



مقاله علمی-پژوهشی

بررسی تولید شیر موکای فراسودمند حاوی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) انکپسوله شده

هانیه نیلفروش زاده^۱، مهشید جهادی^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی،

اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۴

کلمات کلیدی:

پروبیوتیک،

لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG)،

انکپسولاسیون،

شیرموکا

تولید فرآورده های لبنی حاوی باکتری های پروبیوتیک با ویژگی های ارزشمند تغذیه ای امروزه، از موضوعات مهم صنعت غذا می باشد. هدف از این پژوهش بررسی بقای باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) به فرم آزاد و انکپسوله شده در شیر موکا و تاثیر آنها بر ویژگی های شیر طی ۲۱ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد می باشد. برای انکپسولاسیون لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) به روش اکستروژن از سدیم آلزینات، سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر و سدیم آلزینات-اینولین استفاده شد. مواد حامل مورد استفاده جهت انکپسولاسیون، تاثیر معناداری بر راندمان انکپسولاسیون نداشتند و همه ی حامل ها راندمان کپسولاسیون حدود ۹۰ درصد را فراهم کردند. طبق یک الگوی مشابه در طول مدت نگهداری به طور معناداری pH همه نمونه های شیر موکا افزایش یافت، اما تغییرات pH در شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس در فرم آزاد بیشتر بود (۰/۰۵ < p). قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و میزان محتوای فنول کل در شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) انکپسوله شده و آزاد بیشتر از شاهد بود. همچنین میزان زنده مانده ی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) انکپسوله شده به طور معناداری بیشتر از زنده مانده ی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) در فرم آزاد در شیر موکا طی ۲۱ روز نگهداری در دمای ۴ °C بود (۰/۰۵ < p). انکپسولاسیون به طور معناداری مطلوبیت بافت شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) انکپسوله شده را کاهش داد (۰/۰۵ < p) اما بر سایر ویژگی های حسی تاثیر معناداری نداشت.

DOI: 10.22034/FSCT.21.149.1.

مسئول مکاتبات: *

m.jahadi@khuif.ac.ir

۱- مقدمه

شیرهای طعم دار، محصولات آماده مصرف هستند که از شیر تخمیر نشده با محتوای چربی متفاوت، مخلوط با موادی مانند شکر یا شیرین کننده های دیگر، پودر کاکائو، کنسانتره میوه، قهوه، مواد معطر و سایر مواد و افزودنی ها ساخته می شوند. شیرهای طعم دار تمایل مصرف کنندگان برای تنوع و تجربه متفاوت در طعم را برآورده می کنند، زیرا برخی از مصرف کنندگان طعم شیر طبیعی را دوست ندارند، اما از شیر طعم دار استقبال می کنند. علاوه بر این شیر طعم دار می تواند باعث تشویق کودکان به مصرف بیشتر شیر شود [۱]. بر همین اساس شیرهای طعم دار متنوعی در واحدهای صنعتی، تولید می گردد که از این میان می توان به شیر کاکائو، شیر نسکافه، شیر عسل، شیر قهوه، شیر خرما و غیره اشاره نمود. اهمیت افزودن ترکیبات مختلف به شیر زمانی بیش تر می شود که علاوه بر ایجاد رنگ، عطر و طعم خاص در محصول، بتوان با بهره گیری از این افزودنی ها، اثرات فراسودمندی شیر را نیز افزایش داد [۲]. محصولات فراسودمند، محصولاتی هستند که علاوه بر ارزش تغذیه ای دارای اثرات سلامت بخش برای مصرف کننده بوده و می توانند به حفظ وضعیت مطلوب جسمی، روحی و روانی آنها کمک کنند [۳]. هدف از تولید محصولات فراسودمند عمدتاً، استفاده مصرف کننده از میکروارگانیسم ها و ترکیبات مفید به صورت روزانه است. همچنین، صنایع لبنی، استفاده از پروبیوتیک ها را ابزاری برای توسعه محصولات فراسودمند جدید یافته است [۴].

از انواع محصولات فراسودمند، می توان به محصولات حاوی میکروارگانیسم های پروبیوتیک اشاره کرد [۵]. سازمان بهداشت جهانی^۱ پروبیوتیک ها را به عنوان «میکروارگانیسم های زنده ای که وقتی به مقدار کافی مصرف شوند، برای میزبان مفید هستند» تعریف می کند [۶]. دو مزیت رایج پروبیوتیک ها، بهبود عملکرد دستگاه گوارش و تقویت سیستم ایمنی است علاوه بر این، پروبیوتیک ها بر جذب مواد

