مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۴۸ , شماره ۲ ، تابستان ۱۳۹۶ (ص ۲۲۰-۲۱۱)

ارزیابی سینتیک رشد و بقاء *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* با به کارگیری سوبسترای جو و مالت و تأثیر آنها بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی محیط

مهدیه سالاری[۱]، سید هادی رضوی[۲*]

۱. دانشجوی دکتری ، گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۲. استاد ، گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۶- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۳)

چکیده

در این مطالعه پتانسیل محیط‌های جو، جو-مالت و مالت برای رشد و زنده‌مانی دو گونه *لاکتوباسیلوس* (*لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*) جهت تولید نوشیدنی فراسودمند بررسی شد. سپس تأثیر فرایند تخمیر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنول کل سه محیط ارزیابی شده و با همتایان غیر تخمیری خود مقایسه گردید. نتایج نشان داد باکتری‌های انتخابی به‌خوبی در سه محیط رشد کرده به طوری که طی ۱۰ ساعت اول تخمیر pH محیط‌ها تا حدود ۴/۲۵ کاهش یافت. بالاترین جمعیت میکروبی (۹/۷ log CFU/ml) در محیط مالت به دست آمد. محتوای فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی محیط‌ها طی تخمیر به طور قابل توجهی افزایش یافته و محیط مالت تخمیر شده توسط *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بالاترین میزان فنول کل (۸۳/۹۶ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و فعالیت ضد رادیکالی (IC_{50} =۰/۲۶ ml) نشان داد. به‌علاوه بیشترین زنده‌مانی (۱/۲×۱۰^{۶} CFU/ml) در محیط مالت تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* ثبت شد.

واژه‌های کلیدی: جو، مالت، تخمیر، لاکتوباسیلوس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

غلات منبع اصلی انرژی و مواد مغذی در جهان می‌باشند (Đordevic *et al*., 2010). فواید غلات برای سلامتی انسان موضوع بسیاری از تحقیقات بوده که مصرف غلات کامل را در پیشگیری از سندرم متابولیک، چاقی و بیماری‌های مزمن مانند بیماری‌های قلبی و عروقی و دیابت نوع دو مرتبط دانسته‌اند (Cai *et al*., 2015; Masisi *et al*., 2016). مزایای سلامتی بخش غلات در درجه اول به دلیل ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در آن‌ها نظیر اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، ویتامین‌ها، فیبر و ترکیبات معدنی می‌باشد (Poutanen 2012). البته ترکیب شیمیایی و دسترسی زیستی (Bioaccessibility) مواد مغذی بین گونه‌ها و واریته‌های مختلف غلات متفاوت بوده و توسط نوع فرایند غذا تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Senter *et al*., 1983). به تازگی صنایع فراوری مواد غذایی به سمت تولید مواد غذایی با ارزش افزوده برای سلامت مصرف کننده در حرکت می‌باشند. به طور خاص، فرایند تخمیر ساده‌ترین و اقتصادی‌ترین روش برای بهبود ارزش تغذیه‌ای، ماندگاری، خواص حسی و ویژگی‌های عملکردی (Functional quality) می‌باشد (Coda *et al*., 2011; Delcour *et al*., 2012; Hur *et al*., 2014). بسیاری از تغییرات بیوشیمیایی که در طول تخمیر رخ می‌دهد منجر به تغییر نسبت ترکیبات مغذی و ضد تغذیه‌ای مواد گیاهی شده که در نتیجه بر ویژگی‌های محصول نظیر زیست فعالی (Bioactive) و قابلیت هضم آن مؤثر می‌باشد (Katina *et al*., 2007b). از طرفی دانه‌های غلات نیز می‌توانند سوبسترا و حامل‌های مناسبی برای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک باشند. به علاوه به دلیل داشتن مقدار قابل توجهی ترکیبات زیست فعال نظیر کربوهیدرات‌های غیر قابل هضم، فیبر غذایی، الیگوساکاریدها و نشاسته مقاوم پریبیوتیک می‌باشند (Charalampopoulos *et al*., 2003; Gupta *et al*., 2010) بنابراین می‌توانند تأثیر مثبتی بر روی رشد و کلون کردن میکروفلور روده داشته باشند. علاوه بر این، غلات فاقد آلرژنت‌های لبنی بوده و مقدار چربی پایینی دارند (Prado *et al*., 2008; Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010; Rathore *et al*., 2012).

آنتی‌اکسیدان به ترکیبی گفته می‌شود در زمانی که در غلظت‌های پایین‌تری نسبت به ماده قابل اکسیداسیون حضور

* نویسنده مسئول : srazavi@ut.ac.ir

داشته باشد، به طور قابل توجهی اکسیداسیون آن ترکیب را به تعویق انداخته و یا مانع از اکسید شدن آن گردد (Halliwell, 2007). اگرچه آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند بوتیل هیدروکسی تولوئن ((Butylated hydroxytoluene (BHT)) ، بوتیل هیدروکسی آنیزول ((Butylated hydroxyanisole (BHA)) و ترشیو بوتیل هیدروکینون ((Tert-Butylhydroquinone (TBHQ)) و همچنین پروپیل گالات ((Propyl gallate (PG)) به طور گسترده‌ای برای به تأخیر انداختن اکسیداسیون چربی‌ها استفاده می‌شوند ولی امنیتشان به دلیل سمیت و سرطان‌زا بودن زیر سؤال رفته است (Shahidi, 2000). در حالی‌که آنتی‌اکسیدان‌های غذایی نظیر اسیدهای آمینه، پپتیدها، پروتئین‌ها، فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات فنولی نقش مهمی به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های فیزیولوژیکی داشته و در نتیجه موجب افزایش مقاومت طبیعی بدن به آسیب‌های اکسیداتیو می‌شوند (Đordevic *et al*., 2010).

