



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

کاربرد لاکتوباسیلوس رامنوسوس ATCC 7469 ریزپوشانی شده با پروتئین تغلیظ شده شیر در تولید آب پرتقال

فراسودمند و بررسی ویژگی های کیفی آن

فریدون نبی زاده^۱، محمود رضازاد باری^۲، صابر امیری^{۳*}، حسین عبدالهی^۴، سید علیرضا بنی هاشمی^۵

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، موسسه آموز عالی صبا، ارومیه، ایران

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- دانشیار گروه مهندسی پلیمر، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۵- دانشجوی دکتری تخصصی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

فناوری ریزپوشانی روشی نوین برای افزایش مقاومت باکتری ها در برابر عوامل محیطی، شیمیایی و گوارشی است. در این پژوهش از پروتئین کنسانتره شیر به دلیل ویژگی های زیستی و حفاظتی بالا به عنوان ماده دیواره ای استفاده شد. هدف، بررسی تأثیر این ترکیب به همراه آنزیم ترانس گلوتامیناز بر زنده ماندن *Lactobacillus rhamnosus* در محیط اسیدی آب پرتقال بود. چهار نمونه شامل S1 (آب پرتقال خالص)، S2 (پروتئین + باکتری)، S3 (پروتئین + باکتری + آنزیم) و S4 (پروتئین + آنزیم) تهیه شد و طی دوره نگهداری از نظر زنده ماندن باکتری، فعالیت آنتی اکسیدانی، pH، اسیدیته، ویتامین C، قند احیا کننده، ترکیبات فنلی، رنگ، طیف سنجی FTIR و وزن مولکولی بررسی شدند. نتایج نشان داد نمونه S3 با زنده ماندن $10^7 \times 5/5$ CFU/ml، فعالیت آنتی اکسیدانی ۶۸/۵٪ و اسیدیته ۴/۴٪ بهترین عملکرد را داشت و در مقایسه با سایر تیمارها pH برابر ۳/۶ داشت. در مقابل، نمونه S4 کمترین زنده ماندن ($10^7 \times 3/8$ CFU/ml) و کمترین مقدار ویتامین C (۳۲/۳ mg/L) را نشان داد. نمونه S2 دارای بیشترین ترکیبات فنلی (۱۴/۷ mg GAE/ml) و کمترین قند احیا کننده (۱۹/۰۷ mg/ml) بود. در طول نگهداری، ویتامین C، قندهای احیاء و فنول ها کاهش، در حالی که اسیدیته و فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافتند. نمونه های حاوی باکتری، ویتامین C و اسیدیته بیشتری داشتند و نمونه های حاوی آنزیم، قند احیا کننده بیشتری نشان دادند. طیف سنجی FTIR حضور گروه های عاملی کربونیل، متیل و آمین را تأیید کرد. نمونه S2 با کاهش وزن مولکولی و افزایش انحلال پذیری، نشان دهنده تعامل مؤثر باکتری و پروتئین بود.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۰۹

تاریخ داوری: ۱۴۰۴/۰۸/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۰۶

کلمات کلیدی:

میکروانکپسولاسیون،

لاکتوباسیلوس رامنوسوس،

پروتئین کنسانتره

شیر،

زنده ماندن،

آب پرتقال

DOI: 10.48311/fsct.2026.84092.0

* مسئول مکاتبات:

۱-مقدمه

در سال‌های اخیر، آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به ارتباط بین غذا و سلامتی افزایش چشمگیری داشته و محصولات غذایی سلامت‌محور به ویژه غذاهای عملگرا و پروبیوتیک‌ها توجه ویژه‌ای به خود جلب کرده‌اند (۱). پروبیوتیک‌ها عنوان میکروارگانیسم‌های زنده، اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارند، از جمله بهبود فلور میکروبی روده، تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول خون و پیشگیری از بیماری‌ها (۲). با این حال، شرایط نامطلوب محیطی و گوارشی، زنده‌مانی این باکتری‌ها را با چالش مواجه می‌سازد. استفاده از روش‌های نوین مانند ریزپوشانی می‌تواند پایداری و کارایی این میکروارگانیسم‌ها را بهبود بخشد (۳). تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که لاکتوباسیلوس‌ها به دلیل مقاومت به شرایط سخت معده و نمک‌های صفراوی، یکی از مهم‌ترین گونه‌های پروبیوتیک مورد استفاده هستند (۴، ۵). با این حال، پایداری این باکتری‌ها در مواد غذایی، به ویژه در محیط‌های اسیدی مانند آب‌میوه‌ها، پایین است. مطالعات متعددی به بررسی استفاده از مواد مختلف برای ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها پرداخته‌اند که از جمله می‌توان به صمغ‌های گیاهی و هیدروکلوئیدها اشاره کرد (۶). پروتئین‌های کنسانتره شیر به دلیل خواص رئولوژیکی مطلوب و توانایی محافظت از باکتری‌ها، گزینه مناسبی برای ریزپوشانی معرفی شده‌اند (۷). همچنین، آنزیم ترانس‌گلوتامیناز می‌تواند خواص ماتریکس‌های پروتئینی را بهبود بخشد و حفاظت بیشتری را فراهم آورد (۸). نیاز به جایگزینی محصولات لبنی با محصولات غیرلبنی برای گروه‌های حساس مانند گیاه‌خواران، افراد دارای عدم تحمل لاکتوز یا حساس به پروتئین‌های شیر، اهمیت استفاده از ماتریکس‌های جدید برای ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها را افزایش داده است. علاوه بر این، افزایش مصرف آب‌میوه‌ها به عنوان منبع طبیعی ویتامین‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، این محصولات را به حامل‌های بالقوه‌ای برای انتقال پروبیوتیک‌ها تبدیل کرده است. به‌کارگیری فناوری‌های نوین در استخراج رنگدانه‌ها و ترکیبات زیست‌فعال گیاهی، چشم‌انداز تازه‌ای را برای

غنی‌سازی و ارتقای ارزش تغذیه‌ای آب‌میوه‌ها در صنایع غذایی فراهم کرده است (۹). در این راستا، بررسی تأثیر مواد دیواره‌ای مختلف بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در آب‌میوه‌ها می‌تواند گامی موثر در تولید محصولات سلامت‌محور باشد. مطالعات پیشین نیز به بررسی ریزپوشانی گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس در ماتریکس‌های پروتئینی پرداخته‌اند. برای مثال، مالکی و همکاران (۲۰۲۳) در تولید بستنی پروبیوتیک نشان دادند که ریزپوشانی *Lactobacillus rhamnosus* در ماتریکس ترکیبی وی‌پروتئین و سلولز زیستی باعث افزایش چشمگیر زنده‌مانی در طول نگهداری شد (۱۰). افضال و همکاران (۲۰۲۴) نیز گزارش کردند که استفاده از کنسانتره پروتئین شیر به‌عنوان ماده دیواره‌ای در ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها، بازده درون‌پوشانی بالایی (بیش از ۹۰٪) ایجاد می‌کند و پایداری باکتری‌ها را در شرایط اسیدی افزایش می‌دهد (۷). در مطالعه‌ای دیگر، دیکمتاش و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند که به‌کارگیری باکتری‌های پروبیوتیک در آب‌میوه‌های تخمیری با استفاده از ماتریکس‌های پروتئینی و آنزیم‌های پیونددهنده نظیر ترانس‌گلوتامیناز می‌تواند کیفیت حسی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول را بهبود بخشد (۱۱). همچنین، رانداززو و همکاران (۲۰۱۳) بقای *L. rhamnosus* را در مربای هلو بررسی کردند و نشان دادند که ریزپوشانی موجب افزایش چشمگیر زنده‌مانی در طی ذخیره‌سازی می‌شود (۱۲). مجموعه این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیب پروتئین‌های شیری با آنزیم‌های پیونددهنده می‌تواند یک بستر کارآمد برای حفاظت از باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات غیرلبنی مانند آب‌میوه‌ها فراهم کند. اهداف این مطالعه شامل بررسی ریزپوشانی لاکتوباسیلوس رامنوسوس با استفاده از پروتئین کنسانتره شیر و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز برای بهبود زنده‌مانی این باکتری در شرایط محیطی اسیدی آب پرتقال و ارزیابی تأثیر مواد دیواره مختلف بر ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی محصول نهایی است. این پژوهش همچنین تلاش می‌کند تا رویکردی برای افزایش پایداری و کاربرد پروبیوتیک‌ها در فرآورده‌های غیرلبنی ارائه دهد، که

