مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

فعالیت پروتئولیتیکی *Lactobacillus rhamnosus* GG و *Lactobacillus paracasei* در دسر نوشیدنی لبنی و تاثیر آن‌ها بر خاصیت آنتی اکسیدانی محصول: مقایسه نوع تخمیری و غیرتخمیری

سیما طاهری[۱]، مرتضی خُمیری[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.

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

چکیده

پپتیدهای زیست فعال در طول عمل تخمیر توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک ایجاد می‌شوندکه متناسب با توالی اسید آمینه ایجاد شده بعضاً دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت پروتئولیتیک *Lactobacillus rhamnosus* GG و *Lactobacillus paracasei* 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 میکروارگانیسم‌ها 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<۰/۰۵) 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 می دهد 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225]

۱- مقدمه

پروتئین های شیر دارای اثرات بیولوژیک، فیزیولوژیک، عملکردی و تغذیه‌ای بسیاری هستند. در سال های اخیر اثبات شده است که پروتئین‌های موجود در محصولات لبنی منبع غنی از پپتیدهای زیست فعال هستند. این پپتیدها به طور بالقوه سطح سلامتی انسان را ارتقاءمی‌بخشند و در داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد. چندین نوع پپتید زیست فعال با ویژگی‌های 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 آمینه‌های آن‌ها دارد اما تا زمانی که در ساختار پروتئین هستند غیر فعال اند و به ۳ طریقمی‌توان آن‌ها را از زنجیره پروتئینی آزاد نمود۱- هیدرولیز با آنزیم گوارشی (*in vivo*)، ۲- هیدرولیز با میکروارگانیسم های پروتئولیتیک در طی فرآیندهای غذایی (*in vitro*) و ۳- هیدرولیز با آنزیم‌های پروتئولیتیک مستخرج از میکروارگانیسم‌ها (*in vivo*)[۲].

در سال‌های اخیر، باکتری های اسید لاکتیک در صنایع لبنیبسیار مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پپتیدهای زیست فعال در طول عمل تخمیر توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک تولید شده توسط LABهای مختلف (*L.helveticus*، *L.lactis* زیرگونه *cremoris* FT4 و *L. delbruekii* زیرگونه *bulgaricus* SS1) ایجاد می‌شوند [۳، ٤]. فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک به لحاظ آزاد سازی پپتیدهای زیست فعال و تجزیه پروتئین‌های آب پنیر به خصوص بتا-لاکتوگلوبولین که برخی افراد نسبت به آن حساسیت دارند حائز اهمیت است [۵]. از طرف دیگر فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌ها و تجزیه پروتئین‌ها موجب تولید پپتیدهایی می‌شود که مسئول عطر و طعم ویژه در محصولات لبنی هستند [٦] همچنین در رسیدن پنیر، رشد سریع در شیر در طی عمل تخمیر و نیز بهبود زنده‌مانی در طول نگهداری مهم است[۷].

فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های پروبیوتیک را می‌توان از طریق میزان آمینواسید و پپتیدهای آزاد شده در محصول در اثر فعالیت آنزیم پروتئاز این باکتری‌ها مورد ارزیابی قرار داد وبدین طریقحضور پپتیدهای زیست فعال با توجه به فعالیت پروتئولیتیک LAB[1] در فرآورده‌های لبنی مانند ماست، شیرتخمیر شده، دسر لبنی، نوشیدنی بر پایه آب پنیر و پنیر پخته شده توسط برخی محققین مورد بررسی قرار گرفته است [۵، ٦،۸].

شواهد علمی نشان می‌دهد بعضی از پپتیدهای آزاد شده با توالی خاصی از آمینواسیدها در فرآورده‌های تخمیری در نتیجه فعالیت پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک و پروبیوتیک خاصیت آنتی اکسیدانی دارند. بر این اساس مطالعات انجام شده توسط هاشمی (2014) نشان داد که *L.* LS5 *plantarum*جدا شده از پنیرهای کردی دارای(٤۹/٦درصد) فعالیت تخریب رادیکال بود [۹].

