تأثیر اینولین بر ویژگی‌های شیر تخمیری فراسودمند تولید شده توسط سویه‌های بومی جدا شده از ماست سنتی ایران

فائزه شیرخان[a]، سعید میردامادی[b*]، مهتا میرزایی[c]، بهروز اکبری آدرگانی[d]، نیکو نصوحی[e]

[a] دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] استاد پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
[c] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[d] استاد مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
[e] استادیار گروه بیوشیمی-بیوفیزیک، دانشکده علوم نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۵/۰۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۰۲
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1401.19.3.1.6 DOI: 10.30495/JFTN.2022.62166.11142

چکیده

مقدمه: با افزایش توجه مصرف‌کنندگان به محصولات غذایی با خواص حسی مناسب و دارای اثرات سلامت بخشی، تمایل به تولید محصولات لبنی فراسودمند در سال‌های اخیر افزایش یافته است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر برای تولید شیر تخمیری فراسودمند ابتدا اثر سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* جدا شده از ماست سنتی ایران و کشت توأم دو سویه بر فعالیت ضد دیابتی شیر تخمیری بر اساس فعالیت مهارکنندگی آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز بررسی شد. سپس اینولین به عنوان یک پری‌بیوتیک مناسب و کاربردی، به میزان ۱ درصد به شیر تخمیری حاصل از ترکیب دو سویه اضافه و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ضد دیابتی، آنتی‌اکسیدانی، میزان پروتئولیز و جمعیت باکتری‌ها در طی ۱۹ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد شیر تخمیر شده بوسیله کشت توأم دو سویه باکتریایی، فعالیت مهارکنندگی بیشتری بر آنزیم‌های آلفا آمیلاز (۴۵٪) و آلفا گلوکوزیداز (۳۵٪) نسبت به سویه‌های تکی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* دارد ($p<0.05$) و افزودن اینولین باعث افزایش فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز (۲۰٪) و آلفا گلوکوزیداز (۳۳٪) در زمان پایان تخمیر شد. ترکیب دو سویه باکتریایی و اینولین در طول دوره نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بطور معنی‌داری باعث افزایش جمعیت باکتری‌ها، اسیدیته، ویسکوزیته و کاهش معنی‌دار pH و میزان پروتئولیز شیر تخمیری گردید ($p<0.05$). با این وجود در طول این زمان کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد دیابتی مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج نشان‌دهنده پتانسیل مناسب دو سویه باکتری به عنوان مایه تولید محصول تخمیری همراه با اینولین برای تولید محصول غذایی فراسودمند بود.

واژه‌های کلیدی: *اینولین، دیابت، زمان نگهداری، سویه‌های بومی، شیر تخمیری، غذاهای فراسودمند*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: mirdamadi@irost.ir

مقدمه

دیابت ملیتوس[1]، بیماری است که در اثر بالا رفتن سطح گلوکز خون ایجاد می‌شود. یکی از روش‌های درمانی برای کاهش قند خون بعد از دریافت غذا[2] بخصوص در بیماران مبتلا به دیابت نوع دوم، جلوگیری از جذب گلوکز با مهار آنزیم‌های هیدرولیز کننده کربوهیدرات مانند آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز است. مهارکننده این آنزیم‌ها هضم کربوهیدرات‌ها را به تأخیر می‌اندازند که این مسئله منجر به کاهش جذب گلوکز خون می‌شود (Liu *et al*., 2014). امروزه طراحی الگوهای درمانی جدید مورد توجه محققین قرار گرفته است. بطوری‌که پژوهشگران بر این باورند که یک رژیم غذایی مناسب حاوی پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها می‌تواند علائم دیابت را کاهش دهد (Westfall *et al*., 2018). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند، که اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارند. پری‌بیوتیک‌ها نیز ترکیبات غذایی هستند، که باعث تحریک رشد یا فعالیت میکروارگانیسم‌های مفید در بدن می‌شوند و در تغییر میکروبیوتای روده موثر می‌باشند (Valenlia *et al*., 2018). زمانیکه پروبیوتیک‌ها با پری‌بیوتیک‌ها ترکیب شوند فواید سلامتی‌بخش بیشتری را برای میزبان فراهم می‌کنند (Stijepić *et al*., 2013). برخی از اثرات مصرف پروبیوتیک‌ها در مطالعات شامل اثرات ضد چربی، ضد سرطان، تحریک‌کننده سیستم ایمنی و ضد دیابتی گزارش شده است (Widodo *et al*., 2019).امروزه خاصیت ضد دیابتی پروبیوتیک‌ها و برخی از پری‌بیوتیک‌ها از طریق مهار آنزیم‌های هیدرولیزکننده کربوهیدرات برای به تأخیر انداختن جذب گلوکز در غذاهای فراسودمند مورد توجه قرار گرفته است (Ramchandran and Shah, 2010). در این راستا شیر تخمیری بعنوان یکی از غذاهای فراسودمند در کنترل دیابت معرفی شده است (Moreno-Montoro *et al*., 2017). از سوی دیگر استفاده از سویه‌های بومی در تولید شیر تخمیری منجر به عطر و طعم مطلوب در تهیه محصول می‌گردد (Rokhtabnak *et al*., 2016). اما جایگزینی ترکیبات غذایی مانند چربی در شیرهای تخمیری با ترکیبات مختلف اغلب منجر به یک احساس دهانی خاص می‌شود که بر ذائقه مصرف‌کننده اثرگذار است. تعدادی از ترکیبات مانند پری‌بیوتیک‌ها می‌توانند بر این نقص غلبه کنند. اینولین بعنوان یکی از محبوب‌ترین پری‌بیوتیک‌ها، در این دسته از افزودنی‌های غذایی قرار دارد (Ramchandran and Shah, 2010). این پری‌بیوتیک به دلیل ماهیت تجزیه پذیر و سازگار با بدن انسان به طور گسترده‌ای به عنوان جایگزین چربی و اصلاح‌کننده بافت در محصولات غذایی استفاده می‌شود (Simsek *et al*., 2017). بیشتر مطالعات انجام گرفته در خصوص تأثیر اینولین بر خواص حسی و بافتی محصولات لبنی می‌باشد. از آنجا که اینولین پلیمری طبیعی است که توسط آنزیم‌های روده‌ای قابل هیدرولیز نمی‌باشد. بنابراین بعنوان یک فیبر رژیمی بدون کالری می‌تواند یک منبع کربوهیدراتی مناسب برای بیماران دیابتی در نظر گرفته شود (Ehsani *et al*., 2020). برخی مطالعات اثرات مفید اینولین در افراد دیابتی را به کاهش سطح گلوکز نسبت داده‌اند با اینحال مکانیسم تأثیر اینولین بر سطح گلوکز خون به خوبی مشخص نشده است (Kalyan *et al*., 2010). هر چند مطالعاتی مبنی بر خواص ضد دیابتی اینولین انجام گرفته است اما در زمینه تأثیر اینولین بر برخی از فعالیت‌های بیوشیمیایی مانند فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز، مهار رادیکال‌های آزاد و پروتئولیز مطالعات محدودی انجام گرفته است (Habibi Najafi *et al*., 2019). بنابراین با توجه به ارزش غذایی اینولین و اثرات احتمالاً مفید آن در متابولیسم کربوهیدرات‌ها (Gargari *et al*., 2013) و کاربرد سویه‌های بومی در تولید محصولات لبنی فراسودمند، هدف مطالعه حاضر تولید شیر تخمیری با پتانسیل ضد دیابتی و بررسی اثر اینولین بر ویژگی‌های شیر تخمیری فراسودمند تولید شده از سویه‌های بومی جدا شده از ماست سنتی ایران در طول دوره نگهداری بوده است.

مواد و روش‌ها

- مواد اولیه

شیر فرادما ۱/۵ درصد چربی از شرکت کاله تهران تهیه شد. مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل آنزیم آلفا آمیلاز، آنزیم آلفا گلوکوزیداز، پارا نیترو فنیل آلفا دی

[1] Diabetes Mellitus

[2] Post Prandial Hyperglycemia

گلوکوپیرانوزید، اورتوفتالدئید، دی نیتروسالیسلیک اسید، دی فنیل ۱-پیکریل هیدازیل (DPPH)، ۱و۲-آزینوبیس-۴-بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (ABTS) از شرکت سیگما آمریکا خریداری شدند. سایر مواد با درجه آزمایشگاهی از شرکت مرک آلمان و اینولین HPX (با درجه خلوص۹۹/۵٪) از نمایندگی شرکت بنئو بلژیک در ایران تهیه شدند.

- **روش‌ها**
- **سویه‌های باکتریایی و شرایط کشت**

برای پژوهش حاضر، از دو سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* (PTCC1900) و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (PTCC1930) جدا شده از محصول ماست سنتی استان خوزستان استفاده شد. فعالسازی سویه‌ها با تلقیح ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ذخیره به محیط کشت ام آر اس مایع (De Man, Rogosa and Sharpe) در شرایط میکروآئروفیل در داخل گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (Soleymanzadeh *et al*., 2016).