مغذی، هضم کربوهیدرات ها از طریق تولید آنزیم های گوارشی، کاهش سطح کلسترول از طریق تخریب کلسترول در روده، تولید مواد مغذی حیاتی از جمله ویتامین های مختلف [۷]، خواص ضد سرطان زایی، بهبود متابولیسم لاکتوز تاثیر مثبت دارند [۴]. پیشنهاد شده است که برای ایجاد اثرات سلامت بخش در بدن میزبان، محصولات پروبیوتیک باید حاوی حداقل 10^7 (CFU/ml) سلول زنده پروبیوتیک در زمان مصرف باشند [۶]. لاکتوباسیلوس ها^۲ و بیفیدوباکتری ها^۳ پر مصرف ترین و شناخته شده ترین میکروارگانیسم های پروبیوتیک هستند [۸]. لاکتوباسیلوس رامنوسوس توسط شروود گورباخ^۴ و بری گلدین^۵ از نمونه مدفوع انسان سالم جدا شده است. لاکتوباسیلوس رامنوسوس، گرم مثبت، بی هوازی اختیاری، میله ای شکل و غیر اسپورساز است و قندها را به اسید لاکتیک تبدیل می کنند [۹]. لاکتوباسیلوس رامنوسوس می تواند در روده انسان زنده بماند و اثرات سلامت بخشی داشته باشد. این باکتری مقاوم به صفرا بوده و ضمن عبور از دستگاه گوارش انسان زنده می ماند از سوی دیگر به پاسخ های ایمنی یا التهابی واکنش نشان نمی دهد و به دلیل مقاومت در برابر اسید و صفرا و ظرفیت چسبندگی به لایه اپیتلیال روده در انواع محصولات پروبیوتیک تجاری و صنعتی استفاده می شود [۹]. قابلیت زنده ماندن این باکتری ها در طول فرآوری مواد غذایی و ذخیره سازی بسیار مهم است و پس از مصرف، مقدار کافی از سلول های پروبیوتیک باید در دستگاه گوارش زنده بمانند و به روده میزبان منتقل شود. بنابراین لازم است به طریقی، زنده ماندن پروبیوتیک ها در محصول بهبود یابد. یکی از روش های حفظ پروبیوتیک ها در مقابل شرایط محیطی، انکپسوله کردن آنها است. انکپسولاسیون عبارت است از بسته بندی مواد زیست فعال در داخل یک پوشش. این کپسول ها می توانند محتویات خود را با سرعتی کنترل شده و در شرایط خاص،

4- Sherwood Gorbach
5- Barry Goldwin

1- World Health Organization
2- Lactobacillus
3- Bifidobacterium

۲- مواد و روش ها

۲-۱- آماده سازی سویه ی پروبیوتیک

برای فعال سازی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) (PTTC 1637) از محیط کشت MRS Broth استریل استفاده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C در شرایط بی هوازی اختیاری گرمخانه گذاری شد. سپس زیست توده به دست آمده توسط سانتریفیوژ یخچالدار (Universl 320، آلمان) به مدت ۵ دقیقه جداسازی با آب پیتون $0/1\%$ شستشو و تا زمان تلقیح در دمای 4°C نگهداری شد [۱۳].

۲-۲- انکپسولاسیون باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس

GG

در این مطالعه، فرآیند انکپسولاسیون با استفاده از سدیم آلزینات، سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر و سدیم آلزینات-اینولین به روش اکستروژن انجام شد. ابتدا سدیم آلزینات 2% استریل تهیه شده و به مدت یک شب در یخچال نگهداری شد تا ذرات به خوبی آب جذب کند. سپس 10 میلی لیتر از امولسیون باکتریایی (2×10^{10} CFU/ml) تهیه شده به مخلوط سدیم آلزینات، سدیم آلزینات-اینولین و سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر اضافه شده و سوسپانسیون به دست آمده توسط سرنگ استریل به محلول کلرید کلسیم ($0/1$ مولار) استریل تزریق شد. برای سفت شدن، دانک‌ها به مدت 30 دقیقه در محلول کلسیم کلرید نگه داشته شدند و سپس آبکشی و در خشک کن انجمادی (Dena vacuum industry) ساخت ایران) خشک شدند [۷ و ۱۳].

۲-۳- تهیه ی شیر موکا پروبیوتیک

21 گرم پودر موکا (4 گرم پودر کاپوچینو، 5 گرم پودر هات چاکلت، $4/5$ گرم پودر خامه ای کننده غیر لبنی، 1 گرم پودر قهوه کلاسیک، $0/5$ گرم پودر قهوه گلد، $3/5$ گرم شکر، 2 گرم پودر اینولین، $1/5$ گرم صمغ کاراگینان) به همراه 2 گرم میکروارگانسیم انکپسوله شده و آزاد به 150 میلی لیتر شیر استریل اضافه و به خوبی مخلوط شدند و سپس در دمای 4°C در بطری های شیشه ای نگهداری شدند.

آزاد نمایند. همچنین انکپسولاسیون می‌تواند به میکروارگانسیم‌ها کمک کند تا در محیط‌های نامطلوب، محافظت شده و فراهمی زیستی آنها بهبود یابد و زنده ماندن و پایداری آنها حفظ شود [۱۰].

مصرف کاکائو اثرات سلامت بخشی برای مصرف کننده دارد. کاکائو دارای آنتی اکسیدان‌ها و پلی فنول‌ها از جمله فلاونوئید هایی مانند کاتچین، اپی کاتچین و پروسیانیدین مواد معدنی ضروری، به ویژه آهن، پتاسیم، مس و منیزیم است. در نتیجه شیر کاکائو می‌تواند یک جایگزین مناسب به جای شیر معمولی برای افزودن میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک باشد که با مصرف آن سلامت جوامع به ویژه سلامت کودکان بهبود می‌یابد [۱۱]. قهوه نیز یکی از نوشیدنی‌هایی است که بسیاری از افراد به دلیل عطر و طعم خاص، آن را دوست دارند. قهوه حاوی ترکیبات مفیدی مانند کافئین و اسید کلروژنیک می‌باشد. کافئین به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل می‌کند و می‌تواند باعث بهبود کارکرد سیستم ایمنی مصرف کننده بشود. اخیراً تقاضای زیادی از سوی بازار برای افزایش ارزش عملکردی محصولات حاوی قهوه وجود داشته دارد که یکی از آنها افزودن میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک به آنها است که به طور بالقوه می‌تواند سلامت مصرف‌کننده را بهبود بخشد [۱۲]. از آن جایی که شیر موکا علاوه بر کلسیم حاوی مقادیر زیادی آنتی اکسیدان‌های مفید نیز می‌باشد، افزودن باکتری‌های پروبیوتیک در چنین محصولی به ارتقا سلامت جامعه کمک می‌کند [۱۱-۱۲]. هدف از این پژوهش بررسی امکان تولید شیر موکا پروبیوتیک و ارزیابی زنده ماندن و بقاء باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) انکپسوله شده با استفاده از سه حامل سدیم آلزینات، سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر و سدیم آلزینات-اینولین و باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) به فرم آزاد، خصوصیات شیمیایی و حسی در شیر موکا نگهداری شده در دمای 4°C به مدت 21 روز می‌باشد.

