بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و فیزیکوشیمیایی نوشیدنی تخمیری آب پنیر-پسته با استفاده از استارتر کفیر

زهره محمدی یگانه[1]، فرامرز خدائیان[2*] ، سید سعید حسینی[3]، محمد صفری[4]، کرامت اله رضایی[4]، سید محمد موسوی[4]

1. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
2. دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
3. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
4. استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: **94/6/1**، تاریخ پذیرش: **94/8/13**)

چکیده

پسته به‌دلیل ترکیبات فراسودمند خود نظیر اسیدهای چرب و ترکیبات فنلی نقش مهمی در کاهش بیماری‌های قلبی و عروقی دارد. خواص سودمند این محصول، می‌تواند با استفاده از فرایند تخمیر به‌وسیله دانه کفیر افزایش یابد. لذا، هدف از این تحقیق، بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی (محتوای فنل کل، خاصیت کاهش رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاکنندگی)، فیزیکوشیمیایی (pH، غلظت کفیران، ویسکوزیته) و میکروبی (باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها) یک نوشیدنی تخمیری جدید از شیر پسته با استفاده از دانه کفیر است. برای این منظور به جای آب، از آب پنیر در شیر پسته استفاده شد و اثر سطوح مختلف، لاکتوز آب پنیر (5% w/v و ٪2/5)، مقدار پسته (8% w/v و ٪4) و میزان تلقیح دانه کفیر (8% w/v، ٪5، ٪2) در دمای 25 °C به‌مدت 48 ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بالاترین محتوای فنل کل، 130/91±1/29 mg gallic acid/L، خاصیت کاهش رادیکال‌های آزاد (EC_{50} برابر با0/03mL/mL ± 0/10)، قدرت احیاکنندگی (0/02± 0/80)، غلظت کفیران (91/80 ±2/67 g glucose/Lμ) و ویسکوزیته (2/20 ±0/03 mPa.s) در شیر پسته حاوی 5% w/v لاکتوز و 8% w/v پسته و مقدار تلقیح 8% w/v دانه کفیر به‌دست آمد. به‌علاوه کم‌ترین مقدار pH (3/20 ±0/02) و بیش‌ترین تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها نیز در شرایط مذکور مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: پسته، فنل کل، خواص آنتی‌اکسیدانی، کفیران.

* نویسنده مسئول: khodaiyan@ut.ac.ir

1- مقدمه

طی سالیان اخیر مصرف نوشیدنی‌های تخمیری، به‌علت اثرات سلامت بخش آن افزایش یافته است [1]. شواهد باستان شناسی نشان می‌دهد، این فراورده‌ها به‌طور تصادفی طی هزاران سال کشف شده‌اند. این محصولات به‌دلیل pH پایین و برخی ترکیبات ضد میکروبی، زمان ماندگاری بالایی دارند [2]. کفیر یک نوشیدنی تخمیری تولید شده از شیر می‌باشد که از کوه‌های قفقاز شمالی سرچشمه گرفته است. این فـراورده تخمیری لبنی، ویسکوز، اسیدی و به مقدار ناچیزی کربناته است و ممکن است حاوی مقدار کمی الکل نیز باشد. در کفیر اسیدهای آلی مختلفی تولید می‌شود که بیش‌ترین مقدار مربوط به L(+) اسید لاکتیک است. در میان اسیدهای آمینه آلانین، آسپارتیک اسید، والین، لوسین، لایزین و سرین در طی فرایند تخمیر افزایش می‌یابد [3] عطر و طعم، ویسکوزیته و ترکیبات میکروبی-شیمیایی کفیر تابع عوامل مختلفی چون مقدار تلقیح شیر، هم‌زدن، دمای تخمیر، مدت سرد سازی و مرحله رسیدن است. کفیر علاوه‌بر خواص تغذیه‌ای مناسب دارای اثرات سلامت بخشی چون، خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی [4]، ضدتوموری و ضدسرطانی [5-6]، کاهش کلسترول خون [7] و هضم غذا [8] نیز می‌باشد.

استارتر کفیر شامل مجموعه‌ای از باکتری‌ها و مخمرها می‌باشد که به‌همراه پروتئین و لیپیدها توسط پلی ساکارید کفیران در کنار هم قرار می‌گیرند و تشکیل دانه‌هایی شبیه گلچه کوچک کلم با طول یک تا سه سانتی‌متر را می‌دهند [9]. این اگزوپلی‌ساکارید توسط یکی از باکتری‌های پروبیوتیک دانه کفیر به نام لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس[1] تولید می‌شود [10] و شامل نسبت مساویی از دو قند D-گلوکز و D-گالاکتوز بوده و در آن واحدهای 3 گلوکزی و 3 گالاکتوزی تکرار می‌شوند. بررسی ساختار آن به‌وسیله رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR)، نشان می‌دهد که این پلیمر از 6 یا 7 ساکارید انشعاب‌دار تشکیل شده است [11]. آب پنیر مایعی رقیق و آبکی است که رنگ زرد مایل به سبز و گاهی اوقات مایل به آبی کم‌رنگ (بسته به کیفیت و نوع شیر اولیه) دارد [12]. این مایع ارزشمند که حجم عظیمی از فراورده‌های جانبی صنعت پنیر سازی و تولید کازئین را تشکیل می‌دهد، عمدتا به‌عنوان ضایعات دور ریخته می‌شود، که نه تنها به‌علت اکسیژن مورد نیاز بیولوژیکی (BOD) بالا سبب تخریب محیط زیست شده، بلکه به معنی از دست رفتن یک ماده غنی از پروتئین نیز می‌باشد. پروتئین‌های آب پنیر ارزش بیولوژیکی استثنایی داشته که از این لحاظ، حتی شرایط بهتری را نسبت به پروتئین‌های تخم مرغ دارا می‌باشند [13]. این پروتئین‌ها منبع غنی از اسید آمینه‌های ضروری و هم‌چنین اسید آمینه‌های شاخه‌دار (لوسین، ایزولوسین و والین) بوده، که این اسید آمینه‌ها نقش مهمی در عملکرد تنظیم کننده‌های پروتئین، تعادل گلوکز و متابولیسم پروتئین‌ها دارند [14]. پروتئین‌های آب پنیر هم‌چنین شامل مقادیر زیادی از اسید آمینه‌های سولفوردار (متیونین و سیستئین) بوده که نقشی بحرانی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان دارند [15]. لذا استفاده از این فراورده جانبی نه تنها باعث کاهش آلودگی محیط زیست شده، بلکه یک ماده ارزشمند تغذیه‌ای را وارد چرخه غذایی بشر می‌کند.

در میان خشکبار، اکثر مطالعات بر روی گردو و بادام بوده و کم‌تر به سایر مغزها از جمله پسته پرداخته شده است. پسته منبع مناسبی از مواد مغذی و اسیدهای چرب غیراشباع و هم‌چنین غنی از انواع آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله، گاما توکوفرول، بتا کاروتن و لوتئین می‌باشد [16]. مطالعات نشان داده که پسته غنی‌ترین منبع فیتو استرول در میان تمام مغزها است [17] و این نشان از قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای آن دارد. بنابراین استفاده از پسته در این نوشیدنی باعث افزایش ارزش تغذیه‌ای و هم‌چنین خواص آنتی‌اکسیدانی این محصول می‌شود.

