ارزیابی ویژگی‌های میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، درجه پروتئولیز و قدرت مهار آنزیم بازدارنده آنژیوتنسین در ماست تولید شده با آغازگرهای همراه جدا شده از ماست‌های سنتی ایرانی

مهسا سلطانی[۱]، محمد باقرحبیبی نجفی[۲*]، رضا حاجی محمدی فریمانی[۳]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

۲. استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

۳. استادیارگروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کرمان، ایران.

***نویسنده مسئول:** *habibi@um.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۶

چکیده

برای تولید ماست معیارهای متعددی مورد توجه است که انتخاب آغازگر و کمک آغازگر مناسب یکی از مهمترین این معیارها می‌باشد. هدف از این پژوهش اندازه‌گیری میزان پروتئولیز، مهار ACE، خاصیت میکروبی و آنتی‌اکسیدانی ماست تولیدشده توسط آغازگر تجاری به همراه کمک آغازگرهای بومی جداشده از ماست‌های سنتی و مقایسه آنها با نمونه کنترل بود. ابتدا با استفاده از پنج سویه *لاکتوباسیلوس لاکتیس*، دو سویه *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، یک سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *دلبروکی*، دو سویه *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* و یک سویه *ویسلا سیباریا*، ۴۰ نمونه ماست تولید شد و به مدت ۲۰ روز در دمای ۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، ماست‌های حاصل از نظر خصوصیات فیزیکوشیمیایی (pH و اسیدیته) و میکروبی، درجه پروتئولیز، خاصیت مهار ACE و خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از کمک آغازگرهای بومی به طور معنی‌داری ($P<0/05$)، موجب افزایش میزان پروتئولیز، خاصیت مهار ACE و فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها گردید. میزان پروتئولیز در ماست با افزایش زمان نگهداری تا روز پانزدهم افزایش یافت ($P<0/05$)، اما پس از آن این روند شروع به کاهش نمود. همچنین با گذشت زمان نگهداری، تاثیر مشابهی برای خاصیت مهار ACE و فعالیت آنتی-اکسیدانی مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل، نمونه‌های ماست حاوی سویه‌های *لاکتوباسیلوس لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* دارای بیشترین امتیاز از نظر خاصیت مهارکنندگی ACE (۴۷ درصد) و خاصیت آنتی اکسیدانی (۵۸ درصد) نسبت به سایر سویه‌ها بودند. در کل، آغازگرهای همراه با تاثیر زیادی که بر میزان فعالیت مهار ACE و خاصیت آنتی اکسیدانی دارند، می‌توانند برای تولید محصولات لبنی فراسودمند مورد استفاده قرار گیرند.

کلید واژه‌ها: پروتئولیز، فعالیت آنتی اکسیدانی، کمک آغازگرهای بومی، ماست، مهار ACE.

مقدمه

ماست رایج‌ترین و پرمصرف‌ترین محصول لبنی تخمیری است که به عنوان یک فرآورده سلامتی بخش نیز شناخته می‌شود (Saloff-Cost, 1995). برای تولید ماست علاوه بر آغازگر تجاری متداول می‌توان از کشت میکروبی ثانویه یا آغازگر همراه جهت تولید فراورده‌ای با خاصیت ویژه استفاده نمود (Irlinger et al., 2017). کمک آغازگرها را می‌توان با هدف خاصی از جمله تولید گاز، ایجاد رنگ یا گسترش عطر و طعم استفاده نمود بطوریکه محققان نشان داده اند که کمک آغازگرها اثر محسوسی بر طعم ماست تولیدی دارند (Hajimohammadi Farimani et al., 2016). آغازگر این امکان را فراهم می‌کند که فرآیند تولید ماست توسط باکتری‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* انجام شود. معمولا انواع ماست به عنوان یک محصول لبنی در سرتاسر جهان با کشت‌های باکتریایی تعریف شده شامل کشت آغازگر ماست یا گونه‌های *لاکتوباسیلوس* ، *بیفیدیوباکتریوم* و *انتروکوکوس* تولید می شوند (Tamim and Robinson, 2007). آغازگرهای همراه میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که یا به طور طبیعی در شیر وجود دارند یا می‌توانند به

عنوان کشت‌های میکروبی به شیر اضافه شوند. این باکتری‌ها اگر در مقادیر کافی حضور داشته باشند، اثرات مفیدی را برای مصرف کننده ایجاد می‌کنند بطوریکه مصرف شیر تخمیرشده حاوی آغازگرهای همراه می‌تواند تاثیرات بسیار مفیدی در تقویت سیستم ایمنی، کاهش فشار خون بالا و کاهش استرس داشته باشد (Beermann and Hartung, 2013). همچنین، آغازگرهای همراه با داشتن توانایی‌هایی همچون تولید ترکیبات ضد قارچی، تولید پپتیدهای فعال زیستی و خواص پروبیوتیکی پتانسیل بسیار خوبی برای استفاده در صنعت لبنیات و تولید محصولات فراسودمند دارند (Parente and Cogan, 2004).

در حوزه صنعت تولید ماست، نتایج حاصل از مطالعات نشان داده است که باکتری‌های اسید لاکتیک باعث افزایش پروتئولیز و کاهش زمان تخمیر می‌شوند (Silva et al., 2007). امروزه به طور فراوانی از باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به عنوان آغازگر همراه در تولید محصولات شیری تخمیرشده استفاده می‌شود (Zhou et al., 2019). در مطالعه‌ای توسط کورپلا و همکاران (۲۰۰۴)، تخریب پروتئین‌های شیر با پروتئینازهای جداشده از باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* منجر به تولید پپتیدهایی با خاصیت مهارکنندگی آنزیم ACE شد. این پپتیدها به طور قابل توجهی فشار خون را در موش‌های دچار فشار خون بالا کاهش دادند. همچنین، ناکامورا و همکاران (۱۹۹۵) مشاهده کردند که در شیر تخمیر شده حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، پپتیدهایی را با خاصیت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین تولید می‌کند. محققان متوجه شدند که دو تری پپتید متفاوت یعنی والیل-پرولیل- پرولین (VPP) و ایزولوسیل-پرولیل-پرولین (IPP) مسئول خاصیت مهارکنندگی آنزیم ACE می‌باشند. در مطالعه‌ای که توسط سپو و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد، نتایج نشان داد که مصرف کوتاه مدت و بلند مدت محصولات لبنی تخمیر شده حاوی VPP و IPP، تاثیرات چشمگیری بر کاهش فشار خون دارند. شوری و بابا (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای، شیر بدون چربی را با ۱۴ نوع آغازگر تجاری متفاوت تحت فرآیند تخمیر قرار دادند و سپس میزان پروتئولیز، بازدارندگی آنزیم ACE و خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ای ماست تولید شده را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آنها نشان داد که زمان انعقاد، pH و اسیدیته نمونه‌های ماست متغیر است و وابسته به نوع آغازگر مورد استفاده می‌باشد. میان آغازگرهای مورد استفاده، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (Lh-B02) بالاترین درجه از پروتئولیز و بازدارندگی آنزیم ACE را داشت. آغازگرهای *لاکتوباسیلوس کازئی* نیز بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و بیشترین میزان خاصیت مهار کنندگی یون آهن را از خود نشان دادند. پارمر و همکاران (۲۰۱۷)، ارتباط بین پروتئولیز و مهار ACE را در انواع پنیر مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاصل از بررسی آنها افزایش فعالیت مهار کنندگی آنزیم ACE را در طول دوره رسیدن پنیر نشان داد. سایتو و همکاران (۲۰۰۰)، فعالیت کپسول‌های پپتیدی تهیه شده از پنیر گودا، ادام، بلو و امنتال را در موش‌ها با فشار خون بالا مورد بررسی قرار دادند. یک نوع پپتید محلول در آب جدا شده از پنیر گودای کاملا رسیده طی هشت ماه بیشترین میزان فعالیت و تاثیر را در جهت کاهش فشار خون داشت. والدر و همکاران (۲۰۰۸)، در مطالعات خود نشان دادند که تخمیر شیر با کشت‌های تجاری، تولید ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌کند. نتایج این پژوهش نشان داد که تولید پپتیدها از طریق واکنش‌های هیدرولیتیکی بهترین تکنیک جهت تولید پپتیدهایی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر به عنوان آنتی اکسیدان‌های غذایی می باشد. کورهونن (۲۰۰۶)، بر روی میزان مهار ACE توسط پپتیدهای زیست فعال تولید شده در پنیر Manchego در بازه‌های زمانی متفاوت در طول دوره رسیدن پنیر تحقیقات جامعی انجام داد. نتایج حاصل از تحقیقات به میزان اندکی فعالیت مهارکنندگی را در ۱۵

