دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

ارزیابی درجه پروتئولیز، قدرت مهار ACE و قدرت آنتی اکسیدانی در ماست تولید شده از افزودن آغازگرهای همراه جداشده از ماست‌های سنتی خراسان

مهسا سلطانی

استاد راهنما

دکتر محمد باقرحبیبی نجفی

استاد مشاور

دکتر رضا حاجی محمدی فریمانی

شهریور ۱۳۹۸

چکیده:

برای تولید ماست معیارهای متعددی مورد توجه است که انتخاب آغازگر و کمک آغازگر مناسب یکی از مهمترین این معیارها می باشد. آغازگرها و کمک آغازگرهای بومی هرکشوری جزء ذخایر ژنتیکی آن کشور محسوب می‌شوند و نقش اساسی در تولید و ایجاد خواص ارگانولپتیکی و تغییرات فیزیکوشیمیایی محصولات تخمیری ایفا می‌کنند. هدف از این پژوهش اندازه‌گیری میزان پروتئولیز، خاصیت مهار ACE و خاصیت آنتی اکسیدانی ماست تولیدشده توسط آغازگر تجاری به همراه کمک آغازگرهای بومی جداشده از ماست‌های سنتی خراسان و مقایسه آنها با نمونه کنترل، ماست تولیدشده فقط با آغازگر تجاری، و همچنین تیمارهای مختلف با یکدیگر بود. ابتدا با استفاده از ۵ سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، ۲ سویه *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، ۲ سویه *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* و ۱ سویه *ویسلا سیباریا*، ۲۰ نمونه ماست در دو تکرار تولید شد و به مدت ۲۰ روز در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، ماست‌های حاصل از تیمارهای مختلف از نظر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، درجه پروتئولیز، خاصیت مهار ACE و خاصیت آنتی اکسیدانی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که استفاده از کمک آغازگرهای بومی به طور معنی‌داری 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 ($P<۰/۰۵$)، اما پس از آن این روند شروع به کاهش نمود. همچنین با گذشت زمان نگهداری نمونه‌های ماست، تاثیر مشابهی برای خاصیت مهار ACE و فعالیت آنتی-اکسیدانی مشاهده شد بطوریکه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و خاصیت مهار ACE در ماست با افزایش زمان نگهداری تا روز پانزدهم افزایش یافتند ($P<۰/۰۵$)، اما پس از آن این روند شروع به کاهش نمود. بر اساس نتایج حاصل، نمونه‌های ماست حاوی سویه‌های *لاکتوباسیلوس لاکتیس* (۷۱) و *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* (۸۲) دارای بیشترین امتیاز از نظر خاصیت مهارکنندگی ACE و خاصیت آنتی اکسیدانی نسبت به سایر سویه‌ها بودند. فعالیت مهار ACE و خاصیت آنتی اکسیدانی تمام کمک آغازگرهای افزوده-شده به نمونه‌های ماست، دارای همبستگی مثبتی با درجه پروتئولیز 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 و در پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی موثر واقع شوند.

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

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱-مقدمه ۲

فصل دوم: بررسی منابع ۵

۱-۲- ماست ۶

۲-۲- ارزش تغذیه ای ماست ۶

۱-۲-۲- ویتامین ها و مواد معدنی ۶

۲-۲-۲- چربی ماست ۷

۳-۲-۲- باکتری های پروبیوتیک ۷

۴-۲-۲- کلسیم ..... **Error! Bookmark not defined.**

۳-۲- فرآیند تولید ماست ۸

۴-۲- تخمیر و اهمیت آن ۹

۵-۲- عوامل موثر بر تخمیر ۱۲

۱-۵-۲-درجه حرارت ۱۲

۲-۵-۲- pH ۱۳

۳-۵-۲- رطوبت ۱۳

۴-۵-۲- نوع آغازگر ۱۴

۶-۲- تغییرات انجام گرفته در فرآیند تبدیل شیر به ماست ۱۴

۱-۶-۲- عطر و طعم ۱۴

۲-۶-۲- پپتیدهای فعال بیولوژیکی..... ۱۵

۲-۷- آغازگرهای همراه در تخمیر و تولید ماست.....۲۱

۲-۸- تاثیرات آغازگرهای همراه در تخمیر و تولید ماست ۲۳

۱-۸-۲- افزایش تولید پپتیدها با فعالیت مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲۳

۲-۸-۲- افزایش تولید ترکیبات فرار مسئول عطر و طعم ۲۳

۳-۸-۲- تولید ترکیبات ضد قارچی ۲۴

۲-۹- پیشینه پژوهش.....۲۵

فصل سوم: مواد و روش ها.....۲۹

۳-۱- مواد، وسایل و تجهیزات مورد استفاده.....۳۰

۳-۱-۱- محیط کشت ها..... ۳۰

۳-۱-۲- سویه های میکروبی ۳۰

۳-۱-۳- مواد شیمیایی مصرفی ۳۳

۳-۱-۴- سایر مواد مصرفی ۳۴

۳-۱-۵- وسایل و تجهیزات مورد استفاده ۳۴

۳-۲- مرحله مقدماتی آزمایش.....۳۵

۳-۲-۱- فعالسازی سویه ها..... ۳۵

۳-۲-۲-آزمون رنگ آمیزی گرم..... ۳۶

۳-۳- تولید ماست با استفاده از آغازگرهای تجاری و کمک آغازگرهای بومی ۳۷
۴-۳-آزمایشات فیزیکوشیمیایی ماست ۳۸
۱-۴-۳- اندازه گیری اسیدیته ۳۸
۲-۴-۳- اندازه گیری pH ۳۹
۳-۴-۳- اندازه گیری درجه پروتئولیز نمونه های ماست با روش OPA ۳۹
۴-۴-۳- اندازه گیری فعالیت مهار کنندگی ACE نمونه های ماست ۴۰
۵-۴-۳- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های ماست ۴۲
۱-۵-۴-۳- روش DPPH ۴۲
۲-۵-۴-۳- روش چلاته کنندگی فلزات (Fe^{2+}) ۴۳
۵-۳-آنالیز میکروبی نمونه های ماست در زمان نگهداری ۴۴
۶-۳-تجزیه و تحلیل آماری ۴۴
فصل چهارم: نتایج و بحث ۴۵
۱-۴-رنگ آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی ۴۶
۲-۴- اندازه گیری pH و اسیدیته نمونه های ماست ۴۸
۳-۴- اندازه گیری میزان پروتئولیز ۵۶
۴-۴- اندازه گیری میزان فعالیت مهارکنندگی ACE ۵۹
۵-۴- اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی ۶۱
۱-۵-۴- اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی با تکنیک DPPH ۶۱

۲-۵-۴- اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی با روش چلاته کنندگی فلزات ۶۳

۶-۴- بررسی تغییرات زنده مانی باکتری های اسید لاکتیک ۶۵

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات ۶۸

۱-۵- نتیجه گیری.....۶۹

۲-۵- پیشنهادها برای پژوهش های آتی ۷۱

منابع ۷۲

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۲: فرآیند تولید ماست ۹

شکل ۲-۲: فرایند تخمیر..... ۱۱

شکل ۳-۲: فرایند گلیکولیز..... ۱۱

شکل ۴-۲: سیستم رنین-آنژیوتانسین. ۱۷

شکل ۵-۲: *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*. ۲۲

شکل ۶-۲: *استرپتوکوس ترموفیلوس*..... ۲۲

شکل۱-۳: مراحل تولید ماست در این پژوهش. ۳۷

شکل ۱-۴: *لاکتوباسیلوس لاکتیس* ۴۶

شکل ۲-۴: *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* ۴۶

شکل ۳-۴: *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *دلبروکی*..... ۴۷

شکل ۴-۴: *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* ۴۷

شکل ۵-۴: *ویسلا سیباریا*..... ۴۸

فهرست نمودارها

نمودار ۱-۴: مقدار اسیدیته نمونه های مختلف ماست.....۴۹

نمودار ۲-۴: مقدار pH نمونه های مختلف ماست ۵۰

نمودار ۳-۴: میزان اسیدیته نمونه های ماست در طول دوره نگهداری (گروه اول) ۵۰

نمودار ۴-۴: میزان اسیدیته نمونه های ماست در طول دوره نگهداری (گروه دوم)**Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۵-۴: میزان pH نمونه های ماست در طول دوره نگهداری (گروه اول) ۵۱

نمودار ۶-۴: میزان pH نمونه های ماست در طول دوره نگهداری (گروه دوم) ۵۲

نمودار ۷-۴: میزان پروتئولیز نمونه های ماست در طول دوره نگهداری (گروه اول).....۵۸

نمودار ۸-۴: میزان پروتئولیز نمونههای ماست در طول دوره نگهداری (گروه دوم).....۵۸

نمودار ۹-۴: میزان ACE-inhibitory نمونه های ماست در طول دوره نگهداری (گروه اول) ۶۰

نمودار ۱۰-۴: میزان ACE-inhibitory نمونه های ماست در طول دوره نگهداری (گروه دوم).....۶۰

نمودار ۱۱-۴: خاصیت آنتیاکسیدانی نمونه های ماست طی دوره نگهداری با روش DPPH (گروه اول) ۶۲

نمودار ۱۲-۴: خاصیت آنتیاکسیدانی نمونههای ماست طیدوره نگهداری با روش DPPH (گروه دوم) ۶۲

نمودار ۱۳-۴: خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه های ماست در طول دوره نگهداری با روش مهار یون فلزی (گروه اول).....۶۴

نمودار ۱۴-۴: خاصیت آنتیاکسیدانی نمونه های ماست در طول دوره نگهداری با روش مهار یون فلزی (گروه دوم) ۶۴

نمودار ۱۵-۴: زنده مانی باکتری های اسید لاکتیک در طول دوره نگهداری (گروه اول)**.Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۶-۴: زنده مانی باکتری های اسید لاکتیک در طول دوره نگهداری (گروه دوم)**.Error! Bookmark not defined.**

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۲: نقش پپتیدهای زیست‌فعال مشتق‌شده از شیر در سیستم بدن ۲۰

جدول ۲-۲: پپتیدهای زیست‌فعال مشتق شده از پروتئین‌های شیر با خاصیت آنتی‌اکسیدانی ۲۰

جدول ۱-۳: فهرست باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش ۳۱

جدول ۲-۳: فهرست نمونه‌های ماست ۳۲

جدول ۱-۴: مقادیر pH نمونه‌های ماست در طی زمان نگهداری ۵۴

جدول ۲-۴: مقادیر اسیدیته نمونه‌های ماست در طی زمان نگهداری ۵۵

فهرست علائم و اختصارها

معادل فارسی	معادل انگلیسی	علامت اختصاری
سطح معنی داری	Significant level	P
واحد تشکیل دهنده کلنی	Colony Forming Unit	CFU

فصل اول: مقدمه

۱-۱-مقدمه

ماست یک محصول تخمیرشده لبنی است که از تخمیر شیر به وسیله *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* به دست می‌آید (سالوف – کاست ، ۱۹۹۵). در واقع، ماست رایج ترین و پرمصرف ترین محصول لبنی تخمیری است که در سال‌های اخیر به عنوان یک فرآورده سلامتی‌بخش شناخته شده است زیرا حاوی درصد بالایی از پروتئین و کلسیم می‌باشد. به لحاظ طعم مطلوب و تنوع، ماست به عنوان غذایی سالم مورد توجه عموم است (مرتضوی و همکاران، ۱۳۹۱). بطوریکه رشد مصرف قابل توجهی را نشان می‌دهد. ارزش تغذیه‌ای این فرآورده ابتدا به دلیل میزان بالای کلسیم، ویتامین‌ها، مواد معدنی، مقدار پایین چربی و اثر آن بر باکتری های مضر دستگاه گوارش و افزایش طول عمر می‌باشد. همچنین ماست دارای نسبت کلسیم به فسفر مطلوب و کیفیت پروتئین بالاست. این مزیت تغذیه‌ای توسط قابلیت هضم بالای ماست توصیف می‌شود طوریکه انتقال روده‌ای و معده ای ماست بسیار راحت تر از شیر است (آریانا و السون ، ۲۰۱۷). به دلیل حضور ترکیبات مغذی فراوان، ماست به آسانی هضم می‌شود، از فعالیت بیولوژیکی بالایی برخوردار است و این قابلیت را دارد که برای درمان برخی بیماری‌ها استفاده شود (خورانا و همکاران ، ۲۰۰۷). آین فرآورده با درصدهای چربی مختلفی تولید می‌شود اما امروزه با توجه به افزایش تمایل جهت مصرف فرآورده‌های کم چرب و بدون چربی خصوصا در افراد مبتلا به بیماری‌های قلبی عروقی و دارای چربی خون بالا، ترجیح داده می‌شود که از شیر بدون چربی جهت تهیه این فرآورده استفاده شود (برمن و هارتونگ ، ۲۰۱۳).

کشت‌های میکروبی مورد استفاده در صنعت لبنی کشور با صرف هزینه بالا و به طور کامل از چندین کشور خارجی وارد می‌شوند که با توجه به حجم بالای تولید محصولات لبنی تخمیری (پنیر، ماست، دوغ)، سالانه میزان قابل توجهی ارز از کشور خارج می‌شود. در حال حاضر، آماری سالانه‌ای در مورد مقدار یا نوع کشت‌های آغازگر تولیدی یا مورد استفاده در کشور وجود ندارد و فقط براساس فرض و گمان

می‌توان مقدار مصرف کشت‌های آغازگر برای تولید فرآورده‌های لبنی را تخمین زد. از طرف دیگر، احتمال دستکاری ژنتیکی کشت‌های مذکور توسط شرکت‌های تامین کننده آنها وجود دارد و نظر به عدم وجود استاندارد و کنترل‌های قانونی، تبعات مصرف دراز مدت چنین کشت‌هایی بر سلامت مصرف کنندگان در هاله ای از ابهام قرار دارد (حاجی محمدی فریمانی، ۲۰۱۶).

در کشور ما فرآورده‌های لبنی سنتی متنوعی همچون ماست، دوغ، مسکه، کشک و قره قروت از شیر گوسفند و بز تهیه می‌شود. ترکیب باکتری‌های اسید لاکتیک این محصولات از جهت نوع و نسبت با آغازگرهای مورد استفاده در مقیاس صنعتی متفاوت می‌باشند. آغازگرهای بومی هر کشوری جزء ذخایر ژنتیکی آن کشور محسوب می‌شوند و نقش عمده ای در تولید و ایجاد خواص ارگانولپتیکی محصولات تخمیری لبنی ایفا می‌کنند. این موضوع، اهمیت مطالعات در زمینه کاربرد صنعتی آغازگرهای بومی را نشان می‌دهد (حاجی محمدی فریمانی، ۱۳۹۴). با توجه به آنچه گفته شد، مطالعه فرآورده‌های سنتی به شناسایی و حفظ ذخایر میکروبی و ژنتیکی کشور کمک می‌نماید. از طرف دیگر، می‌توان به ذائقه مصرف کنندگان علاقه مند به محصولات طبیعی و سنتی توجه داشت و تقاضای رو به افزایش این فرآورده‌ها را پاسخ داد. علاوه بر این، تولید و عرضه این کشت‌های آغازگر موجبات اشتغال‌زائی و درآمدزایی را فراهم خواهد کرد (حاجی محمدی فریمانی، ۱۳۹۴).

در راستای تولید محصولات لبنی از دو نوع کشت میکروبی استفاده می‌شود که عبارتنداز: کشت میکروبی اولیه و کشت میکروبی ثانویه. کشت اولیه شامل باکتری‌های اسید لاکتیک است که به عنوان آغازگر تجاری شناخته می‌شود و کشت میکروبی ثانویه یا کمک آغازگر که شامل انواع مخمرها (*کاندیدا ژئوتریکوم* و *دباریومایسس هانسنی*)، کپک‌ها (*پنی سیلیوم کاممبرتی* و *پنی سیلیوم راکفورتی*) و باکتری-ها (*میکروکوکوس*، *پروپیونی باکتریوم*، *استافیلوکوکوس*، *کورینه باکتریوم*، *پدیوکوکوس*) می‌باشد (ایرلینگر و همکاران ، ۲۰۱۷). 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 (حاجی محمدی فریمانی و همکاران ، ۲۰۱۶).

هدف از این پژوهش، انتخاب بهترین کمک آغازگر از میان جدایه های بومی شامل ۵ سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه لاکتیس، ۲ سویه *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، ۲ سویه *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* و ۱ سویه *ویسلا سیباریا* (حاجی محمدی فریمانی، ۱۳۹۴) است که بتوان به کمک آن ماستی با اثرات سلامتی‌بخش برای مصرف کنندگان تولید کرد و همچنین سبب بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی این فرآورده شد. در راستای اجرای این پژوهش، میزان پروتئولیز، خاصیت مهار ACE و خاصیت آنتی اکسیدانی ماست تولید شده توسط آغازگر تجاری به همراه کمک آغازگرهای بومی جدا شده از ماست های سنتی خراسان به مدت زمان ۲۰ روز اندازه‌گیری شد و سپس نمونه‌ها با یکدیگر و با نمونه کنترل، یعنی ماست تولید شده فقط با آغازگر تجاری، مقایسه شدند. لازم به ذکر است که تمام کمک آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش قبلا از نظر صفات مختلفی مثل مقاومت به آنتی بیوتیک، تولید آمین‌های بیوژنیک، تولید مواد معطر، تولید اگزوپلی ساکاریدها و رفتار ارگانیسم‌ها در شیر در حین تخمیر مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (حاجی محمدی فریمانی و همکاران ، ۲۰۱۶).

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- ماست

انواع محصولات لبنی با تبدیل لاکتوز شیر به اسید لاکتیک با استفاده از کشت‌های میکروبی تولید می-شوند. قبل از آنکه علم باکتری شناسی شناخته شود، به جای کشت‌های میکروبی برای تولید ماست، از مقدار کمی شیر ترش جهت تلقیح با شیر تازه استفاده می‌شد (بنوزی و همکاران ، ۲۰۱۵). مطابق تعریف سازمان غذا و داروی آمریکا، ماست در واقع محصول تولیدشده از انواع مختلف شیر (شیر کامل، کم چرب و بدون چربی) با کشت میکروبی شامل باکتری‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس* می‌باشد (گیونس و کلایم ، ۲۰۰۲). به طور معمول ماست به عنوان یک ژل صاف و چسبناک با طعم مشخصی از اسید تیز و طعم سیب سبز شناخته می‌شود (دل- بلو و همکاران ، ۲۰۱۲). با توجه به پایگاه داده Euromonitor، تولید ماست در سال ۲۰۱۵ به ۲۷/۷ میلیون تن رسید و محبوبیت این ماده غذایی نه تنها بخاطر تاثیر سلامتی بخش و تاثیرات درمانی، بلکه بخاطر خواص حسی آن بود که عبارتنداز: بافت، رنگ و طعم. در میان این ویژگی‌ها، عطر و طعم نقش مهمی در مقبولیت و شایستگی این محصول در بین مصرف کنندگان ایفا می‌کند (دنسیل ، ۲۰۱۲).

