

بررسی تأثیر تخمیر لاکتیکی توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیمی لیپاز و لیپوکسیژناز جنین گندم

احسان دیوان خسروشاهی^۱، سید هادی رضوی^۲، حسین کیانی^۳، علی آقاخانی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فن آوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران
۲- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فن آوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران
پست الکترونیکی: srazavi@ut.ac.ir
۳- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فن آوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۴/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۸

چکیده

سابقه و هدف: جنین گندم، مغذی‌ترین قسمت دانه گندم می‌باشد که به‌علت محتوای روغنی بالا و حضور آنزیم‌های لیپاز و لیپوکسیژناز عمرماندگاری پایینی دارد، لذا در طول فرآیند آردسازی از کل دانه گندم جدا می‌شود و در حال حاضر اغلب به مصرف دام می‌رسد. هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر تخمیر توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر فعالیت لیپاز، لیپوکسیژناز و خواص آنتی‌اکسیدانی جنین گندم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: غلظت‌های مختلف (۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) جنین گندم توسط تعداد مشخصی از باکتری‌ها (10^9 Log CFU/mL) به صورت جداگانه تلقیح شد و پس از گرمخانه‌گذاری، میزان تغییرات pH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، لیپاز و لیپوکسیژناز نسبت به نمونه تخمیر نشده مورد ارزیابی قرار گرفت و همچنین تأثیر آغازگرهای مختلف بر خصوصیات ذکر شده با هم مقایسه گردید.

یافته‌ها: تخمیر توسط هر دو باکتری به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز و لیپوکسیژناز را کاهش داد و به‌طور کلی نمونه جنین گندم تخمیر شده با غلظت ۲۰ درصد توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم، بیشترین میزان کاهش در فعالیت هر دو آنزیم (۷۱/۴۳ برای لیپاز و ۶۵ درصد برای لیپوکسیژناز) نسبت به جنین گندم تخمیر نشده را نشان داد. جنین گندم خام، فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی داشت و تخمیر باعث افزایش معنی‌داری در میزان آن شد. بررسی نوع آغازگر و غلظت سوبسترا نشان داد که بیشترین (۲۹/۹۷ درصد) و کمترین (۲۱/۵۵ درصد) میزان افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پس از تخمیر به ترتیب مربوط به نمونه تخمیر شده توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم در غلظت ۲۰ درصد و نمونه تخمیر شده توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در غلظت ۱۰ درصد جنین گندم می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تخمیر توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم به‌طور معنی‌داری فعالیت آنتی‌اکسیدانی جنین گندم را بهبود می‌بخشد و همچنین با کاهش معنی‌دار فعالیت لیپاز و لیپوکسیژناز، باعث افزایش عمر ماندگاری آن می‌شود.

واژگان کلیدی: جنین گندم، تخمیر لاکتیکی، لیپاز، لیپوکسیژناز، آنتی‌اکسیدان

• مقدمه

سازمان غذا و کشاورزی ایالات متحده (FAO) و (Food and Agriculture Organization of the United Nations)، میزان کل تولید جهانی غلات در سال ۲۰۱۷ را ۳۳۳۱ میلیون تن اعلام کرده است (۳). در میان غلات، گندم به‌عنوان ماده‌ی اصلی در رژیم غذایی بخش بزرگی از جمعیت جهان قرار دارد و تقریباً ۲۰ تا ۸۰ درصد کل مصارف غذایی در نواحی مختلف جهان را شامل می‌شود (۴). در میان غلات، گندم (حدود

استفاده بهینه از محصولات جانبی تولیدی در صنایع مختلف تبدیلی کشاورزی، به‌منظور کاهش ضایعات و ایجاد ارزش افزوده، همواره از اهداف اصلی محققین صنایع غذایی به‌حساب می‌آید. غلات از مهمترین تولیدات کشاورزی محسوب می‌شوند و به‌عنوان یکی از منابع اصلی تغذیه‌ای، حدود ۷۳ درصد از سطح زیر کشت و حدود ۶۰ درصد کل تولیدات مواد غذایی در جهان را تشکیل می‌دهند (۱، ۲).

جنین گندم به دلیل محتوای روغنی بالا و همچنین وجود آنزیم‌های لیپاز و لیپوکسیژناز، زمان ماندگاری پایینی دارد و به راحتی در معرض اکسیداسیون و فاسد شدن قرار می‌گیرد. لذا در طول فرآیند آردسازی از دانه گندم جدا می‌شود. بنابراین قابلیت استفاده‌ی بهینه و مصارف انسانی از این ماده بسیار با ارزش محدود بوده و در حال حاضر اکثر جنین گندم تولیدی، برای تغذیه‌ی دام مورد استفاده قرار می‌گیرد و مصارف دیگر آن به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است (۹، ۸). صنعت آرد سازی هر ساله مقادیر زیادی از این ماده‌ی مغذی را به عنوان محصول جانبی تولید می‌کند و میزان تولید جهانی جنین گندم سالانه حدود ۲۵ میلیون تن تخمین زده می‌شود که با توجه به ارزش تغذیه‌ای و میزان حجم تولید، محصول جانبی مهمی برای ارزش نهادن می‌باشد (۶). در نتیجه، با توجه به زمان ماندگاری کوتاه جنین گندم، تکنیک‌های دقیقی برای پایدارسازی و افزایش عمر ماندگاری در کنار حفظ ارزش تغذیه‌ای آن و پژوهش‌های بیشتری برای استفاده‌ی بهینه از جنین گندم به عنوان مکمل غذایی و همچنین در مواد غذایی فراسودمند مورد نیاز است (۱۰، ۶).