روز اول از زمان شروع رسیدن پنیر نشان داد. لیو و همکاران (۲۰۱۰)، در مطالعات خود اثر تخمیر با دانه های کفیر را روی میزان فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH شیر گاو و شیرسویا بررسی کردند. هر دو نوع شیر پس از تخمیر با دانه‌های کفیر فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را نسبت به شیر تخمیر نشده نشان دادند که این موضوع نشان دهنده وجود برخی ترکیبات آنتی اکسیدانی در دانه های کفیر است که در طول تخمیر در شیر ایجاد شده اند. لیندمارک و مانسون (۲۰۰۰)، یک نوع ماست را با عصاره میوه های مختلف غنی کرده و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را با استفاده از روش حذف رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری کردند. مطالعات آنها نشان داد که تمام ماست های غنی شده با میوه درصد آنتی اکسیدانی بیشتری در مقایسه با ماست ساده نشان می دهند. حبیبی نجفی و همکاران (۲۰۱۸)، تاثیر افزودن ترکیبات پری بیوتیک (اینولین و فیبر گندم) و درصد چربی (۰، ۲ و ۳/۵ درصد) در ماست حاوی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* را بر میزان پروتئولیز، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین طی ۲۱ روز نگهداری در دمای ۵±۱ درجه سلسیوس بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از ترکیبات پری‌بیوتیک به طور معنی‌داری موجب افزایش ظرفیت نگهداری آب، پروتئولیز و خاصیت مهارکنندگی ACE نمونه‌های ماست گردید. چوی و همکاران (۲۰۱۲)، تاثیر افزودن *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *کرموریس* را به عنوان آغازگر در تولید دو نوع ماست مختلف بر خاصیت مهارکنندگی ACE پپتیدها بررسی کردند. قطعات پپتیدی جدا شده با توالی بتا-کازئین بیشترین خاصیت مهارکنندگی ACE را نشان دادند. اکثر این توالی‌ها دارای ویژگی‌های مشترک با دیگر پپتیدهای مهارکننده ACE بودند.

هدف از این پژوهش، انتخاب بهترین کمک آغازگر از میان ایزوله‌های بومی شامل چهار سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *لاکتیس* و یک سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *دلبروکی* است که بتوان به کمک آن ماستی با اثرات سلامتی بخش تولید کرد.

روش کار

شیر مورد نیاز این پژوهش جهت تولید ماست از مرکز تحقیق و توسعه لبنیات گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد با چربی ۳ درصد ، ماده خشک ۸/۲ درصد و پروتئین ۳/۲۲ درصد، استارتر تجاری ماست (کشت مخلوط *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، (شرکت DSM هلند)، MRS براث (کیولب کانادا)، M17 (کیولب کانادا)، آگار (مرک آلمان)، اورتو فتال دی آلدهید (PDA) (مرک آلمان)، شناساگر اورتوفتال دی آلدهید (سیگما آلدریچ آمریکا)، سدیم دو دسیل سولفات (سیگما آلدریچ آمریکا)، آنزیم ACE (سیگما آلدریچ آمریکا) ، محلول فروزین و DPPH (سیگما آلدریچ آمریکا)، بتامرکاپتواتانول (سیگما آلدریچ آمریکا) تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند.

تولید ماست

ابتدا کمک آغازگرها، در محیط کشت مایع M17 و MRS به صورت خطی کشت داده شدند و در ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شدند. پس از انجام آزمون تاییدی رنگ آمیزی گرم، کشت ذخیره از آغازگرها تهیه شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا مراحل بعدی آزمون‌ها نگهداری شدند.

برای تولید ماست، ابتدا شیر تحت دمای ۹۵-۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شد. سپس ظرف حاوی شیر در حمام آب سرد تا دمای ۴۳-۴۲ درجه سلسیوس خنک شد و پس از آن آغازگر تجاری و سویه-های میکروبی مورد نظر به میزان ۳ درصد به شیر تلقیح

شدند و مخلوط کاملا هم زده شد و در نهایت در لیوان-های ۱۰۰ میلی لیتری استریل پر شد و به گرمخانه با دمای ۴۲ درجه سلسیوس منتقل شد و تا زمان رسیدن pH به ۴/۶ نمونه ها مرتبا کنترل شدند و پس از خروج از گرمخانه به یخچال با دمای ۵ درجه سلسیوس منتقل شدند و به مدت ۲۱ روز در دمای اشاره شده نگهداری گردیدند و هر ۵ روز یکبار نمونه برداری برای آزمون‌های مورد نظر انجام شد. تمام کمک‌آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش (جدول ۱) قبلا از نظر صفات متعددی از جمله: مقاومت به آنتی‌بیوتیک، تولید آمین‌های بیوژنیک، تولید مواد معطر، تولید اگزوپلی ساکاریدها و رفتار ارگانیسم‌ها در شیر در حین تخمیر مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (Hajimohammadi Farimani et al., 2016).

جدول ۱- نمونه‌های ماست تولیدی

شماره نمونه	کد نمونه	سویه های به کار رفته در نمونه های ماست	منبع جداسازی باکتری
۱	AL_1	آغازگر تجاری +*لاکتوباسیلوس لاکتیس* (کد۷۱)	شیر توماغ
۲	AL_2	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس لاکتیس* (کد ۶۶)	ماست توماغ
۳	AL_3	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس لاکتیس* (کد ۷۳/۱)	ماست توماغ
۴	AL_4	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس لاکتیس* (کد ۷۵)	ماست توماغ
۵	AL_5	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (کد ۸۲)	ماست همزه- کانلو
۶	AL_6	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (کد ۸۷)	ماست همزه- کانلو
۷	AL_7	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس دلبروکی* (کد ۱۳۳۳)	شیر توماغ
۸	AP_1	آغازگر تجاری+*پدیوکوکوس پنتوساسئوس* (کد ۵۷)	ماست کنارخانه
۹	AP_2	آغازگر تجاری+*پدیوکوکوس پنتوساسئوس* (کد ۵۸)	ماست کنارخانه
۱۰	AV	آغازگر تجاری + *ویسلا سیباریا* (کد ۳۲)	شیر نهور
۱۱	AA	آغازگر تجاری ماست به تنهایی (نمونه کنترل)	شرکت DSM

آزمایشات فیزیکوشیمیایی ماست

اندازه گیری اسیدیته

اسیدیته بر حسب درصد اسید لاکتیک طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲ (۱۳۸۵) محاسبه شد. برای اندازه‌گیری pH نمونه‌های ماست، ابتدا pH متر (متروم، سوئیس) با استفاده از محلول‌های بافر ۴ و ۷ در دمای ۲۰ درجه سلسیوس تنظیم شد و سپس میزان pH نمونه‌ها اندازه گیری شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۵). لازم به ذکر است که آزمون اندازه گیری میزان pH نمونه‌های ماست هر ۵ روز یکبار به مدت ۲۱ روز انجام گرفت.

آنالیز میکروبی نمونه‌های ماست در زمان نگهداری

برای شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک ابتدا رقت‌های مورد نیاز از آنها تهیه شد. در مرحله دوم، جهت شمارش و بررسی زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک، میزان یک میلی لیتر از هر ۵ رقت تهیه شده توسط سمپلر داخل پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS توزیع شد و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. پس از گرمخانه گذاری، تعداد کلنی‌ها توسط کلنی کانتر شمارش شدند و نتایج آن به صورت واحدهای تشکیل دهنده کلنی در گرم نمونه (cfu/g) گزارش شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۳).

