Food Hygiene, Vol. 14, No. 55, Autumn 2024

"Research article" **DOI: 10.71876/jfh.2024.3051400**

The antioxidant and antimicrobial properties of grape pekmez (grape molasses-like syrup) and butter oil

Karimi-Cheshmeh Ali, R.[1], Shakerian, A.[1*], Rahimi, E.[1], Sharafati Chaleshtori, R.[2, 1]

1. Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Institute for Basic Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[*]Corresponding author: amshakerian@yahoo.com
(Received: 2023/12/31 Accepted: 2024/5/11)

Abstract

Grape juice and butter oil are traditional ingredients in the Iranian diet. This study aimed to investigate their antioxidant and antimicrobial properties. The phenolic content and flavonoid compounds were determined using the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride methods, respectively. Antioxidant activity was assessed by the DPPH assay, and the antimicrobial activity was evaluated by disk diffusion. The results revealed that the total phenolic content of grape juice was 27.41 mg/g (gallic acid equivalent), and the flavonoid content was 9.75 mg/g (quercetin equivalent). Both phenolic and flavonoid compounds decreased during storage. Grape juice exhibited significantly higher antibacterial activity than butter oil at similar concentrations ($p < 0.05$). Additionally, the inhibition zone diameter increased with higher concentrations of both substances. These findings demonstrate that grape juice and butter oil contain phenolic and flavonoid compounds with notable antioxidant and antimicrobial properties.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Pekmez, Butter oil; Antioxidant, Antimicrobial

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.71876/jfh.2024.3051400

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی شیره‌انگور و روغن کره

خواص شیره‌انگور و روغن کره

رضا کریمی‌چشمه‌علی[۱]، امیر شاکریان[۱*]، ابراهیم رحیمی[۱]، رضا شرافتی‌چالشتری[۱،۲]

۱. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲ . مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

*نویسنده مسئول: amshakerian@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۲۲)

چکیده

شیره‌انگور و روغن کره از ترکیبات مغذی و سنتی در الگوی غذایی جمعیت ایرانی می‌باشند. بنابراین، هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی شیره‌انگور و روغن کره بود. پس از تهیه شیره‌انگور و روغن کره، محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به ترتیب به روش‌های فولین سیوکالتیو و کلرید آلومینیوم انجام شد. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی به ترتیب به روش‌های دی‌فنیل‌دی‌پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) و انتشار دیسک انجام گرفت. نتایج نشان داد فنول کل شیره‌انگور برابر ۲۷/۴۱ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و ترکیبات فلاونوئیدی برابر ۹/۷۵ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم بود. همچنین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با گذشت زمان نگهداری کاهش یافتند. در مقابل، فعالیت ضد باکتریایی شیره‌انگور در غلظت مشابه در مقایسه با روغن کره به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($p<۰/۰۵$). همچنین با افزایش غلظت، قطرهاله عدم رشد افزایش یافت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که شیره‌انگور و روغن کره حاوی ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی هستند.

واژه‌های کلیدی: شیره‌انگور، روغن کره، آنتی‌اکسیدان، ضدمیکروبی

مقدمه

روغن کره یا روغن کرمانشاهی یکی از روغن‌های مصرفی متداول در برخی مناطق ایران، هند، ترکیه و آسیای جنوب شرقی است. این روغن به‌طور سنتی از ماست تهیه می‌شود و الگوی اسیدهای چرب آن با کره و چربی‌هایی که مستقیماً از شیر استخراج می‌شوند، متفاوت است. در روش تهیه آن، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و متوسط، افزایش و اسیدهای چرب با زنجیره بلند، کاهش می‌یابد، همچنین کلسترول موجود در آن نیز کم می‌شود. برای تهیه روغن کره یا روغن کرمانشاهی، ابتدا شیر تبدیل به ماست شده و سپس ماست تبدیل به دوغ و کره می‌شود. سپس کره از دوغ جدا و ذوب می‌شود تا ناخالصی‌های آن جدا شود. آنچه به دست می‌آید روغن کره کرمانشاهی است (Bahrami *et al*., 1999).

درصورتی‌که روغن در شرایط نامناسب قرار گیرد اکسیدشده و موجب بدطعمی و عوارض نامطلوب می‌گردد. اکسیداسیون روغن‌ها و چربی‌ها مهم‌ترین عامل فساد مواد غذایی حاوی چربی بالا است. اکسیداسیون موجب تندی، تولید مواد طعم زا نامطلوب، رنگ نامطلوب و به‌طورکلی تغییر در ویژگی‌های ارگانولپتیک ماده غذایی می‌شود. به‌علاوه منجر به تخریب مواد مغذی مانند ویتامین‌ها شده و ارزش تغذیه‌ای محصول غذایی کاهش می‌یابد؛ همچنین برخی از ترکیبات حاصل از اکسیداسیون تهدیدی برای سلامت انسان محسوب می‌شود (Ahmadi-Dastgerdi *et al*., 2019).