اکسیداسیون در بدن انسان و هم‌چنین در مواد غذایی اهمیت زیادی داشته، به‌طوری که سلول‌ها برای زنده مانی خود نیاز به متابولیسم اکسیداتیو دارند. اما یکی از جنبه‌های این اکسیداتیو، تولید رادیکال‌های آزاد بوده که چنین رادیکال‌هایی اگر بیش از اندازه تولید شوند، آنزیم‌های محافظتی بدن از جمله سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز را تخریب کرده و با اکسیداسیون لیپیدهای غشایی، پروتئین‌های سلولی، DNA و آنزیم‌ها، اثرات مخرب و مهلکی را ایجاد می‌کنند [18]. لذا یکی از راه‌کارهای مناسب برای کاهش این مشکلات، مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی و یا غذاهای حاوی آنتی‌اکسیدان می‌باشد [19]. با توجه به این‌که مصرف آنتی‌اکسیدان‌های

1. Lactobacillus kefiranofaciens

مصنوعی و سنتزی عوارض جانبی بالایی دارند، در بسیاری از کشورها محدود و یا ممنوع شده‌اند [18]، محققان در پی وارد کردن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در رژیم غذایی انسان‌ها می‌باشند. از این رو تولید یک محصول تخمیری با خواص آنتی‌اکسیدانی مناسب بسیار حائز اهمیت بوده، لذا هدف از این تحقیق، بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و فیزیکوشیمیایی یک نوشیدنی تخمیری فراسودمند با استفاده از پسته، آب پنیر و استارتر کفیر است.

2-مواد و روش‌ها

2-1- مواد

در این تحقیق از مغز پسته واریته اکبری استفاده شد. دانه‌های کفیر و آب پنیر به‌ترتیب از بانک میکروبی و کارگاه لبنیات گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تهران تهیه گردید. 1,1-دی فنیل-2-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و فنل از شرکت سیگما (امریکا) و متانول، گالیک اسید، معرف فولین-سیوکالتیو[1]، کربنات سدیم، کلرید آهن، پتاسیم فری سیانید، کلرو استیک اسید، اسید سولفوریک غلیظ، از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند.

2-2- روش‌ها

2-2-1- تهیه شیرپسته

برای تهیه شیر پسته ابتدا مغزهای پسته به‌مدت یک شب در آب خیسانده تا پوست سطح آن‌ها جدا شود، مغزهای پوست‌گیری شده با نسبت‌های 4 و 8 به همراه 100 میلی‌لیتر آب پنیر (به دو نسبت 5 و 2/5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز) در یک مخلوط کن آسیاب و دوغاب حاصل توسط دو لایه پارچه متقال فیلتر شد. سپس شیر پسته حاصل به داخل ظروف شیشه‌ای درب‌دار منتقل و در بن ماری مدرج در دمای 70°C به‌مدت 20 دقیقه پاستوریزه شد. پس از سرد شدن تا دمای محیط، ظروف حاوی شیر پسته توسط 2، 5 و یا 8 درصد دانه کفیر تلقیح و پس از تخمیر در دمای 25 °C به‌مدت 48 ساعت، دانه‌های کفیر توسط آب کش پلاستیکی جدا شده و آنالیزهای بعدی روی نوشیدنی‌ها انجام شد.

2-2-2- اندازه‌گیری مقدار فنل کل

در این تحقیق، برای اندازه‌گیری مقدار فنل کل از روش سینگلتون و راسی (1965) با کمی تغییر استفاده شد [20]. ابتدا، مقدار 200 میکرولیتر نمونه رقیق شده را با مقدار 0/1 میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتیو مخلوط کرده و 8 دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس 0/8 میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (7/5 درصد) به مخلوط فوق اضافه و پس از 30 دقیقه نگه‌داری در دمای محیط، مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج 765 نانومتر خوانده شد. غلظت معادل، با قرار دادن میزان جذب در منحنی استاندارد به‌دست آمد. نتایج به‌صورت معادل اسید گالیک در 100 میلی‌لیتر نمونه گزارش گردید (میلی‌گرم گالیک اسید/لیتر (mg GA/L)). برای رسم منحنی استاندارد گالیک اسید، غلظت‌های 80-8 میلی‌گرم در لیتر از گالیک اسید تهیه شده و طبق روش آزمایش، مقدار جذب آن‌ها در طول موج 760 نانومتر خوانده شد. سپس منحنی غلظت گالیک اسید در برابر جذب رسم گردید.

2-2-3- اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های آزاد[1]

در این مطالعه، جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها از روش کام و همکاران (2009) با اندکی تغییر استفاده شد [21]. ابتدا، نمونه‌ها به نسبت‌های مختلف با آب مقطر رقیق شده و سه رقت مختلف از نمونه‌ها تهیه گردید. سپس محلول متانولی DPPH با غلظت 0/06 میلی‌مولار تهیه شده (به‌دلیل حساسیت محلول DPPH به نور، اطراف بالن ژوژه با فویل آلومینیوم پوشانده شد) و با متانول به حجم رسید و به‌خوبی مخلوط گردید. 1 میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف هر کدام از نمونه‌ها داخل لوله آزمایش ریخته و 3 میلی‌لیتر از محلول DPPH به آن اضافه شد و بلافاصله درب لوله‌ها توسط فویل پوشانده و به‌خوبی مخلوط گردید و پس از قرار دادن در تاریکی به‌مدت 30 دقیقه (به‌منظور رسیدن به جذب پایدار) جذب نمونه در طول موج 515 نانومتر خوانده شد. پس از خواندن جذب نمونه‌ها و محاسبه غلظت آن‌ها از روی معادله و منحنی استاندارد DPPH، طبق فرمول زیر مقدار DPPH باقی‌مانده محاسبه و نمودار آن در برابر غلظت نمونه‌ها رسم گردید. با قرار دادن مقدار عددی 0/5 در معادله می‌توان مقدار EC_{50} را به‌دست آورد. هر چه مقدار EC_{50} کم‌تر باشد، یعنی نمونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری دارد.

1. Folin- ciocalteo

1. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

$$\text{باقیمانده DPPH} = Y/Y_0\ \% \qquad (1)$$

Y= غلظت DPPH در نمونه

Y_0 = غلظت DPPH در نمونه کنترل (حاوی 100 میکرولیتر متانول و 3/9 میلی‌لیتر محلول DPPH)

برای رسم منحنی استاندارد DPPH، از محلول DPPH رقت‌های مختلف در متانول تهیه کرده (25، 10 و 5 میلی‌گرم در لیتر)، و جذب هر یک از آن‌ها در طول موج 515 نانومتر خوانده شد. سپس نمودار غلظت در برابر جذب رسم گردید.

2-2-4- اندازه‌گیری خاصیت احیاکنندگی

برای اندازه‌گیری این پارامتر از روش ایایزو (1986) با اندکی تغییر استفاده شد [22]. ابتدا 2/5 میلی‌لیتر از نمونه با 2/5 میلی‌لیتر فسفات بافر (0/2 مولار و pH = 6/6) و 2/5 میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید 1درصد به‌خوبی مخلوط و در دمای 50°C به‌مدت 20 دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. بعد از طی شدن زمان گرمخانه‌گذاری 2/5 میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید 1درصد به مخلوط فوق اضافه و مخلوط حاصل در 1400 g به‌مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس 5 میلی‌لیتر از لایه فوقانی با 5 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و 1 میلی‌لیتر کلرید آهن III به آن افزوده و خوب مخلوط گردید. در ادامه جذب مخلوط حاصل در طول موج 700 نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر خوانده شد. جذب بالاتر نشان دهنده قدرت احیاکنندگی بیش‌تر است.

2-2-5- اندازه‌گیری pH

این پارامتر با pH متر الکترونیک اندازه‌گیری شد. نخست pH متر توسط بافرهای 4 و 7 کالیبره شده و الکترود آن پس از شسته شدن با آب مقطر و خشک کردن درون نمونه مورد نظر قرار داده شد و pH یاداشت گردید.