اندازه گیری درجه پروتئولیز نمونه‌های ماست با روش OPA

تهیه عصاره ماست: ابتدا ۱۰ گرم از نمونه‌های ماست با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر همگن شده و pH آن با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱ مولار روی ۴ تنظیم و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۴۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید .سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور g× ۶۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان pH سرم جدا شده با

سود ۰/۱ مولار روی۷ تنظیم شد و مجددا با همان شرایط سانتریفیوژ گردید. سپس سرم جدا و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در مرحله بعد واکنشگر (OPA، اورتو فتال دی آلدهید) تهیه شد به این صورت که ۳/۸۱ گرم دی سدیم تترابورات دکاهیدرات و ۱۰۰ میلی گرم SDS در آب دیونیزه کاملاً حل شد. سپس ۸۰ میلی گرم اورتوفتال دی آلدهید ۹۷درصد در ۲ میلی لیتر اتانول حل شده و مابقی با آب دیونیزه انتقال یافت. ۰/۲۵ میلی لیتر بتامرکاپتواتانول به این محلول اضافه شده و حجم محلول با آب دیونیزه به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. در نهایت ۰/۴ میلی لیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ نمونه‌های ماست، به ۳ میلی لیتر از محلول فوق اضافه و میزان جذب ۲ دقیقه بعد در طول موج ۳۴۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر خوانده شد. با قرار دادن جذب های قرائت شده متعلق به نمونه‌ها در معادله منحنی استاندارد اسید آمینه سرین غلظت پپتیدی بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد (Aryana and McGrew,2007).

اندازه گیری فعالیت مهارکنندگی ACE نمونه‌های ماست

تهیه عصاره ماست: مقدار ۲۰ گرم نمونه ماست در ۶۵۲۶×g برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس pH محلول رویی (سوپرناتانت) با سود ۰/۱ نرمال به ۸/۳ رسانده شد. سپس میزان خاصیت ACE-inhibitory پپتیدهای حاصله بر اساس روش کاشمن و همکاران (۱۹۷۱) با اندکی تغییرات انجام گرفت.

اندازه گیری خاصیت‌آنتی اکسیدانی با روش DPPH

تهیه عصاره ماست: ۲۵ گرم نمونه ماست با ۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و با دور ۷۵۰۰×g سانتریفیوژ گردید. میزان pH مایع رویی بر روی ۴ تنظیم گردید و مجددا سانتریفیوژ انجام شد و pH مایع رویی بر روی ۷ تنظیم شد. از این محلول برای تعیین خاصیت آنتی-اکسیدانی به روش مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH) استفاده شده است (Nielsen et al.2009).

اندازه گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی با روش مهار یون فلزی (Fe^{2+})

۱ میلی لیتر از عصاره نمونه مورد نظر با ۲ میلی لیتر آب مقطر رقیق می‌شود و ۲ میلی مول بر لیتر محلول $FeCl_2$ (۰/۱ میلی لیتر) نیز به آن اضافه می‌شود . پس از ۳ دقیقه واکنش با اضافه کردن ۵ میلی مول فروزین (۰/۲ میلی لیتر) مهار شد. در مرحله بعد به شدت تکان داده شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد سپس میزان جذب محلول حاصل، در ۵۶۲ نانومتر اندازه گیری شد. یک شاهد نیز بدون عصاره نمونه، به روش مشابه تهیه شد و (0.1 mg/ml EDTA) به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت (Alaa et al,2017).

تجزیه و تحلیل آماری

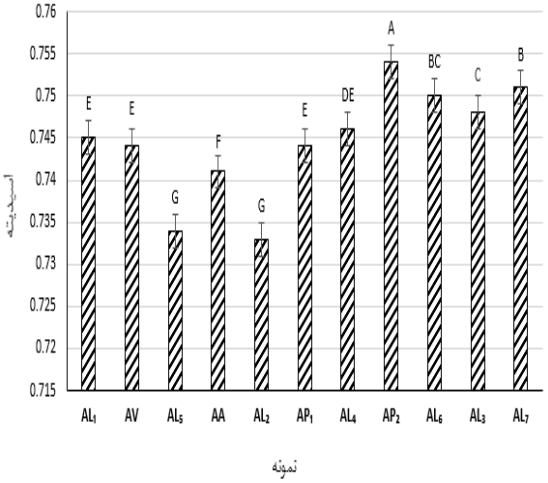
به منظور ارزیابی اثر متغیرهای اضافه شده بر ویژگی‌های مورد بررسی، پژوهش در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی در دو تکرار انجام می‌شود. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و محاسبه انحراف از معیار توسط مجذور واریانس و پذیرش معنا داری در سطح ۰/۰۵ با استفاده از نرم افزار SPSS V.9.1 انجام می‌شود و شکلها به وسیله نرم افزار EXCEL رسم می‌گردد.

نتایج

تغییرات pH و اسیدیته نمونه‌های ماست

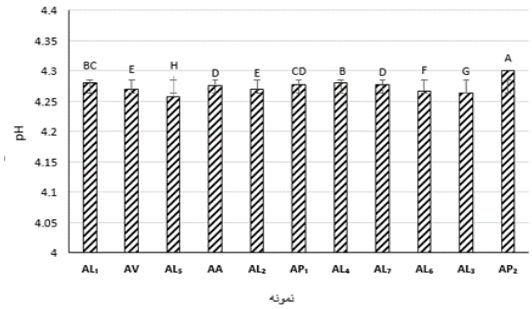
در این پژوهش، میزان pH و اسیدیته نمونه‌های ماست هر ۵ روز یکبار در زمان صفر، روز پنجم، روز دهم، روز پانزدهم و روز بیستم اندازه گیری شد. همانطور که در شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، میزان pH و اسیدیته نمونه‌ها با یکدیگر به طور معنی‌داری تفاوت داشت ($P<0/05$). همانطور که در شکلهای ۳-۴ تا ۶-۴ مشاهده می‌شود، تمام سویه‌های استفاده شده در تولید ماست باعث کاهش pH و افزایش اسیدیته نمونه‌ها در طول زمان نگهداری شدند. در این میان، سویه *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* با کد ۵۸ در مقایسه با سایر سویه‌ها

بیشترین کاهش pH و افزایش اسیدیته را در نمونه ماست نشان داد که این رویداد نشان دهنده تولید بیشترین میزان اسید لاکتیک توسط این سویه میکروبی است. به بیان دیگر نمونه ماست با کد AP_2 در طول زمان نگهداری نسبت به نمونه‌های دیگر افت pH و افزایش اسیدیته بیشتری را نشان داد. تفاوت در pH و اسیدیته بین نمونه‌های ماست تولید شده با سویه‌های متفاوت از یک گونه را می‌توان به اختلافات درون گونه ای نسبت داد.



شکل ۱: مقدار اسیدیته نمونه‌های مختلف ماست

AL_1: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد۷۱)؛ AL_2: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۶۶)؛ AL_3 :آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۳/۱)؛ AL_4: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۵)؛ AL_5: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد۸۲)؛ AL_6: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد ۸۷)؛ AL_7: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس دلبروکی (PTCC1333)؛ AP_1: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۷)؛ AP_2: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۸)؛ AV : آغازگر تجاری + ویسلا سیبارپا (کد ۳۲)؛ AA : نمونه کنترل