- **تولید شیرتخمیری**

برای تولید شیر تخمیری، ۱ میلی‌لیتر از هر کشت فعال (10^7 CFU) بر اساس شمارش سلول و سنجش میزان جذب نوری در طول موج ۶۲۰ نانومتر) به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت ام آر اس مایع اضافه شد. تیمارهای به کار رفته شامل نمونه‌های حاوی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و ترکیب این دو سویه باکتریایی بود. برای تیمار با کشت توأم دو باکتری، از میزان تلقیح یکسان (به نسبت ۰/۵ میلی‌لیتر) برای هر سویه استفاده گردید. پس از تلقیح، تمامی کشت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه قرار گرفتند. سپس کشت‌ها در g × ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (Universal، آلمان) شدند. پس از حذف مایع رویی، توده زیستی بدست آمده به ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر اضافه شد (Soleymanzadeh *et al*., 2016). پس از رسیدن pH به میزان ۳/۵، نمونه‌ها از داخل گرمخانه خارج شدند. سپس اینولین HPX (۱٪) در شرایط استریل به نمونه‌ها اضافه شد و با ورتکس به مدت ۲ دقیقه به خوبی مخلوط گردید (Demain and Solomon, 1986). پس از ارزیابی فعالیت ضد دیابتی سویه‌های مورد آزمون، سویه باکتریایی دارای بالاترین میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز به شیر تلقیح گردید و شیر تخمیری فراسودمند تولید شد. سپس اثر پری‌بیوتیک اینولین بر ویژگی‌های شیرتخمیری فراسودمند در طی دوره نگهداری بمدت ۱۹ روز در مقایسه با نمونه کنترل (فاقد اینولین) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد.

- **ارزیابی فعالیت ضد دیابتی با روش مهار آنزیمی**
- **تهیه سرم شیر تخمیری**

برای بررسی فعالیت ضد دیابتی نمونه‌های شیر تخمیری حاوی اینولین و بدون اینولین از سرم شیر استفاده گردید. برای تهیه سرم، ابتدا pH نمونه‌ها با دستگاه pH متر (Metrohm، سوئیس) در pH ایزوالکتریک (۴/۶) تنظیم شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در g × ۲۰۰۰۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و مایع رویی جدا گردید (Ayyash *et al*., 2018). برای حذف اثر pH از کربنات‌کلسیم جهت خنثی‌سازی و تعدیل pH استفاده شد (Mirdamadi *et al*., 2007).

- **روش مهار آنزیم آلفا آمیلاز**

برای سنجش مهار آنزیم آلفا آمیلاز، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۴۰۰ میکرولیتر آنزیم آلفا آمیلاز (≥5 units/mg) محلول در بافر فسفات سدیم (pH= ۶/۹) مخلوط شد سپس ۴۰۰ میکرولیتر نشاسته (۱٪) به مخلوط واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اضافه گردید. پس از آن با افزودن ۱ میلی‌لیتر معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید و قرار گرفتن نمونه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه واکنش متوقف شد. پس از رقیق‌سازی با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTeck، آمریکا) خوانده و درصد مهار مطابق رابطه (۱) محاسبه شد (Ayyash *et al*., 2018).

$$\text{درصد مهار کنندگی} = \frac{(\text{جذب نوری کنترل}) - (\text{جذب نوری نمونه} \times ۱۰۰)}{(\text{جذب نوری کنترل})} \quad \text{رابطه (۱)}$$

- **روش مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز**

برای سنجش مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز، ۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم آلفاگلوکوزیداز (≥10units/mg) محلول در بافر فسفات پتاسیم (pH=۶/۸) مخلوط شد. سپس۵۰ میکرولیتر سوبسترای پارانیتروفنیل آلفا دی گلوکوپیرانوزید (۵ میلی‌مولار) به مخلوط واکنش افزوده شد. واکنش آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد داخل گرمخانه انجام گرفت. از مخلوط واکنش بدون آنزیم به عنوان نمونه بلانک استفاده شد و جذب نوری نمونه و کنترل در طول موج ۴۰۵ نانومتر در طی زمان ۱ ساعت خوانده شد و پس از محاسبه شیب منحنی، درصد مهار مطابق رابطه (۲) محاسبه گردید (Kwon *et al*., 2006).

رابطه (۲)
$$\text{درصد مهارکنندگی} = \frac{(\text{تغییرات شیب نمونه} - \text{تغییرات شیب نمونه کنترل}) \times ۱۰۰}{\text{(تغییرات شیب نمونه کنترل)}}$$

- تأثیر اینولین بر ویژگی‌های شیر تخمیری فراسودمند در طول دوره نگهداری

- ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی

pH نمونه‌ها با استفاده از دستگاه pH متر، اسیدیته کل بر حسب لاکتیک اسید با روش تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال در مجاورت شناساگر فنل فتالئین و ویسکوزیته با استفاده از دستگاه ویسکومتر (Brokfild، آمریکا)، توسط اسپیندل شماره ۲ در ۵۰ دور در دقیقه به مدت ۵ ثانیه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در طول دوره نگهداری اندازه‌گیری شد (Boosjin *et al*., 2016).

- ارزیابی فعالیت پروتئولیتیک

میزان فعالیت پروتئولیتیک سویه باکتریایی در سرم شیر تخمیری حاوی اینولین و نمونه کنترل مطابق روش Church و همکاران (۱۹۸۳) اندازه‌گیری شد. پس از تهیه محلول شیمیایی اورتوفتالدئید (OPA)، ۱ میلی‌لیتر از محلول OPA به ۲۰ میکرولیتر از نمونه اضافه گردید. جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد و پس از قرار دادن میزان جذب در معادله استاندارد لوسین (۴-۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) فعالیت پروتئولیتیک سویه باکتریایی بر حسب میزان گروه‌های آمین آزاد در سرم شیر تخمیری محاسبه گردید (Church *et al*., 1983).

- ارزیابی جمعیت میکروبی

ارزیابی جمعیت میکروبی شیرتخمیری حاوی اینولین و نمونه کنترل در طول دوره نگهداری در محیط کشت ام آر اس آگار با روش کشت سطحی انجام شد. پس از آن به مدت ۴۸ ساعت در شرایط میکروآئروفیل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل گرمخانه قرار گرفت. تعداد کل کلنی‌ها برحسب CFU/ml Log گزارش شد (Ramchandran and Shah, 2010).

- ارزیابی خصوصیات آنتی اکسیدانی

- خاصیت آنتی اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال آزاد DPPH

برای سنجش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم شیر تخمیری حاوی اینولین، سرم شیرتخمیری بدون اینولین و نمونه کنترل (اتانول ۹۶٪) به ۲۵۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۰۰۲ درصد در اتانول) اضافه شد. سپس در مکان تاریک و دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. میزان جذب نوری محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری و میزان مهار رادیکال آزاد بر اساس رابطه (۱) محاسبه شد (Son and Lewis, 2002).

- خاصیت آنتی اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال آزاد ABTS

برای ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS، محلول ۷ میلی‌مولار از ABTS و محلول ۲/۴۵ میلی‌مولار از پتاسیم پرسولفات (۱:۱) تهیه شد و بعد از مخلوط شدن به مدت ۱۶ ساعت در مکان تاریک و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس محلول حاصل با بافر فسفات ۵ میلی‌مولار (pH=۷/۴) رقیق شد تا میزان جذب این محلول در طول موج ۷۳۴ نانومتر به ۰/۷ ±۰/۰۲ برسد. برای انجام آزمون، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها شامل سرم شیر تخمیری حاوی اینولین، سرم شیر تخمیری و بافر فسفات بعنوان نمونه کنترل با ۹۸۰ میکرولیتر از محلول ABTS مخلوط و پس از گذشت ۶ دقیقه، میزان جذب نوری محلول اندازه‌گیری شد. میزان مهار مطابق رابطه (۱) محاسبه گردید (Mukherjee *et al*., 2011).

- **تجزیه و تحلیل آماری**

برای رسم تغییرات شیب منحنی از نرم‌افزار اکسل تحت ویندوز xp استفاده شد. برای بررسی نتایج از آزمون تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس (ANOVA) و رسم نمودارها از نرم افزار گراف پد ورژن ۸ استفاده گردید. تفاوت معنی‌داری در سطح ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

- **نتایج ارزیابی فعالیت ضد دیابتی سویه‌های مورد آزمون**

نتایج میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در سرم شیر تخمیری سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و ترکیب دو سویه بعد از ۴۸ ساعت تخمیر در نمودار ۱ نشان داده شده است.

مطابق نمودار ۱ میان میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در سرم شیرهای تخمیری مورد آزمون با سرم شیر تخمیر نشده تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود ($p<۰/۰۵$). بعلاوه استفاده از *سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و ترکیب دو *سویه* باعث افزایش فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز شیر تخمیری به میزان ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درصد شد. از اینرو مطابق این یافته میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز در نمونه کشت توأم دو سویه نسبت به سویه‌های تکی (*لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*) به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p<۰/۰۵$). در بررسی مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز در سرم شیر تخمیری نیز نتایج نشان می‌دهند که شیر تخمیر شده بوسیله سویه‌های *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و ترکیب دو سویه به ترتیب توانایی مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز را به میزان ۲۶/۶، ۳۱ و ۳۵ درصد دارند. بنابراین میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا گلوکوزیداز در نمونه حاوی کشت توأم دو سویه نسبت به سویه‌های تکی (*لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*) به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p<۰/۰۵$).

- **نتایج اثر افزودن اینولین بر خاصیت ضد دیابتی سویه‌های مورد آزمون**

نتایج افزودن اینولین به شیر تخمیری آماده شده بوسیله سویه‌های مورد آزمون بر توانایی مهار آنزیم آلفا آمیلاز و آلفاگلوکوزیداز در نمودار ۲ ارائه شده است. مطابق نتایج به دست آمده افزودن اینولین به نمونه شیر تخمیر شده بوسیله ترکیب دو سویه باعث افزایش فعالیت مهار آنزیم آلفا آمیلاز شد ($p<۰/۰۵$). همچنین افزودن اینولین باعث افزایش معنی‌دار فعالیت مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز در سه نمونه شیر تخمیری مورد بررسی گردید ($p<۰/۰۵$).

