تاثیر افزودن اینولین و فرآیند ریزپوشانی بر میزان زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در طول دوره نگهداری ماست بستنی سین بیوتیک

هاجر نعیمی[۱*]، سید علی مرتضوی[۲]، الناز میلانی[۳]، آرش کوچکی[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد

۴- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۳)

چکیده

ماست بستنی، فرآورده منجمد شیر است که از نظر ویژگی های فیزیکی و کیفیت ظاهری مشابه بستنی می باشد. در این تحقیق، ماست بستنی به عنوان فراورده سین بیوتیک حاوی هر دو مورد پروبیوتیک و پری بیوتیک تولید شد. باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس کازئی*(LAFTI-L26) به دو صورت آزاد و ریزپوشانی شده به ماست بستنی اضافه شد و قابلیت زنده مانی آن در طی مدت ۳۰ روز انبارمانی در $18^{o}c$- بررسی گردید. اینولین به عنوان ترکیب پری بیوتیکی در سطوح مختلف (۲/۰،۵ و ۵ درصد وزنی/وزنی)به ماست بستنی افزوده شد. تعداد سلول قابل زیست *لاکتوباسیلوس کازئی* در حالت آزاد در مخلوط ماست بستنی تهیه شده، بین ۹/۸۰۱ log *cfu/ml* ـ ۹/۷۷۹ در روز اول بود که بعد از ۳۰ روز انبارمانی تعداد آن به ۷/۸۶۶ log *cfu/ml* ـ ۷/۴۵۱ کاهش یافت.در نمونه های ماست بستنی حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* ریزپوشانی شده توسط آلژینات سدیم- پروتئین سرم شیر تغلیظ شده، تعداد باکتری در روز اول ۸/۶۶۱ log *cfu/ml* ـ ۸/۱۵۰ بود که بعد از ۳۰ روز انبارمانی به ۷/۴۷۷ log *cfu/ml* ـ ۶/۶۵۰ کاهش یافت. به طور کلی، نتایج حاصل از پژوهش نشان داد، ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در کپسولهای آلژینات سدیم- پروتئین سرم شیر به طور چشمگیری توانست قابلیت زنده مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی را بهبود بخشد.($p<0/05$) شمار زیست پذیر این باکتریها در ماست بستنی حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده، در رنجی که توسط کمیته بین المللی لبنیات پیشنهاد شده(10^{7}-10^{6} cfu/g) بود.

کلید واژگان: ماست بستنی، محصول سین بیوتیک، ریزپوشانی با آلژینات-وی پروتئین، بقاء *لاکتوباسیلوس کازئی*

* مسئول مکاتبات: hajar_naeemi@yahoo.com

۱- مقدمه

طبق تعاریف مختلف"پروبیوتیک" را می توان به عنوان میکروارگانیسم زنده تعریف کرد که می تواند برای سلامت بدن به دلیل حفظ و بهبود تعادل میکروبی محیط روده مفید باشد. امروزه اهمیت محصولات پروبیوتیک به خوبی مشخص شده و در نتیجه، محصولات بسیاری از این قبیل برای مصرف انسان، حیوانات اهلی و خانگی در دسترس هستند[۱]. گزارش شده که پروبیوتیک ها با تعدیل ایمنی، کاهش کلسترول، بهبود تحمل نسبت به لاکتوز و جلوگیری از برخی سرطان ها نقش درمانی ایفا می کنند[۱]. در راستای اهمیت باکتری های پروبایوتیک و اثرات سلامتی بخش محصولات وابسته، در این پژوهش ماست بستنی سین بیوتیک، تولید شد. بقای پروبیوتیک ها را می توان با کاربرد هیدرات کربن پری بایوتیک نظیر اینولین وفروکتوالیگوساکاریدافزایش داد. رژیم حاوی ترکیبات پری بایوتیک، رشد بیفیدوباکتر و لاکتوباسیل‌های ساکن روده را تحریک نموده و فعالیت پاتوژن ها را کاهش می دهد. با این حال، مشکلات بسیاری در کارآیی پایین پروبایوتیک ها در محصولات لبنی وجود دارد. در سال‌های اخیر، استفاده از تکنولوژی ریز پوشانی[1] سبب حل مشکل اخیر شده است؛ ریزپوشانی باکتری پروبایوتیک جهت افزایش تقویت کارآیی آنها در حین فرآیند و همچنین رهایش کنترل شده در دستگاه گوارش، مورد استفاده قرار می گیرد. لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس کازئی از مقاومت مطلوب به ونکومایسین برخوردار است[۲].

بیشترین قابلیت بقا در فرآورده های تخمیری شیر به *لاکتوباسیلوس کازئی* نسبت داده شده است. پرگنه های *لاکتوباسیلوس کازئی* در محیط کشت MRS-Agar به رنگ کرمی بوده ودر انتهای عمقی محیط کشت به شکل دایره ای با هاله کمرنگ و در عمق محیط کشت به شکل مثلثی وبیضی شکل که دارای زاویه در دو گوشه می باشند، قابل مشاهده اند[۲].