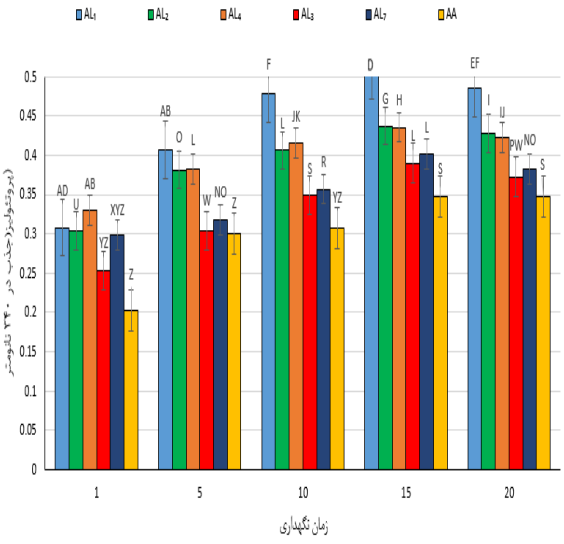


شکل ۲: مقدار pH نمونه‌های مختلف ماست

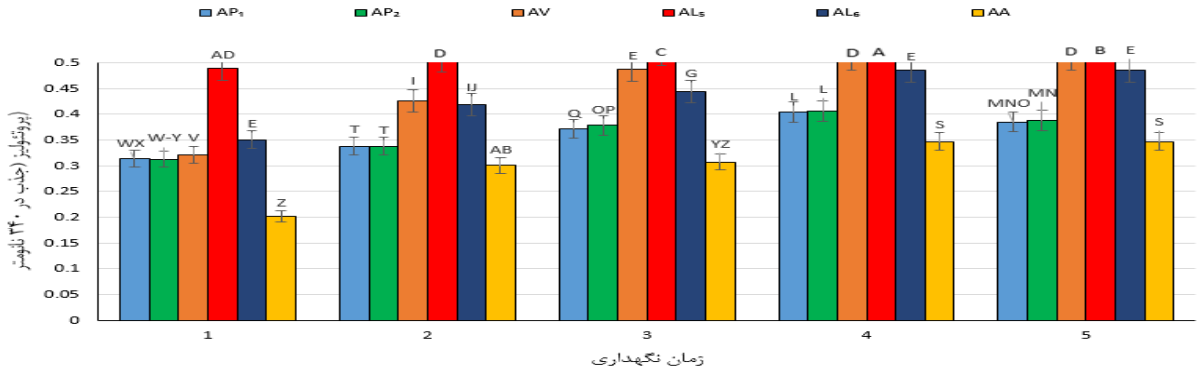
AL_1: آغازگر تجاری + لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد۷۱)؛ AL_2: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۶۶)؛ AL_3 :آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۳/۱)؛ AL_4: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۵)؛ AL_5: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد۸۲)؛ AL_6: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد ۸۷)؛ AL_7: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس دلبروکی (PTCC1333)؛ AP_1: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۷)؛ AP_2: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۸)؛ AV : آغازگر تجاری + ویسلا سیبارپا (کد ۳۲)؛ AA : نمونه کنترل

اندازه گیری میزان پروتئولیز

در این پژوهش میزان نسبی پپتیدهای تولید شده در نمونه های ماست توسط باکتری‌های اسید لاکتیک با روش اورتوفتال دی آلدهید اندازه گیری شد (Nielsen et al.2009). هرچند روش‌های مختلفی از جمله روش اولین سیو کالتیو ، تری نیترو- بنزن- سولفونیک اسید، pH-state، کلدال و اورتوفتال دی آلدهید (OPA) جهت ارزیابی پروتئولیز مورد بررسی قرار گرفته می‌گیرند؛ با این حال، OPA روشی سریع تر، دقیق تر و آسان تر از سایر روش‌ها است و دامنه کاربردی وسیع تری دارد و ضمنا روشی دقیق و حساس محسوب می‌شود (Habibi Najafi et al., 2018) نتایج بررسی پروتئولیز نمونه ها طی زمان نگهداری در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.



شکل ۳: میزان پروتئولیز نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری (گروه اول)

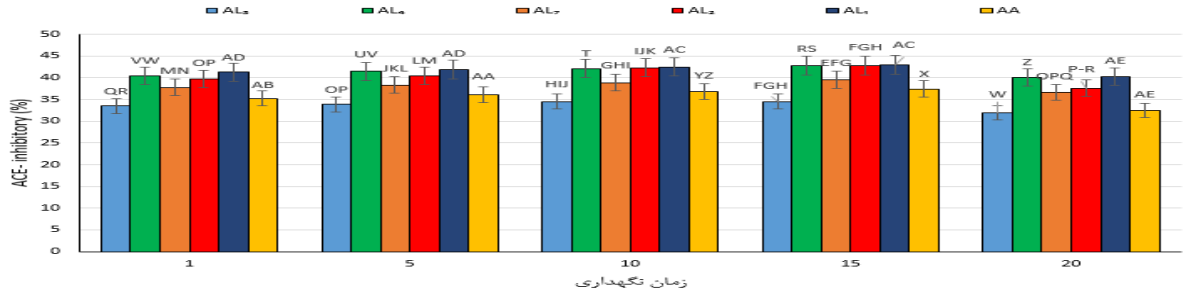


شکل ۴: میزان پروتئولیز نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری (گروه دوم)

AL۱: آغازگر تجاری + لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد۷۱)؛ AL۲: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۶۶)؛ AL۳: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۳/۱)؛ AL۴: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۵)؛ AL۵: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد۸۲)؛ AL۶: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد ۸۷)؛ AL۷: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس دلبروکی (PTCC1333)؛ AP۱: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۷)؛ AP۲:آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۸)؛ AV : آغازگر تجاری + ویسلا سیباریا (کد ۳۲)؛ AA : نمونه کنترل

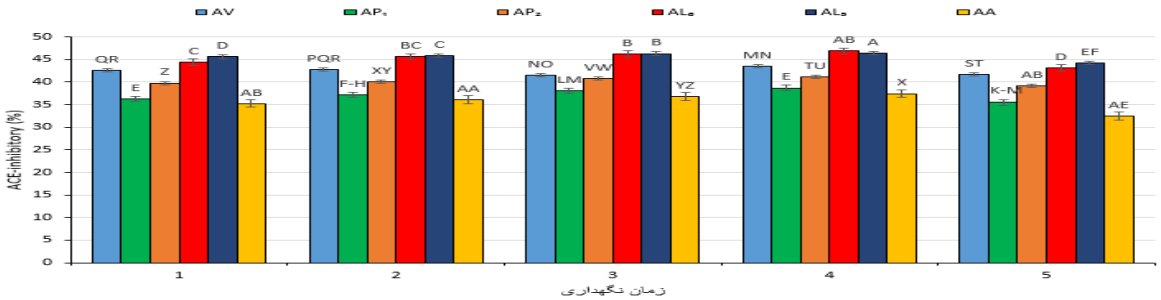
اندازه گیری میزان خاصیت مهارکنندگی ACE

شکل‌های ۵ و ۶ نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت مهارکنندگی ACE پپتیدهای حاصل از پروتئولیز نمونه‌های ماست را نشان می‌دهد.



شکل ۵: میزان ACE-inhibitory نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری (گروه اول)

AL۱: آغازگر تجاری + لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد۷۱)؛ AL۲: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۶۶)؛ AL۳ :آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۳/۱)؛ AL۴: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۵)؛ AL۵: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد۸۲)؛ AL۶: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد ۸۷)؛ AL۷: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس دلبروکی (PTCC1333)؛ AP۱: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۷)؛ AP۲:آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۸)؛ AV: آغازگر تجاری + ویسلا سیباریا (کد ۳۲)؛ AA : نمونه کنترل