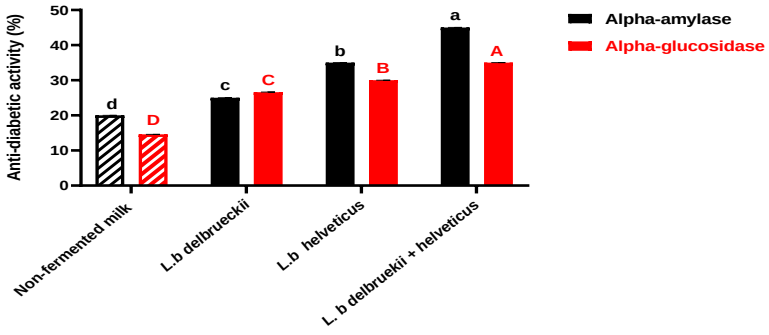

Figure 1- Anti–diabetic activity of fermented milk by *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* and co-culture of two strain after 48 h of fermentation

Different small and large letters, show a statisticaly significant between different treatments (P<0.05).

نمودار ۱- فعالیت ضد دیابتی شیر تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و کشت توأم دو سویه بعد از ۴۸ ساعت تخمیر

حروف کوچک و بزرگ متفاوت نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

- **نتایج تأثیر اینولین بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی شیر تخمیری فراسودمند در طی زمان نگهداری**

- **pH و اسیدیته**

نتایج تغییرات pH و اسیدیته در نمونه شیر تخمیری با کشت توأم دو سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به همراه پری‌بیوتیک اینولین و نمونه کنترل فاقد پری‌بیوتیک حین نگهداری در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در نمودار ۳ ارائه شده است. نتایج نشان‌دهنده کاهش pH و افزایش اسیدیته نمونه‌ها با گذشت زمان نگهداری در مدت ۱۹ روز است ($p<0/05$). همچنین مطابق نمودار میزان کاهش pH و افزایش اسیدیته در نمونه حاوی اینولین نسبت به نمونه کنترل بیشتر می‌باشد ($p<0/05$).

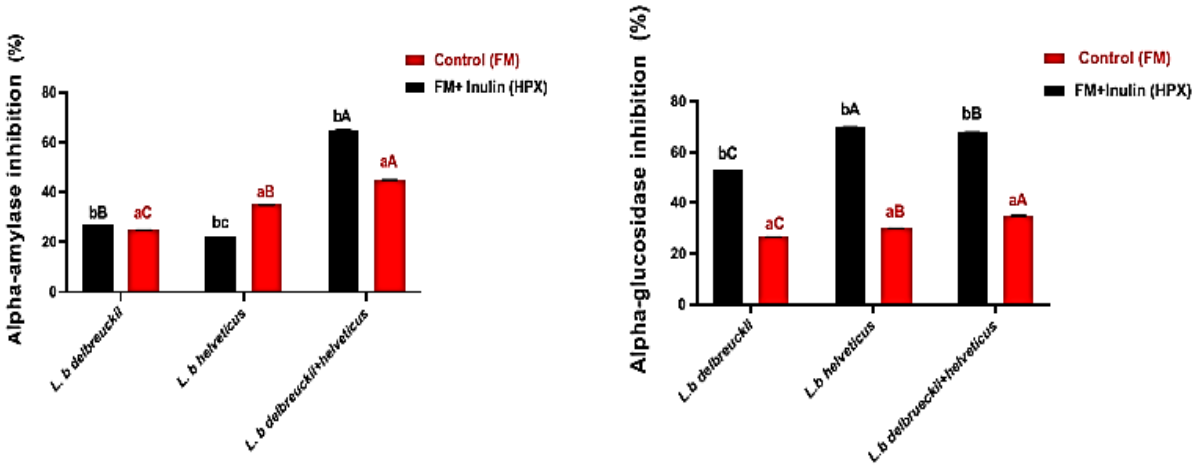

Figure 2- Effect of addition of inulin on alpha-amylase and alpha-glucosidase enzymes inhibition of fermented milk (FM) by *L.b delbrueckii, L.b helveticus* and co-culture of two strain

Small letters show statistical differences within the group of each strain and capital letters show a significant difference between groups in different treatments (P<0.05).

نمودار ۲- اثر افزودن اینولین بر مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز شیر تخمیر شده (FM) توسط *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و کشت توأم دو سویه

حروف کوچک نشاندهنده اختلاف آماری درون گروهی هر تیمار و حروف بزرگ نشاندهنده تفاوت معنی‌دار بین گروهی در تیمارهای مختلف می‌باشد ($p<0/05$).

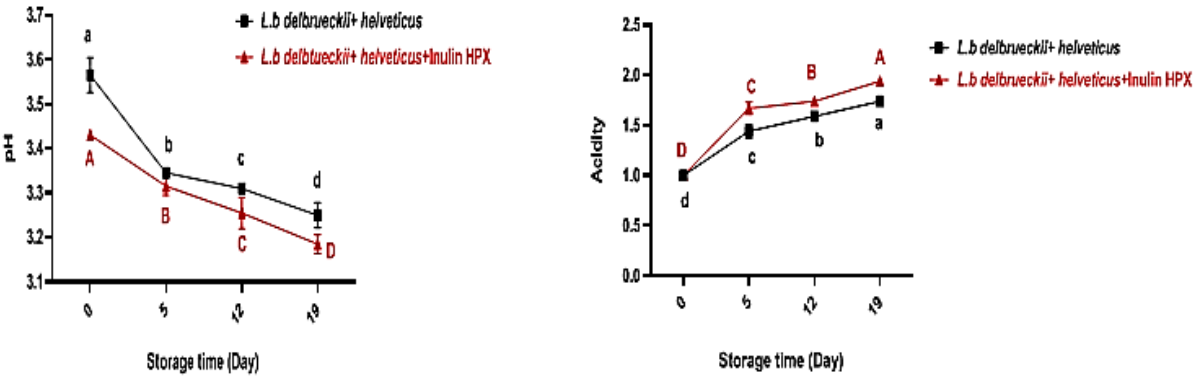

Figure 3- pH changes and acidity values of fermented milk by co-culture of *L.b delbrueckii* and *L.b helveticus* supplemented with and without inulin during the storage period at 4°C

Different small and large letters, show a statisticaly significant different between different treatments (P<0.05).

نمودار ۳- تغییرات pH و مقدار اسیدیته شیر تخمیر شده توسط کشت توأم *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* با اینولین و بدون آن در طول مدت نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

حروف کوچک و بزرگ متفاوت نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد ($p<0/05$).

- **ویسکوزیته ظاهری**

تغییرات ویسکوزیته نمونه شیر تخمیری حاوی کشت توأم دو سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *هلوتیکوس* همراه با اینولین و نمونه کنترل در طی زمان نگهداری به مدت ۱۹ روز در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر حسب سانتی پوآز در ثانیه در نمودار ۴ نشان داده شده است. مطابق داده‌ها، ویسکوزیته نمونه شیر تخمیری در محدوده ۱۵۳ تا ۲۳۵ سانتی‌پوآز قرار دارد در حالی که میزان ویسکوزیته نمونه شیر تخمیری حاوی اینولین در محدوده ۲۳۹ تا ۲۹۰ سانتی پوآز می‌باشد لذا افزودن اینولین باعث افزایش ویسکوزیته در مقایسه با نمونه کنترل شده است ($p<۰/۰۵$).

- **فعالیت پروتئولیتیک**

نتایج فعالیت پروتئولیتیک کشت توأم دو سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *هلوتیکوس* همراه با اینولین و بدون اینولین در نمونه شیر تخمیری بر اساس سنجش محتوای آمین آزاد بر حسب میزان میلی‌گرم لوسین در میلی‌لیتر در نمودار ۵ نشان داده شده است. بررسی تغییرات پروتئولیز در طی زمان نگهداری نشان می‌دهد که با گذشت زمان در نمونه شیر تخمیری حاوی اینولین و نمونه کنترل، میزان فعالیت پروتئولیتیک تا روز پنجم نگهداری افزایش دارد اما پس از آن با گذشت زمان میزان آمین آزاد کاهش می‌یابد ($p<۰/۰۵$).

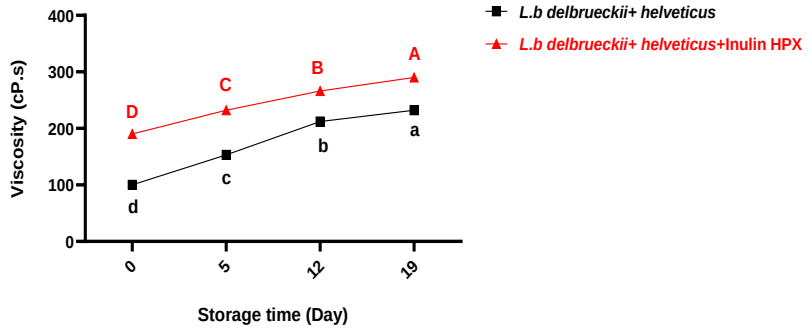

Figure 4- Viscosity changes of fermented milk by co-culture of *L.b delbrueckii* and *L.b helveticus* supplemented with and without inulin during the storage period at 4°C

Different small and large letters, show a statisticaly significant different between different treatments (P<0.05).