مقدار قابل توجهی آنتی‌اکسیدان در غلات و فراورده‌های بر پایه غلات شناسایی شده است (Baublis *et al*., 2000). به طور خاص جو حاوی مقدار قابل توجهی آنتی‌اکسیدان‌های فنولیک بوده که به طور مؤثری در مهار رادیکال‌های پراکسیل، هیدروکسیل و ۲ و ۲ دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل ((2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)) و کنترل اکسیداسیون کلسترول LDL مؤثر می‌باشند (Madhujith & Shahidi, 2006,2007). همچنین مالت جو نیز حاوی مقادیر بالایی ترکیبات فنولی نظیر اسیدهای فنولیک (مشتقات بنزوئیک و سینامیک اسید)، فلاونوئیدها، پروآنتوسیانین‌ها، تانین‌ها و ترکیبات آمینو فنولیک می‌باشد (Zhao *et al*., 2008). پیشنهاد شده است که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند به فواید سلامتی‌بخش فراورده‌های غذایی بر پایه غلات از طریق کاهش بروز بیماری-های مزمن مرتبط با پیری کمک کنند (Miller *et al*., 2000). به علاوه طی تخمیر، متابولیت‌های زیست فعال جدیدی می‌تواند در غلات تولید شده و دسترسی زیستی به ترکیبات زیست فعال افزایش می‌یابد (Poutanen, 2012). بنابراین هدف از این مطالعه، امکان‌سنجی استفاده از جو و مالت به عنوان ماده اولیه جهت تولید نوشیدنی تخمیری فراسودمند با خواص آنتی‌اکسیدانی بهبود یافته می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و محیط کشت

اسید لاکتیک باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه (*لاکتوباسیلوس دلبروکی* (*Lactobacillus delbrueckii*) (DSMZ 20006) و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (*Lactobacillus paracasei*) (DSMZ 15996) از شرکت DSM GMBH (آلمان) به صورت لیوفیریزه خریداری شدند. در طول انجام تحقیق، کشت‌های باکتریایی به صورت منجمد در دمای ۲۰°C- در محیط MRS براث (شرکت مرک، آلمان) حاوی ۲۰٪ گلیسرول نگهداری شدند. باکتری‌ها در زمان نیاز از طریق کشت دادن بر روی محیط MRS براث (۲۴ ساعت، دمای ۳۷ °C) مجدداً فعال شدند (Rathore *et al*., 2012). آرد جو و مالت از شرکت به مالت (کرج، ایران) تهیه گردید.

آماده سازی محیط تخمیر

محیط تخمیر مورد استفاده در این مطالعه توسط آرد جو، آرد مالت و آرد جو-مالت (با نسبت‌های مساوی) تهیه شده و با نسبت ۱۵٪ w/w با آب مقطر ترکیب شدند. این نسبت بر اساس مطالعات اولیه انتخاب شد. در مرحله بعد سوسپانسیون در داخل فانل ریخته و به منظور ژلاتیناسیون نسبی نشاسته، به مدت ۱۵ دقیقه در یک حمام آب با دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه باقی ماند. نمونه‌ها پیش از تلقیح تا دمای ۳۷ °C خنک شدند (Angelov *et al*., 2006).

تهیه مایه تلقیح و فرایند تخمیر

ابتدا یک کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های اسید لاکتیک در MRS براث که در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شده بودند، تهیه شد. در مرحله بعد باکتری‌های اسید لاکتیک رشد یافته توسط سانتریفیوژ با شتاب g × ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه (۴ °C) از محیط کشت جداسازی شده، با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل شستشو و در آب مقطر استریل سوسپانسیون گردیدند. در نهایت سوسپانسیون میکروبی حاصله به عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. به محیط تخمیر (v/v) ۱۰٪ مایه تلقیح ($>10^7$ CFU/ml) اضافه شده و مخلوط در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. جهت انجام آنالیزهای شیمیایی و میکروبی نمونه‌برداری در فواصل زمانی معین طی زمان تخمیر انجام گرفت. برای آنالیزهای شیمیایی، نمونه‌ها در ابتدا در شتاب g × ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس سوپرناتانت تا زمان مورد نیاز در دمای ۲۰ °C- قرار گرفت (Mousavi *et al*., 2011).

شمارش سلولی

شمارش سلول‌های زنده بر حسب CFU/ml (سلول بر میلی‌لیتر) با استفاده از روش شمارش صفحه‌ای استاندارد (Standard plate count) در محیط کشت MRS آگار (pH = ۵/۷) پس از

گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۸ ساعت تعیین شد (Yoon *et al*., 2006).

اندازه‌گیری pH و اسیدیته قابل تیتراسیون

جهت اندازه‌گیری pH نوشیدنی‌ها از یک pH متر دیجیتالی (Metrohm 744، هلند) استفاده شد. اسیدیته کل از طریق تتیراسیون نمونه‌ها (۱۰ گرم نوشیدنی در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر) با محلول سدیم هیدروکسید (مرک، آلمان) ۰/۱ نرمال تا رسیدن به pH برابر با ۸/۳ تعیین شده و بر حسب گرم اسید لاکتیک معادل اسیدهای آلی در ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه بیان شد (Jahandideh *et al*., 2011).

اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک کل

ترکیبات فنولیک کل نمونه‌ها با استفاده از روش فولین-سیوکالتو (Folin–Ciocalteu) مطابق روش Shetty *et al*. (1995) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری گردید. به طور خلاصه، از نمونه‌های تخمیر شده و شاهد رقت‌های مناسب تهیه شده و ۱ میلی‌لیتر از آن با ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتو مخلوط شده و با ورتکس به خوبی به هم زده شد. پس از گذشت ۵ دقیقه ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم (Na_2Co_3) ۵٪ (وزنی – حجمی) به آن اضافه گردید. سپس محلول به دست آمده به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی و دمای محیط باقی مانده و در نهایت جذب آن در طول موج ۷۲۵ نانومتر در مقابل بلانک توسط اسپکتروفتومتر (CEILE CE 2502، ساخت کشور انگلستان) اندازه‌گیری شد. از اسید گالیک برای رسم منحنی استاندارد و محاسبه نتایج استفاده شده و مقدار ترکیبات فنولیک کل به صورت معادل میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه بیان گردید.

تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی توسط روش $DPPH^{\cdot}$

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها بر اساس فعالیت ضد رادیکالی آن‌ها در برابر رادیکال‌های پایدار $DPPH^{\cdot}$ اندازه‌گیری شد. به این صورت که به ۰/۳ میلی‌لیتر نمونه در غلظت‌های مختلف ۲/۷ میلی‌لیتر محلول متانولی رادیکال آزاد $DPPH^{\cdot}$ (۶×۱۰^{-۵} میلی-مولار) افزوده شد. مخلوط حاصل به هم زده شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی نگهداری گردید. کاهش رادیکال $DPPH^{\cdot}$ با اندازه‌گیری میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از یک اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد به همان روش تهیه شد اما به جای نمونه، متانول به محلول محلول متانولی رادیکال آزاد $DPPH^{\cdot}$ اضافه گردید. از حلال متانول برای صفر کردن دستگاه استفاده شد (Barros *et al*., 2008). میزان فعالیت گیرندگی رادیکال آزاد نمونه‌ها با فرمول زیر تعیین گردید:

$$\% \text{ Scavenging capacity (Sc)} = [(A_{Control} - A_{Sample}) / A_{Control}) \times 100 \quad \text{(رابطه ۱)}$$

که در آن $A_{Control}$ میزان جذب شاهد، A_{Sample} میزان جذب نمونه و Sc میزان ظرفیت آنتی‌رادیکالی می‌باشد.

به منظور بررسی بهتر فعالیت آنتی‌رادیکالی، فاکتور IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration) و کارایی ضد رادیکالی (Antiradical efficiency(AE)=1/IC_{50}) مورد استفاده قرار گرفتند. IC_{50} معرف غلظتی از نوشیدنی است که قادر به کاهش غلظت رادیکال آزاد $DPPH^{\cdot}$ به ۵۰٪ مقدار اولیه می‌باشد. مقدار $DPPH^{\cdot}$ باقیمانده در مقابل غلظت نمونه رسم شد تا فاکتور IC_{50} تعیین شود. مقدار به دست آمده با فعالیت آنتی-رادیکالی نمونه رابطه عکس دارد.

تعیین زنده‌مانی باکتری‌ها در نمونه‌های تخمیر شده طی نگهداری در سرما

به منظور بررسی تأثیر نگهداری در سرما بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس‌های انتخابی، نمونه‌های تخمیر شده در دمای °C ۴ به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. هر هفته از محیط‌ها نمونه برداری شده و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک با استفاده از روش شمارش صفحه‌ای استاندارد اندازه‌گیری شده و به صورت CFU/ml بیان گردید (Yoon *et al*., 2005).

تحلیل آماری

تمام آزمون‌ها در ۳ تکرار و در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی انجام شده و داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (SD) نمایش داده شدند. نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ برای تحلیل نتایج آزمایش مورد استفاده قرار گرفت (SAS Institute, Cary NC, USA). مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و جدول ANOVA در سطح احتمال ۵٪ انجام گردید.

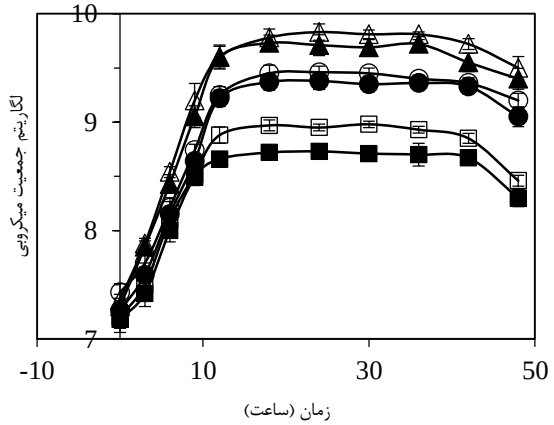
نتایج و بحث

سینتیک رشد باکتری‌ها

همان طور که بیان شد سه نوع سوسپانسیون مختلف از جو، مالت و جو- مالت به نسبت w/w ۱۵٪ آماده سازی شده و سپس با v/v ۱۰٪ باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* جهت به دست آوردن دانسیته سلولی اولیه $۱۰^{۷}$ CFU/ml تلقیح شد. تعداد بالای میکروارگانیسم‌های زنده می‌تواند به رسیدن به pH مناسب در زمان کوتاه‌تر کمک کرده که این امر منجر به کاهش ریسک آلودگی می‌گردد (Angelov *et al*., 2006; Rathore *et al*., 2012). تغییرات

جمعیت میکروبی هر یک از محیط‌ها طی فرایند تخمیر در شکل ۱ آمده است.

هر دو باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* توانستند بدون نیاز به افزودن مکمل غذایی (منبع کربن و نیتروژن)، و یا تنظیم pH سوبسترای غلات را به راحتی مورد استفاده قرار داده و رشد کنند. Yoon *et al*. (2006) نیز نشان دادند هر سه باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس کازئی* می‌توانند در محیط آب کلم بدون افزودن هیچ ماده مغذی رشد کنند. در تمامی نمونه‌ها کاهش جمعیت میکروبی مشاهده نشد. جمعیت سلولی اولیه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* تقریباً log_{10} CFU/ml ۷/۳۶-۷/۲۰ بوده که بعد از ۱۵ ساعت تخمیر در دمای ۳۷ °C به ترتیب به حدود ۸/۹۰ و log_{10} CFU/ml ۸/۷۰ در محیط جو، ۹/۴۰ و log_{10} CFU/ml ۹/۳۰ در محیط جو- مالت و ۹/۷۵ و log_{10} CFU/ml ۹/۷۳ در محیط مالت رسید و بعد از آن هیچ افزایش قابل توجهی مشاهده نشد تا آن که منحنی‌های رشد باکتریایی به فاز مرگ رسیدند. نتایج نشان دهنده رشد بیشتر باکتری‌ها در محیط‌های مالت و جو-مالت نسبت به محیط جو بود. مناسب بودن بیشتر این سوبستراها احتمالاً به علت منوساکاریدها (گلوکز و فروکتوز) و دی‌ساکاریدهای (مالتوز و ساکارز) موجود در محیط مالت بوده که منجر به رشد بالاتر پروبیوتیک‌ها می‌گردد (Charalampopoulos *et al*., 2002). به علاوه شمارش سلولی بالاتر *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در مقایسه با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* در هر سه محیط، احتمالاً می‌تواند به دلیل توانایی بالاتر *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در استفاده از ترکیبات محیط کشت باشد.