2-2-6- اندازه‌گیری غلظت کفیران

برای اندازه‌گیری غلظت کفیران از روش دوبایس و همکاران (1956) با اندکی اصلاح استفاده شد [23]، بدین منظور هم حجم نمونه اتانول سرد (20°C-) به نمونه افزوده و به‌مدت یک شب در دمای20°C- نگه‌داری شد. سپس مخلوط حاصل، در 10000 g و دمای 4 °C، به‌مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از ته نشینی کفیران، ته نشست را دوباره در آب مقطر حل کرده و به‌منظور حذف هر گونه ماده نامحلول باقی‌مانده، با همان شرایط فوق سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، دوباره ته نشست در آب مقطر حل شد. برای اندازه‌گیری غلظت کفیران تولید شده ابتدا، به هر نمونه 1 میلی‌لیتر فنل 5 درصد افزوده شده، سپس 5 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه گردید و پس از نیم ساعت نگه‌داری در دمای اتاق جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 485 نانومتر خوانده شد، و پس از مقایسه با منحنی استاندارد گلوکز، غلظت کفیران در نمونه مورد نظر به‌دست آمد.

2-2-7- اندازه‌گیری ویسکوزیته

ویسکوزیته نمونه‌ها در دمای اتاق با یک ویسکومتر چرخان قابل برنامه‌ریزی دارای مخزن 20 میلی‌لیتری مجهز به اسپیندل شماره 60 با سرعت چرخش 42 دور در دقیقه اندازه‌گیری و بر حسب میلی پاسکال ثانیه گزارش گردید.

2-2-8- شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها

تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک از طریق کشت پورپلیت رقت مناسب در محیط کشت MRS در دمای 30 °C به‌مدت 72 ساعت و تعداد مخمرها از طریق کشت سطحی رقت مناسب در محیط کشت PDA در دمای25 °C به‌مدت 48 ساعت، اندازه‌گیری و نتایج به‌صورت تعداد کلنی حاصل از هر میلی‌لیتر شیر پسته (تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر) گزارش شد.

2-2-9- آنالیز آماری

اختلاف بین تیمارهای مختلف بر اساس طرح آماری فاکتوریل کاملا تصادفی با استفاده از تحلیل واریانس (ANOVA) در سطح اطمینان 5 درصد تعیین شد. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن با استفاده از نرم افزار SAS نسخه 1,9 در سطح اطمینان 5 درصد انجام گرفت.

3-نتایج و بحث

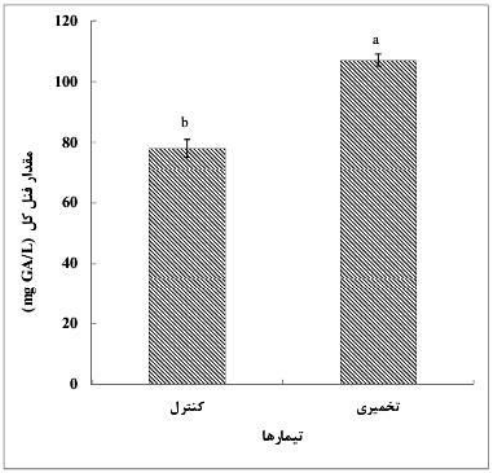
3-1- اثر تخمیر بر فنل کل

مقایسه مقدار فنل کل در نمونه تخمیر نشده و تخمیری

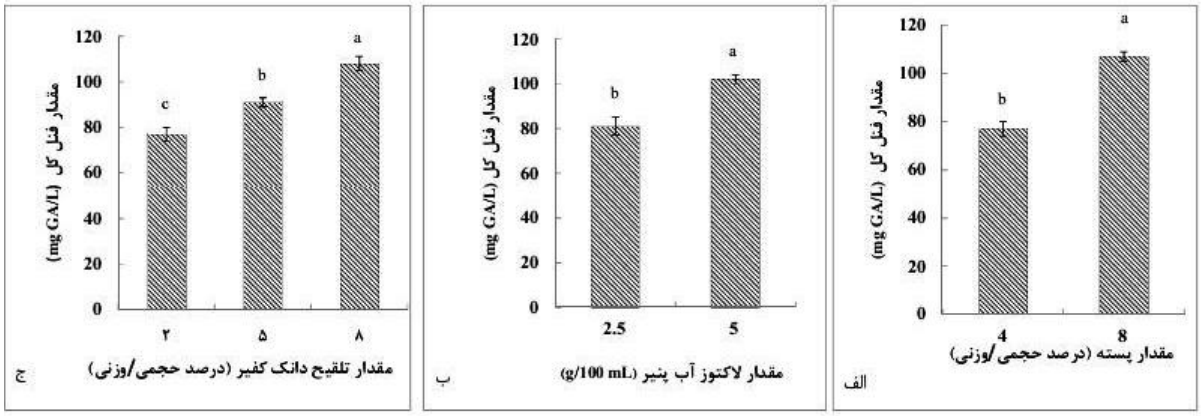
نشان می‌دهد که مقدار فنل کل در نمونه تخمیری (mg GA/L 108±2/2) به‌طور معنی‌داری (P<0/05) بیش‌تر از نمونه غیرتخمیری (mg GA/L 78±3/4) می‌باشد (شکل 1).

برای رسیدن به حداکثر میزان فنل کل در شرایط تخمیری، تاثیر مقدار پسته، لاکتوز آب پنیر و مقدار تلقیح دانک کفیر بر روی مقدار فنل کل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مقدار فنل کل در نمونه با 8 درصد حجمی/وزنی پسته، به میزان mg GA/L 29 بیش‌تر از نمونه حاوی 4 درصد حجمی/وزنی پسته می‌باشد. هم‌چنین مقدار فنل کل در نمونه تهیه شده با آب پنیر حاوی 5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز به میزان 19/6درصد بیش‌تر از نمونه تهیه شده با آب پنیر حاوی 2/5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز می‌باشد. از طرفی میزان فنل کل رابطه مستقیم با مقدار تلقیح دانک کفیر دارد به‌طوری که با افزایش سطح تلقیح به 8 درصد حجمی/وزنی، میزان فنل کل به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (شکل2).

هم‌چنین برهمکنش و تحلیل آماری این سه فاکتور برای رسیدن به بالاترین میزان تولید فنل کل نشان داد، که در نمونه تخمیری تولید شده با آب پنیر حاوی 5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز، 8 درصد حجمی/وزنی پسته و میزان 8 درصد حجمی/وزنی تلقیح دانک کفیر، مقدار فنل کل به‌طور معنی‌داری (P <0/05) بیش‌تر از سایر نمونه‌ها بوده و برابر با mg GA/L 130/91±1/29 می‌باشد (جدول1). در نتیجه مقدار فنل کل در نمونه مذکور به میزان 39/69 درصد بیش‌تر از نمونه کنترل است.



شکل (1) اثر تخمیر بر مقدار فنل کل (ستون‌هایی با حروف متفاوت در آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار (P<0/05) دارند)



شکل (2) اثر، الف- مقدار پسته، ب- مقدار لاکتوز آب پنیر و ج- مقدار تلقیح دانک کفیر بر افزایش مقدار فنل کل (ستون‌هایی با حروف متفاوت در آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار (P<0/05) دارند).

افزایش فنل کل در فراورده‌های تخمیری و در نتیجه بهبود خاصیت آنتی‌اکسیدانی توسط بسیاری از پژوهشگران به اثبات رسیده است [24-25] و علت آن، به هیدرولیز ترکیبات فنولی گلیکوزیل و ایجاد فنل آزاد نسبت داده شده است. آن‌چه که مسلم است، دانک کفیر در طی فرایند تخمیر توانایی افزایش مقدار فنل را دارد. میکروارگانیسم‌های دانک کفیر برای فعالیت خود نیاز به لاکتوز دارند و چون در آب پنیر حاوی درصد حجمی/وزنی ٪ 5 لاکتوز میزان لاکتوز کل بیش‌تر است، در تیجه محیط برای فعالیت این میکروارگانیسم‌ها مساعدتر بوده و میزان تولید فنل کل بیش‌تر خواهد بود. ویوانگ و همکاران (2006)، در تحقیقی به نتایج مشابه با تحقیق حاضر دست یافتند. این محققین بیان داشتند که محتوای فنل کل آب زغال اخته، انگور و توت فرنگی بعد از تخمیر با سراتیا واکسینی[1] افزایش معنی‌داری داشته، که به‌طور مثال پس از تخمیر توت‌فرنگی به‌مدت 5 روز مقدار فنل کل از 385 به 771 میلی‌گرم گالیک اسید به ازای هر لیتر رسیده است [27].