نمودار ٤- تغییرات ویسکوزیته شیر تخمیر شده توسط کشت توأم *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* با اینولین و بدون آن در طول مدت نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

حروف کوچک و بزرگ متفاوت نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

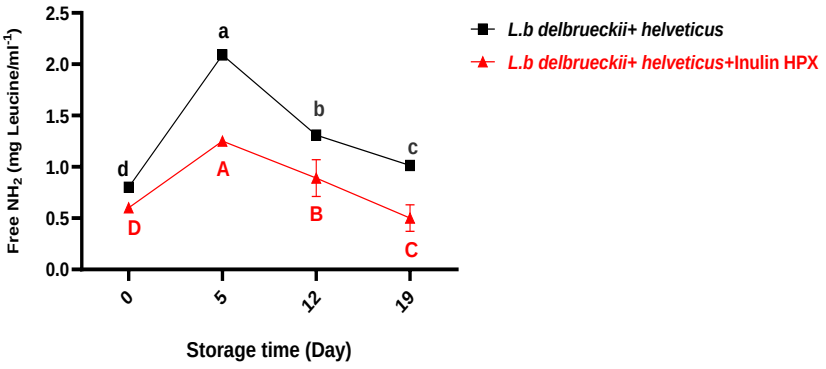

Figure 5- Changes of free amino groups of fermented milk by co-culture of *L.b delbrueckii* and *L.b helveticus* supplemented with and without inulin during the storage period at 4°C

Different small and large letters, show a statisticaly significant different between different treatments (P<0.05).

نمودار ٥- تغییرات گروه‌های آمین آزاد در شیر تخمیر شده توسط کشت توأم *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* با اینولین و بدون آن در طول مدت نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

حروف کوچک و بزرگ متفاوت نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

- نتایج تأثیر اینولین بر جمعیت میکروبی شیر تخمیری فراسودمند در طی زمان نگهداری

نتایج حاصل از تعداد جمعیت میکروبی در شیر تخمیری سویه ترکیبی *لاکتوباسیلوس دلبروکی و هلوتیکوس* با اینولین و نمونه کنترل طی دوره نگهداری در نمودار ۶ نشان داده شده است. مطابق نمودار جمعیت میکروبی از تولید تا پایان دوره نگهداری به میزان بیش از Log CFU ml^{-1} ۸ رسیده است. علاوه بر این مشاهده می‌شود تعداد باکتری‌ها در نمونه دارای اینولین نسبت به نمونه کنترل بیشتر می‌باشد ($p<۰/۰۵$). بطوری‌که افزودن اینولین منجر به افزایش قابل توجه در تعداد کل جمعیت میکروبی در شیر تخمیری از ۰/۰۳ ± ۷/۱۰ در روز صفر نگهداری به Log CFU ml^{-1} ۰/۰۴ ± ۸/۴۸ در روز نوزدهم شده است.

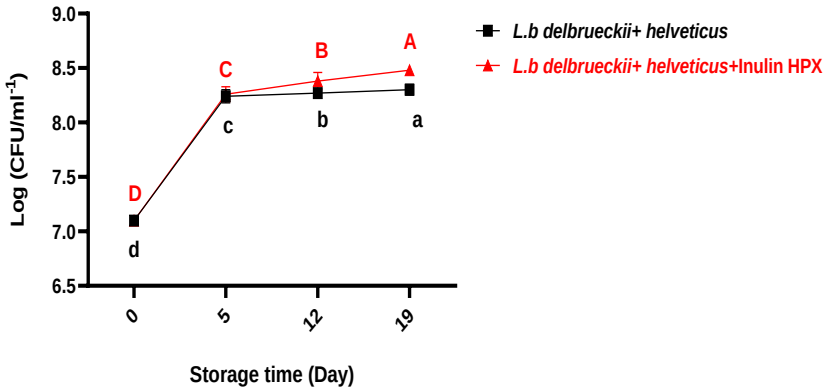

Figure 6- Cell count of bacteria in fermented milk by co-culture of *L.b delbrueckii* and *L.b helveticus* supplemented with and without inulin during the storage period at 4ºC

Different small and large letters, show a statisticaly significant different between different treatments (P<0.05).

نمودار ٦- تعداد سلول باکتری‌های شیر تخمیرشده توسط کشت توأم *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* با اینولین و بدون آن در طول مدت نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

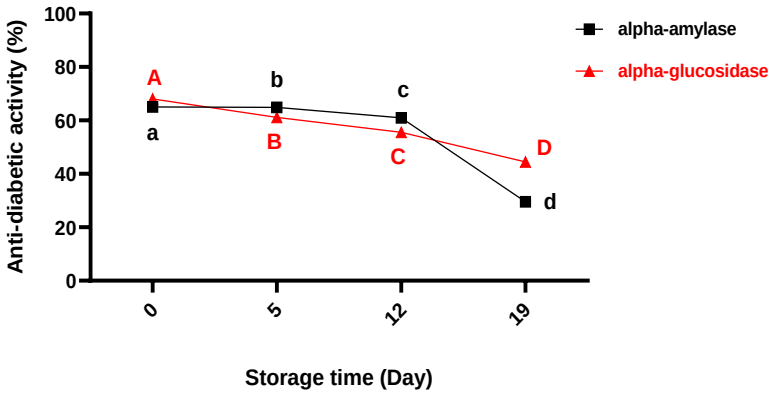

Figure 7. Anti–daibetic activity of fermented milk by co-culture of *L.b delbrueckii* and *L.b helveticus* supplemented with inulin during the storage period at 4ºC

Different small and large letters, show a statisticaly significant different between treatments (P<0.05).

نمودار ۷- فعالیت ضد دیابتی شیر تخمیر شده توسط کشت توأم *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* با اینولین در طول مدت نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

- **نتایج تأثیر اینولین بر ویژگی‌های عملکردی شیر تخمیری فراسودمند در طی زمان نگهداری**

- **ویژگی ضد دیابتی**

نتایج مهار آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در شیر تخمیرشده توسط کشت توأم دو سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی و هلوتیکوس* با اینولین در طی زمان نگهداری در نمودار ۷ ارائه شده است.

نتایج بررسی فعالیت ضد دیابتی شیر تخمیری حاوی اینولین نشان می‌دهد که اینولین به همراه ترکیبات حاصل از تخمیر شیر در کشت توأم دو سویه توانایی مهار آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز را دارد. همچنین بیشترین میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز در روز صفر نگهداری در یخچال است که با گذشت زمان کاهش می‌یابد و تفاوت معنی‌داری بین میزان مهارکنندگی نمونه‌ها در طول دوره نگهداری مشاهده می‌شود ($p<۰/۰۵$). در بررسی اثر اینولین بر فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفا گلوکوزیداز مشاهده می‌شود که بیشترین میزان مهار در نمونه دارای اینولین در روز صفر نگهداری در یخچال است و با گذشت زمان میزان مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز کاهش می‌یابد. همچنین تفاوت معنی‌داری بین میزان مهارکنندگی نمونه‌ها در طول دوره نگهداری مشاهده می‌شود ($p<۰/۰۵$).

- **ویژگی آنتی اکسیدانی**

نتایج حاصل از سنجش مهار رادیکال‌های آزاد با روش DPPH و ABTS در سرم شیر تخمیری حاوی اینولین در مقایسه با نمونه کنترل در نمودار ۸ ارائه شده است. مطابق نمودار نتایج نشان می‌دهند که افزودن اینولین با غلظت ۱ درصد بر خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه شیر تخمیری بر اساس دو مکانیسم مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و ABTS تأثیرگذار نبوده است.

بحث

- **خاصیت ضد دیابتی سویه‌های مورد آزمون**

نتایج بررسی خاصیت ضد دیابتی سویه‌های مورد آزمون (نمودار ۱) نشان داد که در میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز و آلفاگلوکوزیداز در سرم شیر تخمیری نسبت به سرم شیر تخمیر نشده تفاوت معنی‌داری وجود دارد که دلیل این یافته مرتبط با فرایند تخمیر و تولید متابولیت‌های زیستی تولید شده با توانایی مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز است. بطوریکه مطالعات نشان داده‌اند که خواص ضد دیابتی شیرهای تخمیری به طور عمده به پپتیدهای مشتق شده از پروتئین شیر مربوط می‌شود (Patil *et al*., 2015).

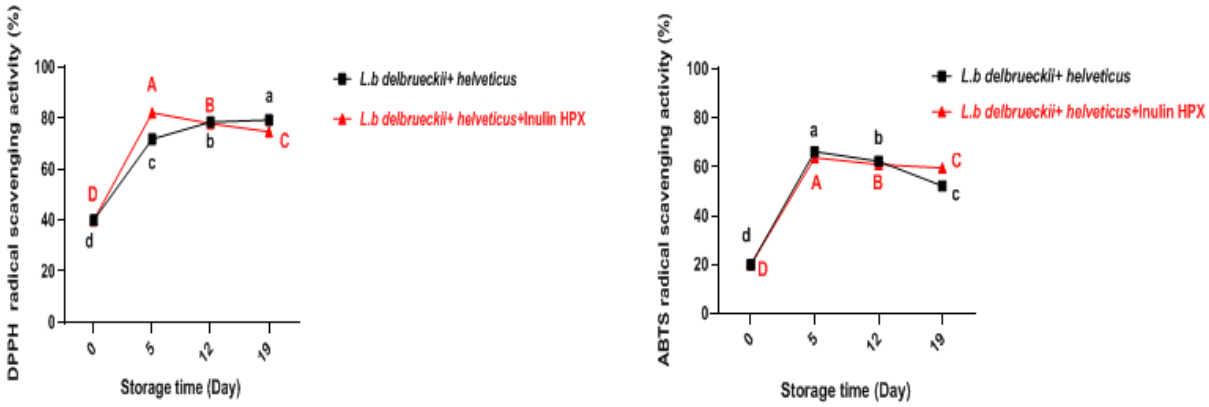

Figure 8- Anti-oxidant activity of fermented milk by co-culture of *L. b delbrueckii* and *L. b helveticus* supplemented with and without during the storage period at 4°C

Different small and large letters, show a statisticaly significant different between different treatments (P<0.05).