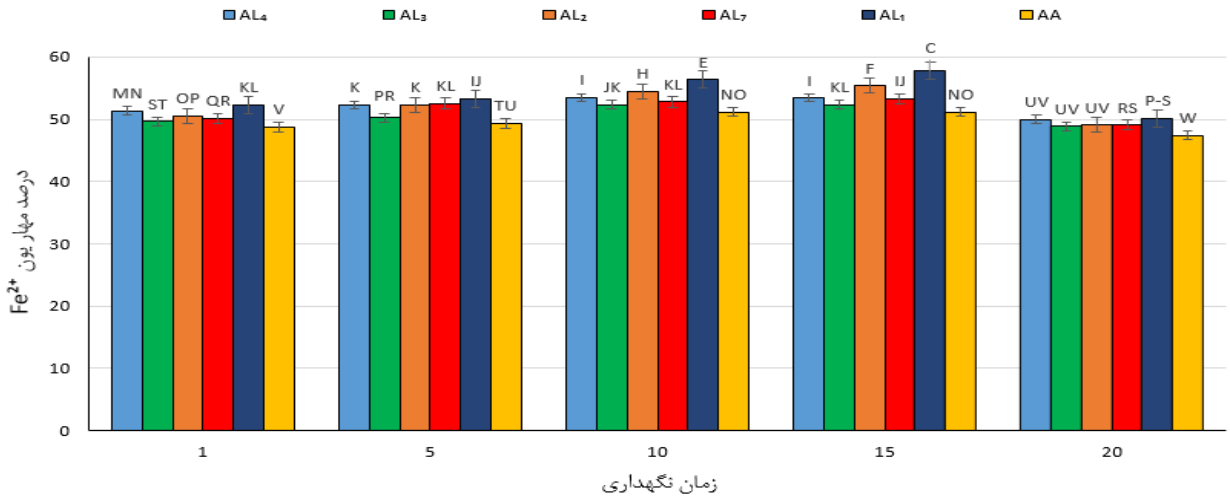
شکل ۶: میزان ACE-inhibitory نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری (گروه دوم)

AL۱: آغازگر تجاری + لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد۷۱)؛ AL۲: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۶۶)؛ AL۳ :آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۳/۱)؛ AL۴: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۵)؛ AL۵: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد۸۲)؛ AL۶: آغازگر

تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد ۸۷)؛ AL_7: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس دلبروکی (PTCC1333)؛ AP_1: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۷)؛ AP_2:آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۸)؛ AV : آغازگر تجاری + ویسلا سیباریا (کد ۳۲)؛ AA : نمونه کنترل

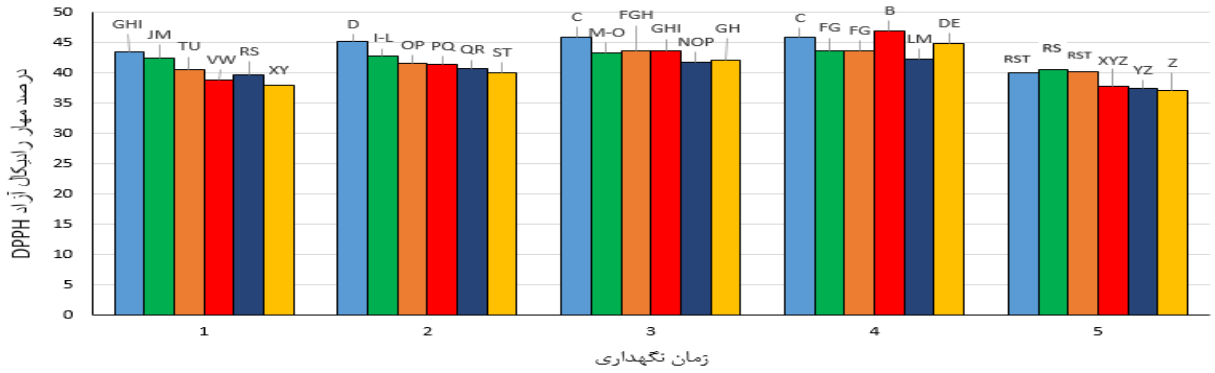
اندازه گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH

نتایج حاصل از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست توسط تکنیک DPPH در شکل‌های ۷ و ۸ نشان داده شده است.



شکل ۷: خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری با روش DPPH (گروه اول)

AL_1: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد۷۱)؛ AL_2: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۶۶)؛ AL_3 :آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۳/۱)؛ AL_4: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۵)؛ AL_5: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد۸۲)؛ AL_6: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد ۸۷)؛ AL_7: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس دلبروکی (PTCC1333)؛ AP_1: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۷)؛ AP_2: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۸)؛ AV: آغازگر تجاری + ویسلا سیباریا (کد ۳۲)؛ AA: نمونه کنترل

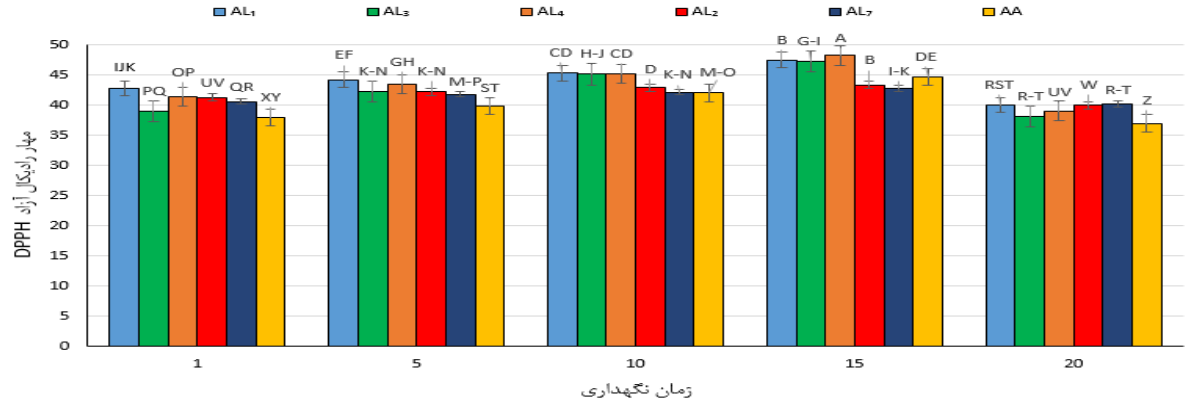


شکل ۸: خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست طی‌دوره نگهداری با روش DPPH (گروه دوم)

AL_1: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد۷۱)؛ AL_2: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۶۶)؛ AL_3: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۳/۱)؛ AL_4: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۵)؛ AL_5: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد۸۲)؛ AL_6: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد ۸۷)؛ AL_7: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس دلبروکی (PTCC1333)؛ AP_1: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۷)؛ AP_2: آغازگر تجاری+ پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۸)؛ AV: آغازگر تجاری + ویسلا سیباریا (کد ۳۲)؛ AA: نمونه کنترل

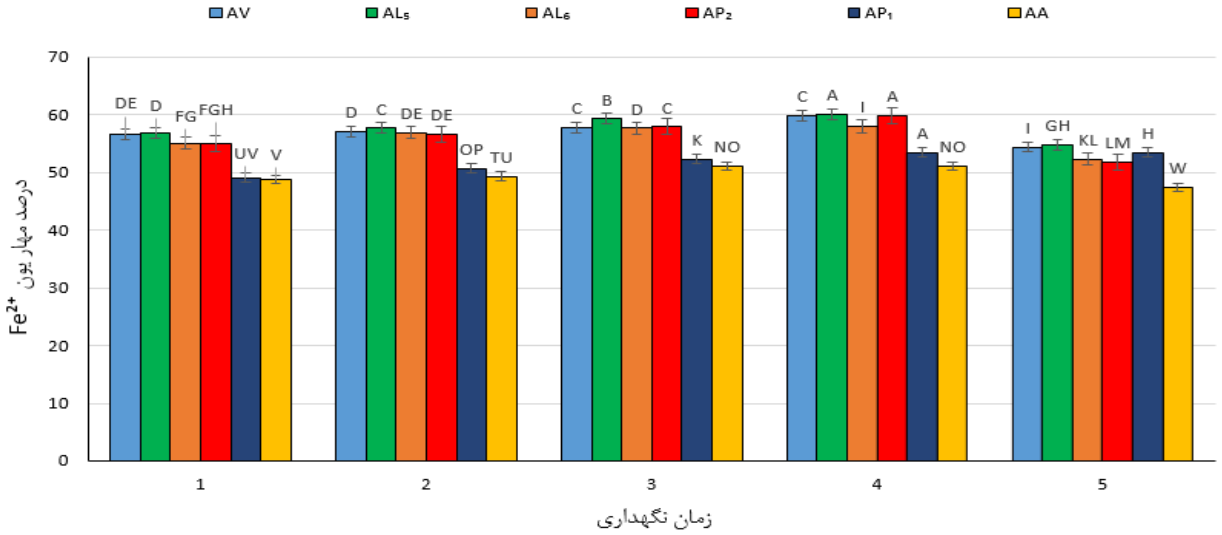
اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی با روش مهار یون فلزی

نتایج حاصل از بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های ماست توسط روش مهار یون فلزی (Fe^{2+}) در شکل‌های ۹ و ۱۰ نشان داده شده است.