پری بایوتیک ها اغلب از جنس هیدرات کربن، هستند و در معده و روده کوچک انسان هضم و جذب نشده؛ در نتیجه به همان شکل اولیه وارد روده بزرگ شده و به مصرف پروبایوتیک ها می رسند. از جمله ترکیبات پری بایوتیک که امروزه توجه بسیاری از محققین را معطوف خود ساخته، انواع فروکتان می باشند. به ترکیبی از پروبایوتیک و پری بایوتیک، سین بایوتیک گفته می شود. عملکرد کم پروبایوتیک ها در محصولات شیری مانند ماست و دسرهای منجمد ناشی از تجمع اسید لاکتیک و اسید استیک و pH کم، حضور پراکسید هیدروژن و ظرفیت اکسیژن می باشد. ریزپوشانی روشی است که باعث بهبود کارآیی میکروارگانیسم ها در محصولات شیری و دستگاه گوارش می شود؛ بر این اساس آزاد شدن مواد ریزپوشانی شده با سرعت کنترل شده حائز اهمیت می باشد. آزاد سازی کنترل‌شده بدین معنی است که باکتری‌ها براثر مواجهه با شرایط نامساعد ضایع نخواهند شد؛ ریزپوشانی یک روش فیزیکو شیمیایی و یا مکانیکی است که در آن ذرات دارای مواد فعال، جهت حفاظت توسط یک لایه از مواد دیگر پوشش داده می شوند. انتخاب مواد پوششی متفاوت معمولا به ویژگی های سلامتی زایی میکروکپسول و روش پوشش دهی استفاده شده وابسته است. برای ریزپوشانی پروبایوتیک ها در صنایع غذایی و لبنی، عموما از ماتریکس هاس حفره دار استفاده می شود، هر کپسول شامل دو قسمت هسته و دیواره می باشد که معمولا هسته شامل فاز آبی و روغنی و حاوی ترکیبات مؤثر خواهد بود. ماست بستنی بدلیل دارا بودن باکتریهای اسید لاکتیک و انجام فرایند تخمیر ارزش تغذیه ای بالایی داشته؛ بعلاوه در مقایسه با بستنی مقدار کمتری چربی، ماده قندی و لاکتوز دارد. بدلیل کاهش میزان لاکتوز طی فرایند تخمیر، مشکل ایجاد بافت شنی در ماست بستنی کاهش می یابد. برخی از اثرات مفید سلامتی در محصولات پروبایوتیکی شامل خواص ضد سرطانی و ضد جهش‌زایی، تحریک، تقویت و تنظیم سیستم ایمنی بدن در برابر حساسیت‌ها، استرس و مسمومیت‌ها، کاهش کلسترول خون، خواص ضد عفونتی، بهبود ناسازگاری لاکتوز و افزایش ارزش تغذیه‌ای می‌باشد[۳].

هدف از این تحقیق تولید محصول ماست بستنی سین بیوتیک با استفاده از اینولین به عنوان پری بیوتیک و نیز تکنولوژی ریز پوشانی به منظور بررسی اثرگذاری آن روی افزایش بقاء لاکتوباسیلوس کازئی در طول زمان نگهداری می باشد.

1. Microencapsulation

۲- موادو روش ها

تجهیزات و مواد اولیه‌ای که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت عبارت اند از:

باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی دارای شماره بچ[۲] ۲۴۶۸۳۳به صورت خشک‌شده انجمادی[۳]و از نوع LAFTI-L26 DSLاز شرکت DSM ، کشت‌های آغازگر ماست شامل لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بلگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس از شرکت لاکتینا، محیط کشت MRSو vancomycine از شرکت مرک آلمان، آلژینات سدیم با ویسکوزیته متوسط از شرکت سیگما، wpc 80% ،روغن کلزا، توین ۸۰ ، کلرور کلسیم،پپتون واتر، پودر شیر خشک پس‌چرخ(شرکت مولتی خراسان)، پانیسول، امولسیفایر، ترکیب پری‌بیوتیکی اینولین با نام تجاری Orafti®HP، خامه ۳۰٪ پگاه، وانیل، شکر، سیترات سدیم،سود ۱ نرمال.

۲-۱- روش‌های آزمون

۲-۱-۱- آماده‌سازی کشت پروبیوتیکی

جهت آماده‌سازی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* مقدار ۱ گرم از کشت به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS Broth تلقیح و در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ به مدت ۱۰ تا ۱۲ ساعت گرمخانه-گذاری شد. مقدار ۱ یک میلی‌لیتر از محیط فوق به ۹۹ میلی-لیتر از محیط کشت MRS Broth جدید منتقل و به صورت ۱٪ رقیق و در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ به مدت ۱۰ تا ۱۲ ساعت گرمخانه-گذاری گردید. کشت مذکور در طول هفته بر حسب تعداد سلول مورد نیاز به محیط کشت تازه انتقال داده شد و بعد از ۱۰ تا ۱۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در یخچال و در دمای ۴ $^{\circ}C$ نگه‌داری شد. هدف از انجام این کار دسترسی دائم به فاز لگاریتمی بوده است. سلول‌های پروبیوتیکی حاصل بعد از سانتریفوژ کردن Herolab در g×۴۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴$^{\circ}C$ جداسازی ،وسپس عمل شستشوی سلول‌های جدا شده ،دوبار با استفاده از محلول ۰/۱٪ پپتون‌واتر تحت شرایط فوق صورت گرفت و از آن جهت تلقیح مستقیم استفاده شد[۴]

۲-۱-۲- ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی

روش آماده سازی مواد تشکیل دهنده دیواره مطابق روش چن و سابیراد [۴](۲۰۰۶) بود. بدین صورت که ابتدا مقدار ۲ گرم از آلژینات سدیم با ویسکوزیته متوسط در۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر با استفاده از همزن مغناطیسی حل شد. سپس به مدت یک شب در یخچال و در دمای ۴$^{\circ}C$ نگه‌داری شد تا آلژینات به خوبی آب جذب کند. سپس به بیرون از یخچال منتقل و مدتی در دمای آزمایشگاه نگه‌داشته شد تا با محیط هم‌دما شود . مقدار ۸ گرم از پودر ۸۰٪ wpcرا در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه برای مدت یک ساعت بر روی همزن مغناطیسی قرار داده ،سپس سوسپانسیون فوق را به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده ،بعد با استفاده از سود ۱ نرمال، pH آن را به ۸ رسانیده،به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حرارت داده،به دمای محیط رسانده و ۲ ساعت در دمای محیط نگهداری شد،سپس به نسبت ۲ :۱ با محلول آلژیناتی که قبلا تهیه شد ،مخلوط گردید،به مدت نیم ساعت در دمای محیط توسط هم زن همزده و به مدت یک شب در یخچال ۱۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. عمل ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی با استفاده از روش ژلاتیناسیون خارجی که توسط تراستراپ(۲۰۰۲) و الان (۲۰۰۸) [۶] و رضائی‌مکرم و همکاران (۲۰۰۸)[۴] گزارش گردید ،انجام شد. دانک‌های تشکیل شده،سپس، با استفاده از سانتریفوژ در g × ۵۰۰ و در دمای ۴ $^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه جداسازی و شستشو گردید[۴]. دانک‌های آلژینات سدیم-پروتئین سرم شیر حاصل، همانند بیومس، از آن جهت تلقیح مستقیم استفاده به عمل آمد.

