توسعه فعالیت آنتی اکسیدانی در آب پنیر و پرمیات شیر توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB12

صابر امیری[۱]، رضا رضائی مکرم[۲*]، محمود صوتی خیابانی[۳]، محمود رضازاد باری[۴]، محمد علیزاده خالد آباد[۵]

۱- دکترای تخصصی میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
٤- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۵- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸ /۰۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰٦/۱۰)

چکیده

رادیکال‌های آزاد، از طریق آسیب رساندن به سلول‌ها عامل اصلی بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان هستند. کاربرد سویه‌های پروبیوتیک در مواد غذایی لبنی تخمیری به دلیل اثرات ارتقاء سلامت مصرف کننده، گسترش یافته است. با توجه به پتانسیل‌های آنتی اکسیدانی باکتری‌های پروبیوتیک، اهداف این مطالعه مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی گونه‌های مرسوم پروبیوتیک (*L. acidophilus* LA5 و *B. animalis* subsp. lactis BB12) مورد استفاده در مواد غذایی و بررسی اثرات دمای گرمخانه گذاری، pH اولیه، زمان تخمیر، غلظت عصاره مخمر و غلظت لینولئیک اسید، بر فعالیت آنتی اکسیدانی آنها در محیط کشت آب پنیر و پرمیات شیر غنی شده بود. نتایج نشان داد که زمان تخمیر، دمای گرمخانه گذاری و غلظت عصاره مخمر مهمترین فاکتورهایی هستند که اثر معنی دار بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل دارند ($p<۰/۰۵$). فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و هیدروکسیل با افزایش دمای گرمخانه گذاری و غلظت عصاره مخمر به ترتیب با تأمین دمای بهینه و منبع نیتروژن مورد نیاز برای رشد باکتری‌ها، افزایش یافت. فعالیت آنتی اکسیدانی در ٢٤ ساعت اول فرآیند افزایش یافت که متناسب با رشد باکتری‌ها بود. در نتیجه فعالیت کشت‌های پروبیوتیک و تأثیر آنها بر روی سوبسترا، با تخریب ساختارهای پلیمری در ٢٤ ساعت اول زمان تخمیر، فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل و رادیکال آزاد DPPH به ترتیب افزایش و کاهش داشت. این مطالعه نشان داد، زیست فرآیند تخمیر توسط *L. acidophilus* LA5 و *B. animalis* subsp. lactis BB12 در محیط کشت آب پنیر، فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی دارد.

کلید واژگان: پروبیوتیک‌ها، فعالیت مهار DPPH، فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل و زیست فرآیند تخمیر

*مسئول مکاتبات: rmokarram@tabrizu.ac.ir

۱- مقدمه

تشکیل رادیکال‌های آزاد، مانند رادیکال آنیون سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل، یک فرآیند غیر قابل اجتناب در موجودات هوازی در طول تنفس است. این رادیکال ها بسیار ناپایدار هستند و به سرعت با سایر گروه‌ها و یا مواد در بدن واکنش می‌دهند و منجر به آسیب سلول یا بافت و بیماری‌های مختلف می‌شود. بدن خود دارای سیستم دفاعی در برابر رادیکال‌های آزاد است که از آنزیم‌های آنتی اکسیدان و همچنین ترکیبات آنتی اکسیدان غیر آنزیمی با وزن مولکول کم تشکیل شده است. ولی متاسفانه این مکانیسم‌های دفاعی برای جلوگیری کامل از آسیب به اندازه کافی موثر نیستند. از این رو، رژیم غذایی حاوی مولکول‌هایی با خواص آنتی اکسیدانی می‌تواند خطر بیماری‌های انسان را کاهش دهد. بنابراین مواد غذایی حاوی آنتی اکسیدان‌ها ممکن است برای کمک به بدن انسان برای کاهش آسیب اکسیداتیو و پیشگیری از بیماری‌ها ناشی از آن ها مفید باشد [۱، ۲ و ۳]. آنتی اکسیدان‌های طبیعی نسبت به انواع سنتتیک مطلوب‌تر هستند [٤ و ٥]. بنابراین توسعه روش‌هایی مانند فرآیند تخمیر مواد غذایی توسط میکروارگانیسم‌ها در فرآوری مواد غذایی که با تولید متابولیت‌ها باعث افزایش محتوای آنتی اکسیدانی مواد غذایی می‌شوند، یکی از راه‌های مفید می‌باشد [۲ و ٦].

توسعه سویه‌های پروبیوتیک در مواد غذایی با هدف ارتقاء سلامت مصرف کننده، موضوع مورد توجه در زمینه بیوتکنولوژی مواد غذایی است. بطور کلی اساس تعاریف مختلف پروبیوتیک‌ها بر خواص سلامت بخشی این میکروب‌ها تاکید دارد [۷]. امروزه کاهش سطح کلسترول، اثر ضد فشار خون و فعالیت‌های ضد سرطانی، اثرات دیگر نوید بخش پروبیوتیک‌ها هستند که ناشی از متابولیت‌های مختلف تولیدی توسط این میکروارگانیسم‌های مفید می‌باشد [۷ و ۸]. علاوه بر این، در مورد پتانسیل‌های آنتی اکسیدانی باکتری‌های پروبیوتیک، از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک بویژه لاکتوباسیل‌ها و همچنین بیفیدوباکتریوم‌ها گزارش‌های متعددی وجود دارد [۷، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲]. Lin و Chang در سال ۲۰۰۰، اثر آنتی اکسیدانی باکتری پروبیوتیک را پس از ۱۸ ساعت کشت در محیط کشت MRS[1] آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که این دو باکتری توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[2] را دارند [۱۲]. همچنین اثر کشت خالص کفیر بر فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنلی کفیر حاوی بادام زمینی گزارش شده است [٤، ۱۳ و ١٤]. Virtanen و همکاران در سال ۲۰۰٦، برای بررسی تولید فعالت آنتی اکسیدانی در طول تخمیر از استارترهای لبنی استفاده کردند. شیر با ۲۵ سویه باکتری اسید لاکتیک تخمیر گردید و گونه های *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Cremoris*، *L. jensenii* (ATCC 25258) و *L. acidophilus* (ATCC 4356) بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند [۳]. Osuntoki و Korie در سال ۲۰۱۰، هشت جدایه لاکتوباسیلوس حاصل از پنج غذای تخمیر شده بومی را مورد بررسی قرار دادند. تمامی نمونه ها نشان دهنده فعالیت های مهار رادیکال بود. پنج جدایه *L. brevis*، *L. plantarum*، *L. casei* و *L. fermentum* *delbrueckii* بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را داشتند [٦]. گونه های غیر استارتری *L. helveticus* برای توانایی تولید شیر تخمیر شده غنی از پپتیدهای آنتی اکسیدانی ارزیابی شدند. نتایج نشان داد *L.helveticus* به عنوان یک کشت عملگرا قادر به ارتقاء سلامتی در غذاهای فراسودمند برپایه لبنیات است [۱۵].

آب پنیر مایع زرد رنگ متمایل به سبزی است که پس از تشکیل و جدا شدن دلمه در فرآیند تولید پنیر باقی می‌ماند و پرمیات مایع باقیمانده حاصل از اولترافیلتراسیون شیر یا آب پنیر است. اکسیژن خواهی بیولوژیک (BOD[3]) و اکسیژن خواهی شیمیایی (COD[4]) آب پنیر و پرمیات بالا است از این رو یک آلایندهٔ

1. de Man, Rogosa and Sharpe
2. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
3. Biological Oxygen Demand (BOD)
4. Chemical Oxygen Demand (COD)

محیطی بالقوه محسوب شده و دفع آن از مشکلات صنعت لبنی شناخته می‌شود، زیرا قبل از دفع نیاز به پیش تیمار گسترده دارد که در نتیجه منجر به افزایش هزینه‌های عملیاتی در کارخانه لبنی می‌گردد [۱۶]. به طور کلی آب پنیر و پرمیات کاربردهای محدودی دارند و غالباً در تولید کنسانتره‌های پروتئینی، لاکتوز، پودر آب پنیر و پرمیات و نیز تغذیه دام مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۷، ۱۸ و ۱۹]. در دهه اخیر استفاده از آن‌ها به عنوان ماده اولیه در تولید نوشیدنی‌های تخمیری و غیر تخمیری طعم‌دار یکی از جذاب ترین راه‌های استفاده از آب پنیر و پرمیات برای مصرف انسان است [۱۷ و ۲۰]. Maleki و همکاران در سال ۲۰۱۵، فعالیت مهار رادیکال DPPH، توانایی احیاء[5] و توانایی شلاته کردن آهن[6] بر عملکرد فرآیند تخمیر را بررسی کردند [۲۱]. همچنین Khamirian و همکاران در سال ۲۰۱۷، ابتدا فرمولاسیون نوشیدنی میوه‌ای بر پایه پرمیات را بهینه نموده و پس از پاستوریزاسیون نوشیدنی بهینه آن را با استفاده از باکتری پروبیوتیک *L. acidophilus* تلقیح کرده و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، حسی و میکروبی را در طول ٤ هفته نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی گراد بررسی کردند [۱۸].