شکل ۱. منحنی رشد *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (اشکال سفید) و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (اشکال سیاه) طی ۴۸ ساعت تخمیر محیط‌های مالت (▲)، جو-مالت (●) و جو (■) در دمای ۳۷ °C.

pH و اسیدیته

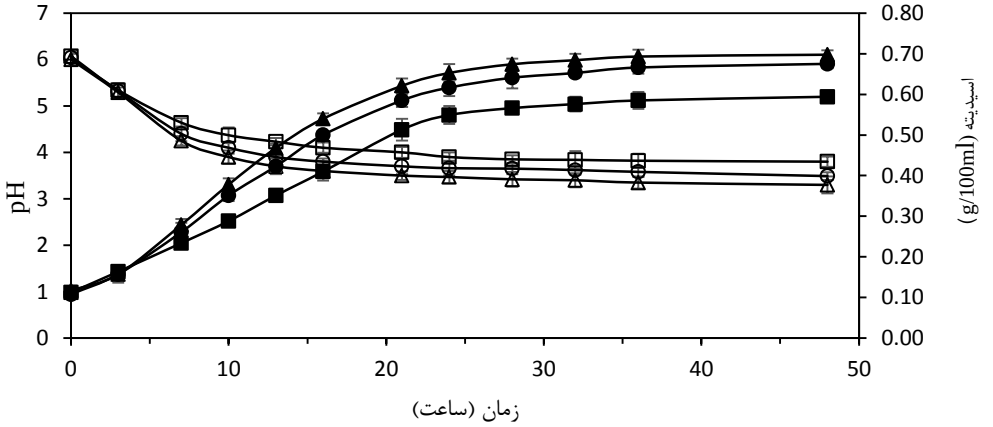
تغییرات pH و اسیدیته نمونه‌ها طی ۴۸ ساعت تخمیر در شکل ۲ نشان داده شده است. کاهش pH در طول فرایند تخمیر لاکتیکی به دلیل مصرف کربوهیدرات‌ها توسط باکتری‌ها و تولید اسیدهای آلی به ویژه اسید لاکتیک می‌باشد. همان طور که در شکل نشان داده شده است، سرعت کاهش مقدار pH و نرخ اسیدی شدن در طی دوره رشد لگاریتمی بسیار سریع بوده در حالی که در طی دوره سکون این روند بسیار آهسته می‌باشد. مقدار pH هر سه محیط قبل از تخمیر حدود ۶ بوده که پس از ۱۰ ساعت تخمیر این مقدار تا حدود ۴/۲۵ کاهش می‌یابد. بیشترین کاهش pH و افزایش اسیدیته تخمیر توسط *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در محیط مالت مشاهده شد که پس از ۴۸ ساعت تخمیر به ترتیب به مقادیر ۳/۲۵ و ۰/۷۱ گرم در ۱۰۰ گرم رسیدند. در همین زمان، محیط جو تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* با مقدار pH ۳/۸ و اسیدیته ۰/۵۹ گرم در ۱۰۰ گرم، بالاترین pH و کمترین اسیدیته را نشان داد. به طور کلی کاهش pH و افزایش اسیدیته در محیط جو نسبت به محیط‌های جو – مالت و مالت کمتر بود که احتمالاً به دلیل رشد کمتر باکتری‌ها در این محیط می‌باشد. اسیدی شدن محیط در نتیجه تولید اسیدهای آلی توسط باکتری‌ها، بر بهبود خواص حسی و ارگانولپتیکی محصول نهایی، افزایش ماندگاری آن و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های نامطلوب مؤثر است (Caplic & fitzgerald, 1999).

مقدار فنول کل

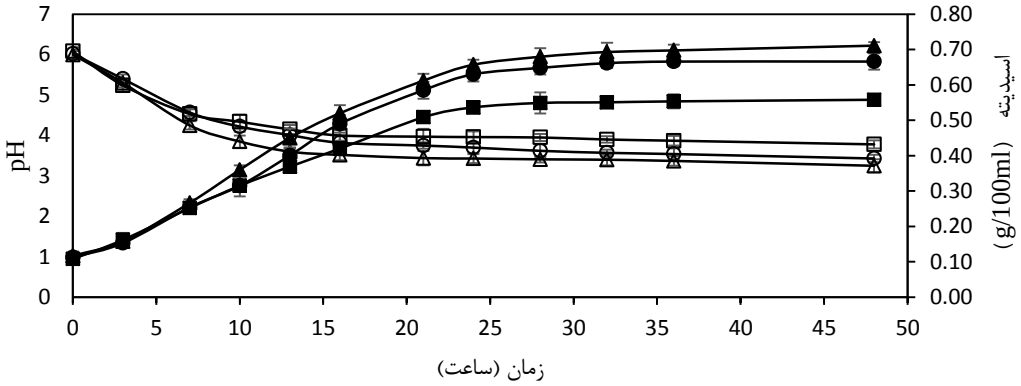
مقدار ترکیبات فنولیک کل نمونه‌ها پس از ۱۵ ساعت تخمیر در دمای ۳۷ °C، با استفاده از روش فولین سیوکالتو به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ میلی لیتر نوشیدنی بر اساس معادله خط منحنی استاندارد (R^2 = ۰/۹۹۱۴، ۰/۰۲۱۲+ y= ۰/۰۰۸۹x) محاسبه شد.

همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، بیشترین میزان ترکیبات فنولیک در محیط مالت ، ۶۲/۰۹ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر، بود. محیط جو-مالت و جو حاوی مقدار ترکیبات فنولیک کمتری (به ترتیب ۵۵/۵۰ و ۴۷/۹۵ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر) بودند. فرایند مالت سازی از جو تأثیر بسزایی بر محتوای فنول منفرد و فنول کل و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی دارد. مقدار برخی از ترکیبات فنولی نظیر فرولیک اسید، *p*-کوماریک اسید و سیناپیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی طی جوانه زنی و

متعاقب آن مرحله خشک کردن (kilning) افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند (Lu *et al*., 2007; Leitao *et al*., 2012). Fogarasi *et al*. (2015) میزان ترکیبات فنولیک ۹ غله مختلف را مورد بررسی قرار داده که در بین آن‌ها جو بیشترین میزان ترکیبات فنولیک داشته و میزان این ترکیبات طی فرایند مالت سازی افزایش یافت.