۲-۱-۳- شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در دانک‌ها

جهت تعیین کارایی فرایند ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی،از روش رضایی مکرم و همکاران(۲۰۰۸)[۴]استفاده شد. این شمارش در سه تکرار صورت پذیرفت.

۲-۱-۴- تولید ماست بستنی

تولید بستنی ماستی مطابق روش میلانی و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت[۷] مقدار۹۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر با۹/۱ گرم

2. Batch number
3. Freeze-dried

4. Chen &Subirade

پودر شیر پس‌چرخ مخلوط ،هموژنیزه و در دمای $85^{\circ}C$ ،به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شد. حدود ۰/۰۳٪ از کشت آغازگر، به شیربا دمای حدود $45^{\circ}C$ اضافه و ۱۵ دقیقه در انکوباتور نگهداری گردید. برای تولید ماست، ۷۰٪ از کل شیر محاسبه شده برای تهیه ماست بستنی، در دمای $42^{\circ}C$ با آغازگر آماده-سازی شده تلقیح شد وبرای تهیه ماست گرمخانه‌گذاری گردید.پایان گرمخانه‌گذاری، رسیدن به pH حدود ۴/۸ بوده است[۷].برای تولید فاز غیر ماستی، ۳۰٪ از شیر باقی مانده، ابتدا تا دمای $45^{\circ}C$ در حمام آب حرارت داده شد، سپس ترکیبات دیگر (مواد جامد) به آرامی به شیر اضافه شدو عمل هموژنیزاسیون مخلوط تا جاییکه هیچ ذره یا کلوخه‌ای باقی نماند، صورت گرفت. سپس، خامه با ۳۰٪ چربی به مخلوط اضافه شد. این مخلوط به مدت۲۰ ثانیه در حرارت $80^{\circ}C$ پاستوریزه و سپس دمای مخلوط سریعا به زیر $10^{\circ}C$ رسانیده شد. ماست تهیه شده با فاز غیرماستی مخلوط و به مدت ۱۲الی۱۴ ساعت در دمای $4^{\circ}C$ نگه‌داری شد تا عمل رسانیدن مخلوط، کامل گردد. پس از اتمام این مرحله، دانک‌های آلژینات سدیم-پروتئین سرم شیر حاوی بیومس پروبیوتیکی به مخلوط بستنی تلقیح شد، و عملل انجماد مخلوط در دستگاه بستنس ساز خانگی برای مدت۲۵ دقیقه پی گیری شد. عمل شمارش تعداد سلول پروبیوتیکی قبل و بعد از انجماد با استفاده از روش رقت سازی ۹ لوله ای و کشت مخلوط، انجام شد. بدین ترتیب که مقدار۱۰گرم از نمونه ماست بستنی در۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر سیترات سدیم ۱٪ w/v پراکنده شده و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از هم‌زن مغناطیسی همزده شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول فوق داخل پلیت ریخته شده و با استفاده از محیط کشتMRS- Agar به همراهVancomycin مخلوط داده شد[۸و۹]. این محیط کشت به عنوان محیط کشت انتخابی برای لاکتوباسیلوس کازئی که امکان شمارش این باکتریها را در نمونه هایی که حاوی دیگر باکتریها هستند، از جمله باکتریهای موجود در ماست و پنیر، فراهم می آورد، بدین صورت که این آنتی بیوتیک از رشد باکتریهای ماست و پنیر جلوگیری کرده و فقط لاکتو*باسیلوس کازئی* رشد مینماید[۲]. بعد از انجماد مخلوط در دستگاه بستنی ساز نیز کشت صورت گرفت و همه نمونه‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت و در دمای $37^{\circ}C$ تحت شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری گردید. میانگین همه نتایج بدست آمده به عنوان واحدهای شکل‌گیری کلنی[5] در هر گرم از نمونه (cfu/g) بیان گردید. نمونه‌های ماست بستنی محتوی باکتری-های آزاد در روش مشابهی (جایگزینی پپتون‌واتر ۰/۱٪ با سیترات سدیم ۱٪ w/v)، کشت مخلوط داده شد[۴].

۲-۱-۵- بررسی تیمارهای انجام شده

در این تحقیق از اینولین به عنوان یک ترکیب پری‌بیوتیکی در سه سطح ۰٪ ، ۲/۵ ٪ و ۵٪ استفاده شد. همچنین کشت پروبیوتیکی در دو حالت ریزپوشانی شده و آزاد به محصول تلقیح شد. و در نهایت محصول در سطوح مختلف زمان نگه‌داری ۰ ، ۱ ، ۱۰ ، ۲۰ و ۳۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۶- طرح آماری

تجزیه و تحلیل نتایج در رابطه با بستنی ماستی با طرح آماری دو فاکتوره‌ی کاملاً تصادفی و در سه تکرار و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. برای انجام آنالیز واریانس از نرم‌افزار Minitab ver 13.1 و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار Mstatc استفاده شد. برازش خطوط و ترسیم منحنی‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزارهای Slide Write و Excel انجام شد.