2-3- اثر تخمیر بر کاهش رادیکال آزاد DPPH

DPPH یک مولکول آزاد پایدار بنفش رنگ بوده، که در طول موج 520 نانومتر دارای جذب نوری می‌باشد [28]. زمانی که محلولی از DPPH با ماده‌ای که توانایی اهدای اتم هیدروژن را دارد مخلوط می‌شود، احیا شده که این پدیده با از دست رفتن رنگ بنفش آن همراه است. این نتیجه را می‌توان با پارامتر غلظت موثر یا EC_{50}، (به معنی غلظتی از ماده که 50 درصد از فعالیت رادیکال‌های DPPH را خنثی می‌کند) نشان داد. اگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا باشد، مقدار این پارامتر پایین است. شکل 3 نشان می‌دهد، فرایند تخمیر مقدار EC_{50} را به‌طور معنی‌داری به میزان 33 درصد کاهش می‌دهد. در نتیجه می‌توان دریافت که تخمیر توانایی کاهش مقدار EC_{50} و افزایش خاصیت آنتی‌رادیکالی را دارد.

در بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر EC_{50} مشخص شد که مقدار این پارامتر در نمونه حاوی 8 درصد پسته، 19درصد کم‌تر از نمونه با 4 درصد پسته است. هم‌چنین این پارامتر در نمونه حاوی آب پنیر با 5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز به میزان حدود 0/1 mL/1mL کم‌تر از نمونه حاوی آب پنیر با 2/5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز می‌باشد. از طرفی میزان EC_{50} رابطه عکس با مقدار تلقیح دانک کفیر دارد به‌طوری که کم‌ترین مقدار EC_{50} مربوط به تلقیح دانک کفیر به مقدار 8 درصد می‌باشد (شکل4).

نتایج برهمکنش این سه فاکتور نشان می‌دهد، مقدار EC_{50} در تیمار 8 که تهیه شده از آب پنیر حاوی 5 درصد حجمی/ وزنی لاکتوز، 8 درصد حجمی/وزنی پسته و میزان 8 درصد حجمی/وزنی تلقیح دانک کفیر می‌باشد، از سایر تیمارها کم‌تر

1. Serrtia vaccinia

جدول (1) اثر متقابل سه فاکتور مقدار پسته، لاکتوز آب پنیر و مقدار تلقیح دانک کفیر بر مقدار فنل کل

تیمارها	مقدار لاکتوز آب پنیر (g/100ml)	مقدار تلقیح دانک کفیر (درصد حجمی/وزنی)	مقدار پسته (درصد حجمی/وزنی)	مقدار فنل کل mg GA/L
1	2/5	5	4	61/64 ± 2/43 h
2	5	5	4	85/66 ± 3/06 f
3	2/5	8	4	76/77 ± 1/93 g
4	5	8	4	94/27 ± 1/12 e
5	2/5	5	8	100/87 ± 2/04 d
6	5	5	8	115/77 ± 1/79 e
7	2/5	8	8	123/24 ± 1/25 b
8	5	8	8	130/91 ± 1/29 a

*هر عد میانگین سه تکرار (Mean±SD) است.

**حروف مختلف نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P<0/05$).

می‌باشد، لذا این تیمار دارای بالاترین خاصیت ضد رادیکالی و بالطبع بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی است (جدول 2)، و میزان EC_{50} آن به مقدار 75/60 درصد کم‌تر از نمونه کنترل می‌باشد.

خاصیت جذب رادیکال‌های آزاد را می‌توان به فرایند تخمیر و مواد اولیه موجود در ساختار این نوشیدنی ربط داد، که این موضوع توسط بسیاری از محققین تایید شده است. نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد، از جمله عوامل موثر در کاهش مقدار EC_{50}، ترکیبات فنلی موجود در پسته [29]، نوع اسید آمینه‌ها و پروتئین‌های موجود در ساختار آب پنیر [30]، افزایش محتوای فنل آزاد طی فرایند تخمیر [27] و فعالیت آنزیم‌های ترشح شده توسط میکروارگانیسم‌های دانک کفیر [26] می‌باشند.

3-3- اثر تخمیر بر قدرت احیاکنندگی

قدرت احیاکنندگی یکی دیگر از پارامترهایی است که می‌تواند به خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها مرتبط باشد. به‌طوری که، قدرت احیاکنندگی بالاتر نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تر است. در شکل 5، تفاوت بین نمونه تخمیری و کنترل، از نظر قدرت احیاکنندگی بررسی شده است. مشاهده می‌شود که قدرت احیاکنندگی در نمونه تخمیری به‌طور معنی‌داری به میزان 62 درصد بیش‌تر از نمونه کنترل می‌باشد.

بررسی اثر فاکتورهای مختلف برای رسیدن به بالاترین خاصیت احیاکنندگی نشان می‌دهد، قدرت احیاکنندگی در نمونه تخمیری حاوی 8 درصد حجمی/وزنی پسته، به میزان 23 درصد بیش‌تر از نمونه حاوی 4 درصد حجمی/وزنی پسته می‌باشد. این پارامتر در نمونه حاوی آب پنیر با 5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز، به میزان 25 درصد بیش‌تر از نمونه تهیه شده با آب پنیر حاوی 2/5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز است. هم‌چنین در نمونه‌ای که میزان تلقیح دانک کفیر برابر با 8 درصد حجمی/وزنی است، قدرت احیاکنندگی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از نمونه‌ها با میزان تلقیح کم‌تر می‌باشد (شکل 6).

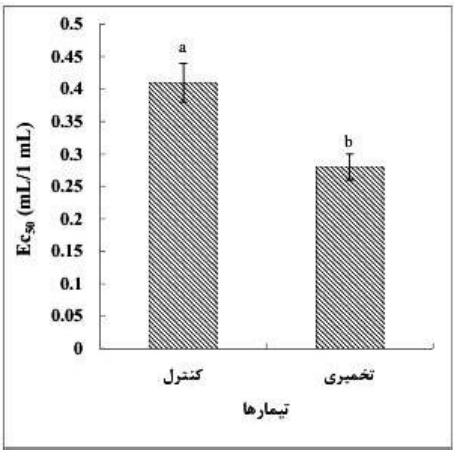
نتیجه برهمکنش فاکتورهای مختلف و تحلیل آماری آن نشان می‌دهد، تیمار 8 که با آب پنیر حاوی 5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز و 8 درصد حجمی/وزنی پسته تهیه شده و هم‌چنین میزان تلقیح دانک کفیر در آن برابر با 8 درصد حجمی/وزنی بوده است، دارای بیش‌ترین خاصیت احیاکنندگی و آنتی‌اکسیدانی بوده (جدول 3) و قدرت احیاکنندگی آن به میزان 75 درصد بیش‌تر از نمونه کنترل می‌باشد.