الف

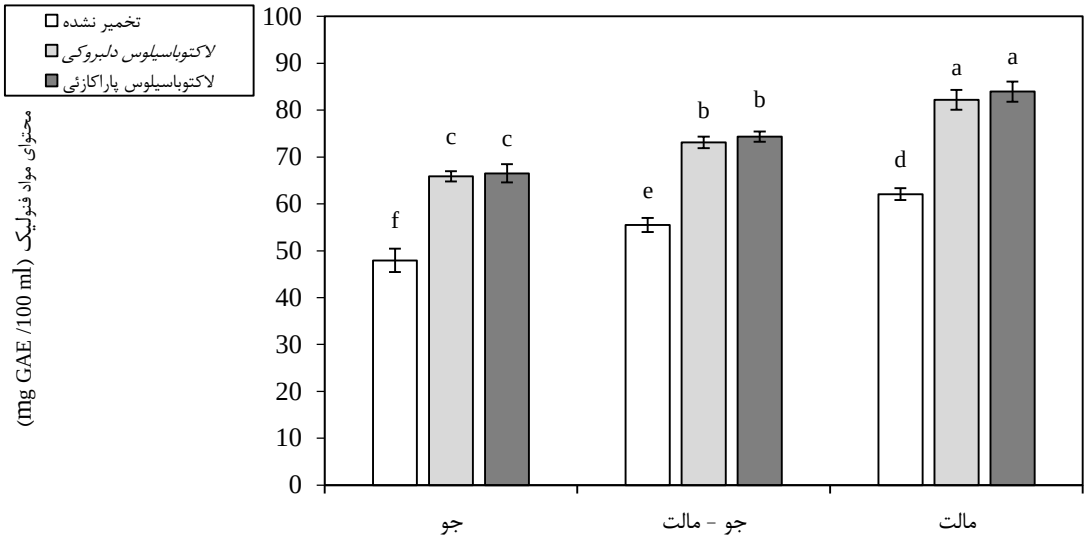


ب

شکل ۲. تغییرات pH (اشکال سفید) و اسیدیته (اشکال سیاه) طی ۴۸ ساعت تخمیر محیط‌های مالت (▲)، جو-مالت (●) و جو (■) توسط *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (الف) و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (ب).

سطح ترکیبات زیست فعال در غلات می‌تواند به طور قابل توجهی از طریق افزودن مایه تلقیح بهبود یابد. که در این زمینه تأثیر *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* نسبت به *لاکتوباسیلوس دلبروکی* به طور معنی‌داری بیشتر بود (P <۰/۰۵) (شکل ۳). میزان فنول کل در محیط مالت تخمیر نشده ۶۲/۰۹ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر بود که پس از تخمیر توسط *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* به ترتیب به ۸۲/۲۱ و ۸۳/۹۶ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ میلی-لیتر، رسید. این داده‌ها برای محیط جو-مالت به ترتیب ۵۵/۵۰، ۷۳/۱۰ و ۷۴/۳۷ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ میلی-لیتر بود. کمترین میزان فنول کل مربوط به محیط جو بوده (۴۷/۹۵ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر) که پس از تخمیر با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* به ترتیب به ۶۵/۸۷ و ۶۶/۵۲ میلی گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. Đordevic *et al*. (2010) نشان دادند که میزان فنول کل غلات توسط نوع استارتر تخمیر تحت تأثیر قرار گرفته و مقدار این ترکیبات در غلات تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*Lactobacillus rhamnosus*) نسبت به نمونه‌های تخمیر شده با *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) بیشتر است. تخریب دیواره سلولی در حین تخمیر منجر به رهایش و یا سنتز ترکیبات زیست فعال می‌گردد. همچنین طی تخمیر آنزیم‌هایی نظیر آمیلاز، زایلاناز و پروتئاز مشتق شده از دانه‌ها و میکروب، به اصلاح ترکیبات دانه کمک کرده و ترکیبات فنولیک پیوندی نیز ممکن است آزاد شوند (Katina *et al*., 2007a). همچنین بتا گلیکوزیدازهای منشاء گرفته از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در هیدرولیز فنول‌ها و فلاونوئیدها شرکت کرده و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها را بهبود بخشند (Bhatia *et al*., 2002). Beek & Priest

(2000) بیان کردند سویه‌های لاکتوباسیلوس ایزوله شده از ویسکی مالت تخمیری نظیر *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، حاوی ژن آنزیم هیدروکسی *p*-کوماریک اسید دکربوکسیلاز بوده که می‌توانند *p*-کوماریک اسید و یا فرولیک اسید را دکربوکسیله کرده و به ترتیب ۴-وینیل فنول و یا ۴-ونیل گوایکول تولید کرده و در نتیجه در متابولیسم ترکیبات فنولیک شرکت کنند. بنابراین تخمیر می‌تواند تأثیر مثبتی بر روی محتوای فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلات داشته ولی درجه تأثیر بسته به نوع میکروارگانیسم مورد استفاده متفاوت است.



شکل ۳. محتوای فنول کل محیط‌های جو، جو- مالت و مالت. حروف غیر مشترک نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین نتایج می‌باشد (P <۰/۰۵ ، آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