۲-۲- ارزش تغذیه ای ماست

۲-۲-۱- ویتامین‌ها و مواد معدنی

نتایج مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ویتامین‌ها و مواد معدنی که به طور طبیعی در شیر وجود دارند، زمانی که به ماست تبدیل شوند، توسط بدن انسان بهتر جذب می‌شوند. در واقع، ماست به عنوان منبع خوبی از کلسیم، فسفر، ید، پروتئین، اسید لینولئیک، اسید آمینه ضروری تریپتوفان، پتاسیم، ویتامین B، عناصر ضروری روی و مولیبیدن شناخته شده است. باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در ماست، در طول

فرآیند تخمیر، ترکیباتی مانند اسید لاکتیک و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر را تولید می‌کنند که به اسیدی شدن محیط روده کمک می‌نمایند. این رویداد بخشی از یک واکنش زنجیره ای است که در حین آن شیر به ماست تبدیل شده و محیط اسیدی ایجاد می‌کند که به نوبه خود باعث جذب کلسیم در خون و استخوان می‌شود (رابینسون و همکاران ، ۲۰۰۲؛ مورنو و همکاران ، ۲۰۱۰).

۲-۲-۲- چربی ماست

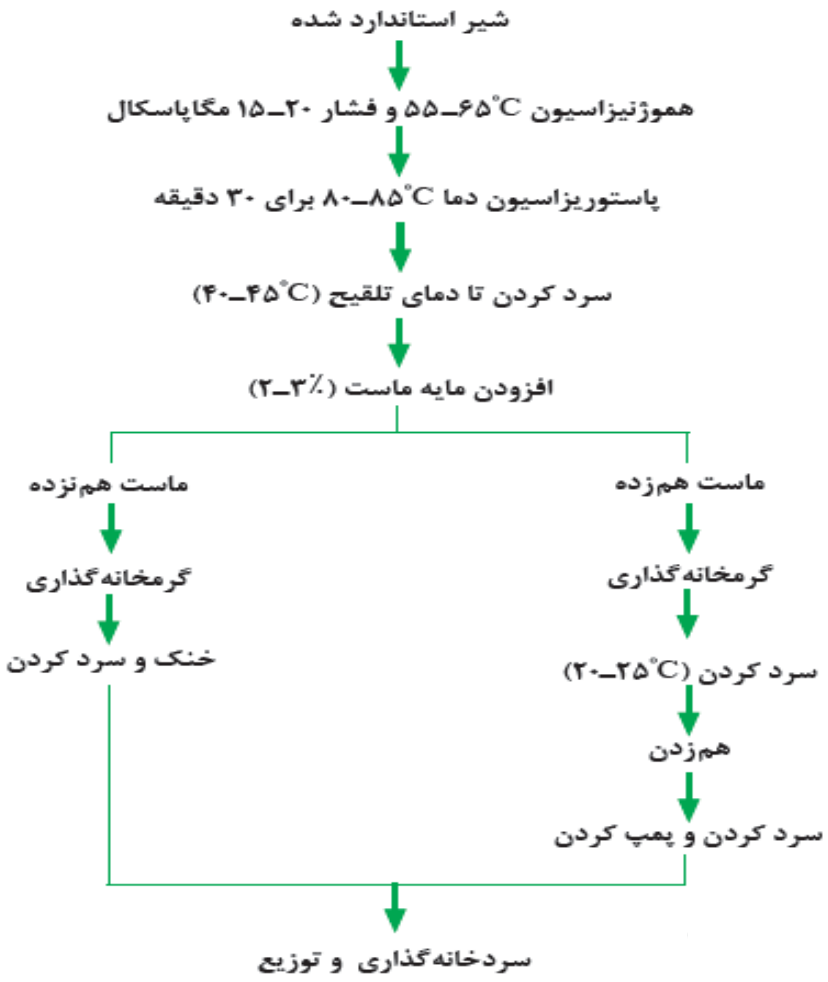
اسید لینولئیک یک نوع اسید چرب ضروری است که در چربی محصولات لبنی یافت می‌شود و تنها از طریق رژیم غذایی به دست می‌آید و از طریق بدن انسان تولید نمی‌شود. این اسید چرب یک ماده ضدسرطان است و می‌تواند خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش دهد. همچنین باعث کمک به درمان التهاب، کاهش چربی بدن به ویژه چربی شکمی، کاهش کلسترول و تری گلیسیرید، افزایش متابولیسم و تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شود (روتری و میشرا ، ۲۰۱۱).

۲-۲-۳- باکتری‌های پروبیوتیک

باکتری‌های پروبیوتیک نه تنها به تولید ویتامین K و ویتامین B کمک می‌کنند، بلکه باعث می‌شوند که کلسیم به طور قابل ملاحظه ای جذب خون شده و به استخوان‌ها برسد. محققان توصیه کرده اند که ماست به رژیم غذایی افزوده شود؛ زیرا خواص و فوایدی که باکتری‌های پروبیوتیک موجود در ماست دارند، بدن را در ساخت و جذب بسیاری از مواد مغذی ضروری کمک می‌کند (پردیگون و همکاران ، ۲۰۰۵).

۲-۳- فرآیند تولید ماست

فرآیند تولید ماست به طور کلی شامل استانداردسازی شیر، همگن‌سازی، حرارت‌دهی، تخمیر، سرد کردن و ذخیره‌سازی است (سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۵) (شکل ۴-۲). در مرحله استانداردسازی، شیر مورد استفاده برای تهیه ماست به منظور اصلاح ترکیبات موجود در آن و تهیه فراورده نهایی با کیفیت مطلوب استاندارد می‌شود و به عبارتی محتوای چربی و مواد جامد بدون چربی شیر تنظیم می‌شود. حال برای جلوگیری از جدا شدن چربی هنگام تولید و حمل و نقل، همچنین دستیابی به ماستی با قوام و پایداری بالا، انجام عملیات هموژنیزاسیون شیر ضروری است. هموژنیزاسیون باعث کاهش اندازه و در نتیجه افزایش تعداد گلبول‌های چربی می‌شود. این امر باعث پراکنش بیشتر نور شده و در نتیجه ماست سفیدتر به نظر می‌رسد. فرایند حرارتی مهم ترین مرحله در تولید محصولات تخمیری شیر است. فرایند حرارتی شیر برای تولید ماست باعث از بین بردن میکروب‌های بیماری زای احتمالی می‌شود (روزمونت ، ۲۰۰۰). تولید فراورد های تخمیری، نیاز به میکروارگانیسم های آغازگر دارد که این میکروب‌ها با فعالیت خود، اسید و ترکیبات مولد عطر و طعم ایجاد می‌کنند و به این ترتیب یک محصول تخمیری مناسب تولید می‌شود (سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۳) (شکل ۱-۲).



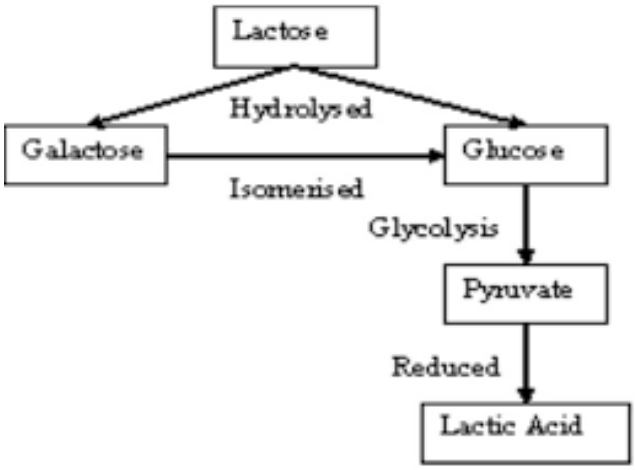
شکل ۱-۲: فرآیند تولید ماست (برگرفته از سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۵).

۲-۴- تخمیر و اهمیت آن

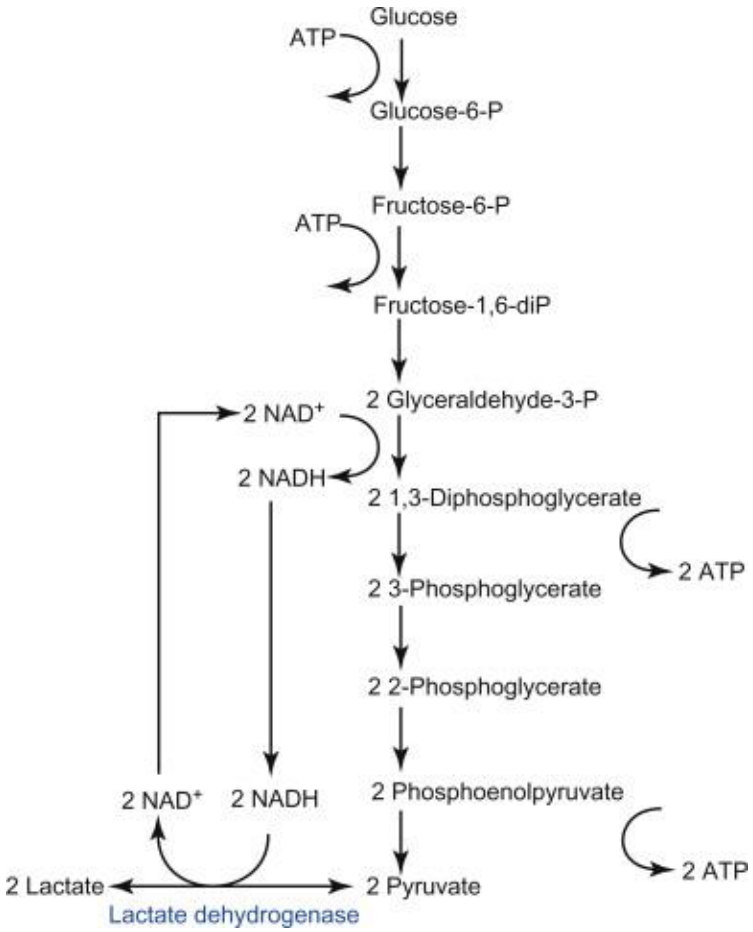
تخمیر شامل شرایطی است که در آن با تلقیح یک مایه کشت و از طریق گلیکولیز، لاکتوز شیر به اسید لاکتیک، اتانول، دی اکسیدکربن، اسید استیک، دی استیل، استالدئید و چندین ماده دیگر تبدیل می‌شود

(لی و لوسی ، ۲۰۱۰) (شکل ۲-۲ و شکل ۳-۲). در فرآیند تخمیر، به علت pH اسیدی، کمبود اکسیژن و غلظت بالای لاکتات تولید شده، احتمال بروز آلودگی میکروبی محدود است. از بین صدها هزار گونه از باکتری‌های مختلف که تاکنون شناسایی شده اند، دو گروه از آنها بیش از سایرین در فرایند تخمیر مؤثر هستند. باکتری‌های گروه اول شامل باکتری‌های اسید لاکتیک و باکتری‌های اسید استیک در تولید فرآورده‌های لبنی تخمیری نظیر ماست و گروه دوم در تولید سرکه نقش مهمی ایفا می‌کنند (اوزر و همکاران ، ۲۰۰۷).

در فرایند تخمیر، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* یک رابطه همزیستی را در فرایند تولید ماست نشان می‌دهند (تمیم ، ۲۰۰۲). طی این فرایند، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در ابتدا به سرعت رشد می‌کند و اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک تولید شده توسط فعالیت آنزیم پروتئاز *لاکتوباسیلیوس بولگاریکوس* را مصرف کرده و در عین حال با تولید اسید لاکتیک و اسید فرمیک و افزایش اسیدیته ، به نوبه خود موجب تحریک رشد *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* می‌شوند زیرا اسید لاکتیک pH را به حد بهینه برای رشد این میکروارگانسم می‌رساند (تمیم و رابینسون ، ۲۰۰۷). لازم به ذکر است که رشد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در پایین تر از pH ۴/۴-۴/۲ محدود می‌شود در حالی که محدوده pH برای *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* ۳/۸-۳/۵ است.



شکل ۲-۲: فرایند تخمیر (کورلای و همکاران ، ۲۰۰۷).



شکل ۳-۲: فرایند گلیکولیز (رابینسون ، ۲۰۰۵).

واحد ایمنی مواد غذایی سازمان بهداشت جهانی، اهمیت زیادی برای تحقیقات تخمیر به عنوان تکنیکی جهت تهیه و نگهداری مواد غذایی قائل است. تخمیر لاکتیکی غذا به عنوان یک فرآیند استاندارد، عامل کاهش خطر رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در غذا شناخته‌شده است (سودینیت و همکاران ، ۲۰۰۴). برخی از میکروارگانیسم‌های تخمیرکننده، ترکیبات ضدمیکروبی تولید می‌کنند که به ایمنی و افزایش زمان نگهداری فرآورده نهایی کمک می‌کنند (اسمیت و همکاران ، ۲۰۰۵). همچنین، فعالیت میکروارگانیسم‌ها و تخمیر شیر منجر به تولید موادی می‌شود که به فرآورده‌های تخمیری ویژگی‌های مهمی نظیر عطر، طعم و قوام می‌بخشند (سیورتس و همکاران ، ۲۰۰۸). به هر حال، از اهداف اصلی تخمیر شیر و تولید ماست می‌توان به موارد ذیل اشاره داشت: افزایش زمان ماندگاری شیر و تولید محصول جدید از طریق تشکیل لخته به واسطه کاهش pH، ایجاد طعم مطلوب، قوام مناسب و تولید ترکیبات معطر بر اثر فعالیت متابولیک کشت میکروبی افزوده شده. (لی و لوسی ، ۲۰۱۰).

۲-۵- عوامل موثر بر تخمیر

از مهم ترین عوامل مؤثر بر تخمیر فرآورده‌های شیری می‌توان به درجه حرارت، رطوبت، اسیدیته، و نوع آغازگر اشاره کرد (مرتضوی و همکاران ، ۱۳۹۱).

۲-۵-۱-درجه حرارت

درجه حرارت مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌های مختلف، متفاوت است. دمای بهینه رشد *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* ۴۵ و دمای بهینه رشد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* حدود ۳۹ می‌باشد لذا در دماهای ۴۲ تا ۴۳ درجه سانتی گراد سرعت رشد این دو باکتری مناسب است. هرچه

دما افزایش یابد، شرایط برای رشد *لاکتوباسیلوس* مناسب‌تر خواهد شد. بنابراین، در دماهای بالا سرعت تولید اسید بیشتر و محصول دارای عطر و طعم قوی تری خواهد بود. البته در این مورد، نوع آغازگر انتخاب شده و شرایط رشد آن تاثیر به سزایی بر عطر و طعم ماست دارند. هر دو باکتری مزبور در دمای یخچال فعال می‌باشند و با تبدیل لاکتوز به اسید لاکتیک باعث کاهش pH می‌شوند (سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷).

pH -۲-۵-۲

یکی از عومل کنترل کننده فرایند تخمیر، pH است. کپک‌ها و مخمرها در pH اسیدی به خوبی قادر به رشد و نمو هستند؛ در حالی که، اکثر باکتری‌ها به جز باکتری‌های اسید لاکتیک، pH نزدیک به خنثی را ترجیح می‌دهند. در مواد غذایی اسیدی و در حضور اکسیژن کافی، کپک‌ها روی سطح رشد و نمو کرده و اسید محیط را مصرف می‌کنند (لی و لوسی، ۲۰۱۰). به این ترتیب، رشد کپک‌ها از قابلیت نگهداری مواد غذایی می‌کاهد. همچنین، برخی از مخمرها در محیط‌های نسبتاً اسیدی قوی رشد می‌کنند و متابولیت-های قلیایی نظیر آمونیاک سنتز را می‌نمایند. در نتیجه این عمل، pH محیط به تدریج افزایش یافته و مقدمات فساد مواد غذایی فراهم می‌شود (سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷).

۲-۵-۳- رطوبت

رطوبت یک پارامتر کلیدی در افزایش راندمان تخمیر می‌باشد زیرا رشد میکروارگانسیم‌ها، فعالیت آنزیمی و دسترسی به سوبسترا تحت تاثیر این پارامتر می‌باشد و از طرفی سرعت انتقال اکسیژن و دی اکسید

کربن متاثر از میزان رطوبت است که به نوبه خود از عوامل موثر بر فرایند تخمیر به شمار می‌آیند (سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷).

۲-۵-۴- نوع آغازگر

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 (تمیم و رابینسون، ۲۰۰۷). با این حال، تولید سایر محصولات لبنی ممکن است به آغازگری متفاوت نیاز داشته باشد (پارنت و کوگان، ۲۰۰۴). به طور کلی برای انتخاب آغازگر باید به سه عامل مهم یعنی توانایی ایجاد بافت در محصول که اغلب از طریق تولید اگزوپلی ساکارید صورت می‌گیرد، توانایی تولید اسید و توانایی تولید عطر و طعم توجه داشت (مرتضوی و همکاران، ۱۳۹۱).

۲-۶- تغییرات انجام گرفته در فرآیند تبدیل شیر به ماست

۲-۶-۱- عطر و طعم

برای محصولات لبنی، خواص حسی مثل عطر و طعم عمدتا بستگی به تعادل نسبی ترکیبات طعم‌دار مشتق شده از کربوهیدرات، پروتئین و چربی شیر دارند. در خصوص ماست، اجزای طعم دهنده عبارتند از: ترکیبات فرار و غیرفرار موجود در شیر و ترکیباتی خاصی که در حین تخمیر شیر تولید می‌شوند. تاکنون بالغ بر ۹۰ نوع ترکیب فرار مختلف در ماست شناخته شده است که از آن میان می‌توان به موارد

ذیل اشاره داشت: ترکیبات گوگردی، الکلها، آلدئیدها، کتونها، استرها، پیرازینها و مشتقات فوران (اوت و همکاران، ۲۰۰۳).

