نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، ص. ۲۷۸-۲۷۱

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 8, No. 3, Fall 2012, p. 271-278

ارزیابی بقاء باکتری ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) در طول دوره نگهداری بستنی ماستی سین‌بایوتیک

عباس احمدی [۱]- سید علی مرتضوی [۲]- الناز میلانی [۳*] - رضا رضائی مکرم [۴]

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۱
تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۲۱

چکیده

در این تحقیق بستنی ماستی به عنوان یک فراورده سین‌بیوتیک تولید شد. فرآورده‌های غذایی که شامل هر دو بخش پروبیوتیکی و پری‌بیوتیکی‌اند را سین‌بیوتیک یا غذاهای عملگرا می‌نامند. باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) به دو صورت آزاد و ریزپوشانی شده به بستنی ماستی اضافه گردید و قابلیت زنده‌مانی آن طی مدت ۶۰ روز از نگه‌داری در $-18°C$ مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین ترکیب پری‌بیوتیکی فروکتوالیگوساکارید (FOS) در سطوح مختلف (۰، ۰/۴و ۰/۸ درصد وزنی/وزنی) در تولید بستنی ماستی استفاده شد. تعداد سلول قابل زیست در حالت آزاد در مخلوط‌های بستنی ماستی، با ۰، ۰/۴و ۰/۸ درصد فروکتوالیگوساکارید به ترتیب برابر $۳/۸\times۱۰^{۹} cfu/ml$، $۳/۵\times۱۰^{۹} cfu/ml$ و $۳/۸\times۱۰^{۹} cfu/ml$ بود که بعد از ۶۰ روز نگهداری این تعداد به $۲/۲\times۱۰^{۷} cfu/ml$، $۲/۲\times۱۰^{۷} cfu/ml$ و $۲/۲\times۱۰^{۷} cfu/ml$ کاهش یافت در حالی که تعداد سلول قابل زیست در حالت ریزپوشانی شده از $۷/۵\times۱۰^{۹} cfu/ml$، $۸/۹\times۱۰^{۹} cfu/ml$ و $۹/۸\times۱۰^{۹} cfu/ml$ به ترتیب به $۲/۱۳\times۱۰^{۹} cfu/ml$، $۲/۵\times۱۰^{۹} cfu/ml$ و $۲/۹\times۱۰^{۹} cfu/ml$ کاهش یافته بود. به طور کلی نتایج نشان دادند که ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس توانسته به‌طور چشمگیری ($p<۰/۰۵$) قابلیت زنده‌مانی آن را در سطحی بالاتر از سطوح پیشنهادی توسط کمیته بین المللی لبنیات ($۱۰^{۷} cfu/g$) بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، ریزپوشانی، سین‌بیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بستنی ماستی

مقدمه

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های میکروبی زنده‌ای هستند که به واسطه ایجاد تعادل میکروبی روده‌ای اثر سودمندی بر مصرف‌کننده دارند (۵). اثرات پروبیوتیکی نسبت داده شده به این باکتری‌ها عبارت‌اند از تقویت مصونیت در مقابل عفونت‌های روده‌ای و بهبود مصرف لاکتوز، جلوگیری از بیماری‌های اسهال و سرطان روده بزرگ، کاهش کلسترول و بیماری‌های ناحیه معده‌ای و روده‌ای، شکل‌گیری و بازسازی تعادل بهتر فلور میکروبی طبیعی روده‌ای، بهبود جذب کلسیم و سنتز ویتامین و پیش هضم پروتئین‌ها (۱۷،۱۲). میکروارگانیسم‌های معمول ماست از قبیل لاکتوباسیلوس بلگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس در ماست تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز می‌نمایند اما این باکتری‌ها به دلیل تحمل پایین نسبت به املاح صفراوی در ناحیه روده‌ای نمی‌توانند زنده بمانند و رشد کنند. از طرف دیگر باکتری‌های پروبیوتیکی مانند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ناحیه روده‌ای و در حضور املاح صفراوی می‌توانند زنده بمانند و تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز نمایند (۱۸). جهت اینکه باکتری‌های پروبیوتیکی سودمند واقع شوند، لازم است تا غلظت پروبیوتیک‌ها در فراورده‌های غذایی که به عنوان حامل در نظر گرفته شده‌اند بالا باشد و این سطوح پیشنهادی سلول‌های پروبیوتیکی خیلی اوقات به عنوان سطوح درمانی در محدوده $۱۰^{۷}$ یا $۱۰^{۸}$ اشاره شده است (۱۳). مانع اصلی برای حفظ این سطوح پیشنهادی، وابستگی گونه ارگانیسم‌های پروبیوتیکی و قابلیت زنده‌مانی ناچیز ناشی از تنش اسیدیته و افزایش غلظت اکسیژن و نقصان مواد غذایی می‌باشد (۲۳،۲۱،۲۰،۳). جهت غلبه بر این مشکلات، شیوه‌های مختلفی شامل کشت‌های میکروبی انتخابی (۲۵،۱۴)، ریزپوشانی و افزودن پری‌بیوتیک‌ها استفاده شده است (۲). اصطلاح ریزپوشانی به عنوان تکنولوژی بسته‌بندی جامدات، مایعات یا