۲-۴- راندمان انکپسولاسیون^۶

راندمان انکپسولاسیون، میزان بقاء میکروارگانیزم‌ها در طی فرایند انکپسولاسیون می‌باشد که مطابق رابطه (۱) محاسبه شد

$$\text{رابطه } \% \text{ راندمان انکپسولاسیون} = \text{NA} / \text{NB} \times 100 \quad (۱)$$

NA تعداد سلول‌های زنده آزاد شده از کپسول و NB تعداد سلول‌های زنده آزاد به کار رفته در فرایند کپسول‌پوشانی [۱۴].

۲-۵- زنده مانی و بقاء باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس

انکپسوله شده و آزاد در طول مدت نگهداری

جهت بررسی بقاء و زنده مانی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده، ۱ میلی لیتر از هر نمونه به ۹ میلی لیتر سدیم سیترات ۲٪ استریل اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه هموژن شد تا امکان آزاد سازی کامل باکتری از کپسول‌ها فراهم شود. سپس رقیق سازی سریالی در سرم فیزیولوژی و شمارش باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس انجام شد [۱۵].

۲-۶- اندازه گیری pH

pH نمونه‌ها به وسیله دستگاه pH متر دیجیتالی (Metrohm No 827، ساخت سوئیس) اندازه گیری شد [۱۶].

۲-۷- قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH^۷

قدرت مهار رادیکال‌های آزاد به روش DPPH انجام شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico UV 2100، چین) خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد از رابطه (۲) محاسبه شد که در آن AS جذب نمونه و AC جذب شاهد می‌باشد [۱۷].

$$\% \text{ مهار رادیکال آزاد} = (\text{Ac} - \text{As}) / (\text{Ac}) \times 100 \quad \text{رابطه (۲)}$$

۲-۸- اندازه گیری ترکیبات فنولی کل (TPC)^۸

در این مطالعه اندازه گیری ترکیبات فنول کل به روش فولین سیوکالتو انجام شد. جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico UV 2100، چین) خوانده

شد. منحنی استاندارد با استفاده از افزایش غلظت اسید گالیک تهیه شد و ترکیبات فنولی به عنوان میلی گرم استاندارد اسید گالیک^۹ (GAE) بر لیتر گزارش شد [۱۶].

۲-۹- ارزیابی حسی

برای این آزمون از ۴۰ نفر ارزیاب عمومی آموزش دیده (۲۰ زن و ۲۰ مرد) استفاده شد و ویژگی‌های حسی محصول از نظر مطلوبیت بافت، مطلوبیت طعم، مطلوبیت بو و پذیرش کلی مورد ارزیابی قرار گرفته شد و امتیاز ۶ برای مطلوبیت زیاد و امتیاز ۱ برای نامطلوب زیاد در نظر گرفته شد [۴].

۲-۱۰- تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش شامل ۵ تیمار (شیر موکا، شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG)، در فرم آزاد و شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG) انکپسوله شده در حامل آلژینات، آلژینات-پروتئین آب پنیر و آلژینات-اینولین بود. تیمارها در فاصله زمانی ۷ روزه به مدت ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفتند. در این پژوهش تجزیه و تحلیل نتایج بر اساس طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمون فاکتوریل صورت گرفت. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵٪ و از طریق نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت.

۳- نتایج و یافته‌ها

۳-۱- راندمان انکپسولاسیون

هدف از انکپسوله کردن، ایجاد یک محیط مناسب برای میکروارگانیزم‌ها جهت زنده ماندن بیشتر طی زمان ذخیره سازی و آزاد شدن در مکان مناسب (برای مثال روده کوچک) می‌باشد [۱۸]. همانطور که اشاره شد، راندمان انکپسولاسیون معمولاً به صورت "تعداد میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک شمارش شده در کپسول‌ها نسبت به تعداد اولیه مورد استفاده" تعریف می‌شود [۱۹]. راندمان انکپسولاسیون باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس (نمودار ۱) انکپسوله شده توسط حامل‌های سدیم آلژینات، سدیم آلژینات-پروتئین آب پنیر و سدیم آلژینات-اینولین اختلاف آماری معناداری

2-Total phenolic compounds
3-Gallic acid

1-Encapsulation efficiency
1- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* انکپسوله شده با سدیم آلژینات-ایزوله پروتئین سویا [۲۰] و باکتری *لاکتوباسیلوس /سیدوفیلوس* انکپسوله شده با سدیم آلژینات-اینولین [۱۳] را نشان دادند که علت آن خواص عملکردی پروتئین ها و پریبیوتیک ها و تاثیر مستقیم آنها بر راندمان انکپسولاسیون می باشد [۷-۱۴].