انگور یکی از محصولات مهم باغی در دنیا محسوب می‌شود. تولید انگور در ایران حدود سه میلیون تن است که از این نظر مقام هفتم را در جهان دارد (Dehghanian *et al*., 2001). حدود ۵ تا ۲۰٪ انگورهای تولیدی در ایران برای تهیه شیره‌انگور مورداستفاده قرار می‌گیرد. شیره‌انگور یکی از محصولات جانبی انگور است که در مناطق تاک خیز ایران به شیوه سنتی تولید می‌شود. تولید شیره‌انگور یک مایع تیره‌رنگ، شیرین و چسبناک است که به‌وسیله تغلیظ مقدماتی و سپس تبخیر در اواپراتورهای تک بدنه‌ای یا چند بدنه‌ای تولید می‌شود (Ehteshami *et al*., 2005; Tosun *et al*., 2013; Heshmati *et al*., 2020). تغلیظ آب انگور علاوه بر کاهش فعالیت آبی و کند کردن رشد میکروارگانیسم‌ها باعث کاهش هزینه‌های حمل‌ونقل و انبارمانی نیز می‌شود و مدت ماندگاری فراورده را افزایش می‌دهد. شیره‌انگور علاوه بر اینکه به شیوه کاملاً صنعتی و پیوسته انجام می‌گیرد، از دیرباز در ایران به شیوه سنتی متداول بوده است (Helvacıo glu *et al*., 2018). شیره‌انگور معمولاً به‌عنوان یک محصول غذایی انفرادی مصرف می‌شود یا ممکن است رقیق شود و به‌عنوان نوشیدنی سرو شود (Aliyazicioglu *et al*., 2009; Heshmati *et al*., 2019a, b, c). در ایران و ترکیه معمولاً به‌عنوان صبحانه در زمستان مصرف می‌شود (Akan, 2018). علاوه بر این، می‌توان آن را به‌عنوان جایگزین قند نیشکر/چغندر در فرمولاسیون انواع محصولات غذایی استفاده کرد (Jaddi *et al*., 2018; Heshmati *et al*., 2019a). شیره‌انگور حاوی مقادیر زیادی قند طبیعی و همچنین مواد معدنی، ویتامین‌های A، C، B_2، B_1، اسیدهای آلی و عوامل آنتی‌اکسیدانی است. به همین جهت نقش مهمی در تغذیه گروه‌های سنی مختلف مخصوصاً کودکان و ورزشکاران و بیماران دارد (Mohamadi *et al*., 2008;

Demirozu *et al*., 2019). محاسبات ریاضی نشان داد که شیره‌انگور از نوع سیال غیرنیوتنی و غلیظ‌شونده با برش است. همچنین ضریب پایداری شیره‌انگور با دما رابطه دارد (Tovakolipour and Kalbasi Ashtari; 2012).

هرچند مطالعات زیادی در خصوص اثر آنتی‌اکسیدانی گیاهان ازجمله انگور و فرآورده‌های جانبی آن صورت پذیرفته است اما در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی شیره‌انگور و روغن کره مطالعه‌ای ثبت‌نشده است. هدف از این تحقیق بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی شیره‌انگور و روغن کره بود.

مواد و روش‌ها

- تهیه روغن کره و شیره‌انگور

در این مطالعه تجربی، یک نمونه روغن کره (کرمانشاهی) از یک مرکز فروش در استان چهارمحال و بختیاری (ایران) تهیه و به‌صورت استریل به آزمایشگاه دانشگاه آزاد شهرکرد منتقل شد.

جهت تهیه شیره‌انگور، نمونه‌های انگور (واریته عسگری) به مدت ۱۰ دقیقه در آب (۲۰ درجه سلسیوس) غوطه‌ور شدند و سپس به مدت ۱۰ ثانیه با آب شسته شدند. با استفاده از آب‌میوه‌گیری (پارس خزر، تهران، ایران)، نمونه‌های انگور خرد شد و سپس تحت‌فشار قرار گرفتند. پوست و دانه انگور با فیلتر کردن از طریق کاغذ صافی واتمن (شماره ۲) خارج شد. در مرحله بعد آب انگور به‌دست‌آمده شفاف شد. آب انگور جمع‌آوری‌شده در دمای ۶۰-۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه جوشانده شد و خاک ملاس به آن اضافه شد. پس از ۵-۴ ساعت استراحت، با برداشتن رسوب از ته ظرف و جوشاندن مجدد، ماده تشکیل‌شده شیره‌انگور است (Heshmati *et al*., 2020).

- تعیین پروفایل اسید چرب

به‌منظور تعیین پروفایل اسیدهای چرب موجود در نمونه، از دستگاه GC/FID (Agilent, USA) استفاده شد. برای متیلاسیون ۵۰ میکرولیتر از نمونه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سدیم متوکسید متانولی ۰/۵ نرمال و ۱ میلی‌لیتر هگزان اضافه گردید و متیلاسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. دمای ابتدایی آون ۶۰ درجه سلسیوس و گرادیان حرارتی ۴ درجه سلسیوس در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۸۰ تا ۳۰۰ درجه سلسیوس، دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سلسیوس، گاز هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد به‌عنوان فاز متحرک (گاز حامل) با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه انتخاب شد. پس از تهیه متیل استرهای اسید چرب، یک گرم از نمونه توسط پیپت پاستور به درون یک لوله آزمایش منتقل گردید. سپس ۷ میلی‌لیتر حلال انهگزان و ۲ میلی‌لیتر پتاس به آن افزوده و درب لوله محکم بسته شد و لوله آزمایش درون بن‌ماری جوش ۵۰-۵۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از ۱۵ دقیقه لوله آزمایش به مدت ۵ دقیقه ساکن نگه‌داشته شد و از فاز رویی برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی استفاده شد. سپس با استفاده از محلول استاندارد اسیدهای چرب که در غلظت‌های مشخص ساخته‌شده بود، منحنی کالیبراسیون رسم شد و درصد اسیدهای چرب موجود در نمونه اندازه‌گیری شد.