در نهایت، استفاده از میکروارگانیسم‌ها 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 پروتئولیتیکی باکتری‌های پروبیوتیک در طول مدت نگهداری در یخچال همچنین مخلوط‌های 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 لاکتیکی و خاصیت آنتی اکسیدانی آن می‌باشد همچنین به مقایسه این دو ویژگی در نوشیدنی تخمیری و غیرتخمیری پرداخته می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه دسر نوشیدنی سین‌بیوتیک 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 هموژنایزر با سرعت ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه هموژن گردید (پروب هموژنایزربا 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

1. Lactic Acid Bacteria

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-22]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225]

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 ۴ °C تلقیح شد تا جمعیت اولیه به 10^8CFU/ml برسد و سپس در دمای یخچال نگهداری شد.

۲-۲- تهیه دسر نوشیدنی سین بیوتیک تخمیری

در ابتدا همانند روش تهیه دسر نوشیدنی غیرتخمیری ابتدا مخلوط اولیه دسر نوشیدنی بدون افزودن آنزیم بتاگالاکتوزیداز تهیه شد ودر 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 10^7CFU/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[2] ارزیابی شد[۷]. در مرحله اول ۲/۵ میلی لیتر از نمونه‌های نوشیدنی درون لوله آزمایش ریخته شد و ۵ میلی لیتر 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 سانترفیوژ کردن (۱۰/۴۰۰۰rpm دقیقه) سوپرناتانت با کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف گردید. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از مایع صاف شده با ۳ میلی لیتر 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 نمونه‌های نوشیدنی تلقیح شده و جذب نمونه نوشیدنی تلقیح نشده گزارش گردید.

۲-۴- تهیه محلول OPA

آماده‌سازی محلولOPA مطابق روش Churchو همکاران (۱۹۹۳) انجام گرفت[۱۱]. درون یک بالن حجمی، ۲۵ میلی‌لیتر محلول سدیم تترابورات (بوراکس) ۱۰۰ میلی‌مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم دو دسیل سولفات۲۰درصد (w/w) ریخته شد. ۴۰ میلی‌گرم ماد خالص OPA توزین و در یک میلی لیتر 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 آماده سازی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۵- ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی دسر نوشیدنی

خاصیت آنتی اکسیدانی 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[۱۲، ۱۳].۵۰ میکرولیتر نمونه رقیق نشده به طور مستقیم با ۲ میلی‌لیتر محلولDPPH[4] (۲۴mg/L methanol) مخلوط شد و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ (۱۰/۵۰۰۰rpm دقیقه) شد و سوپرناتانت به یک لوله تمیز منتقل گردید. جذب توسط اسپکتروفتومتر در دمای ۵۱۷nm 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.

درصد بازدارندگی=Ac-As/ Ac ×100

۲-۶- آنالیز آماری

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

[2]ortho-phthalaldehyde

3Dithiothreitol
42,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-22]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225]

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

۳- نتایج و بحث

۳-۱-فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های پروبیوتیک در دسر نوشیدنی تخمیری

جدول۱ فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های پروبیوتیک را در نمونه تخمیری درطول ۲٤ 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<۰/۰۵). 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.rhamnosus*GG و *L. paracasei* 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 ۲٤ ساعت زمان تخمیر روند افزایشی داشت و پس از ۲٤ ساعت از بین باکتری‌های پروبیوتیک بیشترین و 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 termophilus* 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 ۰/۵*L.thermophilus* 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[۱٤]. شاکریان و همکاران (۱۳۹۲) میزان فعالیت پروتئولیتیک *L. acidophilus* و *B. animalis*را در ماست پروبیوتیک بدون اینولین ۰/٦۸ و در حضور ۱ درصد اینولین ۰/٦ 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 همانطورکه جدول ۱ نشان می‌دهد پس از افزایش میزان آمینواسیدها در اثر پروتئولیز نسبی، این میزان در برخی نقاط به صفر رسیده است.