نداشت ($p > 0.05$). که علت راندمان مناسب در تیمارهای فوق شرایط ملایم روش کپسول پوشانی اکستروژن (دمای اتاق 25°C) می باشد [۱۴]. مطالعات پیشین، راندمان کپسول پوشانی بیشتر از ۸۰٪ برای باکتری *لاکتوباسیلوس /سیدوفیلوس* انکپسوله شده با سدیم آلژینات-پروتئین آب پنیر [۱۴] و باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* انکپسوله شده با سدیم آلژینات-پروتئین نخود [۵] و بیشتر از ۹۰٪ برای

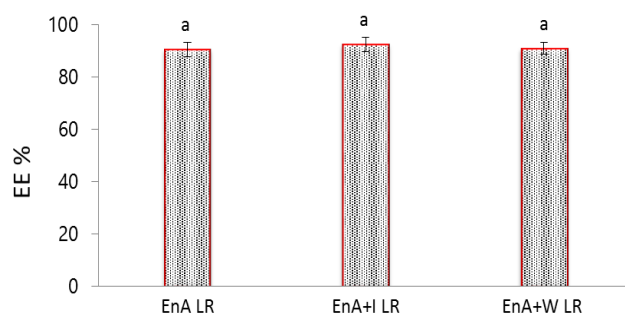


Figure 1. Encapsulation efficiency (%) of *Lactobacillus rhamnosus* GG in sodium alginate (EnA LR), sodium alginate-inulin (EnA and I LR) and alginate-whey protein (EnA and W LR)

Table 1. Assessment of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG (CFU/ml) in mocha milk

Mocha milk (Treatment)	Time (Day)			
	Day1	Day 7	Day14	Day 21
EnA LR	8.17±0.17 ^{aA}	7.94±0.80 ^{aA}	7.91±0.81 ^{aA}	7.13±0.27 ^{aA}
EnA+I LR	8.27±0.17 ^{aA}	8.14±0.90 ^{aA}	7.95±0.85 ^{aA}	7.18±0.44 ^{aA}
EnA+w LR	8.45±0.05 ^{aA}	8.23±0.64 ^{aA}	8.10±0.79 ^{aA}	7.25±0.68 ^{aA}
LR	8.02±0.06 ^{aA}	7.84±0.58 ^{aAB}	6.99±0.44 ^{aBC}	6.01±0.81 ^{bC}

In each column, values with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$), and in each row, the values with different capital letters are significantly different ($p < 0.05$). Mocha milk containing free form of *Lactobacillus rhamnosus* (LR), encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in sodium alginate (EnA LR), sodium alginate-inulin (EnA+I LR) and in sodium alginate-whey protein (EnA+W LR).

باکتری پروبیوتیک زنده باشد تا تأثیر سلامت بخش برای مصرف کننده داشته باشد. با توجه به لزوم زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک در زمان مصرف یک محصول، تأثیر انکپسولاسیون بر زنده ماندن باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* انکپسوله شده (در حامل سدیم آلژینات، سدیم آلژینات-پروتئین آب پنیر و سدیم آلژینات-اینولین) در شیر

۳-میزان زنده ماندن باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*

انکپسوله شده و آزاد در طول مدت نگهداری

ارزش اصلی یک محصول حاوی باکتری پروبیوتیک تعداد سلول های پروبیوتیک زنده در هر میلی لیتر محصول در زمان مصرف است. همانطور که پیش تر ذکر شد، یک محصول پروبیوتیک در زمان مصرف باید حاوی حداقل ۷ (CFU/ml)

پروتئین آب پنیر 10^9 (CFU/ml) [۱۴]، بیفیدوباکتریوم لانگوم انکپسوله شده توسط سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر 10^7 (CFU/ml) [۱۵] و بیفیدوباکتریوم لاکتیس انکپسوله شده با سدیم آلزینات-اینولین در 10^8 (CFU/ml) شیر بز [۲۲] بود.

۳-۳- تغییرات pH

بر اساس نتایج موجود در نمودار ۲ طی مدت زمان نگهداری، pH شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده و آزاد کاهش پیدا می کند، اما کاهش pH در شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده به طور معناداری کمتر از سایر نمونه ها است ($p < 0.05$). علت آن دسترسی بیشتر و آسان تر لاکتوباسیلوس رامنوسوس به مواد مغذی موجود در محیط، فعالیت زیستی بیشتر و در نتیجه تولید و انتشار اسیدهای آلی توسط آنها می باشد. پژوهش های پیشین نیز به بررسی تغییرات pH و اسیدیته شیر طعم دار حاوی باکتری های پروبیوتیک انکپسوله شده و آزاد طی مدت زمان نگهداری پرداختند و نشان دادند کاهش pH و افزایش اسیدیته در شیر کاکائو حاوی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم انیمالیس انکپسوله شده به دلیل فعالیت کمتر میکروارگانیسم های داخل پوشش کپسول ها، کمتر [۱۱] و کاهش pH و افزایش اسیدیته در شیر طعم دار شده با شیر انگور حاوی باکتری باسیلوس کوگولانس به علت دسترسی میکروارگانیسم به شیر انگور به عنوان ماده غذایی مورد نیاز جهت فعالیت و تولید اسید لاکتیک، بیشتر است [۲۳].