این‌که پس از تخمیر با دانک کفیر، قدرت احیاکنندگی نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) افزایش می‌یابد به‌وسیله بسیاری از محققین اثبات شده است. لیو و همکاران (2005)، نتیجه مشابهی را در شیر سویای تخمیر شده با دانک کفیر به‌دست آورده‌اند و مشاهده کردند که قدرت احیاکنندگی شیر سویای تخمیری نسبت به نوع غیرتخمیری بیش‌تر است [31]. گزارش شده است که شیر حاوی آنتی‌اکسیدان‌هایی هم‌چون لاکتوفرین، آسکوربیک اسید، آلفا توکوفرول و کاروتنوئید می‌باشد [32]. از طرف دیگر بعضی از پروتئین‌ها و پپتیدهای حاضر در شیر هم ممکن است دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشند [33-34]. به احتمال زیاد این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در آب پنیر هم حضور دارند که می‌توان قدرت احیاکنندگی را به آن‌ها ربط داد. برخی محققین ترکیبات سولفوردار و هم‌چنین پروتئین‌ها و پپتیدهای حاوی گروه هیدروکسیل آزاد را عامل فعالیت احیاکنندگی پیشنهاد کرده‌اند. ترکیب دیگری که می‌توان فعالیت احیاکنندگی نمونه‌ها را به آن ربط داد ترکیبات فنلی موجود در پسته می‌باشند. شکستن این ترکیبات در طول تخمیر احتمالا سبب آزاد شدن بخش‌های سولفیدریلی و هیدروکسیلی می‌شود، که این بخش‌ها نیز می‌توانند فعالیت احیاکنندگی نمونه را توجیه کنند.

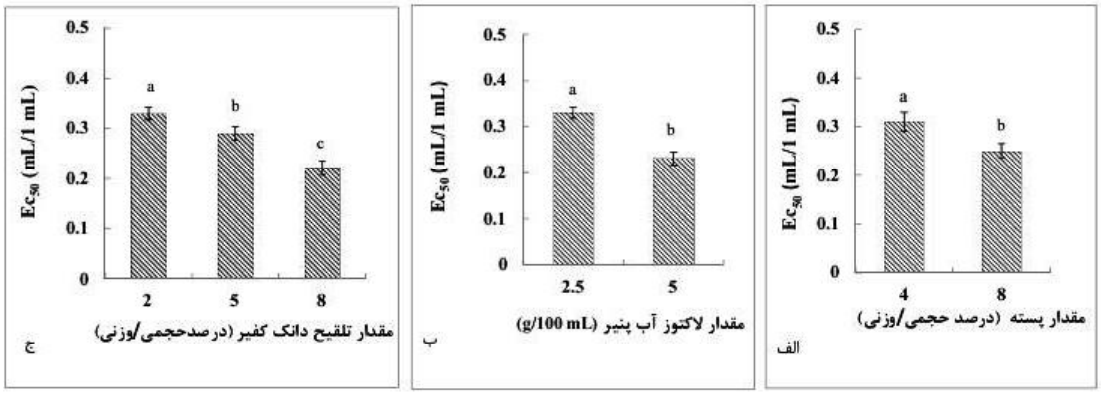
4-3- اثر تخمیر بر pH

مقایسه pH در نمونه تخمیری و غیرتخمیری نشان می‌دهد طی فرایند تخمیر pH به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) به میزان 46/2٪ کاهش می‌یابد (شکل 7).

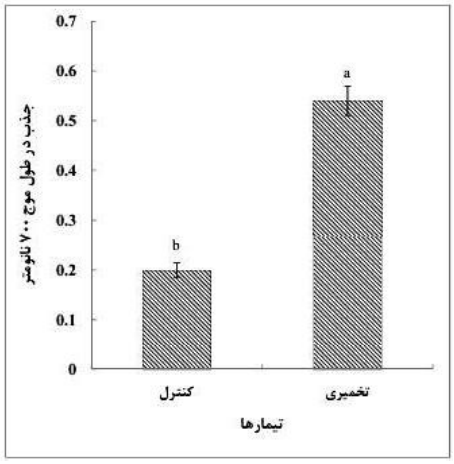
بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر pH نشان داده است، این فاکتور در نمونه تخمیری حاوی 4 درصد حجمی/وزنی پسته به میزان 8/1 درصد کم‌تر از نمونه تخمیری حاوی 8 درصد حجمی/وزنی پسته می‌باشد. و هم‌چنین pH در نمونه تخمیری حاوی 2/5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز، به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) کم‌تر از نمونه حاوی 5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز



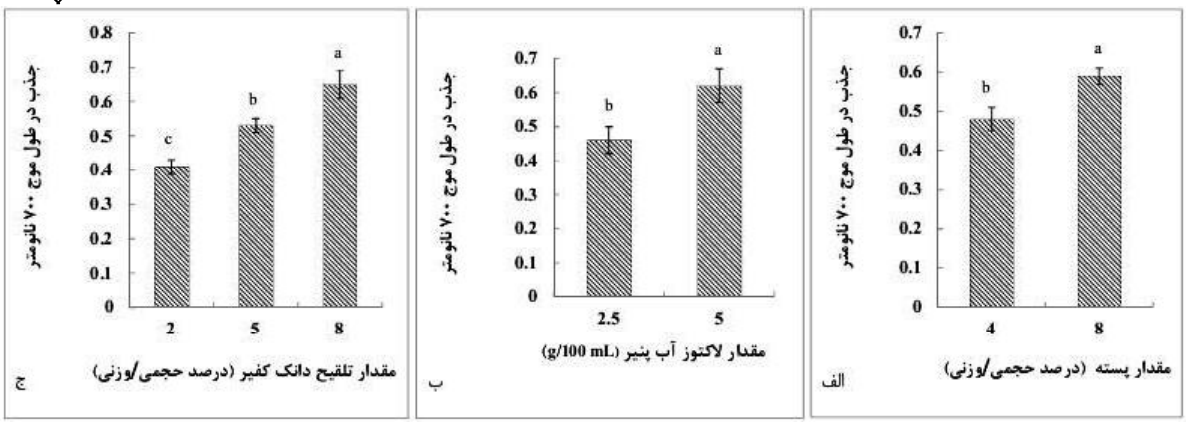
شکل (3) اثر تخمیر بر مقدار EC_{50} (ستون‌هایی با حروف متفاوت در آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار (P<0/05) دارند)



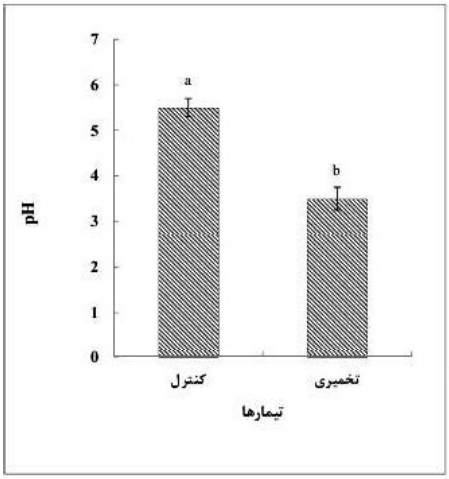
شکل (4) اثر، الف- مقدار پسته، ب- مقدار لاکتوز آب پنیر و ج- مقدار تلقیح دانک کفیر بر کاهش مقدار EC_{50} (ستون‌هایی با حروف متفاوت در آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار (P<0/05) دارند)



