Food Hygiene, Vol. 11, No. 41, Spring 2021

"Research article" **DOI:10.30495/JFH.2020.578849.1200**

The effect of microencapsulation with succinylated alginate on the viability of *Lactobacillus acidophilus* and the qualitative and sensory properties of yogurt during the storage

Forouzantabar, M.[1], Hosseinzadeh, S.[2*], Ghaisari, H.R.[3], Shekarforoush, S.S.[4]

1. Ph.D. student of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Professor of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Associate Professor of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
4. Professor of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

*Corresponding author: hosseinzadeh@shirazu.ac.ir

(Received: 2018/11/10 Accepted: 2019/4/17)

Abstract

The use of the microencapsulation technique can lead to an increase in the survival of probiotics in dairy products during storage. Chemical modification is one of the proposed strategies to improve the protective ability of alginate used in microencapsulation. In the current work, the effect of succinylated alginate and its application as a micro-coating on the preparation of *Lactobacillus acidophilus* microcapsules was evaluated on the qualitative properties (pH, acidity, syneresis, and water holding capacity), sensory properties, and survival of this bacteria in yogurt during 21 days of storage at 4°C. For this purpose, four samples of yogurt including yogurt without *L. acidophilus*, yogurt containing free *L. acidophilus*, yogurt containing microencapsulated *L. acidophilus* with native alginate, and yogurt containing microencapsulated *L. acidophilus* with succinylated alginate, was prepared. The results of qualitative tests showed that the acidity and syneresis of yogurt containing succinylated alginate microcapsules were lower while the pH and water holding capacity were higher than the other experimental groups. Also, the results of microbial counting and sensory evaluation showed that the microencapsulation of *L. acidophilus* using succinylated alginate was significantly increased its survival during the storage time ($p<0.05$) without any adverse effects on the sensory properties. Therefore, microencapsulation with succinylated alginate can be suggested as an effective approach to improve the survival of probiotics in yogurt.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, Microencapsulation, Succinylated alginate, Probiotic yogurt

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2020.578849.1200

بررسی اثر ریزپوشانی با آلژینات سوکسینیله شده بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ویژگی‌های کیفی و حسی ماست حاوی آن طی دوره نگه‌داری

محمود فروزان‌تبار[۱]، سعید حسین‌زاده[۲*]، حمیدرضا قیصری[۳]، سید شهرام شکرفروش[٤]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲. استاد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳. دانشیار بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

٤. استاد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: hosseinzadeh@shirazu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۷/۸/۱۹ پذیرش نهایی: ۹۸/۱/۲۸)

چکیده

استفاده از تکنیک ریزپوشانی می‌تواند منجر به افزایش قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در فرآورده‌های لبنی طی دوره نگه‌داری گردد. یکی از راهکارهای پیشنهاد شده برای بهبود توانایی حفاظتی آلژینات مورد استفاده در ریزپوشانی، اصلاح شیمیایی آن است. در این پژوهش تأثیر سوکسینیله کردن آلژینات و کاربرد آن به‌عنوان ماده ریزپوشانی کننده در تهیه ریزپوشینه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر ویژگی‌های کیفی (pH، اسیدیته، آب اندازی و ظرفیت نگهداری آب)، خصوصیات حسی و قابلیت زنده‌مانی این باکتری در ماست طی ۲۱ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور چهار نمونه ماست شامل ماست فاقد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد، ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی و ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده تهیه گردید. نتایج آزمون‌های کیفی نشان داد که اسیدیته و آب‌اندازی ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات سوکسینیله شده در مقایسه با سایر نمونه‌ها کمتر و در مقابل pH و ظرفیت نگه‌داری آب آن نسبت به دیگر نمونه‌ها بیشتر بود. هم‌چنین نتایج حاصل از آزمون شمارش میکروبی و ارزیابی حسی نشان داد که ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با استفاده از آلژینات سوکسینیله شده به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش زنده‌مانی آن طی دوره نگه‌داری ماست گردید ($p<0/05$) بدون آن‌که اثر منفی معنی‌داری بر ویژگی‌های حسی ماست داشته باشد، لذا می‌توان ریزپوشانی با آلژینات سوکسینیله شده را به‌عنوان روشی موثر برای بهبود زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در ماست پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، ریزپوشانی، آلژینات سوکسینیله شده، ماست پروبیوتیک

مقدمه

طی دهه‌های گذشته تقاضای بازار برای پروبیوتیک‌ها به‌علت رشد آگاهی‌های عمومی درباره آثار سلامتی بخش آن‌ها به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته است به‌طوری که انتظار می‌رود تجارت جهانی محصولات پروبیوتیک از ۲۴/۲۳ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۱ به ۴۴/۹ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۸ افزایش یابد (Chen *et al.*, 2017). روبیوتیک-ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که اگر به تعداد کافی و به‌صورت زنده به روده انسان برسند، اثرات سلامتی بخش در میزبان بر جای می‌گذارند. فعالیت و زنده ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات سلامتی خش آن‌ها است. از اثرات سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها می‌توان به حفظ میکروفلور طبیعی روده، ارتقاء سیستم ایمنی بدن، کاهش عدم تحمل لاکتوز در افرادی که نمی‌توانند لاکتوز را هضم کنند، کاهش سطح کلسترول خون و خواص ضد جهش‌زایی و ضد سرطانی آن‌ها اشاره کرد. بر حسب استانداردها، برای بروز ویژگی‌های سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها، اید به تعداد 10^6 تا 10^7 از این میکروارگانیسم‌ها در هر گرم از محصول پروبیوتیک وجود داشته باشد و مصرف‌کننده نیز بایستی روزانه حداقل ۱۰۰ گرم از آن را مصرف نموده تا اثرات مفید این دسته از غذاها را دریافت کند (Doleyers *et al.*, 2005; Anal *et al.*, 2007; Mortazavian *et al.*, 2007).