غیر فعال کردن آنزیم‌های اکسیداتیو (لیپاز و لیپوکسیژناز) یا جدا کردن روغن برای داشتن جنین گندمی پایدار ضروری است که این کار را می‌توان به طرق مختلف فیزیکی (حرارت، پرتوافکنی، حرارتی-مکانیکی)، شیمیایی (قلیایی، اسیدی) و بیولوژیکی (تخمیر) انجام داد. با این حال، تخمیر به عنوان روشی ایمن و ارزان، همواره به عنوان یکی از بهترین روش‌ها مطرح می‌باشد زیرا این روش باعث اثرات ضد تغذیه‌ای نمی‌شود و حتی خواص تغذیه‌ای را بهبود می‌بخشد. به نظر می‌رسد تخمیر لاکتیکی با تولید اسیدهای آلی، pH را از بهینه فعالیت لیپاز و لیپوکسیژناز خارج کرده و با کاهش فعالیت این دو آنزیم از فساد زودرس جنین گندم جلوگیری کند (۴).

با توجه به مطالب ذکر شده، هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر تخمیر توسط لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلاننتاروم بر کاهش فعالیت لیپاز و لیپوکسیژناز و بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی جنین گندم می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

تهیه سوسپانسیون جنین گندم با آب: جنین گندم خام و تازه از کارخانه آردسازی ورامین تهیه گردید و پس از آسیاب کردن، سوسپانسیون‌هایی با غلظت ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد (وزنی/حجمی) تهیه شد و سپس در دمای ۸۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه پاستوریزه گردید.

۷۵۴/۱ میلیون تن) از نظر میزان تولید در سال ۲۰۱۸ در سراسر دنیا پس از ذرت (حدود ۱۰۴۶ میلیون تن) در رتبه دوم قرار دارد (۵). دانه گندم به سه قسمت اصلی اندوسپرم، پوسته (سیوس) و جنین تقسیم می‌شود. اندوسپرم ۸۵-۸۰ درصد، پوسته ۱۷-۱۳ درصد و جنین ۲-۳ درصد کل دانه را تشکیل می‌دهند. جنین گندم حاوی مقادیر قابل توجهی از مواد مغذی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای چرب غیراشباع، مواد معدنی، ویتامین B و E، فیبرهای رژیمی، آمینواسیدهای ضروری، فلاونوئیدها و استرول‌ها می‌باشد و در واقع جنین، به عنوان مغذی‌ترین قسمت دانه گندم محسوب می‌شود. ترکیب شیمیایی جنین گندم را کربوهیدرات (۵۱/۳ درصد)، پروتئین (۲۸/۸-۲۷/۷ درصد)، چربی (۹/۷-۹/۴ درصد)، مواد معدنی (۴/۵-۴/۳ درصد) و رطوبت (۶/۸-۶/۶ درصد) تشکیل می‌دهند. قسمت اصلی جنین گندم را کربوهیدرات‌ها تشکیل می‌دهند که حاوی نشاسته و مقادیر قابل توجهی از فیبرهای رژیمی (۱۲/۳ درصد) می‌باشد (۶). اگرچه پروتئین‌های گیاهی به طور کلی ارزش بیولوژیکی پایینی دارند ولی پروتئین‌های ایزوله‌شده از جنین گندم روغن‌گیری شده ارزش بیولوژیکی بسیار بالایی دارند (۷). پروتئین‌های موجود در جنین گندم را آلومین‌ها، گلوبولین‌ها، گلوٹنین‌ها و پرولامین‌ها تشکیل می‌دهند که با در برداشتن مقادیر زیاد آلانین، آرژنین، آسپارژین، گلیسین و لیزین دارای تعادل آمینواسیدی مناسبی هستند. این پروفایل آمینواسیدی به مدل آمینواسیدی که از نظر FAO و سازمان بهداشت جهانی (WHO) (World Health Organization) به عنوان ترکیب آمینواسیدی مناسب مطرح شده است، نزدیک می‌باشد و در واقع، در جنین اکثر آمینواسیدهای ضروری در سطوح قابل مقایسه‌ای با پروتئین‌های موجود در تخم‌مرغ و شیر حضور دارند. محتوای لیپیدی جنین شامل اسیدهای چرب اشباع، اسیدهای چرب تک غیراشباع و اسیدهای چرب چند غیراشباع می‌باشند که اسیدهای چرب چند غیر اشباع با ۴/۳ درصد فراوان‌ترین جزء قسمت لیپیدی محسوب می‌شوند. همچنین محتوای لیپیدی از نظر اسیدهای چرب غیراشباع مانند اولئیک، لینولئیک و آلفالینولئیک غنی می‌باشد. تراکم مواد معدنی در جنین گندم تقریباً چهار برابر بیشتر از سایر قسمت‌های دانه گندم می‌باشد. مقدار ویتامین E در جنین گندم بسیار قابل توجه بوده و میزان آلفا توکوفرول جنین ۱۶ برابر بیشتر از مقدار آن در سایر قسمت‌های دانه گندم می‌باشد به نحوی که جنین گندم به عنوان غنی‌ترین منبع گیاهی شناخته شده‌ی ویتامین E در نظر گرفته می‌شود (۶).

درجه‌ی این بی‌رنگی نشان‌دهنده‌ی قدرت به‌دام اندازی رادیکال‌های آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌های نمونه است. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ها با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول DPPH در اتانول ۸۰ درصد، به خوبی مخلوط شد و برای رسیدن به جذب پایدار به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. نمونه‌ای به عنوان شاهد نیز در کنار نمونه‌ها قرار داده شد. در نهایت، جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری (Spectrophotometer) که با اتانول کالیبره شده بود در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید و درصد بازدارندگی براساس میزان کاهش جذب نمونه‌های مختلف در مقایسه با نمونه شاهد با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{inhibition percentage} = \frac{X_1 - X_2}{X_1} \times 100$$

X_1 و X_2 به ترتیب میزان جذب نمونه‌ی شاهد و نمونه‌ی مورد آزمایش در پایان زمان واکنش می‌باشند.