بتواند منجر به توسعه محصولات سلامت‌محور با قابلیت مصرف گسترده‌تر شود.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد، تجهیزات و میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل پودر شیر خشک بدون چربی از شرکت SIGMA-ALDRICH، محیط کشت MRS آگار از شرکت MERCK، توئین ۸۰ (Tween 80) از شرکت Scharlau، بافر پپتون آب (Buffered Peptone Water) از شرکت Micro Media و روغن کانولا تولید شرکت لادن بودند. تجهیزات آزمایشگاهی شامل اتوکلاو (ریحان طب، ایران)، ترازوی دیجیتال مدل FEW (ساخت ژاپن)، همزن الکترومغناطیسی مدل L-81 (Stuart)، سانتریفیوژ (شیمی فن ایران)، دستگاه ورتکس مدل L-81 (LABINCO)، هلند، انکوباتور (SHIMAZ CO)، رفراکتومتر رومیزی مدل WJ2 (چین)، انواع شیشه‌آلات آزمایشگاهی (SIMAX)، سمپلر (DRAGON، آلمان) و pH متر دیجیتال مدل pH 827 (Metrohm، سوئیس) بود که جهت انجام مراحل مختلف آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. سویه باکتری *Lactobacillus rhamnosus* از شرکت فرآورده‌های پردیس رشد مهرگان تهیه و تا زمان مصرف، در شرایط استریل و در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد.

۲-۲-آماده‌سازی، فعال‌سازی و خالص‌سازی باکتری

برای تهیه محیط کشت شیر بدون چربی^۱، ۱۰ گرم پودر شیر خشک بدون چربی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در دستگاه اتوکلاو استریل گردید. پس از خنک شدن محلول تا دمای محیط، باکتری *Lactobacillus rhamnosus* به میزان ۲ درصد وزنی به آن افزوده و به‌خوبی مخلوط شد. مخلوط تهیه‌شده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت تا فعال‌سازی

باکتری انجام شود. پس از پایان دوره انکوباسیون، باکتری فعال‌شده به‌منظور خالص‌سازی در محیط کشت MRS آگار و به روش پورپلیت کشت داده شد. کلونی‌های تشکیل‌شده پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، عاری از هرگونه آلودگی مشاهده شدند و برای مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند (۱۳).

۲-۳-تولید و بررسی بازده ریزپوشینه‌ها

برای تولید ریزپوشینه‌ها، مقدار ۵ گرم کنسانتره پروتئین شیر (MPC) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و محلول حاصل تا دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد گرم شد. پس از استریل‌سازی و خنک‌سازی محلول، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر از محلول MPC افزوده و به‌آرامی با هم مخلوط شد. مخلوط به‌دست‌آمده به‌تدریج به ۲۵۰ میلی‌لیتر روغن کانولا حاوی ۲ درصد توئین ۸۰ اضافه و تحت همزدن یکنواخت امولسیون‌سازی شد. نمونه امولسیون‌شده به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. در مرحله بعد، ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار (در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) به سیستم افزوده گردید. پس از ته‌نشینی، ریزپوشینه‌ها از طریق سانتریفیوژ و شست‌وشو با سرم فیزیولوژیک جداسازی و خالص‌سازی شدند. بازده درون‌پوشانی %EE^۲، از طریق مقایسه تعداد سلول‌های زنده ریزپوشانی‌نشده با تعداد کل سلول‌های زنده پس از فرآیند ریزپوشانی تعیین شد. شمارش سلول‌ها به‌صورت مستقیم از امولسیون انجام گرفت (۷).

۲-۴-اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای تعیین محتوای فنل کل، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه با ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتو و ۰/۴ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷۵٪ مخلوط شد. مخلوط‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس

این فرمول بر اساس احیاء یون‌های مس دو ظرفیتی (Cu^{++}) به یون‌های مس یک ظرفیتی (Cu^{+}) در محلول بود.

۶-۲- اندازه‌گیری ویتامین C

برای اندازه‌گیری ویتامین C، ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه (نمونه شماره ۱۰) را در یک بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد اسید تری‌کلرو استیک به آن اضافه می‌کنیم. بالن را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و ۱۰ میلی‌لیتر از آن را به داخل ارلن تمیز منتقل می‌کنیم. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر استون به آن اضافه می‌کنیم. در ادامه، با استفاده از دی‌کلرو فنول اندوفنول، تیتراژ کردن را انجام می‌دهیم تا زمانی که رنگ قرمز ملایم ظاهر شود.

محاسبه میزان ویتامین C به صورت زیر انجام می‌گیرد:

$$\text{Vitamin C (mg)} = \frac{V_{\text{titrant}} \times C_{\text{titrant}} \times F}{V_{\text{sample}}}$$

۷-۲- بررسی زنده مانی

برای ارزیابی زنده‌مانی و پایداری باکتری *Lactobacillus rhamnosus*، مقایسه‌ای بین نتایج حاصل از زنده‌مانی این باکتری در طول ۳۰ روز نگهداری در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط آب پرتقال انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که باکتری‌های آزاد در طول مدت نگهداری کاهش چشمگیری در شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی (CFU) خود داشته‌اند. در مقابل، نمونه‌های ریزپوشانی‌شده، که تحت پوشش محافظتی قرار داشتند، کاهش کمتری در شمارش باکتری‌ها نشان دادند. این نتایج بیانگر اثر حفاظتی پوشش‌های ریزپوشانی بر زنده‌مانی باکتری در طول مدت نگهداری در دماهای مختلف است.

۸-۲- pH و اسیدیته کل نمونه‌ها

برای اندازه‌گیری pH و اسیدیته کل، مقدار ۵ میلی‌لیتر از نمونه صاف‌شده (و در مورد کنسانتره، نمونه رقیق‌شده و صاف‌شده) با استفاده از پیت به ارلن منتقل شد. مقدار pH با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتال که پیش از استفاده در

جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. مقدار فنل کل بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید و به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در میلی‌لیتر نمونه (mg GAE/ml) بیان شد (۱۴). فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نیز با روش DPPH بر اساس میزان کاهش رادیکال‌های آزاد سنجیده شد. برای این منظور، ۲/۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH مخلوط گردید و پس از ۳۰ دقیقه واکنش در تاریکی، جذب محلول در طول موج ۵۱۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک لوله حاوی DPPH بدون نمونه به عنوان کنترل استفاده شد (۱۵). فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت درصد کاهش جذب DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = 100 \times \frac{A - B}{A}$$

که A جذب کنترل (محلول DPPH بدون نمونه) و B جذب محلول حاوی نمونه است.

۵-۲- اندازه‌گیری قندهای احیاء

برای تعیین میزان قندهای احیاء، ابتدا ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه برداشت شده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس محلول به کمک زغال فعال صاف گردید. به یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری، ۵ میلی‌لیتر از محلول فهلینگ A، ۵ میلی‌لیتر از محلول فهلینگ B و چند قطره شناساگر متیلن بلو افزوده شد. مخلوط حاصل به آرامی روی هیتر حرارت داده شد و برای جلوگیری از جوش ناگهانی، چند دانه پرل شیشه‌ای به آن اضافه گردید. سپس محلول صاف‌شده با استفاده از پیت به آرامی به مخلوط در حال جوش تیتراژ شد تا زمانی که رنگ محلول به نارنجی آجری پایدار تغییر یابد (۱۶). در صورت بازگشت رنگ به آبی پس از افزودن شناساگر، تیتراژ مجدداً تکرار شد.

$$\text{Reducing sugar (\%)} = \frac{\text{Fehling factor} \times \text{Dilution factor (4)} \times 100}{\text{volume of sample filtrate used}}$$

۲-۱۰- اندازه‌گیری وزن مولکولی و قطر ذرات

برای تعیین وزن مولکولی نمونه، محلول پایه‌ای با غلظت ۰/۰۵ گرم بر میلی‌لیتر تهیه و به سه غلظت پایین‌تر شامل ۰/۰۱، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۲۵ گرم بر میلی‌لیتر رقیق شد. شدت پراکندگی نور نمونه‌ها با استفاده از دستگاه Zetasizer Nano اندازه‌گیری شد. با استفاده از داده‌های حاصل و رسم منحنی رایلی، وزن مولکولی نمونه به‌عنوان تابعی از غلظت بر اساس شیب نمودار تخمین زده شد. برای اندازه‌گیری قطر متوسط ذرات (Size Distribution)، از تکنیک پراکندگی نور دینامیکی (DLS) با همان دستگاه استفاده گردید و نتایج بر اساس میانگین عددی و حجمی بیان شدند (۱۸).