نمودار ۸- فعالیت آنتی اکسیدانی شیر تخمیر شده توسط کشت توأم *لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* با اینولین و بدون آن در طول مدت نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

حروف کوچک و بزرگ متفاوت نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

با توجه به افزایش میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در سرم شیر تخمیری حاوی دو سویه باکتریایی، دلیل این یافته می‌تواند ناشی از افزایش قدرت مهارکنندگی و تولید متابولیت‌های خاص در اثر ترکیب این دو سویه باشد. در بررسی و مقایسه میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در دو سرم شیر تخمیری سویه تکی *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* مشاهده شد که شیر تخمیر شده توسط سویه *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* توانایی بیشتری در مهار دو آنزیم مذکور نسبت به سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* دارد. به طور کلی مکانیسم دقیق فعالیت مهارکنندگی آنزیم‌ها ونقش متابولیت‌های مختلف تولید شده توسط باکتری‌ها در این فرایند به روشنی مشخص نیست (Panwar *et al*., 2014) و این اثر می‌تواند به تولید الیگوپپتیدها در طی فرایند تخمیر بواسطه فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک باکتری‌ها مرتبط باشد. بطوریکه تفاوت بین باکتری‌های مختلف به میزان و نوع فعالیت پروتئولیتیک آن‌ها مرتبط است (Muganga *et al*., 2015) و فعالیت بالاتر مشاهده شده در سویه *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* می‌تواند بواسطه فعالیت گسترده پروتئازی آن باشد (Han *et al*., 2018). همچنین اثر مشاهده شده ممکن است به مهار یون کلسیم موجود در آنزیم آلفا آمیلاز توسط متابولیت‌های تولید شده در طی فرایند تخمیر مربوط باشد (Liao *et al*., 2019) برخی دیگر از محققین نیز گزارش کرده اند که فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفاگلوکوزیداز ممکن است به اگزوپلی ساکاریدهای تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک مربوط باشد. (Ramchandran and Shah, 2010)

- اثر اینولین بر فعالیت ضد دیابتی سویه‌های مورد آزمون

مطابق نتایج بدست آمده مشاهده شد که اینولین باعث بهبود فعالیت مهارکنندگی آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفاگلوکوزیداز در نمونه‌های مورد آزمون شد بطوریکه افزودن اینولین به نمونه شیر تخمیر شده بوسیله ترکیب دو سویه باعث افزایش مهار آنزیم آلفا آمیلاز گردید (نمودار ۲). در زمینه مهار آنزیم آلفا آمیلاز توسط اینولین در سرم شیر تخمیری مطالعه‌ای یافت نشد. در مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز در بین سویه‌های مورد بررسی بیشترین اثر افزایشی مربوط به نمونه تخمیر شده توسط سویه *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بود که این یافته با نتایج مطالعه Ramchandran and Shah (۲۰۱۰) همخوانی دارد بصورتیکه با افزودن اینولین در غلظت یکسان به شیرهای تخمیری تفاوت در میزان مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز مشاهده شد (Ramchandran and Shah, 2010). از اینرو تفاوت در مهارکنندگی را می‌توان به نوع و کارایی سویه مورد مطالعه، ساختار و عملکرد هر آنزیم نسبت داد. در این راستا نتایج بخشی از این تحقیق نشان داد اینولین در بافر توانایی مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز را نداشت اما در شیر تخمیری بر اساس برهمکنش با متابولیت‌های تولیدی توانست آنزیم آلفاگلوکوزیداز را مهار کند (نتایج گزارش نشده است). بنابراین مطابق داده‌های بدست آمده می‌توان بیان کرد که علت اثربخشی اینولین در مهار آنزیم‌های مذکور می‌تواند با ساختار و قابلیت شکسته شدن آن توسط سویه‌های لاکتیک اسید مرتبط باشد بطوریکه اینولین به آسانی توسط انسان هضم نمی‌شود، اما می‌تواند توسط برخی از باکتری‌های روده‌ای مانند *لاکتوباسیل‌ها* و *بیفیدوباکترها* تجزیه و مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین، اینولین به عنوان یک پری‌بیوتیک شناخته شده می‌تواند رشد، فعالیت و یا هر دو را در روده بزرگ تحریک کند و در نتیجه سلامت میزبان را بهبود بخشد (Tsujikawa *et al*., 2021).

- اثر اینولین بر ویژگی‌های شیر تخمیری فراسودمند در طی زمان نگهداری

مطالعه pH و سنجش اسیدیته پس از فرایند تخمیر، بهترین معیار برای مقبولیت فرآورده‌های لبنی در طول دوران نگهداری و منعکس‌کننده رفتار متابولیکی میکروارگانیسم‌ها است (Baba *et al*., 2014). مطابق داده‌های بدست آمده مبنی بر کاهش pH و افزایش اسیدیته در طول دوره نگهداری مشاهده شد که با وجود دمای پایین نگهداری (۴ درجه سانتی‌گراد) تولید اسید در طی نگهداری در تمام نمونه‌ها ادامه دارد (نمودار ۳). و مقادیر اسیدیته بالاتر در نمونه‌های حاوی اینولین می‌تواند به دلیل متابولیسم ترکیبات پلی‌فروکتان اینولین توسط باکتری‌های پروبیوتیک باشد که منجر به تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره نظیر پروپیونیک اسید، بوتیریک اسید، لاکتیک اسید و استیک اسید می‌شود (Donkor *et al*.,

2006). در مطالعه Nikmaram و همکاران (۲۰۱۵) کاهش pH در نمونه دوغ پروبیوتیک حاوی اینولین در طی دوران نگهداری مشاهده شد (Nikmaram *et al*., 2015). در حالی که مظلومی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که اضافه نمودن اینولین بر اسیدیته و pH نمونه‌های ماست پروبیوتیک کم چرب، اثر معنی‌داری ندارد (Mazloumi *et al*., 2011). Guven و همکاران (۲۰۰۵) نیز با افزودن اینولین اثر معنی‌داری بر مقادیر pH در نمونه‌های ماست بدون چربی مشاهده نکردند (Guven *et al*., 2005). لذا تفاوت در زمینه اثرگذاری اینولین بر ویژگی‌های شیمیایی نمونه‌های مورد بررسی در مطالعات می‌تواند به سویه آغازگر، نوع و درجه پلیمریزاسیون اینولین و نمونه مورد آزمون مرتبط باشد.

ویسکوزیته بیانگر مقاومت داخلی سیال در برابر جریان است. در مورد اثر پری‌بیوتیک اینولین بر ویسکوزیته مشاهده شد که افزودن اینولین باعث افزایش ویسکوزیته در طول دوره نگهداری گردید (نمودار ۴) که این اثر را می‌توان به شبکه ژلی تشکیل شده توسط اینولین و خاصیت هیدروکلوئیدی آن نسبت داد (Shahdadi and Ezzati, 2020; Wihansah *et al*., 2018). همچنین از آنجایی که جهت افزایش ویسکوزیته و حالت ژل شدن وجود محیط اسیدی ضروری است و شیر تخمیری هم یک محیط اسیدی است بنابراین با ژل ایجاد شده توسط اینولین در محصول، افزایش ویسکوزیته در شیر تخمیری منطقی بنظر می‌رسد. علاوه بر این افزایش ویسکوزیته نمونه‌ها طی دوره نگهداری می‌تواند مرتبط به فعالیت باکتری‌های تخمیر کننده باشد. بطوریکه طبق گزارشات قبلی ویسکوزیته می‌تواند تحت تأثیر روش‌های فرآوری، نوع کشت‌های اولیه، عملیات حرارتی، ترکیب فرمولاسیون قرار گیرد. افزایش اسیدیته و زمان نگهداری نیز از دلایل افزایش ویسکوزیته در نمونه شیر تخمیری گزارش شده است (Handaka *et al*., 2017). در این زمینه Astawan و همکاران (۲۰۱۲) تغییرات ویسکوزیته در نمونه‌های ماست را به آبرسانی پروتئین و تراکم ساختار ژلی ماست در طول دوره نگهداری نسبت دادند (Astawan *et al*., 2012). نتایج تحقیق حاضر نیز تأیید کننده نقش زمان نگهداری و افزایش اسیدیته بر ویسکوزیته محصول تولیدی بود. علاوه بر این مطابق نظر محققین اگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند به عنوان یک قوام دهنده باعث افزایش ویسکوزیته شوند (Mashayekh *et al*., 2009).