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳-استادیار پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: e_milani81@yahoo.com)
۴-استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تبریز

گازها در کپسول‌های کوچک تعریف می‌شود به‌طوریکه می‌تواند ترکیبات آن در برابر شرایط خاص رهایش یابند (۴). از عمده‌ترین ترکیبات مورد استفاده در ریزپوشانی پربیوتیک‌ها، صمغ آلژینات سدیم است. این صمغ یک هتروپلی‌ساکارید خطی متشکل از واحدهای ساختمانی د- مانورونیک اسید و ال- گلورونیک اسید می‌باشد و از جلبک‌های دریایی استخراج می‌شود. علت استفاده از آلژینات در ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها، ارزانی، سهولت کاربرد و نیز مطابقت و سازگاری با محیط زیست می‌باشد (۱۶،۱۵). آلژینات به هنگام ایجاد ژل دارای منافذی با قطر ۱۷ نانومتر است که به خوبی می‌تواند باکتری‌ها را که در اندازه میکرون هستند در خود به دام اندازد (۱۶). پری‌بیوتیک‌ها کربوهیدراتهای پیچیده غیرقابل هضم هستند که به صورت انتخابی رشد و فعالیت باکتری‌ها را در روده تحریک می‌کنند و نیز اثرات سودمندی روی میزبان می‌گذارند (۶). فروکتوالیگوساکاریدها یک زیر گروه از اینولین، با درجه پلی‌مراسیون کمتر از۱۰ بوده و در گیاهانی از قبیل کنگر فرنگی، ریشه کاسنی، تره فرنگی، پیاز، سیر، جو دوسر، جو و چاودار یا گندم سیاه تشخیص داده شده است (۲۸). هدف از این تحقیق تولید یک فراورده سین‌بیوتیکی مبتنی بر فرایند ریزپوشانی بوده است.

مواد و روش‌ها

کشت میکروبی و شمارش باکتری پروبیوتیکی ریزپوشانی شده و آزاد

باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس *(La-5)* به صورت خشک شده انجمادی از شرکت کریستین هانسن خریداری شد. جهت فعال‌سازی باکتری، مقدار ۱ گرم از پودر در ۹۹ میلی‌لیتر از محیط *کشت MRS Broth* تلقیح شد و به مدت ۶ تا ۸ ساعت در دمای $37°C$ گرمخانه‌گذاری شد. عمل جداسازی بیومس پروبیوتیکی در انتهای فاز لگاریتمی توسط سانتریفوژ در $g \times ۴۵۰۰$ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای $4°C$ انجام گردید. شستشوی بیومس باکتریایی توسط محلول استریل ۰/۱ درصد پپتون‌واتر طی دو مرحله و تحت شرایط فوق انجام شده و سپس در دمای $4°C$ نگهداری شد تا در فرایند ریزپوشانی استفاده شود. جهت شمارش تعداد سلول باکتریایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از محیط کشت انتخابی *MRS-Bile Agar* استفاده شد (۲۷،۲۶). شمارش تعداد سلول پروبیوتیکی طبق روش توصیف شده هاینس و پلین (۲۰۰۲) قبل از انجماد و بلافاصله بعد از انجماد و نیز در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و۶۰ انجام شده بود. بدین ترتیب که مقدار ۱۰ گرم از نمونه بستنی ماستی به صورت ۰/۱ در مقدار ۹۰ میلی‌لیتر از محلول استریل ۰/۱ درصد پپتون واتر رقیق شده و ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تولید شده در پلیت های *MRS-Bile Agar* کشت داده شدند. نمونه‌برداری از بستنی ماستی در روزهای مختلف انجام شده بود و تمامی پلیت‌هایی که کشت مخلوط داده شده بودند در ۳۷°C برای ۷۲ ساعت تحت شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. میانگین تعداد سلول‌های بدست آمده به عنوان واحدهای شکل‌گیری کلنی[1] در هر گرم از نمونه ($cfu\ g^{-1}$) گزارش شدند. عمل شمارش باکتری ریزپوشانی شده در بستنی ماستی طبق روش شیو و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد (۲۲). بدین ترتیب که مقدار ۱۰ گرم از نمونه بستنی ماستی حاوی باکتری ریزپوشانی شده در ۹۰ میلی لیتر از محلول بافر سیترات سدیم (۱ درصد وزنی/ وزنی، $pH=۶$) به صورت یکنواخت توسط هم‌زن مغناطیسی برای ۱۰ دقیقه پراکنده شد. سپس تعداد سلول‌ها توسط کشت پلیتی روی محیط *MRS-Bile Agar* تعیین گردید. به منظور حفظ شرایط یکسان، نمونه‌های بستنی ماستی حاوی باکتری آزاد نیز در روش مشابهی تیمار شده بودند.

ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی

عمل ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با استفاده از روش ژلاتیناسیون خارجی (۲۲) که توسط تراستراپ (۲۰۰۲) و رضائی‌مکرم و همکاران (۲۰۰۸) قبلا گزارش گردید، انجام شد (۱۶). ابتدا مقدار۱۰ گرم از آلژینات سدیم با ویسکوزیته متوسط در ۱ لیتر آب مقطر با استفاده از هم‌زن مغناطیسی حل شد. سپس به مدت یک شب در یخچال در دمای $4°C$ نگهداری شد تا آلژینات به خوبی آب جذب کند. سپس بیرون یخچال منتقل و مدتی در دمای آزمایشگاه نگه‌داشته شد تا با محیط هم‌دما شود. بعد ۱۸ گرم از محلول آلژینات با ۱ گرم از سوسپانسیون باکتریایی مخلوط شد و سپس مخلوط حاصل با استفاده از پی‌پت استریل در ۱۰۰ گرم روغن نباتی مایع (کلزا) حاوی توین ۸۰ (۵ g/l) که توسط هم‌زن مغناطیسی در rpm ۹۰۰ در حال هم‌خوردن بود اضافه شد و برای ۲۰ دقیقه به صورت یکنواخت پراکنده گردید. سپس با اضافه کردن ۱۰۰ میلی‌لیتر از یک امولسیون حاوی یون کلسیم (حاصل انحلال ۶۰ گرم روغن مایع کلزا، توین۸۰ (۵ g/l) و کلرور کلسیم ۰/۱ مولار) عمل ژلاتیناسیون آغاز می‌شود. عمل هم‌زدن برای ۲۰ دقیقه دیگر نیز ادامه پیدا می‌کند تا دانک‌های آلژینات شکل بگیرد. بعد از این مدت، ۳۰ دقیقه دیگر همزدن ادامه یافت تا عمل ژلاتیناسیون کامل شود. در نهایت سیستم دو فازی تشکیل می‌گردید که فاز رویی روغن و فاز پایینی آن دانک‌های آلژینات سدیم ته‌نشین شده در محلول کلرورکلسیم هستند. در این حالت فاز روغنی را جدا کرده و دانک‌های آلژینات با استفاده از سانتریفوژ در $g \times ۵۰۰$ و در دمای $4°C$ برای ۵ دقیقه جداسازی گردیدند. عمل شستشوی دانک‌ها نیز با استفاده از محلول ۰/۱درصد پپتون‌واتر و با استفاده از سانتریفوژ تحت شرایط فوق انجام شد.

1 - Colony forming units

شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در دانک‌ها

جهت تعیین کارایی فرایند ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی، مقدار ۱ گرم از نمونه‌های دانک‌های تولید شده را در ۹۹ میلی‌لیتر از محلول سیترات سدیم استریل (۱درصد وزنی/ وزنی، $pH=6$) پراکنده کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق توسط هم‌زن مغناطیسی، عمل هم‌زدن ادامه پیدا کرد. بعد از این مرحله عمل رقت‌سازی انجام شد و با استفاده از محیط *MRS Agar* در شرایط هوازی و در دمای $37°C$ به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت کشت میکروبی داده شد. در نهایت تعداد باکتری‌ها شمارش شدند. این شمارش در سه تکرار صورت پذیرفت (۱۶).

تعیین ریخت‌شناسی دانک‌ها

جهت تعیین ریخت‌شناسی دانک‌ها از میکروسکوپ نوری استفاده شد. بدین ترتیب که به صورت تصادفی تعداد مشخصی از دانک‌ها روی لام قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری *Olympus* مشاهده انجام شد.

تولید بستنی ماستی

تولید ماست

۶۶ درصد از کل شیر محاسبه شده برای تهیه بستنی ماستی، در دمای $42°C$ با آغازگر فعال‌سازی شده تلقیح و برای تهیه ماست گرمخانه‌گذاری گردید. پایان فرایند گرمخانه‌گذاری رسیدن به pH حدود ۴/۷ الی ۴/۹ بوده است. بعد از عمل گرمخانه‌گذاری، ماست خارج شده از انکوباتور با فاز غیرماستی مخلوط گردید.

تولید مخلوط بستنی ماستی

بدین منظور میزان هر یک از مواد مورد نیاز بر اساس روش جبری محاسبه و در ترکیب بکار رفتند. ۳۳ درصد از شیر باقی مانده که در فاز غیرماستی مورد استفاده قرار گرفت، ابتدا تا دمای $45°C$ حرارت داده شد، سپس ترکیبات دیگر (وانیل، امولسیفایر، شکر، فروکتوالیگوساکارید و پانیسول) به آرامی به شیر اضافه شدند و بعد عمل همگن شدن مخلوط با استفاده از هموژنایزر تا جایی که هیچ کلوخه‌ای نداشته باشد ادامه پیدا کرد. در مرحله بعد خامه با ۳۰ درصد چربی که قبلا در حمام آب ذوب شده بود به مخلوط اضافه شد. سپس این مخلوط به مدت ۲۰ ثانیه در حرارت $8°C$ پاستوریزه شد. بعد دمای مخلوط به سرعت به زیر $10°C$ با استفاده از مخلوط آب و یخ رسانیده شد. در مرحله بعد ماست تهیه شده با فاز غیرماستی مخلوط شد تا بافتی همگن بدست آید. سپس مخلوط بستنی ماستی به مدت ۱۲ الی ۱۴ ساعت در دمای $4°C$ نگهداری شد تا عمل رسانیدن مخلوط کامل شود. بعد از اتمام مرحله رسانیدن و قبل از انتقال به دستگاه بستنی‌ساز، دانک‌های آلژینات سدیم حاوی بیومس پروبیوتیکی به مخلوط بستنی ماستی تلقیح شدند. سپس عمل شمارش تعداد سلول پروبیوتیکی قبل و بعد از انجماد انجام شد. بدین ترتیب که مقدار ۱۰ گرم از نمونه بستنی بستنی ماستی در ۹۰ میلی‌لیتر از بافر سیترات سدیم ۱ درصد *w/v* پراکنده شد و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از هم‌زن مغناطیسی هم‌زده شد. سپس۱میلی‌لیتر از محلول فوق به داخل پلیت قرار داده شد و سپس با استفاده از محیط کشت *MRS-Bile Agar* در سه تکرار کشت داده شد. همه نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت و در دمای $37°C$ تحت شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. نمونه‌های بستنی محتوی باکتری‌های آزاد نیز در روش مشابهی (جایگزینی پپتون‌واتر ۰/۱ درصد با سیترات سدیم ۱ درصد *w/v*) به منظور حفظ شرایط یکسان، کشت داده شدند (۱).