موکا مورد مطالعه قرار گرفت. جدول ۱ زنده مانگی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده و آزاد را طی مدت زمان نگهداری نشان می دهد. در روز اول پس از تولید تعداد میکروارگانیسم لاکتوباسیلوس رامنوسوس در همه تیمارهای با یکدیگر اختلاف آماری معناداری نداشت ($p > 0.05$). زنده مانگی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس طی مدت زمان نگهداری روند کاهشی داشت اما میزان کاهش برای لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده در همه حامل های مورد استفاده، به طور معناداری کمتر از فرم آزاد می باشد ($p < 0.05$). بدان معنا که استفاده از سدیم آلزینات، سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر و سدیم آلزینات-اینولین به عنوان حامل انکپسولاسیون باعث حفظ بقاء بیشتر لاکتوباسیلوس رامنوسوس می شود. این موضوع تأثیر حامل کپسول ها بر محافظت از باکتری های پروبیوتیک در حین نگهداری محصول را تایید می کند. به عبارت دیگر انکپسولاسیون یک مانع فیزیکی بین میکروارگانیسم و محیط ایجاد کرده در نتیجه دسترسی به مواد مغذی موجود در محیط برای میکروارگانیسم کمتر شده و رشد و فعالیت کمتری خواهد داشت در واقع میکروارگانیسم انکپسوله شده به زمان بیشتری برای کاهش یک چرخه لگاریتمی در مقایسه با میکروارگانیسم به فرم آزاد نیاز دارد [۱۱]. در این پژوهش زنده مانگی باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده با سدیم آلزینات، سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر و سدیم آلزینات-اینولین در مدت زمان نگهداری ۲۱ روز، بیشتر از 10^7 (CFU/ml) بود. نتایج پژوهش های پیشین در همین راستا حاکی از نقش محافظتی کپسول ها در بقا لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس انکپسوله شده با سدیم آلزینات-

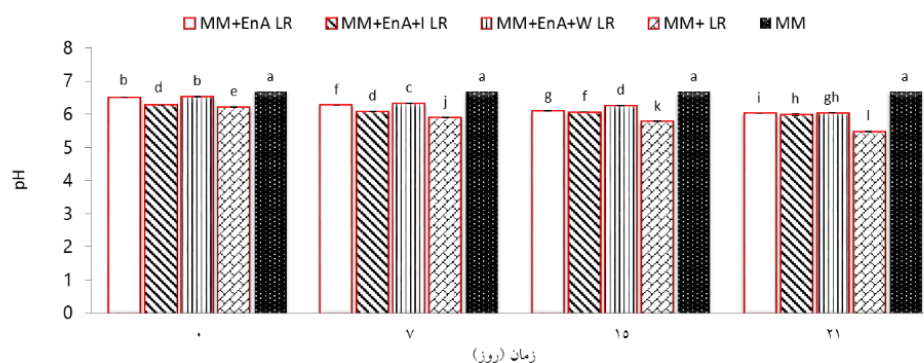


Figure 2. Assessment of the pH of mocha milk containing free and encapsulated forms of *Lactobacillus rhamnosus* GG at 4 °C for 21 d

The means with different letters at the level of 5% of the LSD test are significantly different.

Mocha milk containing free form of *Lactobacillus rhamnosus* (LR), encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in sodium alginate (EnA LR), sodium alginate-inulin (EnA+I LR) and in sodium alginate-whey protein (EnA+W LR).

لاکتوباسیلوس رامنوسوس آزاد به طور معناداری بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی و شیر موکا (شاهد) کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی را دارد ($p < 0.05$) (جدول ۲). علت آن فعالیت متابولیکی بیشتر لاکتوباسیلوس رامنوسوس آزاد نسبت به لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده است. در همین راستا مدهو و همکاران افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی ماست پروبیوتیک حاوی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در طول مدت زمان نگهداری ۲۸ روزه به علت تولید ترکیبات زیست فعال دارای خاصیت آنتی اکسیدانی در طی عمل تخمیر توسط باکتری های اسید لاکتیک بیان کردند [۲۶]. ماریوس و همکاران نیز بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی را در آب میوه حاوی باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی در روز آخر نگهداری گزارش کردند [۲۵]. هرچه باکتری پروبیوتیک خاصیت پروتئولیتیک و رشد بیشتری داشته باشد، محصول تولیدی توسط آن نیز خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری دارد [۲۴]. کپسول یک مانع فیزیکی بین لاکتوباسیلوس رامنوسوس و محیط ایجاد می کند و باعث کاهش فعالیت متابولیکی لاکتوباسیلوس رامنوسوس می شود [۱۱]. همچنین شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده با سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر به طور معناداری افزایش

در شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده با سدیم آلزینات-اینولین، pH به طور معناداری کمتر از شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده با سدیم آلزینات و سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر است ($p < 0.05$). علت آن فعالیت اسیدی اینولین، در هنگام حل شدن در شیرموکا می باشد. که با نتایج حاصل از پژوهش گندمی و همکاران که کاهش pH را پس از افزودن اینولین به آب سیب مشاهده کردند و علت آن را رفتار اسیدی خفیف اینولین پس از حل شدن عنوان کردند، مطابقت دارد [۱۵].