فعالیت پروتئولیتیک توسط باکتری‌های اسید لاکتیک مهمترین فرایند شیمیایی در حین تخمیر و نگهداری می‌باشد (Thakkar *et al*., 2018). در بررسی میزان پروتئولیز در نمونه شیر تخمیری طی دوره نگهداری مشاهده شد که میزان فعالیت پروتئولیتیک تا روز پنجم نگهداری افزایش داشت ولی پس از آن میزان آمین آزاد در نمونه کاهش یافت (نمودار ۵). این در حالی است که در مطالعه Ayyash و همکاران (۲۰۱۸) میزان پروتئولیز در هر دو نوع شیر تخمیر شده گاو و شتر در طی زمان نگهداری به مدت ۲۱ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد افزایش داشت (Ayyash *et al*., 2018). در این زمینه برخی از محققین معتقدند که کاهش میزان آمین آزاد می‌تواند بدلیل مصرف شدن ترکیبات پپتیدی یا اسیدهای آمینه توسط سلول‌های زنده جهت رشد سلولی (Loghman *et al*., 2019) و یا آگلوتینه شدن پروتئین‌ها و پپتیدها در pH های اسیدی باشد که بصورت رسوب از سرم جدا می‌گردد و در واقع علت کاهش فعالیت ظاهری پروتئولیتیک، عدم وجود بستر و سوبسترای مناسب و غیرفعال شدن آنزیم در شرایط نامناسب pH برای میکروارگانیسم‌ها در طی زمان نگهداری می‌باشد (Donkor *et al*., 2005). همچنین در شیر تخمیری بدون حضور اینولین میزان فعالیت پروتئولیتیک سویه‌ها بیشتر بود و از آنجایی که اینولین باعث کاهش pH و افزایش اسیدیته در طول زمان نگهداری شده است بنابراین کاهش هیدرولیز ممکن است بخاطر تغییرات اسیدیته بوده باشد. نتایج مطالعه شاکریان و همکاران (۲۰۱۴) مبنی بر کاهش فعالیت پروتئولیتیک در حضور اینولین با غلظت ۱ درصد نسبت به نمونه ماست پروبیوتیک به عنوان کنترل، این یافته را تأیید می‌کند (Shakerian *et al*., 2014) در حالی که در مطالعه حبیبی نجفی و همکاران (۲۰۱۹) افزایش میزان پروتئولیز در نمونه ماست تخمیر شده توسط سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* حاوی اینولین (۰/۳ و ۰/۵ درصد) نسبت به نمونه کنترل گزارش شده است (Habibi Najafi *et al*., 2019). از اینرو مطابق نتایج حاضر نه تنها نوع اینولین، بلکه میزان اینولین، نوع میکروارگانیسم تخمیرکننده، نوع شیر، بر نتایج به دست

آمده در تحقیقات مختلف موثر بوده است (Ayyash *et al*., 2018; Ramchandran and Shah, 2010).

در ارزیابی جمعیت باکتریایی سویه با کشت توأم دوسویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *هلوتیکوس* نتایج حاصل مبنی بر افزایش تعداد سلول باکتری در طول فرایند نگهداری (نمودار ۶) با نتایج تغییرات pH و اسیدیته در طول همان زمان مطابقت داشت و مشاهده شد که جمعیت باکتری‌ها در حضور اینولین افزایش یافت که این یافته با نتایج پژوهش قصاب نژاد و همکاران (۲۰۱۹) مبنی بر افزایش جمعیت باکتری‌های کفیر تولید شده از شیر گاومیش در حضور اینولین (۱،۰/۵ و ۱/۵ درصد) در طول دوره نگهداری بمدت ۱۵ روز در دمای ۴ تا ۶ درجه سانتی‌گراد همخوانی دارد (Ghasab nezhad *et al*., 2019). و دلیل توانایی رشد سویه‌ها در حضور اینولین می‌تواند به تولید آنزیم‌های خارج سلولی مربوط باشد بطوریکه می‌توانند فروکتان‌های زنجیره بلند را هیدرولیز کنند (Ramchandran and Shah, 2010). این در حالی است که Donkor و همکاران (۲۰۰۷) در زمینه تأثیر اینولین در ماست حاوی اینولین حاوی غلظت‌های ۱،۰/۵ و ۱/۵ درصد به مدت ۲۸ روز نگهداری در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده کردند که اگرچه اینولین قابلیت زنده‌ماندن پروبیوتیک‌ها را در حین نگهداری افزایش نداد، اما اثر قابل توجهی در عملکرد رشد اولیه پروبیوتیک‌ها داشت و دلیل این یافته به اثرگذاری نوع سویه بر زنده‌مانی عنوان شد (Donkor *et al*., 2007). افزون بر این، اینولین با بهبود بافت محصول در طی دوره نگهداری از افت قابل توجه تعداد سلول‌ها ممانعت می‌کند، بطوریکه پری‌بیوتیک‌های قابل متابولیزه شدن مانند پری‌بیوتیک‌های مشتق شده از فروکتان می‌توانند متابولیسم باکتری‌های اسید لاکتیک را (بدلیل افزایش سطح فروکتوز آزاد شده از هیدرولیز پری‌بیوتیک‌ها) افزایش داده و به عنوان یک منبع کربن و انرژی اضافی مصرف و مانع افت تعداد سلول شوند (Mishra and Mishra, 2018). لازم بذکر است روش‌های تیمار و فرایند تخمیر نیز می‌توانند در تغییر تعداد سلول باکتری موثر باشند. در مطالعه حاضر پری‌بیوتیک اینولین جهت حفظ خصوصیات زیستی بعد از فرایند تخمیر به نمونه اضافه شد لذا علت افزایش تعداد باکتری در حضور اینولین می‌تواند به علت مصرف مقادیری از اینولین در زمان نگهداری در دمای پایین ۴ درجه سانتی‌گراد توسط باکتری‌ها باشد. مروری بر مطالعات نیز حاکی از اثرگذاری اینولین بر روی رشد و فعالیت‌های بیوشیمیایی برخی از سویه‌های انتخابی است. بطور نمونه Shah and Ramchandran (۲۰۱۰) نشان دادند که در شیر خشک بازسازی شده همه *لاکتوباسیل*‌های مورد ارزیابی به جزء *لاکتوباسیلوس ترموفیلوس* توانستند در حضور اینولین اسیدهای آلی بخصوص اسید لاکتیک تولید کنند (Ramchandran and Shah, 2010). در این زمینه Oliveira و همکاران (۲۰۱۱) کاهش محتوای اینولین را در طی ۳۰ روز نگهداری در سرما تا حدود ۴۰ درصد از مقدار اولیه نشان دادند و ثابت کردند اینولین توسط سویه مصرف شده است (De Souza Oliveira *et al*., 2011) که این یافته با مطالعه حاضر هم راستا می‌باشد بصورتیکه تخمیر مداوم و آرام باکتری‌های اسید لاکتیک در طی نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش در تعداد سلول شده است.

در بررسی خاصیت ضد دیابتی نمونه شیر تخمیری در طول دوره نگهداری نتایج حاکی از این بود که پری‌بیوتیک اینولین اثر محافظتی مناسبی بر ترکیبات مهارکننده آنزیم آلفا آمیلاز مورد بررسی در طی دوران نگهداری داشت یا در کنار آن‌ها این اثر را تشدید می‌نماید بصورتیکه اثر محافظتی در ماتریس مواد غذایی ممکن است مربوط به شبکه ژلی سه بعدی ایجاد شده توسط اینولین باشد (Bedani *et al*., 2013). همچنین نتایج نشان دادند که میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در طول دوره نگهداری کاهش یافت (نمودار ۷) بصورتیکه مطابق مطالعات علل کاهش میزان مهار آنزیم‌های مذکور در طول دوره نگهداری را می‌توان به تغییرات pH، اسیدیته، غلظت پری‌بیوتیک، تولید اسید لاکتیک، نوع سویه باکتریایی، قابلیت تولید اگزوپلی‌ساکارید و رشد سلول عنوان نمود. در این راستا در مطالعه انجام شده توسط Ramchandran and Shah (۲۰۰۹) مشاهده شد که میزان مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز در نمونه شیر تخمیر شده با سویه *لاکتوباسیلوس ترموفیلوس* با توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید حاوی اینولین (۳٪) طی دوران نگهداری تا روز هفتم افزایش داشت و پس از آن ثابت ماند که دلیل آن می‌تواند تولید متابولیت‌های اسیدی مانند اسید لاکتیک باشد

(Ramchandran and Shah, 2009). در این زمینه Zheng و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش کرده‌اند که فعالیت آنتی اکسیدانی، آنتی هایپرگلایسمی و ضد فشارخونی با محتوای اسید لاکتیک در ارتباط است (Zheng *et al*., 2014). از سوی دیگر مشاهده شد نمونه شیر تخمیر شده با سویه *لاکتوباسیلوس ترموفیلوس* فاقد توانایی اگزوپلی‌ساکارید حاوی اینولین (۳٪) تا روز بیست و یکم توانایی مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز را نداشت ولی بعد از آن میزان مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز افزایش یافت که علت آن می‌تواند مرتبط به تغییرات pH و میزان اسیدیته باشد بطوریکه میزان pH تا روز چهاردهم کاهش داشت ولی روز بیست و یکم میزان pH افزایش یافت که دلیل این مسئله می‌تواند روند غیرطبیعی اسیدی شدن و انحراف از اسیدیته مطلوب باشد (Ramchandran and Shah, 2009).

در بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی در طول دوره نگهداری نتایج حاکی از کم بودن فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط اینولین بود (نمودار ۸) که دلیل آن ممکن است غلظت اینولین استفاده شده باشد بطوریکه Shang و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS توسط اینولین در غلظت ۰ تا ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پایین است و با افزایش غلظت، میزان مهار رادیکال آزاد افزایش می‌یابد (Shang *et al*., 2018). نتایج حاصل از سنجش مهار رادیکال آزاد در شیر تخمیری حاوی اینولین و نمونه کنترل فاقد اینولین نشان داد که میزان مهار رادیکال آزاد DPPH وABTS تا روز پنجم افزایش داشت که علت این امر می‌تواند بدلیل افزایش جمعیت میکروبی در روز پنجم باشد ولی پس از آن میزان مهار تقریباً ثابت مانده و یا کاهش یافت. بصورتیکه پایداری فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و ABTS از یک روند پیروی کرده است و تغییرات فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS در محصول حاوی اینولین نسبت به نمونه بدون اینولین ممکن است به تفاوت در ترکیب آن‌ها مرتبط باشد بطوریکه بعد از روز پنجم تغییرات ایجاد شده در مهار رادیکال آزاد DPPH باعث کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده است. از آنجا که اینولین بصورت یک پلی‌ساکارید و یک پلیمر خطی است و با توجه به اینکه فعالیت بیولوژیکی پلی‌ساکاریدها ارتباط نزدیکی با ساختار آن‌ها دارد (Chen *et al*., 2020) لذا ممکن است با گذشت زمان تغییرات در گروه‌های عملکردی اینولین و برهمکنش‌های ایجاد شده میان اینولین و متابولیت‌های تولیدی منجر به کاهش مهار رادیکال آزاد DPPH وABTS شده باشد. همچنین پس از افزودن اینولین عواملی مانند تغییرات اسیدیته، رشد و فعالیت سلول‌ها می‌تواند بر خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه موثر باشد. در بررسی مهار رادیکال آزاد به روش DPPH در نمونه کنترل در طول دوره نگهداری نتایج حاکی از این بود که با گذشت زمان خاصیت آنتی اکسیدانی افزایش می‌یابد و این یافته با مطالعه Yilmaz و همکاران (۲۰۱۶) در زمینه افزایش فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در نمونه‌های کفیر در طی ۲۱ روز نگهداری همخوانی دارد که علت آن متابولیسم میکروارگانیسم‌ها در دماهای پایین عنوان شده است (Yilmaz-Ersan *et al*., 2016). در این زمینه Madhu و همکاران (۲۰۱۲) نیز افزایش مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه ماست حاوی دو سویه *لاکتوباسیلوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* را در طول ۲۸ روز نگهداری در یخچال مشاهده کردند که این یافته با داده‌های مطالعه حاضر هم راستا می‌باشد (Madhu *et al*., 2012). بنابراین مطابق نظر مصلحی‌شاد و همکاران (۲۰۱۳) افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی حاصل شده در طی دوره نگهداری می‌تواند ناشی از آزاد سازی آنزیم‌ها از درون ماتریس غذایی توسط میکروارگانیسم‌ها باشد (Moslehishad *et al*., 2013). به طورکلی، فعالیت آنتی اکسیدانی شیر تخمیر شده به عوامل مختلفی از جمله نوع و مقدار متابولیت‌های تولیدی، آنزیم‌های کشت‌های آغازگر و هیدرولیز پروتئین‌ها بستگی دارد. بعلاوه، عواملی از جمله موقعیت اسیدهای آمینه پروتئین‌ها و پپتیدها در توالی آن‌ها، ساختار فیزیکی، آبگریزی و وزن مولکولی آن‌ها نیز بر خاصیت آنتی اکسیدانی موثر است (El-Sayed *et al*., 2021).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که کشت توأم دو سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *هلوتیکوس* فعالیت ضد دیابتی بالاتری نسبت به سویه‌های تکی *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* دارد. در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که استفاده از اینولین ۱ درصد به شیر تخمیری کم چربی، می‌تواند

کیفیت و ویژگی‌های قابل قبولی را نسبت به شیر تخمیری بدون پری‌بیوتیک داشته باشد بطوریکه در بررسی حاضر تأثیر اینولین بر برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میکروبی و عملکردی شیر تخمیری طی ۱۹روز نگهداری در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نشان داد که افزودن اینولین به شیر تخمیری باعث کاهش pH و فعالیت پروتئولیتیک، افزایش اسیدیته، ویسکوزیته و جمعیت میکروبی باکتری‌های لاکتیکی طی دوره نگهداری شد. همچنین مشاهده شد با گذشت زمان میزان مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز کاهش داشت اما اینولین از افت سریع مهار آنزیم آلفا آمیلاز ممانعت بعمل آورد. با این‌حال اینولین اثر قابل توجهی بر فعالیت آنتی اکسیدانی سویه‌ها نسبت به نمونه کنترل نشان نداد.

منابع

Astawan, M., Wresdiyati, T., Arief, I. I. & Septiawan, R. (2012). Production of synbiotic yogurt-like using indigenous lactic acid bacteria as functional food. *Media Peternakan*, 35(1), 9-14.

Ayyash, M., Al-Nuaimi, A. K., Al-Mahadin, S. & Liu, S. Q. (2018). In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α-amylase and α-glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Food Chemistry*, 239, 588-597.

Baba, A. S., Najarian, A., Shori, A. B., Lit, K. W. & Keng, G. A. (2014). Viability of Lactic Acid Bacteria, Antioxidant Activity and In Vitro Inhibition of Angiotensin-I-Converting Enzyme of Lycium barbarum Yogurt. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 39 (7), 5355-5362.

Bedani, R., Rossi, E. A., Saad, S. M. I. (2013). Impact of inulin and okara on Lactobacillus acidophilus La-5 and Bifidobacterium animalis Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 34 (2), 382-389.

Boosjin, S. N., Noghani, V. F. & Hashemiravan, M. (2016). Characterization of probiotic fermented milk prepared by different inoculation size of mesophilic and thermophilic Lactic acid bacteria. *Applied Food Biotechnology*, 3(4), 276-282.

Chen, Y., Mi, Y., Li, Q., Dong, F. & Guo, Z. (2020). Synthesis of Schiff bases modified inulin derivatives for potential antifungal and antioxidant applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 714-723.

Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Aairy Science*, 66(6), 1219-1227.

De Souza Oliveira, R. P., Perego, P., de Oliveira, M. N. & Converti, A. (2011). Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engineering*, 107(1), 36-40.

Demain, A. L. & Solomon, N. A. (1986). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. *American Society for Microbiology*, pp. 59-60.

Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T. & Shah, N. P. (2006). Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage, *International Dairy Journal*, 16(10), 1181-1189.

Donkor, O. N., Nilmini, S. L. I., Stolic, P., Vasiljevic, T. & Shah, N. P. (2007). Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage, *International Dairy Journal*, 17(6). 657–665.

Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T. & Shah, N. P. (2005). Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yogurt. *Journal of Food Science*, 70(8), 375-381.

Ehsani, J., Mohsenzadeh, M., Khomeiri, M., Ghasemnezhad, A. & Ebrahimi, S. (2020). A review of the most common prebiotic combinations, with an emphasis on inulin. *Neyshabur University Medical Science*, 8(4), 1-21 [In Persian].

El-Sayed, M. I., Awad, S. & Abou-Soliman, N. H. I. (2021). Improving the Antioxidant Properties of Fermented Camel Milk Using Some Strains of Lactobacillus. *Food and Nutrition Sciences*, 12 (4), 352-371.

Gargari, B. P., Dehghan, P., Aliasgharzadeh, A. & Jafar-Abadi, M. A. (2013). Effects of high performance inulin supplementation on glycemic control and antioxidant status in women with type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism Journal*, 37(2), 140-148.

Ghasab nezhad, M., Hojjati, M. & Jooyandeh, H. (2019). Effect of inulin on physico-chemical, microbial and sensory properties of the kefir produced of buffalo milk. *Journal of Food Science and Technology*, 16 (89), 357-367 [In Persian].

Guven, M., Yasar, K., Karaca, O. B. & Hayaloglu, A. A. (2005). The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 58(3), 180–184.

Habibi Najafi, M. B., Fatemizadeh, S. S. & Tavakoli, M. (2019). Release of Proteolysis Products with ACE-Inhibitory and Antioxidant Activities in Probiotic Yogurt Containing Different Levels of Fat and Prebiotics. *International Journal*

of Peptide Research and Therapeutics, 25(1), 367-377.

Han, K., Cao, J., Wang, J., Chen, J., Yuan, K., Pang, F., Gu, S. & Huo, N. (2018). Effects of Lactobacillus helveticus Fermentation on the Ca^{2+} Release and Antioxidative Properties of Sheep Bone Hydrolysate. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38 (6), 1144-1154.

Handaka, R., Wahyuni, E. & Taufiq, T. T. (2017). The quality of fermented milk produced using intestinal-origin lactic acid bacteria as starters. *International Food Research Journal*, 24(6), 2371–2376.

Kalyani Nair, K., Kharb, S. & Thompkinson, D. K. (2010). Inulin dietary fiber with functional and health attributes a review. *Food Reviews Internationa*, 26(2), 189-203.

Kwon, Y. I., Apostolidis, E. & Shetty, K. (2006). Anti-diabetes functionality of Kefir culture-Mediated fermented soymilk supplemented with Rhodiola extracts. *Food Biotechnology*, 20(1), 13-29.

Liao, S. M., Liang, G. E., Zhu, J., Lu, B. O., Peng, L.X., Wang, Q. Y., Wei, Y.T., Zhou, G. P. & Huang, R. B. (2019). Influence of Calcium Ions on the Thermal Characteristics of α-amylase from Thermophilic Anoxybacillus sp. GXS-BL. *Protein and Peptide Letters*, 26(2), 148-157.

Liu, J., Lu, J. F., Kan, J., Wen, X. Y. & Jin, C. H. (2014). Synthesis, characterization and in vitro anti-diabetic activity of catechin grafted inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 76-83.