طرح آماری

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از طرح فاکتوریل کاملا تصادفی صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن توسط نرم افزار *Spss* انجام شد. همچنین نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای *Excell* و *Spss* رسم شد و منحنی‌های سطح پاسخ[1] توسط نرم‌افزار *Slide write* رسم شدند

نتایج و بحث

شمارش تعداد باکتری‌های بدام افتاده در دانک‌ها و تعیین ریخت‌شناسی دانک‌ها

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که تعداد سلول های زنده باکتریایی قبل از ریزپوشانی با آلژینات سدیم برابر *Log cfu/ml* ۱۲/۳۰ الی ۱۲/۳۲ بوده است. این در حالی است که تعداد سلول زنده باکتریایی بعد از فرایند ریزپوشانی برابر با *Log cfu/ml* ۱۱/۸۱ الی ۱۲/۰۱ بدست آمد. بنابراین با مقایسه تعداد سلول زنده، قبل و بعد از فرایند ریزپوشانی این نتیجه حاصل می‌شود که فرایند ریزپوشانی با روش امولسیونی توانسته کارایی بالایی در ارتباط با بدام اندازی سلول باکتریایی داشته باشد. به عبارت دیگر از دست رفتن جزئی سلول باکتریایی نشان می‌دهد که ریزپوشانی تاثیری در تعداد سلول باکتری نداشته است. روشی که در این تحقیق استفاده شد، روش ژلاتیناسیون خارجی بود که قبلا توسط تراستراپ (۲۰۰۲) گزارش شده است. در این روش دانک‌هایی با قطر کمتر از ۱۰۰ میکرومتر تولید شد. این امر نشان می‌دهد که با این روش می‌توان دانک‌هایی با قطر میکرونی تهیه کرد، لذا می‌توان بافت نرم‌تری را در مواد غذایی ایجاد کرد. (۱۴)، در روش امولسیونی، اندازه ذرات توسط

1 – Response surface methodology

سرعت به هم‌زدن کنترل می‌شود و می‌تواند بین ۲۵ میکرومتر تا ۲ میلی‌متر تغییرکند. این روش برای ریزپوشانی باکتری‌های اسیدلاکتیک به خوبی استفاده شده است (۱۹). در ارتباط با خصوصیات فیزیکی، محققین بیان داشتند که میانگین ضخامت ۳۰ میکرومتر برای استفاده در دسر لبنی منجمد مناسب است. دانه‌های بزرگتر می‌تواند منجر به درشتی و زبری مخلوط شود در حالی که دانه‌های کوچک نمی‌تواند محافظت خوبی از باکتری‌ها به عمل آورد (۱۰). همچنین همانطور که در شکل نشان داده شده با روش امولسیونی می‌توان دانک‌هایی یک شکل، منظم و کروی تولید کرد. این نتیجه مطابق گزارش رضایی مکرم و همکاران (۲۰۰۹) است که با استفاده از روش امولسیونی دانک‌هایی با شکل یکسان و کروی تولید کرده‌اند. در تحقیقی که توسط همایونی و همکاران (۲۰۰۷*a*) انجام شد، یک روش اصلاح شده ریزپوشانی مبتنی بر روش امولسیونی جهت تولید دانک‌هایی با قطر پایین‌تر از ۱۰۰ میکرومتر پیشنهاد شده بود. مطالعات نشان داد که کنترل اندازه ریزدانک‌های آلژینات با استفاده از سرعت هم‌زدن (۴۰۰ *rpm* برای ۲۰ دقیقه) امولسیون جهت تولید دانک‌هایی در محدوده ۱۰ تا ۳۰ میکرومتر ممکن است (۹).

قابلیت زنده‌مانی باکتری پروبیوتیکی آزاد و ریزپوشانی شده

نتایج بدست آمده از شمارش سلولی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در بستنی ماستی با سطوح مختلف ترکیب پربیوتیکی فروکتوالیگوساکارید، نشان می‌دهد که ریزپوشانی سلول باکتریایی توانسته تاثیر چشمگیری در قابلیت زنده‌مانی باکتری در این دسر لبنی سین‌بیوتیک داشته باشد ($P<0/05$).