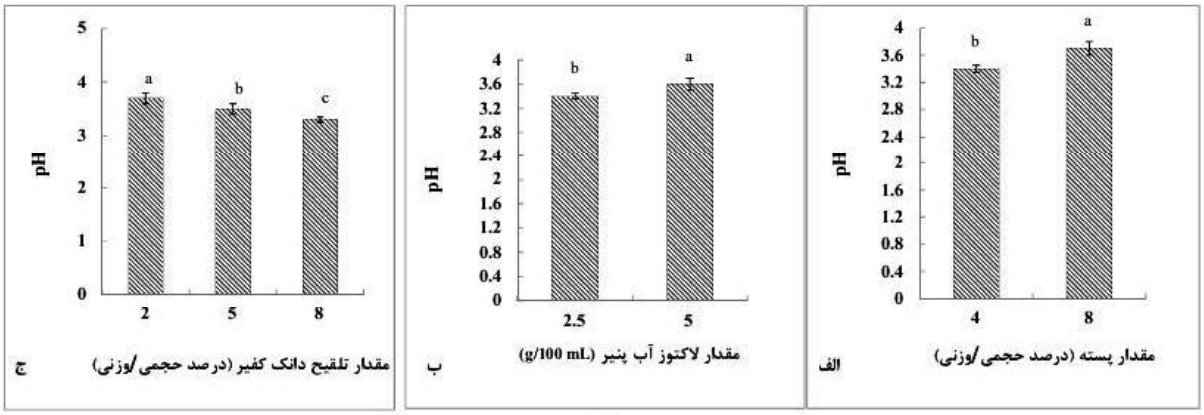
شکل (5) اثر تخمیر بر قدرت احیاکنندگی (ستون‌هایی با حروف متفاوت در آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار (P<0/05) دارند)



شکل (6) اثر، الف- مقدار پسته، ب- مقدار لاکتوز آب پنیر و ج- مقدار تلقیح دانک کفیر بر افزایش قدرت احیاکنندگی (ستون‌هایی با حروف متفاوت در آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار (P<0/05) دارند)



شکل (7) اثر تخمیر بر مقدار pH (ستون‌هایی با حروف متفاوت در آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار (P<0/05) دارند).



شکل (8) اثر، الف- مقدار پسته، ب- مقدار لاکتوز آب پنیر و ج- مقدار تلقیح دانک کفیر بر pH (ستون‌هایی با حروف متفاوت در آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار (P<0/05) دارند)

جدول (2) اثر متقابل سه فاکتور مقدار پسته، لاکتوز آب پنیر و مقدار تلقیح کفیر بر EC_{50}

تیمارها	مقدار لاکتوز آب پنیر (g/100ml)	مقدار تلقیح دانک کفیر (درصد حجمی/وزنی)	مقدار پسته (درصد حجمی/وزنی)	EC_{50} mL /1 mL
1	5/2	5	4	0/3 ± 0/03 [a]
2	5	5	4	0/29 ±0/02 [bc]
3	5/2	8	4	0/30 ±0/02 [b]
4	5	8	4	0/22 ±0/03 [e]
5	5/2	5	8	0/32 ±0/03 [ab]
6	5	5	8	0/23 ±0/02 [de]
7	5/2	8	8	0/26 ±0/02 [cd]
8	5	8	8	0/10 ± 0/03 [f]

*هر عد میانگین سه تکرار (Mean±SD) است.
**حروف مختلف نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (P<0/05).

جدول (3) اثر متقابل سه فاکتور مقدار پسته، لاکتوز آب پنیر و مقدار تلقیح دانک کفیر بر قدرت احیاکنندگی

تیمارها	مقدار لاکتوز آب پنیر (g/100ml)	مقدار تلقیح دانک کفیر (درصد حجمی/وزنی)	مقدار پسته (درصد حجمی/وزنی)	جذب در طول موج 700 نانومتر
1	5/2	5	4	0/37 ±0/03 [e]
2	5	5	4	0/62 ±0/02 [bc]
3	5/2	8	4	0/43 ±0/01 [d]
4	5	8	4	0/71 ±0/02 [b]
5	5/2	5	8	0/51 ±0/03 [c]
6	5	5	8	0/65 ±0/03 [bc]
7	5/2	8	8	0/69 ±0/02 [b]
8	5	8	8	0/80 ±0/02 [a]

*هر عد میانگین سه تکرار (Mean±SD) است.
**حروف مختلف نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (P<0/05).

آب پنیر می‌باشد. از طرفی میزان تلقیح دانک کفیر با pH رابطه عکس دارد و هر چه میزان تلقیح افزایش یابد مقدار این فاکتور کاهش می‌یابد (شکل8).

بررسی برهمکنش بین فاکتورهای مختلف نشان می‌دهد، تیمار 8 که حاوی 8 درصد حجمی/وزنی پسته، 5 درصد حجمی/ وزنی لاکتوز آب پنیر و تلقیح دانک کفیر به میزان 8 درصد حجمی/وزنی می‌باشد، دارای کم‌ترین مقدار pH است. مقدار این فاکتور در این تیمار به میزان 50/8 درصد کم‌تر از نمونه کنترل می‌باشد (جدول4).

مشاهده می‌شود که pH تمامی نمونه‌ها پس از تخمیر کاهش معنی‌داری یافته است. این نتیجه توسط بسیاری از محققین به اثبات رسیده است [35-36]. کاهش pH در طول تخمیر را می‌توان به تولید اسیدهای آلی در دوره رشد لگاریتمی باکتری‌های لاکتیکی موجود در دانک کفیر نسبت داد. بنسمیرا و جیانگ (2011)، در تحقیقی pH شیر بادام زمینی تخمیری با کفیر را حدود 4 گزارش کردند. این محققان کاهش pH در طی تخمیر شیر بادام زمینی را به مصرف لاکتوز توسط میکروارگانیسم‌های دانک کفیر و افزایش مقدار اسید لاکتیک

جدول (4) اثر متقابل سه فاکتور مقدار پسته، لاکتوز آب پنیر و مقدار تلقیح دانک کفیر بر pH

تیمارها	مقدار لاکتوز آب پنیر (g/100ml)	مقدار تلقیح دانک کفیر (درصد حجمی/وزنی)	مقدار پسته (درصد حجمی/وزنی)	pH
1	5/2	5	4	a03/0± 62/3
2	5	5	4	c02/0± 41/3
3	5/2	8	4	b04/0± 52/3
4	5	8	4	b01/0± 30/3
5	5/2	5	8	e03/0± 53/3
6	5	5	8	c01/0± 41/3
7	5/2	8	8	d02/0± 34/3
8	5	8	4	f02/0± 20/3

*هر عد میانگین سه تکرار (Mean±SD) است.
**حروف مختلف نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (P<0/05).

در طول تخمیر نسبت داده‌اند [37].

5-3- اندازه‌گیری غلظت کفیران

مطالعه اولیه روی ساختار دانه‌های کفیر نشان داد که بعضی از باکتری‌ها به‌وسیله یک پلی‌ساکارید به نام کفیران کپسوله شده‌اند. کفیران علاوه‌بر فرم کپسوله که اطراف دانه‌ها را احاطه کرده است، در داخل خود نوشیدنی تهیه شده با دانک کفیر هم حضور دارد، که این نوع کفیران را خارج سلولی[1] می‌نامند. بررسی اثر فاکتورهای مختلف نشان داد، در نمونه حاوی 8 درصد حجمی/وزنی پسته، غلظت کفیران به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از نمونه حاوی 4 درصد حجمی/وزنی پسته می‌باشد و هم‌چنین در نمونه حاوی 5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز غلظت کفیران به‌طور معنی‌داری به میزان 7/4 درصد بیش‌تر از نمونه با 2/5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز آب پنیر می‌باشد. مقدار تلقیح دانک کفیر با غلظت کفیران رابطه مستقیم دارد، به‌طوری‌که با افزایش تلقیح، غلظت کفیران به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (شکل9).