اندازه‌گیری فعالیت لیپاز جنین گندم: اندازه‌گیری فعالیت لیپاز با استفاده از روش Kumar و همکاران (۲۰۱۳) با کمی تعدیل مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۲). در این آزمون، روغن زیتون (دانه، ایران) به عنوان سوبسترای آنزیم استفاده شد. ۵۰۰ میلی‌گرم جنین گندم به ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و با سدیم فسفات بافر pH را بر روی ۸ تنظیم گردید. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، میزان اسیدهای چرب آزاد شده با تیتراژ کردن در مقابل سود ۰/۰۵ مولار اندازه‌گیری شدند. برای هر نمونه، آزمون‌های مربوطه در سه تکرار انجام گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت لیپوکسیژناز جنین گندم: روش Xu و همکاران (۲۰۱۳) برای اندازه‌گیری فعالیت لیپوکسیژناز از طریق اسپکتروفوتومتری (VWR UV-6300PC، امریکا) مورد استفاده قرار گرفت (۹). در این روش هیدروپراکسیدهای تولید شده که دارای بیشترین جذب در ۲۳۴ نانومتر هستند، اندازه‌گیری شدند.

استخراج آنزیم: یک گرم جنین گندم با ۵ میلی‌لیتر پتاسیم فسفات بافر (۰/۱ مولار pH=۶) مخلوط شد و به مدت یک ساعت عمل استخراج در دمای ۴ درجه سلسیوس با استفاده از همزن انجام گرفت. سوسپانسیون‌های به‌دست آمده در ۱۱۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس محلول به‌دست آمده توسط میکروفیلترهایی به قطر ۰/۲ میکرون صاف گردید و از محلول شفاف به‌دست آمده به عنوان منبع آنزیم استفاده شد.

تهیه محلول سوبسترا: برای تهیه سوبسترا، ۰/۵ میلی‌لیتر اسید لینولئیک خالص (سیگما، امریکا) به صورت قطره قطره به

آماده‌سازی مایه‌ی تلقیح: سوش باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس DSM 20079 (*Lactobacillus acidophilus DSM 20079*) و پلانتاروم DSM 20179 (*Lactobacillus plantarum DSM 20179*) به صورت لیوفیلیزه از بانک باکتری‌ها و قارچ‌های گروه صنایع غذایی دانشگاه تهران تهیه گردید. پس از دو بار پاساژ موفق در محیط MRS Broth (مرک، آلمان) و فعال‌سازی باکتری‌های مورد نظر، در مرحله اول به منظور تعیین میزان دقیق باکتری‌های مورد نیاز برای تلقیح (-Colony: CUF forming unit) ($10^9 \log \text{CFU/mL}$)، منحنی رشد میکروارگانیسم‌ها، با بررسی همزمان تعداد باکتری‌ها به‌روش کشت مخلوط (Pour plate) و کدورت حاصل از تکثیر در جذب ۶۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که در $1/6 \text{ OD}$ ، باکتری‌های پلانتاروم و اسیدوفیلوس به تعداد مورد نظر برای تلقیح خواهند رسید.

انتقال باکتری‌های فعال به سوسپانسیون جنین گندم و انجام عمل تخمیر: حجم مایه‌ی تلقیح مورد استفاده ۱ درصد حجمی-حجمی (10^9 Log CFU/mL) بود. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از میکروارگانیسم‌های رشد یافته در محیط MRS Broth، تحت شرایط کاملاً استریل هود لامینار، کنار شعله به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRS Broth اضافه شد و پس از رسیدن به تعداد مورد نیاز اولیه برای تلقیح (10^9 Log CFU/mL)، به منظور جداسازی محیط کشت، عملیات سانتریفیوژ انجام گرفت و دو بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد و در نهایت به نمونه مورد نظر تلقیح گردید. پس از تلقیح باکتری‌ها، نمونه‌های تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری (WET binder، آلمان) شدند (۲).

اندازه‌گیری pH: جهت اندازه‌گیری pH نمونه‌ها، ابتدا pH متر (METROHM 744، آلمان) را با محلول‌های بافر ۴ و ۷ کالیبره کرده و سپس الکتروود دستگاه را که قبل از استفاده با آب مقطر تمیز و خشک شده است درون نمونه‌ها قرار داده و پس از ثابت شدن عدد، pH نمونه خوانده می‌شود.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی: برای تعیین فعالیت آنتی-اکسیدانی از روش Marinkovic و همکاران (۲۰۱۰) با کمی تعدیل استفاده گردید (۱۱). در این روش از رادیکال DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (سیگما، امریکا) و اندازه‌گیری جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر استفاده شد. رنگ ارغوانی رادیکال‌های DPPH توسط ترکیبات آنتی-اکسیدانی نمونه کاهش یافته و به رنگ زرد تبدیل می‌شود.

باعث کاهش بیشتری در میزان pH می‌شود به نحوی که غلظت ۲۰ درصد جنین گندم کمترین pH و پس از آن غلظت ۱۵ و سپس غلظت ۱۰ درصد پایین‌ترین pH را داشتند. از طرف دیگر بررسی تأثیر آغازگرهای مختلف نشان داد که لاکتوباسیلوس پلانتراروم، در تمامی غلظت‌های جنین گندم کاهش بیشتری در میزان pH در مقایسه با تخمیر توسط لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس ایجاد کرده است که نشان‌دهنده فعالیت بیشتر این باکتری در بستر جنین گندم می‌باشد. در نتیجه، بررسی همزمان نوع آغازگر و غلظت جنین گندم نشان داد که، پایین‌ترین میزان pH پس از تخمیر مربوط به نمونه تخمیری با لاکتوباسیلوس پلانتراروم در سطح غلظت ۲۰ درصد (۳/۹۲) و بالاترین میزان pH مربوط به نمونه تخمیری توسط لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در سطح غلظت ۱۰ درصد (۴/۲۱) می‌باشد.

تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی: بررسی تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی (شکل ۲) نشان می‌دهد که در همه نمونه‌های تخمیر شده با غلظت‌ها و آغازگرهای متفاوت تخمیر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به صورت معنی‌داری ($p < 0/05$) بیشتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جنین گندم خام و تخمیر نشده می‌باشد که نشان از افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی طی فرایند تخمیر دارد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی جنین خام و تخمیر نشده $51/18 \pm 1/3$ بود که پس از تخمیر، بیشترین میزان افزایش (۲۹/۹۷ درصد) مربوط به نمونه تخمیر شده توسط لاکتوباسیلوس پلانتراروم با غلظت ۲۰ درصد جنین گندم و کمترین میزان افزایش (۲۱/۵۵ درصد) مربوط به نمونه تخمیر شده توسط لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس می‌باشد. همچنین، هردو باکتری با افزایش غلظت جنین گندم در محیط کشت خود، فعالیت بهتری دارند و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به نمونه‌های با غلظت کمتر، افزایش بیشتری می‌یابد. در نتیجه، بررسی‌های آماری نشان داد که نمونه تخمیر شده توسط لاکتوباسیلوس پلانتراروم در سطح غلظت ۲۰ درصد جنین گندم دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ($p < 0/05$) نسبت به نمونه شاهد (جنین گندم خام و تخمیر نشده) می‌باشد.

۰/۵ میلی لیتر توئین شماره ۲۰ و ۱۰ میلی لیتر بافر بورات (۰/۱ مولار ۹ pH) اضافه شد. سپس ۱/۳ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار به منظور شفاف‌سازی، به محلول مورد نظر اضافه گردید. بعد از آن به محلول حاصل ۹۰ میلی لیتر بافر بورات اضافه و حجم نهایی به حجم ۲۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

واکنش آنزیم و سوپسترا: ۴۰ میکرولیتر از سوپسترا با ۲/۹ میلی لیتر از پتاسیم فسفات بافر (۰/۱ مولار ۶ pH) ترکیب شده و ۴۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده به آن‌ها اضافه گردید. سپس تغییر در طول موج ۲۳۴ nm به مدت ۵ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان فعالیت لپوکسیژناز از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$X(\%) = \frac{\Delta \text{Abs}_{234 \text{ nm}} / \text{minsample}}{\Delta \text{Abs}_{234 \text{ nm}} / \text{mincontrol}} \times 100$$

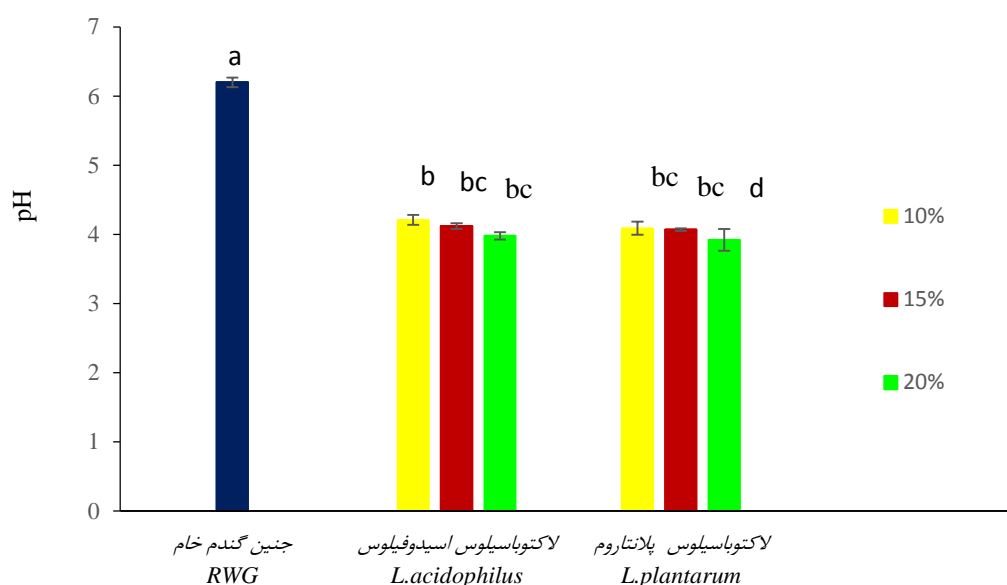
X میزان فعالیت نسبی لپوکسیژناز (٪)،
 $\Delta \text{Abs}_{234 \text{ nm}} / \text{minsample}$ و $\Delta \text{Abs}_{234 \text{ nm}} / \text{mincontrol}$ به ترتیب میزان تغییرات جذب نمونه و نمونه کنترل در طول زمان آزمایش می‌باشند.

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش اثر دو سوش باکتری آغاز کننده تخمیر و سطوح مختلف غلظت (۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) سوپسترا (جنین گندم) در غیرفعال‌سازی آنزیم‌های لیباز و لپوکسیژناز به روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار Minitab 18 در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. میانگین نتایج به دست آمده به روش دانکن در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد مقایسه شد.

• یافته‌ها

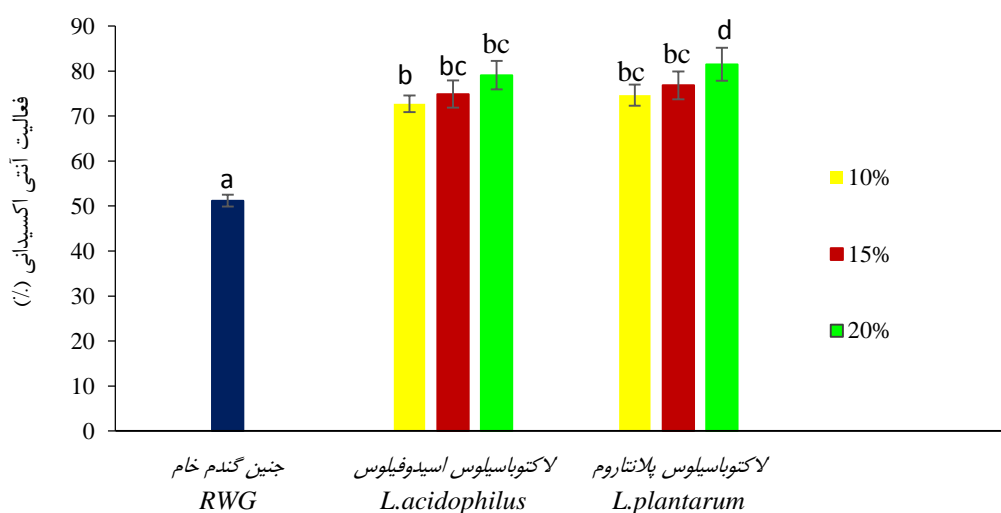
تغییرات pH: میزان pH جنین گندم خام (Raw wheat germ) و جنین گندم تخمیر شده تحت شرایط مختلف، در شکل ۱ نشان داده شده است.