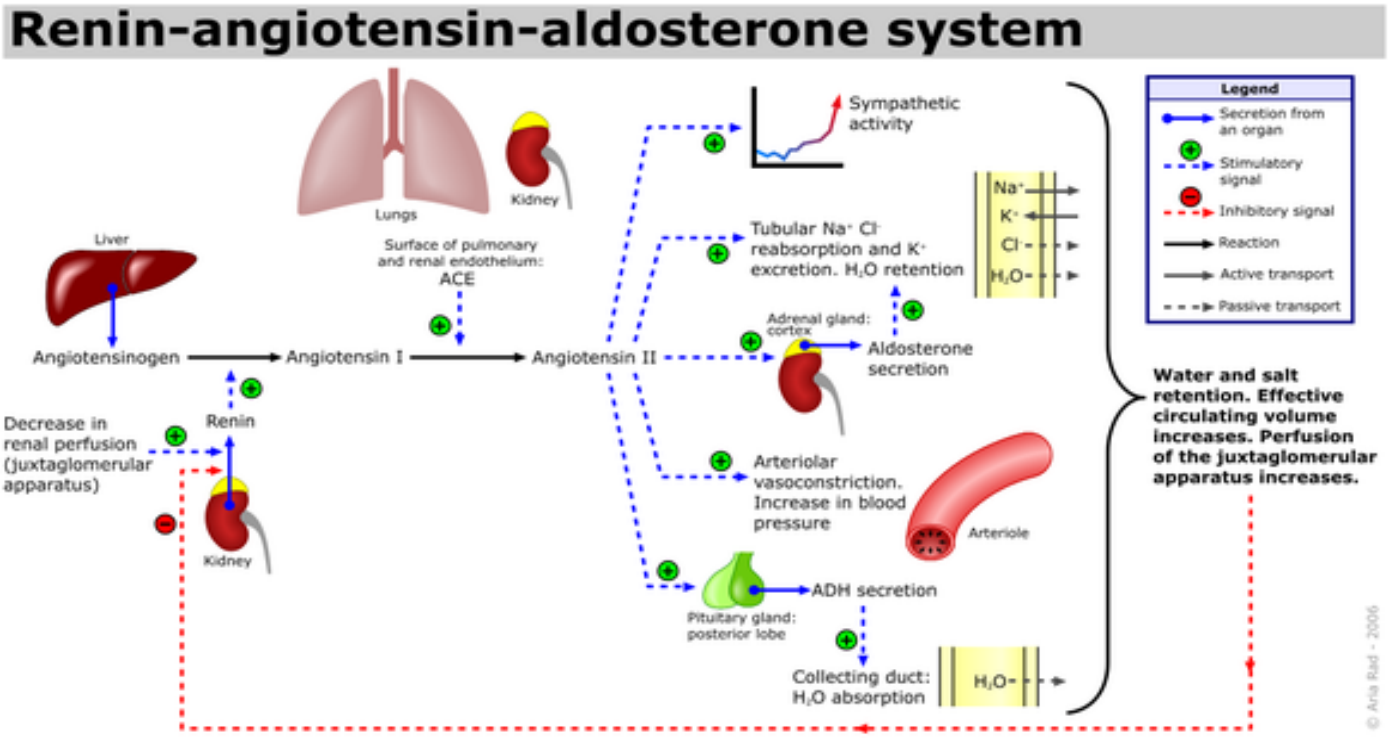
با این وجود، تمام اجزای فرار موجود در ماست به دلیل غلظت متفاوتشان از اهمیت چشایی و حسی یکسانی برخوردار نیستند و تنها زمانی که غلظت آنها از حد مشخصی تجاوز کند، قابل درک و تشخیص خواهند بود. به نظر می‌رسد که ترکیبات مولد عطر و طعم مخصوص ماست شامل اسید لاکتیک، استالدئید، دی استیل، استون و ۲- بوتانون باشند (پنگ و همکاران، ۲۰۱۴) بطوریکه زمانی که سطح مناسبی از این ترکیبات تولید شود، ماستی با عطر و طعم بسیار عالی تولید می شود. به عنوان مثال، غلظت مطلوب استالدئید در ماست بین ۲۰-۱۴ میلی گرم در کیلوگرم است، درحالیکه غلظت کمتر از ۰/۸ میلی گرم در کیلوگرم باعث ایجاد طعم ضعیف در ماست می شود و از طرفی استالدئید بیش از اندازه باعث ایجاد طعم گسی و تند در ماست می‌شود (روتری و میشرا، ۲۰۱۱).

۲-۶-۲- پپتیدهای فعال بیولوژیکی

در حال حاضر این موضوع به خوبی اثبات شده است که پپتیدهای فعال بیولوژیکی از پروتئین‌های غذایی در طول تخمیر توسط باکتری‌های اسید لاکتیک و یا هضم گوارشی تولید می‌شوند (شیمیزو و سون، ۲۰۰۷). پپتیدهای زیست فعال به عنوان قطعات پروتئینی خاصی که تاثیر فیزیولوژیکی بر بدن انسان و در نهایت بر سلامتی دارند، تعریف می‌شوند. بنابراین پتانسیل توالی‌های پپتیدی مختلف غذایی برای بهبود سلامت انسان با کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن یا بهبود سیستم ایمنی بدن به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته است (ساینف و همکاران، ۲۰۱۴). تاکنون چندین توالی پپتیدی شناخته شده است که دارای خواص درمانی مانند فعالیت ضد میکروبی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، آرامش بخش، ضد فشار خون و تقویت کننده سیستم ایمنی هستند (فیتزگرالد و مورای، ۲۰۰۶). این فعالیت‌ها

تحت تاثیر ترکیب اسید آمینه و ساختار و توالی این پپتیدهاست بطوریکه برخی از این پپتیدها خواص چندمنظوره ای را اعمال می‌کنند (شیمیزو و سون، ۲۰۰۷). در واقع، فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک در حین تخمیر شیر می‌تواند منجر به تولید پپتیدهایی با خاصیت کنترل فشار خون شود (کورهونن، ۲۰۰۹). تاکنون، چندین پپتید مهارکننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین از هیدرولیز آنزیمی شیر تخمیرشده با باکتری‌های اسید لاکتیک شناسایی شده است (پیهلانتو – لپالا، ۲۰۰۷). عملکرد این پپتیدها متکی به سیستم رنین-آنژیوتانسین است که در نگهداری دامنه نرمال فشار خون دخالت دارد (سپو و همکاران، ۲۰۱۳). مکانسیم عمل سیستم رنین-آنژیوتانسین بدین گونه است که در بدن ابتدا پیش ساز هورمون یعنی آنژیوتانسینوژن توسط کبد ساخته، در خون آزاد می‌شود (کوآتس، ۲۰۰۳). پروتئین آنژیوتانسینوژن توسط هورمون رنین به آنژیوتانسین یک تبدیل می‌شود و آنژیوتانسین یک توسط آنزیم مبدل آنژیوتانسین که بیشتر در مویرگ‌های ریه یافت می‌شود به آنژیوتانسین دو تبدیل می‌شود (ورمرسن و همکاران، ۲۰۱۴). البته این آنزیم در سایر نقاط نیز یافت می‌شود ولی محل تجمع اصلی آن آندوتلیوم مویرگ‌های ریه است. این آنزیم از گروه کینازها بوده بخش کوچکی از انتهای C آنژیوتانسین یک (دواسید آمینه His-Leu) را حذف می‌کند (گوبتی و همکاران، ۲۰۰۴). این فرایندها در کنار هم موجب نگهداری دامنه نرمال فشار خون می‌گردند (شکل ۴-۲) (شیمیزو و سون، ۲۰۰۷).

شکل ۴-۲: سیستم رنین-آنژیوتانسین (آنگر ، ۲۰۰۲).



بسیاری از پپتیدهای موجود در شیر نیز نقش تنظیم کننده در واکنش‌های اکسیداتیو که برای زنده ماندن سلول‌ها ضروری است و باعث ایجاد تغییرات اکسیداتیو با تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود ، دارند. هنگامی که رادیکال‌های آزاد بیش از اندازه تولید شوند باعث اکسید شدن پروتئین سلولی و لیپید غشایی می‌شوند و تنفس سلولی را قطع می‌کنند و باعث ایجاد آسیب هایی از جمله آرترواسکلروزیس ، دیابت ، روماتیسم مفصلی و اکسید شدن و آسیب به DNA (کلر و سوآیس گود، ۲۰۰۰) و در نهایت منجر به سرطان می‌شود. رادیکال‌های آزاد رها شده از کازئین می‌توانند تحت تاثیر فعالیت حذف و مهار قرار گیرند و مانع پرواکسیداسیون آنزیمی و غیر آنزیمی لیپیدها شوند (رایول و همکاران، ۲۰۰۱). پپتیدهای حاصل از شیر تخمیر شده توانایی قابل توجهی در مهار رادیکال‌های سوپر اکسید دارند که به ماکرومولکول‌های حیاتی سلول حمله کرده و آنها را تخریب می‌کند (ژاو و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که ماست به عنوان یک محصول لبنی حاصل از تخمیر شیر می‌تواند دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی باشد (لیندمارک و کسون، ۲۰۰۰) و ممکن است به عنوان یک محافظ بدن در برابر انواع مختلف سرطان‌ها اعمال وظیفه نماید (پیتهوا و همکاران، ۲۰۱۵).

در مطالعه‌ای توسط کورپلا[۱] و همکاران (۲۰۰۴)، تخریب پروتئین‌های شیر با پروتئینازهای جداشده از باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* منجر به تولید پپتیدهایی با خاصیت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین شد. نویسندگان نشان دادند که این پپتیدها به طور قابل توجهی فشار خون را در موش‌های دچار فشار خون بالا کاهش دادند. همچنین، ناکامورا[۲] و همکاران (۱۹۹۵) مشاهده کردند که در شیر تخمیر شده حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، پپتیدهایی را با خاصیت مهارکنندگی آنزیم مبدل

۱ Korpela
۲ Nakamura

آنژیوتانسین تولید می‌کند. محققان متوجه شدند که دو تری پپتید متفاوت یعنی والیل-پرولیل- پرولین[۳] (VPP) و ایزولوسیل-پرولیل-پرولین[۴] (IPP) مسئول خاصیت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین می-باشند. در مطالعه‌ای که توسط سپو[۵] 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.

۳ valyl-prolyl- proline
۴ isoleucyl-prolyl-proline
۵ seppo

جدول ۱-۲: نقش پپتیدهای زیست‌فعال مشتق‌شده از شیر در سیستم بدن (کورهونن، ۲۰۱۶).

پپتید های زیست فعال مشتق شده از شیر	سیستم بدن
پپتید های ضدمیکروبی	
ایمن سازی	سیستم گوارش
آرامبخش	
مهار کننده ACE	
Antithrombotic	دستگاه قلبی - عروقی
کاهنده کلسترول	
ضد فشارخون بالا	
ایمنی بخش	سیستم دفاعی بدن
Cytomodulatory	
پپتید انتقال دهنده کلسیم	سلامت استخوان
لاکتوفرین	

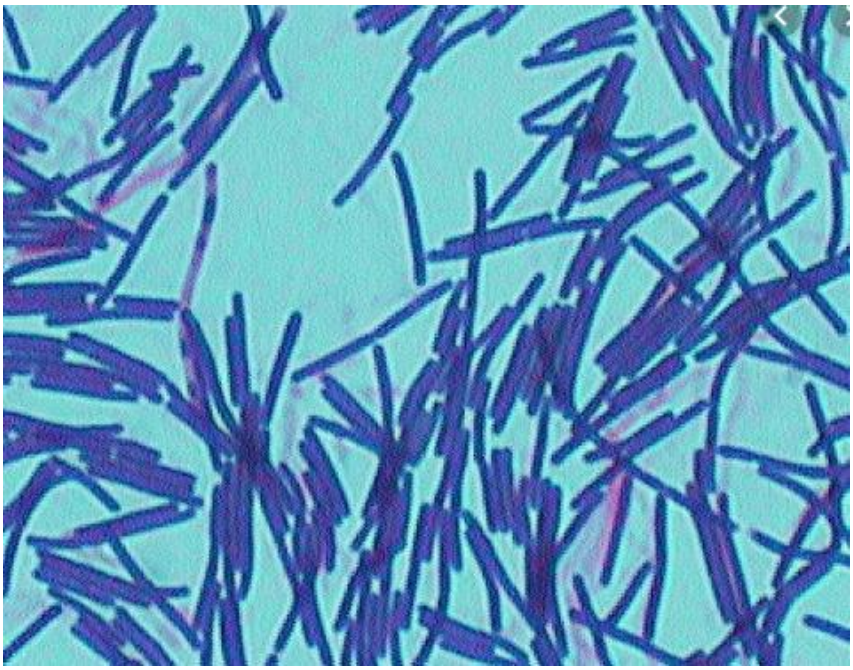
جدول ۲-۲: پپتیدهای زیست‌فعال مشتق شده از پروتئین‌های شیر با خاصیت آنتی-اکسیدانی (کورهونن، ۲۰۱۶).

منبع پروتئین	آنزیم	توالی پپتیدی	فعالیت آنتی اکسیدانی
کازئین	تریپسین	Val-Lys-Glu-Ala-Pro-Lys	مهار پرواکسیداسیون لیپید
کازئین	پپسین	Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu	مهار رادیکال های آزاد
بتا-لاکتوگلوبولین	corols	-	مهار رادیکال های آزاد

۲-۷- آغازگرهای همراه در تخمیر و تولید ماست

آغازگرهای همراه میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که یا به طور طبیعی در شیر وجود دارند یا می-توانند 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 (برمن و هارتونگ، ۲۰۱۳). 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 (پارنت و کوگان، ۲۰۰۴). در حوزه صنعت تولید ماست ، نتایج حاصل از مطالعات نشان داده است که باکتری‌های اسید لاکتیک باعث

افزایش پروتئولیز و کاهش زمان تخمیر می‌شوند (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۷). امروزه به طور فراوانی از باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* به عنوان آغازگر همراه در تولید محصولات شیری تخمیر شده استفاده می‌شود (ژاو و همکاران، ۲۰۱۹) (شکل ۵-۲).



شکل ۵-۲: *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*

۲-۸- تاثیرات آغازگرهای همراه در تخمیر و تولید ماست

۲-۸-۱- افزایش تولید پپتیدها با فعالیت مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین

برخی از گونه‌های *لاکتوباسیلوس* را چه به عنوان آغازگر یا کمک آغازگر برای افزایش تولید پپتیدها با فعالیت مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین در محصولات لبنی استفاده می‌کنند. میزان مهار کننده‌های ACE آزاد شده وابسته به مرحله تخمیر است. لازم به ذکر است که پروتئولیز بیش از حد می‌تواند فعالیت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین در محصولات لبنی تخمیری را کاهش دهد (چاوز-لپ و همکاران، ۲۰۱۴). از طرفی این باکتری‌ها می‌توانند با تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی ویسکوزیته ماست را افزایش دهند (دا سیلوا و همکاران، ۲۰۱۷).

۲-۸-۲- افزایش تولید ترکیبات فرار مسئول عطر و طعم

تاکنون، بیش از ۴۰۰ ترکیب فرار در فرآیند تخمیر شیر توسط باکتری‌های اسید لاکتیک شناخته شده است (چنج، ۲۰۱۰). برای مثال، استوئین ماده ای با طعم بسیار مطلوب است که در بسیاری از محصولات لبنی تخمیر شده از جمله ماست وجود دارد. این ماده دارای طعمی خامه ای ملایم، کمی شیرین و کره ای است (رونکال و همکاران، ۲۰۱۷). افزایش تولید ترکیبات فرار مسئول عطر و طعم در مطالعات مختلفی نشان داده شده است. در این راستا، ژاو و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که تمام شیرهای تخمیر شده حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان آغازگر همراه دارای استوئین بیشتری نسبت به نمونه‌های تولید شده فقط با آغازگر تجاری بودند. علاوه بر استوئین، در میان ترکیبات طعم دهنده، بنزآلدئید منحصرا در شیرهای تخمیر شده حاوی آغازگرهای همراه تشخیص داده شده است که این ممکن است از

اکسیداسیون اسیدهای چرب از جمله α- اکسیداسیون فنیل استالدئید یا β- اکسیداسیون اسید سینامیک باشد.

۲-۸-۳- تولید ترکیبات ضد میکروبی

امروزه، توجه ویژه‌ای به آغازگرهای همراه شده است چرا که آنها با تولید ترکیبات ضد میکروبی، تاثیرات مثبتی بر بهبود کیفیت و ماندگاری مواد غذایی دارند و در نهایت ثبات ماده غذایی تولید شده را افزایش می‌دهند. نتایج مطالعات اخیر نشان می‌دهد که باکتری‌های کمک آغازگر در طول تخمیر محصولات لبنی می‌توانند باعث مهار رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* شوند (دل-بلو و همکاران ، ۲۰۱۲). این فعالیت ضدمیکروبی آغازگرهای همراه به جز رقابت در رشد می‌تواند ناشی از تولید متابولیت‌هایی مانند اسیدهای آلی (لاکتیک، پروپیونیک، استیک اسید و فنیل لاکتیک اسید)، دی اکسید کربن، اتانول و سایر متابولیت-ها با وزن مولکولی کم مانند پپتیدها باشد (ژاو و همکاران ، ۲۰۱۹).

۲-۹- پیشینه پژوهش

شوری و بابا (۲۰۱۶) در مطالعه ای، شیر بدون چربی را با ۱۴ نوع آغازگر تجاری متفاوت تحت فرآیند تخمیر قرار دادند و سپس میزان پروتئولیز، بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین 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. نویسندگان نشان دادند که در میان آغازگرهای مورد استفاده، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (Lh-B02) بالاترین درجه از پروتئولیز و بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین را داراست. آغازگرهای *لاکتوباسیلوس کازئی* (01)، Yo-Fast1، YC-281، MYE 96 و YO-Mix 205 نیز بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH را از خود نشان دادند و آغازگر *لاکتوباسیلوس کازئی* (۰۱) بیشترین میزان خاصیت مهار کنندگی یون آهن را نشان داد. بر اساس نتایج پژوهش، آغازگر Yo-Fast1 فعالیت پروتئولیتیک، بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را نشان داد. همچنین، همبستگی مثبتی بین فعالیت-های پروتئولیتیک و بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین و آنتی‌اکسیدانی تمام آغازگرها مشاهده شد.

پارمر و همکاران (۲۰۱۷)، ارتباط بین پروتئولیز و مهار ACE را در انواع پنیر Brie ، Castello ، Gamalost ، Pultost و Norvegia مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاصل از بررسی آنها افزایش فعالیت مهار کنندگی 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 (۲۴

میلی متر جیوه). سه قطعه پپتیدی دیگر توسط کروماتوگرافی آب گریز یافت شد که میزان فشار خون در موش ها (SBP)[۶] را به ترتیب به میزان ۱۵ ، ۱۸/۸ و ۲۱/۲ میلی متر جیوه کاهش داد.

شاه و همکاران (۲۰۰۸)، مطالعه و پژوهشی در ارتباط با تاثیر کازئین و همچنین تاثیر هشت نمونه کازئینات سدیم بر مهار سلول‌های سرطانی انسان انجام دادند. نتایج نشان داد که پپتیدهای مشتق شده از کازئین اثرات خاصی را روی توالی‌های سلولی مورد هدف نشان داده و تاثیرات متنوعی روی فعالیت میتوکندری و سنتز DNA در سلول‌های مختلف دارند .

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 آنتی‌اکسیدانی بالاتر به عنوان آنتی اکسیدان‌های غذایی می‌باشد.

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. در حالی که میزان فعالیت در طول ۴ ماه اول کاهش یافت و زمانی که پروتئولیز شدیدتر شد فعالیت مهار کنندگی هم افزایش یافت و دوباره در ۱۲ ماه از زمان رسیدن پنیر میزان فعالیت کاهش یافت.

---

[۶] Systolic blood pressure

ناگوکا و همکاران (۲۰۰۱)، پپتید کاهنده کلسترول (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys) بدست آمده از قطعه پروتئینی b- lg، را شناسایی کردند. این پپتیدها میزان کلسترول خون را توسط سلول‌هایی که عمل جذب کلسترول را انجام می‌دهند، کاهش می‌دهد، همچنین نتایج حاصل از این مطالعه کاهش میزان کلسترول را در بدن موش‌های زنده پس از مصرف پپتیدهای خوراکی به خوبی نشان دادند. مکانیسم جذب کلسترول توسط این پپتیدها هنوز به طور دقیق مشخص نشده است.

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 آنتی‌اکسیدانی 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 اندازه گیری 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.

ناکامورا و همکاران (۱۹۹۵)، پپتید های مهار کننده ACE را از Calpis ، یک نوشیدنی ملایم ژاپنی تولید شده از شیر تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *ساکارومایسس سرویزیه* خالص سازی کردند. پپتید های ضد فشار خون Val-Pro-Proαs1 و Ile- Pro-Pro که از αs1 و β-CN بدست آمده بودند میزان فشار خون را به طور قابل توجهی پس از ۴ الی ۸ هفته مصرف لبنیات کاهش دادند.

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 ۱±۵ درجه سانتی گراد بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از ترکیبات پری بیوتیک به طور معنی داری موجب افزایش ظرفیت نگهداری آب ، پروتئولیز و خاصیت مهارکنندگی ACE نمونه های ماست گردید. همچنین تاثیر ترکیبات پری‌بیوتیک و باکتری پروبیوتیک بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها کاملا معنادار گزارش شد و زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در نمونه‌های تیمار شده با اینولین و فیبر گندم در طول دوره نگهداری افزایش یافت.