- اندازه‌گیری فنل کل

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در شیره‌انگور از طریق رنگ‌سنجی به روش فولین‌سیوکالتو موردبررسی قرار گرفت. مطابق روش دونالد و همکاران (۲۰۰۱)، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۵ میلی‌لیتر از معرف فولین-سیوکالتو (که با آب مقطر ۱۰ برابر رقیق‌شده بود) و ۴ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم یک مولار به‌خوبی مخلوط شد. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Technicon, Italy) در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد. محلول پایه‌ای از اسید گالیک با غلظت ۱ گرم بر لیتر تهیه گردید. از این محلول پایه، غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) آماده گردید و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکرشده در بالا مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، مقدار کل ترکیبات فنولی با استفاده از معادله خط رسم‌شده (Y= 1.36 X+0.064) بر مبنای اسید گالیک و به‌صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان گردید (Donald *et al.*, 2001).

- اندازه‌گیری فلاونوئید کل

ترکیبات فلاونوئیدی شیره‌انگور به روش چانگ اندازه‌گیری شد. به‌این‌ترتیب که به ۰/۵ میلی‌لیتر از شیره‌انگور، ۰/۱میلی‌لیتر از کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد افزوده سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از استات پتاسیم ۱مولار، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و بعد از گذشت مدت‌زمان ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه جذب آن‌ها در ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. محلول پایه‌ای از کوئرستین با غلظت ۱گرم بر لیتر تهیه گردید. از این محلول پایه، غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۰، ...، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) آماده گردید و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکرشده در بالا مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین، مقدار کل فلاونوئید عصاره اوجی با استفاده از معادله خط رسم شده (Y= 0.96 X+0.017) بر مبنای کوئرستین و به‌صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان گردید (Chang, 2002).

- تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از رادیکال آزاد ۲،۲-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) موردبررسی قرار گرفت. آزمایش مهار رادیکال آزاد یکی از پرکاربردترین روش‌ها جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. بدین منظور ۰/۳ میلی‌لیتر از نمونه با ۲/۷ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک نگهداری شد، سپس جذب در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد و از طریق رابطه زیر میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال آزاد به دست آمد (*et* Suh *al.*, 2014).

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Acontrol} - \text{Asample}}{\text{Acontrol}} \times 100$$

A: میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر

- تعیین فعالیت ضدمیکروبی

باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و باکتری‌های گرم منفی *اشریشیاکلای* (ATCC 25922)، *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC 29212) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) از مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید و در محیط مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar, Merck) به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت کشت داده شدند. اثر ضد باکتریایی بر اساس روش دیسک‌دیفیوژن تعیین شد. برای تهیه سوسپانسیون باکتری از کشت ۲۴ ساعته با غلظت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. سپس نمونه باکتری روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و دیسک‌های کاغذی استریل به پلیت‌های حاوی باکتری اضافه شد که هر یک با غلظت‌های مختلف شیره‌انگور و روغن کره حل‌شده در حلال ۵٪ دی‌متیل‌سولفوکساید (dimethyl sulfoxide; DMSO, Merck) تلقیح شدند. دیسک حاوی ۱۵ میکرولیتر آنتی-بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین و جنتامایسین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. پلیت‌ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از گذشت زمان انکوباسیون هاله‌های عدم رشد دقیقاً اندازه‌گیری شدند (Ahmadi-Dastgerdi *et al*., 2017).

- روش آماری

تمامی آزمون‌های انجام‌شده با سه تکرار و نتایج به‌صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شدند. مقایسه میانگین نتایج با آزمون ANOVA (دانکن) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام گرفت.

یافته‌ها

- محتوی فنول و فلاونوئید شیره‌انگور

محتوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی شیره‌انگور در مدت‌زمان نگهداری در جدول (۱) نشان داده‌شده است. شیره‌انگور دارای ۲۷/۴۱ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم فنول کل و ۹/۷۵ میلی‌گرم موئرستین بر گرم فلاوونوئید است. نتایج نشان می‌دهد ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی با گذشت زمان روند کاهشی داشته است.

جدول (۱)- محتوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی شیره‌انگور در مدت‌زمان نگهداری

زمان نگهداری (روز)	ترکیبات فنولی (میلی‌گرم در گرم اسید گالیک)	ترکیبات فلاونوئیدی (میلی‌گرم در گرم کوئرستین)
۰	۲۷/۴۱±۰/۰۶^{a}	۹/۷۵±۰/۰۶^{a}
۱۵	۲۶/۱۹±۰/۰۵^{b}	۹/۳۷±۰/۰۸^{b}
۳۰	۲۳/۴۳±۰/۰۹^{c}	۷/۸۱±۰/۰۷^{c}
۶۰	۲۱/۵۳±۰/۰۶^{d}	۶/۳۴±۰/۰۴^{d}

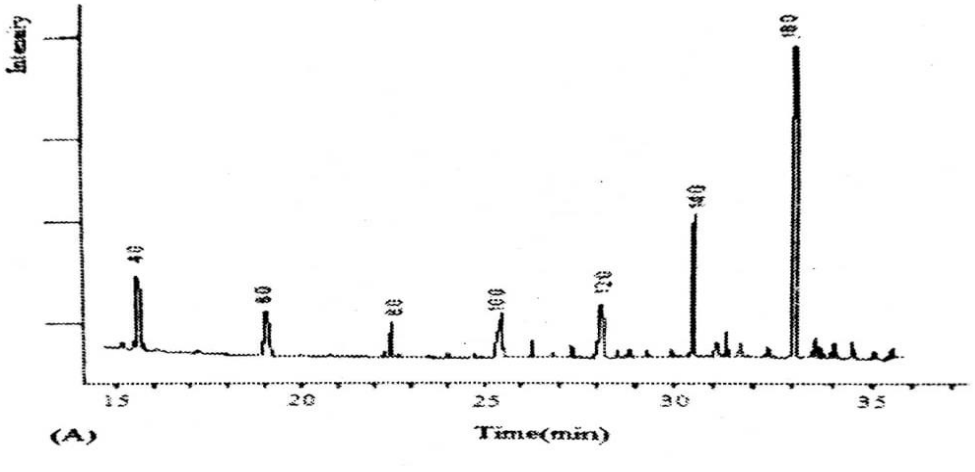
حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح p <۰/۰۵ است.