۳- بحث و نتایج

۳-۱- تاثیر متقابل افزودن اینولین و مدت زمان رسیدگی بر شمارش باکتری *L.casei* در دو فرم آزاد و ریزپوشانی شده:

تأثیر زمان، اینولین و فرم تلقیح باکتری لاکتو*باسیلوس کازئی* تلقیح شده به ماست‌های منجمد، بر بقاء و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها، طبق داده‌های به دست آمده از جدول آنالیز واریانس معنی‌دار بود. ($p<۰/۰۵$)

مطابق نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها، با گذشت ۳۰ روز انبار مانی در دمای $18^{o}c$- ،بقاءپروبیوتیک لاکتو*باسیلوس کازئی* در ماست بستنی حاوی این باکتری در حالت آزاد و ریزپوشانی شده، کاهش یافت که میزان این کاهش برای لاکتو با سیلوس کازئی در حالت ریزپوشانی شده، نسبت به نوع آزاد آن، در نمونه‌های ماست بستنی، کم‌تر بود($p<۰/۰۵$).

5. Colony forming units

جدول ۱ زنده‌مانی باکتری‌های لاکتو با سیلوس کازئی در طی ۳۰ روز انبار مانی در $18^{o}c-$ در عدم حضور اینولین در نمونه‌های ماست بستنی.

روزهای نگهداری	تعداد سلول زنده بعد از قرار گرفتن در معرض انجماد (میانگین + خطای استاندارد)	
	حالت آزاد log *cfu/ml*	حالت ریزپوشانی شده log *cfu/ml*
۰	۹/۸۰۱± ۰/۱	۸/۶۶۱ ±۰/۲
۱	۹/۵۵۶ ± ۰/۰۱	۸/۰۴۸ ± ۰/۴
۱۰	۹/۵۰۱± ۰/۱	۷/۹۵۱± ۰/۴
۲۰	۸/۳۸۹±۰/۱	۶/۸۴۵ ± ۰
۳۰	۷/۴۵۱ ± ۰/۲	۶/۸۱۰ ± ۰/۴
R^2 (ضریب تعیین)	۰/۹۸۹۲	۰/۹۰۰۲

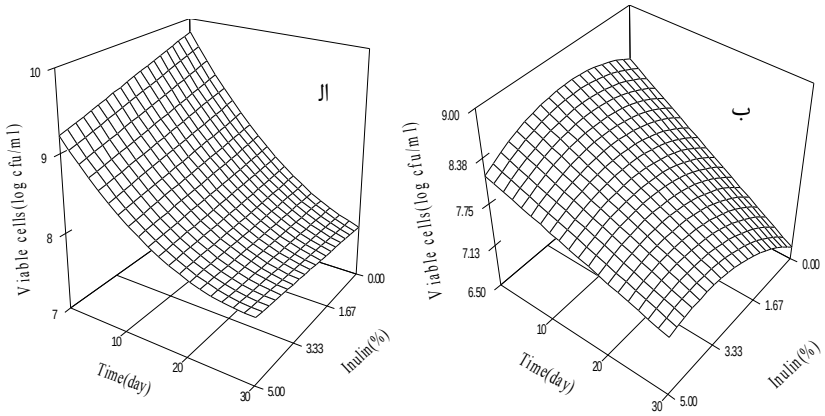
جدول۲ زنده‌مانی باکتری‌های لاکتو با سیلوس کازئی در طی ۳۰ روز انبارمانی در $18^{o}c-$ در حضور ۵ درصد اینولین در ماست بستنی

روزهای نگهداری	تعداد سلول زنده بعد از قرار گیری در معرض انجماد(میانگین+خطای استاندارد)	
	حالت آزاد log *cfu/ml*	حالت ریزپوشانی شده log *cfu/ml*
۰	۹/۷۷۹ ± ۰/۰۵	۸/۲۴۶ ± ۰/۰۹
۱	۸/۶۸۵± ۰/۱	۸/۱۰۸ ± ۰/۰۹
۱۰	۸/۳۱۴± ۰/۱	۷/۹۲۲ ± ۰/۳
۲۰	۸/۰۹± ۰/۰۷	۷/۳۸۹ ± ۰/۱
۳۰	۷/۸۶۶ ± ۰/۱	۷/۳۳۵ ± ۰/۱
R^2 (ضریب تعیین)	۰/۷۷۰۷	۰/۹۰۲۲

در مورد نمونه‌ها ماست بستنی حاوی باکتری‌های پروبیوتیکی به صورت ریزپوشانی شده، همانگونه که از جداول ۱و۲، می‌توان پی برد، میزان کاهش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در دانک‌ها در طول دوره انبار مانی ۳۰ روزه در $18^{o}c-$، کاهش کم‌تری را نسبت به باکتری‌های در حالت آزاد تلقیح شده به ماست بستنی، نشان داد که تعدادآنها از log *cfu/ml* ۸/۶۶۱ ـ ۸/۱۵۰ در روز تولید و بعد از فرآیند انجماد به log *cfu/ml* ۷/۴۷۷ ـ ۶/۸۱۰ در انتهای دوره ۳۰ روزه انبار مانی در $18^{o}c-$ رسید، که حدود ۱/۵ ـ ۱ سیکل لگاریتمی کاهش را در تعداد سلول‌های پروبیوتیکی با قابلیت زنده‌مانی به دام افتاده در دانک ها را نشان داد که خود تأئیدی است بر عمل دیواره (دانک) در محافظت از باکتری‌های پروبیوتیکی، تحت شرایط و عوامل نامساعد برای رشد آنها که در محصول و یا در طی فرآیند و تولید محصول وجود دارد.

با توجه به شکل ۱(ب) نیز مشاهده گردید که در حضور ۵ درصد اینولین تلقیح شده به نمونه ماست بستنی، بقاء باکتری‌های پروبیوتیکی به دام افتاده بیشتر بود و به گونه‌ای چشمگیر، نسبت به نمونه‌های ماست بستنی فاقد اینولین و دارای ۲/۵ درصد اینولین، کاهش کم‌تری را با توجه به شیب ملایم‌تر منحنی، در طول دوره ۳۰ روزه انبار مانی در $18^{o}c-$ نشان داد.