چوی و همکاران (۲۰۱۲)، تاثیر افزودن *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* (SS1) و *لاکتوباسیلوس لاکتیس* زیرگونه *کرموریس* (FT4) 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 f6-14 ، f7-14 ، f73-82 ، f74-82 و f75-82 بیشترین خاصیت مهارکنندگی ACE را نشان دادند. اکثر این توالی‌ها دارای ویژگی‌های مشترک با دیگر پپتیدهای مهارکننده ACE بودند.

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد، وسایل و تجهیزات مورد استفاده

مواد، وسایل و تجهیزات مورد استفاده در این پژوهش شامل موارد ذیل بودند:

۳-۱-۱- محیط کشت‌ها

محیط‌های کشت مورد استفاده در این پژوهش به شکل ذیل بودند:

۱- PDA[۷] (مرک، آلمان)

۲- M17[۸] (کیولب، کانادا)

۳- MRS[۹] (کیولب، کانادا)

۳-۱-۲- سویه‌های میکروبی

در این پژوهش، آغازگر تجاری ماست (شامل دو سویه *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس*) از شرکت DSM هلند همراه با ۱۰ جدایه کمک آغازگر مختلف به دست آمده از ماست سنتی خراسان (حاجی محمدی فریمانی، ۱۳۹۴) به صورت ترکیبی برای تولید ۱۱ نمونه ماست مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱-۳).

[۷] Potato Dextrose Agar

[۸] M17 broth

[۹] De Man, Rogosa, Sharpe

جدول ۱-۳: فهرست باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش

شماره ایزوله	منبع جداسازی	کد / نام باکتری
۷۱	شیر توماغ	L1 /*لاکتوباسیلوس لاکتیس*
۶۶	ماست توماغ	L2 /*لاکتوباسیلوس لاکتیس*
۷۳/۱	ماست توماغ	L3 /*لاکتوباسیلوس لاکتیس*
۷۵	ماست توماغ	L4 /*لاکتوباسیلوس لاکتیس*
۸۲	ماست همزه- کانلو	L5 /*لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*
۸۷	ماست همزه- کانلو	L6 /*لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*
PTCC1333	مرکز کلکسیون باکتری ها و قارچ های ایران	L7 /*لاکتوباسیلوس دلبروکی*
۵۷	ماست کنارخانه	P1 / *پدیوکوکوس پنتوساسئوس*
۵۸	ماست کنارخانه	P2 / پدیوکوکوس پنتوساسئوس
۳۲	شیر نهور	V/ *ویسلا سیباریا*
-	شرکت DSM	A / آغازگر تجاری ماست

جدول ۲-۳: فهرست نمونه‌های ماست

شماره نمونه	کد نمونه	سویه های به کار رفته در نمونه های ماست
۱	AL_1	آغازگر تجاری +*لاکتوباسیلوس لاکتیس* (کد۷۱)
۲	AL_2	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس لاکتیس* (کد ۶۶)
۳	AL_3	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس لاکتیس* (کد ۷۳/۱)
۴	AL_4	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس لاکتیس* (کد ۷۵)
۵	AL_5	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* (کد۸۲)
۶	AL_6	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* (کد ۸۷)
۷	AL_7	آغازگر تجاری+*لاکتوباسیلوس دلبروکی* (PTCC1333)
۸	AP_1	آغازگر تجاری+*پدیوکوکوس پنتوساسئوس* (کد ۵۷)
۹	AP_2	آغازگر تجاری+*پدیوکوکوس پنتوساسئوس* (کد ۵۸)
۱۰	AV	آغازگر تجاری + *ویسلا سیباریا* (کد ۳۲)
۱۱	AA	آغازگر تجاری به تنهایی (نمونه کنترل)

۳-۱-۳- مواد شیمیایی مصرفی

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش و شرکت تولید کننده آنها به شرح ذیل بودند:

- آگار (مرک، آلمان)
- گلیسرول (مرک، آلمان)
- معرف فنل فتالئین (مرک، آلمان)
- محلول هیدروژن پراکسید ۳٪ (مرک، آلمان)
- رنگ کریستال ویوله (مرک، آلمان)
- محول رنگی لوگول (مرک، آلمان)
- محلول الکل- استن (مرک، آلمان)
- محلول سافرانین (مرک، آلمان)
- قرص رینگر (مرک، آلمان)
- بروموکرزول بنفش (مرک، آلمان)
- برومو کرزول سبز (سامچون، چین)
- شناساگر اورتوفتال دی آلدهید (سیگما آلدریچ، آمریکا)
- سدیم دو دسیل سولفات (سیگما آلدریچ، آمریکا)
- نمک هیدروکسید سدیم (مرک، آلمان)
- آنزیم ACE (سیگما آلدریچ، آمریکا)
- هیپوریل-هیستیدین-لوسین (سیگما، آلدریچ آمریکا)
- محلول فروزین (سیگما آلدریچ، آمریکا)
- واکنشگر ۲،۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (سیگما آلدریچ، آمریکا)

- کلرید آهن (مرک، آلمان)
- شناساگر بتامرکاپتواتانول (سیگما آلدریچ، آمریکا)

۳-۱-۴- سایر مواد مصرفی

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 خصوصیات زیر تهیه شد: چربی ۳ درصد، ماده خشک ۸/۲ درصد، پروتئین ۳/۲۲ درصد، pH = ۶/۹۰.

۳-۱-۵- وسایل و تجهیزات مورد استفاده

وسایل و تجهیزات مورد استفاده در این پژوهش به شرح ذیل بودند:

- ظروف یکبار مصرف پلاستیکی صد میلی لیتر
- میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری
- سمپلر ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰، شرکت اپندورف آلمان
- نوک سمپلر ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر ماکسول
- پلیت یک بار مصرف استریل (۱۶×۸۰ cm)
- لوله دورها
- فالکون ۲۵ و ۵۰ میلی لیتری
- ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ متلر تولدو، EK 300i
- ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ ، شرکت کرن آلمان

- pH متر، (متروم، سوئیس)
- گرمخانه ۳۰ درجه سانتی گراد، (ممرت، آلمان)
- گرمخانه ۴۵ درجه سانتی گراد، (ممرت، آلمان)
- سانتریفوژ یخچال دار، (سیگما، آلمان)
- شیکر لوله آزمایش، (لابترون، ایران)
- میکروفیوژ، (شرکت خرداد، ایران)
- میکروسکوپ Olympus) DG12، ژاپن)
- بن ماری، (ممرت، آلمان)
- اسپکتروفتومتر، (Agilent، آمریکا)
- اتوکلاو
- یخچال

۳-۲- مرحله مقدماتی آزمایش

۳-۲-۱- فعالسازی سویه‌ها

ابتدا کمک آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش، در محیط کشت مایع M17 و MRS کشت داده شدند. پس از فعال شدن، کمک آغازگرها در محیط کشت آگار M17 و MRS به صورت خطی کشت داده شدند و در ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت 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.

۳-۲-۲-آزمون رنگ آمیزی گرم

آزمون رنگ آمیزی گرم سویه‌ها به ترتیب مراحل زیر انجام شد:

۱- در مرحله اول یک گسترش از سویه مورد نظر بر روی یک لام تهیه شد.

۲- سپس مقداری از رنگ کریستال ویوله با قطره چکان به سطح لام ریخته شد و پس از گذشت ۱ دقیقه، جهت نفوذ رنگ به دیواره سلولی میکروب‌ها، سطح لام با استفاده از آب مقطر شست و شو داده شد تا رنگ اضافی از سطح لام خارج شود.

۳- در مرحله سوم، مقداری محلول لوگول با قطره چکان روی سطح لام ریخته شد. پس از گذشت مدت زمان ۱ دقیقه، مقدار لوگول اضافی دور ریخته شد و سطح لام با آب مقطر شست و شو داده شد.

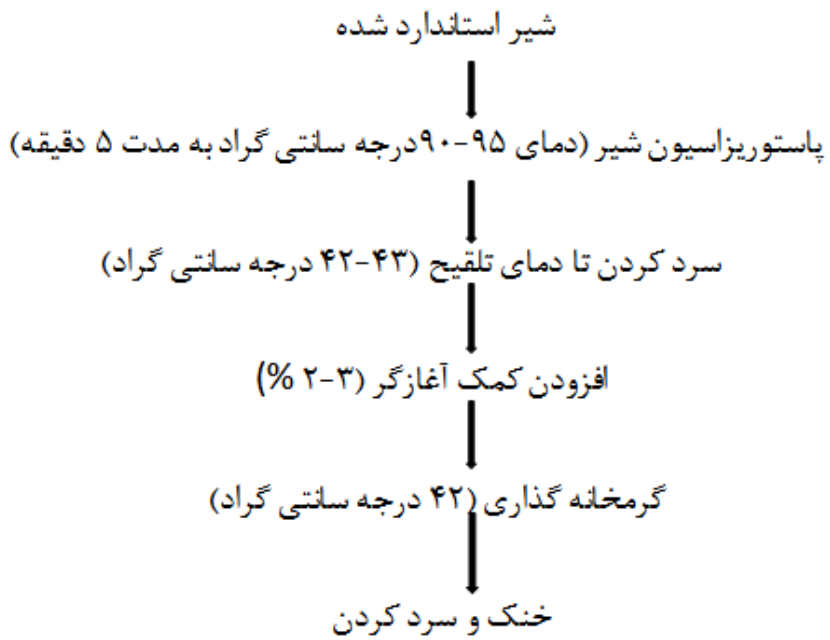
۴- در مرحله چهارم، محلول استن – الکل به مدت ۳۰ ثانیه به سطح لام اضافه شده و پس از آن با آب مقطر شست و شو داده شد.

۵- در مرحله پنجم، سطح لام به طور کامل با محلول رنگی سافرانین پوشانده شده و پس از ۶۰-۳۰ ثانیه با آب مقطر شست و شو داده شد.

پس از رنگ آمیزی نمونه‌ها، برای مشاهده رنگ کلنی‌ها و به دنبال آن تشخیص خصوصیات سویه‌ها، از جهت گرم مثبت بودن یا گرم منفی بودن، تشخیص شکل ظاهری (کروی، میله ای یا خوشه ای)، لام مربوطه پس از خشک شدن کامل لایه میکروبی، به میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۱۰۰× انتقال داده شد (براون و بنسون ، ۲۰۰۱).

۳-۳- تولید ماست با استفاده از آغازگرهای تجاری و کمک آغازگرهای بومی

مطابق با شکل ۱-۳، ابتدا شیر حاوی ۳٪ چربی و ۳/۵ ٪ پروتئین، تحت دمای ۹۵-۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شد. سپس، ظرف حاوی شیر در حمام آب سرد تا دمای ۴۳-۴۲ درجه سانتی گراد خنک شد و پس از آن آغازگر تجاری و سویه‌های میکروبی به میزان ۳٪ به شیر تلقیح شدند و مخلوط کاملا هم زده شد و در نهایت در لیوان‌های ۱۰۰ میلی لیتری استریل پر شد و به گرمخانه با دمای ۴۲ درجه سانتی گراد منتقل شد و تا زمان رسیدن pH به ۴/۶، نمونه‌ها مرتبا کنترل شدند و پس از خروج از گرمخانه به یخچال با دمای ۵ درجه سانتی گراد منتقل شدند و به مدت ۲۱ روز در دمای اشاره شده نگهداری شدند و هر ۵ روز یکبار نمونه برداری برای آزمون‌های مورد نظر انجام شد.



شکل۱-۳: مراحل تولید ماست در این پژوهش.

۳-۴-آزمایشات فیزیکوشیمیایی ماست

۳-۴-۱- اندازه گیری اسیدیته

جهت اندازه گیری اسیدیته نمونه‌های ماست، ابتدا نمونه کاملا هم زده و یکنواخت شد، سپس ۹ گرم از نمونه را داخل بشر وزن کرده و با آب عاری از دی اکسید کربن آن را به حجم رسانده و مقدار ۰/۵ میلی لیتر معرف فنل فتالئین یک درصد به آن اضافه شد و تیتراسیون تا ظهور رنگ صورتی کم رنگ که به مدت ۵ ثانیه پایدار بماند، با هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال انجام شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۵). اسیدیته بر حسب درصد اسید لاکتیک با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد اسیدیته} = \frac{N \times ۰/۰۰۹ \times ۱۰۰}{V}$$

که در آن:

۰/۰۰۹ گرم اسید لاکتیک معادل ۱ میلی لیتر سود ۰/۱ نرمال مصرف شده می‌باشد.

N = مقدار میلی لیتر سود ۰/۱ نرمال مصرف شده می‌باشد.

V = حجم آزمونه

لازم به ذکر است که آزمون اندازه گیری اسیدیته نمونه‌های ماست هر ۵ روز یکبار به مدت ۲۱ روز انجام گرفت.

۳-۴-۲- اندازه گیری pH

برای اندازه‌گیری pH نمونه‌های ماست، ابتدا pH متر (متروم، سوئیس) با استفاده از محلول‌های بافر ۴ و ۷ در دمای ۲۰ درجه سلسیوس تنظیم شده 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.

۳-۴-۳- اندازه گیری درجه پروتئولیز نمونه‌های ماست با روش OPA

جهت 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 سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس، نمونه‌های ماست با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور g× ۶۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت، میزان pH سرم جداشده با سود ۰/۱ مولار روی ۷ تنظیم شد و مجددا با همان شرایط سانتریفیوژ شد. سرم جدا شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بعد از تهیه عصاره ماست، اندازه گیری درجه پروتئولیز یا محتوای نیتروژنی آمینو آزاد ماست بر اساس روش واکنشگر OPA بر اساس روش نیلسن و همکاران (۲۰۰۱) با اندکی تغییرات انجام شد. در این روش، واکنش میان گروه آمین آزاد و OPA در حضور بتامرکاپتواتانول به شکل یک ترکیب رنگی قابل شناسایی در طول موج ۳۴۰ نانومتر در یک اسپکتروفتومتر انجام می‌شود. بر این اساس، ابتدا واکنشگر 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 ٪۹۷ در ۲ میلی لیتر اتانول حل

شده و مابقی با آب دیونیزه انتقال یافت. در ادامه، ۰/۲۵ میلی لیتر بتامرکاپتواتانول به این محلول اضافه شده و حجم محلول با آب دیونیزه به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس، 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. از آمینواسید سرین به عنوان استاندارد استفاده شد، زیرا این آمینواسید واکنش بسیار نزدیک به میانگین پاسخ سایر آمینواسیدها نشان داده است. نتایج گروه‌های آمین آزاد در برابر منحنی استاندارد سرین محاسبه شد. بدین صورت که جذب محلول‌های استاندارد حاوی۰/۲۰، ۰/۴۰، ۰/۶۰ ، ۰/۸۰ ، ۱ و ۱/۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر سرین، در ۳۴۰ نانومتر قرائت شده و منحنی استاندارد رسم شد. با قرار دادن جذب های قرائت شده متعلق به نمونه‌ها در معادله منحنی استاندارد، غلظت پپتیدی بر حسب میلی گرم در میلی لیتر محاسبه شد.

۳-۴-۴- اندازه گیری فعالیت مهار کنندگی ACE نمونه‌های ماست

جهت تهیه عصاره ماست، نخست مقدار ۲۵ گرم نمونه ماست در g× ۶۵۲۶ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس pH سوپرناتانت با سود ۰/۱ نرمال به ۸/۳ رسانده شد. در ادامه، میزان خاصیت مهار کنندگی ACE پپتیدهای حاصله به روش زیر مورد بررسی قرار گرفت: میزان مهار ACE بر اساس روش نیلسن و همکاران (۲۰۰۹) با اندکی تغییرات انجام گرفت. در این روش، ابتدا محلول سوبسترای بافر توسط حل کردن ۵ میلی مول هیپوریل- ال – هیستیدین – ال – لوسین در ۱۰۰ میلی مول محلول بافر سدیم بورات حاوی ۳۰۰ میلی مول NaCl (pH 8.3) تهیه می‌شود. سپس، چهار میکروتیوب به شرح زیر آماده می‌شود:

میکروتیوب A : ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای بافر + ۴۰ میکرولیتر آب مقطر +۲۰ میکرولیتر ACE

میکروتیوب B: ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات +۶۰ میکرولیتر آب مقطر

میکروتیوب C: ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات +۴۰ میکرولیتر عصاره ماست +۲۰ میکرولیتر ACE

میکروتیوب D: ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات +۴۰ میکرولیتر عصاره + ۴۰ میکرولیتر آب مقطر.

سپس تمام میکروتیوب‌ها در ۳۷ درجه سانتی گراد برای ۳۵ دقیقه گرمخانه گذاری می‌شوند. واکنش با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک (HCl) یک نرمال متوقف می‌شود. در ادامه، یک میلی لیتر اتیل استات به هر لوله، جهت استخراج اسید هیپوریک آزاد شده، اضافه می‌شود و لوله‌ها برای ۲۰ ثانیه و در ۱۵۰۰×g برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شوند. در مرحله بعد، یک الیکوت از فاز آلی در ۸۰ درجه سانتی گراد برای ۹۰ دقیقه بخار می‌شود و باقی مانده در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل شده و به شدت هم زده می‌شود. در مرحله بعد میزان جذب در ۲۲۸ نانومتر اندازه گیری شده و میزان فعالیت مهارکنندگی آنزیم ACE با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

درصد فعالیت مهار کنندگی =(1-(C-D)/(A-B))×100

که در آن:

A میزان جذب در حضور ACE و بافر

B جذب فقط در حضور بافر

C میزان جذب در حضور ACE ، عصاره و بافر

D میزان جذب در حضور عصاره و بافر

۳-۴-۵- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های ماست

۳-۴-۵-۱- روش DPPH

جهت تهیه عصاره ماست، نخست ۲۰ گرم نمونه ماست با ۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و توسط سانتریفیوژ با دور ۷۵۰۰×g سانتریفیوژ شد. میزان pH مایع رویی بر روی ۴ تنظیم گردید و مجددا سانتریفیوژ انجام شد و pH مایع رویی بر روی ۷ تنظیم شد. در ادامه، از این محلول برای تعیین خاصیت آنتی اکسیدانی به روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH استفاده شد.

برای اندازه گیری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال تولیدشده در نمونه‌های ماست، روش DPPH (واکنشگر ۲,۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل) که توسط کیم و همکاران (۲۰۰۷) شرح داده شده است، استفاده شد. این روش بر اساس تسخیر رادیکال DPPH توسط آنتی اکسیدان‌های تولیدشده است که سبب کاهش میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر می‌شوند. برای اجرای این روش، ۳ میلی لیتر واکنشگر DPPH در۶۰ میلی مولار متیل الکل حل شده، محلول همگن شده و به یک بطری شیشه ای تیره منتقل شد. محلول تهیه شده در روز آزمایش مورد استفاده قرار گرفت بدین ترتیب که مقدار ۰/۱ میلی لیتر از نمونه (۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) در فضایی تاریک و بدون نور به لوله‌های آزمایش حاوی ۳/۹ میلی لیتر رادیکال DPPH منتقل شده و با تکان دادن به خوبی مخلوط همگین شد. بعد از گذشت ۴۵ دقیقه، فعالیت آنتی اکسیدانی و جذب رادیکال‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در طی واکنش، به همان نسبت (۰/۱ میلی لیتر آب مقطر و ۳/۹ میلی لیتر رادیکال DPPH) از آب مقطر و رادیکال DPPH به عنوان شاهد استفاده شد. متیل الکل نیز به عنوان blank در نظر گرفته شد.