- ترکیب اسیدهای چرب روغن

جدول (۲) و نمودار (۱) ترکیب و کروماتوگرام اسیدهای چرب روغن کره را نشان می‌دهد. روغن کره دارای ۷۸ درصد اسیدهای چرب اشباع و ۱۵/۰۴ درصد اسیدهای چرب غیراشباع بود. درصد اسید چرب ترانس نیز ۵/۱ درصد بود.

جدول (۲)- پروفایل اسیدهای چرب موجود در روغن کره

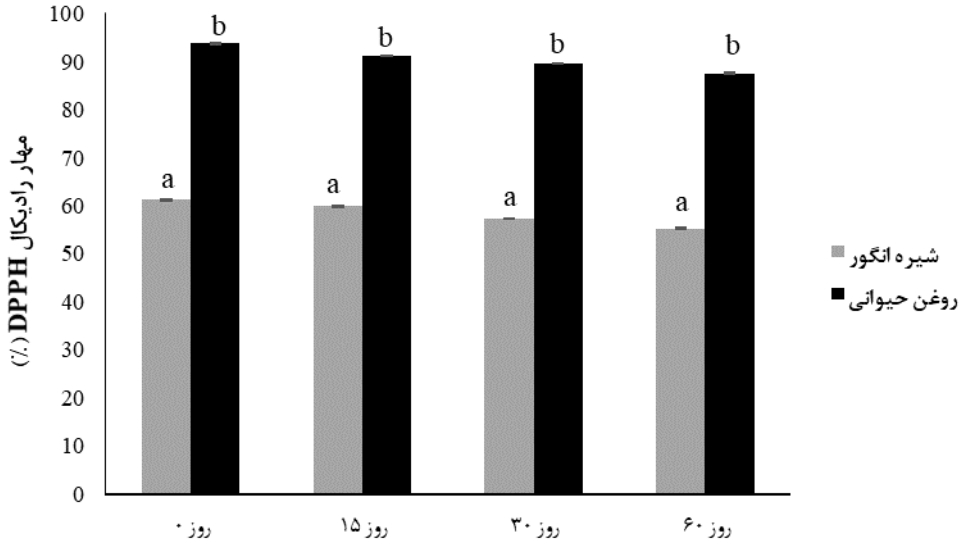
	اسیدهای چرب اشباع												اسیدهای چرب غیراشباع			
	کوتاه زنجیر			متوسط زنجیر			بلند زنجیر				ترانس					
ردیف	C4	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C20	C18:1	C18:1.T	C18:2	C18:3
۱	۸/۱	۴/۷	۳/۵	۶/۱	۶	۱۳/۲	۲۶/۳	۹/۶	۰/۵	۱۴	۵/۱	۱	۰/۴



نمودار (۱)- نمونه کروماتوگرام اسیدهای چرب روغن کره

- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی روغن کره و شیره‌انگور در نمودار (۲) نشان داده‌شده است. نتایج نشان می‌دهد که روغن کره نسبت به شیره‌انگور درصد بیشتری از رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار می‌کند. همچنین با گذشت زمان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی تغییر معناداری نشان نداده است ($p>۰/۰۵$).



نمودار (۲)- مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی روغن کره و شیره‌انگور در طی نگهداری. حروف نامشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۵$ است.

- فعالیت ضدمیکروبی

فعالیت ضدمیکروبی روغن کره و شیره‌انگور در جدول (۳) نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد فعالیت ضد باکتریایی شیره‌انگور در غلظت مشابه در مقایسه با روغن کره به طور معنی‌داری بالاتر است ($p<۰/۰۵$). قوی‌ترین اثر و بزرگترین قطر هاله عدم رشد، مربوط به *اشریشیاکلی* و سپس *استافیلوکوکوس اروئوس* در غلظت ۸ و ۱۶٪ شیره‌انگور بود ولی در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های شیمیایی کمتر بود. همچنین با افزایش غلظت، قطرهاله عدم رشد افزایش یافته است.

جدول (۳)- قطر هاله عدم رشد (میلی متر)

نمونه	غلظت	*استافیلوکوکوس اروئوس*	*اشریشیاکلی*	*انتروکوکوس فکالیس*	*سودوموناس آئروژینوزا*
شیره‌انگور	۰/۵ درصد	-	-	-	-
روغن کره	۰/۵ درصد	-	-	-	-
شیره‌انگور	۱ درصد	۰,۰±۱۲	۱۴/۰±۵/۷۱	-	-
روغن کره	۱ درصد	-	-	-	-
شیره‌انگور	۲ درصد	۰±۱۴/۰	۱۶/۰±۵/۷۱	-	-
روغن کره	۲ درصد	-	-	-	-
شیره‌انگور	۴ درصد	۰±۱۸/۰A	۰±۱۹/۰A	۱۵/۰±۵/۷۱	۱۴/۰±۵/۷۱
روغن کره	۴ درصد	۱۱/۰±۵/۷۱B	۰±۱۵/۰B	-	-
شیره‌انگور	۸ درصد	۰±۲۱/۰A	۰±۲۲/۰A	۱۷/۰±۵/۷۱A	±۵/۱۷/۷۱
روغن کره	۸ درصد	۱۳/۰±۵/۷۱B	۰±۱۸/۰B	۱۳/۰±۵/۷۱B	-