۴-۳- بررسی قدرت مهار رادیکال آزاد

کاکائو و قهوه دارای ترکیبات زیست فعال با خاصیت آنتی اکسیدانی هستند. پودر کاکائو به طور متوسط ۷۵٪ خاصیت آنتی اکسیدانی دارد [۲۴]. باکتری های اسید لاکتیک به دلیل فعالیت های متابولیکی قادر به تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند ترکیبات فنولیک هستند [۲۵]. در این پژوهش اثر زمان نگهداری بر ظرفیت آنتی اکسیدانی شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده و آزاد و شیر موکا (شاهد) معنادار بوده و باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی شده است ($p < 0.05$) (جدول ۲). شیر موکا حاوی

۳-۵- بررسی فنل کل

همانطور که پیش از این گفته شد، باکتری‌های اسید لاکتیک به دلیل فعالیت‌های متابولیکی قادر به تولید ترکیبات فنولیک هستند [۲۵]. این باکتری‌ها برای فعالیت خود نیاز به لاکتوز دارند و چون شیر حاوی لاکتوز است برای فعالیت این باکتری‌ها محیط مناسبی بوده و میزان تولید ترکیبات فنولیک در طی مدت زمان نگهداری بیشتر خواهد شد [۲۷]. بر اساس نتایج موجود در *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* آزاد به دلیل دسترسی بهتر به مواد مغذی محیطی و استفاده از آنها و تولید ترکیبات فنولیک می‌باشد [۱۱]. قهوه و کاکائو حاوی ترکیبات فنولیک زیادی مانند اپی کاتچین و کاتچین هستند و باعث افزایش محتوای فنولیک در نمونه های شیر موکا می‌شوند [۲۴].

بیشتری در ظرفیت آنتی اکسیدانی نسبت به شیر موکا حاوی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* انکپسوله شده با سدیم آلزینات و سدیم آلزینات-اینولین داشت ($p < 0.05$). علت آن علاوه بر تولید ترکیبات زیست فعال دارای خاصیت آنتی اکسیدانی توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، اسیدهای آمینه موجود در پروتئین آب پنیر نیز می‌باشد که باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی می‌شوند. در تایید این موضوع شاید بتوان اظهار داشت که بیشتر بودن ظرفیت آنتی اکسیدانی در نوشیدنی تخمیری حاوی آب پنیر آمینواسیدهایی مانند سیتئین و تیروزین به همراه آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین موجود در پروتئین آب پنیر و پاستوریزاسیون آب پنیر در حین فرآوری می‌باشد [۲۴].

Table 2. Antioxidant capacity (%) and total phenolic content [mg(GAE)/100 ml] in mocha milk containing encapsulated and free forms of *Lactobacillus rhamnosus*

Mocha milk	Antioxidant capacity (%)		Total phenolic content (mg(GAE) /100 ml)	
	Day 1	Day 21	Day 1	Day 21
MM+EnA LR	39.90±4.97 ^b	57.64±3.92 ^{bc}	465.13± 28.85 ^{de}	703.37± 32.84 ^b
MM+EnA+I LR	32.21±4.92 ^c	48.08±8.73 ^{cd}	416.87± 24.25 ^{ef}	580.27± 40.41 ^c
MM+EnA+w LR	41.00±4.84 ^b	60.55±5.69 ^b	471.13± 28.15 ^{de}	737.47± 50.85 ^b
MM+ LR	61.69±3.21 ^a	80.24±3.31 ^a	479.00± 41.62 ^d	925.93± 35.58 ^a
MM	29.54±6.53 ^c	42.23±3.69 ^d	379.97± 47.11 ^f	512.40± 16.38 ^d

The means with different letters at the level of 5% of the LSD test are significantly different. Mocha milk (MM) containing free form of *Lactobacillus rhamnosus* (LR), encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in sodium alginate (EnA LR), sodium alginate-inulin (EnA+I LR) and in sodium alginate-whey protein (EnA+W LR).

Table 3. Sensory evaluation of mocha milk containing encapsulated and free form of *Lactobacillus rhamnosus*

Mocha milk	Odor acceptability	Texture acceptability	Taste acceptability	Over all acceptability
MM+EnA LR	4.97± 0.58 ^a	4.97± 0.72 ^{bc}	5.35± 0.49 ^a	5.03± 0.63 ^a
MM+EnA+I LR	5.09± 0.62 ^a	4.91± 0.73 ^{bc}	5.50± 0.62 ^a	5.06± 0.74 ^a
MM+EnA+w LR	4.91± 0.67 ^a	4.88± 0.81 ^c	5.26± 0.51 ^a	4.91± 0.62 ^a
MM+ LR	5.12± 0.59 ^a	5.26± 0.67 ^{ab}	5.50± 0.51 ^a	5.12± 0.73 ^a
MM	5.12± 0.69 ^a	5.35± 0.69 ^a	5.56± 0.56 ^a	5.09± 0.71 ^a

The means with different letters at the level of 5% of the LSD test are significantly different. Mocha milk (MM) containing free form of *Lactobacillus rhamnosus* (LR), encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in sodium alginate (EnA LR), sodium alginate-inulin (EnA+I LR) and in sodium alginate-whey protein (EnA+W LR).

مصرف باعث ایجاد حالت نامطلوب در بافت محصول می شود به همین دلیل شیرموکا های حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده، مطلوبیت بافت کمتری دارند [۱۱]. در این پژوهش شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده با سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر کمترین امتیاز را از لحاظ مطلوبیت بافت کسب کرد.