منحنی استاندارد نیز با استفاده از غلظت‌های ۰ تا ۶۰ میکرومولار از DPPH در نمونه‌ها و بازه‌های زمانی مختلف رسم شده و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی از فرمول زیر محاسبه شد:

درصد مهار رادیکال‌های آزاد = {1-(A/A0)} × 100

که در آن:

A: میزان جذب در آزمون

A0: میزان جذب blank.

۳-۴-۵-۲- روش مهار یون فلزی (آهن دو ظرفیتی)

برای اجرای این روش، ۱ میلی لیتر از عصاره نمونه مورد نظر با ۲/۷ میلی لیتر آب مقطر رقیق شده و ۲ میلی مول بر لیتر محلول FeCl2 (۰/۱ میلی لیتر) به آن اضافه شد. پس از ۳ دقیقه، با اضافه کردن ۵ میلی مول فروزین (۰/۲ میلی لیتر) واکنش مهار شد. در مرحله بعد، نمونه 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. بلانک نیز بدون عصاره نمونه، به روش مشابه تهیه شد و 0.1 mg/ml (EDTA) به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت (آلا و همکاران ، ۲۰۱۶). ظرفیت مهار یون فلزی (آهن دو ظرفیتی) نیز به شرح زیر محاسبه شد:

Fe^{2+} chelating activity (%) = (A0 – As)/A0 ×100

که در آن:

A0 میزان جذب بلانک در ۵۶۲ نانومتر

As میزان جذب عصاره نمونه در ۵۶۲ نانومتر.

۳-۵-آنالیز میکروبی نمونه‌های ماست در زمان نگهداری

برای شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک ابتدا رقت‌های مورد نیاز از آنها تهیه شد به این ترتیب که ۱۰ گرم از نمونه ماست موردنظر با ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر استریل کاملا مخلوط شد و به این ترتیب رقت ۰/۱ تهیه گردید و سپس ۱ میلی لیتر از رقت تهیه‌شده مجددا با ۹ میلی لیتر محلول رینگر استریل مخلوط شده و رقت ۰/۲ تهیه شد، به همین ترتیب تا رقت ۵- برای این آزمون تهیه گردید.

در مرحله دوم، جهت شمارش و بررسی زنده مانی باکتری‌های اسید لاکتیک، میزان یک میلی لیتر از هر ۵ رقت تهیه شده (رقت ۱- ، ۲- ، ۳- ، ۴- ، ۵-) توسط سمپلر داخل پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS توزیع شد و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد 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).

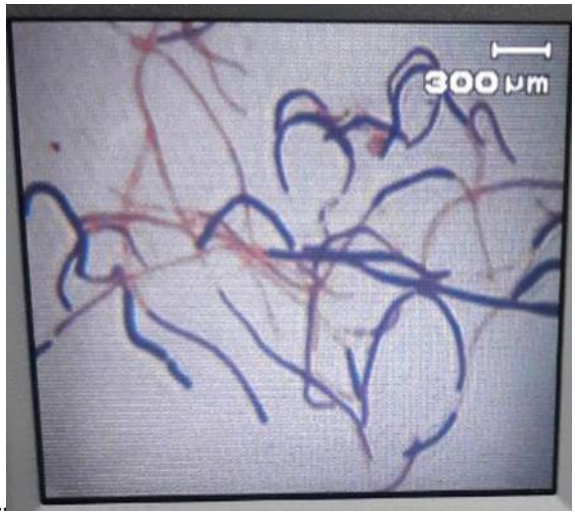
۳-۶-تجزیه و تحلیل آماری

به منظور ارزیابی اثر متغیرهای اضافه شده بر ویژگی‌های مورد بررسی، پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی در دو تکرار انجام شد. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و در سطح معناداری ۰/۰۵ با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد و نمودارها به وسیله نرم افزار EXCEL رسم شدند.

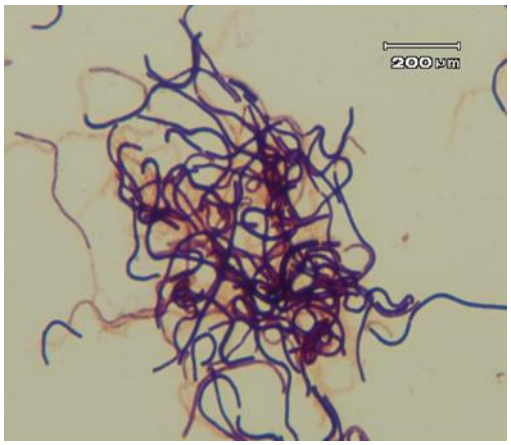
فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱-رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی

نتیجه رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی سویه‌های میکروبی مورد استفاده در این تحقیق در شکل ۱-۴ تا ۵-۴ نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده، کلیه سویه‌ها گرم مثبت می‌باشند و شکل سلولی آنها میله ای یا کروی بود.

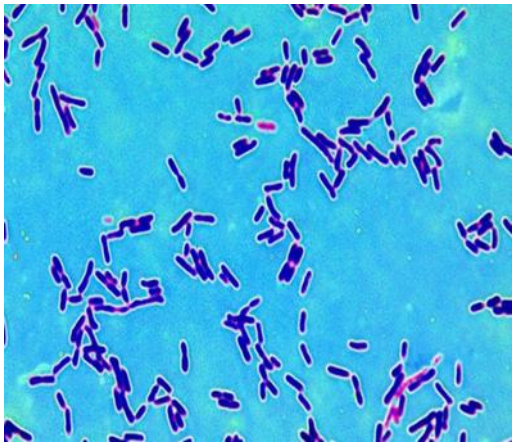


شکل ۱-۴: جنس *لاکتوباسیلوس لاکتیس* (میکروسکوپ نوری، Olampus)

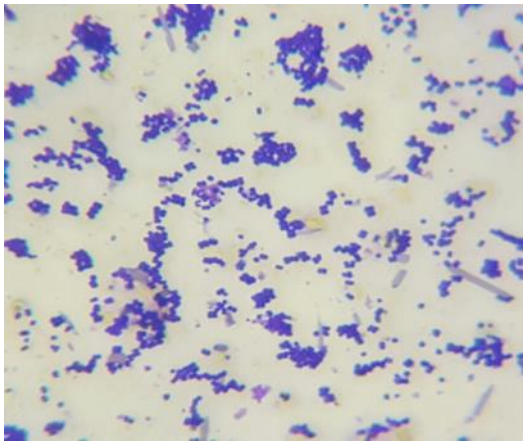


شکل ۲-۴: جنس *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* (میکروسکوپ نوری، Olampus)

شکل ۳-۴: جنس *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *دلبروکی* (میکروسکوپ نوری، Olampus)



شکل ۴-۴: جنس *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* (میکروسکوپ نوری، Olampus)



شکل ۵-۴: جنس *ویسلا سیباریا* (میکروسکوپ نوری، Olampus)

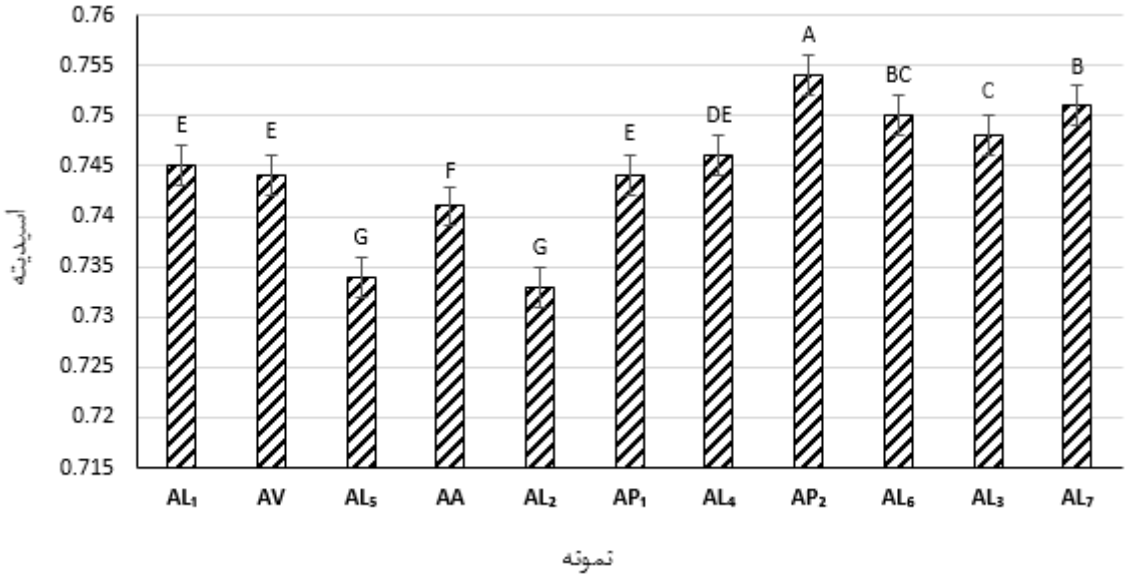
برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از اثر متغیرهای اضافه‌شده بر ویژگی‌های مورد بررسی، به دلیل زیاد بودن تعداد سویه‌های مورد استفاده و حجم داده‌ها، آنالیز داده‌ها و تفسیر آنها در دو گروه جداگانه بررسی گردید که هر گروه شامل ۶ نمونه ماست بود. گروه اول شامل نمونه‌های ماست با کد AL_1، AL_2 ، AL_3 ، AL_4، AL_7 و AA و گروه دوم شامل نمونه‌های ماست با کد AL_5، AL_6 ، AP_1، AP_2، AV و AA بودند. در این پژوهش، ابتدا مقایسه میان نمونه‌های ماست حاوی کمک آغازگرها با یکدیگر و در نهایت مقایسه آنها با نمونه کنترل انجام شد.

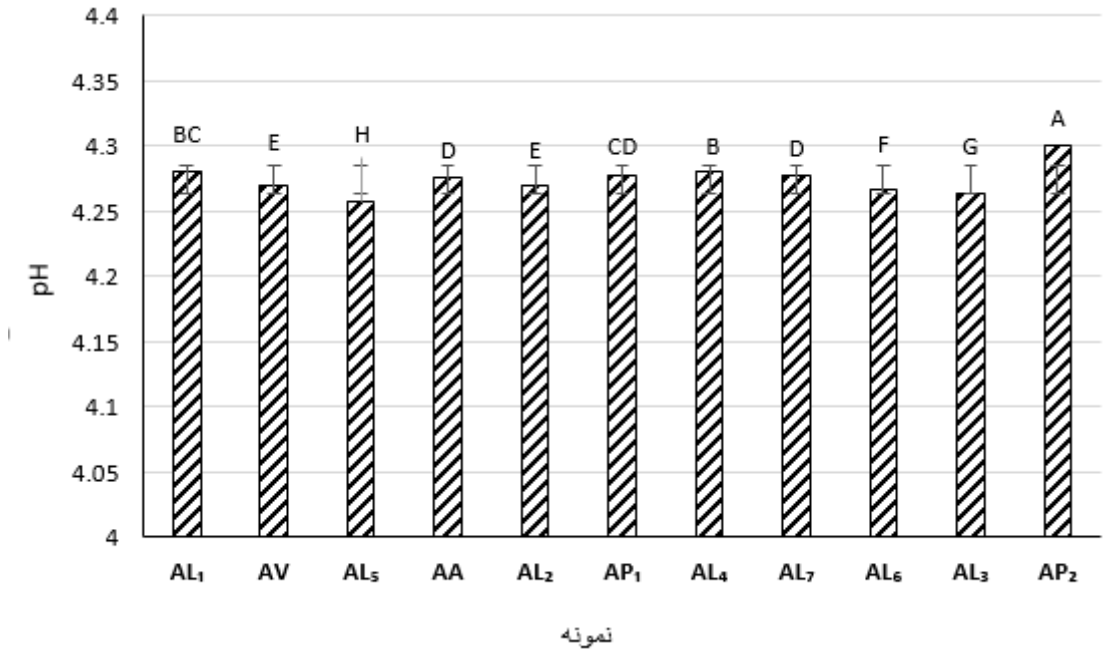
۴-۲- اندازه گیری pH و اسیدیته نمونه‌های ماست

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 نمودارهای ۱-۴ و ۲-۴ مشاهده می‌شود، میزان pH و اسیدیته نمونه‌ها با یکدیگر به طور معنی‌داری تفاوت داشت ($P < ۰/۰۵$).

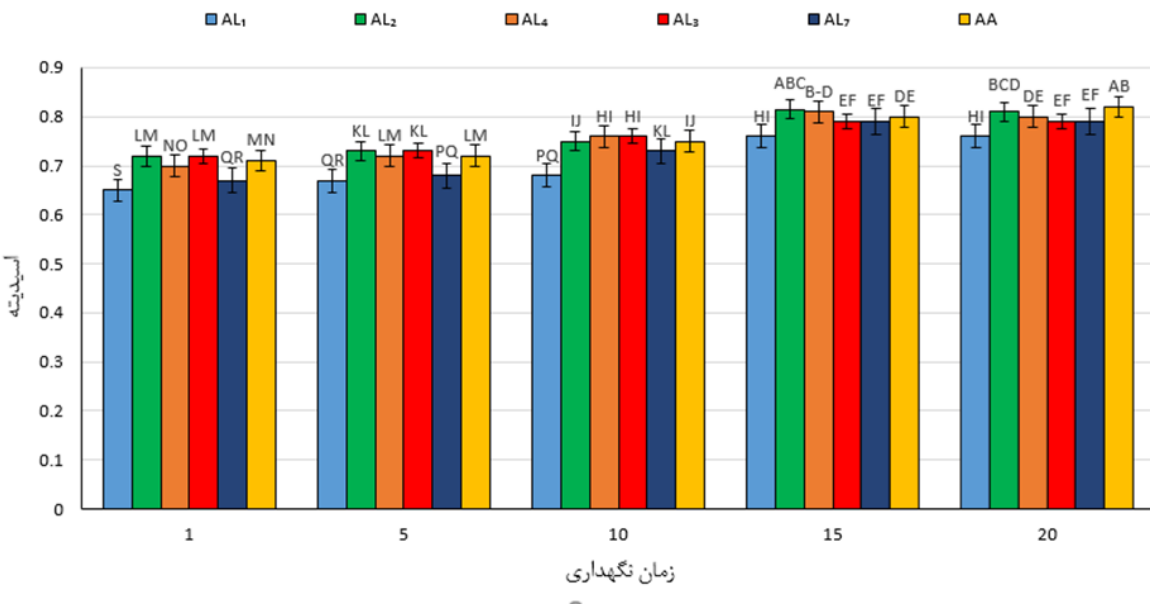
همانطور که در نمودارهای ۳-۴ تا ۶-۴ مشاهده می‌شود، تمام سویه‌های استفاده شده در تولید ماست باعث کاهش pH و افزایش اسیدیته نمونه‌ها در طول زمان نگهداری شدند. در این میان، سویه *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* با کد ۵۸ در مقایسه با سایر سویه‌ها بیشترین کاهش pH و افزایش اسیدیته را در نمونه ماست نشان داد که این رویداد 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.

نمودار ۱-۴: مقدار اسیدیته نمونه‌های مختلف ماست

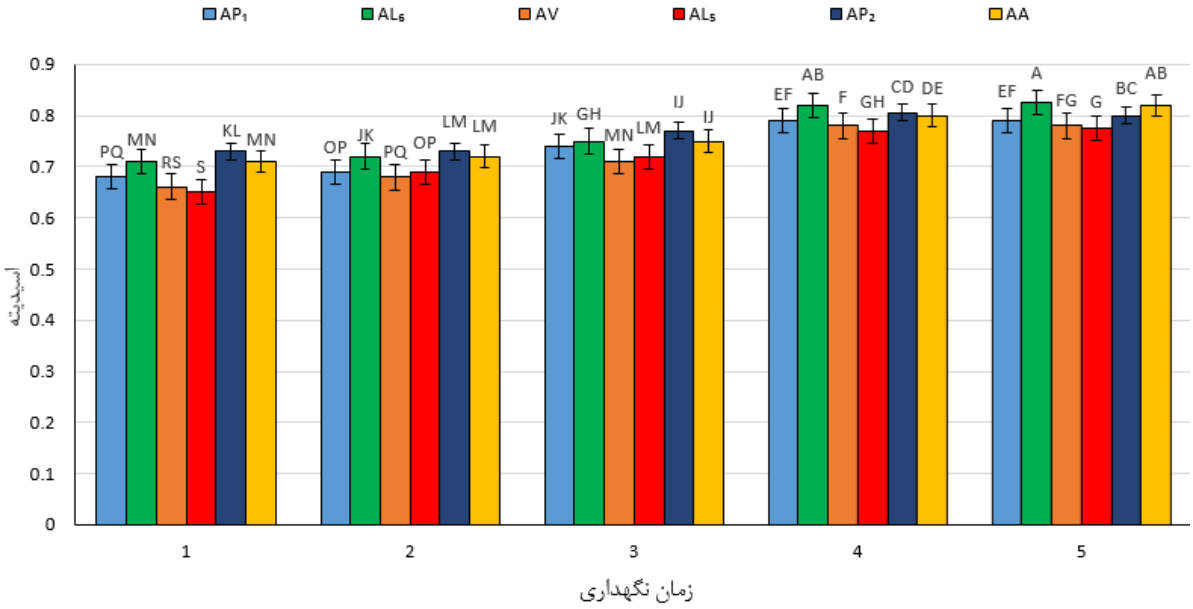




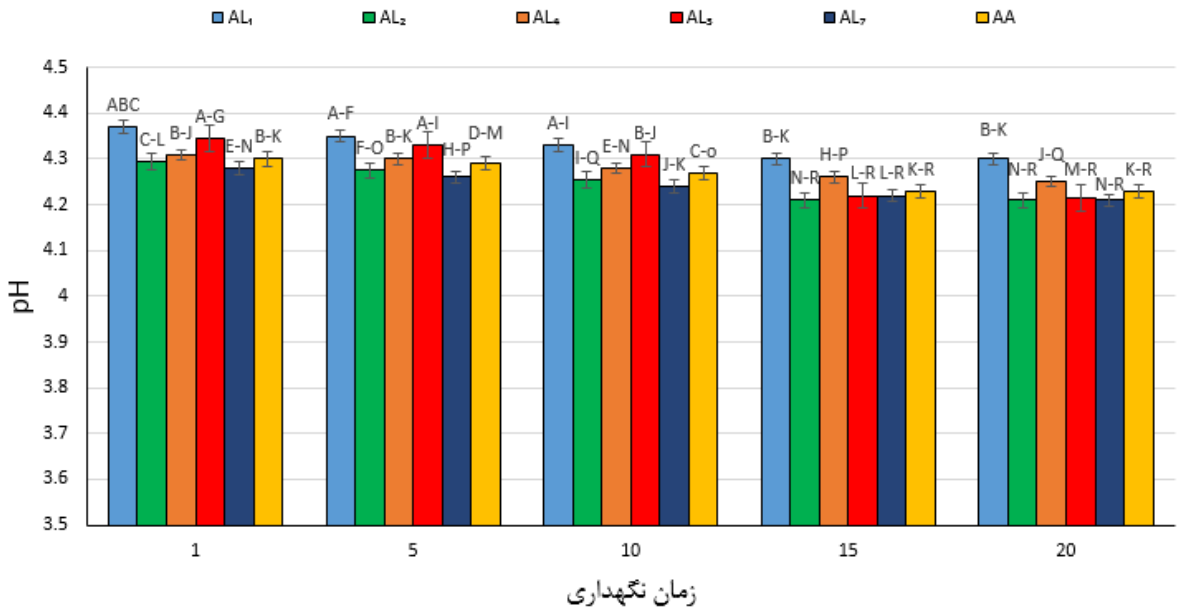
نمودار ۲-۴: مقدار pH نمونه‌های مختلف ماست