تعداد ابتدایی سلول باکتری در بستنی ماستی بدون *FOS* در حالت آزاد $(3/8\pm0/3)\times10^{9}$ *Log(cfu/ml)* بوده است که در پایان ۶۰ روز از نگهداری در $-18°C$ این تعداد به $(2\pm0/2)\times10^{7}$ *Log(cfu/ml)* کاهش پیدا می‌کند. این در شرایطی است که تعداد اولیه سلول باکتری در حالت ریزپوشانی شده $(7/5\pm0/9)\times10^{9}$ *Log(cfu/ml)* بوده که بعد از ۶۰ روز از نگهداری در $-18°C$ این تعداد به $(2/13\pm0/2)\times10^{9}$ *Log(cfu/ml)* کاهش پیدا کرد. نتایج نشان می‌دهد که ۲ سیکل لگاریتمی کاهش در تعداد سلول در حالت آزاد در بستنی ماستی بدون *FOS* رخ داده است. در ارتباط با بستنی ماستی حاوی ۰/۴ درصد *FOS* تعداد ابتدایی سلول باکتری در حالت آزاد $(3/5\pm0/3)\times10^{9}$ *Log(cfu/ml)* است که این تعداد در پایان ۶۰ روز به $(2/2\pm0/1)\times10^{7}$ *Log(cfu/ml)* کاهش پیدا می‌کند.از طرف دیگر افت سلول در حالت ریزپوشانی شده بسیار ناچیز بوده و تعداد سلول از $(8/9\pm0/1)\times10^{9}$ *Log(cfu/ml)* به $(2/5\pm0/2)\times10^{9}$ *Log(cfu/ml)* کاهش پیدا کرد.

جدول ۱- قابلیت زنده‌مانی باکتری پروبیوتیکی در بستنی ماستی بدون فروکتوالیگوساکارید طی ٦٠ روز

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)*
0	$(8/3\pm3/0)\times10^{9}$	$(5/7\pm9/0)\times10^{9}$
1	$(4/2\pm7/0)\times10^{9}$	$(66/5\pm2/1)\times10^{9}$
15	$(5/4\pm6/0)\times10^{8}$	$(7/4\pm8/0)\times10^{9}$
30	$(6/2\pm2/0)\times10^{7}$	$(8/3\pm3/0)\times10^{9}$
45	$(3/2\pm2/0)\times10^{7}$	$(2/3\pm5/0)\times10^{9}$
60	$(2\pm2/0)\times10^{7}$	$(2/13\pm2/0)\times10^{9}$
R^2 (ضریب تعیین)	93/0	86/0

جدول۲- قابلیت زنده‌مانی باکتری پروبیوتیکی در بستنی ماستی با ۰/٤ درصد فروکتوالیگوساکارید طی ٦٠ روز

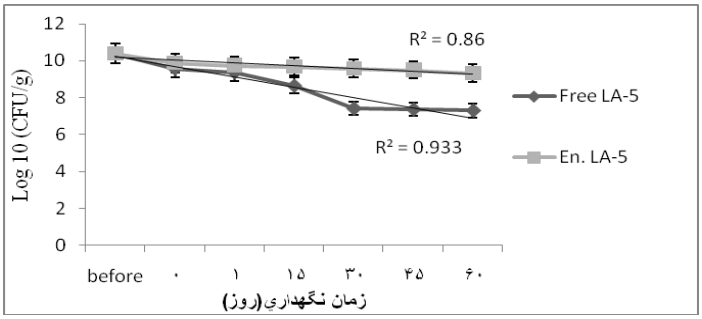
روزهای نگهداری	تعداد سلول زنده بعد از قرار گرفتن در معرض انجماد(میانگین ± خطای استاندارد)	
	حالت آزاد *Log (cfu/ml)*	حالت ریزپوشانی شده *Log (cfu/ml)*
0	$(5/3\pm3/0)\times10^{9}$	$(9/8\pm1/0)\times10^{9}$
1	$(5\pm3/0)\times10^{8}$	$(6/7\pm7/0)\times10^{9}$
15	$(8/3\pm3/0)\times10^{7}$	$(1/5\pm3/0)\times10^{9}$
30	$(9/2\pm1/0)\times10^{7}$	$(1/4\pm6/0)\times10^{9}$
45	$(4/2\pm4/0)\times10^{7}$	$(4/3\pm5/0)\times10^{9}$
60	$(2/2\pm1/0)\times10^{7}$	$(5/2\pm2/0)\times10^{9}$
R2 (ضریب تعیین)	85/0	91/0

نتایج نشان می‌دهند که تعداد سلول از $(۳/۸\pm۰/۲)\times۱۰^{۹}Log(cfu/ml)$ در روز اول برای حالت آزاد در نمونه بستنی ماستی حاوی ۰/۸ درصد فروکتوالیگوساکارید، تا $(۲/۲\pm۰/۱)\times۱۰^{۷}Log(cfu/ml)$ کاهش داشته است. در شرایطی که این کاهش تعداد در حالت ریزپوشانی شده از $(۹/۸\pm۲/۳)\times۱۰^{۹}Log(cfu/ml)$ در روز اول تا $(۲/۹\pm۰/۶)\times۱۰^{۹}Log(cfu/ml)$ در پایان ۶۰ روز بوده است.