۴- نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، استفاده از حامل های سدیم آلزینات، سدیم آلزینات-اینولین و سدیم آلزینات-پروتئین آب پنیر راندمان انکپسولاسیون مناسبی را فراهم می کنند. افزودن لاکتوباسیلوس رامنوسوس منجر به افزایش ارزش غذایی و عملکردی شیر موکا شده و در طی مدت زمان نگهداری ظرفیت آنتی اکسیدانی و محتوای فنل کل در شیر موکا افزایش می یابد. علاوه بر این، روند تغییرات pH در شیرموکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس را می توان با انکپسولاسیون به تعویق انداخت. امکان تولید شیر موکا حاوی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده در صورت نگهداری در دمای یخچال وجود دارد و بقا لاکتوباسیلوس رامنوسوس کپسول پوشانی در شیر موکا تا ۲۱ روز مناسب است. علاوه بر این، با توجه به ویژگی های حسی ارزیابی شده و کسب امتیاز مورد قبول برای پذیرش کلی، با اصلاحات لازم جهت بهبود بافت محصول، شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده، می تواند به بازار عرضه شود.

۵- منابع

- [1] Bisig, W., & Kelly, A. L. (2011). Liquid Milk Products | Liquid Milk Products: Flavored Milks. Module in Food Science, 301-306.
[2] Orleans, K. A. (2011). Microbiological and chemical changes during shelf-life in regular and

جدول ۲ محتوای ترکیبات فنولیک همه ی نمونه ها در طی مدت زمان نگهداری به طور معناداری افزایش پیدا کرده است ($p < 0/05$). ترکیبات فنولیک در شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس آزاد به طور معناداری بیشتر از ترکیبات فنولیک شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس انکپسوله شده و شیر موکا (شاهد) افزایش داشته است ($p < 0/05$). (جدول ۲). که علت آن فعالیت متابولیکی بیشتر در همین راستا مدهو و همکاران به بررسی ترکیبات فنولیک ماست حاوی باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس پلانتروم پرداختند و بیان کردند ترکیبات فنولیک موجود در ماست حاوی باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس پلانتروم بیشتر از نمونه شاهد بود که علت آن فعالیت تخمیری لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس پلانتروم و تولید ترکیبات فنولیک می باشد [۲۶].

۶-۳- بررسی ارزیابی حسی

جدول ۳ ویژگی های ارزیابی حسی تیمارهای مختلف شیر موکا به منظور بررسی مطلوبیت بافت، بو و طعم و پذیرش کلی نشان داده شده است. شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس به فرم انکپسوله شده و آزاد با نمونه شاهد از نظر مطلوبیت بو، طعم و پذیرش کلی اختلاف آماری معناداری نداشت. این موضوع نشان می دهد که افزودن لاکتوباسیلوس رامنوسوس به فرم انکپسوله شده و آزاد تاثیری بر ویژگی های فوق الذکر نداشت ($p < 0/05$). در بررسی مطلوبیت بافت نمونه ها، ابتدا نمونه شاهد بیشترین امتیاز و بعد از آن شیر موکا حاوی لاکتوباسیلوس رامنوسوس آزاد امتیاز بیشتری را کسب نمودند. گفته شده است، اندازه کپسول ها بر ظاهر و بافت محصولات غذایی تاثیر دارند و کپسول های دارای ابعاد بیشتر از یک میلی متر باعث زبر و شنی شدن بافت محصول می شوند [۲۸]. از آنجایی که انکپسولاسیون به روش اکستروژن، ذراتی با ابعاد بزرگ تولید می کند، هنگام chocolate milk (Doctoral dissertation, The Ohio State University).
[3] Saeed Gohari, A., Nateghi, L. (2022). A review on the use of gums in the production of biopolymer-based nanocapsules in the production of ultra-

beneficial dairy products. *Journal of Food Safety and Processing*, 3(2), 151-162.

[4] Taghizadeh, G., Jahadi, M., & Abbasi, H. (2018). Physicochemical properties of probiotic soy milk chocolate mousse during refrigerated storage. *Applied Food Biotechnology*, 5(2), 79-86.

[5] Sobati, M., Kazemini, H., & Khoshbakht, R. (2023). Evaluation of the effect of shiitake mushroom (*lentinula edodes*) water extracts on the survival of the probiotic bacterium *bifidobacterium bifidum* and physico-chemical properties in Feta cheese. *Journal of food science and technology (Iran)*, 20(136), 11-23.

[6] Chan, M. Z. A., & Liu, S. Q. (2022). Coffee brews as food matrices for delivering probiotics: Opportunities, challenges, and potential health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 227-242.

[7] Xu, M., Gagné-Bourque, F., Dumont, M. J., & Jabaji, S. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, 168, 52-59.

[8] Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(2), 344-371.

[9] Armand, M., Ghasemi, M. F., Fazeli, M. R., & Mirpour, M. (2023). Pilot-Plant scale biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103: A comparison between batch and fed-batch fermentation. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, e9718-e9718.

[10] Ta, L. P., Bujna, E., Antal, O., Ladányi, M., Juhász, R., Szécsi, A., & Nguyen, Q. D. (2021). Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1136-1144.

[11] Ghasemnezhad, R., Razavilar, V., Pourjafar, H., Khosravi-Darani, K., & Ala, K. (2017). The viability of free and encapsulated *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in chocolate milk, and evaluation of its pH changes and sensory properties during storage. *Annual Research & Review in Biology*, 1-8.

[12] Jannah, S. R., Rahayu, E. S., Yanti, R., Suroto, D. A., & Wikandari, R. (2022). Study of Viability, Storage Stability, and Shelf Life of Probiotic Instant Coffee *Lactiplantibacillus plantarum* Subsp. *plantarum* Dad-13 in Vacuum and Nonvacuum Packaging at Different Storage Temperatures. *International Journal of Food Science*, 2022.

[13] Jantarathin, S., Borompichaichartkul, C., & Sanguandekul, R. (2017). Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp

feeding. *Materials Today: Proceedings*, 4(5), 6166-6172.