شیره‌انگور	۱۶ درصد	۰±۲۵/۰A	۲۴/۰±۵/۷۱A	۰±۲۰/۰A	۰±۲۱/۰A
روغن کره	۱۶ درصد	۱۵/۰±۵/۷۱B	۰±۲۰/۰B	۰±۱۶/۰B	۰±۱۵/۰B
آموکسی‌سیلین	۲۵ میکروگرم	–	۰±۲۳/۰	–	–
آمپی سیلین	۱۰ میکروگرم	۰,۰±۳۰	۰±۲۰/۰	۰±۱۸/۰	–
جنتامایسین	۱۲ میکروگرم	۰±۲۵/۰	۰±۲۳/۰	۰±۱۷/۰	۰±۲۰/۰

حروف نامتشابه در غلظت مشابه نشان دهنده تفاوت معنی داری در سطح $p < ۰/۰۵$ می باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که نتایج نشان داد شیره‌انگور دارای مقدار قابل‌توجهی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است. حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی-اکسیدانی در شیره‌انگور در بسیاری از تحقیقات گزارش‌شده است. با افزایش میزان شیره‌انگور در نوشیدنی فراسودمند میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد و در طی مدت‌زمان نگهداری میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی اکسیدانی روند کاهشی دارد (Jaddi *et a*l., 2018).

محققین در بررسی محتوای ترکیبات فنولی و ظرفیت ضداکسایشی در برگ، غوره، کشمش و شیره‌انگور نشان دادند که برگ در مقایسه با میوه نارس، رسیده، خشک‌شده و شیره‌انگور بیشترین محتوای فنلی و فلاونوئیدی را دارا می‌باشد و بیشترین درصد مهار رادیکال DPPH و مهار پراکسیداسیون لیپیدها در عصاره برگ مشاهده می‌شود (Poorakbar and Adeli Fard, 2016).

یافته‌های مطالعه‌ای نشان داد افزودن فرآورده‌های جانبی انگور مانند پومیس انگور به گوشت خرگوش، هیچ بهبودی در محتوای فنلی کل، ظرفیت آنتی-اکسیدانی، قدرت احیاکنندگی و اکسیداسیون لیپید در گوشت ایجاد نکرد (Bouzaida *et al*., 2022).

شیره‌انگور دارای فعالیت ویژه‌ای در مهار رادیکال DPPH بود ولی این خاصیت از روغن کره کمتر بود که احتمالاً به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای چرب کوتاه زنجیر موجود در آن می‌باشد (Tain *et al*., 2021). خاصیت آنتی‌اکسیدانی شیره‌انگور را می‌توان به حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در شیره‌انگور نسبت داد (Jaddi *et al*., 2018).

تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات فنولی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند و نقش مهمی در جلوگیری از اتواکسیداسیون روغن‌ها ایفا می‌کنند (Farokhzad et al., 2023; Kiani Aliabadi et al., 2023; Ahmadi-Dastgerdi et al., 2022). با افزایش غلظت ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی افزایش می‌یابد. همه ترکیبات فنلی ممکن است توانایی مهار رادیکال‌های آزاد یا به عبارتی فعالیت ضداکسایشی نداشته باشند. قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد به تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیبات فنلی بستگی زیادی دارد. در ترکیبات فنلی با وزن مولکولی پایین‌تر، گروه‌های هیدروکسیل راحت‌تر در دسترس قرار می‌گیرند (Mahluji *et al*., 2019).

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر نیز دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند. آن‌ها با اثرات مفیدی بر سلامت انسان مرتبط با خواص متابولیک و سیگنالینگ آن‌ها مرتبط هستند. عملکردهای فیزیولوژیکی آن‌ها به طول دم آلیفاتیک آن‌ها مربوط می‌شود و وابسته به فعال شدن گیرنده‌های غشایی خاص است. توانایی این ترکیبات طبیعی برای القای مسیرهای سیگنالینگ، شامل فاکتور مربوط به اریتروئید هسته‌ای (Nrf2)، به حفظ هموستاز ردوکس در شرایط فیزیولوژیکی کمک می‌کند. بنابراین آن‌ها ممکن است به‌عنوان عوامل تغذیه‌ای و درمانی در پیری سالم و بیماری‌های عروقی و سایر بیماری‌ها مانند دیابت، آسیب‌شناسی عصبی و سرطان عمل کنند (Tain *et al*., 2021).

در مطالعه‌ای بر روی عصاره هسته انگور مشخص شد که این عصاره گیاهی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالقوه با مهار اکسیداسیون چربی و فعالیت ضدمیکروبی در مقابل پاتوژن‌های مواد غذایی است (Hosseinzadeh and Shirazinejad, 2017). یافته‌های مطالعه‌ای دیگر نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره انگور تخمیری می‌تواند تحت تأثیر ساختارهای متفاوت اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها و همچنین مشتقات این ترکیبات باشد. به‌عنوان‌مثال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای فنولیک و مشتقات آن همانند استرها، وابسته به تعداد گروه‌های هیدروکسیل در مولکول است. این نتیجه نشان می‌دهد که نوع ترکیب فنولیک، بیشتر از مقدار آن در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارد (Sharfi Yurqanlu *et al*., 2013).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شیر و فرآورده‌های شیر عمدتاً به دلیل اسیدهای آمینه حاوی گوگرد مانند سیستئین، فسفات، ویتامین‌های A، E، کاروتنوئیدها، روی، سلنیوم در سیستم‌های آنزیمی است (Khan *et al*., 2019). همچنین، فسفولیپیدهای شیر فعالیت آنتی-اکسیدانی قابل‌توجهی را در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند، درحالی‌که فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلولی آن‌ها بسیار محدود بود (Huang *et a*l., 2020). محصولات لبنی تخمیر شده حاوی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به محصولات لبنی تخمیر نشده گزارش‌شده است (Khan *et al*., 2019).