pH نمونه جنین گندم خام و تخمیر نشده $6/2 \pm 0/06$ بود و همان‌گونه که در شکل قابل مشاهده است، pH تمامی نمونه‌ها پس از تخمیر با توجه به فعالیت باکتری‌های لاکتیکی کاهش معنی‌داری یافته است ($p < 0/05$). با افزایش غلظت جنین گندم در سوسپانسیون تولیدی، میزان فعالیت هردو باکتری آغاز کننده‌ی تخمیر، افزایش می‌یابد و در نتیجه



شکل ۱. تغییرات pH جنین گندم (غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم

*حروف لاتین غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می باشد.



شکل ۲. تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جنین گندم تخمیر شده (غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و

لاکتوباسیلوس پلانتاروم

*حروف لاتین غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می باشد.

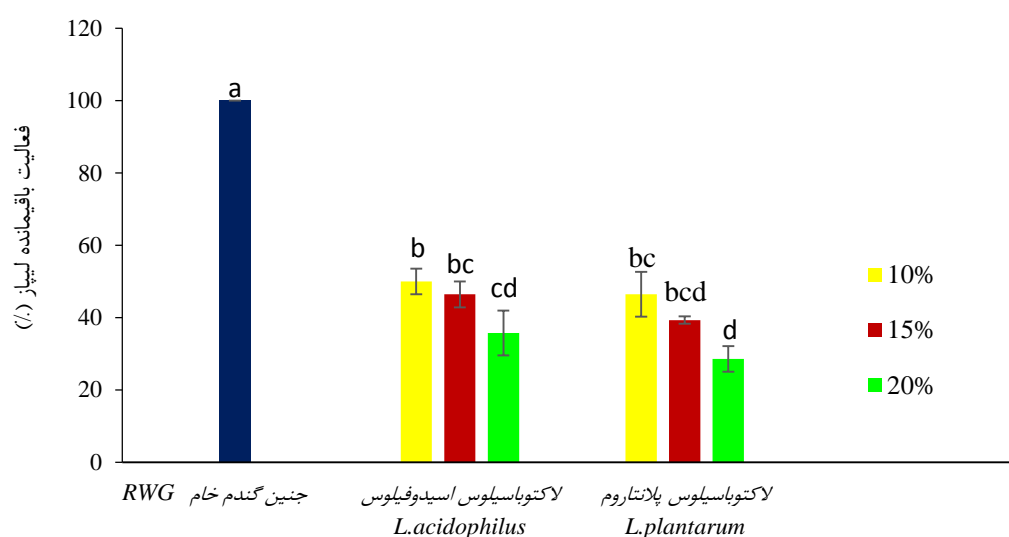
کاهش فعالیت جنین گندم نشان داد که در هر دو آغازگر، افزایش غلظت جنین گندم باعث کاهش بیشتری در میزان فعالیت آنزیم شده است از طرف دیگر بررسی نوع آغازگرهای تخمیر نشان می‌دهند که، لاکتوباسیلوس پلانتاروم توانایی بیشتری در کاهش فعالیت لیپاز در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارد به طوری که بیشترین میزان کاهش فعالیت لیپاز در نمونه جنین گندم تخمیر شده

تغییرات فعالیت لیپاز: میزان تغییر فعالیت لیپاز نمونه‌ها در شرایط مختلف تخمیر در شکل ۳ نمایش داده شده است. همانطور که در شکل مشخص است، فعالیت لیپاز در تمامی شرایط تخمیر کاهش یافته است. تحلیل آماری داده‌های مرتبط با فعالیت لیپاز نشان داد که، میزان کاهش فعالیت لیپاز در تمامی نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری با میزان فعالیت نمونه‌ی شاهد دارد ($p < 0.05$). همچنین بررسی تأثیر غلظت در میزان

معنی‌داری با نمونه شاهد دارد ($p < 0/05$) با این تفاوت که میزان نهایی باقی‌مانده فعالیت آنزیم‌ها با هم تفاوت می‌کنند به نحوی که بیشترین میزان کاهش فعالیت لیپوکسیژناز، در نمونه‌ی حاوی ۲۰ درصد جنین گندم و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس پلانتراروم، ۶۵ درصد و کمترین میزان کاهش مربوط به نمونه حاوی ۱۰ درصد جنین گندم و تخمیر شده با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، ۵۵/۵ درصد می‌باشد.

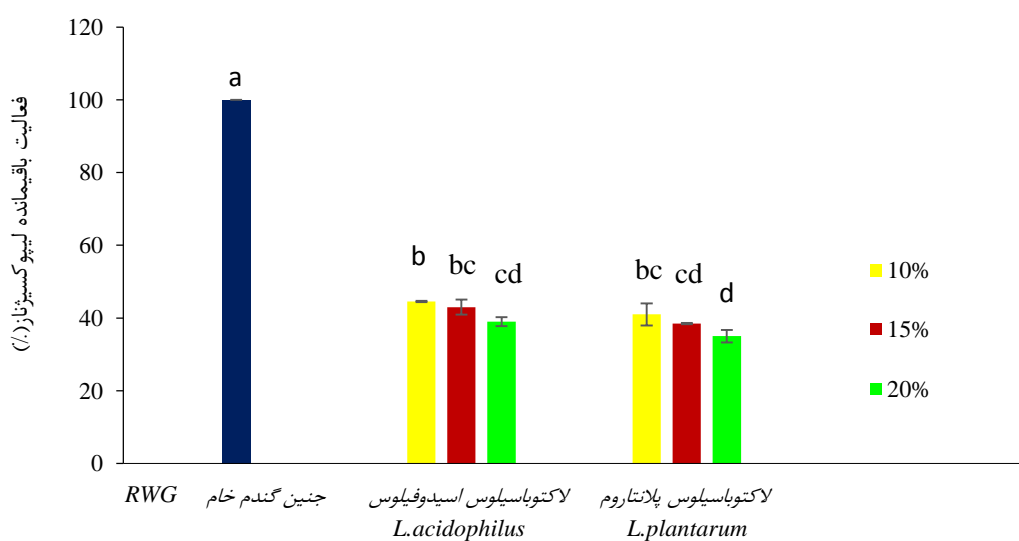
توسط لاکتوباسیلوس پلانتراروم در غلظت ۲۰ درصد (۷۱/۴۳ درصد) مشاهده شد ($p < 0/05$).