۲-۱۱- اندازه‌گیری رنگ

برای ارزیابی ویژگی‌های رنگی نمونه‌ها، از رنگ‌سنج پرتابل Minolta CR-400 (ساخت ژاپن) بر اساس فضای رنگی CIE Lab استفاده شد. پیش از آزمون، دستگاه بر روی صفحه سفید استاندارد با مقادیر مرجع $L^*=84.59$ ، $a^*=1.11$ ، $b^*=3.32$ کالیبره گردید. پس از کالیبراسیون، مقادیر سه‌گانه رنگی شامل روشنایی (L^*)، قرمزی-سبزی (a^*) و زردی-آبی (b^*) برای هر نمونه ثبت شد (۱۹). برای تعیین اختلاف کلی رنگ نمونه نسبت به رنگ مرجع، شاخص ΔE طبق رابطه زیر محاسبه شد:

$$\Delta E = \sqrt{(b^* - b)^2 + (a^* - a)^2 + (L^* - L)^2}$$

همچنین، اندیس سفیدی (WI) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$WI = 100 - \sqrt{(b^*)^2 + (a^*)^2 + (L^* - 100)^2}$$

۲-۱۲- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در قالب سه تکرار مستقل انجام شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و بر اساس طرح آماری فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی (CRD) صورت گرفت. پیش از انجام تحلیل واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. سپس برای

دمای محیط کالیبره شده بود، به‌صورت مستقیم اندازه‌گیری گردید. به‌منظور تعیین اسیدیته کل، نمونه با محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال (NaOH 0.1N) تیترا شد (۱۱). بسته به نوع شناساگر مورد استفاده، نقطه پایانی متفاوت بود: در صورت استفاده از فنل‌فالتین، ایجاد رنگ صورتی پایدار و در صورت استفاده از بلو دو متیلن، تشکیل رنگ آبی پایدار به‌عنوان نقطه پایانی تیترا در نظر گرفته شد.

مقدار اسیدیته کل بر حسب اسید سیتریک با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{Total acidity (g citric acid / 100 mL)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times 0.0064 \times 100}{V_{\text{sample}}}$$

که در آن:

- V_{NaOH} : حجم سدیم هیدروکسید ۰.۱ نرمال مصرف‌شده در تیتراسیون (mL)
- V_{sample} : حجم نمونه تیتراشده (mL) - در این مطالعه برابر ۵ mL
- ۰.۰۰۶۴: معادل گرمی اسید سیتریک خنثی‌شده توسط ۱ میلی‌لیتر 0.1N NaOH
- ۱۰۰: عامل تبدیل مقدار اسید موجود در حجم نمونه به مقدار اسید بر حسب g در ۱۰۰ mL نمونه

۲-۹- آزمون طیف‌سنجی فروسرخ (FTIR)

برای انجام آزمون FTIR، قرص‌های شفاف حاوی نمونه تهیه شدند. بدین منظور، مقدار مشخصی از نمونه خشک با پتاسیم برمید (KBr) خشک و خالص به نسبت وزنی ۱:۲۰ به‌خوبی مخلوط شد. مخلوط حاصل تحت فشار حدود ۶۰ کیلوپاسکال به مدت ۱۰ دقیقه در قالب مخصوص قرص‌سازی فشرده شد. سپس طیف عبور نمونه‌ها در محدوده عدد موج ۴۰۰۰ تا ۴۰۰ سانتی‌متر معکوس، با قدرت تفکیک ۰/۱۵ سانتی‌متر^{-۱} و با استفاده از دستگاه FTIR مدل Spectrum Two (ساخت Perkin Elmer، ایالات متحده) ثبت و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۷).

مقایسه میانگین‌ها، تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) اجرا و در صورت معنی دار بودن اثر تیمارها ($P < 0.05$)، آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه زوجی میانگین‌ها به کار گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- pH و اسیدیته کل نمونه‌ها

مقادیر pH نمونه‌ها بین ۳/۶۱ تا ۴/۰۳ متغیر بود و اختلاف معنی داری بین آن‌ها مشاهده شد ($p \leq 0.05$). همان‌طور که در شکل ۱(a) مشاهده می‌شود، بالاترین مقدار pH مربوط به نمونه S4 (حاوی پروتئین MPC و آنزیم TG بدون باکتری) بود، در حالی که نمونه‌های حاوی *Lactobacillus rhamnosus* (S2 و S3) pH پایین‌تری داشتند. این کاهش به فعالیت متابولیکی باکتری و تولید اسیدهای آلی نسبت داده می‌شود. کاهش pH معمولاً به عنوان شاخصی از پیشرفت واکنش‌های تخریبی یا فعالیت آنزیمی تلقی می‌شود و این موضوع در محصولات گیاهی فرآوری شده نیز گزارش شده است. بررسی میانگین‌ها نشان داد که اختلاف pH بین S3 و S2 تنها ۰/۰۱ واحد و بیشترین اختلاف بین S2 و S1 (معادل ۰/۳۸ واحد) بود. کاهش pH در طول نگهداری نیز مشاهده شد که با نتایج مطالعه شیرپور و همکاران (۱۳۹۵) همخوانی دارد (۲۰). آزمون توکی نیز در شکل ۱(b) اختلاف معنی دار بین برخی نمونه‌ها را تأیید کرد. از آنجا که pH نقشی مهم در پایداری کیفی و میکروبی فرآورده‌ها دارد، کاهش آن می‌تواند شرایط نامطلوبی برای رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها ایجاد کرده و در نتیجه به افزایش پایداری نسبی محصول کمک کند.

اسیدیته نمونه‌ها بین ۳/۹۶٪ تا ۴/۰۳٪ متغیر بود. نمونه S4 (فاقد باکتری) کم‌ترین اسیدیته را نشان داد، در حالی که نمونه‌های دارای باکتری، مقادیر بالاتری داشتند. تفاوت معنی داری بین تیمارها ($p \leq 0.05$) ثبت شد. اختلاف بیشینه بین نمونه‌های S2 و S3 با مقدار ۰/۱٪ و کم‌ترین اختلاف بین S4 و S1 با مقدار ۰/۰۴٪ بود. همان‌طور که در شکل ۱(b) دیده می‌شود، افزایش اسیدیته عمدتاً به فعالیت متابولیکی *L. rhamnosus* و تولید اسیدهای آلی در طول نگهداری مربوط است. از سوی دیگر، ترکیب پروتئین MPC و آنزیم TG نقش مؤثری در حفظ پایداری و کنترل اسیدیته ایفا کرد. افزایش احتمالی اسیدیته می‌تواند ناشی از آزادسازی اسیدهای آلی از بافت گیاهی، تجزیه ترکیبات پکتینی، یا اکسیداسیون ترکیبات فنولی و تبدیل آن‌ها به مشتقات اسیدی باشد. در بسیاری از محصولات گیاهی، واکنش‌های اکسیداسیون و هیدرولیز موجب تولید اسیدهای آلی نظیر سیتریک، مالیک یا اسیدهای فنولیک می‌شود؛ بنابراین مشاهده تغییر اسیدیته کاملاً قابل انتظار است. از سوی دیگر، تغییر در اسیدیته می‌تواند با pH نمونه‌ها نیز همبستگی داشته باشد، زیرا افزایش غلظت گونه‌های اسیدی معمولاً با کاهش pH همراه است. این موضوع از نظر پایداری محصول اهمیت دارد؛ زیرا اسیدیته بالاتر می‌تواند محیط نامساعدتری برای رشد میکروارگانیسم‌های فسادزا ایجاد کند. با این حال، تغییرات شدید اسیدیته ممکن است ویژگی‌های حسی نمونه را تحت تأثیر قرار داده و منجر به کاهش پذیرش مصرف‌کننده شود. نتایج مشابهی توسط مالکی و همکاران (۲۰۲۳) در بستنی پروبیوتیک و راندازو و همکاران (۲۰۱۳) در مربای هلو گزارش شده است که کاهش pH ناشی از تولید اسید لاکتیک توسط *Lactobacillus rhamnosus* دانسته‌اند (۱۰، ۱۲).