شکل نمودارهای سطح پاسخ۱(الف و ب)بیان بیانگر این مطلب است که در طول انبار مانی ۳۰ روزه در دمای $18^{o}c-$ ،زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیکی موجود در ماست بستنی، کاهش قابل توجهی را نشان داد.



شکل ۱ بقاء لاکتوباسیلوس کازئی(پروبیوتیک) در ماست بستنی حاوی لاکتوباسیلوس کازئی در حالت آزاد(الف) وریزپوشانی شده(ب)وحاوی سطوح مختلف اینولین

سلول‌های کپسوله شده به زمان بیشتری نیاز دارند تا یک چرخه (سیکل) لگاریتمی در تعداد سلول‌های با قابلیت زیست‌پذیری آنها کاهش صورت گیرد. نیز،آنها عنوان کردند که بیشترین آسیب انجماد زمانی رخ داد که پروبیوتیک‌ها درفرآورده بستنی بودند. احتمالاً آسیب به سلول‌ها در داخل فریز بستنی به دلیل تشکیل بلورهای یخ و خراشیده شدن

جداره استوانه توسط تیغه‌های فریزر بود. سلول‌های به دام افتاده، بهتر از سلول‌های آزاد، البته در یک نژاد نسبت به انجماد طاقت آوردند ($p<۰/۰۵$). پروبیوتیک‌ها هنگامی که در آژینات کلسیم پوشش یافتند، ۳۰ درصد بیشتر از زمانیکه پوشش نداشتند، زنده ماندند. محافظت توسط انکپسوله کردن، هم در فریزر بستنی و هم طی نگهداری در حالت انجماد، قابل توجه بود. ($p<۰/۰۵$) که با نتایج بدست آمده از تحقیق همایونی و همکاران (۲۰۰۷)همخوانی داشت [۱۰] .

در این تحقیق، کاهش برای نمونه‌های ماست بستنی حاوی باکتری‌های پروبیوتیکی در حالت آزاد، حدود ۲/۳ ـ ۲ سیکل لگاریتمی کاهش را نشان داد که تعداد این باکتری‌ها در نمونه‌های ماست بستنی حاوی سطوح مختلف اینولین، از ۹/۸۰۱ ـ ۹/۷۷۹ $\log cfu/ml$ در ابتدای تولید و بعد از انجام فرآیند انجماد به ۷/۸۶۶ ـ ۷/۴۵۱ $\log cfu/ml$ در انتهای ۳۰ روز انبار مانی در $18^{o}c$ـ رسید. از طرفی، مشاهده شد که با افزایش سطح اینولین تا ۵ درصد، در طول ۳۰ روز انبار مانی در $18^{o}c$ـ بقاء بالاتر باکتری‌های آزاد لاکتو با سیلوس کازئی در حضور پری بیوتیک اینولین، آشکار گردید. که این خود، نشان دهنده اثر پری بیوتیکی اینولین بر روی باکتری‌های پروبیوتیک و بقاء آنها در طول دوره انبار مانی می‌باشد.

درمورد زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در ماست بستنی وقتی به شکل آزاد تلقیح شدند، در عدم حضور اینولین، کاهش تا روز سی‌ام صورت گرفت که شیب منحنی تا روز بیست و پنجم بیشتر بوده و کاهش بیشتری را نشان می‌دهد، از آن پس تا روز سی‌ام ملایم‌تر شده و انتظار می‌رود که بعد از آن به حد ثابتی برسد ولی در هنگامی که اینولین در سطح ۵ درصد تلقیحی، موجود باشد، نشان داده شد که این شیب کاهشی نسبت به زمانی که میزان اینولین ،صفر و ۲/۵ درصد بود، ملایم‌تر بوده و از روز بیستم تقریباً به ثبات رسید. در مورد نمونه‌های حاوی باکتری پروبیوتیکی در حالت کپسوله حاوی ۵ درصد اینولین ، روند کاهشی خیلی ملایم‌تری نسبت به نمونه‌های حاوی دو سطح دیگر اینولین (۰ و ۲/۵ درصد)را نشان داد که بعد از ۳۰ روز، به یک ثبات رسید. در مورد نمونه های حاوی باکتری در شکل آزاد ، در روز های مختلف انبار مانی (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰) کاهش به گونه ای معنی دار صورت گرفت($p<۰/۰۵$) در مورد نمونه های حاوی باکتری به شکل کپسوله ، بین روز های صفر ، یکم ، دهم، اختلاف معنی داری در تعداد باکتری های با قابلیت زیستی وجود نداشت.($p<۰/۰۵$) ولی از آن به بین روز های بیستم و سی ام ، این کاهش معنی دار بود. ($p<۰/۰۵$)

در مورد افزودن اینولین به نمونه های حاوی باکتری آزاد و ریزپوشانی شده بین سطوح اینولین ۲/۵و ۵ درصد در هر دو مورد، اختلاف معنی دار نبوده($p>۰/۰۵$) ولی با نمونه های فاقد اینولین، اختلاف معنی داری به چشم خورد. ($p<۰/۰۵$)

در پژوهش آکالین و همکاران [۶] (۲۰۰۸)، اثرافزودن الیگوفروکتوز یا اینولین بر خصوصیات رئولوژیکی و بقاء *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5* و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس Bb-12* در بستنی کم چرب انبارمانی شده و در$18^{o}c$–برای ۹۰ روز بررسی گردید، بیشترین تعداد *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* در طول ۹۰ روز انبارمانی، در بستنی حاوی الیگوفروکتوز بدست آمد که بالاتر از حداقل پیشنهادی($10^{۶}$ cfu/g) بود[۱۱]. کمترین شمارش باکتریایی *بیفیدوباکتریوم انیمایس* در فرآورده حاوی اینولین در روزهای انبارمانی بدست آمد که دلیل آن می‌تواند افزایش حجم[۷] بیشترفرآورده باشد، زیرا گونه‌های بیفیدو، غیرهوازی بوده ونسبت به اسیدوفیلوس به اکسیژن حساس‌تر می‌باشند[۱۲].

تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس، هنگامی که سطح اینولین زیاد شد، افزایش پیدا کرد. که به دلیل اثرات پری‌بیوتیکی اینولین می‌باشد؛ اینولین به میزان ۲ درصد و pH=۵/۹، بهترین اثر پری‌بیوتیکی را نتیجه داد[۱۲].

تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس به سرعت در نمونه‌های شاهد کاهش یافت و در پایان ۱۰ روز دوره انبارمانی، تعداد سلولهای زنده$10^{۵}$ cfu/g بود.این کاهش در نمونه‌های غنی شده با اینولین کم‌تر از نمونه‌های شاهد بود و تعداد سلولهای باکتریایی پروبیوتیک در پایان ۹۰ روز دوره انبارمانی $10^{۶}$cfu/g بود[۱۳].

حکمت و مک ماهون[۸] (۱۹۹۲) دریافتند؛ زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در یک مخلوط بستنی، ۲ سیکل لگاریتمی، بعد از انبارمانی برای ۱۷ هفته در$29^{o}c$ – کاهش یافت[۱۴].

6. Akalin et. al
7. Over run
8. Hekmat, Mc Mahon

هاینز و پلانگ[9] (۲۰۰۲) دریافتند در نمونه بستنی کم چرب، بیفیدوباکتریوم لاکتیس (BLC-1) بهتر از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس Lafti L10 و لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیر گونه پاراکازائی LCS-1 در ۵۲ هفته در ۲۵°c- بقاء یافت [۱۵].

نتایج کار همایونی و همکاران (۲۰۰۷)، بیان کرد که در مورد لاکتوباسیلوس کازئی در حالت آزاد، تعداد سلولها طی ۸۰ روز نگهداری در۲۰°c بسیار کاهش یافت (حدود ۳/۴Log). شمار بیفیدوباکتریوم لاکتیس کاهش متوسط ۲/۹log را برای حالت آزاد پس از ۱۸۰ روز نشان داد. حالت کپسول دار همین نژادها به ترتیب ۱/۴و ۰/۷ سیکل لگاریتمی کاهش را نشان داد. کاهش لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس، اختلاف معنی‌داری ($P<$۰/۰۵) بین حالت آزاد و کپسول‌دار را در بستنی سین بیوتیک در پایان ۱۸۰ روز نگهداری به صورت منجمد نشان داد[۲].

شاه و راویولا (۲۰۰۰)[10] بیان کردند که فاکتور اصلی تأثیرگذار بر بقاء باکتری‌های پروبیوتیک افزایش محتوای اسیدی ماست پس از تخمیر و طی نگهداری می‌باشد که بیش از حد اسیدی شدن، یا «اسیدی شدن پس از تولید» نام دارد[۱۶].

بسیاری از محققان بیان کردند که وقتی که باکتری های کپسوله شده پروبیوتیکی در معرض شرایط نامطلوب محیطی قرار می‌گیرند، افزایش معنی‌داری در بقاء آنها نسبت به حالت به دام نیفتاده مشاهده می‌شود [۱۳].

در تحقیقی که کایلاساپیسی[11](۲۰۰۵) بر روی ماست انجام داد، یک افزایش بقاء در حدود ۲ و ۱ سیکل لگاریتمی در تعداد سلولهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس را به ترتیب نشان داد که به علت محافظت سلولها توسط میکروانکپسولاسیون بود. نتایج این تحقیق نشان داد که کاهش‌های معنی‌داری در تعداد سلولهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس DD910 و بیفیدوباکتریوم لاکتیس DD920 در یک دوره ۷ هفته‌ای وجود دارد. تقریباً ۴ و ۳ سیکل لگاریتمی کاهش در تعداد سلولهای آزاد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم به ترتیب وجود داشت. باکتریهای کپسوله فقط ۲سیکل لگاریتمی کاهش در تعداد سلولها را نشان داد. زنده‌مانی پائین در ماست به طور عمده به pH پائین‌تر ماست نسبت داده شد و کاهش بیشتر pH در ماست در طول اسیدسازی [۱].

طبق تحقیقی که پیکوت و لاکروکس[12] (۲۰۰۳) انجام دادند، بیفیدوباکتریوم بروی و بیفیدوباکتریوم لانگوم به صورت خشک شده انجمادی یا کشتهای تازه در میکروکپسول های غیرقابل حل در آب که توسط روش امولسیون و یا اینکه از طریق خشک کردن پاششی تهیه و ریزپوشانی شدند. با استفاده از چربی شیر و یا پروتئینهای آب پنیر دناتوره شده، به عنوان مواد غیرمتحرک کننده. توزیع سلولهای تازه در پروتئین سرم شیر دناتوره شده حرارتی که به دنبال آن اسپری – درائینگ صورت گرفت، روشی با حداقل تخریب می‌باشد. بقاء بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در طول تخمیر و انبارمانی ماست توسط انکپسولاسیون با یک کاهش زیست پذیری محدود تا ۲/۵ سیکل لگاریتمی در مقایسه با ۵/۱ سیکل لگاریتمی در مورد سلولهای آزاد بعد از ۴ هفته در ۴°c ، افزایش یافت[۱۷].