تغییرات فعالیت لیپوکسیژناز: نتایج به دست آمده از میزان فعالیت لیپوکسیژناز (شکل ۴) نشان می‌دهد که روند تغییرات در کاهش میزان فعالیت لیپوکسیژناز در شرایط مختلف تخمیر، مشابه روند تغییرات آنزیم لیپاز بوده و میزان فعالیت لیپوکسیژناز در تمامی نمونه‌ها پس از تخمیر اختلاف



شکل ۳. تغییرات فعالیت لیپاز در جنین گندم تخمیر شده (غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتراروم

*حروف لاتین غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می باشد.



شکل ۴. تغییرات فعالیت لیپوکسیژناز در جنین گندم تخمیر شده (غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتراروم

*حروف لاتین غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می باشد.

● بحث

تغییرات pH: در فرایند تخمیر، سطح pH را می‌توان به‌عنوان شاخصی از فعالیت و رشد باکتری‌ها در نظر گرفت. اختلاف در مقادیر pH پس از تخمیر در بین گونه‌های مختلف می‌تواند به دلیل توانایی سازگاری آن‌ها با محیط‌های مختلف و همچنین توانایی آن‌ها در تولید متابولیت‌های مختلف در طول فرایند تخمیر باشد (۱۳). با توجه به نتایج حاصل از تغییرات pH پس از تخمیر جنین گندم، می‌توان نتیجه گرفت که هر دو باکتری *لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در بستر جنین گندم به خوبی رشد و فعالیت داشته‌اند. با افزایش غلظت جنین گندم، توانایی رشد و فعالیت هر دو باکتری افزایش یافت و جنین گندم با دربرداشتن ترکیبات متعدد تغذیه‌ای باعث تحریک رشد هر دو باکتری شد. در نهایت هم می‌توان گفت که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مقایسه با *لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس* در بستر جنین گندم از رشد و فعالیت بیشتری برخوردار می‌باشد.

مطالعات پیشین نشان دادند که باکتری‌های اسید لاکتیک در طی رشد و فعالیت خود در سوبستراهای مناسب، با تولید اسیدهای آلی (اسید لاکتیک، اسید استیک و اسید پروپیونیک) pH را تا حدود ۴ کاهش می‌دهند که ضمن افزایش عمر ماندگاری محصول مورد نظر، رشد و فعالیت باکتری‌های عامل فساد را محدود کرده و از رشد برخی پاتوژن‌ها جلوگیری می‌کنند (۱۴، ۱۵). در پژوهشی که توسط Rizzello و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت، مشخص گردید که جنین گندم سوبسترای مناسبی برای فعالیت باکتری‌های لاکتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (LB1) و *لاکتوباسیلوس روزئی* (LB5) می‌باشد و pH اولیه جنین گندم خام و تازه از $6/34 \pm 0/08$ قبل از تخمیر به $4/15 \pm 0/05$ پس از ۲۴ ساعت تخمیر در دمای ۳۰ درجه سلسیوس توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (LB1) و *لاکتوباسیلوس روزئی* (LB5) کاهش می‌یابد (۱۶).

تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی: ویژگی جذب رادیکال‌های آزاد را می‌توان به فرایند تخمیر و ترکیبات مختلف موجود در جنین گندم نسبت داد که این موضوع توسط بسیاری از محققین به اثبات رسیده است (۱۷، ۱۸). جنین گندم منبعی غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و برخی از منابع، جنین گندم را به عنوان غنی‌ترین منبع گیاهی حاوی ویتامین E معرفی کرده‌اند (۱۹). نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که از جمله عوامل مؤثر در کاهش مقدار رادیکال‌های آزاد، ترکیبات فنولی، نوع اسیدهای آمینه و

پروتئین‌های موجود در نمونه مورد نظر، افزایش محتوای فنول آزاد طی فرایند تخمیر و فعالیت آنزیم‌های ترشح شده توسط میکروارگانیسم‌ها می‌باشند و تخمیر غذاهای گیاهی، روشی مفید برای افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد (۲۰). بررسی نتایج بدست آمده از تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد که، جنین گندم خام، فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوبی داشته است و فرایند تخمیر توسط *لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، این خاصیت آنتی‌اکسیدانی را به طور معنی‌داری بهبود بخشیده است ($p < 0/05$).

اثر تخمیر به‌وسیله *باسیلوس سوبتیلیس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی چهار نوع گونه‌ی گیاهی (نوعی از حبوبات بومی جنوب شرقی آسیا به نام ادلی، بلوط، کنار و گردو) توسط Wang و همکاران (۲۰۱۳) بررسی شد و با نمونه‌های تخمیر نشده مقایسه گردید. محققین این پژوهش دریافتند که میزان نهایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به نوع باکتری‌های آغاز کننده تخمیر متفاوت می‌باشد. در پایان نیز، تخمیر به عنوان روشی کارآمد برای افزایش خصوصیات آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی گیاهی که باعث بهبود سلامتی در مصرف کنندگان می‌شود مطرح گردید (۲۱).