شکل ۹: خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری با روش مهار یون فلزی (گروه اول)

AL_1: آغازگر تجاری + لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد۷۱)؛ AL_2: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۶۶)؛ AL_3 :آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۳/۱)؛ AL_4: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۵)؛ AL_5: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد۸۲)؛ AL_6: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد ۸۷)؛ AL_7: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس دلبروکی (PTCC1333)؛ AP_1: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۷)؛ AP_2:آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۸)؛ AV: آغازگر تجاری + ویسلا سیباریا (کد ۳۲)؛ AA : نمونه کنترل



شکل ۱۰: خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری با روش مهار یون فلزی (گروه دوم)

AL_1: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد۷۱)؛ AL_2: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۶۶)؛ AL_3 :آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۳/۱)؛ AL_4: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس لاکتیس (کد ۷۵)؛ AL_5: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد۸۲)؛ AL_6: آغازگر تجاری+لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (کد ۸۷)؛ AL_7: آغازگر تجاری+ لاکتوباسیلوس دلبروکی (PTCC1333)؛ AP_1: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۷)؛ AP_2: آغازگر تجاری+پدیوکوکوس پنتوساسئوس (کد ۵۸)؛ AV : آغازگر تجاری + ویسلا سیباریا (کد ۳۲)؛ AA : نمونه کنترل

بررسی تغییرات زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک

نتایج مربوط به بررسی روند تغییرات زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک در نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری در جدول ۲ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک در تمام نمونه‌های ماست حاوی کمک آغازگر و دو نمونه ماست شاهد با افزایش

مدت زمان نگهداری به طور معنی داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). طی دوره نگهداری، در گروه اول، بیشترین تعداد باکتری زنده متعلق به نمونه‌های AL1، AL2 و AA و کمترین تعداد باکتری زنده متعلق به نمونه AL3 بود و در گروه دوم، بیشترین تعداد باکتری زنده متعلق به نمونه‌های AV، AL6 و AA و کمترین تعداد باکتری زنده متعلق به نمونه AP2 بود

جدول ۲: زنده مانی (پرگنه × 10^6) باکتری های اسید لاکتیک طی ۲۰ روز نگهداری (log cfu/ml)

کد نمونه	زمان صفر	روز پنجم	روز دهم	روز پانزدهم	روز بیستم
AL_1	۴/۳۴±۰/۰۰ ^{d}	۴/۳۵±۰/۰۰۱ ^{c}	۴/۳۵±۰/۰۰۷ ^{gh}	۴/۳۳±۰/۰۲ ^{efg}	۴/۳۲±۰/۰۰۷ ^{jk}
AL_2	۴/۳۵±۰/۰۷ ^{c}	۴/۳۴±۰/۰۱۴ ^{ef}	۴/۳۳±۰/۰۲۱ ^{gh}	۴/۳۲±۰/۰۰۷ ^{gh}	۴/۳۱±۰/۰۰ ^{kl}
AL_3	۴/۲۳±۰/۰۰ ^{s}	۴/۲۲۹±۰/۰۰۶ ^{s}	۴/۲۲۴±۰/۰۰۸ ^{s}	۴/۲۲۱±۰/۰۰۷ ^{s}	۴/۲۲۴±۰/۰۰۵ ^{s}
AL_4	۴/۲۸±۰/۰۲۱ ^{o}	۴/۲۷±۰/۰۰ ^{p}	۴/۲۶±۰/۰۷ ^{p}	۴/۲۵۷±۰/۰۱۴ ^{q}	۴/۲۵۹±۰/۰۱۲ ^{q}
AL_5	۴/۳۳±۰/۰۰ $^{e-g}$	۴/۳۲±۰/۰۰۳ $^{i-k}$	۴/۳۰۹±۰/۰۱۳ ^{kl}	۴/۳۰۱±۰/۰۰ ^{mn}	۴/۲۸±۰/۰۰۴ ^{o}
AL_6	۴/۳۷±۰/۰۰ ^{a}	۴/۳۶±۰/۰۱ ^{b}	۴/۳۵±۰/۰۰۲ ^{b}	۴/۳۴±۰/۰۰ ^{cd}	۴/۳۳±۰/۰۳ $^{f-h}$
AL_7	۴/۳۲±۰/۰۰ $^{i-k}$	۴/۳۰۹±۰/۰۰۶ ^{lm}	۴/۳۰۲±۰/۰۰ ^{mn}	۴/۲۸±۰/۰۲ ^{o}	۴/۲۷±۰/۰۰۷ ^{p}
AP_1	۴/۲۷±۰/۰۱ ^{d}	۴/۲۵±۰/۰۰۹ ^{r}	۴/۲۴±۰/۰۰ ^{r}	۴/۲۳±۰/۰۰۶ ^{s}	۴/۲۳۲±۰/۰۰ ^{s}
AP_2	۴/۰۷۹±۰/۰۰۱ ^{t}	۴/۰۷۵±۰/۰۰۵ ^{t}	۴/۰۴۵±۰/۰۱ ^{u}	۴/۰۱۷±۰/۰۰ ^{v}	۳/۹۹±۰/۰۰۷ ^{w}
AV	۴/۳۷±۰/۰۰۳ ^{a}	۴/۳۶±۰/۰۵ ^{b}	۴/۳۵±۰/۰۱۳ ^{c}	۴/۳۴±۰/۰۰۸ ^{de}	۴/۳۲±۰/۰۱۵ ^{ijk}
AA	۴/۳۶±۰/۰۰۶ ^{b}	۴/۳۵±۰/۰۰ ^{c}	۴/۳۳±۰/۰۱۴ $^{e-g}$	۴/۳۲±۰/۰۰۳ $^{h-j}$	۴/۳۱±۰/۰۲۸ ^{kl}

حروف در هر ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵)

بحث

در ارتباط با توجیه کاهش pH و افزایش اسیدیته طی زمان ماندگاری می‌توان گفت که آغازگرهای ماست دارای فعالیت پروتئولیتیک هستند و زمانی که میزان آمینو اسیدهای آزاد و پپتیدها کم باشد، باکتری‌های اسید لاکتیک با هیدرولیز کافی پروتئین‌های شیر این نیاز را تامین می‌کنند که این عمل به نوبه خود سبب ایجاد شرایط مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌ها شده و در نتیجه افزایش در رشد باکتری‌ها موجب افزایش اسیدیته و کاهش pH می‌شود (Habibi Najafi et al., 2018). نتایج به دست آمده در ارتباط با اندازه گیری اسیدیته و pH با تحقیقات انجام شده توسط سایر محققان همخوانی داشت (Shaker et al., 2000). اسیدیته به دلیل افزایش فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم ها افزایش می یابد نتایج به دست آمده مطابق نتایج حاصل از مطالعه سرا و همکاران (۲۰۰۹) بر ویژگی‌های فیزیکی ماست همزده و قالبی طی نگهداری سرد با استفاده از هموژنیزاسیون با فشار بالا بود، آنها اظهار داشتند که اسیدیته تمامی ماست‌های هم زده و سفت با گذشت زمان طی ۲۸ روز افزایش یافت. پژوهشگران دلیل این امر را افزایش اسیدیفیکاسیون بعدی باکتری های اسید لاکتیک دانستند زیرا فعالیت آنزیمی این باکتری‌ها کاملا متوقف نمی‌شود بلکه کاهش می‌یابد (Shaker et al., 2000). کاهش pH نیز به نوبه خود از فعالیت باکتری‌های ماست طی مرحله سردکردن ناشی شده و در تقویت استحکام شبکه پروتئینی ایفای نقش می‌کند (Sieber et al., 2004).