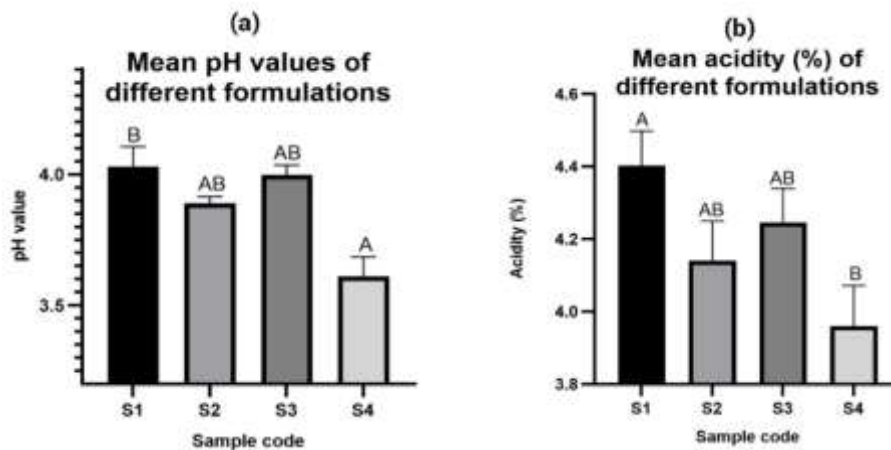


Figure 1. (a) pH and (b) Acidity of the Samples

۳-۲- ویتامین C

دیکمتاش و همکاران (2025) در آبمیوه‌های تخمیری همخوانی دارد؛ هر دو مطالعه نشان دادند که باکتری‌های پروبیوتیک در مراحل اولیه رشد با حفظ ویتامین C سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (۱۱، ۲۱). با این حال، کاهش تدریجی ویتامین C در برخی نمونه‌ها طی زمان مشاهده شد که مشابه گزارش‌ها در محصولات فراسودمند دیگر از جمله بستنی پروبیوتیک است (۱۰)، و ممکن است ناشی از جذب و مصرف آن توسط سلول‌های باکتریایی باشد. این موضوع نشان می‌دهد که حضور پروبیوتیک‌ها در ابتدا به حفظ ویتامین کمک می‌کند، اما در ادامه می‌تواند موجب کاهش آن شود.

۳-۳- قندهای احیاءکننده

بر اساس نتایج شکل ۲(b) و آنالیز واریانس، بین تیمارهای مختلف از نظر میزان قندهای احیاءکننده اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p \leq 0.05$). میانگین این قندها در نمونه‌ها بین ۹/۰۶۷ تا ۱۶/۳۳۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. نمونه S2_3 بیشترین اختلاف میانگین (۳/۲ درصد) و نمونه S1_2 کمترین اختلاف (۰/۷۲ درصد) را نشان دادند. کمترین مقدار قند در نمونه S2 (فاقد آنزیم ترانس‌گلوتامیناز) و بیشترین مقدار در نمونه S4 مشاهده شد. استفاده از آنزیم ترانس‌گلوتامیناز موجب افزایش معنی‌دار قندهای احیاءکننده شد، که می‌تواند به بهبود ویژگی‌های عملکردی محصولات پروبیوتیکی منجر گردد. در مقابل، کاهش تدریجی قندها طی

میزان ویتامین C نمونه‌ها در طی فرایند دستخوش کاهش شد که این موضوع را می‌توان به ماهیت ناپایدار این ویتامین در برابر عوامل محیطی نسبت داد. ویتامین C یک ترکیب بسیار حساس به حرارت، نور، اکسیژن و pH است و به سرعت در اثر اکسیداسیون به دی‌هیدروآسکوربیک اسید و سپس به ترکیبات غیر فعال تبدیل می‌شود. بنابراین کاهش آن در محصولات گیاهی فرآوری شده کاملاً قابل انتظار است. نتایج حاصل از شکل ۲(a) و تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که بین نمونه‌های مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری در میزان ویتامین C وجود دارد ($p \leq 0.05$). مقادیر میانگین ویتامین C در نمونه‌ها در بازه ۳۲/۲۸۰ تا ۴۵/۴۸۰ میلی‌گرم بر لیتر قرار گرفت. بیشترین اختلاف میانگین بین دو نمونه S4 و S1 مشاهده شد (۱.۳۲ درصد)، در حالی که کمترین اختلاف میانگین بین S4 و S3 (۰/۲۲ درصد) به دست آمد. نمونه S4 (فاقد باکتری پروبیوتیک) کمترین مقدار ویتامین C را دارا بود، در حالی که نمونه‌های حاوی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (S1، S2 و S3) به‌طور معنی‌داری مقادیر بالاتری را نشان دادند. این یافته‌ها تأیید می‌کند که حضور باکتری پروبیوتیک به حفظ ویتامین C کمک می‌کند، که احتمالاً به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی این ویتامین و نیاز متابولیکی باکتری در مراحل ابتدایی رشد می‌باشد. این یافته با گزارش سیلالاهی و همکاران (2018) در نوشیدنی ماستی و

را در اثر مصرف متابولیکی توسط لاکتوباسیلوس‌ها گزارش کردند (۷). مدل رگرسیونی با ضریب تعیین بالا ($R^2 = 0.906$) و ($Adjusted R^2 = 0.872$) نیز نشان داد که تغییرات قندهای احیاءکننده به‌خوبی قابل پیش‌بینی است. بنابراین، کنترل هم‌زمان ترکیب آنزیم‌ها و ف

۱۴ روز نگهداری، احتمالاً به‌دلیل مصرف آن‌ها توسط *Lactobacillus rhamnosus* رخ داده است. این یافته با گزارش شیرپور و همکاران (۱۳۹۵) هم‌راستا بود که بیان می‌کند افزایش تراکم باکتری موجب کاهش بیشتر قندهای احیاءکننده می‌شود (۲۰). همچنین نتایج ما مشابه یافته‌های افصال و همکاران (۲۰۲۴) است که کاهش قندهای احیاءکننده عالیت باکتریایی می‌تواند به بهینه‌سازی فرمولاسیون محصولات پروبیوتیکی کمک شایانی کند.

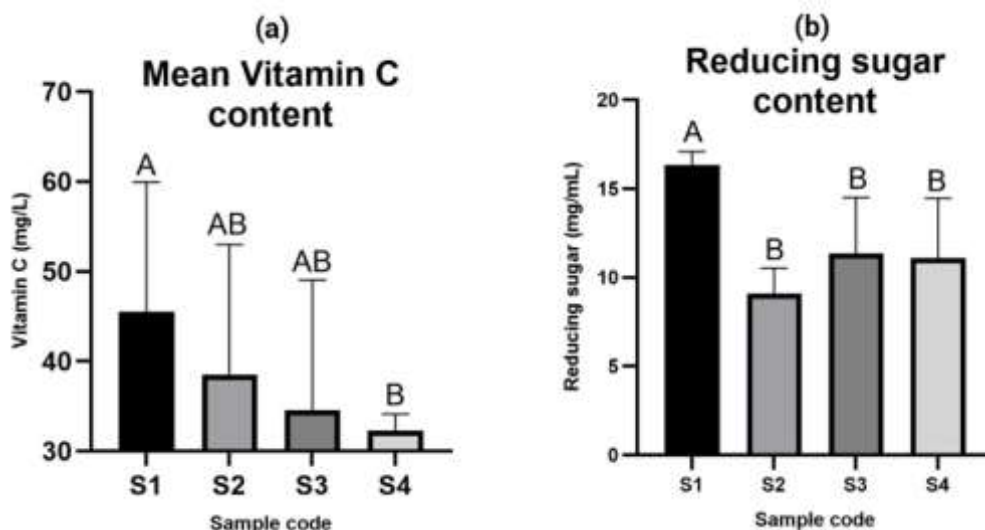


Figure 2. (a) Vitamin C Content and (b) Reducing Sugars Content of the Samples

نمونه‌ی S3 داشت. این افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول زمان کاهش یافت، که مطابق با گزارش‌های پیشین درباره کاهش تدریجی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در محصولات پروبیوتیکی طی دوره نگهداری است (۲۱). همچنین، معادله‌ی پیش‌بینی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با مقادیر R^2 و $adj-R^2$ به ترتیب ۰/۹۷۴ و ۰/۹۶۵ درصد نشان‌دهنده دقت بالای مدل در پیش‌بینی این پاسخ است.