کاهش سریع در شمار بیفیدوباکتریوم لاکتیس در طول تخمیر ماست و انبارمانی یخچالی به دنبال آن، ممکن است به یک حساسیت توسعه یافته سلولهای خشک شده پاششی به pH پائین و به هیدروژن پراکسید و اسیدهای آلی تولید شده توسط باکتریهای ماستی نسبت داده شود[۱۶].در تحقیقی که جیباسی[13]وهمکاران(۲۰۰۹)بر روی ریزکپسول‌دار کردن لاکتوباسیلوس پلانتاروم در زمینه آلژینات که با پروتئینهای آب پنیر پوشش یافت، سلولهای تهیه شده به روش انجماد خشک به محلول آلژینات سدیم ۲ درصد تلقیح شد. این سوسپانسیون از طریق سرنگ استریل در ۱۰۰ml از کلرید کلسیم ۰/۱M چکانده شد که باعث سخت شدن قطره‌ها به اشکال کروی گردید. سپس دانک‌های تشکیل شده، جداسازی شد و از طریق سرنگ به محلول پروتئینهای آب پنیر با غلظت ۲ درصد اضافه شدند. (از روش اکستروژن برای کپسوله کردن و پوشش‌دهی استفاده شد) نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p<$ ۰/۰۵) بین بقاء سلول در دانک‌های پوشش‌دار و فاقد پوشش برای تمام نژادها مشاهده شد. و نیز نشان داد که

9. Haynes, Plagne
10. Shah & Ravula
11. Kailasa pathy
12. Picot & lacroix
13. Gbassi et al.

پوشش‌دار کردن با آب پنیر به میزان زیادی بقاء باکتری‌ها در مهره‌های آلژینات را بهبود بخشید [۱۸].

در تحقیقی که دوهرتی و همکاران[14] (۲۰۰۹) انجام دادند و ساکن‌سازی لاکتوباسیلوس رامنوسوس را در سه محصول پروتئینی جداگانه بررسی کردند که شامل WPI [15] (ایزوله پروتئین سرم شیر) به صورت طبیعی، دناتوره شده و هیدرولیز شده بود. آنها دریافتند که ساکن‌سازی سلول در WPI دناتوره شده و هیدرولیز شده، بقاء را که در حدود ۰/۱ ± ۶/۱ و ۰/۱ ± ۵/۸ سیکل لگاریتمی بود که به مدت ۱۴ روز در ^{o}c ۳۷ انبارمانی شده و در هر دو تیمار حفاظت دمایی را در ^{o}c ۵۷ ایجاد کردند، بهبود بخشید log *cfu/ml* ۰/۱ ± ۷/۳ و ۰/۱ ± ۶/۵). پروتئین سرم شیرها، خصوصیات فیزیکوشیمیایی خوبی را دارا هستند حاوی توانایی تشکیل ژل که می‌تواند توسط حرارت دادن محلول پروتئین، همراه سرد کردن به دنبال آن و اسیدی کردن صورت گیرد. (هولت[16] ۲۰۰۰) [۱۹].

رفتار تجمعی پروتئین سرم شیرهای دناتوره شده در نقطه ایزوالکتریک ممکن است دلیل اثر حفاظتی نشان داده شده بر روی پروبیوتیک بوسیله WPI دناتوره شده، توسط مهیاسازی یک نیروی رانش بیشتر برای به دام‌اندازی سلولها در مقایسه با آنچه که توسط تیمارهای نوع طبیعی و هیدرولیز بیان شد، باشد. [۱۸] مقاومت توسعه یافته رامنوسوس GG در طول سیستم‌های هیدرولیز شده و تیمار شده حرارتی، به طور احتمالی به خاطر ظرفیت بافری محیط پیرامون میکروبی می‌باشد، زیرا این می‌تواند فاکتور کلیدی مسئول برای محافظت سلولی توسط پروتئینهای لبنی باشد[۱۷و۱۹].

۴- نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، می‌توان گفت که ماست بستنی می‌تواند به عنوان یک حامل، برای انتقال میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی به بدن انسان در نظر گرفته شود. از آنجائیکه در تولید ماست بستنی از باکتریهای سنتی ماست استفاده شده که دارای اثرات سلامت بخشی هستند و نیز استفاده از ترکیب پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی و ترکیب پری‌بیوتیکی اینولین، در ساخت ماست بستنی، می‌توان گفت که یک محصول سین‌بیوتیک تولید شده است که دارای خواص درمانی و سلامت بخش برای مصرف کننده می‌باشد.

همین طور، در این تحقیق مشخص شد که افزودن لاکتوباسیلوس کازئی به شکل کپسوله شده به محصول ماست بستنی، یک عامل موثر در افزایش زنده‌مانی سلول باکتریایی می‌باشد. نیز استفاده از آلژینات –پروتئین سرم شیر تغلیظ شده (WPC) به عنوان یک پوشش دهنده مناسب، دارای کارائی بالایی برای محافظت باکتریهای پروبیوتیکی تحت شرایط تولید و فرآیند و نیز انبارمانی محصول بوده است. ترکیب پری‌بیوتیکی مورد استفاده، اثر معنی‌داری بر روی افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک داشت، نمونه‌هایی که دارای بیشترین سطح اینولین تلقیحی بود، تعداد سلول باکتریایی قابل زیست بیشتری داشت. در طی ۳۰ روز انبارمانی ماست بستنی در شرایط انجماد، بیشترین کاهش تعداد سلول در حین فرآیند انجماد و مدت زمان نگهداری رخ داد، که ۳ سیکل لگاریتمی کاهش برای حالت آزاد باکتری در تمامی نمونه‌ها مشاهده شد.

این در صورتی است که وقتی سلول به صورت ریزپوشانی شده به محصول تلقیح شد، تنها یک سیکل لگاریتمی کاهش در تعداد باکتریهای لاکتوباسیلوس کازئی مشاهده گردید. نیز مشاهده گردید که در این تحقیق، تعداد بالای سلول باکتریایی ابتدایی در محصول می‌تواند مقدار توصیه شده توسط فدراسیون بین‌المللی شیر(cfu/g $۱۰^{۶}$-$۱۰^{۷}$) را فراهم کند.

۵- منابع

[1] Kailasapathy, K.(2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. lwt lebensmittel-wissenschaft und technologie. Food Science and Technology. 39 (10) :1221-1227.