Table1 Proteolytic activity of *L.rhamnosus* GG and *L. paracasei* in fermented sample during fermentation and storage time (OD)

Time (hour/day)	*L. paracasei*	*L.rhamnosus* 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-22]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225]

۳-۲-فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های پروبیوتیک در دسر نوشیدنی غیرتخمیری

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 Mouraو 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)	*L. paracasei* (OD)	*L.rhamnosus* 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 نیزاحتمالا خاصیت آنتی اکسیدانی را افزایش می‌دهد. Taylor و Richardson(۱۹۸۰) گزارش کردند که تیمار حرارتی (۱۳۰-۷۰ ^{o}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 Virtanenو 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.casei*، *L.brevis*، *L. plantarum*، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و *L.delbruekii* مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش کردند فعالیت آنتی

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]. آنزیم‌های پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک و اختصاصی بودن آن‌ها برای پروتئین‌های شیر نقش مهمی را در تولید پتیدهای 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 اکسیدان‌در N-ترمینال خود دارای انشعاب آمینواسیدهای آبگریز والین یا لوسین و در توالی خود دارای پرولین، هیستیدین یا تریپتوفان هستند[۲٤]. 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.

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

Time (hour/day)	*L. paracasei* (%)	*L.rhamnosus* 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

۳-٤-خاصیت آنتی اکسیدانی دسر نوشیدنی غیرتخمیری

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 دونمونه مربوط به زمان صفر و ٦۸/۲۸ درصد در مورد *L. paracasei* و ۷۱/۳٦ درصد در مورد *L.rhamnosus*GGبود اما تفاوت معنی داری بین نمونه‌های حاوی*L.rhamnosus*GG و *L. paracasei*وجود نداشت) جدول .(4 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 غیرتخمیری عامل فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار بالای آن است. پودر کاکائو بطور متوسط ۷۵ درصد خاصیت آنتی اکسیدانی دارد. اپی‌کاتچین[5] و کاتچین[٦]، بیشترین پلی‌فنل 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[۲٦]. 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 Othmanو همکاران (۲۰۰۷) گزاش کردند کاکائو غنا نسبت به مالزی، ساحل عاج و سولاوسی و عصاره الکلی بیشتر از عصاره آبی خاصیت آنتی اکسیدانی دارد[۲۷].

5. Epicatechin
6. Catechin

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-22]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225]

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

Time (day)	*L. paracasei* (%)	*L.rhamnosus*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

٤- 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 آنتی اکسیدانی این فرمولاسیون مورد بررسی قرار گرفت. *L. rhamnosus*GG و *L. paracasei* 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 درصدخاصیت آنتی اکسیدانی داشتند، اما اختلاف معنی داری در میزان خاصیت آنتی اکسیدانی بین نمونه‌های حاوی *L. rhamnosus*GG و *L. paracasei* در هر دو شکل تخمیری و غیرتخمیری مشاهده نشد. نتایج نشان داد از آنجا که دسر نوشیدنی غیرتخمیری حاوی پودر کاکائو بود به لحاظ خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه مطلوب‌تری است.

٥- 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. andSahu, 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-Iconverting enzyme-inhibitory peptides in fermented milk started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactobacilluslactis* 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 Iconverting 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 fermentedwhey-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*in probiotic cheese on the physicochemical featuresand 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-Farfan, 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-22]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225]

[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. *ApplIied 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, Luís, V.B. andMaria, R.B. (2009). Phenolic Content and Antioxidant Activity of MoscatelDessert Wines from the Setúbal Region in Portugal. *Food Analitical 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 Metabolit 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 responces of Wistar rats fed with dairy dessert containing Lactobacillus acidophilus LA5. *Food Reaserch 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 a-lactalbumin. *Journal of Dairy Research* 49: 239-248.

[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 Agricaltural 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 Agricaltural 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-22]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Proteolytic activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus paracasei*in drinking dessert containing resistant starch and its effect on antioxidant activity of product: Comparingthe 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 proteoletic 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-22]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.1.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.128.225]