گزارش‌های بسیار کمی به بررسی پتانسیل‌های آنتی اکسیدانی ناشی از فرآیند تخمیر پروبیوتیک‌ها پرداخته است. شایان ذکر می‌باشد که هیچ مطالعه‌ای در رابطه با فعالیت‌های آنتی اکسیدانی در اثر فرآیند تخمیری ناشی *B. animalis* subsp. lactis BB12 و همچنین استفاده از پرمیات برای این منظور صورت نگرفته است. مطالعه حاضر با هدف مقایسه عملکرد آنتی اکسیداتیو دو سویه پروبیوتیک *L. acidophilus* LA5 و *B. animalis* subsp. lactis BB12 در آب پنیر و پرمیات شیر به عنوان محیط‌های کشت مدل شبیه سازی شده شیر و بررسی اثر شرایط محیطی و مواد مغذی بر میزان فعالیت آنتی اکسیداتیو این دو باکتری پروبیوتیک تجاری انجام شد.

5. Reducing Power
6. ferrous-ion chelating ability

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد مورد استفاده

گونه‌های باکتریایی مورد استفاده در پژوهش حاضر *Lactobacillus acidophilus* LA5 و *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB12 محصول شرکت کریستن هانسن (Christian Hansen, DK-2970 Hørsholm, Denmark) از شرکت پیشگامان پخش صدیق، نمایندگی شرکت Chr. Hansen در ایران، تهیه گردید. آب پنیر و پرمیات شیر، به ترتیب از کارخانه لبنیاتی تولید کننده پنیر پیتزا و پنیر سفید ایرانی فراپالایش شده، واقع در ارومیه تهیه شد و بلافاصله پس از تولید در دمای ٤ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل شد تا جهت تلقیح کشت آماده سازی شود (جدول شماره ۱، ویژگی‌های آب پنیر و پرمیات شیر مورد استفاده را نشان می‌دهد). محیط‌های کشت میکروبی پودری به شرح ذیل که از نمایندگی شرکت‌های تولید کننده در ایران خریداری خواهد شد. RCA[7]، MRS براث و آگار و پپتون واتر (شرکت Merck، آلمان). گاز پک A (شرکت Merck، آلمان) و آب دیونیزه (شرکت زلال، کرج، ایران) مورد استفاده قرار گرفت. سایر مواد شیمیایی آزمایشگاهی مورد استفاده از Merck، آلمان بودند.

Table 1 Characteristics of cheese whey and milk permeate

Cultivation medium	pH	Total sugars (mg/ml)	Total Protein (%)
Cheese whey	6.54±0.02	4.64±0.12	0.3
Milk permeate	6.23±0.02	6.69±0.03	0.2

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- آماده سازی محیط کشت نمونه‌ها

هر دو محیط کشت آب پنیر و پرمیات به شرح زیر جهت کشت

7. Reinforced Clostridial Agar

آماده سازی شدند؛ پس از تنظیم pH ٤/٥ با اسید هیدروکلراید ٥ نرمال، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد تا پروتئین‌ها دناتوره شوند. سپس رسوب حاصله با استفاده از سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه) جدا گردید. سوپرناتانت در pH مورد مطالعه تنظیم و در ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل و به عنوان محیط کشت استفاده شد [۲۲ و ۲۳].

۲-۲-۲- آماده سازی مایه تلقیح

برای این منظور از روش de Lara Pedroso و همکاران (۲۰۱۲) و Florence و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییر استفاده شد. به این ترتیب که پس از تهیه محیط کشت MRS براث، به آن ۱ درصد توئین ۸۰[8] (مطابق دستورالعمل شرکت سازنده جهت رشد بهتر باکتری‌های پروبیوتیک) اضافه گردید، جهت کشت *L. acidophilus* LA5 ولی برای کشت *B. animalis* subsp. lactis BB12 به محیط کشت حاضر شده ۰/۰۵ درصد سیستئین و ۰/۱ درصد لیتیوم کلرید اضافه شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل گردید. سپس ۱ گرم از سلول‌های باکتریایی آماده استفاده تولید شده به روش خشک کردن انجمادی در ۱۰۰ میلی لیتر محلول فوق حل گردید و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، *L. acidophilus* LA5 در شرایط هوازی و *B. animalis* subsp. lactis BB12 در شرایط بی هوازی، گرمخانه گذاری شد. سلول ها با سانتریفوژ شدن در ۲۳٦۰×g به مدت ۸ دقیقه برداشت شده و دو بار در محلول NaCl (۰/۸۵ درصد وزنی/حجمی) شسته شدند. توده باکتریای در محلول نرمال سالین مجددا حل گردید تا حاوی حدود 10^{9}-10^{10} CFU.ml^{-1} باکتری زنده و فعال گردد [٢٤ و ٢٥].

۲-۲-۳- تلقیح و کشت ناپیوسته پروبیوتیک ها

مطابق طرح آماری پس از آماده سازی محیط کشت هر نمونه آزمایشی، در حدود 10^{9}-10^{10} CFU.ml^{-1} باکتری زنده و فعال به عنوان مایه تلقیح باکتری‌های مورد مطالعه به محیط کشت اضافه گردید. کشت ناپیوسته در ارلن مایر ۵۰ میلی لیتر حاوی ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت در دمای فرآیند بر حسب درجه سانتی گراد و مدت زمان تخمیر مورد مطالعه بر حسب ساعت مطابق طرح آماری انجام شد [۲۳].

۲-۲-٤- شمارش سلولی

شمارش سلول های باکتری‌های پروبیوتیک در این مجموعه سوسپانسیون‌های سلولی توسط کشت پورپلیت رقت مناسب در محیط‌های کشت RCA و MRS آگار، به ترتیب برای *B. animalis* subsp. lactis BB12 و *L. acidophilus* LA5، انجام و پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت، به ترتیب در شرایط هوازی و بی هوازی، گرمخانه گذاری شده و شمارش شدند [٢٦].

۲-۲-۵- اندازه گیری اسیدیته قابل تیتراسیون

برای این منظور تیتراسیون با استفاده از محلول ۰/۱ مولار NaOH انجام شد و به صورت درصد از اسید لاکتیک بیان گردید [۲۷].