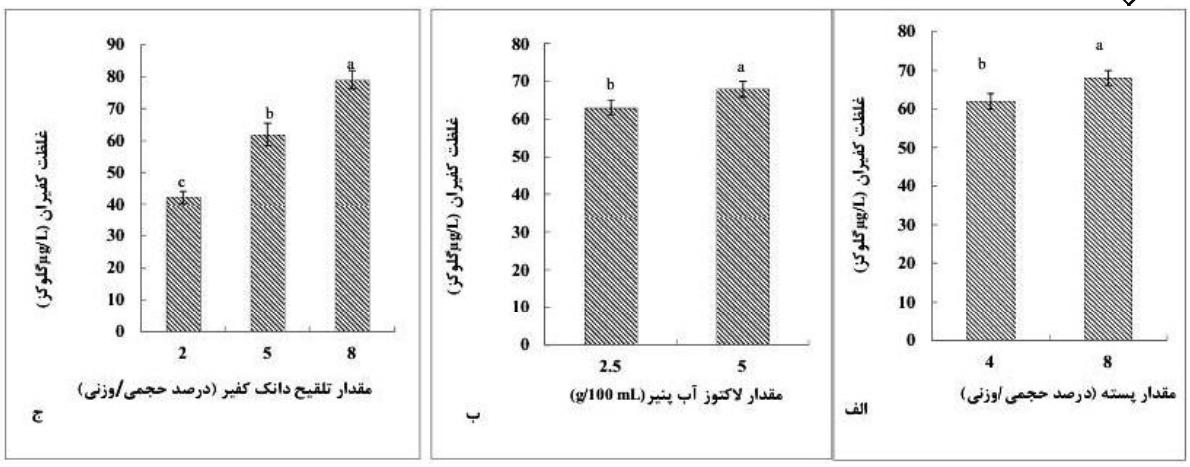
نتایج برهمکنش میان فاکتورها و آنالیز آماری آن نشان می‌دهد، تیمار 8 با 8 درصد حجمی/وزنی پسته و 5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز آب پنیر که میزان تلقیح دانک کفیر در آن برابر با 8 درصد حجمی/وزنی بوده، دارای بیش‌ترین غلظت کفیران می‌باشد (جدول5).

1. extracellular

لاکتوز ماده ضروری برای فعالیت میکروارگانیسم‌های دانک کفیر است. زمانی که آب پنیر با مقدار لاکتوز بیش‌تر، برای تهیه نوشیدنی استفاده می‌شود به‌علت فعالیت بهتر میکروارگانیسم‌های دانک کفیر، که تولیدکننده کفیران می‌باشند، غلظت کفیران بیش‌تر می‌شود. از طرفی با بالاتر رفتن مقدار تلقیح دانک کفیر، غلظت کفیران نیز افزایش می‌یابد، که این امر به‌علت مسئول بودن میکروارگانیسم‌ها در تولید کفیران می‌باشد.

6-3- ویسکوزیته

یکی از فاکتورهای مهم و موثر بر خصوصیات ارگانولپتیکی و بازار پسندی نوشیدنی‌ها، ویسکوزیته آن‌ها است. جدول 6 نشان می‌دهد که تیمار 8 با سطح تلقیح، مقدار پسته و لاکتوز آب پنیر به ترتیب برابر با 8، 8 و 5 درصد حجمی/وزنی دارای بیش‌ترین مقدار ویسکوزیته می‌باشد. طی فرایند تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های دانک کفیر، متابولیت‌های مختلفی هم‌چون اگزوپلی ساکارید کفیران، اسیدهای آلی و غیره تولید و وارد محصول می‌شوند، این ترکیبات و اثر متقابل آن‌ها می‌تواند باعث تغییر در ویسکوزیته نوشیدنی‌ها شود [38]. در این میان کفیران به‌عنوان یک هیدروکلوئید آب‌دوست و غلیظ‌کننده نقش مهمی به عهده دارد [39]. نتایج فوق در خصوص تولید کفیران نشان می‌دهد که بالاترین غلظت کفیران در تیمار



شکل (9) اثر، الف- مقدار پسته، ب- مقدار لاکتوز آب پنیر و ج- مقدار تلقیح دانک کفیر بر غلظت کفیران (ستون‌هایی با حروف متفاوت در آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار (P<0/05) دارند)

جدول (5) اثر متقابل سه فاکتور مقدار پسته، لاکتوز آب پنیر و مقدار تلقیح دانک کفیر بر غلظت کفیران

تیمارها	مقدار لاکتوز آب پنیر (g/100ml)	مقدار تلقیح دانک کفیر (درصد حجمی/وزنی)	مقدار پسته (درصد حجمی/وزنی)	غلظت کفیران (µg/L گلوکز)
1	2/5	5	4	64/74 ±2/01 h
2	5	5	4	73/50 ±1/98 e
3	2/5	8	4	67/43 ±2/50 g
4	5	8	4	87/05 ±3/00 b
5	2/5	5	8	71/23 ±1/05 f
6	5	5	8	85/01 ±2/59 c
7	2/5	8	8	83/07 ±2/31 d
8	5	8	8	91/80 ±2/67 a

*هر عد میانگین سه تکرار (Mean±SD) است.
**حروف مختلف نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (P<0/05).

شماره هشت دیده می‌شود.

3-7- شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها

وجود تعداد فراوانی از باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک در دانه کفیر توسط بسیاری از محققان تایید شده است [40]. نتایج نشان می‌دهد، جمعیت باکتری‌ها و مخمرها در نوشیدنی تخمیری مربوط به تیمار 8 بیش‌تر از سایر تیمارها می‌باشد (جدول 6). با توجه به این‌که لاکتوز ماده ضروری برای رشد میکروارگانیسم‌های دانک کفیر است، لذا زمانی که لاکتوز در محیط بیش‌تر باشد، جمعیت باکتری‌ها و مخمرها نیز بیش‌تر خواهد بود. از طرفی چون دانک کفیر عامل انتقال میکروارگانیسم‌ها به داخل نوشیدنی می‌باشد، در نتیجه افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌ها با افزایش سطح تلقیح دانک امری طبیعی است. این نتایج مشابه نتایج گزارش شده توسط برخی از محققین می‌باشد [41-42].

4-نتیجه گیری

با توجه به اهمیت غذاهای تخمیری و اثرات سلامت بخش آن،

جدول (6) اثر متقابل سه فاکتور مقدار پسته، لاکتوز آب پنیر و مقدار تلقیح دانک کفیر بر ویسکوزیته، تعداد باکتری‌ها و مخمرها

تیمارها	1	2	3	4	5	6	7	8
مقدار لاکتوز آب پنیر (g/100ml)	2/5	5	2/5	5	2/5	5	2/5	5
مقدار تلقیح دانک کفیر (درصد حجمی/وزنی)	5	5	8	8	5	5	8	8
مقدار پسته (درصد حجمی/وزنی)	4	4	4	4	8	8	8	8
ویسکوزیته (mPa.s)	۱/۳۱ ± ۰/۰۴ g	۲ ± ۰/۰۲ de	۱/۶۹ ± ۰/۰۲ f	۲/۰۸ ± ۰/۰۵ c	۱/۹۵ ± ۰/۰۲ e	۲/۱۴ ± ۰/۰۲ b	۲/۰۲ ± ۰/۰۲ cd	۲/۲۰ ± ۰/۰۳ a
تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک (تعداد کلنی در هر میلی لیتر ($\times 10^8$))	۳/۰۶ ± ۰/۱۰ e	۳/۵۳ ± ۰/۰۳ f	۴/۴۷ ± ۰/۱۳ c	۵/۱۹ ± ۰/۱۴ a	۳/۸۳ ± ۰/۲۰ d	۳/۱۷ ± ۰/۰۶ e	۴/۸۰ ± ۰/۱۳ b	۵/۴۰ ± ۰/۳۰ a
تعداد مخمرها (تعداد کلنی در هر میلی لیتر ($\times 10^8$))	۲/۰۲ ± ۰/۱۰ g	۲/۴۰ ± ۰/۰۱ f	۲/۵۷ ± ۰/۲۰ bf	۳/۰۶ ± ۰/۱۰ cd	۲/۸۰ ± ۰/۵۱ g	۳/۲۰ ± ۰/۰۱ f	۳/۴۰ ± ۰/۴۱ bf	۳/۷۰ ± ۰/۲۰ cd

*هر عد میانگین سه تکرار (Mean±SD) است.
**حروف مختلف نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P<0/05$).