در خصوص فنول کل، مقدار میانگین آن در محدوده ۹/۸۶۷ تا ۱۴/۷۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تغییر یافت. در نمونه فاقد باکتری (S4)، میزان فنول کل کاهش یافت، اما حضور هم‌زمان باکتری و پروتئین کنسانتره شیر موجب افزایش میزان فنول کل شد که در نتیجه باعث بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردید. این افزایش در فنول کل با گذشت زمان کاهش یافت، که پیش‌تر نیز در محصولات مشابه گزارش شده است (۲۲). نتایج مشابهی توسط لائوره و همکاران (۲۰۲۱) در کامبوچا

۳-۴- میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول کل

نتایج آنالیز واریانس برای هر دو فاکتور مهار رادیکال‌های آزاد و میزان فنول کل نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های مورد مطالعه بود ($p \leq 0.05$). طبق شکل‌های ۳ (a) و ۳ (b)، در هر دو پارامتر، اختلاف میانگین بالاتری در بین نمونه‌های S4_S3 مشاهده شد، به‌طوری که میزان اختلاف در این نمونه‌ها به ترتیب برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول کل بیشترین مقدار را نشان داد. در حالی که نمونه S3_S1 کمترین اختلاف را در هر دو پارامتر داشت، اختلاف معنی‌داری در بین سایر نمونه‌ها مشاهده نشد.

در خصوص فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میانگین مقدار آن بین ۳۲/۰۲ تا ۶۸/۵۰ درصد متغیر بود. نتایج نشان داد که اثر هم‌زمان باکتری، آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و پروتئین کنسانتره شیر تأثیر معناداری بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در

میزان فنول کل با مقادیر R^2 و $adj-R^2$ به ترتیب ۰/۸۵۸ و ۰/۸۰۵ درصد نشان‌دهنده دقت بالای مدل در پیش‌بینی میزان فنول کل می‌باشد.

و مالکی و همکاران (۲۰۲۳) در محصولات سنتتیک پروبیوتیکی گزارش شد، که حضور پروبیوتیک‌ها موجب افزایش ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد در ابتدای نگهداری و کاهش تدریجی آن در طول زمان می‌شود (۱۰، ۲۲). معادله‌ی

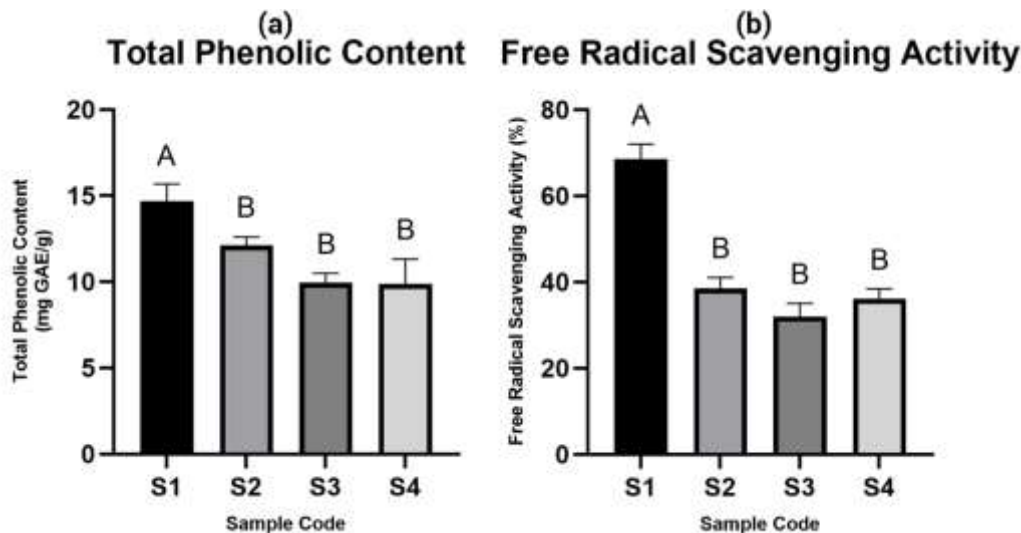


Figure 3. (a) Total Phenolic Content (TPC) and (b) Free Radical Scavenging Activity (FRSA) of the samples (S1–S4).

ترکیبات اکسیداتیو نیز می‌تواند شرایط دشوارتری برای باکتری‌ها ایجاد کند. با توجه به نتایج آنالیز واریانس، اختلاف معنی‌داری در میزان زنده‌مانی بین نمونه‌های مختلف مشاهده شد ($p \leq 0.05$). نتایج نشان داد که اختلاف میانگین بین نمونه‌ی S2_S3 بیشتر از سایر نمونه‌ها بود، به‌طوری که این اختلاف معادل ۰/۲ درصد بود. همچنین، نمونه S4_S3 کمترین اختلاف میانگین را داشت (۰/۱۶ درصد) و هیچ اختلاف معنی‌داری بین سایر نمونه‌ها مشاهده نشد. میانگین زنده‌مانی نمونه‌ها در محدوده بین ۳/۸۶۷ تا ۵/۵۰۰ درصد به‌دست آمد. بیشترین میزان زنده‌مانی در نمونه S3 مشاهده شد، در حالی که نمونه S4 کمترین میزان زنده‌مانی را در مقایسه با سایر نمونه‌ها داشت. این یافته با گزارش‌های مشابه درباره بهبود بقا در محصولات لبنی ریزپوشانی‌شده همخوانی دارد (۱۰، ۲۳). همچنین نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه مشابه نتایج تحقیق راندازو و همکاران (۲۰۱۳) است که به بررسی بقای باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در مربای هلو در طول دوره ذخیره‌سازی پرداختند (۱۲).

۳-۵- زنده‌مانی

مطابق نتایج به‌دست‌آمده، میزان زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌ها طی فرایند تغییراتی نشان داد که این تغییرات را می‌توان به عوامل فیزیکی و شیمیایی محیط از جمله pH، اسیدیته، دسترسی به مواد مغذی و حضور ترکیبات آنتی‌میکروبیال طبیعی مرتبط دانست. کاهش زنده‌مانی مشاهده‌شده در برخی نمونه‌ها احتمالاً ناشی از افزایش اسیدیته و کاهش pH است که می‌تواند فشار تنشی قابل توجهی بر باکتری‌ها وارد کند و ساختار غشای سلولی و فعالیت آنزیمی آن‌ها را مختل نماید. از سوی دیگر، وجود ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌ها می‌تواند بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها اثر داشته باشد. بسیاری از ترکیبات فنولی دارای فعالیت آنتی‌میکروبیال هستند و توانایی اختلال در غشای سلولی و تغییر نفوذپذیری آن را دارند. بنابراین، تغییرات در فنول کل یا فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند بخشی از تغییرات زنده‌مانی را توضیح دهد. برخی مطالعات نشان داده‌اند که کاهش ویتامین C و افزایش

cm^{-1} به گروه کربونیل ($\text{C}=\text{O}$) اختصاص داشت. گروه‌های دارای پیوند دوگانه کربن-کربن ($\text{C}=\text{C}$) نیز در $1655/00$ ، $1538/21$ ، $1538/03$ ، $2076/87$ و $1430/71$ شناسایی شدند. همچنین، گروه‌های اتر ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) در $1109/53$ ، $1109/00$ و $1057/61$ و گروه آمین (NH_2) در طول موج $3357/67$ مشاهده شدند. این یافته‌ها تأیید می‌کنند که ماتریس پروتئینی و باکتریایی مورد استفاده حاوی گروه‌های عاملی متنوع بوده و وجود تعاملات شیمیایی میان مولکولی در ساختار نمونه‌ها را نشان می‌دهد (۱۷).