[14] De Araújo Etchepare, M., Nunes, G. L., Nicoloso, B. R., Barin, J. S., Flores, E. M. M., de Oliveira Mello, R., & de Menezes, C. R. (2020). Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. *LWT-Food Science and Technology*, 117, 108601.

[15] Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., and Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 365-371.

[16] Azarpazhooh, E., Rashidi, H., Sharayei, P., Behmadi, H., & Ramaswamy, H. S. (2021). Effect of flaxseed-mucilage and Stevia on physico-chemical, antioxidant and sensorial properties of formulated cocoa milk. *Food Hydrocolloids for Health*, 1, 100017.

[17] Zahrani, A. J. A., & Shori, A. B. (2023). Viability of probiotics and antioxidant activity of soy and almond milk fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT-Food Science and Technology*, 176, 114531.

[18] Darbahaniha, R., Akhavan Sepahi, A., Mehrabiyan, S., & Dehnad, A. (2022). Isolation of *Lactobacillus* spp from cheese and their microencapsulation to increase shelf life. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 12(48), 0-0.

[19] Hugues-Ayala, A. M., Sarabia-Sainz, J. A. I., González-Rios, H., Vázquez-Moreno, L., & Montfort, G. R. C. (2020). Airbrush encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in dry microbeads of alginate coated with regular buttermilk proteins. *LWT- Food Science and Technology*, 117, 108639.

[20] Karimi, M., Tabatabaee Yazdi, F., Mortazavi, S. A., Shahabi-Ghahfarrokhi, I., Chamani, J. (2019). Improvement of GABA production and survival of *Lactobacillus brevis* G42 in simulated gastrointestinal conditions by soy- alginate microcapsulation. *Journal of Food Science & Technology* (2008-8787), 17(105).

[21] Yasmin, I., Saeed, M., Pasha, I., & Zia, M. A. (2019). Development of whey protein concentrate-pectin-alginate based delivery system to improve survival of *B. longum* BL-05 in simulated gastrointestinal conditions. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 413-426.

[22] Pradeep Prasanna, P. H., & Charalampopoulos, D. (2019). Encapsulation in an alginate-goats' milk-inulin matrix improves survival of probiotic *Bifidobacterium* in simulated gastrointestinal conditions and goats' milk yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 132-141.

[23] Kazem Alilou, N., Amiri, S., Rezazadeh Bari, M., and Dodangeh, S. (2021). Investigation of chemical and microbial properties of flavored

probiotic milk using *Bacillus coagulans* and grape syrup. *Journal of food science and technology* (Iran), 18(112), 11-19.

[24] Taheri, S., Khomeiri, M., Moayedi, A., Aalami, M. (2019). Proteolytic activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus paracasei* in drinking dessert containing resistant starch and its effect on antioxidant activity of product: Comparing the fermented and non-fermented type. *Journal of Food Science and Technology* (Iran), 19(128), 225-233.

[25] Marius, F. K. E., Marie, K. P., Blandine, M., Laverdure, T. P., Daquain, F. T. U., and François, Z. N. (2023). Development of a non-dairy probiotic beverage based on sorrel and pineapple juices using

Lactobacillus paracasei 62L. *Journal of Agriculture and Food Research*, 100688.

[26] Madhu, A. N., Amrutha, N., and Prapulla, S. G. (2012). Characterization and antioxidant property of probiotic and synbiotic yogurts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 90-97.

[27] Mohammadi-Yeganeh, Z., Khodaiyan, F., Hosseini, M., Rezai, K., Mousavi, M. (2017). Investigating antioxidant and physicochemical properties of whey-pistachio fermented drink using kefir starter, *New Technologies in Food Industry Journal*, 3(1), 69-84.

[28] Kazemi Goraji, M., Abbasi, H., Roozbeh Nasiraii, L., Milani, E. (2014). Influence of microencapsulation

of indigenous probiotic *Lactobacillus plantarum* on bacterial survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Research*, 1(27), 183-191.



Production of functional mocha milk containing encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG

Hanieh Nilforooshzadeh ¹, Mahshid Jahadi^{2*}

1- MSc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2- Associate professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2023/9/12 Accepted:2024/1/24 Keywords: Probiotics, Encapsulation, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (GG), Mocha milk DOI: 10.22034/FSCT.21.149.1. *Corresponding Author E-Mail: m.jahadi@khuif.ac.ir	Nowadays, production of dairy products containing probiotic bacteria with valuable nutritional characteristics is one of the important interests of food industries. The aim of this study was to investigate survival of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG probiotic bacteria of free and encapsulated forms in mocha milk and their effects on the milk characteristics during 21 days of storage at 4 °C. Sodium alginate, sodium alginate-whey protein and sodium alginate-inulin were used for the encapsulation of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG using extrusion method. Carrier materials used for encapsulation did not include significant effects on the encapsulation efficiency and all the carriers provided encapsulation efficiency of nearly 90%. Based on the similar patterns, pH of all mocha milk samples increased significantly during the storage; however, pH changes were higher in mocha milk containing <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG of free form ($p < 0.05$). Furthermore, DPPH free radical inhibition power and total phenol content in mocha milk containing <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG of encapsulated and free forms were higher than those in the control. Survival rate of encapsulated <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG was significantly higher than that of free <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG in mocha milk during 21 days of storage at 4 °C ($p < 0.05$). Encapsulation significantly decreased texture desirability of mocha milk containing encapsulated <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ($p < 0.05$) with no significant effects on other sensory characteristics.