۲-۲-٦- اندازه گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

رادیکال آزاد DPPH به دلیل سهولت در انجام آزمون به صورت گسترده برای بررسی توانایی ترکیبات در مهار رادیکال آزاد یا دهنده هیدروژن استفاده می شود. در این روش، ترکیبات آنتی اکسیدان می توانند رادیکال های پایدار DPPH را احیا کرده و موجب تغییر رنگ به زرد شوند [٤، ۱۵، ۲۱ و ۳۰]. برای این منظور نمونه ها با اسپکتروفتومتر اندازه گیری می‌شود. ابتدا ۰/۸ میلی‌لیتر از عصاره بدون باکتری با ۱ میلی‌لیتر محلول رادیکالی DPPH (۰/۲ میلی مولار در متانول) تازه تهیه شده، مخلوط گردید. سپس در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و جذب در برابر متانول خالص (برای کالیبره کرده دستگاه) در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده خواهد

8. Tween 80

شد. درصد فعالیت مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید (A_{sample} جذب محلول حاوی نمونه با غلظت خاص است و $A_{Reference}$ جذب محلول DPPH بدون نمونه است) [۲۸]:

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_{Reference} - A_{Sample}}{A_{Reference}} \times 100$$

۲-۲-۷- اندازه گیری فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

به طور خلاصه، ۱ میلی لیتر محلول نمونه با ۲ میلی لیتر $FeSO_4$ (۱/۸ میلی مولار)، ۱/۵ میلی لیتر سالیسیلیک اسید (۱/۸ میلی مولار) و ۱/۵ میلی لیتر H_2O_2 (۰/۳ درصد حجمی/حجمی) مخلوط شد. پس از آن محلول به شدت مخلوط شده و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. در نهایت، پس از سانتریفیوژ (۴۰۰۰ × g به مدت ۵ دقیقه)، جذب سوپرناتانت در ۵۱۰ نانومتر اندازه گیری شد. سپس فعالیت رادیکالهای هیدروکسیل با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{Hydroxyl radicals scavenging activity (\%)} = \frac{(A_s - A_c)}{(A_b - A_c)} \times 100$$

از آنجا که جذب محلول حاوی یک نمونه از یک غلظت خاص است، جذب محلول در جایگزینی اسید سالیسیلیک با آب مقطر است A_c .جذب محلول حاوی H_2O_2 به عنوان یک کنترل است [۲۹]:

۲-۳- طرح و تحلیل آماری

در این مطالعه از طرح پایه کاملاً تصادفی به صورت آرایش فاکتوریل دو سطحی با ۸ نقطه مرکزی، برای بررسی اثرات پنج فاکتور عددی شامل دمای تخمیر (۳۰ تا ۳۸ درجه سانتی گراد)، pH اولیه (۵ الی ۷)، زمان گرمخانه گذاری (۱۲ تا ۴۸ ساعت)، غلظت عصاره مخمر (صفر الی ٤ درصد) و غلظت لینولئیک اسید (صفر الی ۴۰۰ میکرولیتر)، به همراه دو فاکتور اسمی شامل نوع باکتری پروبیوتیک (*L. acidophilus* LA5 و *B. animalis* subsp. lactis BB12) و نوع محیط کشت (آب پنیر و پرمیات شیر) بر فعالیت آنتی اکسیدانی استفاده شد. بررسی اثر معنی‌داری فاکتورها و بر هم‌کنش‌های آن‌ها با استفاده از توزیع فیشر به روش تجزیه واریانس در سطح $\alpha \leq$ ۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. طرح و تحلیل آماری و همچنین رسم نمودارها با نرم افزار Design Expert v10.0.4.0 (Stat-Ease Int. Co., Minneapolis, MN, USA) انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر متغیرهای مستقل بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

نمودار تغییرات فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد اثر متقابل pH اولیه با زمان گرمخانه گذاری و غلظت لینولئیک اسید، همچنین زمان گرمخانه گذاری و نوع محیط کشت بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH معنی دار بوده است (p<۰/۰۵). با توجه به نمودار c و d شکل (۱)، با افزایش زمان گرمخانه گذاری از میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته می‌شود، این کاهش در پرمیات بیشتر بوده و تفاوت معنی دار داشت (p<۰/۰۵). Shah و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH نوشیدنی سین‌بیوتیک حاوی عسل ۲۸/٤۳ درصد بود که در ۷ روز به ۲۳/۰۳ درصد کاهش یافت در حالیکه برای نوشیدنی سین‌بیوتیک بر پایه آب پنیر حاوی اینولین از ۲٦/۸۵ درصد (روز صفر) تا ۱۲/۱۷ درصد (روز هفتم) کاهش یافت و همچنان تا پایان دوره تخمیر، کاهش داشت. بر اساس مطالعات، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در حدود ۲٤ ساعت اول گرمخانه گذاری ایجاد می‌شود و به این دلیل با ادامه مدت زمان تخمیر روند کاهشی دارد. همچنین Shah و همکاران در سال ۲۰۱٦، تفاوت در فعالیت های مهار رادیکال DPPH هر دو محصولات نوشیدنی تخمیری برپایه شیر و برپایه آب پنیر را به تفاوت در ترکیب آنها نسبت دادند [۷]، که با نتایج نامداری و

نجاتی نیز مطابقت دارد [۱۵]. Maleki و همکاران در سال ۲۰۱۵، اثر معنی دار فرآیند تخمیر، دمای فرآیند و حجم مایه تلقیح را بر مهار رادیکال DPPH گزارش کردند. در این پژوهش، دلیل افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از آزمون مهار رادیکال‌های DPPH در حین تخمیر شیر حاوی فندق، تجمع فنل و پروتئولیز بیان شد [۲۱]. پروتئین‌های آب پنیر دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند و هیدرولیز پروتئین آب پنیر به عنوان آنتی اکسیدان‌های طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳۰]. ولی در میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، آب پنیر و پرمیات تفاوت معنی داری باهم نداشتند ($p>0/05$)، که احتمالاً به دلیل غنی سازی هر دو محیط کشت با عصاره مخمر می‌باشد.

نتایج نشان داد که افزایش pH اولیه از ۵ به ۷ و غلظت لینولئیک اسید از صفر به ۲۰۰ میکرولیتر موجب افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH می‌گردد که می‌تواند به دلیل موثرتر بودن آزمایش DPPH در سیستم با ویژگی هیدروفوب بیشتر باشد [۱۵]. با توجه به اینکه عصاره مخمر یک منبع نیتروژنی پیچیده است، پروتئین‌های متنوع آن می‌تواند یک سوبسترا منحصر به فرد برای آزاد کردن پپتیدهای زیست فعال با استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک باشد. ترکیبات بیولوژیکی که در هنگام تخمیر توسط فرآیند پروتئولیتیک تولید می‌شوند، علاوه بر ارزش تغذیه‌ای، فعالیت آنتی اکسیدانی نیز دارند [۳۱].

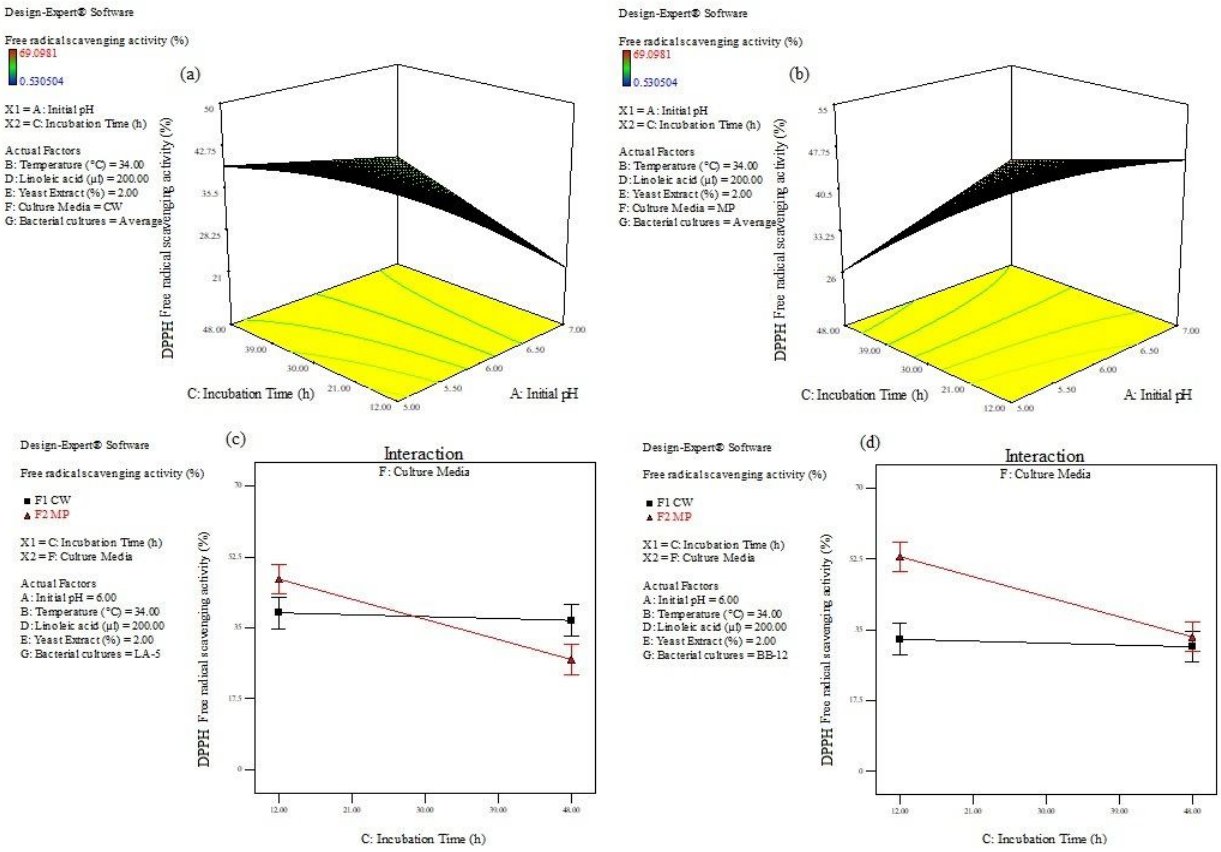

Fig 1 Effects of incubation time and its interaction with initial pH and culture media on DPPH free radical scavenging activity