در مطالعه‌ای که توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت، تأثیر تخمیر توسط *باسیلوس سوبتیلیس* بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی جنین گندم روغن‌گیری شده مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به‌دست آمده نشان دادند که تخمیر، حالت تعاملی بین پروتئین‌ها و پلی‌فنل‌ها را تغییر داده و با افزایش میزان فنل‌های آزاد باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی جنین گندم روغن‌گیری شده می‌شود. در نتیجه، تخمیر به‌وسیله *باسیلوس سوبتیلیس* به عنوان روشی مؤثر در جهت تولید ترکیبات فنلی و افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی معرفی گردید (۲۲).

تغییرات فعالیت لیپاز: عمده‌ترین عامل محدود کننده عمر ماندگاری و استفاده بهینه از جنین گندم، میزان بالای روغن و وجود آنزیم‌های لیپاز و لیپوکسیژناز آن می‌باشد که با تجزیه‌ی چربی‌ها باعث ایجاد فساد در جنین گندم می‌شوند (۲۳). در نتیجه غیر فعال کردن آنزیم‌های ذکر شده به‌منظور افزایش عمر ماندگاری و فراهم کردن شرایط برای استفاده بهینه از آن امری ضروری می‌باشد. لیپازها را می‌توان زیر مجموعه‌ای از استرازها و از گروه اصلی هیدرولازها دانست که قادر به هیدرولیز استرها هستند و نقش اختصاصی تبدیل تری‌گلیسریدها به گلیسرول و اسید چرب را بر عهده دارند.

تغییرات فعالیت لیپوکسیژناز: لیپوکسیژناز از دسته اکسیدوردوکتازها و یک آنزیم دی‌اکسیژناز است. دی-اکسیژنازها قادرند دو اتم اکسیژن مولکولی را به مولکول سوبسترا اضافه کنند که با تشکیل هیدروپراکسیدها همراه است. لیپوکسیژناز فوق‌العاده اختصاصی عمل کرده و داکسیژناسیون اسیدهای چرب چند غیر اشباع سیس، سیس-۱، ۴- پنتادیان (Cis- cis, 1,4 panta diene) را به مشتقات ۱، ۴- هیدروپراکسی سیس، ترانس دیان (Cis- trans, diene) کاتالیز می‌کند. اغلب سوبسترای خاص این آنزیم‌ها ایزومرهای از سه واحد اسید چرب ضروری لینولئیک، لینولنیک و آراشیدونیک می‌باشند. همان‌طور که در بالا ذکر شد، اسیدی شدن توسط تخمیر با کاهش حساسیت قسمت فعال آنزیم به سوبسترا، از میزان فعالیت آنزیم می‌کاهد. لذا بررسی‌ها نشان می‌دهند که کاهش فعالیت لیپوکسیژناز در تمامی نمونه‌ها، همچون لیپاز نسبت به جنین گندم تخمیر نشده معنی‌دار می‌باشد.

در نهایت از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که، جنین گندم سوبسترای مناسبی برای باکتری‌های لاکتیکی می‌باشد و تخمیر جنین گندم توسط لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم علاوه بر بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی، با کاهش فعالیت آنزیم‌های لیپاز و لیپوکسیژناز، گامی مؤثر در جهت افزایش عمر ماندگاری، استفاده بهینه و جلوگیری از هدر رفت جنین گندم می‌باشد.

آنزیم‌ها معمولاً دارای pH بهینه‌ی فعالیت هستند که در آن pH بهترین فعالیت را دارند و در خارج از آن pH با تحت تأثیر قرار گرفتن ساختار آنزیم‌ها و کاهش حساسیت آنزیم به سوبسترا، از میزان فعالیت آنزیم کاسته می‌شود. پروفایل فعالیت لیپاز نشان می‌دهد که pH بهینه‌ی فعالیت لیپازهای مختلف در محدوده pH خنثی می‌باشد و در محدوده pH اسیدی (حدود ۳ pH) و همچنین در محدوده pH بازی (حدود ۱۲ pH) دارای حداقل میزان فعالیت می‌باشند. همچنین مشخص گردید که، pH های شدیداً اسیدی و قلیایی می‌توانند ساختار آنزیم را به‌طور کلی دچار تغییر کنند و مانع از فعالیت آن شوند. لیپاز جنین گندم دارای pH بهینه فعالیت حدود ۷-۸ می‌باشد و در خارج از این pH، میزان فعالیت آن کاهش خواهد یافت (۲۴).

همان‌گونه که ذکر شد، pH جنین گندم پس از تخمیر در تمامی نمونه‌ها کاهش معنی‌داری داشته است که با توجه به مطالب بالا با تغییر ساختار قسمت فعال (Active site) آنزیم لیپاز، باعث کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم پس از تخمیر تحت شرایط مختلف این پژوهش شده است ($p < 0/05$). اختلاف در میزان کاهش فعالیت لیپاز در نمونه‌های مختلف تخمیر شده، احتمالاً مرتبط با سطح نهایی pH در هر کدام از نمونه‌ها می‌باشد و همان‌طور که قبلاً اشاره شد، نمونه‌ی جنین گندم تخمیر شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم در غلظت ۲۰ درصد با پایین‌ترین میزان pH (۳/۹۲) پس از فرایند تخمیر نسبت به سایر نمونه‌ها، بیشترین میزان کاهش فعالیت لیپاز را نشان می‌دهد (۷۱/۴۳ درصد).