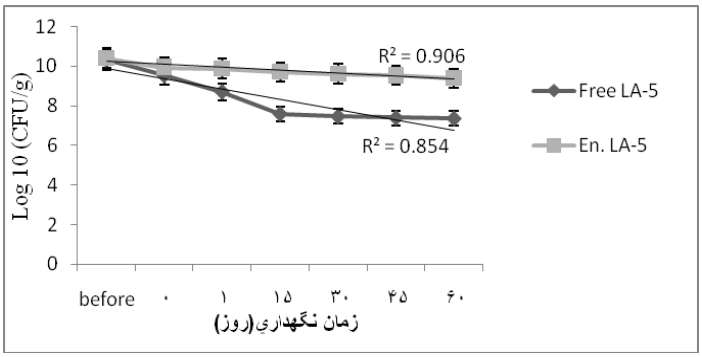
نتایج نشان می‌دهند که تعداد سلول از $(۳/۸\pm۰/۲)\times۱۰^{۹}Log(cfu/ml)$ در روز اول برای حالت آزاد در نمونه بستنی ماستی حاوی ۰/۸ درصد *FOS*، تا $(۲/۲\pm۰/۱)\times۱۰^{۷}Log(cfu/ml)$ کاهش داشته است. در شرایطی که این کاهش تعداد در حالت ریزپوشانی شده از $(۹/۸\pm۲/۳)\times۱۰^{۹}Log(cfu/ml)$ در روز اول تا $(۲/۹\pm۰/۶)\times۱۰^{۹}Log(cfu/ml)$ در پایان ۶۰ روز بوده است. همانطور که در شکل‌های ۱،۲،۳ نشان داده شده است در تمامی نمونه‌های بستنی ماستی بعد از ۶۰ روز نگهداری در $-۱۸°C$ اساسا یک کاهش ۳ لگاریتمی در تعداد سلول باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در حالت آزاد مشاهده شد. این در حالی است که افت سلول برای حالت ریزپوشانی شده باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مدت ۶۰ روز در $-۱۸°C$ فقط ۱ لگاریتم بوده است.

جدول۳- قابلیت زنده‌مانی باکتری پروبیوتیکی در بستنی ماستی با ۰/۸ درصد فروکتوالیگوساکارید طی ٦٠ روز

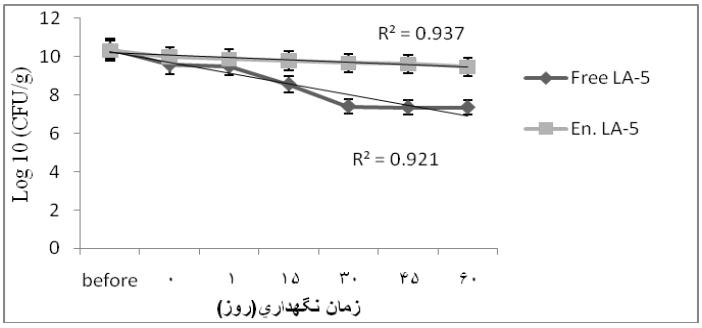
روزهای نگهداری	تعداد سلول زنده بعد از قرار گرفتن در معرض انجماد(میانگین ± خطای استاندارد)	
	حالت آزاد *Log (cfu/ml)*	حالت ریزپوشانی شده *Log (cfu/ml)*
0	$(8/3 \pm 2/0)\times 10^{9}$	$(8/9 \pm 3/2)\times 10^{9}$
1	$(2/3 \pm 3/0)\times 10^{9}$	$(7/7 \pm 1/1)\times 10^{9}$
15	$(7/3 \pm 5/0)\times 10^{8}$	$(2/6 \pm 1)\times 10^{9}$
30	$(5/2 \pm 5/0)\times 10^{7}$	$(6/4 \pm 1)\times 10^{9}$
45	$(2/2 \pm 3/0)\times 10^{7}$	$(1/4 \pm 3/0)\times 10^{9}$
60	$(2/2 \pm 1/0)\times 10^{7}$	$(9/2 \pm 6/0)\times 10^{9}$
R^2 (ضریب تعیین)	92/0	93/0



شکل ۱- قابلیت زنده‌مانی سلول پروبیوتیکی در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی ماستی بدون FOS



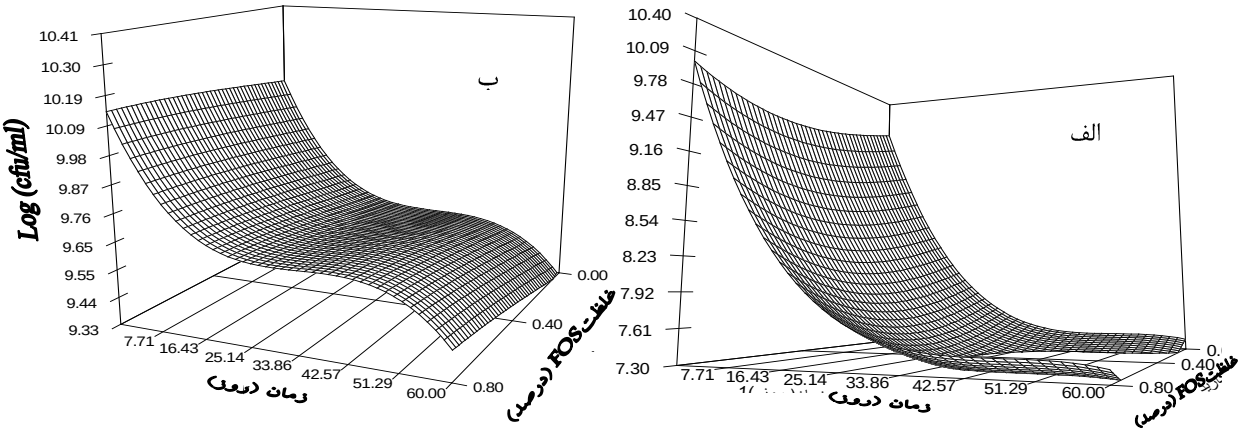
شکل ۲- قابلیت زنده‌مانی سلول پروبیوتیکی در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی ماستی با ۰/٤ درصد FOS