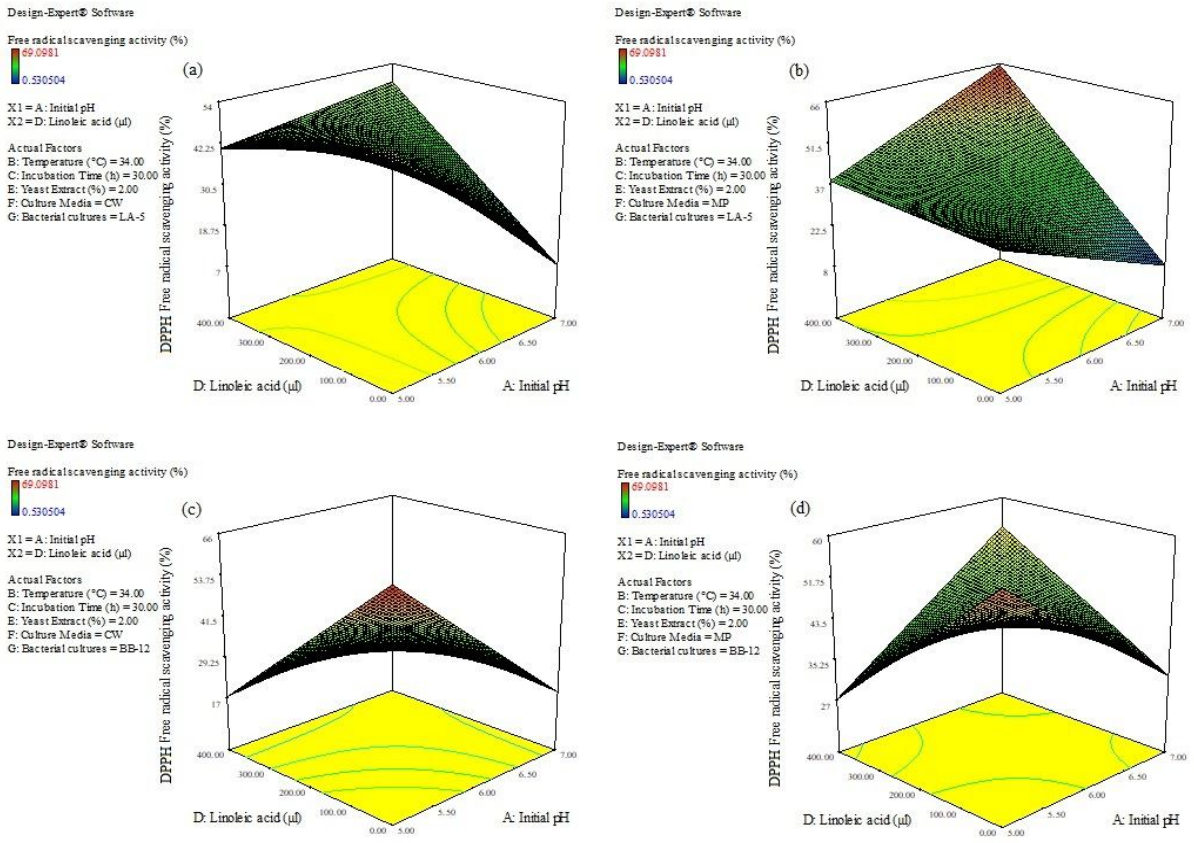

Fig 2 The effect of initial pH interaction with CLA concentration on DPPH free radical scavenging activity

مونواولئات سوربیتان (توئین ۸۰)، استات سدیم و نمک منیزیم باعث تحریک رشد آنها می‌شوند [۳۲]. Hamdipour و همکاران در سال ۲۰۱٤ نیز افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل در اثر افزایش دما را گزارش کردند [۵]. پیش از این افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل در طول فرایند تخمیر گزارش شده است [۳۳ و ۱]. اثر متقابل زمان گرمخانه گذاری و غلظت عصاره مخمر بر میزان فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل معنی دار بود ($p<۰/۰۵$)، که به دلیل تأمین شدن دمای بهینه و نیتروژن مورد نیاز برای رشد باکتری‌ها است [۳٤]. افزایش تولید متابولیت‌های موثر بر این مواد در طول مدت زمان گرمخانه گذاری دلیل این افزایش است که با نتایج Hamdipour و همکاران در سال ۲۰۱٤ نیز مطابقت دارد [۳۵]. روند مشابهی توسط محققان در مقالات منتشر شده گزارش گردیده است، McCue و Shetty گزارش کردند که افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل در طی تولید ماست با استفاده از کشت کفیر مشاهده شد [۳۳]. Bensmira و Jiang افزایش در فعالیت مهار

۳-۲- اثر متغیرهای مستقل بر فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

شکل (۳) نمودار تغییرات فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل را نشان می‌دهد. مطابق این شکل اثر دمای گرمخانه گذاری و غلظت عصاره مخمر بر فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل معنی دار بود است ($p<۰/۰۵$). همانطور که در شکل مشاهد می‌شود با افزایش دمای گرمخانه گذاری و غلظت عصاره مخمر، فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل افزایش می‌یابد. دلیل این امر مربوط به دمای بهینه رشد *L. acidophilus* LA5 و *B. animalis* subsp. lactis BB12 است که با افزایش رشد و تولید متابولیت‌های بیشتر موجب افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل شدند. همچنین این باکتری‌های پروبیوتیک از نظر نیازهای تغذیه‌ای پُر توقع[9] هستند و محیط کشت غنی از اسیدهای آمینه (پپتون، عصاره مخمر و عصاره گوشت گاو) و ویتامین‌ها و نیز ترکیباتی مانند

9. Fastidious

شده است [۲۸]. مطابق نتایج مالکی و همکاران در سال ۲۰۱۵، مقدار محتوای کل ترکیبات فنلی شیر فندق تخمیر شده در طول مدت زمان تخمیر توسط دانه های کفیر کاهش یافته و بعد از ٤٨ ساعت تخمیر از ۱/٤۲ ± ۱۳۰/٤۲ به ۷۵/۷۱ ± ۳/۹۱ میلی گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر برحسب اسید گالیک کاهش یافت. آنها متابولیسم ترکیبات فنلی توسط میکروارگانیسم‌های دانه کفیر را علت این کاهش دانستند. در این پژوهش تاثیر دمای مختلف تخمیر بر روی مقادیر محتوای کل ترکیبات فنلیک شیر فندق تخمیر شده با دانه های کفیر معنی دار بوده و کاهش مقادیر فنل کل این نوشیدنی در تمام درجه حرارت‌های مورد مطالعه رخ داد [۲۱].