نتایج طیف‌سنجی FTIR حضور گروه‌های عاملی متعددی را در ساختار نمونه‌ها نشان داد. باندهای جذبی مربوط به پیوندهای آمیدی (N-H) در ناحیه حدود 3300 cm^{-1} و همچنین باند آمید I در محدوده $1650\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ مشاهده شد که بیانگر ساختار پروتئینی نمونه‌هاست (۲۴). ارتعاشات کششی H-C در $2909/91$ تا $2931/99$ ، و گروه‌های متیل (CH_3) در $2870/95$ و $2875/00$ شناسایی شد. همچنین، پیک‌های مشاهده‌شده در ناحیه‌های $1653/87$ ، $1658/36$ و $1648/72$

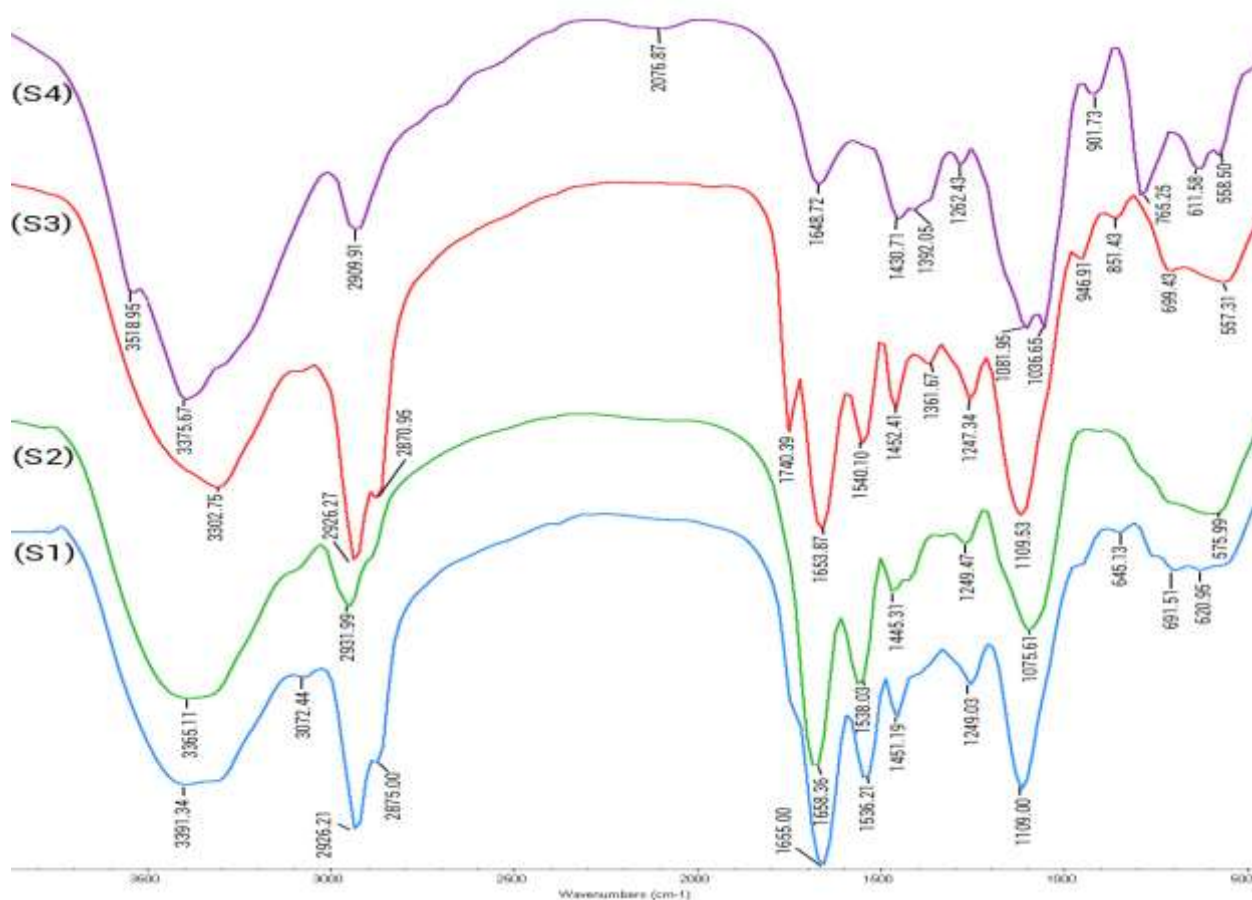


Figure 5. FTIR spectra of four different formulations overlaid for comparison. The blue spectrum (S1) represents *Lactobacillus rhamnosus* with milk protein concentrate and transglutaminase enzyme. The green spectrum (S2) shows the milk protein concentrate alone. The red spectrum (S3) corresponds to *Lactobacillus rhamnosus* combined with milk protein concentrate, while the purple spectrum (S4) corresponds to the transglutaminase enzyme. Differences in spectral bands reflect molecular interactions and structural modifications among the formulations.

بررسی نتایج حاصل از شکل‌های ۶(a) و ۶(b) نشان داد که قطر ذرات در محدوده فرکانس ۸۰٪ کمی بیش از ۱۰۰ نانومتر بود. اندازه کوچک ذرات می‌تواند نقش مؤثری در

۳-۷- اندازه ذرات و وزن مولکولی

فرمولاسیون‌ها منجر به تشکیل ریزپوشانه‌های کوچک‌تر و شکننده‌تر گردید. مطابق با گزارش مانگا و همکاران (2023)، کاهش وزن مولکولی می‌تواند به بهبود پخش‌پذیری و افزایش انحلال‌پذیری پروتئین‌های شیری منجر شود، که با نتایج این پژوهش همخوان است (۲۶). به‌طور کلی، یافته‌ها تأکید می‌کنند که اندازه ذرات و وزن مولکولی پارامترهای تعیین‌کننده‌ای در کیفیت، پایداری، انحلال‌پذیری و عملکرد محصولات پروبیوتیکی و امولسیونی هستند. انتخاب دقیق اجزا و شرایط فرمولاسیون می‌تواند به بهینه‌سازی این ویژگی‌ها کمک کرده و ارزش تغذیه‌ای و عملکردی محصول را ارتقا بخشد.

افزایش پایداری امولسیون نسبت به ته‌نشینی یا خامه‌ای شدن ایفا کند (۲۵). وزن مولکولی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه DLS در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب برابر با $10^4 \times 4/286$ و $10^4 \times 4/787$ کیلو دالتون به‌دست آمد. وزن مولکولی بالا معمولاً با تشکیل لایه‌ای ضخیم‌تر در اطراف ذرات همراه است که به پایداری ساختاری و مقاومت حرارتی بیشتر کمک می‌کند (۲۶). از سوی دیگر، کاهش وزن مولکولی می‌تواند باعث افزایش انحلال‌پذیری شود که در برخی کاربردها مزیت محسوب می‌شود (۲۷). میانگین- Z (average) به‌عنوان شاخص هیدرودینامیکی اندازه ذرات، برای نمونه‌ها به‌ترتیب $324/1$ و $7175/2$ نانومتر بود. این شاخص فقط برای ذرات پراکنده یا مولکول‌های محلول قابل تفسیر است. افزایش بیش از حد پروتئین ایزوله وی در برخی