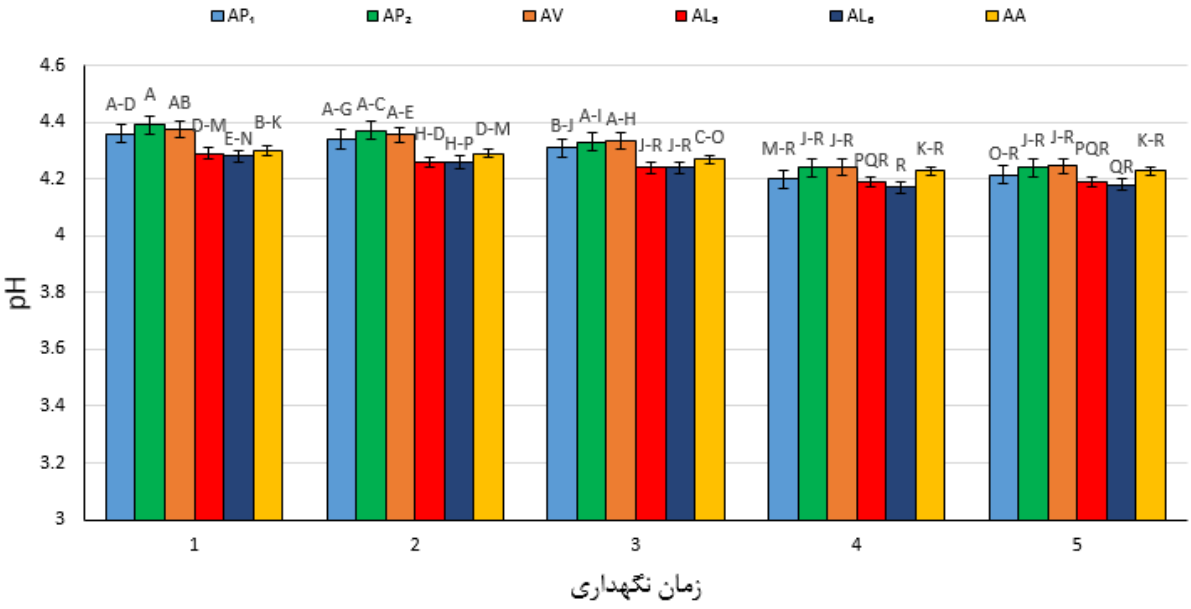
نمودار ۳-۴: میزان اسیدیته نمونه‌های ماست در طول دوره نگهداری (گروه اول)



نمودار ۴-۴: میزان اسیدیته نمونه‌های ماست در طول دوره نگهداری (گروه دوم)



نمودار ۵-۴: میزان pH نمونه‌های ماست در طول دوره نگهداری (گروه اول)



نمودار ۶-۴: میزان pH نمونه‌های ماست در طول دوره نگهداری (گروه دوم)

جداول ۱-۴ و ۲-۴، تغییرات pH و اسیدیته نمونه‌های ماست را طی زمان‌های مختلف نگهداری نشان می‌دهند. در 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، باکتری-های 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 (حبیبی نجفی و همکاران ، ۲۰۱۸).

نتایج به دست آمده در ارتباط با اندازه گیری اسیدیته و pH با تحقیقات انجام شده توسط سایر محققان همخوانی داشت (شاکر و همکاران ، ۲۰۰۰). اسیدیته به دلیل افزایش فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم ها افزایش می یابد نتایج به دست آمده مطابق نتایج حاصل از مطالعه سرا [۱۰]و همکاران ۲۰۰۹ بر ویژگی-های 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[۱۱] باکتری های اسید لاکتیک دانستند زیرا فعالیت آنزیمی این باکتری‌ها کاملا متوقف نمی‌شود بلکه کاهش می‌یابد (شاکر و همکاران ، ۲۰۰۰). کاهش pH نیز به نوبه خود از فعالیت باکتری‌های ماست طی مرحله سردکردن ناشی شده و در تقویت استحکام شبکه پروتئنی ایفای نقش می‌کند (سایبر و همکاران ، ۲۰۰۴).

۸ Serra

۹ post acidification

جدول ۱-۴: مقادیر pH نمونه‌های ماست طی مدت زمان نگهداری

نمونه ها	زمان صفر	روز پنجم	روز دهم	روز پانزدهم	روز بیستم
AL_1	۴/۳۷ ± ۰/۰۰۷ abc	۴/۳۵± ۰/۰۱ a-f	۴/۳۳± ۰/۰۰ a-i	۴/۳ ± ۰/۰۰ b-k	۴/۳ ± ۰/۰۰۶ b-k
AL_2	۴/۳ ± ۰/۰۲ c-l	۴/۲۷ ± ۰/۰۲ f-o	۴/۲۵ ± ۰/۰۲ i-q	۴/۲۱ ± ۰/۰۲ n-r	۴/۲۱ ± ۰/۰۲ n-r
AL_3	۴/۳۴ ± ۰/۰۰۷ a-g	۴/۳۳± ۰/۰۳ a-i	۴/۳۱± ۰/۰۰ b-j	۴/۲۲±۱ ۰/۰۱ l-r	۴/۲۱ ± ۰/۰۱ m-r
AL_4	۴/۳۱± ۰/۰۰ b-j	۴/۳± ۰/۰۰ b-k	۴/۲۸ ± ۰/۰۵ e-n	۴/۲۶ ± ۰/۰۰ h-p	۴/۲۵± ۰/۰۰ j-q
AL_5	۴/۲۹± ۰/۰۰ d-m	۴/۲۶± ۰/۰۴ h-d	۴/۲۴± ۰/۰۸ j-r	۴/۱۹± ۰/۰۰ pqr	۴/۱۹± ۰/۰۷ pqr
AL_6	۴/۲۸ ± ۰/۰۳ e-n	۴/۲۶ ± ۰/۰۱ h-p	۴/۲۵ ± ۰ /۱ j-r	۴/۱۷ ± ۰/۰۰۳ r	۴/۱۸ ± ۰/۰۵ qr
AL_7	۴/۲۸± ۰/۲۱ e-n	۴/۲۶ ± ۰/۰۲ h-p	۴/۲۴ ± ۰/۰۳ j-k	۴/۲۲ ± ۰/۰۱ i-r	۴/۲۱± ۰/۰۰ n-r
AP_1	۴/۳۶ ± ۰/۰۱۵ ad	۴/۳۴ ± ۰/۰۷ a-g	۴/۳۱± ۰/۰۱۷ b-j	۴/۲ ± ۰/۰۰ m-r	۴/۲۱۵ ± ۰/۰۰۷ o-r
AP_2	۴/۳۹ ± ۰/۰۳ a	۴/۳۷ ± ۰/۰۱۴ ac	۴/۳۳ ± ۰/۰۲ a-i	۴/۲۴ ± ۰/۰۰۶ j-r	۴/۲۴ ± ۰/۰۰ j-r
AV	۴/۳۷ ± ۰/۰۰۷ ab	۴/۳۵± ۰/۰۰۷ ac	۴/۳۳ ± ۰/۰۰۷ a-h	۴/۲۴ ± ۰/۰۸ jr	۴/۲۵ ± ۰/۰۷ jr
AA	۴/۳ ± ۰/۰۱ bk	۴/۲۹ ± ۰/۰۰۱ d-m	۴/۲۷ ± ۰/۰۰ c-o	۴/۲۳ ± ۰/۰۰ k-r	۴/۲۳ ± ۰/۰۱ k-r

میانگین هایی که در هر ستون دارای حروف متفاوت هستند دارای تفاوت معنی دار می باشند($P<۰/۰۵$).

جدول ۲-۴: مقادیر اسیدیته نمونه‌های ماست طی مدت زمان نگهداری

نمونه ها	زمان صفر	روز پنجم	روز دهم	روز پانزدهم	روز بیستم
AL_1	۰/۶۵ ± ۰/۰۰ ^{s}	۰/۶۷ ± ۰/۰۳ ^{qr}	۰/۶۸ ± ۰/۰۰ ^{pq}	۰/۷۶ ± ۰/۰۲ ^{hi}	۰/۷۶ ± ۰/۰۱ ^{hi}
AL_2	۰/۷۲ ± ۰/۰۱ ^{lm}	۰/۷۳± ۰/۰۱ ^{kl}	۰/۷۵ ± ۰/۰۰۱ ^{ij}	۰/۸۱± ۰/۰۰ ^{abc}	۰/۸۱± ۰/۰۳ ^{bcd}
AL_3	۰/۷۲ ± ۰/۰۲ ^{lm}	۰/۷۳ ± ۰/۰۲ ^{kl}	۰/۷۶ ± ۰/۰۰۷ ^{hi}	۰/۷۹ ± ۰/۰۰ ^{ef}	۰/۷۹ ± ۰/۰۴ ^{ef}
AL_4	۰/۷ ± ۰/۰۰۷ ^{no}	۰/۷۲± ۰/۰۰ ^{lm}	۰/۷۶ ± ۰/۰۳ ^{hi}	۰/۸۱ ± ۰/۰۰۵ ^{bd}	۰/۸ ± ۰/۰۰ ^{de}
AL_5	۰/۶۵ ± ۰/۰۱۲ ^{s}	۰/۶۹± ۰/۰۱۵ ^{op}	۰/۷۲ ± ۰/۰۰ ^{lm}	۰/۷۷ ± ۰/۰۰۶ ^{gh}	۰/۷۹ ± ۰/۲ ^{g}
AL_6	۰/۷۳ ± ۰/۰۱۶ ^{kl}	۰/۷۳ ± ۰/۰۳ ^{jk}	۰/۷۷ ± ۰/۱ ^{gh}	۰/۸۰± ۰/۰۰۷ ^{cd}	۰/۸۰± ۰/۰۰۶ ^{de}
AL_7	۰/۶۷ ± ۰/۰۲۵ ^{qr}	۰/۷۰± ۰/۰۲۳ ^{pq}	۰/۷۳ ± ۰/۰۰۱ ^{kl}	۰/۷۹± ۰/۰۲۶ ^{ef}	۰/۸۲ ± ۰/۰۱۳ ^{ef}
AP_1	۰/۶۸ ± ۰/۰۱۰ ^{pq}	۰/۷۴ ± ۰/ ۰۳۲ ^{op}	۰/۷۷ ± ۰/۰۱۷ ^{jk}	۰/۸۰± ۰/۰۱۵ ^{ef}	۰/۸۴ ± ۰/۰۲۱ ^{ef}
AP_2	۰/۷۱ ± ۰/۰۰ ^{mn}	۰/۷۸ ± ۰/۰۰۲ ^{lm}	۰/۸۰± ۰/۰۶۴ ^{ij}	۰/۸۴ ± ۰/۰۴۹ ^{ab}	۰/۸۹ ± ۰/۰۱۲ ^{a}
AV	۰/۶۹ ± ۰/۰۳۰ ^{rs}	۰/۷۳± ۰/۰۱۶ ^{pq}	۰/۷۶ ± ۰/۰۵۱ ^{mn}	۰/۷۹ ± ۰/۰۰۶ ^{fg}	۰/۸۴ ± ۰/۰۴۸ ^{fg}
AA	۰/۷۱± ۰/۰۲۲ ^{mn}	۰/۷۵ ± ۰/۰۱۹ ^{lm}	۰/۸۰± ۰/۰۳۸ ^{ij}	۰/۸۶ ± ۰/۰۲۷ ^{de}	۰/۹۰± ۰/۰۰۸ ^{ab}

میانگین هایی که در هر ستون دارای حروف متفاوت هستند دارای تفاوت معنی دار می باشند($P<۰/۰۵$).

۴-۳- 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[۱۲] اندازه گیری شد (نیسلن و همکاران ، ۲۰۰۹). هرچند روش‌های مختلفی از جمله روش اولین سیو کالتیو[۱۳] ، تری نیترو- بنزن- سولفونیک اسید[۱۴]، 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 (حبیبی نجفی و همکاران ، ۲۰۱۸).

نتایج بررسی پروتئولیز نمونه ها طی زمان نگهداری در نمودارهای ۷-۴ و ۸-۴ نشان داده شده است. بر اساس این نمودارها، 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 نشان‌دهنده 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

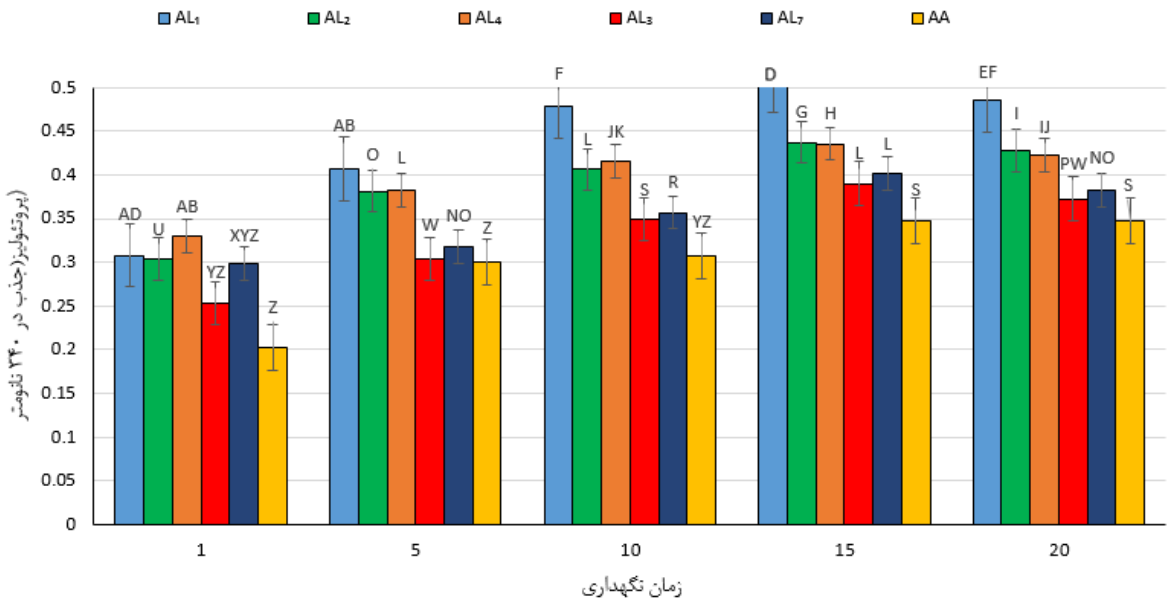
۹ O-phthaldialdehyde (OPA) assay

۱۰ Folin-Ciocalteau

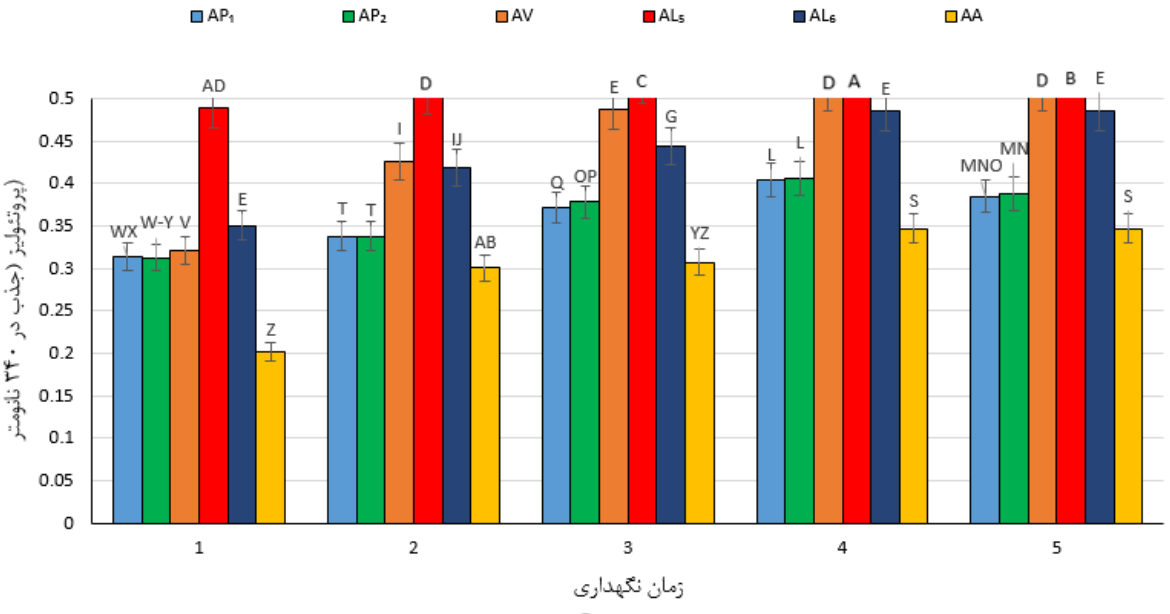
۱۱ Trinitro-benzene-sulfonic acid (TNBS)

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[۱۵] و همکاران (۲۰۰۹) در خصوص افزایش مقادیر گروه‌های آمینوی آزاد طی زمان تخمیر مطابقت داشت.

۱۳ Nielsen



نمودار ۴-۷: میزان پروتئولیز نمونه‌های ماست در طول دوره نگهداری (گروه اول)



نمودار ۴-۸: میزان پروتئولیز نمونه‌های ماست در طول دوره نگهداری (گروه دوم)

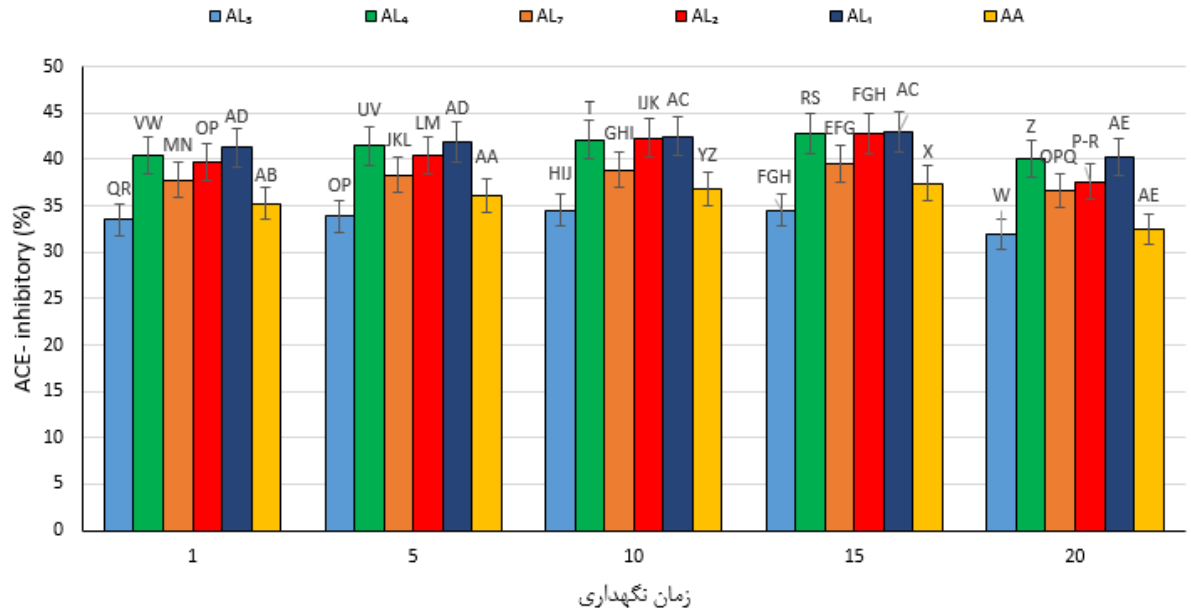
۴-۴- اندازه گیری میزان خاصیت مهارکنندگی ACE

نمودارهای ۴-۹ و ۴-۱۰ نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت مهارکنندگی ACE پپتیدهای حاصل از پروتئولیز نمونه‌های ماست را نشان می‌دهد. 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 (حبیبی نجفی و همکاران ، ۲۰۱۸).