رادیکال هیدروکسیل در اثر فرآیند تخمیر مشاهده کردند، نتایج آنها نشان داد که فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل شیرحاوی بادام زمینی با شیر حاوی بادام زمینی تخمیر شده از نظر آماری تفاوت معنی دار داشته و کمتر بود. ایشان دلیل چنین نتیجه‌ای را، تشکیل فنل های پلیمری در طی زیست فرآیند تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک دانستند [٤]. علاوه بر این، پس از تخمیر سویا، غلظت قابل توجهی از محتوای فنلی در مقایسه با سویا تخمیر نشده گزارش شده است [۱ و ۲]. افزایش معنی دار محتوای ترکیبات فنلی کل شیر سویای تخمیر شده با *Streptococcus thermophilus* S10 در طول زمان تخمیر ۲٤ ساعته نسبت به نمونه شاهد توسط Lee و همکاران گزارش

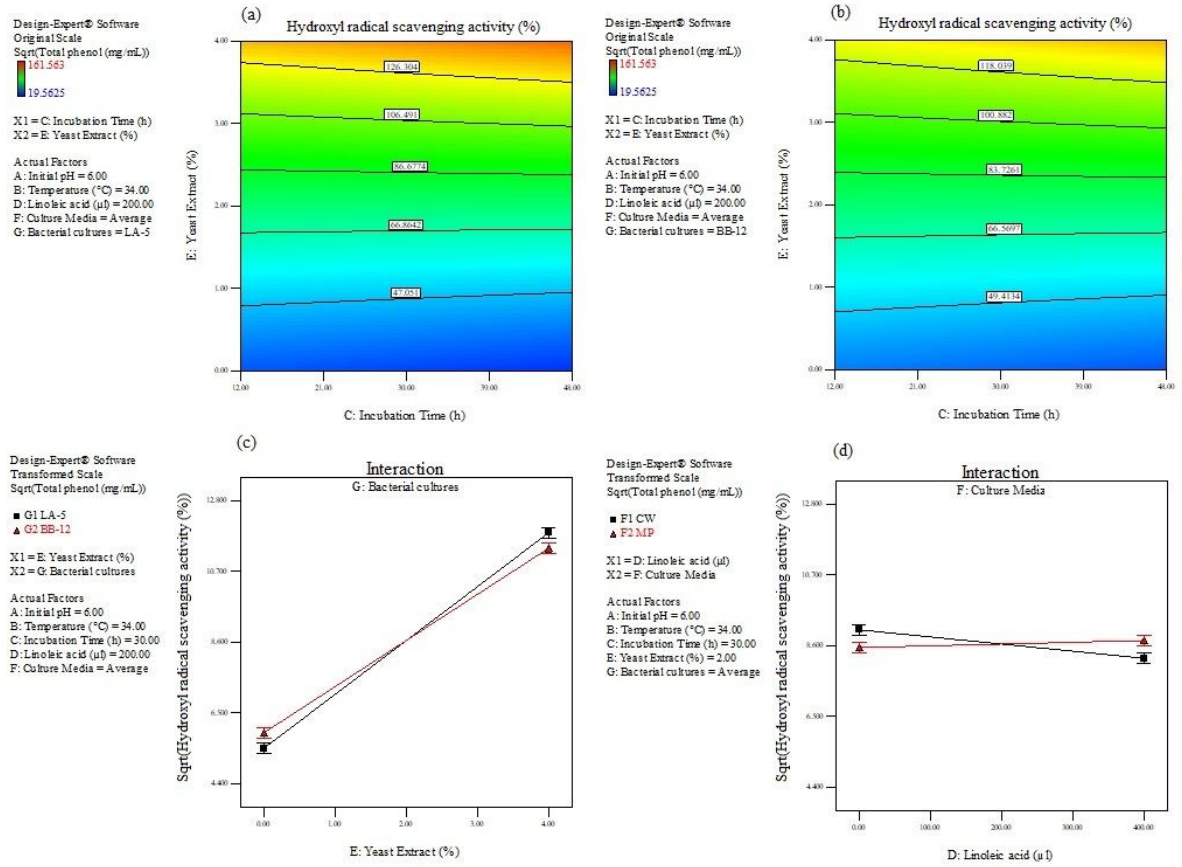

Fig 3 The effects of independent variables on Hydroxyl radicals scavenging activity

باکتری بر زنده مانی پروبیوتیک‌ها تأثیر معنی دار داشتند ($p<۰/۰۵$). همچنین اثر متقابل دمای گرمخانه گذاری و غلظت عصاره مخمر، عصاره مخمر و نوع محیط کشت و نیز نوع محیط کشت با نوع باکتری از نظر آماری معنی دار بود ($p<۰/۰۵$).

۳-۳- اثر متغیرهای مستقل بر زنده مانی پروبیوتیک ها

نتایج نشان داد زمان گرمخانه گذاری، غلظت عصاره مخمر و نوع

نسبت به آب پنیر می‌گردد. Marhamatizadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲، در مطالعه خود در مورد تاثیر پرمیات بر رشد و زنده ماندن *L. acidophilus* و *B. bifidum* در تولید نوشیدنی های غذایی پروبیوتیک، به نتایج مشابه دست یافتند. آنها گزارش کردند اثر ضد باکتری و مهار کننده pH پایین برای *B. bifidum* قوی تر از *L. acidophilus* است و به نظر می‌رسد که در طول زمان ذخیره سازی و فرآیند افزایش تخمیر، کاهش pH موجب کاهش رشد *B. bifidum* می شود [۳۶]. در تحقیقی که Jayalalitha و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام دادند، نتایج مشابه بود و مقاومت *L. acidophilus* در محیط معده بیشتر از سایر گونه‌ها از جمله *B. bifidum* گزارش شد [۳۷]. پروبیوتیک‌ها اغلب زنده مانی ضعیفی محصولات لبنی تخمیری نشان می‌دهد، کاهش زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک و بقای ضعیف آن در طی زمان نگهداری و نیز کاهش در اثر آسیب‌های ناشی از افزایش اسیدی توسط محققان گزارش شده است [۴۱-۳۸].

همانطور که در نمودارهای شکل (٤) مشخص است با افزایش درصد عصاره مخمر از صفر به ٤ درصد، باکتری‌های پروبیوتیک رشد داشته و اثر متقابل دمای گرمخانه گذاری و غلظت عصاره مخمر این رشد را تشدید کرده است. همچنین با افزایش درصد عصاره مخمر در پرمیات، زنده مانی پروبیوتیک‌ها ثابت باقیمانده ولی در آب پنیر پروبیوتیک ها رشد داشتند که ناشی از منابع نیتروژنی موجود در آب پنیر می باشد که رشد پروبیوتیک‌ها را تحریک کرده است. مطابق با نمودارهای شکل (۵)، زنده مانی *L. acidophilus* LA5 در هردو محیط کشت ثابت بود ولی زنده مانی *B. animalis* subsp. lactis BB12 در پرمیات نسبت به آب پنیر کمتر بود. یکی از عوامل مهم که بر بقای سویه‌های باکتری پروبیوتیک در مواد غذایی تأثیر می‌گذارد، pH است، بطوری که بقاء در pH های پایین، محدود است [۳۶]. کاهش در زنده مانی *B. animalis* subsp. lactis BB12 در پرمیات به دلیل محتوای لاکتوز بالاتر پرمیات نسبت به آب پنیر است که در اثر فرآیند تخمیر باعث افزایش اسیدیته و کاهش بیشتر pH

