] Ramchandran, L. and Shah, N.P. (2009). Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic, angiotensin-I-convertin enzyme- and α -glucosidase-inhibitory activities as well as on textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *Dairy Science and Technology*, 89: 583–600.
- [15] Shakerian, M. and Khodaiyan, F. (2013). Effect of Thermal Processing on Metabolite of Probiotic Bacteria in Long-life Stirred Yoghurt, Mansour Shakarian. Doctoral thesis. *Tehran University* [In Persian]
- [16] Moura, C. S. Lollo, P. C. B., Morato, P. N., Margalho, L. P., Santos-Junior, V. A. and Coimbra, L. P. (2016). Assessment of antioxidant activity, lipid profile, general biochemical and immune system responses of Wistar rats fed with dairy dessert containing *Lactobacillus acidophilus* LA5. *Food Research International*.
- [17] Allen, J. C. and Wrieden, W. L. (2017). Influence of milk proteins on lipid oxidation in aqueous emulsion I. Casein, whey protein and α -lactalbumin. *Journal of Dairy Research* 49: 239-248.



Proteolytic activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus paracasei* drinking dessert containing resistant starch and its effect on antioxidant activity of product: Comparing the fermented and non-fermented type

Taheri, S.¹, Khomeiri, M.^{2*}, Moayedi, A.³, Aalami, M.²

1. MSc in Food Science and Technology, Faculty of Food Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Gorgan, Iran.
2. Associate Professor, Faculty of Food Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Gorgan, Iran.
3. Assistant Professor, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Gorgan, Iran.

ABSTRACT

Bioactive peptides, are released by proteolytic enzymes of lactic acid bacteria (LAB) during fermentation process which some have antioxidant activity according to their amino acids sequences. The aim of this study was to investigate the proteolytic activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus paracasei* in drinking dessert mix and to evaluate the antioxidant capacity of this synbiotic drinking dessert in two types of fermented and low-lactose non-fermented. Proteolytic activity of probiotic bacteria were evaluated using the OPA indicator for amino acid residues by optical absorbance. The antioxidant activity also evaluated by optical absorbance method according to DPPH radical scavenging activity. In fermented sample, proteolytic activity of *L. paracasei* during fermentation time was not significant ($P < 0.05$), but *L. rhamnosus* GG had the highest proteolytic activity after 17 h of incubation. During storage time, the highest proteolytic activity for *L. paracasei* was in 7 and 4 days after storage ($P < 0.05$) and for *L. rhamnosus* GG was in the first day of storage. In non-fermented sample the most activity of *L. paracasei* was related to the first day of storage (0.5). But *L. rhamnosus* GG proteolytic activity was much less (0.12) and was related to the second day. Antioxidant activity of fermented dessert was not significant which shows that these two probiotic bacteria has no significant antioxidant activity. Comparing the fermented sample and non-fermented drinking dessert, the non-fermented one exhibited higher antioxidant activity due to containing cocoa powder which has antioxidant component.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2019/ 05/ 15
Accepted 2019/ 10/12

Keywords:

Drinking dessert,
Antioxidant activity,
Proteolytic activity,
Lactobacillus rhamnosus GG,
Lactobacillus paracasei.

DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6

*Corresponding Author E-Mail:
khomeiri@gau.ac.ir