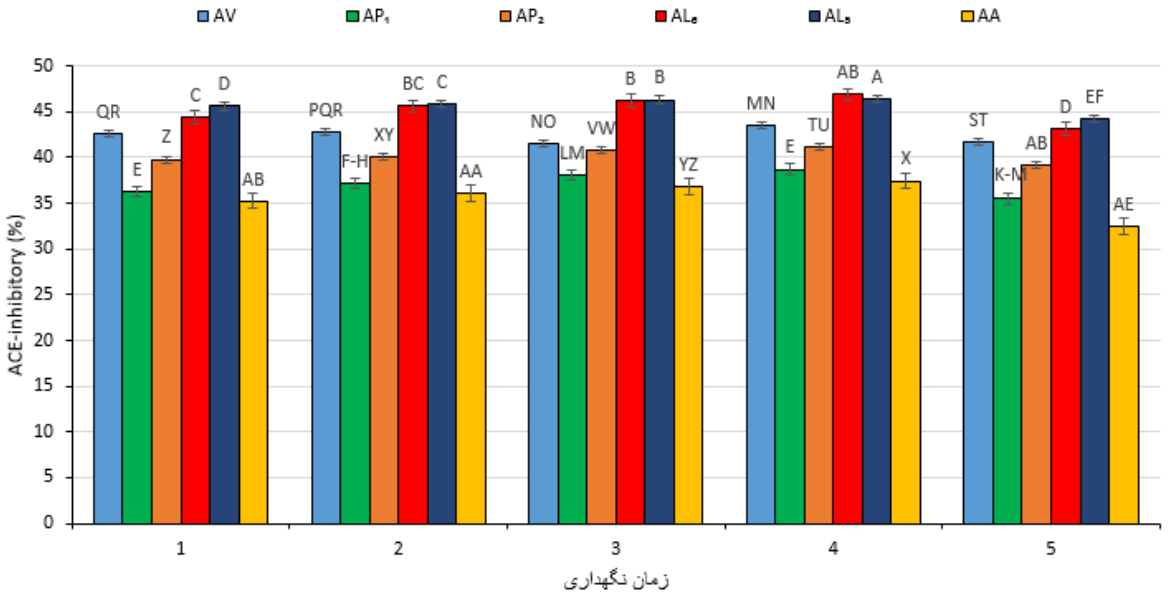
طبق نتایج به دست آمده، اختلاف معناداری در میزان فعالیت مهار ACE بین نمونه‌های مختلف ماست حاوی کمک آغازگر و ماست شاهد وجود داشت ($P<۰/۰۵$). افزایش خاصیت مهار ACE تا روز پانزدهم در تمام نمونه‌ها وجود داشت و این روند در نمونه شاهد نسبت به نمونه‌های دیگر ضعیف تر بود که این رویداد نشان‌دهنده تاثیر گذاری سویه‌های مورد استفاده به عنوان کمک آغازگر در تولید ماست و افزایش خاصیت مهار آنزیم ACE است. در توافق با نتایج ما، ژاو[۱۶] 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.

---

۱۳ Zhou



نمودار ۹-۴: میزان ACE-inhibitory نمونه‌های ماست در طول دوره نگهداری (گروه اول)

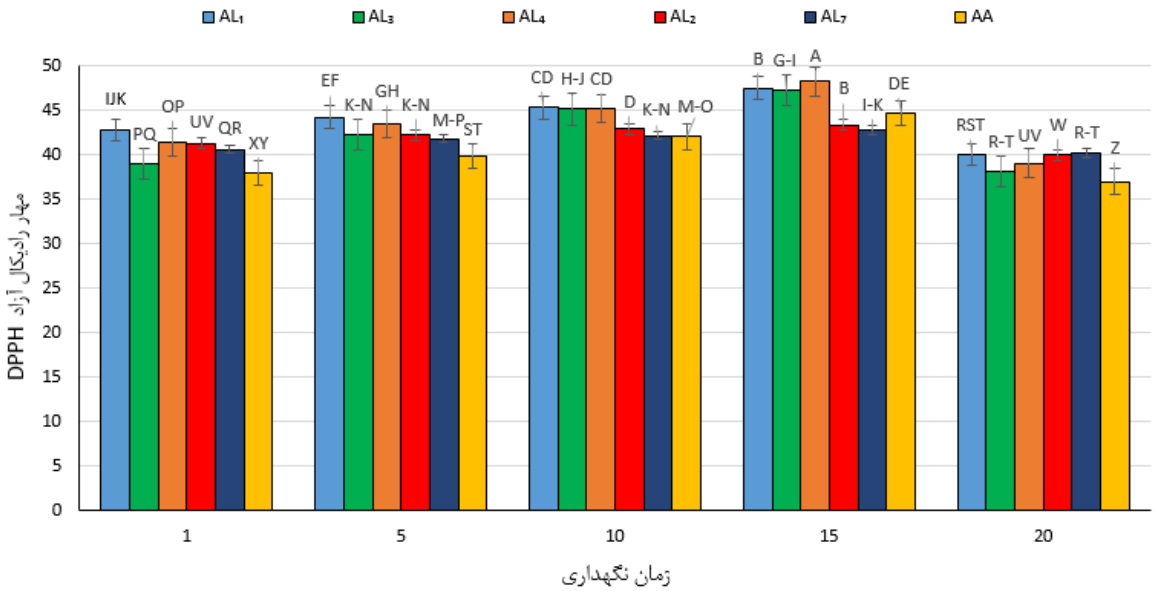


نمودار ۱۰-۴: میزان ACE-inhibitory نمونه‌های ماست در طول دوره نگهداری (گروه دوم)

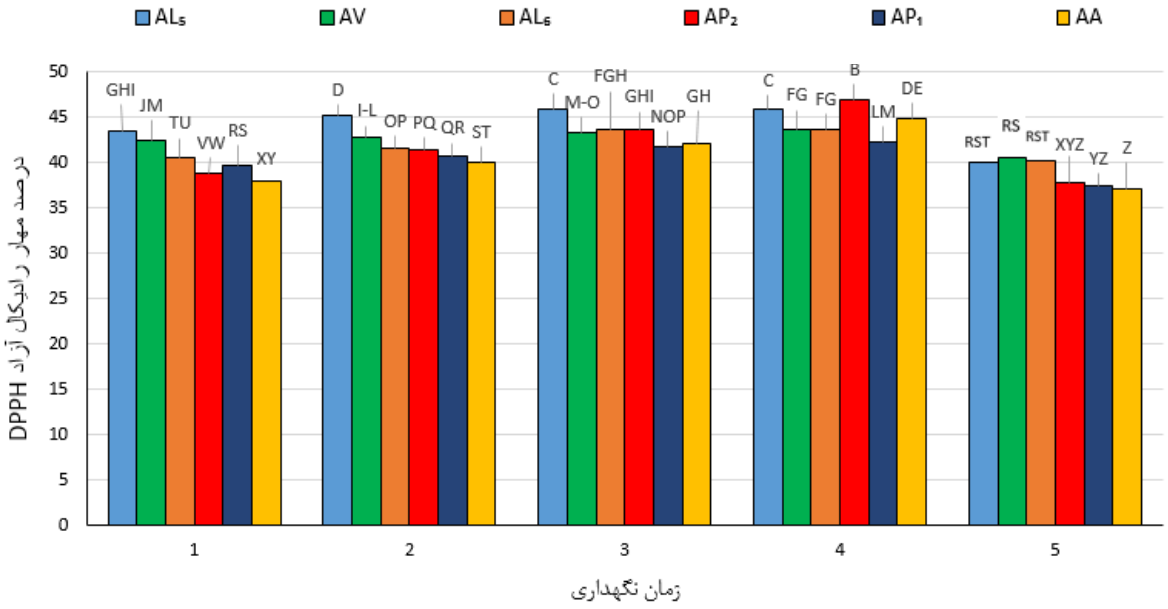
۴-۵- اندازه گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی

۴-۵-۱- اندازه گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH

نتایج حاصل از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست توسط تکنیک DPPH در نمودارهای ۱۱-۴ و ۱۲-۴، نشان داده 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 هیدرولیزات‌های پروتئینی حاصل از فعالیت باکتری‌های اسید لاکتیک در نظر گرفته شد. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی 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 (حبیبی نجفی و همکاران ، ۲۰۱۸).



نمودار ۱۱-۴: خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری با روش DPPH (گروه اول)



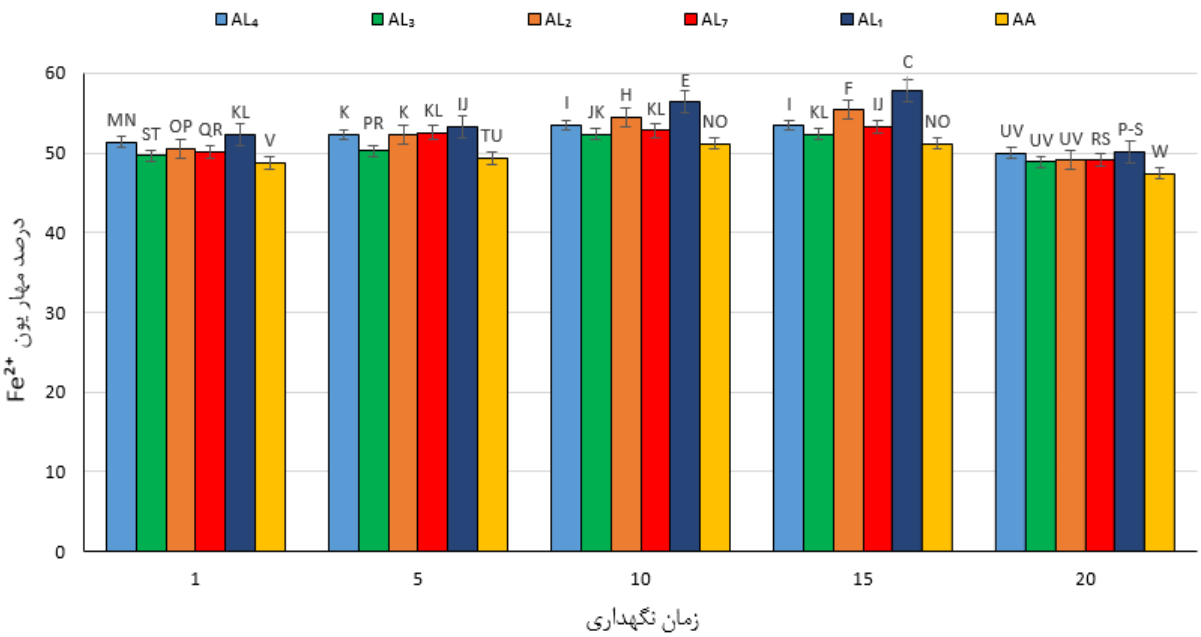
نمودار ۱۲-۴: خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست طی‌دوره نگهداری با روش DPPH (گروه دوم)

۴-۵-۲- اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی با روش مهار یون فلزی

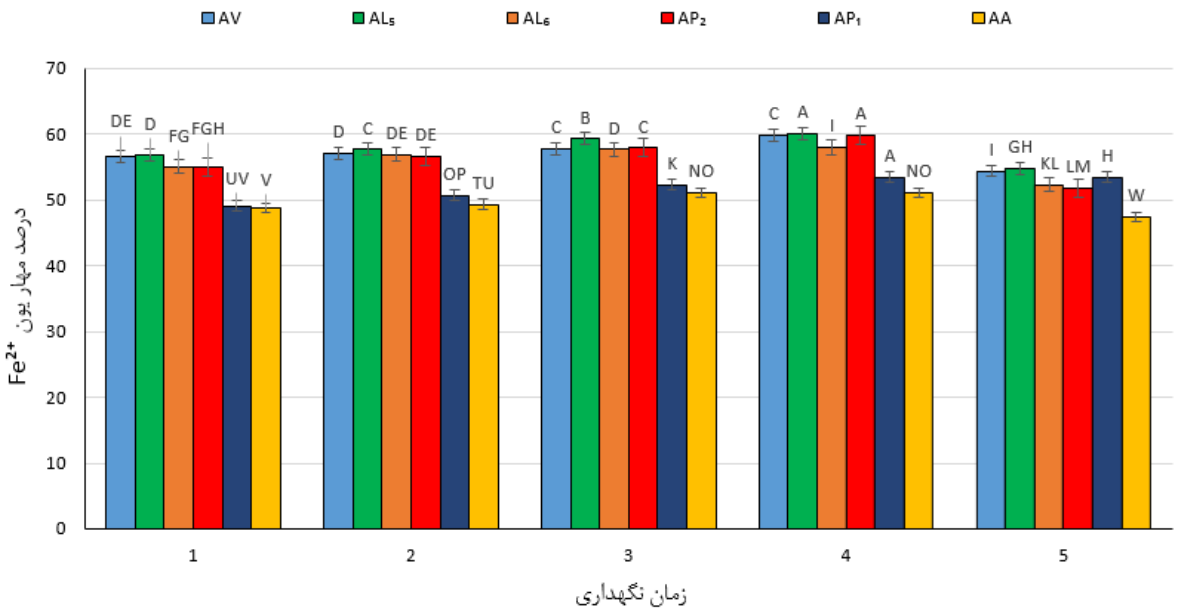
نتایج حاصل از بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های ماست توسط روش مهار یون فلزی (Fe^{2+}) در نمودارهای ۴-۱۳ و ۴-۱۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، روند تغییرات خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها با روش ذکرشده کاملا مشابه با نتایج به دست‌آمده توسط روش DPPH می‌باشد. در هر دو روش، میزان خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها 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 نمونه‌های ماست حاوی کمک آغازگرها در مقایسه با نمونه شاهد به طور قابل ملاحظه ای 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[۱۷] و همکاران (۲۰۰۸) نیز در مطالعه خود دریافتند که روند افزایش خاصیت آنتی-اکسیدانی 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.

---

۱۴ Elias



نمودار ۱۳-۴: خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست در طول دوره نگهداری با روش مهار یون فلزی (گروه اول).



نمودار ۱۴-۴: خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست در طول دوره نگهداری با روش مهار یون فلزی (گروه دوم)

۴-۶- 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 ۳-۴ 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.

باکنار 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 (لو و همکاران ۲۰۱۸)، (کراسکوپت و تندهانسکول ، ۲۰۱۶) ، (اینوکنت و همکاران ۲۰۱۶) و همچنین (شاه و دیو ، ۲۰۰۰) مطابقت داشت 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.

جدول ۳-۴. 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
AL₁	۴/۳۴±۰/۰۰ d	۴/۳۵±۰/۰۰۱ c	۰/۳۵±۰/۰۰۷ gh	۰/۳۳±۰/۰۲ efg	۰/۳۲±۰/۰۰۷ jk
			۴	۴	۴
AL₂	۴/۳۵±۰/۰۷ c				
AL₃	۴/۲۳±۰/۰۰ s	۰/۳۴±۰/۰۱۴ ef	۰/۳۳±۰/۰۲۱ gh		۴/۳۱±۰/۰۰ kl
		۴	۴	۰/۳۲±۰/۰۰۷ gh	
				۴	
AL₄	۰/۲۸±۰/۰۲۱ o				۲۲۴±۰/۰۰۵ s
	۴		۲۲۴±۰/۰۰۸ s		۴/
AL₅		۰/۲۲۹±۰/۰۰۶ s	۴/	۲۲۱±۰/۰۰۷ s	
	e-	۴		۴/	
AL₆	۴/۳۳±۰/۰۰ g	۴/۲۷±۰/۰۰ p	۴/۲۶±۰/۰۷ p		۲۵۹±۰/۰۱۲ q
					۴/
AL₇	۴/۳۷±۰/۰۰ a	i-		۲۵۷±۰/۰۱۴ q	
		۴/۳۲±۰/۰۰۳ k	۳۰۹±۰/۰۱۳ kl	۴/	
	i-		۴/		۰/۲۸±۰/۰۰۴ o
AP₁	۴/۳۲±۰/۰۰ k	۴/۳۶±۰/۰۱ b			۴
				۳۰۱±۰/۰۰ mn	
AP₂	۴/۲۷±۰/۰۱ d	۳۰۹±۰/۰۰۶ lm	۰/۳۵±۰/۰۰۲ b	۴/	f-
		۴/	۴		۴/۳۳±۰/۰۳ h
AV	۰۷۹±۰/۰۰۱ t			۴/۳۴±۰/۰۰ cd	
	۴/	۴/۲۵±۰/۰۰۹ r	۳۰۲±۰/۰۰ mn		۰/۲۷±۰/۰۰۷ p
AA			۴/	۴/۲۸±۰/۰۲ o	۴
	۰/۳۷±۰/۰۰۳ a	۰/۰۷۵±۰/۰۰۵ t	۴/۲۴±۰/۰۰ r		
	۴	۴		۰/۲۳±۰/۰۰۶ s	۰/۲۳۲±۰/۰۰ s
			۰/۰۴۵±۰/۰۱ u	۴	۴
	۰/۳۶±۰/۰۰۶ b	۴/۳۶±۰/۰۵ b	۴		
	۴			۰/۰۱۷±۰/۰۰ v	۰/۹۹±۰/۰۰۷ w
		۴/۳۵±۰/۰۰ c	۰/۳۵±۰/۰۱۳ c	۴	۳
			۴		
				۰/۳۴±۰/۰۰۸ de	۰/۳۲±۰/۰۱۵ ijk
			e-	۴	۴
			۰/۳۳±۰/۰۱۴ g		
			۴	h-	
				۰/۳۲±۰/۰۰۳ j	۰/۳۱±۰/۰۲۸ kl
				۴	۴

میانگین هایی که در هر ستون دارای حروف متفاوت هستند دارای تفاوت معنی دار می باشند ($P< ۰/۰۵$)

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادها

۵-۱- نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه انتخاب آغازگر و کمک آغازگر در تولید ماست از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و مطالعه کشت‌های آغازگر و کمک آغازگر بومی باعث کمک به تولید فرآورده‌های سنتی و حفظ ذخایر ژنتیکی و میکروبی کشور می‌شود و از طرفی از خروج ارز جلوگیری می‌کند، لذا در این پژوهش خصوصیات فیزیکوشیمیایی انواع ماست‌های تولید شده توسط کمک آغازگرهای بومی ایزوله شده از ماست‌های سنتی استان خراسان با ماست تولیدشده توسط آغازگر تجاری مقایسه شدند. در این راستا، نخست با استفاده از ۵ سویه *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، ۲ سویه *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، ۲ سویه *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* و ۱ سویه *ویسلا سیباریا*، ۲۰ نمونه ماست تولید شد و سپس میزان پروتئولیز، خاصیت مهار ACE و خاصیت آنتی اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که از میان ۲۰ نوع ماست تولید شده، آن دسته از نمونه‌هایی که حاوی کمک آغازگر *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* بودند، بیشترین میزان اسیدیته طی مدت زمان نگهداری را نشان دادند. از آنجا که تولید اسید باعث تجمع کازئین و در نتیجه تشکیل ژل ماست می‌شود (حبیبی نجفی و همکاران، ۱۳۹۷)، سرعت تولید اسید یکی از مهم ترین ویژگی‌های فناورانه باکتری‌های اسید لاکتیک به جهت انتخاب آنها به عنوان کشت آغازگر و کمک آغازگر برای تولید ماست می‌باشد. همچنین، تولید سریع اسید در ایجاد عطر، بافت و طعم مطلوب فرآورده، حائز اهمیت است (علیزاده و همکاران ، ۲۰۰۸) بطوریکه ویژگی طعم تند و اسیدی ماست توسط اسید لاکتیک ایجاد شده از رشد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در شیر به دست می‌آید (دی بوک و همکاران ، ۲۰۱۱). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که کمک آغازگرهای *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* احتمالا ویژگی‌های حسی مطلوب‌تری را به ارمغان می‌آوردند.