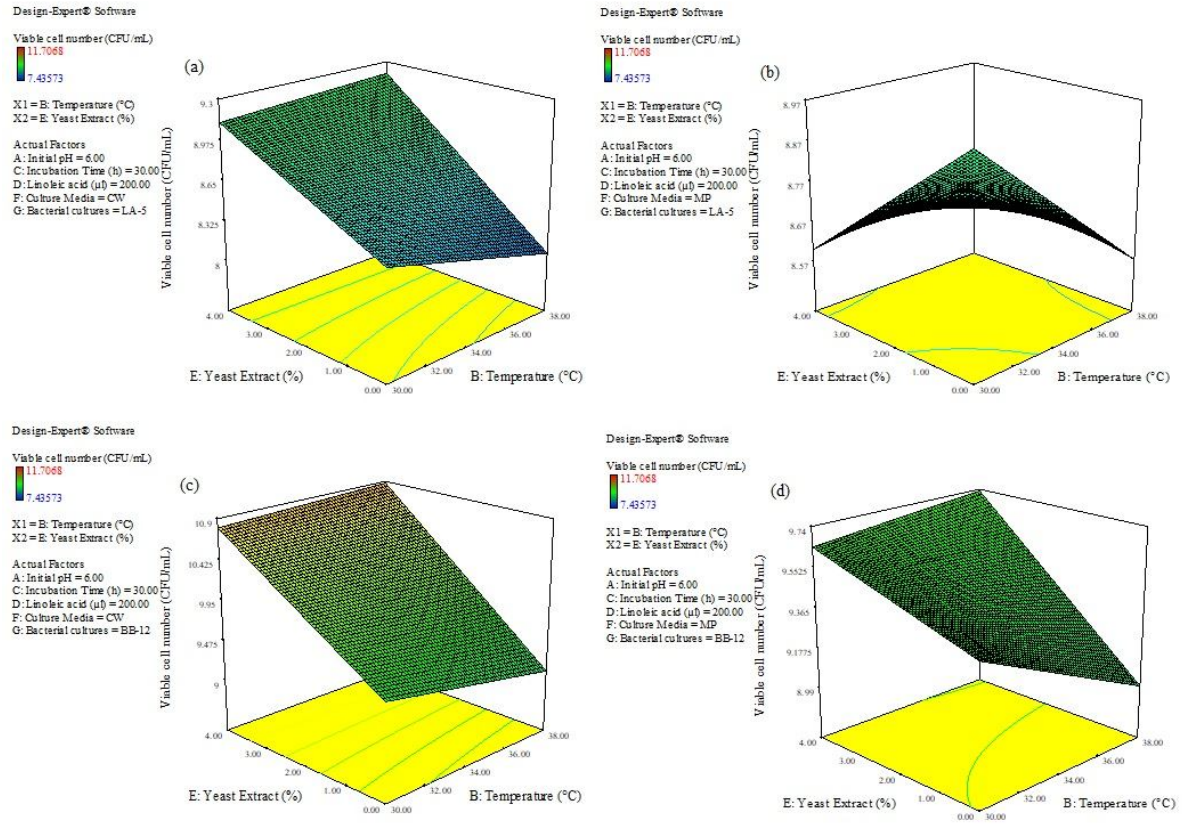

Fig 4 The effect of temperature interaction with yeast extract concentration on viability of *L. acidophilus* and *B. lactis*

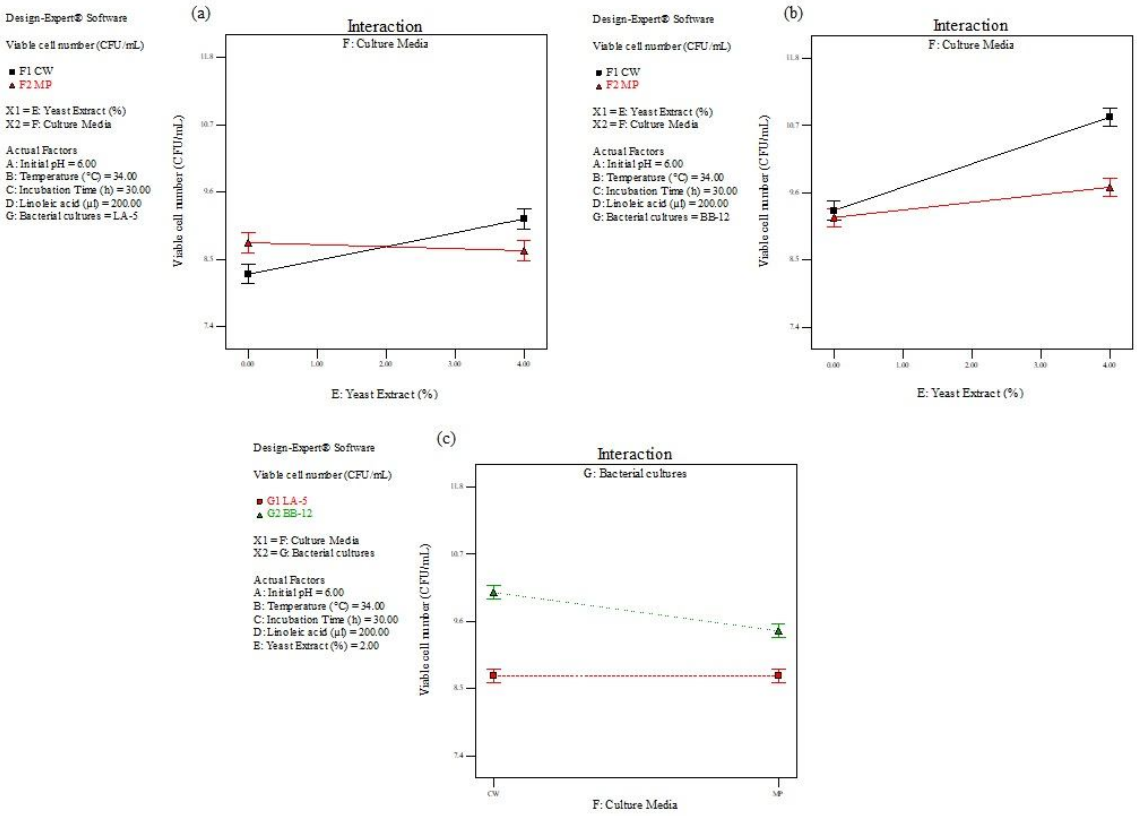

Fig 5 Effects of independent variables on viability of *L. acidophilus* and *B. lactis*

بر روی تولید نوشیدنی تخمیری با تلقیح دانه‌های کفیر و پروبیوتیک‌های تجاری کنسانتره پروتئین آب پنیر مایع و پرمیات مطالعه کرده بودند، گزارش شده است. ایشان بیان کردند در نوشیدنی‌های تخمیری با پرمیات اولترافیلتراسیون تغلیظ شده، دارای اسیدیته بسیار کمتری نسبت به کنسانتره پروتئین مایع آب پنیر هستند. اسیدیته قابل تیتراسیون *B. bifidum* در مقایسه با *L. acidophilus* بیشتر بود [۲۷]. زیرا *B. bifidum* اسید استیک و اسید لاکتیک را در نسبت مولی ۳: ۲ تولید می‌نماید ولی *L. acidophilus* هموفرمنتاتیو بوده و فقط اسید لاکتیک تولید می‌کند [۳٤]. شایان ذکر است نتایج نشان داد، اثر متقابل pH اولیه و غلظت لینولئیک اسید، دما و زمان گرمخانه گذاری، دمای گرمخانه گذاری و نوع محیط کشت و نیز دمای گرمخانه گذاری و نوع باکتری پروبیوتیک از نظر آماری معنی دار بود ($p<۰/۰۵$).

۳-٤- اثر متغیرهای مستقل بر اسیدیته قابل تیتراسیون

افزایش اسیدیته پارامتری است که نشان دهنده عملکرد تخمیر یک کشت میکروبی است [۱۵]. دمای گرمخانه گذاری، مدت زمان گرمخانه گذاری، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و نوع باکتری پروبیوتیک بر اسیدیته قابل تیتراسیون تأثیر معنی دار داشتند ($p<۰/۰۵$). مطابق نمودارهای شکل ٦ و ۷ با افزایش دما و زمان گرمخانه گذاری و نیز غلظت عصاره مخمر، اسیدیته قابل تیتراسیون افزایش می‌یابد. میزان اسیدیته قابل تیتراسیون در محیط کشت آب پنیر بیشتر از پرمیات بود. به دلیل وجود منابع نیتروژنی زیاد در آب پنیر، میزان رشد و فعالیت باکتری‌های مورد استفاده بیشتر بوده و در نتیجه موجب افزایش اسیدیته قابل تیتراسیون شدند. نتایج مشابهی توسط Pereira و همکاران در سال ۲۰۱۵