گزارش‌شده است که ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی شیرخام، پاستوریزه و جوشانده شده به ترتیب برای گاو (۴۲,۱ ، ۴۱,۳ و ۴۰,۷ درصد) و گاومیش (۵۸,۴ ، ۵۷,۶ و ۵۶,۵ درصد) بود و فعالیت DPPH شیرخام، پاستوریزه و جوشانده به ترتیب برای گاو (۲۴,۳ ، ۲۳,۸ و ۲۳,۶ درصد) و گاومیش (۳۱,۸ ، ۳۱,۵ و ۳۰,۴ درصد) ذکر شد (Khan *et al*., 2017). فعالیت آنتی-اکسیدانی در اسید لینولئیک در شیر گاومیش و گاو به ترتیب ۱۱,۷ و ۱۷,۴ درصد ثبت شد. پاستوریزاسیون و جوشانیدن هیچ تأثیری در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شیر گاو و گاومیش نشان نداد (Khan *et al*., 2017).

پاستوریزاسیون و جوشاندن، غلظت اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه را در شیر گاو و گاومیش افزایش داد. در شیر پاستوریزه گاو و گاومیش غلظت اسیدهای چرب زنجیره کوتاه به ترتیب ۱۲/۳۵ و ۱۵/۱۱ درصد بود. در شیر جوشانده شده گاو و گاومیش غلظت اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه به ترتیب ۱۴/۴۳ و ۱۷/۲۹ درصد بود. به‌عنوان تابعی از عملیات حرارتی، اسیدهای چرب با زنجیره بلند ممکن است به اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و زنجیره متوسط تبدیل شوند

(Khan *et al.*, 2017). محققین گزارش کردند که غلظت اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و زنجیره متوسط پس از پاستوریزاسیون افزایش یافت (Wang *et al.*, 2006).

نتایج قطر هاله نشان داد که شیره‌انگور و روغن کره، سطوح متفاوتی از فعالیت ضدمیکروبی را علیه نمونه‌های باکتریایی نشان دادند و از رشد تمام گونه‌های میکروبی جلوگیری کردند اما شیره‌انگور در اکثر موارد ویژگی‌های ضدمیکروبی بهتری نسبت به روغن کره نشان داد (جدول ۲). شیره‌انگور دارای مقدار قابل-توجهی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است. حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در شیره‌انگور مسئول خاصیت ضدمیکروبی آن است. محققین نشان دادند نوشیدنی حاوی شیره‌انگور فاقد آلودگی میکروبی پس از ۹۰ روز بودند (Jaddi *et al.*, 2018).

تحقیقات نشان می‌دهد که ترکیبات گیاهی نفوذپذیری غشا را افزایش داده و ترکیبات آن‌ها در غشا حل‌شده و باعث تورم و کاهش عملکرد غشا می‌شوند. عوامل دیگری که منجر به اختلال و نقص در غشا و شکستن غشا می‌شوند شامل اختلاف pH و پتانسیل الکتریکی و تغییر در انتقال یون‌ها و یا دپلاریزاسیون، درنتیجه تغییرات ساختاری در غشا، دخالت در سیستم تولید انرژی در سلول (ATP) و جلوگیری از عملکرد آنزیم‌ها برای تولید انرژی است (Holley and Patel, 2005). به‌طورکلی فرآورده‌های گیاهی منجر به گرانوله شدن سیتوپلاسم، گسیختگی غشای سیتوپلاسمی، غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون‌سلولی و برون‌سلولی موثر در رشد میکروارگانیسم‌ها و متلاشی شدن دیواره سلولی می‌شوند. آن‌ها با نفوذ در غشا منجر به متورم شدن غشا گردیده و فعالیت آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند (Ahmadi-Dastgerdi *et al.*, 2017).

ترکیبات شیمیایی و نقش سینرژیستی که ترکیبات جزئی با سایر ترکیبات دارند تأثیر مهمی بر فعالیت‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی دارند. در بسیاری تحقیقات آمده است که فعالیت ضدمیکروبی مربوط به فلاوونوئیدهای موجود در گیاه است. ترکیبات آروماتیک و فنولیک اثرات ضدمیکروبی خود را در غشای سیتوپلاسمی با تغییر ساختار و عملکرد آن انجام می‌دهند. توانایی ترکیبات فنولی در مداخله در متابولیسم سلولی از طریق مکانیسم‌هایی مانند شکستن غشا، غیرفعال‌سازی آنزیمی و شلاته کردن فلزات است. همچنین توانایی آن‌ها در نفوذ به غشا فاکتور مهمی در مقاومت یا حساسیت سلول می‌باشند. نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی عامل مرگ سلول است. همچنین ترکیبات غیر فنولیک نیز مؤثر می‌باشند. ترپن‌ها توانایی شکستن و نفوذ به ساختار لیپیدی دیواره سلولی باکتری‌ها را دارند که منجر به دناتوراسیون پروتئین‌ها و شکستن غشای سلولی و نشت سیتوپلاسمی و تخریب سلولی و نهایتاً مرگ سلولی می‌شوند (Ahmadi-Dastgerdi *et al.*, 2017). درواقع با شناسایی ترکیبات موجود در مواد طبیعی گیاهی می‌توان به این نکته پی برد که بین ترکیبات موجود و خواص ضد میکروبی آن رابطه مستقیمی وجود دارد ولی اساساً نقش اصلی را ترکیب عمده یا شاخص بازی می‌کند.