بر اساس شکل‌های ۳ و ۴، مقدار پروتئولیز برای همه نمونه‌ها طی زمان نگهداری افزایش یافت که نشان دهنده فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک در طول دوره نگهداری می‌باشد. ماست‌های تولید شده با کد AL_1 و AL_5 در مقایسه با نمونه‌های دیگر سطوح بالاتری از آمینو اسیدهای آزاد را نشان دادند که این مسئله نشان-دهنده قدرت پروتئولیتیکی بیشتر سویه‌های *لاکتوباسیلوس لاکتیس* (کد ۷۱) و *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* (کد ۸۲) و به دنبال آن تولید اسید آمینه

بیشتر در مقایسه با نمونه‌های دیگر است. طبق نتایج به دست آمده، میزان پروتئولیز نمونه‌های حاوی کمک آغازگر در طول زمان نگهداری در مقایسه با نمونه شاهد به میزان بیشتری افزایش یافت و کمترین میزان تغییر در مدت زمان نگهداری مربوط به نمونه شاهد بود. نتایج نشان داد که تاثیر کمک آغازگرهای افزوده‌شده بر میزان پروتئولیز در مدت زمان ۲۱ روز معنی دار بود (P<۰/۰۵). این یافته ها با نتایج نیلسن و همکاران (۲۰۰۹) در خصوص افزایش مقادیر گروه‌های آمینوی آزاد طی زمان تخمیر مطابقت داشت.

بر اساس نتایج حاصل از اندازه گیری میزان فعالیت مهار ACE، در اثر هیدرولیز کازئین ابتدا روند افزایشی فعالیت بازدارندگی آنزیم ACE در تمام نمونه‌ها مشاهده شد. اما با گذشت زمان و رسیدن به حداکثر توانایی بازدارندگی، از این توانایی کاسته شده که علت آن می تواند شکست در ساختار پپتیدهای دارای خاصیت بازدارندگی ACE در زمان‌های طولانی هیدرولیز باشد که در نتیجه توانایی بازدارندگی کاهش می‌یابد (Habibi Najafi et al., 2018). طبق نتایج به دست آمده، اختلاف معناداری در میزان فعالیت مهار ACE بین نمونه‌های مختلف ماست حاوی کمک آغازگر و ماست شاهد وجود داشت (P<۰/۰۵). افزایش خاصیت مهار ACE تا روز پانزدهم در تمام نمونه‌ها وجود داشت و این روند در نمونه شاهد نسبت به نمونه‌های دیگر ضعیف تر بود که این رویداد نشان‌دهنده تاثیر گذاری سویه‌های مورد استفاده به عنوان کمک آغازگر در تولید ماست و افزایش خاصیت مهار آنزیم ACE است. در توافق با نتایج ما، ژاو و همکاران (۲۰۱۹) از باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (H9) به عنوان آغازگر همراه در مقادیر متفاوت برای تلقیح و تولید انواع ماست استفاده کردند و تاثیر آن را بر میزان فعالیت مهار ACE طی ۲۸ روز نگهداری بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که استفاده از این میکروارگانیسم به عنوان آغازگر همراه میزان فعالیت مهارکنندگی آنزیم ACE برخی نمونه های ماست را تا روز چهاردهم و تعدادی دیگر را تا روز بیست و یکم افزایش داده و پس از گذشت زمان ذکر شده، این روند دچار کاهش شده است.

پپتیدهای حاصل از پروتئولیز نمونه‌های ماست می‌توانند درجه آنتی اکسیدانی متفاوتی از خود نشان دهند که در این آزمون بررسی درصد مهار رادیکال DPPH به عنوان ملاکی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی قطعات پروتئینی حاصل از فعالیت باکتری‌های اسید لاکتیک در نظر گرفته شد. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که خاصیت آنتی اکسیدانی در همه نمونه‌های مورد آزمایش تا روز پانزدهم افزایش چشمگیری داشته است؛ در حالی که با گذشت زمان و افزایش میزان هیدرولیز تا روز بیستم از میزان این خاصیت در بعضی نمونه‌ها کم شده و در بعضی نمونه‌ها یا با تغییر بسیار جزئی همراه بوده است یا بدون تغییر ثابت مانده است. دلیل این کاهش می‌تواند مرتبط با هیدرولیز بیشتر و شکست در مناطقی از پپتیدهای زیست فعال باشد که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Habibi Najafi et al., 2018). بر اساس نتایج، روند تغییرات خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها با روش ذکرشده کاملا مشابه با نتایج به دست‌آمده توسط روش DPPH می‌باشد. در هر دو روش، میزان خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها تا روز پانزدهم افزایش یافت اما با گذشت زمان و هیدرولیز بیشتر، این روند رو به کاهش گذاشت و در بعضی موارد با گذشت زمان از روز پانزدهم تا روز بیستم میزان این خاصیت ثابت مانده و تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشت. همچنین نتایج نشان داد که روند افزایشی در میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی در تمام نمونه-های ماست حاوی کمک آغازگرها در مقایسه با نمونه شاهد به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود به طوری که اثر افزودن کمک آغازگرها در تولید ماست جهت افزایش میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی در مدت زمان نگهداری ۲۰ روز معنی‌دار شناخته شد (P<۰/۰۵). منطبق بر یافته‌های ما، الایس و همکاران (۲۰۰۸) نیز در مطالعه خود دریافتند که روند افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی در

ماست حاصل از آغازگرهای تجاری تا روز چهاردهم با افزایش همراه است؛ با این حال، بعد از روز چهاردهم، آنها مشاهده کردند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی ماست رو به کاهش است.

با کنار هم گذاشتن اطلاعات مربوط به روند تغییر pH و میزان باکتری زنده می‌توان به این نتیجه رسید که تعداد باکتری‌های زنده شمارش‌شده رابطه مستقیمی با تغییرات pH دارد. نتایج به دست آمده با یافته‌های سایر محققین مطابقت داشت (Lu et al., 2018; Krasekoopt and Tandhansku, 2016; Innocente et al., 2016;). بطوری‌که آن‌ها نشان دادند که با افزایش مدت زمان نگهداری از تعداد باکتری های اسید لاکتیک کاسته می‌شود. همچنین، هارت و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه خود روی اثر آغازگر بر قابلیت زنده مانی باکتری های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مشاهده کردند که تعداد این باکتری‌ها در تمامی نمونه های ماست طی دوره نگهداری با کاهش همراه بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد اثر افزودن سویه‌های میکروبی به عنوان کمک آغازگر به نمونه‌های ماست بر صفات مورد بررسی معنادار بوده است($p<۰/۰۵$). میزان پروتئولیز نمونه های حاوی کمک آغازگر نسبت به نمونه کنترل افزایش بیشتری داشت. همچنین افزایش زمان ماندگاری تا روز پانزدهم سبب افزایش میزان پروتئولیز، افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مهار ACE نمونه‌های ماست شد. بر اساس این نتایج تاریخ انقضای مصرف نمونه‌های ماست تولید شده با افزودن کمک آغازگر باید به پانزده روز کاهش داده شود تا بیشترین خواص سلامتی بخشی به مصرف کننده برسد طبق داده‌ها و نتایج به دست آمده ، از میان سویه‌های مختلف که به عنوان کمک آغازگر در تولید انواع ماست استفاده گردید، سویه *لاکتوباسیلوس لاکتیس* (۷۱) دارای بیشترین امتیاز از نظرخاصیت مهار ACE و خاصیت آنتی-اکسیدانی نسبت به سایر سویه ها در این محصول لبنی بود. بنابراین از این سویه به عنوان نمونه برتر می توان در تولید محصولات فراسودمند استفاده کرد.

به طور کلی با توجه به اهمیت و جایگاه محصولات لبنی در زنجیره غذایی مصرف‌کنندگان در سرتاسر جهان و پتانسیل و توانایی کافی کمک آغازگرهای مورد استفاده در ارتقای سطح سلامت مردم، استفاده از کمک آغازگرهای بومی در تولید محصولات لبنی می تواند یک راهکار بسیار مناسب در جهت تولید محصولات فراسودمند با تاثیرات سلامتی‌بخش برای عموم مصرف کنندگان باشد.