شکل ۳- قابلیت زنده‌مانی سلول پروبیوتیکی در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی ماستی با ۰/۸ درصدFOS

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص می‌شود که فرایند ریزپوشانی سلول‌های باکتریایی می‌تواند یک عامل موثر در افزایش زنده‌مانی سلول پروبیوتیکی باشد. صدمه انجمادی ناشی از شوک حرارتی به سلول‌های باکتریایی می‌تواند عاملی باشد که باعث افت ۳ لگاریتمی در تعداد سلول‌ها شده است. از طرف دیگر در نمونه‌های بستنی ماستی‌ای که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به صورت ریزپوشانی شده تلقیح شده بود نیز یک کاهش ۱ لگاریتمی دیده شد که این می‌تواند به دلیل صدمه فیزیکی ناشی از تیغه‌های دستگاه بستنی‌ساز به دیواره دانک‌ها در مرحله انجماد باشد. همایونی و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند کاهش در تعداد باکتری‌ها در نتیجه انجماد شاید ناشی از آسیب انجمادی به سلول‌ها باشد که در نهایت منجر به مرگ سلول‌ها می‌شود. آنها همچنین بیان کردند که تنش‌های مکانیکی مخلوط کردن و فرایند انجماد و همچنین تلقیح اکسیژن به داخل مخلوط می‌تواند منجر به کاهش بیشتری در تعداد سلول باکتریایی شود. آنها همچنین بیان کردند که آسیب به سلول‌ها در داخل فریزر بستنی به علت شکل‌گیری کریستال‌های یخ و توسط خرده‌های دیواره سیلندر توسط تیغه فریزر بوده است (۹). محققین دیگری دریافتند، وقتی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در یک مخلوط بستنی استاندارد تلقیح شده و اجازه تخمیر به آن داده شد، هنگامی که در $-29°C$ برای ۱۷ هفته نگهداری شد، ۲ سیکل لگاریتمی کاهش را نشان داد (۸). طبق نتایج حاصل از تحقیقات، گزارش شده که طی تولید بستنی ماستی، انجماد می‌تواند بر قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌های سنتی ماست اثر سوء داشته باشد. آنچه که بیشتر سبب مرگ سلول‌ها در اثر انجماد می‌شود،

تغییرات دمایی طی دوره نگهداری طولانی فرآورده است. این موضوع پدیده‌های تبلور مجدد، رشد بلورها و تغییرات pH را به همراه دارد که نتیجه آنها مرگ شیمیایی یا مکانیکی (متلاشی شدن) سلول‌ها است (۲۶). اکسیژن موجود در بستنی ماستی همانند یک سم برای سلول باکتری است، لذا اورران ایجاد شده در بستنی ماستی خود باعث افت تعداد سلول در نمونه‌های محصول می‌شود. با پوشش‌دار کردن، سلول باکتری نسبت به شرایط بد محیطی مصون می‌ماند. در شکل ۴ (الف و ب) روند تغییرات تعداد سلول پروبیوتیکی در طول ۶۰ روز از نگهداری در نمونه‌های بستنی ماستی با درصدهای مختلف FOS نشان داده شده است.



شکل ٤- تغییرات سلول باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس آزاد (الف) و ریزپوشانی شده (ب) در بستنی ماستی طی ٦٠ روز نگهداری