[2]Homayouni,A.(2008).Healthy Characteristics of Functional Foods, Probiotic ,Prebiotic ,Synbiotic.Medical Science and curing university of Tabriz publisher. Tabriz .Iran

[3]Mortazavian, A., Sohrabvand, S. (2006). Probiotics And Probiotic Food Product. (Translation). Eta Publisher.Tehran.Iran: 65-78

[4]Mokarram, R. Mortazavi, S.A., Habibi Najafi M.B., F. Shahidi. (2008). The influence of alginate microencapsulation on

14. Doherty et. al
15. whey protein isolate
16. Holt et al.

survivability of microencapsulated probiotic Lactobacillus acidophilus PTCC 1643 in simulated gastric and intestinal juice. In 18th Nathional congress on food technology (p. 60): 153-168

[5]Lingyun Chen, Muriel subirade. (2006). Alginate- whey protein granular mic rospheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. Biomaterials 27: 4646-4654.

[6]Allan. P- L. Woj tas, truelstrp Hansen, Daulson. A. T. (2008). Micro structural studies of probiotic bacteria- loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and an hydrous fixation. lwt lebensmittel-wissenschaft und technologie. 41: 101-108.

[7]Milani,elnaz. Koocheki, arash. (2010). The effects of date syrup and guar gum on physical, rheological and sensory properties of low fat frozen yoghurt dessert.International Journal of Dairy Technology. 64(1):121-130

[8]Michael, phillip. Kailasapathy,y. Tran, Lai. (2006). Viability of commercial probiotic culture (Lacidophilus, Bifidobacterium sp.,L.casei,L.paracasei and L.rhamnosus)in cheddarcheese.international Journal of Food microbiology 108: 276-280

[9] Kailasapathy,,sahar.Hesari,Javad.Saris,Per and Nahaei,mohammad raza.(2009).Isolation of lactic acid bacteria from Lighvan cheese,a semi-hard cheese made from raw sheep milk in Iran.international journal of dairy technology: 260-264.

[10] Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S. & Razavi, S. H., 2008b. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chemistry, 111: 50-55.

[11] Akalin. A.S and Erisir. D. (2008). Effects of Inulin and oligo fructose on the Rheological characteristics and probiotic culture survival in low- fat probiotic Ice cream. JFS M: food microbiology and safty. M184- M188

[12] Talwalkar A. and Kailasapathy K. 2003a. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. Aust. J. Dairy Technol. 58: 36-39

[13] Akin .M.B. Akin .M. S, kirmaci. Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics-food chemistery 104: 93-99.

[14] Hekmat. S and Mcmahon, D, 1992. Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in ice cream for use as a probiotic food. Journal of dairy science 75: 1415-1422.

[15] Haynes, I. N., & Playne, M. J. (2002). Survival of probiotic cultures in low fat ice cream. Australian Journal of Dairy Technology, 57(1): 10–14.

[16] Shah, N. P., & Ravula, R. R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. Australian Journal of Dairy Technology. 55: 139–144.

[17] Picot,Arnaud, lacroix Christophe. (2004). Encapsulation of bifido bacteria in whey protein- based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. International Dairy journal 14: 505-515.

[18] Gbassi, Gildas komenan., Thierry randamme, said Ennahar, Eric Marchioni (2009). Microencapsulation of lactobacillus plantarum spp in an alginate matrix coated with whey proteins. International journal of food Microbiology. 129: 103-105.

[19]Doherty, P-G., Campos-Montiel.R.G, Lobato-Calleros.C, Pedroza-Islas. R .(2009). Encapsulation of lactobacillus rhamnosus in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions.food research international 42: 292-297.

The influence of adding *Inulin* and Encapsulation on survivability *lactobacillus casei* storage of *synbiotic yoghurt*

Naeemi, H. [1*], Mortazavi, S. A. [2], Milani, E. [3], Koochaki, A. [4]

1.Msc. Student of Food Science and Technology Dep., Islamic Azad University of sabzevar, Iran
2. Research instructor, Iranian Academic Center for Education Culture and Research (ACECR), Mashhad, Iran
3. Assistant Professor Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (IACECR) Mashhad- Iran
4. Associate professor Iranian Department of food science &technology,ferdowsi university , mashhad,Iran
(Received: 89/11/16 Accepted: .91/2/3)

Yog-ice cream (frozen yogurt), is a kind of frozen desserts which has similar features with ice cream in physical and apparent characteristics. In this study, frozen yogurt was produced as a synbiotic product containing both probiotics and prebiotics. *Lactobacillus Casei*(LAFTI-L26)as a probiotic bacteria was added to low fat frozen yogurt in two types;free and encapsulated,and its survivability was evaluated during 30 days storage at -18^{o}c.Prebiotic compound that was used in this study,was Inulin that added to frozen yogurt in different levels(0,2.5 and 5% w/w). The viable cell number of L.casei in the free state in prepared low fat frozen yogurt mixture, was between 9.801-9.779 log cfu/ml at the first day, and after 30 days storage at -18^{o}c,its viable number redused to 7.451-7.866 log cfu/ml. In samples of frozen yogurt containing L.casei that was encapsulated by sodium alginate-whey protein concentration(wpc),the viable cell number of L.casei was 8.150-8.661 log cfu/ml at the first day that reduced to 6.650-7.477 log cfu/ml at the end of 30 days storage at -18^{o}c.Totally ,obtained results showed that encapsulation of *lactobacillus casei* in Alginate-Whey protein capsules, could significantly improve survivability of L.casei.($p<0.05$) that the viable number of this bacteria in frozen yogurt containing encapsulated probiotic,was in the range of investigated levels by the International Dairy Federation(10^6-10^7 cfu/g).

Key words; Alginate -Whey Protein Concentration, Encapsulation, L.Casei, Inulin, Survivability

* Corresponding Author E-Mail address: hajar_naeemi@yahoo.com