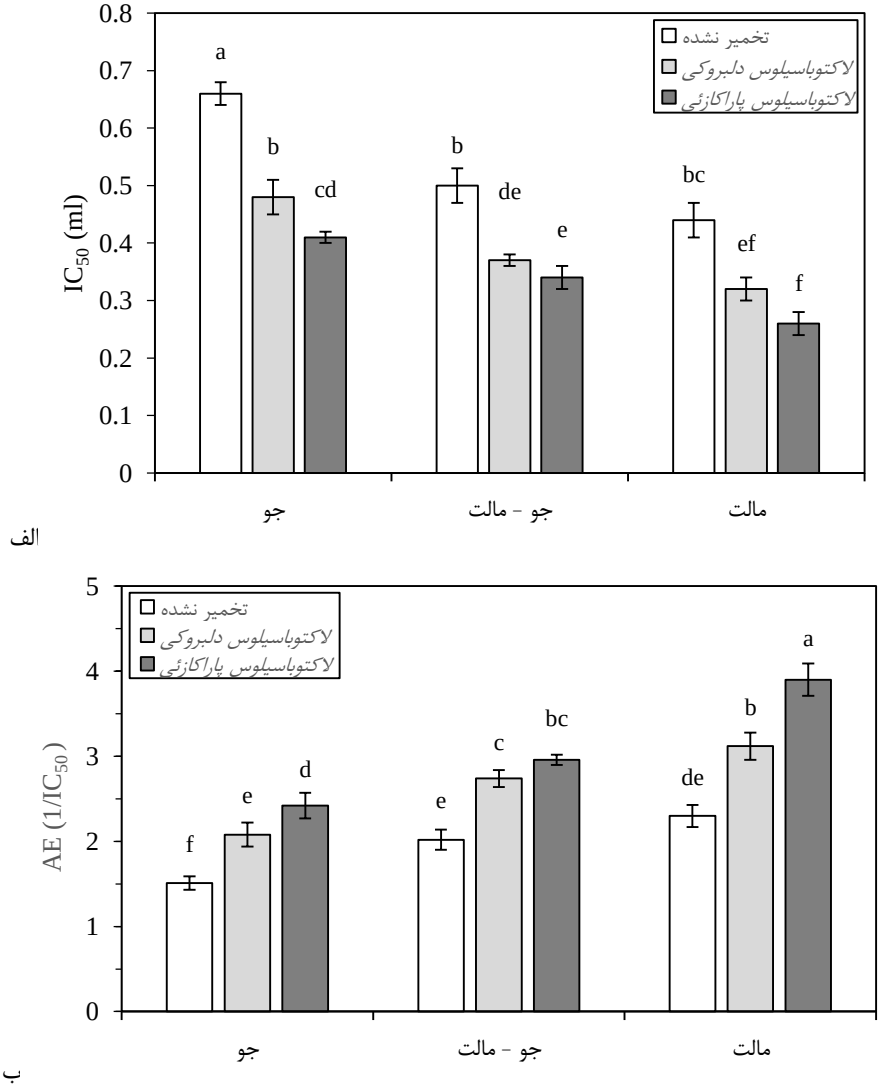
خاصیت آنتی‌اکسیدانی

امروزه DPPH· به طور گسترده برای ارزیابی فعالیت مهار رادیکالی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب یک رادیکال آزاد پایدار بوده که با قبول یک رادیکال الکترون یا هیدروژن به یک مولکول دیامغناطیس پایدار تبدیل می‌شود (Soares *et al.*, 1997). میزان کاهش رادیکال‌های DPPH· از طریق کاهش میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر که ناشی از وجود آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد، مشخص می‌شود (Goupy *et al.*, 1999; Fardet *et al.*, 2008).

نتایج مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها پس از گذشت ۱۵ ساعت از زمان تخمیر در شکل ۴ آمده است. به طور کلی، مالت با بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (IC_{50} =۰/۴۴ ml) و کارایی ضدرادیکالی (AE =۲/۳۰) را نشان می‌دهد. علت این امر آن است که ترکیبات فنولیک تا حد بالایی در پتانسیل آنتی‌اکسیدانی جو و مالت شرکت می‌کنند (Liu & Yao, 2007). پس از مالت، محیط جو-مالت با داشتن IC_{50} =۰/۵ ml و AE =۲/۰۲ در رده دوم قرار می‌گیرد. کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کارایی ضدرادیکالی مربوط به محیط جو با IC_{50} =۰/۶۶ ml و AE =۱/۵۱ می‌باشد. مشخص شده است روش DPPH برای برآورد فعالیت آنتی‌رادیکالی جو کاملاً مناسب بوده و با مقدار ترکیبات فنولی موجود در آن به ویژه فلاون ۳-اُل در ارتباط می‌باشد (Goupy *et al.*, 1999). مالت علاوه بر داشتن ترکیبات مختلف از جو (ترکیبات فنولیک اندوژن (Endogenous phenolic compounds) دارای ترکیباتی از فرایند مالت سازی (محصولات واکنش مایلارد) بوده که در فعالیت آنتی‌اکسیدانی شرکت می‌کنند (Maillard *et al.*, 1996).

تخمیر توسط باکتری‌های لاکتیکی موجب افزایش قابل توجهی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کارایی ضد رادیکالی نمونه‌ها گردید. البته در این مورد بین نمونه‌های تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* تفاوت معنی داری جود نداشت (P <۰/۰۵). در تخمیر محیط مالت توسط *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* IC_{50} و AE به ترتیب از مقدار اولیه ۰/۴۴ میلی‌لیتر و ۲/۳ در نمونه تخمیر نشده به ۰/۲۶ میلی‌لیتر و ۳/۹ در نمونه تخمیر شده رسید. نتایج مشابه از افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پس از تخمیر با *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در محیط جو-مالت (به ترتیب ۰/۵ و ۰/۳۴ میلی‌لیتر) و محیط جو (به ترتیب ۰/۶۶ و ۰/۴۱ میلی‌لیتر) به دست آمد. تخمیر با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* تأثیر کمتری بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها گذاشت (شکل ۴). میزان IC_{50} نمونه‌های

تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس دلبروکی* برای محیط‌های مالت، جو-مالت و جو به ترتیب ۰/۳۲، ۰/۳۷ و ۰/۴۸ میلی‌لیتر بود. نتایج به دست آمده با نتایج گزارش شده توسط Wang *et al*. (2014) مشابه بود. آن‌ها بیان کردند میزان ترکیبات زیست فعال و همچنین فعالیت مهار رادیکال DPPH غلات پس از تخمیر توسط *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) و *لاکتوباسیلوس پلانتارم* (*Lactobacillus plantarum*) افزایش می‌یابد. Yang *et al*., (2000) شیر سویا را توسط کشت مخلوطی از باکتری‌ها شامل سویه‌های مختلف *استوباکتر*، *لاکتوباسیلوس* و *استرپتومایسس* تخمیر کردند. نتایج آن‌ها نشان داد نمونه تخمیری نسبت به شیر سویای تخمیر نشده فعالیت کاهندگی، جذب رادیکال آزاد DPPH، و همچنین شلاته کنندگی یون آهن بالاتری نشان می‌دهند. فرایند تخمیر، ساختار و قطبیت فاکتورهای آنتی اکسیدانی در غلات را تغییر داده و یا موجب تولید ترکیبات فنولیک با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا شده و همین علت موجب اختلاف فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلات با و بدون تخمیر می‌شود (Wang *et al*., 2014).