• References

- Gupta S, Abu-Ghannam N. Probiotic fermentation of plant based products: Possibilities and opportunities. Crit Rev Food Sci Nutr. 2012;52(2):183-99.
- Shokoohi M, Razavi SH, Labbafi M, Vahidinia A, Gharibzahedi SMT. Wheat sprout flour as an attractive substrate for the producing probiotic fermented beverages: Process development and product characterisation. Qual Assur Saf Crop Foods. 2015;7(4):469-75.
- Ayyash M, Johnson SK, Liu SQ, Mesmari N, Dahmani S, Al Dhaheri AS, et al. In vitro investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using Lactobacillus spp. Food Chem [Internet]. 2019;275(January 2018):50-8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.031>
- Wrigley C. The Cereal Grains: Providing our Food, Feed and Fuel Needs [Internet]. Second Edi. Cereal Grains: Assessing and Managing Quality: Second Edition. Elsevier Ltd; 2017. 27-40 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100719-8/00002-4>
- FAO. 2018. Crop prospects and food situation . Food and Agriculture Organization of the United Nations Quarterly Global Report (available online at: www.fao.org/giews).
- Boukid F, Folloni S, Ranieri R, Vittadini E. Trends in Food Science & Technology A compendium of wheat germ: Separation, stabilization and food applications. 2018;78(June):120-33.
- Seleet FL, Assem FM, El-gawad MAMABD. Development of a novel milk-based fermented product fortified with wheat germ. 2016;69(2):217-24.
- Xu bin, Wang Likun, Miao Wenj, Wu Qifef, Liu Yanxia, Sun Y, et al. Thermal verrsus microwave inactivation kinetics of lipase and lipoxygenase from wheat germ. 2015;247-55.
- Xu B, Zhou S, Miao W, Gao C, Cai M, Dong Y. Study on the stabilization effect of continuous microwave on

- wheat germ. 2013;117:1-7.
10. Liu F, Chen Z, Shao J, Wang C, Zhan C. Effect of fermentation on the peptide content, phenolics and antioxidant activity of defatted wheat germ. *Food Biosci*. 2017;20(October):141-8.
 11. Šiler-marinkovic SS, Dimitrijevic SI. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. 2010;119:957-63.
 12. Kumar P, Kudachikar VB, Kumar S. Lipase inactivation in wheat germ by gamma irradiation. *Radiat Phys Chem* [Internet]. 2013;86:136-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2013.01.018>
 13. Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, Cantero D, Webb C. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res Int* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2018 Oct 20];36(6):527-43. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996903000097#aep-section-id10>
 14. Kohajdová Z. 4 - Fermented Cereal Products [Internet]. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V.; 2017. 91-117 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00004-2>
 15. Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, Cantero D, Webb C. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res Int*. 2003;36(6):527-43.
 16. Rizzello CG, Nionelli L, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M. Effect of sourdough fermentation on stabilisation, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. *Food Chem* [Internet]. 2010;119(3):1079-89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.016>
 17. Nanditha B, Prabhasankar P. Antioxidants in bakery products: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009;49(1):1-27.
 18. Nanditha BR, Jena BS, Prabhasankar P. Influence of natural antioxidants and their carry-through property in biscuit processing. *J Sci Food Agric*. 2009;89(2):288-98.
 19. Seleet FL, Assem FM, Abd El-Gawad MAM, Dabiza NM, Abd El-Salam MH. Development of a novel milk-based fermented product fortified with wheat germ. *Int J Dairy Technol*. 2016;69(2):217-24.
 20. Hur SJ, Lee SY, Kim YC, Choi I, Kim GB. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem* [Internet]. 2014;160:346-56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112>
 21. Wang C, Wu S, Shyu Y, Al WET, Ioeng JBIB. Antioxidant properties of certain cereals as affected by food-grade bacteria fermentation. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2014;117(4):449-56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.10.002>
 22. Liu F, Chen Z, Shao J, Wang C, Zhan C. Effect of fermentation on the peptide content, phenolics and antioxidant activity of defatted wheat germ. *Food Biosci* [Internet]. 2017;20(October):141-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.10.002>
 23. Tolouie H, Mohammadifar MA, Ghomi H, Yaghoubi AS, Hashemi M. The impact of atmospheric cold plasma treatment on inactivation of lipase and lipoxygenase of wheat germs. *Innov Food Sci Emerg Technol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2018 Oct 20];47:346-52. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856417308202>
 24. Rao KS, Rajendran S, Rajeshwara AN, Prakash V. Structural Stability of Lipase from Wheat Germ in Alkaline pH 1. 1991;103.

Effects of Lactic Fermentation by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* on Antioxidant Characteristics and Lipase and Lipoxygenase Activities of Wheat Germs

D.Khosroshahi E¹, Razavi H^{2*}, Kaini H³, Aghakhani A³

1- MSc Student, Department of Food Science & Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran

2-*Corresponding author: Professor, Department of Food Science & Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran. Email: srazavi@ut.ac.ir

3- Assistant professor, Department of Food Science & Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran

Received 27 Feb, 2020

Accepted 3 Jul, 2020

Background and Objectives: Wheat germ is the most nutritious part of wheat grains, which has a short shelf-life due to its high lipid contents and presence of lipase and lipoxygenase enzymes. Thus, wheat germs are separated from the whole wheat grains during the flouring process, mostly used as animal foods. The objective of this study was to investigate effects of fermentation by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* on lipase, lipoxygenase activity and antioxidant characteristics of wheat germs.

Materials & Methods: Various concentrations of wheat germs were inoculated individually with a certain number of the bacteria (10^9 Log CFU / mL). After incubation at 37 °C for 24 h, pH changes and antioxidant, lipase and lipoxygenase activities were compared to those of unfermented samples and effects of various starters on the highlighted characteristics of wheat germs at various concentrations were investigated.

Results: Fermentation by the two bacteria significantly decreased activities of the lipase and lipoxygenase enzymes. Furthermore, 20% concentration of fermented wheat germs by *Lactobacillus plantarum* showed the highest decreases in activities of the two enzymes (71/43 for lipase and 65% for lipoxygenase). Raw wheat germs included good antioxidant activities that significantly increased after fermentation by the bacteria. Investigation of the starter type and substrate concentration showed that the highest (29.97%) and the lowest (21.55%) increases in antioxidant activities after fermentation were linked to fermented samples by *Lactobacillus plantarum* at 20% and *Lactobacillus acidophilus* at 10% concentrations of wheat germs, respectively.

Conclusion: Fermentation by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* significantly improves antioxidant activities of the wheat germs and increases its shelf-life by significantly decreasing lipase and lipoxygenase activities.

Keywords: Wheat germs, Lactic fermentation, Lipase, Lipoxygenase, Antioxidants