منابع

۱. حاجی محمدی فریمانی، ر. ۱۳۹۴ ، جداسازی و تعیین خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک ماست های سنتی خراسان و بررسی قابلیت های فناورانه سویه ها در تولید ماست. پایان نامه دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی فردوسی مشهد.

۲. سازمان ملی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۵. شیر و فرآورده های آن – تعیین اسیدیته و pH روش آزمون. استاندارد شماره ۲۸۵۲.

۳. سازمان ملی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۳. ماست– شناسایی میکروارگانیسم‌های پایه تولیدکننده ماست – روش شمارش کلنی در ۳۷ درجه سلسیوس. استاندارد شماره ۷۷۱۴.

4. Alaa, A.E., Sally, S., Samia, E.D., Hany, E. 2016. Angiotensin-converting enzyme inhibition and antioxidant activity of commercial dairy starter cultures. Food Sci Biotech.25:1745-1751.

5. Aryana, K.J., McGrew, P. 2007. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. LWT. 40: 1808-1814.

6. Amirdivani, S., Salihin Baba, A. 2011. Change in yogurt fermentation characteristic and antioxidant potential and in vivo

16. Korhonen, H. 2016. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. J Function Foods. 1: 177-187.
17. Korpela R., Karhunen, M-L, Mikkola, L., Jauhiainen, T., Seppo, L., Nissinen, A . 2004. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. J Human Hyperten. 18: 795-802.
18. Krasekoopt, W., Tandhanskul, A. 2016. Sensory and acceptance assessment of yogurt containing probiotic beads in Thailand. Kasetsart J. 42: 99-106.
19. Lu, Y., H. Ishikawa, Y. Kwon, F. Hu, T. Miyakawa, and M. Tanokura. 2018. Real-time monitoring of chemical changes in three kinds of fermented milk products during fermentation using quantitative difference NMR spectroscopy. J Agric Food Chem. 66: 1479–1487.
20. Lindmark-Mansson, H., Kesson, B., 2000. Antioxidative factors in milk. The British J Nutr. 84: 103-110.
21. Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen, R.J. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. BMC Genomics. 11(36).
22. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K, Okubo, A., Yamazaki, S. 1995. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. J Dairy Sci.78: 777-783.
23. Nielsen, P.M. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J Food Sci. 66(5): 642-646.
24. Nielsen, M.S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K.I., Otte, J. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. Int Dairy J 19:155–165.
25. Parente, E., Cogan, T.M. 2004. Starter cultures: general aspects. In: Fox PF (Ed). inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. Food Sci Technol. 44:1458-1464.
7. Beermann, C., J. Hartung. 2013. Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. Food Funct. 4: 185–199.
8. Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., Anand, S. 2012. Bioactive peptides in dairy products. Int J Dairy Technol.65: 1-12.
9. Cushman, D.W., Cheung, H.S.1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol. 20: 1637-1648.
10. Habibi Najafi, M.B., Fatemizade, S., Tavakoli, M. 2018. Release of proteolysis products with ACE inhibitory and antioxidant activities in probiotic yogurt containing different levels of fat and prebiotics. Int J Pept Res Ther. 19(4):275-380.
11. Hajimohammadi Farimani, R., Habibi Najafi, M.B., Fazly Bazzaz, B.S., Edalatian, M.R. Bahrami, A.R., Belen Florez, A., Mayo, B. 2016. Identification, typing and functional characterization of dominant lactic acid bacteria strains from Iranian traditional yoghurt. J Eur Food Res Technol. 242: 517-526.
13. Harte, F., Luedecke, L., Swanson, B., Barbosa-Cánovas, G.V. 2013. Low-fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. J Dairy Sci. 86:1074-1082.
14. Irlinger, F., Helinck, S., Jany, J.L. 2017. Secondary and Adjunct Cultures. Cheese Chem, Physics and Microbiol. 4: 273-300.
15. Innocente, N., Biasutti, M., Rita, F., Brichese, R., Comi, G., and Iacumin, L. 2016. Effect of indigenous *Lactobacillus rhamnosus* isolated from bovine milk on microbiological characteristics and aromatic profile of traditional yogurt. J Food Sci Technol.66:158-164.

Cheese: chemistry, physics and microbiology, 1. London: Elsevier, 123–47.
26. Parmar, H., S. Hati, A. Sakure. 2017. *In vitro* and in silico analysis of novel ACE-inhibitory bioactive peptides derived from fermented goat milk. Int J Pept Res Ther. 24: 441–453.
27. Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R. 2013. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. The American J Clinical Nutr. 77: 326-330.
28. Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P., Eyer, H. 2004. Impact of microbial cultures on conjugated linolenic acid in dairy products. A areview. J Int Dairy. 14, 1-15.
29. Shaker, R.R., Jumah, R.Y., Abu-Jdayil, B.2000. Reological properties of plain yoghurt during coagulation process: impact of fat content and preheat treatment of milk. J Food Eng. 44: 175-180.
30. Saloff-Cost, C. 1995. Fermented milks: effects on the immune system. Danone world Newsletter. 9: 2-8.
31. Silva, A.V., Papadimitriou, C.G., Mastrojiannaki, A.V., Gomes, A.M., Malcata, F.X., Alichanidis, E. 2007. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. Food Chem. 105: 647-656.
32. Shori, A.B., Baba, A.S. 2016. The influence of *Allium sativum* or *Cinnamomum verum* on cow- and camel- milk yogurts: proteolytic and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activities. J Adv Mater Res. 832: 639-643.
33. Saito, T. 2004. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from *Lactobacillus acidophilus* group and their application of functional foods. Anim Sci J. 75: 177-190.
34. Tamim, A.Y., Robinson, R.K.2007. Yoghurt: Science and Technology. 3rd ed. Woodhead Publishing. Cambridge, UK.
35. Walther, B., Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Wechsler, D. 2008. Occurrence of the angiotensin-converting enzyme inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. J Dairy Sci.91: 29-38.
36. Zhou, T., Huo R., Kwok L.Y., Li C., Mo Y., Mi Z., Chen Y.2019. Effects of applying *Lactobacillus helveticus* H9 as adjunct starter culture in yogurt fermentation and storage. J Dairy Sci. 102: 1–13.

Evaluation of microbial, antioxidant, proteolytic degree, and ACE inhibitory properties of Yogurt produced by adjunct cultures isolated from traditional Iranian Yogurts

Soltani M[1], Habibi Najafi MB[2*], Hajimohammadi Farimani R[3]

1. MSc Graduated, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kerman University, Kerman, Iran.

***Corresponding Author:** *habibi@um.ac.ir*

Received: March 25 2020 Accepted: June 26 2020

Abstract

Several factors are considered during the production of yogurt, among which selecting the accurate starter and or adjunct culture is one of the most important factors. This study was aimed to measure the degree of proteolysis, ACE-inhibitory, the microbial and antioxidant activity of yogurt produced by a commercial starter supplemented with native co-cultures isolated from traditional yogurts during a 20-days of storage. All treatments were also compared with the commercial culture as a control. Initially, five strains of *Lactobacillus lactis*, two strains of *Lactobacillus helveticus,* one strain of *Lactobacillus delbrueckii*, one strain of *Pedicucus pentosaseus*, and one strain of *Vissella sibaria* used to inoculate into 40 yogurt samples in a completely randomized factorial design with two replications. The samples were kept at 5 ˚C for 20 days and investigated for their physicochemical properties (pH and acidity), degree of proteolysis, ACE-inhibitory, microbial antioxidant activity. The results of statistical analyses showed that the application of native co-cultures was significantly increased the degree of proteolysis, ACE-inhibitory, and antioxidant activity of the samples. Our findings showed that yogurt inoculated with the native strains of *Lactobacillus lactis* had the highest scores for ACE-inhibitory and antioxidant activity. In all co-cultures, ACE-inhibitory (47%) and antioxidant activity (58%) exhibited a positive correlation with proteolysis. Our results show that co-cultures greatly affect the ACE-inhibitory and antioxidant activity, which can be used in the production of functional foodstuff.

Keywords: ACE inhibitory, Adjunct Culture, Proteolysis, Yogurt.