شکل ۴. فعالیت ضد رادیکالی (IC_{50}) (الف) و کارایی ضد رادیکالی (AE) (ب) محیط‌های جو، جو- مالت و مالت. حروف غیر مشترک نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین نتایج می‌باشد (P <۰/۰۵ ، آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

تأثیر نگهداری در سرما بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس‌ها

تغییرات مشاهده شده در زنده‌مانی باکتری‌ها در نمونه‌های تخمیر شده در جدول ۱ آمده است. در محیط جو، شمارش سلولی به تدریج کاهش یافته و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* به ترتیب پس از ۲ و ۳ هفته زنده‌مانی خود را به طور کامل از دست دادند. نتایج نشان دهنده آن بود که مالت محیط ایده‌آلی برای زنده ماندن باکتری‌های لاکتیکی در طی نگهداری در سرما می‌باشد. به همین علت، باکتری‌ها در محیط‌های مالت و جو- مالت حتی پس از گذشتن ۴ هفته از زمان تخمیر زنده باقی ماندند. نتایج تحقیقات

Charalampopoulos *et al*. (2003) نشان داد که عصاره غلات به ویژه مالت، به علت داشتن مقدار زیاد قند، تأثیر مثبتی بر زنده‌مانی اسید لاکتیک باکتری‌ها تحت شرایط اسیدی دارد. شمارش سلولی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* در محیط مالت پس از گذشت ۴ هفته نگهداری در دمای ۴°C در سطح قابل قبول (10^{6}-10^{7} CFU/ml) باقی ماند. در همین زمان، جمعیت میکروبی *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* به $3/0 \times 10^{5}$ CFU/ml رسید. در مطالعه صورت گرفته توسط Mousavi *et al*., (2011) نیز *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* نسبت به *لاکتوباسیلوس دلبروکی* مقاومت کمتری در برابر شرایط اسیدی طی نگهداری در سرما نشان داد.

برای دستیابی به اثرات سودمند سلامتی‌زا و درمانی پروبیوتیک‌ها، حداقل تعداد اسید لاکتیک باکتری‌ها در محصول نهایی پروبیوتیک باید 10^{6} CFU/ml بر اساس ۱۰۰ ml دوز روزانه باشد (Shah, 2001). فاکتور اصلی از دست رفتن زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک، pH پایین و تجمع اسیدهای آلی تولید شده در نتیجه رشد آن‌ها و تخمیر می‌باشد (Hood & Zottola, 1998). هرچند سایر فاکتورها نظیر نگهداری در سرما، تولید اسید لاکتیک، سطح اکسیژن، کمبود مواد مغذی، شرایط کشت و زمان تخمیر نیز بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مؤثر می‌باشند (Shah, 2001).

جدول ۱. تأثیر نگهداری در سرما بر زنده‌مانی (CFU/ml) *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در محیط‌های جو، جو-مالت و مالت.

محیط*	جو		جو- مالت		مالت	
زمان (هفته)	*لاکتوباسیلوس پاراکازئی*	*لاکتوباسیلوس دلبروکی*	*لاکتوباسیلوس پاراکازئی*	*لاکتوباسیلوس دلبروکی*	*لاکتوباسیلوس پاراکازئی*	*لاکتوباسیلوس دلبروکی*
۰	$8/2 \pm 0/24 \times 10^{8}$ a	$4/9 \pm 0/22 \times 10^{8}$ a	$2/05 \pm 0/21 \times 10^{9}$ a	$1/7 \pm 0/12 \times 10^{9}$ a	$4/47 \pm 0/31 \times 10^{9}$ a	$5/7 \pm 0/25 \times 10^{9}$ a
۱	$3/3 \pm 0/21 \times 10^{6}$ b	$3/5 \pm 0/16 \times 10^{7}$ b	$3/2 \pm 0/34 \times 10^{8}$ b	$2/26 \pm 0/25 \times 10^{8}$ b	$6/5 \pm 0/26 \times 10^{8}$ b	$5/0 \pm 0/12 \times 10^{8}$ b
۲	$2/0 \pm 0/12 \times 10^{5}$ b	$2/3 \pm 0/29 \times 10^{6}$ c	$4/0 \pm 0/34 \times 10^{6}$ c	$3/23 \pm 0/12 \times 10^{7}$ c	$2/3 \pm 0/22 \times 10^{8}$ c	$3/3 \pm 0/17 \times 10^{7}$ c
۳	ش.ن	$3/3 \pm 0/24 \times 10^{5}$ c	$1/8 \pm 0/29 \times 10^{5}$ c	$4/0 \pm 0/21 \times 10^{6}$ c	$3/3 \pm 0/21 \times 10^{7}$ c	$4/1 \pm 0/12 \times 10^{6}$ c
۴	ش.ن	ش.ن	$3/0 \pm 0/25 \times 10^{4}$ c	$2/6 \pm 0/08 \times 10^{5}$ c	$3/0 \pm 0/16 \times 10^{5}$ c	$1/2 \pm 0/09 \times 10^{6}$ c

ش.ن: شمارش نشده

*** نتایج (میانگین ± انحراف معیار برای سه تکرار) دارای حروف غیر مشترک در هر محیط تفاوت معنی‌دار با یکدیگر دارند (P <۰/۰۵)، آزمون چند دامنه‌ای دانکن).**

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد جو و مالت (به ویژه مالت) مواد اولیه مناسبی برای تولید نوشیدنی‌های تخمیری فراسودمند بر پایه غلات می‌باشند. لاکتوباسیلوس‌ها توانستند بدون هیچ گونه مکمل غذایی در این محیط‌ها رشد کرده به طوری که تعداد سلول‌های زنده پس از گذشت ۱۵ ساعت تخمیر در دمای ۳۷ °C، به بیش از 10^{8} CFU/ml رسید. باکتری‌های لاکتیکی در پایان دوره رشد لگاریتمی خود pH محیط‌ها را به زیر ۴ کاهش داده که از لحاظ تکنولوژیکی و ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های ناخواسته بسیار حایز اهمیت است. هر سه محیط مقدار فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نشان داده که پس از فرایند تخمیر مقدار این دو پارامتر به طور معنی‌داری افزایش یافت (P <۰/۰۵). در این رابطه تأثیر *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* نسبت به *لاکتوباسیلوس دلبروکی* بیشتر بود. همچنین مشخص شد محیط مالت می‌تواند پایداری لاکتوباسیلوس‌ها را نسبت به pH پایین و اسیدیته بالا افزایش دهد. بنابراین می‌توان گفت فرایند تخمیر غلات، منجر به تولید محصولی با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های تغذیه‌ای بهبود یافته شده که می‌تواند به افزایش سلامت مصرف کننده کمک کند.