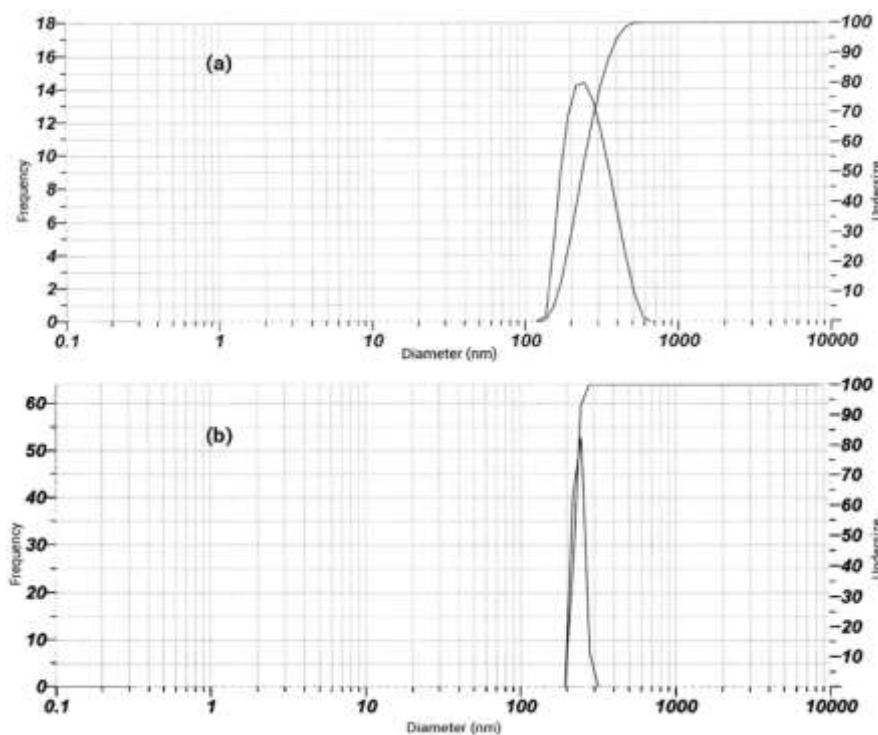


Figure 6. (a) Particle Size of *Lactobacillus rhamnosus* and Milk Protein Concentrate, (b) Particle Size of *Lactobacillus rhamnosus*, Milk Protein Concentrate, and Transglutaminase Enzyme

۳-۸- رنگ‌سنجی

(روشنایی)، a (قرمزی-سبزی) و b (زردی-آبی) بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری داشتند. مقدار روشنایی (L) در نمونه‌ها بین $57/8$ تا $73/5$ متغیر بود. نمونه S2 (حاوی باکتری و پروتئین کنسانتره شیر) کمترین مقدار روشنایی ($57/8$) را نشان داد، در حالی که نمونه S1 (شاهد)

تغییرات شاخص‌های رنگی نمونه‌ها در طی فرایند می‌تواند بیانگر تحول ساختار مولکولی رنگدانه‌ها و وقوع واکنش‌های اکسیداسیونی در ماتریس محصول باشد. نتایج رنگ‌سنجی نمونه‌ها (جدول 1) نشان داد که پارامترهای رنگی L

و S4 داشت که ممکن است به تولید ترکیبات زرد رنگ ناشی از فعالیت آنزیم یا متابولیسم باکتری‌ها مرتبط باشد (۳۱). در مجموع، داده‌ها نشان می‌دهند که حضور لاکتوباسیلوس رامنوسوس و آنزیم ترانس گلوتامیناز بر ویژگی‌های رنگی نمونه‌ها اثرگذار بوده‌اند. کاهش روشنایی و تغییر در شاخص‌های رنگی a و b احتمالاً ناشی از واکنش‌های شیمیایی و فیزیکی در ساختار ماتریکس است. تغییرات مشابه در پارامترهای رنگی توسط عباباف و همکاران (2020) در ماست سویا و ماسیا و همکاران (2021) در مواد گیاهی تخمیری گزارش شده است که حضور لاکتوباسیلوس‌ها و آنزیم ترانس گلوتامیناز موجب کاهش روشنایی و افزایش زردی در محصولات تخمیری می‌شود (۲۸، ۳۱).

با مقدار ۷۳/۵ بیشترین میزان را داشت. کاهش روشنایی در S2 احتمالاً ناشی از فعالیت متابولیکی لاکتوباسیلوس رامنوسوس و تأثیر آن بر ترکیبات ماتریکس بوده است (۲۸). همچنین، کاهش شفافیت نمونه‌ها در طول زمان مشاهده شد که می‌تواند به تغییرات ساختاری، تجمع ذرات یا تعاملات بین مولکولی مرتبط (۲۹). در بررسی فاکتور a (قرمز تا سبز)، مقادیر بین ۱/۷ تا -۸/۷ قرار داشت. بیشترین مقدار مربوط به S2 (۱/۷) و کمترین مربوط به S1 (-۸/۷) بود. این تغییرات می‌تواند تحت تأثیر واکنش‌های آنزیمی یا متابولیسم باکتری‌ها باشد (۳۰). مقدار b (زردی) نیز بین ۱۱/۳ تا ۱۵/۴ متغیر بود. بیشترین مقدار در نمونه S1 (۱۵/۴) و کمترین در S2 (۱۱/۳) ثبت شد. نمونه S3 که حاوی هر سه ترکیب (باکتری، پروتئین و آنزیم ترانس گلوتامیناز) بود، مقدار b بالاتری نسبت به S2

Table 1. Color Measurement of the Samples

Sample	b* (Yellow to Blue)	a* (Red to Green)	L* (Lightness)
S1	15.4 ^x ± 0.6	-8.7 ^y ± 0.3	73.5 ^x ± 0.8
S2	11.3 ^z ± 0.7	1.7 ^x ± 0.4	57.8 ^z ± 1.0
S3	14.5 ^x ± 0.8	0.9 ^x ± 0.5	60.8 ^y ± 0.9
S4	12.4 ^y ± 0.5	-0.8 ^x ± 0.4	62.3 ^y ± 1.1

Values are expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Different letters (xyz) within each column indicate significant differences (P < 0.05) according to Tukey's test.

(پروتئین + آنزیم)، بیشترین pH، روشنایی (L) و قندهای احیاءکننده را داشت، اما کمترین زنده‌مانی و ویتامین C را نشان داد. در مقابل، نمونه S2 (پروتئین + باکتری) بیشترین فنول کل و کمترین قند احیاءکننده و روشنایی را داشت. در طول دوره نگهداری، روند کاهش در ویتامین C، pH، فنول و قندهای احیاءکننده مشاهده شد، در حالی که اسیدیته و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافتند. این تغییرات عمدتاً به فعالیت متابولیکی باکتری‌ها و تعاملات ترکیبات ماتریکس نسبت داده شد. همچنین، بررسی FTIR حضور گروه‌های عاملی مهم از جمله کربونیل، متیل و آمین را تأیید کرد که در پایداری ساختار و ویژگی‌های عملکردی نقش دارند. اندازه

۴- نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب پروتئین کنسانتره شیر، آنزیم ترانس گلوتامیناز و باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس تأثیر قابل توجهی بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی نوشیدنی داشت. در میان تیمارها، نمونه S3 (حاوی هر سه ترکیب) عملکرد بهتری از نظر زنده‌مانی باکتری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و حفظ ویتامین C نشان داد و از این نظر گزینه‌ای مناسب برای توسعه محصولات پروبیوتیکی محسوب می‌شود. هرچند این نمونه دارای pH پایین‌تری نسبت به سایر تیمارها بود، اما کاهش pH و افزایش اسیدیته با افزایش زنده‌مانی باکتری‌ها همبستگی داشت. نمونه S4

تأمین مالی

نویسنده اعلام میکند که هیچ بودجه ای دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

تمام فعالیت ها توسط نویسنده انجام شده است.

منافع رقابتی

نویسنده تأیید میکند که هیچ گونه تضاد منافع مالی یا منافع رقابتی در این مطالعه ندارد.

دسترسی به داده ها

داده های تولیدشده یا تحلیل شده در این مطالعه، در صورت درخواست منطقی، از نویسنده مسئول قابل دریافت است.