همانطورکه در شکل‌ها مشخص است، در نمونه‌هایی از بستنی ماستی که دارای بیشترین مقدارFOS بوده‌اند، افت تعداد سلول پروبیوتیکی به میزان کمتری رخ داده است. همچنین نتایج حاصل از تحقیقات کاپلا و همکاران (۲۰۰۵) نشان داده که ریزپوشانی نقش چشمگیری در حفظ قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها طی ۶ ماه از نگهداری در $-21°C$ و در حضور فروکتوالیگوساکارید ایفاء می‌کند (۲). شاه و راویولا (۲۰۰۰) گزارش کردند؛ ریزپوشانی، تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم را در مقایسه با سلول‌های آزاد در دسرهای لبنی منجمد نگهداری شده برای ۱۲ هفته بهبود بخشید (۱۶). قابلیت زنده‌مانی باکتری پروبیوتیکی به عنوان زمان مورد نیاز یا صرف شده برای نابود ساختن یا تلف کردن ۹۰ درصد یا یک سیکل لگاریتمی از ارگانیسم‌ها است که در تمامی نمونه‌های بستنی ماستی یک اختلاف معنی داری ($P<0/05$) بین حالت‌های آزاد و ریزپوشانی شده در قابلیت زنده‌مانی باکتری مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان گفت که بستنی ماستی می‌تواند به عنوان یک حامل، برای تحویل میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی به بدن انسان در نظر گرفته شود. مشخص شد که فرایند ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی می‌تواند به عنوان یک عامل موثر در افزایش زنده‌مانی سلول باکتریایی باشد. همچنین آلژینات سدیم به عنوان یک پوشش دهنده مناسب برای این منظور دارای کارایی بالایی بوده است. در طی ۶۰ روز از نگهداری بستنی ماستی در شرایط انجماد بیشترین کاهش تعداد سلول در حین فرایند انجماد رخ داده است و طی مدت نگهداری، ۳ سیکل لگاریتمی کاهش برای حالت آزاد باکتری در تمامی نمونه‌ها رخ داد. این در شرایطی است که وقتی سلول به صورت ریزپوشانی شده به محصول تلقیح شد، تنها ۱ سیکل لگاریتمی کاهش در تعداد سلول رخ داد. همچنین مشخص شد که تعداد سلول باکتریایی قابل زیست در تمامی نمونه‌ها بالاتر از 10^7 $log\ cfu/ml$ بوده است و این سطح از تعداد سلول، بالاتر از سطوح پیشنهادی فدراسیون بین المللی لبنیات ($log\ cfu/ml$ $10^7 - 10^6$) است.

منابع

معین فرد، م. ۱۳۸۶. بهینه‌سازی و فرمولاسیون بستنی بر پایه ماست غلیظ شده و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ارگانولپتیک آن در طی نگهداری. پایان‌نامه کارشناسی ارشد.

Capela, P., Hay, T. K. C., and Shah, N. P. 2006, Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yogurt and freeze-dried yogurt, Food research International, 39, 203-211.

Dave, R. I., and Shah, N. P. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy Journal, 7(1), 31–41.

Desai, K.G.H., Park, H.J., 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. Drying Technology 23, 1361–1394.

Fuller, R. 1992. Probiotics: the scientific basis. London: Chapman & Hal

Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota; introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, 125, 1401–1412.

Haynes, I.N., and Playne, M.J. 2002. Survival of probiotic cultures in low fat ice cream, Australian Journal of Dairy Technology, 57, 10-14

Hekmat, S., McMahon, D. L. 1992, Survival of lactobacillus acidophilus and bifidobacterium bifidum in ice cream for use as a probiotic food, J Dairy sci, 75, 1415-1422

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Razavi, S. H. and Yarmand, M. S. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream, food chemistry, 111, 50-55.

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Razavi, S. H. and Yarmand, M. S. 2007a, Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads, Iranian polymer journal, 16, 9, 597-606.

Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Razavi, S. H., and Yarmand, M. S. 2007b. An introduction to functional dairy foods. In Proceedings of the First National Functional Food Congress (p. 60).

Kailasapathy, K., and Rybka, S. 1997. L. acidophilus and Bifido-bacterium spp. their therapeutic potential and survival in yogurt. The Australian Journal of Dairy Technology, 52, 28-33.

Kurmann, J. A., and Rasic, J. L. 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. In R. K. Robinson (Ed.), Therapeutic properties of fermented milks (pp. 117–158). London, UK: Elsevier Applied Food Sciences.

Martinsen, A., Skjak-Braek, C., Smidsrod, O., 1989. Alginate as immobilization

material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. Biotechnology and Bioengineering, 33(1), 79–89.

Nakasawa, Y., and Hosono, A. 1992. Functions of fermented milk. Challenges for the health sciences. London, UK: Elsevier Applied Science.

Noh, D. O., and Gilliland, S. E. 1993. Influence of bile on cellular integrity and beta-galactosidase of Lactobacillus acidophilus. Journal Dairy Science, 76(5), 1253–1259.

Ravula, R. R., Shah, N. P. 1998, Effect of acid casein hydrolysate and cystein on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented dairy desserts, Australian journal of dairy technology, 53, 175-179.

Shah, N. P. 2000a. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science, 83, 894–907.

Shah, N. P. 2000b. Some beneficial effects of probiotic bacteria. Bioscience Microflora, 19, 99–106.

Sheu, T. Y., Marshal, R. T. 1993, Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels, Journal of food science, 54, 557-561.

Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. 2004. A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3, 117–124.

Truelstrup Hansen, L., Allan-wojtas, P.M., Jin, Y.L., and Paulson, A.T. 2002. Survival of ca-alginate microencapsulated bifidobacterium spp. In milk and simulated gastrointestinal conditions, Food Microbiology, 19, 35-45

Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., and Salminen, S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. American Journal of Clinical Nutrition, 73, 393S–398S.

Vinderola, C. G., and Reinheimer, J. A. 1999, Culture media for the enumeration of bifidobacterium bifidum and lactobacillus acidophilus in the presence of yogurt bacteria, International dairy journal, 9, 497-505.

Vinderola, C. G., and Reinheimer, J. A. 2000, Enumeration of lactobacillus casei in the presence of L. acidophilus, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products, International dairy journal, 10, 271-275.

Voragen, A.G.J., Trends Food Sci. Technol. 9 1998 328–335.