حساس‌تر بودن باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی به دلیل وجود غشاهای خارجی

نسبت نفوذناپذیر احاطه‌کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم‌منفی (لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی) است که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضدمیکروبی حساسیت کمتری از خود نشان دهند. این غشاء خارجی انتشار مواد هیدروفوب از میان این لایه پوشاننده لیپوپلی‌ساکاریدی را محدود می‌کند. لیپوپلی-ساکاریدهای دیواره سلولی احتمالاً مانع از رسیدن ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم-منفی می‌شود. در باکتری‌های گرم‌مثبت تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب با لایه فسفولیپید دو لایه‌ای صورت می‌گیرد. این محل جایی است که این ترکیبات اثر خود را بر جای می‌گذارند. این اثر یا به‌صورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلولی رخ می‌دهد و یا اینکه ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند. علاوه بر این اختلاف در هیدروفوبیسیتی سطح سلول می‌تواند ازجمله فاکتورهای مؤثر دیگر باشد. سلول‌های گرم‌منفی سطح هیدروفوبیک‌تری دارند که توسط پروتئین‌های پورین در غشای خارجی سلول‌های گرم‌منفی منشعب شده‌اند. این امر کانال‌های بزرگی ایجاد می‌کند که عبور ترکیباتی با جرم مولکولی کم مانند ترکیبات فنولیک موجود را محدود می‌کند (Ahmadi-Dastgerdi *et al*., 2017).

در این تحقیق نشان داده شد که فرآورده‌های طبیعی مانند شیره‌انگور و روغن کره و ترکیبات آن‌ها به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب ایفاء نقش می‌کنند. حضور ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در آن سبب ایجاد ویژگی‌های آنتی-اکسیدانی و ضدمیکروبی گردید. آن‌ها سطوح مختلفی از فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی را از خود در محیط آزمایشگاهی نشان دادند. بنابراین می‌توانند به‌عنوان منبع امیدبخش جهت تأمین منابع طبیعی آنتی-اکسیدانی و ضدمیکروبی باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود واجب می‌دانند از آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد مراتب سپاسگزاری را به‌عمل آورند.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abdelhamid, A.S., Brown, T.J., Brainard, J.S., Biswas, P., Thorpe, G.C., Moore, H.J., et al., (2018). Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. Cochrane Database Systematic Review, 11: 1-528.
- Ahmadi-Dastgerdi, A., Ezzatpanah, H., Asgary, S., Dokhani, S., Rahimi, E. and Gholami-Ahangaran, M. (2019). Oxidative stability of mayonnaise supplemented with essential oil of achillea millefolium ssp millefolium during storage. Food Science and Technology, 13 (1):34-41.
- Ahmadi-Dastgerdi, A., Ezzatpanah, H., Asgary, S., Dokhani, S. and Rahimi, E. (2017). Phytochemical, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil from flowers and leaves of achillea millefolium subsp. Millefolium. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 20 (2): 395-409.

- Ahmadi-Dastgerdi, A., Fallah, N., Zokaei, M., Gholami-Ahangaran, M. (2022). The Role of Thyme (Zataria multiflora Boiss) Essential Oil as Natural Antioxidant on the Lipid Oxidation in Mayonnaise. Journal of Food Quality. 1: 1-7
- Aliyazicioglu, R., Kolayli, S., Kara, M., Yildiz, O., Sarikaya, A.O. and Cengiz, S. (2009). Determination of chemical, physical and biological characteristics of some pekmez (molasses) from Turkey. Asian Journal Chemistry, 21 (3): 2215-2223.
- Bahrami, G.H., Rahi, H. and Pyravi Vanak, Z. (1999). Change in fatty acid composition of milk products during the traditional ghee making process (Persian). The Journal of Kerman University of Medical Sciences, 7 (6): 14-19.
- Bennato, F., Di Luca, A., Martino, C., Ianni, A., Marone, E., Grotta, L., et al., (2020). Influence of grape pomace intake on nutritional value, lipid oxidation and volatile profile of poultry meat. Foods, 9 (4): 508.
- Bouzaida, M.D., Resconi, V.C., Gimeno, D., Romero, J.V., Calanche, J.B., Barahona, M., et al., (2021). Effect of dietary grape pomace on fattening rabbit performance, fatty acid composition, and shelf life of meat. Antioxidants, 10 (5), 795.
- Chang, Y.L. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal Agricultural Food Chemistry, 50 (13): 3713-3717.
- Dehghanian, S., Mortazavi, A., Nasiri, M. and Ghorbany, M. (2001). Allocation of efficient factors in production of grapes with emphasis on sustainable agriculture in the Khorasan province. Journal of Agricultural Science and Technology, 15 (2): 143-153.
- Demirözü, B., Sökmen, M., Uçak, A.,Yilmaz. and H., Gülderen, Ş. (2002). Variation of copper, iron, and zinc levels in pekmez products. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 69: 330-334.
- Donald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M. and Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry Journal, 73: 73-84.
- Ehteshami, M.J., Hadad Khodaparast, M.H. and Habibi Najafi, M.B. (2005). Modified method for production of grape juice concentrate. Journal of food science and technology research, 1: 11-17. [In Persian]
- Farokhzad, P., Ahmadi Dastgerdi, A., Tabatabeian Nimavard, J. (2023).The Effect of Chitosan and Rosemary Essential Oil on the Quality Characteristics of Chicken Burgers during Storage. Journal of Food Processing and Preservation. 1: 1-8.
- Heshmati, A., Ghadimi, S., Ranjbar, A. and Mousavi Khaneghah, A. (2020). The influence of processing and clarifier agents on the concentrations of potentially toxic elements (PTEs) in pekmez (a grape molasses-like syrup). Environmental Science and Pollution Research, 27: 10342-10350.
- Heshmati, A., Ghadimi, S., Ranjbar, A. and Mousavi Khaneghah, A . (2019a). Changes in aflatoxins content during processing of pekmez as a traditional product of grape. LWT - Food Science and Technology, 103: 178-185.
- Heshmati, A., Sadati, R., Ghavami, M. and Mousavi Khaneghah, A. (2019b). The concentration of potentially toxic elements (PTEs) in muscle tissue of farmed Iranian rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), feed, and water samples collected from the west of Iran: a risk assessment study. Environmental Science and Pollution Research, 26: 34584-34593.
- Heshmati, A., Ghadimi, S., Ranjbar, A. and Mousavi Khaneghah, A. (2020). Assessment of processing impacts and type of clarifier on the concentration of ochratoxin A in pekmez as a conventional grape-based product. LWT-Food Science and Technology, 119 (108882).
- Holley, R.A. and Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology, 22 (4): 273-292.
- Hosseinzadeh, F. and Shirazinejad, A. (2017). Investigating antioxidant and antimicrobial properties of grape seed extract and evaluating its sensory properties in sponge cake. Food Science, 85, 15, 165-178. [In Persian]