۵-منابع

- [1] Bhutto RA, Mahar H, Khanal S, Wang M, Iqbal S, Fan Y, Yi J. Recent trends in co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 2025;156:104829.
- [2] Jia H, Li Y, Tian Y, Li N, Zheng M, Zhang W, et al. Recent advances in electrospray encapsulation of probiotics: influencing factors, natural polymers and emerging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2024;1-18.
- [3] Bu W, McClements DJ, Zhang Z, Zhang R, Jin Z, Chen L. Encapsulation method of probiotic embedded delivery system and its application in food. *Food Hydrocolloids*. 2025;159:110625.
- [4] Zolfaghari H, Khezerlou A, Banihashemi SA, Tavassoli M, Ehsani A. Review on bio-detoxification of aflatoxins based on lactic acid bacteria: mechanism and applications. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 2023;13(1):e9424-e.
- [5] Amin MR, Biswas AP, Tasnim M, Islam MN, Azam MS. Probiotics and their Applications in Functional Foods: A Health Perspective. *Applied Food Research*. 2025;101193.
- [6] Khezerlou A, Zolfaghari H, Banihashemi SA, Forghani S, Ehsani A. Plant gums as the functional compounds for edible films and coatings in the food industry: A review. *Polymers for Advanced Technologies*. 2021;32.۲۶-۲۳۰۶:(۶)
- [7] Afzal A, Afzaal M, Saeed F, Shah YA, Raza MA, Khan MH, et al. Milk protein based encapsulation of probiotics and other food material: comprehensive review. *International Journal of Food Properties*. 2024;27(1):245-62.
- [8] Velazquez-Dominguez A, Hiolle M, Abdallah M, Delaplace G, Peixoto PP. Transglutaminase cross-linking on dairy proteins: Functionalities, patents, and commercial uses. *International Dairy Journal*. 2023;143:105688.
- [9] Hazervazifeh A, Rezazadeh A, Banihashemi A, Ghasempour Z, Kia EM. Pulsed microwave radiation for extraction of betalains from red beetroot: Engineering and technological aspects. *Process Biochemistry*. 2023;134:121-30.
- [10] Maleki O, Khosrowshahi Asl A, Alizadeh Khaledabad M, Amiri S. Production and characterization of synbiotic ice cream using microencapsulation and cryopreservation of *Lactobacillus rhamnosus* in whey protein/bio-cellulose/inulin composite microcapsules. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2023;17(4):3909-17.
- [11] Dikmetas DN, Acar EG, Ceylan FD, İlkadım F, Özer H, Karbancioglu-Guler F. Functional fermented fruit juice production and characterization by using water kefir grains.

- Journal of Food Science and Technology. 2025;1-14.
- [12] Randazzo CL, Pitino I, Licciardello F, Muratore G, Caggia C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. Food Science and Technology. 2013;33:652-9.
- [13] Shao Y, Gao S, Guo H, Zhang H. Influence of culture conditions and preconditioning on survival of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* ND02 during lyophilization. Journal of Dairy Science. 2014;97(3):1270-80.
- [14] Pérez M, Dominguez-López I, Lamuela-Raventós RM. The chemistry behind the folin-ciocalteu method for the estimation of (poly) phenol content in food: Total phenolic intake in a mediterranean dietary pattern. Journal of agricultural and food chemistry. 2023;71(46):17543-53.
- [15] Yamauchi M, Kitamura Y, Nagano H, Kawatsu J, Gotoh H. DPPH measurements and structure—Activity relationship studies on the antioxidant capacity of phenols. Antioxidants. 2024;13(3):309.
- [16] Borba VS, Lemos AC, Rodrigues MHP, Gropelli VM, Cerqueira MBR, Badiale-Furlong E. Miniaturization of spectrophotometric methods to determine reducing sugars, total starch and soluble proteins in wheat-based products. Food Analytical Methods. 2022;15(10):2756-66.
- [17] Gruska RM, Kunicka-Styczyńska A, Jaśkiewicz A, Baryga A, Brzeziński S, Świącik B. Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FT-MIR) as a method of identifying contaminants in sugar beet production process—Case studies. Molecules. 2023;28(14):5559.
- [18] Tian H, Zhao Q, He Z, Wang Z, Qin F, Zeng M, Chen J. Effects of molecular weight and degree of esterification of soluble soybean polysaccharide on the stability of casein under acidic conditions. Foods. 2021;10(3):686.
- [19] Kardas M, Kiciak A, Szynal K, Sitkiewicz B, Staśkiewicz-Bartecka W, Bielaszka A. Assessment of the color of orange juice in the context of dietitians' food preferences. Frontiers in Nutrition. 2024;10:1328795. Journal of food science and technology(Iran).14(67):273-65.
- [20] Silalahi J, Nadarason D, Silalahi YC. The effect of storage condition on antioxidant activity of probiotics in yogurt drinks. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2018;11(12):280-3.
- [21] La Torre C, Fazio A, Caputo P, Plastina P, Caroleo MC, Cannataro R, Cione E. Effects of long-term storage on radical scavenging properties and phenolic content of kombucha from black tea. Molecules. 2021;26.۰۴۷۴:(۱۸)
- [22] Shahmoradi Z, Khaledabad MA, Amiri S. Effect of co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and selenium in hydrogelated matrix of basil seed mucilage/sodium caseinate on properties of set yogurt. Food Bioscience. 2023;55:103039.
- [23] Neofytos DD, Gregersen SB, Corredig M. FTIR Imaging as a Tool for Studying Protein Dynamics and Interactions at the Oil/Water Interface with Spatial Resolution: A Single Droplet Analysis Approach. Langmuir. 2025;41(21):12858-72.
- [24] Kaur G, Panigrahi C, Agarwal S, Khuntia A, Sahoo M. Recent trends and advancements in nanoemulsions: Production methods, functional properties, applications in food sector, safety and toxicological effects. Food Physics. 2024;1:100024.
- [25] Manga MS, Higgins L, Kumar AA, Lobel BT, York DW, Cayre OJ. Exploring effects of polymeric stabiliser molecular weight and concentration on emulsion production via stirred cell membrane emulsification. Polymer chemistry. 2023;14(45):5049-59.
- [26] Dickinson E. Colloids in food: ingredients, structure, and stability. Annual review of food science and technology. 2015;6(1):211-33.
- [27] Masiá C, Geppel A, Jensen PE, Buldo P. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on physicochemical properties of fermented plant-based raw materials. Foods. 2021;10(3):57.۳
- [28] Kupikowska-Stobba B, Domagała J, Kasprzak MM. Critical review of techniques for food emulsion characterization. Applied Sciences. 2024;14(3):1069.
- [29] Du J, Song Y, Li X, Liu N, An X, Qi J. Dynamic changes and correlation analysis of polysaccharide content and color parameters in *Glycyrrhiza* stems and leaves during fermentation. Fermentation. 2023;9(10):900.
- [30] Ababaf K, Jooyandeh H, Nasehi B. Effect of transglutaminase enzyme treatment on the physicochemical and microbial properties of synbiotic soy yogurt. Food Research Journal. 2020;30(3):189-201.



Scientific Research

Application of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 with milk protein concentrate in the production of functional orange juice and investigation of its qualitative characteristics

Fereydoun Nabizadeh¹, Mahmoud Rezazadeh Bari², Saber Amiri^{3*}, Hossein Abdollahi⁴, Seyed Alireza Banihashemi⁵

- 1- Graduate M.Sc., Food Science and Technology, Saba Institute of Higher Education, Urmia, Iran
 2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
 3- Associated Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
 4- Associate Professor, Department of Polymer Engineering, Faculty of Engineering, Urmia University, Urmia, Iran
 5- Ph.D. Candidate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2025/08/31

Review: 2025/11/17

Accepted: 2025/11/27

Keywords:

Microencapsulation,

Lactobacillus rhamnosus,

Milk Protein Concentrate,

Viability,

Orange Juice

DOI: 10.48311/fsct.2026.84092.0

*Corresponding Author E-

Abstract

Microencapsulation technology is a novel approach to enhancing bacterial resistance against environmental, chemical, and gastrointestinal stresses. In this study, milk protein concentrate (MPC) was used as a wall material due to its strong biological and protective properties. The aim was to evaluate the effect of this material, combined with transglutaminase enzyme, on the survival of *Lactobacillus rhamnosus* in the acidic environment of orange juice. Four samples were prepared: S1 (plain orange juice), S2 (protein + bacteria), S3 (protein + bacteria + enzyme), and S4 (protein + enzyme). During storage, samples were analysed for bacterial viability, antioxidant activity, pH, titratable acidity, vitamin C, reducing sugar, total phenolic content, color, FTIR spectra, and molecular weight. The results showed that sample S3 exhibited the best performance with a viability of 5.5×10^7 CFU/mL, antioxidant activity of 68.5%, and acidity of 4.4%, along with a pH of 3.6. In contrast, sample S4 showed the lowest viability (3.8×10^7 CFU/mL) and vitamin C content (32.3 mg/L). Sample S2 had the highest total phenolic content (14.7 mg GAE/mL) and the lowest reducing sugar (9.07 mg/mL). During storage, vitamin C, reducing sugars, and phenolics decreased, whereas acidity and antioxidant activity increased. Samples containing bacteria showed higher vitamin C and acidity, while those with the enzyme exhibited higher reducing sugar content. FTIR analysis confirmed the presence of carbonyl, methyl, and amine functional groups. Sample S2 showed decreased molecular weight and increased solubility, indicating effective interactions between bacteria and protein.