Loghman, S., Moayedi, A., Mahmoudi, M. & Khomeiri, M. (2018). Evaluation of Proteolysis in milk fermented by proteolytic lactic acid bacteria and antibacterial activities of their peptide extract. *Journal of Applied Microbiology*, *4*(2), 31-43 [In Persian].

Madhu, A. N., Amrutha, N. & Prapulla, S. G. (2012). Characterization and antioxidant property of probiotic and synbiotic yogurts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2), 90-97.

Mashayekh, M., Taslimi, A., Ardeshir, H., Zohorian, G. & Abadi, A.R. (2009). Laboratory scale production of soy yogurt with strawberry Flavor. *Iranian Journal of Science and Technology*, 5(4), 1-9 [In Persian].

Mazloumi, S., Shekarforoush, S.S., Ebrahimnejad, H. & Sajedianfard, J. (2011). Effect of adding inulin on microbial and physicochemical properties of low fat probiotic yogurt, *Iranian Journal of Veterinary Research*, 12(2), 93–98.

Mirdamadi, S., Rajabi, A., Aziz Mohseni, F. & Momen B. (2007). Lactic acid production by Lactobacillus strains. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 2(3), 57-64 [In Persian].

Mishra, S. & Mishra, H. N. (2018). Comparative study of the synbiotic effect of inulin and fructooligosaccharide with probiotics with regard to the various properties of fermented soy milk. *Food Science and Technology International*, 24(7), 564–575.

Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Rufián-Henares, J.Á., Martínez, R.G., Miralles, B., Bergillos, T., Navarro-Alarcón, M. & Jauregi, P. (2017). Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activity of fermented goat milk: activity and physicochemical property relationship of the peptide components. *Food & Function*, 8(8), 2783-2791.

Moslehishad, M., Ehsani, M. R., Salami, M., Mirdamadi, S., Ezzatpanah, H., Naslaji, A. N. & Moosavi-Movahedi, A. A. (2013). The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by Lactobacillus rhamnosus PTCC 1637. *International Dairy Journal*, 29(2), 82-87.

Muganga, L., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H. & Chen, W. (2015). Screening for lactic acid bacteria based on antihyperglycaemic and probiotic potential and application in synbiotic set yoghurt. *Journal of Functional Foods*, 16, 125-136.

Mukherjee, S., Pawar, N., Kulkarni, O., Nagarkar, B., Thopte, S., Bhujbal, A. & Pawar, P. (2011). Evaluation of free-radical quenching properties of standard Ayurvedic formulation Vayasthapana Rasayana, *BMC Complement and Alternative Medicine*, 11(1),1-6.

Nikmaram, P., Mousavi, S. M., Emam-Djomeh, Z., Kiani, H. & Razavi, S. H. (2015). Evaluation and prediction of metabolite production, antioxidant activities, and survival of Lactobacillus casei 431 in a pomegranate juice supplemented yogurt drink using support vector regression. *Food Scienc and Biotechnology*, 24(6), 2105-2112.

Panwar, H., Calderwood, D., Grant, I. R., Grover, S. & Green, B. D. (2014) .Lactobacillus strains isolated from infant faeces possess potent inhibitory activity against intestinal alpha and beta-glucosidases suggesting anti-diabetic potential. *European Journal of Nutrition*, 53(7), 1465-1474.

Patil, P., Mandal, S., Tomar, S. K. & Anand, S. (2015). Food protein‐derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes, *European Journal of Nutrition*, 54(6), 863-880.

Ramchandran, L. & Shah, N.P. (2009). Effect of EPS on the proteolytic and ACE-inhibitory activities and textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy science*, 92, 895–906.

Ramchandran, L. & Shah, N. P. (2010). Influence of addition of Raftiline HP® on the growth, proteolytic, ACE- and α-glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria and Bifidobacterium. *LWT-Food Science and Technology*, 43(1), 146-152.

Rokhtabnak, N., Khaleghi, M. & Sasan, H. A.

(2016). Isolation and identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. *Journal of Medical Microbiology*, 10(1), 24-34 [In Persian].

Shahdadi, F. & Ezzati, R. (2020). Effect of Different Concentrations of Inulin and Whey on the Qualitative and Rheological Properties of Aloe vera Doogh Containing Microencapsulated probiotic bacteria. *Food Science and Technology*, 17(103), 15-31 [In Persian].

Shakerian, M., Hadi Razavi, S., Khodaiyan, F., Ziai, S. A., Saeid Yarmand, M. & Moayedi, A. (2014). Effect of different levels of fat and inulin on the microbial growth and metabolites in probiotic yogurt containing nonviable bacteria. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(1), 261–268.

Shang, H. M., Zhou, H. Z., Yang, J. Y., Li, R., Song, H. & Wu, H. X. (2018). In vitro and in vivo antioxidant activities of inulin. *PLoS ONE*., 13(2), 1–12.

Simsek, S., Sánchez-Rivera, L., El, S. N., Karakaya, S. & Recio, I. (2017). Characterisation of in vitro gastrointestinal digests from low fat caprine kefir enriched with inulin. *International Dairy Journal*, 75, 68-74.

Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S. & Kianirad, M. (2016). Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal). *Dairy Science & Technology*, 96(4), 443-457.

Son, S. & Lewis, B. A. (2002). Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 468-472.

Stijepić, M. I. L. K. A., Glušac, J. O. V. A. N. A., Đurđević-Milošević, D. R. A. G. I. C. A. & Pešić-Mikulec, D. R. A. G. A. N. A. (2013). Physicochemical characteristics of soy probiotic yoghurt with inulin additon during the refrigerated storage. *Romanian Biotechnological Letters*,18(2), 8077-8085.

Thakkar, P. N., Patel, A. R., Modi, H. A. & Prajapati, J. B. (2018). Evaluation of antioxidative, proteolytic, and ACE inhibitory activities of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional fermented food products. *Acta Alimentaria*, 47(1), 113-121.

Tsujikawa, Y., Ishikawa, S., Sakane, I., Yoshida, K. I. & Osawa, R. (2021). Identification of genes encoding a novel ABC transporter in Lactobacillus delbrueckii for inulin polymers uptake. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.

Valenlia, K. B., Morshedi, M., Saghafi-Asl, M., Shahabi, P. & Abbasi, M. M. (2018). Beneficial impacts of Lactobacillus plantarum and inulin on hypothalamic levels of insulin, leptin, and oxidative markers in diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 46, 529-537.

Westfall, S., Lomis, N. & Prakash, S. (2018). A polyphenol-rich prebiotic in combination with a novel probiotic formulation alleviates markers of obesity and diabetes in Drosophila. *Journal of Functional Foods*, 48, 374-386.

Widodo, W., Harsita, P. A., Sukarno, A. S. & Nurrochmad, A. (2019). Antidiabetic effect of milk fermented using intestinal probiotics. *Nutrition & Food Science*, 49(6), 1063-1074.

Wihansah, R. R. S., Arief, I. I. & Batubara, I. (2018). Anti-diabetic potency and characteristics of probiotic goat-milk yogurt supplemented with roselle extract during cold storage. *Tropical Animal Science Journal*, 41(3), 191–199.

Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpinar-Bayizit, A. & Sahin, S. (2016). The Antioxidative Capacity of Kefir Produced from Goat Milk. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 7(1), 22-26.

Zheng, X., Yu, Y., Xiao, G., Xu, Y., Wu, J., Tang, D., Cheng, Y. & Zhang, Y. (2014). Changes of anti-glucosidase content and some other characteristics in mulberry juice during fermentation with Leuconostoc mesenteroides. *Acta Aliment*, 43(4), 668-675.

The Effect of Inulin on Properties of Functional Fermented Milk Produced by Native Strains Isolated from Traditional Iranian Yogurt

F. Shirkhan [a], S. Mirdamadi [b] *, M. Mirzaei [c], B. Akbari-adergani [d], N. Nasoohi [e]

[a] PhD Student of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sience, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Professor of the Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

[c] Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[d] Professor of Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

[e] Assistant Professor of the Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 23 July 2021 Accepted: 22 January 2022

Abstract

Introduction: The inclination to manufacture beneficial dairy products has increased in recent years, as consumers pay more attention to food products with adequate sensory qualities and health benefits.

Materials and Methods: The current study looked first at the anti-diabetic efficacy of milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii*, and *Lactobacillus helveticus* strains isolated from traditional yogurt as well as co-culture of two-strain based on the inhibitory activity of alpha-amylase and alpha-glucosidase enzymes for the production of functional fermented milk. Then, added 1% inulin as an appropriate and applied prebiotic to fermented milk resulting from the combination of two strains and evaluated physicochemical, anti-diabetic, anti-oxidant, proteolysis rate, and population of bacteria during 19 days at 4°C.

Results: The results indicated that milk fermented with two-strain bacterial intercropping had stronger inhibitory activity on alpha-amylase (45%) and alpha-glucosidase (35%) than single strains of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus helveticus* ($p<0.05$). The addition of inulin increased the inhibitory activity of alpha-amylase (20%) and alpha-glucosidase (33%) at the end of fermentation, respectively. During storage at 4°C, the composition two bacterial strains and inuline significantly increased the population of bacteria, acidity and viscosity and significantly reduced the pH and proteolysis rate of fermented milk. However, there was a decrease in antioxidant and antidiabetic activities.

Conclusion: The results revealed that both bacterial strains in combination with inulin have the capacity to produce functional food.

Keywords: *Diabetes, Fermented Milk, Functional Foods, Inulin, Native Strains, Storage Time.*

* Corresponding Author: mirdamadi@irost.ir