نوشیدنی تخمیری جدیدی از آب پنیر و پسته با استارتر کفیر تولید شد. بررسی‌ها نشان داد استفاده از مقادیر مختلف از لاکتوز آب پنیر، پسته و دانک کفیر باعث تغییرات قابل توجهی در خواص آنتی‌اکسیدانی و فیزیکوشیمیایی این فراورده شده به‌طوری که بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به نمونه حاوی 8 درصد حجمی/وزنی پسته، 8 درصد حجمی/وزنی دانک کفیر و 5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز آب پنیر می‌باشد. لذا محتوای فنل کل، و قدرت احیاکنندگی در این نمونه، به ترتیب به میزان 39/69 و 75 درصد بیش‌تر و قدرت کاهش رادیکال‌های آزاد بر حسب EC_{50} به میزان75/60 درصد کم‌تر از نمونه کنترل است. هم‌چنین غلظت کفیران، مقدار ویسکوزیته و تعداد اسید لاکتیک باکتری‌ها و مخمرها نیز در نمونه مذکور بیش‌تر از سایر نمونه‌ها بوده است. کم‌ترین مقدار pH مربوط به نمونه حاوی 4 درصد حجمی/وزنی پسته، 8 درصد حجمی/ وزنی دانک کفیر و 5 درصد حجمی/وزنی لاکتوز آب پنیر می‌باشد که به میزان 50/8 درصد کم‌تر از نمونه کنترل است.

5- تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح شماره 7314872/1/04 با اعتبارات دانشگاه تهران اجرا شده است.

منابع

[1] Ozer, B.H., Kirmaci, H.A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *Int. J. Dairy Technol.*, 63(1), 1–15.

[2] Farnworth, E. R. (2006). Kefir–a complex probiotic. *Food Sci. Technol. Bull.: Fu*, 2(1), 1–17.

[3] Alm, L. (1982). Effect of fermentation on B-vitamin content of milk in Sweden. *J. Dairy Sci.*, 65(3), 353–359.

[4] Jamuna, M., Jeevaratnam, K. (2004). Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50(2), 79–90.

[5] Kubo, M., Odani, T., Nakamura, S., Tokumaru, S., Matsuda, H. (1992). Pharmacological study on kefir--a fermented milk product in Caucasus. I. On antitumor activity (1). *Yakugaku Zasshi.*, 112(7), 489–495.

[6] Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M., Aibara, K. (1982). Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 35(2), 75–80.

[7] Vujicic, I.F., Vulic, M., Konyves, T. (1992). Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnol. Lett.*, 14(9), 847–850.

[8] Lee, Y.K., Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Tech.*, 6(7), 241–245.

[9] Macedo, R.F., Freitas, R. J.S., Pandey, A., Soccol, C.R. (1999). Production and shelf life studies of low cost beverage with soymilk, buffalo cheese whey and cow milk fermented by mixed cultures of *Lactobacillus casei* ssp. *shirota* and *Bifidobacterium adolescentis*. *J. Basic Microb.*, 39(4), 243–251.

[10] Cheirsilp, B., Radchabut, S. (2011). Use of whey lactose from dairy industry for economical kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts. *New Biotechnol.*, 28(6), 574–580.

[11] Kooiman, P. (1968). The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohyd. Res.*, 7(2), 200–211.

[12] Smithers, G.W. (2008). Whey and whey proteins—from "gutter-to-gold." *Int. Dairy J.*, 18(7), 695–704.

[13] Ha, E., Zemel, M.B. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J. Nutr. Biochem.*, 14(5), 251–258.

[14] Zemel, M. B. (2004). Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79(5), 907–912.

[15] Shoveller, A.K., Stoll, B., Ball, R.O., Burrin, D.G. (2005). Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *J. Nutr.*, 135(7), 1609–1612.

[16] Tokusoglu, O., Unal, M.K., Yemis, F. (2005). Determination of the phytoalexin resveratrol (3, 5, 4' trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J. Agr. Food Chem.*, 53(12), 5003–5009.

[17] Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Ashraf-Khorassani, M. (2005). Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J. Agr. Food Chem.*, 53(24), 9436–9445.

[18] Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.*, 16(11), 1306–1314.

[19] Wang, Y.C., Yu, R.C., Chou, C.C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.*, 23(2), 128–35.

[20] Singleton, V. L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of

cal scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.*, 68(1), 81–85.

[30] Meucci, E., Mordente, A., Martorana, G.E. (1991). Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging. *J. Biol. Chem.*, 266(8), 4692–4699.

[31] Liu, J. R., Chen, M. J., Lin, C. W. (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *J. Agr. Food. Chem.*, 53(7), 2467–2474.

[32] Lindmark-Mansson, H., Akesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk. *Brit. J. Nutr.*, 84(S1), 103–110.

[33] Pena-Ramos, E. A., Xiong, Y. L. (2001). Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *J. Dairy Sci.*, 84(12), 2577–2583.

[34] Ye, X.Y., Ng, T.B. (2000). Purification and characterization of glycolactin, a novel glycoprotein from bovine milk. *Life Sci.*, 66(13), 1177–1186.

[35] Athanasiadis, I., Paraskevopoulou, A., Blekas, G., Kiosseoglou, V. (2004). Development of a novel whey beverage by fermentation with kefir granules. Effect of various treatments. *Biotechnol. Progr.*, 20(4), 1091–1095.

[36] Magalhaes, K.T., Dragone, G., de Melo Pereira, G.V, Oliveira, J.M., Domingues, L., Teixeira, J.A., Schwan, R. F. (2011). Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chem.*, 126(1), 249–253.

[37] Bensmira, M., Jiang, B. (2011). Organic acids formation during the production of a novel peanut-milk kefir beverage. *Brit. J. Dairy Sci.*, 2(1), 18–22.

[38] Garrote, G. L., Abraham, A.G., De-Antoni, G. L. (1998). Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. *J. Dairy Res.*, 65, 149–154.

total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, 16(3), 144–158.

[21] Cam, M., Hışıl, Y., Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem.*, 112(3), 721–726.

[22] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.*, 44(6), 307-315.

[23] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, Pa., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28(3), 350–356.

[24] Chu, S.C., Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chem.*, 98(3), 502–507.

[25] Dordevic, T.M., Siler-Marinkovic, S.S., Dimitrijevic-Brankovic, S.I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chem.*, 119(3), 957–963.

[26] Katina, K., Liukkonen, K.H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S.M., Lampi, A. M., Poutanen, K. (2007). Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *J. Cereal Sci.*, 46(3), 348–355.

[27] Vuong, T., Martin, L., Matar, C. (2006). Antioxidant activity of fermented berry juices and their effects on nitric oxide and tumor necrosis ractor alpha production in macrophages 264.7 gamma no (–) cell line. *J. Food Biochem.*, 30(3), 249–268.

[28] Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2), 211–219.

[29] Lu, Y., Yeap Foo, L. (2000). Antioxidant and radi-

[39] Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., Hashemi, M. (2014). Development and characterization of the kefiran-whey protein isolate-TiO2 nanocomposite films. *Int. J. Biol. Macromol.*, 65, 340–5.

[40] Garrote, G.L., Abraham, A.G., De-Antoni, G.L. (2000). Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *J. Food Prot.*, 63, 364–369.

[41] Mazaheri Assadi, M., Abdolmaleki, F., Mokarrame, R.R. (2008). Application of whey in fermented beverage production using kefir starter culture. *Nutr. Food Sci.*, 38(2), 121–127.

[42] Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., Ibanez, F.C. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chem.*, 90, 613–620.