نتایج نشان داد که تمام ماست‌های تولیدشده توسط کمک آغازگرهای بومی از نظر میزان پروتئولیز، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت مهار ACE نسبت به نمونه کنترل که تنها حاوی آغازگر تجاری بود دارای امتیاز بالاتری بودند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که آغازگرهای بومی ایزوله شده از ماست‌های سنتی استان خراسان قادر هستند تا ارزش تغذیه‌ای ماست را افزایش دهند.

ارزیابی میزان پروتئولیز، خاصیت مهار ACE و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها طی دوره نگهداری نشان داد که میزان این سه پارامتر مورد مطالعه در طول زمان نگهداری از زمان صفر تا روز پانزدهم سیر صعودی داشته و از آن پس تا روز بیستم یا دچار روند کاهشی شده یا با اختلاف بسیار کم ثابت مانده است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که کمک آغازگرهای بومی ایزوله شده از ماست‌های سنتی استان خراسان قادر هستند تا ارزش تغذیه‌ای ماست را طی ۱۵ روز نگهداری افزایش دهند.

بطورکلی، بر اساس نتایج می‌توان اینگونه استنباط کرد که آغازگرهای همراه بومی ایزوله شده از ماست-های سنتی استان خراسان با تاثیر بسزایی که بر افزایش میزان پروتئولیز، فعالیت مهار ACE و خاصیت آنتی اکسیدانی دارند، می‌توانند برای تولید محصولات لبنی فراسودمند مورد استفاده قرار گیرند و به واسطه تقویت فعالیت مهار ACE در پیشگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی موثر واقع شوند. درنتیجه، استفاده از کمک آغازگرهای بومی در تولید محصولات لبنی می‌تواند یک راهکار بسیار مناسب در جهت تولید محصولات فراسودمند با اثر تقویت شده سلامتی بخشی برای عموم مصرف کنندگان باشد.

در پایان، سویه‌های *لاکتوباسیلوس لاکتیس* (۷۱) و *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* (۸۲) دارای بالاترین پتانسیل از نظر خاصیت مهارکنندگی ACE و خاصیت آنتی‌اکسیدانی جهت بکارگیری در صنعت به عنوان کمک آغازگر می باشند.

۵-۲- پیشنهاد ها برای پژوهش های آتی

- ارزیابی میزان کاهش کلسترول در ماست تولید شده با کمک آغازگرهای بومی
- بررسی توانایی تولید پپتیدهای آرامش‌بخش توسط کمک آغازگرهای بومی
- بررسی تولید و اثر پلی‌ساکاریدهای تولید توسط آغازگرهای بومی بر میزان پروتئولیز و خاصیت مهار ACE
- بررسی نوع و میزان ارتباط فعالیت مهار ACE با سیستم پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک
- ارزیابی خصوصیات کمک آغازگرهای بومی جهت استفاده در تولید محصولات لبنی با خواص درمانی
- مطالعه تاثیر افزودن آغازگرهای همراه در ایجاد عطر و طعم و خصوصیات بافتی ماست
- مطالعه تاثیر افزودن مخمرها یا گونه‌های کپکی به عنوان آغازگر همراه بر میزان پروتئولیز، خاصیت مهار ACE و خاصیت آنتی اکسیدانی ماست

منابع

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

حبیبی نجفی، م.ب، توکلی، م، فاطمی زاده، س، ۱۳۹۷، بررسی تاثیر درصد چربی و ترکیب پری بیوتیک بر میزان پروتئولیز، ACE-inhibirory و خاصیت آنتی اکسیدانی ماست پروبیوتیک، فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی، شماره ۱، ۲۹-۱۶.

مرتضوی، ع، شهیدی، م، حکیم زاده، ح، حکیم عطار ب، طباطبایی یزدی، ف، ۱۳۹۱، تکنولوژی شیر و فرآورده‌های لبنی. ترجمان خرد.

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۷. ماست – ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. شماره ۶۹۵.

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

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

Alizadeh, A. and Ehsani, M. R. 2008. Probiotic survival in yogurt made from ultrafiltered skim milk during refrigeration storage. *Research Journal of Biological Sciences*, 3, 1163-1165.

Ahmed, A. S., El-Bassiony, T., Elmalt, L. M., Ibrahim, H. R. 2015. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, 74, 80–88.

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

Aryana, K., Olson, D. 2017. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *J. Dairy Sci*, 100, 9987–10013.

Brown A.E., Benson A. 2001. Microbioligical applications, Laboratory manual in general microbiology. McGrowHill. 8th edition. 64-65.

Beermann, C., and J. Hartung. 2013. Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. Food Funct, 4, 185–199.

Benozzi, E., A. Romano, V. Capozzi, S. Makhoul, L. Cappellin, I. Khomenko, E. Aprea, M. Scampicchio, G. Spano, T. D. Mark, F. Gasperi, and F. Biasioli. 2015. Monitoring of lactic fermentation driven by different starter cultures via direct injection mass spectrometric analysis of flavour-related volatile compounds. Food Res. Int, 76, 682–688.

Cheng H. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. 2010. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 938-950.

Chaves-López, C., A. Serio, A. Paparella, M. Martuscelli, A. Corsetti, R. Tofalo, and G. Suzzi. 2014. Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. Food Microbiol, 42, 117–121.

Coates D. 2003. The angiotensin converting enzyme (ACE). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35, 769-773.

Clare, D. A., Swaisgood, H. E. 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of dairy science*, 83, 1187-1195.

Costa, M. P., C. F. Balthazar, R. V. B. P. Moreira, A. C. Gomes, and C. A. Conte-Júnior. 2013. Fermented milk: Potential functional food. Enciclopedia Biosfera, 9, 1387–1408.

Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., Anand, S., 2012. Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*,65, 1-12.

De Bok, F. A., Janssen, P. W., Bayjanov, J. R., Sieuwerts, S., Lommen, A., van Hylckama Vlieg, J. E., Molenaar, D. 2011. Volatile compound fingerprinting of mixed-culture fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 6233-6239.

Dellaglio, F., Felis, G.E., Castioni, A., Torriani, S., and Germond, J.E. 2015. Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus subsp. Nov., isolated from Indian dairy products. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 401-404.

Dal-Bello B, Cocolin L, Zeppa G, Field D, Cotter PD, Hill C. 2012. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *Int J Food Microbiol, 153,58-65.*

Dincel, S. 2012. Chemical and rheological properties of yoghurt produced by lactic acid cultures isolated from traditional Turkish yoghurt. A thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of Middle East technical university, Turkey.

Dave R., and Shah, N.2000. Effect of level of starter culture on viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts. *Food Australia journal*, 49, 146-168.

Daskaya-Dikmen C. Yucetepe A. Karbancioglu-Guler F. Daskaya H and Ozcelik B. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)- Inhibitory Peptides from Plants. Nutrients.2017; 9(316):1-19.

Da Silva Fernandes, M., F. S. Lima, D. Rodrigues, C. Handa, M. Guelfi, S. Garcia, and E. I. Ida. 2017. Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented

soymilk storage and after the in vitro, digestive system simulation. Food Chem. 229:373–380.

Elias, R. J., Kellerby, S. S., Decker, E. A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Food Science & Nutrition*, 48, 430–441.

Ebringer, L., Ferencik, M., Krajcovik, J .2018. Beneficial Health Effects of Milk and Fermented Dairy Products – Review. *Folia Microbiol*, 53, 378-394.

Fitzgerald RJ, Murray BA. 2006. Bioactive peptide and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 118-125.

Givens, D. I. and K. E. Kliem. 2002. Improving the nutritional quality of milk. P. Paquin (Ed.), *Functional and Speciality Beverage Technology*, 561-226.

Gobbetti M, Minervini F, Rizzello CG. 2004. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory and microbial-bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 173-187.

Hashim, IB. Khalil, A. H. and Afifi, HS. 2009 .Quality characteristics and consumer acceptance of yogurt fortified with date fiber. *Journal of Dairy Science*, 92, 5403- 5407.

Harte F, Luedecke L, Swanson B, Barbosa-Cánovas GV. 2013. Low-fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. *Journal of dairy science*, 86, 1074-1082.

HabibiNajafi M.B., Fatemizade S., Tavakoli M. 2018. Release of Proteolysis Products with ACEInhibitory and Antioxidant Activities in Probiotic Yogurt Containing Different Levels of Fat and Prebiotics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19, 4, 275-380.

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. *Journal of Eur Food Res Technol*, 242, 517-526.

Irlinger, F., Helinck, S., Jany, J.L. 2017. Secondary and Adjunct Cultures.In Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., Guinee, T. *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Elsevier applied science publishers, 273-300.

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. *Journal of Food Science and Technology*, 66, 158-164.

Krasekoopt, W. and Tandhanskul, A. 2016. Sensory and acceptance assessment of yogurt containing probiotic beads in Thailand. *Kasetsart Journal*, 42, 99-106.

Korhonen H. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *Intrernational Dairy Journal*, 16, 945-960.

Korhonen H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functianal Foods*, 2, 177-187.

Korpela R., et al. 2004. Effect of ingesting sour milk fermented using Lactobacillus helveticus bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of human hypertension*, 18, 795-802.

Korhonen H. 2016. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of functional foods*, 1, 177-187.

Kim, S.-Y., Je, J.-Y., Kim, S. K. 2007. Purification and characterization of antioxidant peptides from milk frame protein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 31–38.

Khurana, H.K. and Kanawjia, S.K. 2007. Recent trend in development of fermented milks. *Current Nutrition and Food Science*, 3, 91-108.

Lee W.G., and Lucey J.A., 2010. Formation and Physical Properties of Yogurt. Asian-Aust. *J. Anim. Sci*, 23, 9, 1127-1136.

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.

Lindmark-Mansson, H., Kesson, B., 2000. Antioxidative factors in milk. *The British journal of nutrition*, 84, 103-110.

Leclerc P.L, Gauthier S.F, Bachelard H. Santure, M, Roy D. 2017. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 12, 995–1004.

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.

Moreno rojas, R., Sanchez segarpa, P., Garcia Martinez, M., Gordillo otero, M., and Lopez, A. 2010. Mineral composition of skimmed milk fruit-added yoghurt- nutritional assessment. *Milchwissenschaft*, 55, 510-512.

Nielsen P.M., Petersen D., Dambmann C. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66, 5, 642-646.

Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, et al. 1995. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 777-783.

Nielsen M S, Martinussen T, Flambard B, Sørensen K I and 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. *International Dairy Journal*, 19, 155–165.

Ott, A. Fay, L. B., Chaintreau, A. 2003. Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 850-858.

Ozer, B., Kirmaci, H. A., Oztekin, S., Hayaloglu, A. A. & Atamer, M. 2007. Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production, *International Dairy Journal*, 17, 199-207.

Peng, T., Pan, D. D., Wu, Z., Zeng, X. Q., Li, H. 2014. Volatile organic compounds profile during milk fermentation by *Lactobacillus pentosus* and correlations between volatiles flavor and carbohydrate metabolism. *Journal of Dairy Science*, 97, 624-631.

Pihlanto-Leppala, A. 2007. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 347–356.

Perdigon G, Guarner F, Corthier G., et al. 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic. *The British journal of nutrition*, 93, 783-786.

Parente E, Cogan TM. 2004. Starter cultures: general aspects. In: Fox PF (Ed). *Cheese: chemistry, physics and microbiology, 1. London: Elsevier, 123‐47.*

Parmar, H., S. Hati, and 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.

Pithva SP, Ambalam PS, Ramoliya JM, Dave JM, Vyas BRM. 2015. Antigenotoxic and antimutagenic activities of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* VC against N‐Methyl‐N‐Nitro‐N‐Nitrosoguanidine. *Nutr Cancer*, 67, 7, 1142‐50.

Routray, W., Mishra, H. N. 2011. Scientific and technical aspects of yogurt aroma and taste: a review. *Food Science and Food Safety*, 10, 208–22.

Robinson RK, Tamime AY, Wszolek M. 2002. Microbiology of fermented milks. the Microbiology of Milk and Milk Products, *Wiley-Interscience*, 367-430.

Rabinson, R.K. 2005. Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products. John Wiley & Sons.

Rosemont, I. 2000. Yogurt It's Nutritional and Health Benefits. *Journal of Dairy Counc*, 61, 7-12.

Roncal, T., S. Caballero, M. Guereñu, I. Rincón, S. Prieto-Fernández, and J. R. Ochoa-Gómez. 2017. Efficient production of acetoin by fermentation using the newly isolated mutant strain Lactococcus lactis ssp. lactis CML B4. Process Biochem, 58, 35–41.

Silva AV, Papadimitriou CG, Mastrojiannaki AV, Gomes AM, Malcata FX, Alichanidis E. 2007. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 105, 647-656.

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 journal of clinical nutrition*, 77, 326-330.

Shori AB, Baba AS. 2016. The influence of Allium sativum or Cinnamomum verum on cow- and camel- milk yogurts: proteolytic and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activities. *Advanced Materials Research* ,832, 639-643.

Shori AB, Baba AS. 2013. Antioxidant activity and inhibition of key enzymes linked to type-2diabetes and hypertension by Azadirachta indica-yogurt. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17, 295-301.

Saito, T. 2004. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from Lactobacillus acidophilus group and their application of functional foods. *Animal Science Journal*, 75, 177-190.

Steele, J.ِ, Broadbent, J.ِ Kok, J. 2013. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 135-141.

Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S., Corrieu, G. 2004. The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 113-137.

Smit, G., Smit, B. A., Engels, W. J. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Review*, 29, 591-610.

Sieuwerts, S., de Bok, F. A., Hugenholtz, J., van Hylckama Vlieg, J. E. 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4997-5007.

Shimizu M, Son DO. 2007. Food-derived peptides and intestinal functions. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 885-895.

Singh, B. P., Vij, S., Hati, S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. Peptides, 54, 171–179.

Serra, M., Trujillo, A.J., Guamis, B., and Ferragut, V. 2009. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. *Journal of Food Hydrocolloids*, 23(1), 82-91.

Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P., and Eyer, H. 2004. Impact of microbial cultures on conjugated linolenic acid in dairy products_areview, *Journal of International Dairy*, 14, 1-15.

Serra, M., Trujillo, A.J,. Guamis, B., and Ferragut, V. 2009. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. *Journal of Food Hydrocolloids*, 23, 1, 82-91.

Shah NP. On, L,. 2008. Release and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, 4, 1555–1566.

Shah NP., Ramchandran L,. 2014. Effect of exopolysaccharides on the proteolytic and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activities and textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 92, 895-906.

Shaker, R.R., Jumah, R.Y., and Abu-Jdayil, B. 2000. Properties of plain yoghurt during coagulation process: impact of fat content and preheat treatment of milk. *Journal of Food Engineering*, 44, 175-180.

Saloff-Cost, C. 1995. Fermented milks: effects on the immune system. Danone world Newsletter,9, 2-8.

Thierry, A., Pogacic, T., Weber, M., Lortal, S. 2015. Production of flavor compounds by lactic acid bacteria in fermented foods, *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, 19, 314-340.

Tamime, A. Y. 2002. Fermented milks: a historical food with modern applications--a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 4, S2-S15.

Unger T. 2002. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*, 89, 3A-9A.

Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. 2014. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *The British journal of nutrition*, 92, 357-366.

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. *Journal of Dairy Science*, 91, 29-38.

Yang Y. Tao G. Liu P. Liu J. 2007. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal. *J Agric Food Chem*, 55, 19, 7891-7895.

Yeganehzad, S., Mazaheri-Tehrani,M. and Shahidi, F. 2007. Studying microbial, physicochemical and sensory properties of directly concentration probiotic yogurt. *African Journal of Agricultural Research*, 2, 8, 366-369.

Zhu, Y. P., Fan, J. F., Cheng, Y. Q., Li, L. T. 2008. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using Bacillus subtilis B2. *Food Control*, 19, 654–661.

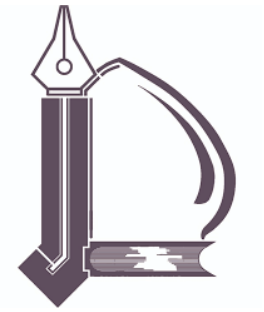
Zhou, T., Huo R., Kwok L.Y., Li C., Mo Y., Mi Z., Chen Y.2019. Effects of applying Lactobacillus helveticus H9 as adjunct starter culture in yogurt fermentation and storage. *J. Dairy Sci*. 102:1–13.

Abstract

Several factors are considered during production of yoghurt, among which selecting the right starter culture is one of the most important. Native starter cultures and co-cultures are an important part of every country’s genetic resources and play a significant role in the development of organoleptic properties and physicochemical changes in fermented products. In this study, we aimed to measure the proteolytic, ACE-inhibitory, and antioxidant activity of yoghurt produced with a commercial starter supplemented with native co-cultures isolated from traditional yoghurts of Khorasan during a 20-day period. We also compared the treatments with each other and with the commercial culture.

Initially, 5 strains of Lactobacillus delbrueckii, 2 strains of L. helveticus, 2 strains of Pediococcus pentosaceus, and a strain of Weissella cibaria were used to inoculate 20 yoghurt samples in a completely randomized factorial design with two replications. The samples were kept at 5 ˚C for 20 days and their physicochemical properties, degree of proteolysis, and ACE-inhibitory and antioxidant activity were measured. Finally, samples were compared with each other and with a control treatment which had been treated only with a commercial starter culture. The results of statistical analyses showed that application of native co-cultures significantly increased proteolytic, ACE-inhibitory, and antioxidant activity of samples. Proteolysis significantly increased as time progressed ($P<0.05$), but began to decline after proteolytic activity crossed a certain threshold (15th day). ACE-inhibitory and antioxidant activity showed similar trends. Our findings show that compared with other samples, yoghurt inoculated with strains of Lactobacillus lactis (71) and L. helveticus (82) had the highest scores for ACE-inhibitory and antioxidant activity. In all co-cultures, ACE-inhibitory and antioxidant activity exhibited a positive correlation with proteolysis. Our results show that co-cultures greatly affect ACE-inhibitory and antioxidant activity, can be used in production of functional food, and help prevent cardiovascular diseases.

Keywords: Yoghurt, Proteolysis, ACE inhibitory, adjunct cultures



Ferdowsi University of Mashhad
Faculty of Agriculture
Department of ...

Msc. Thesis of ...

Subject:
...

Thesis Advisor:
.... Ph.D.

Consulting Advisor:
....Ph.D.

By:

....

Autumn 2019