- Huang, Z., Brennan, C., Zhao, H., Guan, W., Mohan, M.S., Stipkovits, L., et al., (2020). Milk phospholipid antioxidant activity and digestibility: Kinetics of fatty acids and choline release. Journal of Functional Foods, 68 (103865): 1-9.
- Jaddi, S.Z., Ahmadi Dastgardi, A. and Shrafati Chalantari, R. (2018). Production of a beneficial drink containing Bacillus coagulans using grape juice and lemon zest, Food Hygiene, 9 (4): 33-47. [In Persian]
- Khan, I.T., Nadeem, M., Imran, M., Ayaz, M., Ajmal, M., Yaqoob Ellahi, M. and Khalique, A. (2017). Antioxidant capacity and fatty acids characterization of heat treated cow and buffalo milk. Lipids in Health and Disease, 16 (163): 1-10.
- Khan, I.T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M. Jaspal, M.H. (2019). Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. Lipids in Health and Disease, 18 (41): 1-13.
- Kiani Aliabadi, F., Ahmadi Dastgerdi, A.,Tabatabaeian Nimavard, J. (2023). The Oxidative Stability of Chia Seed Oil Enriched with Oregano (Origanumvulgare L.) and Yarrow (Achillea millefolium) Extracts. Journal of Food Quality.1: 1-6.
- Mahluji, M., Ahmadi Dastgardi, A. and Shrafati Chaleshtari, R. (2019). Investigating the antimicrobial properties of sumac ethanolic extract on the microbial population of minced meat inoculated with multi-drug resistant E. Yaftehm 22: 69-83. [In Persian]
- Mohamadi, M., Ahmad, S., Shaker, A. (2008). Industrial grape molasses production. Azerbaijan's applied research and education center. 18 pp [In Persian]
- Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J. and Willett, W.C. (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. The New England Journal of Medicine. 354 (15): 1601-1613.
- Poorakbar, L. and Adeli Fard, M. (2016) Investigating the content of phenolic compounds and antioxidant capacity in leaves, gourd, raisins and juice of red raisin grapes. Journal of Food Sciences, 6(67) 1-15. [In Persian]
- Sanchez-Alonson, I., Jimenez-Escrig, A., Saura-Calixto, F. and Borderıas, A.J. (2008). Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. LWT-Food Science and Technology, 41 (1): 42-50.
- Sharfi Yurqanlu, R., Rezad Bari, M., Alizadeh Khalidabadm M. and Pourakbar, L. (2013) Evaluation of antioxidant properties of grape pomace extract fermented with Aspergillus erizae with ultrasound pretreatment by response surface method. Food Hygiene, 4(4): 16: 55-90. [In Persian]
- Suh, S.S., Hwang, J., Park, M., Park, H.S. and Lee, T.K. (2014). Phenol content, antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mangrove plants in Micronesia. Asian extracts of selected plants. Food Chemistry, 99: 775-783.
- Tain, Y.L., Chang, S, K.C., Liao, J.X., Chen, Y.W., Huang, H.T., Li, Y.L. and Hou., C.Y. (2021). Synthesis of short-chain-fatty-acid resveratrol esters and their antioxidant properties. Antioxidants, 10 (3): 420.
- Tovakolipour, H. and Kalbasi Ashtari, A. (2012). Investigation of the rheological properties of grape juice. Quarterly Journal of Food Sciences and Industries, 40, 10. [In Persian]
- Tosun, H., Yildiz, H., Obuz, E. and Seçkin, A.K. (2013). Ochratoxin A in grape pekmez (grape molasses) consumed in Turkey. Food Additives & Contaminants: Part B. 7 (1): 37-39.
- Wang, Y., Yu, R. and Chou, C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology, 23: 128-35.
- World Health Organisation. (2021). World health organisation cardiovascular diseases. Available online: https://www.who.int/ weste rnpac ific/healt h-topics/cardi ovasc ular-diseases.
- Zipes, D.P., Libby, P., Bonow, R. and Braunwald, E. (2005). Braunwald's heart disease: A text book of cardiovascular medicine, 7th ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1141,1-5.