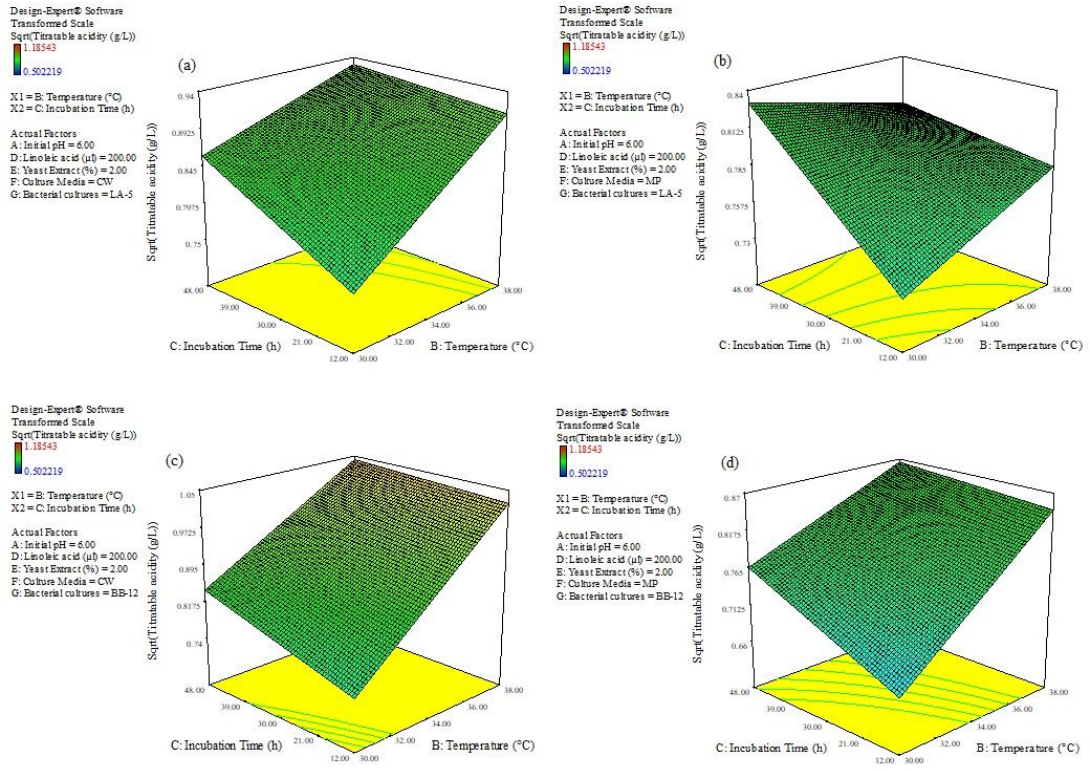

Fig 6 The effect of temperature interaction with incubation time on titratable acidity

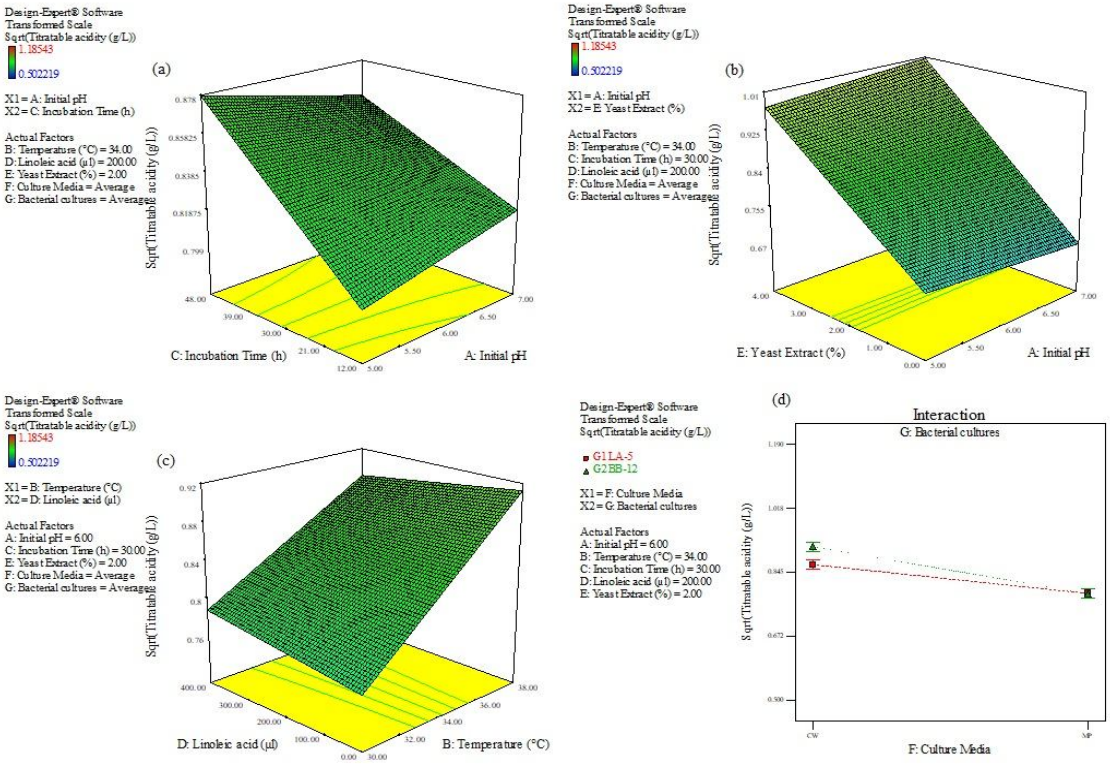

Fig 7 Effects of independent variables on titratable acidity

٤- نتیجه گیری

بـر اسـاس نتـایج، *L. acidophilus* LA5 و *B. animalis* subsp. lactis BB12 طی فرآیند تخمیر در محیط کـشت آب پنیر غنی شده با عصاره مخمر باعث افزایش فعالیت ضد اکسیدانی شـدند. زمـان گرمخانـه گـذاری بـر فعالیـت مهـار رادیکـال آزاد DPPH اثر معنی دار داشت و نیز اثر متقابـل pH اولیـه و غلظـت لینولئیک اسید، دمای گرمخانـه گـذاری و غلظـت عـصاره مخمـر، همچنین زمان گرمخانه گذاری و نوع محیط کشت بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH معنی دار بوده است ($p<۰/۰۵$). بـا افـزایش زمان گرمخانه گذاری از میزان فعالیت مهار رادیکـال آزاد DPPH کاسته شد که این کاهش در پرمیات بیشتر بوده و تفاوت معنـی دار با آب پنیر داشت. زمان گرمخانه گذاری، غلظت عـصاره مخمـر و نوع باکتری بر زنده مانی پروبیوتیک ها تـأثیر معنـی دار داشـتند و همچنین اثر متقابل دمای گرمخانه گذاری و غلظت عصاره مخمـر، عصاره مخمر و نوع محیط کشت و نیز نوع محیط کـشت بـا نـوع باکتری از نظر آماری معنی دار بود ($p<۰/۰۵$). بـا افـزایش درصـد عصاره مخمر از صفر به ٤ درصد، باکتری هـای پروبیوتیـک رشـد داشته و اثر متقابل دمای گرمخانه گذاری و غلظت عـصاره مخمـر این رشد را تشدید کرد. نتـایج ایـن پـژوهش نـشان داد کـه زمـان تخمیر، دمای گرمخانه گذاری و غلظـت عـصاره مخمـر مهمتـرین فاکتورهای تأثیر گذار بر فعالیت مهار رادیکـال هـای آزاد DPPH و هیدروکـسیل بودنـد. ایـن مطالعـه نـشان داد کـه دو بـاکتری پروبیوتیک *L. acidophilus* LA5 و *B. animalis* subsp. lactis BB12 توانایی بالایی در فعالیت آنتی اکسیدانی با کـشت در آب پنیر به عنوان محیط کشت را دارند.

٥- منابع

[1] Juan, M. Y., & Chou, C. C. (2010). Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with Bacillus subtilis BCRC 14715. *Food microbiology, 27*(5), 586-591.

[2] Wardhani, D. H., Vázquez, J. A., & Pandiella, S. S. (2010). Optimisation of antioxidants extraction from soybeans fermented by Aspergillus oryzae. *Food chemistry, 118*(3), 731-739.

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

[4] Bensmira, M., & Jiang, B. (2015). Total phenolic compounds and antioxidant activity of a novel peanut based kefir. *Food Science and Biotechnology, 24*(3), 1055-1060.

[5] Hamdipour, S., Rezazad, M. & Alizadeh, M. (2014). Identification of effective factors on antioxidant production and extraction from apple residue using two subvarietes of *Rhizopus oligosporus Journal of Food Research, 3*(25), 359-368.

[6] Osuntoki, A., & 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.

[7] Shah, C., Mokashe, N., & Mishra, V. (2016). Preparation, characterization and in vitro antioxidative potential of synbiotic fermented dairy products. *Journal of food science and technology, 53*(4), 1984-1992.

[8] Mathys, S., Meile, L., & Lacroix, C. (2009). Co□cultivation of a bacteriocin□producing mixed culture of *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 and *Pediococcus acidilactici* UVA1 isolated from baby faeces. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(1), 36-46.