REFERENCES

Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva R., Hristozova, T. (2006). Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 75–80.

Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R. (2008). Antioxidant activity of Agaricus sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*, 111, 61–66.

Baublis, A., Decker, E. A., Clydesdale, F.M. (2000). Antioxidant effects of aqueous extracts from wheat-based ready-to-eat breakfast cereals. *Food Chemistry*, 68, 1–6.

Beek, S., Priest, F. (2000). Decarboxylation of

Substituted Cinnamic Acids by Lactic Acid Bacteria Isolated during Malt Whisky Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5322–5328.

Bhatia, Y., Mishra, S., Bisaria, V.S. (2002). Microbial b-glucosidases: cloning, properties, and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22, 375-407.

Cai, S., Han, Z., Huang, Y., Chen, Z.H., Zhang, G., Dai, F. (2015). Genetic Diversity of Individual Phenolic Acids in Barley and Their Correlation with Barley Malt Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 7051−7057.

Caplic, E. and fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of Food Micribiology*, 50, 131-149.

Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. Webb, C. (2003). Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 133– 141.

Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S., Webb, C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 851–859.

Coda, R., Rizzello, C.G., Trani, A., Gobbetti, M. (2011). Manufacture and characterization of functional emmer beverages fermented by selected lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28, 526–536.

Delcour, J. A., Rouau, X., Courtin, C. M., Poutanen, K., Ranieri, R. (2012). Technologies for enhanced exploitation of the health-promoting potential of cereals. *Trends in Food Science and Technology*. 25, 78-86.

Đordevic, T.M., Šiler-Marinkovic S.S. and S.I. Dimitrijevic´-Brankovic. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 119, 957–963.

Fardet, A., Rock, E., Remesy, C. (2008). Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo. *Journal of Cereal Science*, 48, 258–276.

Fogarasi, A.L., Kun, S., Tankó, G., Stefanovits-Bányai, É., Hegyesné-Vecseri, B. (2015). A comparative assessment of antioxidant properties, total phenolic content of einkorn, wheat, barley and their malts. *Food Chemistry*, 167, 1–6.

Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, J. (1999). Antioxidant composition an activity of barley (Hordeum vulgare) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 79, 1625–1634.

Gupta, S.S., Cox, S., Abu-Ghannam, N. (2010). Process optimization for the development of a functional beverage based on lactic acid fermentation of oats. *Biochemical Engineering Journal*, 52, 199-204.

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5), 1147–1150.

Hood, S.K., Zottola, M.L. (1998). Effect of low pH on the ability of Lactobacillus acidophilus to suvive and adhere to human intestinal cell. *Journal of Food Science*, 53, 1514-1516.

Hur, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.C., Choi, I.W., Kim, G.B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346-356.

Jahandideh, F., Mousavi, S.M., Razavi. S.H. (2011). Utilization of *Echium amoenum* extract as a growth medium for the production of organic acids by selected lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2275-2279.

Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K-H., Kariluoto, S., Piironen, V., Landberg, R., Aman, P., Poutanen, K. (2007a). Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiology*, 24, 175–186.

Katina, K., Liukkonen, K.H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S.M., Lampi, A.M. (2007b). Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*, 46, 348-355.

Leitao, C., Marchioni, E., Bergaentzlé, M., Zhao, M., Didierjean, L., Miesch, L., Holder, E., Miesch, M., Ennahar, S. (2012). Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. *Journal of Cereal Science*, 55, 318−322.

Liu, Q., Yao, H. (2007). Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chemistry*, 102, 732–737.

Lu, J., Zhao, H.F., Chen, J., Fan, W., Dong, J.J., Kong, W.B., Sun, J., Cao, Y., Cai, G. (2007). Evolution of phenolic compounds and antioxidant activity during malting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10994–11001.

Madhujith, T., Shahidi, F. (2006). Optimization of the extraction of antioxidative constituents of six barley cultivars and their antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8048–8057.

Madhujith, T., Shahidi, F. (2007). Antioxidative and antiproliferative properties of selected barley (Hordeum vulgarae L.) cultivars and their potential for inhibition of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5018–5024.

Maillard, M.N., Soum, M.H., Boivin, P., Berset, C. (1996). Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29, 238–244.

Masisi, K., Beta, T., Moghadasian, M.T. (2016). Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chemistry*, 196, 90–97.

Miller, H. E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., Kanter, M. (2000). Whole-grain products and

antioxidants. *Cereal Food World*, 45, 59–63.

Mousavi, Z.E., Mousavi, S.M., Razavi, S.H., Emam-Djomeh, Z, Kiani, H. (2011). Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 123–128.

Poutanen, K. (2012). Past and future of cereal grains as food for health. *Trends in Food Science & Technology*, 25, 58-62.

Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A., Soccol, C.R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41, 111–123.

Rathore, S., Salmerón, I., Pandiella, S.S. (2012). Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiology*, 30, 239–244.

Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27, 1-11.

Senter, S.D., Horvat, R.J., Forbus, W.R. (1983). Comparative GLCMS analysis of phenolic acids of selected tree nuts. *Journal of Food Science*, 48, 798–803.

Shah, N.P., (2001). Functional Foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, 55, 46-53.

Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44, 158–163.

Shetty, K., Curtis, O.F., Levin, R.E., Witkowsky, R., Ang, W. (1995). Prevention of Vitrification Aßociated with in vitro Shoot Culture of Oregano. (Origanum vulgare) by Pseudomonas spp. *Journal of Plant Physiology*, 147, 447–451.

Soares, J.R., Dins, T.C.P., Cunha, A.P., Ameida, L.M. (1997). Antioxidant activity of some extracts of Thymus zygis. *Free Radical Research*, 26, 469–478.

Wang, C.Y., Wu, S.J., Shyu, Y.T. (2014). Antioxidant properties of certain cereals as affected by food-grade bacteria fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 449-456.

Yang, J.H., Mau, J.L., Ko, P.T., Huang, L.C. (2000). Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chemistry*, 71, 249–254.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E., Hang, Y.D. (2006). Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97, 1427–1430.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E., Hang, Y.D., (2005). Probiotication of Tomato Juice by Lactic Acid Bacteria. *The Journal of Microbiology*, 42, 315-318.

Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y., Kong, W. (2008). Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*, 107, 296–304.