[9] Ahire, J. J., Mokashe, N. U., Patil, H. J., & Chaudhari, B. L. (2013). Antioxidative potential of folate producing probiotic Lactobacillus helveticus CD6. *Journal of food science and technology, 50*(1), 26-34.

[10] Achuthan, A. A., Duary, R. K., Madathil, A., Panwar, H., Kumar, H., Batish, V. K., & Grover, S. (2012). Antioxidative potential of lactobacilli isolated from the gut of Indian people. *Molecular biology reports, 39*(8), 7887-7897.

[11] Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., & Kilk, A. (2002). Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International journal of food microbiology, 72*(3), 215-224.

[12] Lin, M. Y., & Chang, F. J. (2000). Antioxidative effect of intestinal bacteria

[22] Salla, A. C. V., Margarites, A. C., Seibel, F. I., Holz, L. C., Brião, V. B., Bertolin, T. E., ... & Costa, J. A. V. (2016). Increase in the carbohydrate content of the microalgae Spirulina in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource technology*, *209*, 133-141.

[23] Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. (2019). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB12: Optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. *International journal of biological macromolecules*, 123, 752-765.

[24] de Lara Pedroso, D., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., & Favaro-Trindade, C. S. (2012). Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal, 26*(2), 127-132.

[25] Florence, A. C. R., Oliveira, R. P., Silva, R. C., Soares, F. A., Gioielli, L. A., & Oliveira, M. N. (2012). Organic milk improves *Bifidobacterium lactis* counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. *LWT-Food Science and Technology*, *49*(1), 89-95.

[26] Loghavi, L., Sastry, S. K., & Yousef, A. E. (2007). Effect of moderate electric field on the metabolic activity and growth kinetics of Lactobacillus acidophilus. *Biotechnology and bioengineering*, *98*(4), 872-881.

[27] Pereira, C., Henriques, M., Gomes, D., Gomez-Zavaglia, A., & de Antoni, G. (2015). Novel Functional Whey-Based Drinks with Great Potential in the Dairy Industry. *Food technology and biotechnology, 53*(3), 307.

[28] Lee, M., Hong, G. E., Zhang, H., Yang, C. Y., Han, K. H., Mandal, P. K., & Lee, C. H. (2015). Production of the isoflavone aglycone and antioxidant activities in black soymilk using fermentation with *Streptococcus thermophilus* S10. *Food Science and Biotechnology, 24*(2), 537-544.

[29] Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. (2019). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB12: *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive diseases and sciences, 45*(8), 1617-1622.

[13] Tabasco, R., García-Cayuela, T., Peláez, C., & Requena, T. (2009). *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *International journal of food microbiology*, *132*(2), 109-116.

[14] Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, *11*(1), 1-17.

[15] Namdari, A., & Nejati, F. (2016). Development of Antioxidant Activity during Milk Fermentation by Wild Isolates of *Lactobacillus helveticus*. *Applied Food Biotechnology, 3*(3), 178-186.

[16] Parashar, A., Jin, Y., Mason, B., Chae, M., & Bressler, D. C. (2016). Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. *Journal of dairy science, 99*(3), 1859-1867.

[17] Pescuma, M., de Valdez, G. F., & Mozzi, F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied microbiology and biotechnology, 99*(15), 6183-6196.

[18] Khamirian, R. A., Jooyandeh, H., Hesari, J., & Barzegar, H. (2016). Optimization and investigation on physicochemical, microbial and sensory quality of permeate-based probiotic lemon beverage. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 1396*(13).

[19] Nabizadeh, F., Khosrowshahi Asl, A. & Zomorodi, S. (2014). Influence of ultrafiltered milk permeate and zedo gum on qualitative properties of doogh. *Journal of Food Research, 4*(23), 567-580.

[20] Baljeet, S. Y., Ritika, B. Y., & Sarita, R. (2013). Studies on development and storage of whey-based pineapple (Ananas comosus) and bottle gourd (Lagenaria siceraria) mixed herbal beverage. *International Food Research Journal*, *20*(2).

[21] Maleki, N., Khodaiyan, F., & Mousavi, S. M. (2015). Antioxidant activity of fermented Hazelnut milk. *Food Science and Biotechnology, 24(*1), 107-115.

Optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. *International journal of biological macromolecules*, *123*, 752-765.

[30] Peña□Ramos, E. A., Xiong, Y. L., & Arteaga, G. E. (2004). Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 84*(14), 1908-1918.

[31] Solieri, L., Rutella, G. S., & Tagliazucchi, D. (2015). Impact of non-starter lactobacilli on release of peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities during bovine milk fermentation. *Food microbiology, 51*, 108-116.

[32] Robinson, R. K. (2014). *Encyclopedia of food microbiology*. C. A. Batt (Ed.). Academic press.

[33] McCue, P. P., & Shetty, K. (2005). Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. *Process Biochemistry, 40*(5), 1791-1797.

[34] Lee, Y. K., & Salminen, S. (2009). *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons.

[35] Hamdipour, S., Rezazad, M., & Alizadeh, M. (2014). Production of phenolic antioxidants from apple residue using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 2*(6), 1937-1942.

[36] Marhamatizadeh, H. M., Ehsandoost, E., Gholami, P., Moshiri, H., & Nazemi, M. (2012). Effect of permeate on growth and survival of Lactobacillus acidophilus and *Bifidobacterium bifidum* for production of probiotic nutritive beverages. *World Applied Sciences Journal, 18*(1), 1389-1393.

[37] Jayalalitha, V., Balasundaram, B., & Palanidorai, R. (2012). *In Vitro* assessment of microencapsulated probiotic beads. *International Journal of Agriculture: Research and Review, 2* (1): 1-6.

[38] Sarabi jamab, M., Rahnama vosough, P., kate shamdhiri, M. & Karazhyan, R. (2017). Survivability of Probiotic Bacteria in Simulated Gastric and Intestinal model. JFST No. 68, Vol. 14.

[39] Hekmat, S., Soltani, H., & Reid, G. (2009). Growth and survival of Lactobacillus reuteri RC-14 and Lactobacillus rhamnosus GR-1 in yogurt for use as a functional food. *Innovative food science & emerging technologies, 10*(2), 293-296.

[40] Lucas, A., Sodini, I., Monnet, C., Jolivet, P., & Corrieu, G. (2004). Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, *14*(1), 47-53.

[41] Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2004). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, *37*(9), 839-850.

Development of the antioxidant activity in cheese whey and milk permeate using *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB12

Amiri, S. [1], Rezaei Mokarram, R. [2*], Sowti Khiabani, M. [3], Rezazadeh Bari, M. [4], Alizadeh Khaledabad, M. [5]

1. PhD, Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
5. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: 2019/06/15 Accepted:2019/09/01)

Free radicals are a major cause of many diseases, such as cancer, by damage to the cells. The use of probiotic strains in fermented dairy foods has expanded due to the health-promotion effects of the consumer. Regarding antioxidant potentials of probiotic bacteria, the aims of this study were compared the antioxidant activity of probiotic species *L. acidophilus* LA5 and *B. animalis* subsp. lactis BB12 used in foods and investigate effects of incubation temperature, Initial pH, fermentation time, yeast extract concentration and linoleic acid concentration on their antioxidant activity in enriched cheese whey and milk permeate. The results showed that fermentation time, incubation temperature and concentration of yeast extract were the most important factors that had a significant effect on both DPPH free radical inhibitory activity and hydroxyl radical scavenging activity ($p < 0.05$). DPPH free radical inhibitory activity and hydroxyl radical scavenging activity increased with increasing incubation temperature and yeast extract concentration, respectively. Antioxidant activity was observed in the first 24 hours of fermentation process, which was proportional to bacterial growth. Hydroxyl radical scavenging activity and DPPH free radical scavenging activity, as a result of the probiotic culture activity and their effect on the substrate, increased and decreased, respectively, in the first 24 hours of fermentation time, by destruction the polymers. This study showed that the fermentation bioprocess by *L. acidophilus* LA5 and *B. animalis* subsp. lactis BB12 in the cheese whey as a medium had high antioxidant activity.

Keywords: Probiotics, DPPH· scavenging activity, Hydroxyl radical scavenging activity and Fermentation bioprocess

* Corresponding Author E-Mail Address: rmokarram@tabrizu.ac.ir