مهم‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک گزارش شده در منابع مختلف متعلق به گونه‌های دو جنس *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیلوس* هستند (Savoie *et al.*, 2007). بیشترین قابلیت بقاء در فرآورده‌های تخمیری شیر از جمله ماست به *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus casei*) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*Lactobacillus acidophilus*) نسبت داده شده است. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* یک باکتری گرم مثبت، مزوفیل، هموفرمانتاتیو اجباری، یکروآئروفیل، کاتالاز منفی و فاقد اسپور بوده و ظرفیت بالایی برای تولید اسید دارد (Naeemi *et al.*, 2013).

در بین فرآورده‌های تخمیری شیر، ماست مهم‌ترین حامل باکتری‌های پروبیوتیک و عامل انتقال آن به مصرف‌کننده است. برای تهیه ماست پروبیوتیک علاوه بر باکتری‌های آغازگر ماست، باید باکتری پروبیوتیک در حین فرآیند خمیر و در محصول نهایی تا زمان مصرف به تعداد کافی وجود داشته باشد (Mohebbi *et al.*, 2008). هر چند که سیاری از فرآورده‌های لبنی تخمیری موجود در بازار فاقد استاندارد ذکر شده (10^6–10^7CFU/gr) هستند زیرا این گونه‌های پروبیوتیکی در شرایط اسیدی فرآورده از بین می‌روند. حتی اگر پروبیوتیک‌ها به تعداد کافی در حین تولید در محصول وجود داشته باشند در طول نگهداری با افزایش اسیدیته محصول به‌وسیله باکتری‌های تولیدکننده اسید از تعداد آن‌ها کاسته می‌شود. اسیدی شدن ماست طی نگهداری عامل اصلی از بین رفتن پروبیوتیک‌ها در محصول است. البته عوامل دیگری همچون پراکسید هیدروژن حاصل از باکتری‌های آغازگر نیز می‌تواند موجب مرگ پروبیوتیک‌ها شوند. یکی از

راهکارهایی که برای غلبه بر این مشکلات پیشنهاد شده است ریزپوشانی است (Homayouni *et al.*, 2008).

از دیدگاه میکروب‌شناسی، ریزپوشانی عبارت از پوشش دادن لایه‌ای از هیدروکلوییدها به دور میکروارگانیسم‌ها در مقیاس میکروسکوپی به‌منظور محصور کردن و تفکیک کردن آن‌ها از محیط است. در نتیجه این فرآیند، زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط مختلف محیطی از جمله شرایط دشوار و تخریبی دستگاه گوارش افزایش یافته و آزادسازی هدفمند پروبیوتیک‌ها را در مکان مناسب در پی دارد (Krasakoopt *et al*, 2003; Sultana *et al*, 2000). تاکنون طالعات زیادی در رابطه با ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با استفاده از ترکیبات گوناگون نظیر صمغ لوبیای لوکاست، گوار، کاراگینان (Ding and Shah, 2009)، زانتان، ژلان، پولولان، جامیلان (Jiménez-Pranteda *et al.*, 2012)، پکتین و پروتئین آب پنیر (Gebara *et al.*, 2013) صورت گرفته است. اما در این میان، آلژینات به میزان گسترده‌تری در فرآیند ریزپوشانی استفاده شده است. این ماده یک هتروپلی‌ساکارید خطی متشکل از واحدهای β-D- مانورونیک اسید و α-L- گلوکورونیک اسید است که از جلبک‌های دریایی استخراج می‌شود. از مزایای آلژینات می‌توان به ارزانی، غیر سمی بودن و سهولت تشکیل کپسول آن اشاره کرد (Anal *et al.*, 2007; Mortazavian *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2010). ریزپوشینه‌های تشکیل شده از آلژینات بسیار متخلخل بوده و همین امر موجب کاهش توان حفاظتی آن‌ها در شرایط اسیدی می‌شود. جهت افزایش مقاومت ریزپوشینه‌های آلژینات می‌توان ساختار شیمیایی آن را اصلاح نمود. برای اصلاح شیمیایی آلژینات روش‌های مختلفی وجود دارد که سوکسینیله کردن آلژینات از جمله آن‌ها است (Le-Tien *et al.*, 2004).

با توجه به این‌که تاکنون مطالعات بسیار کمی در خصوص اصلاح شیمیایی آلژینات و کاربرد آن به‌عنوان ریزپوشینه در فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک صورت گرفته است، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر ریزپوشانی با آلژینات سوکسینیله شده بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ویژگی‌های کیفی و حسی ماست حاوی آن طی دوره نگه‌داری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

- اصلاح شیمیایی آلژینات (سوکسینیله کردن آلژینات)

اصلاح شیمیایی آلژینات از طریق سوکسینیله کردن آن انجام گردید. ۵ گرم آلژینات‌سدیم (Sigma-Aldrich, Germany) در ٤٥٠ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ٤٠ درجه سلسیوس حل شده و pH آن با محلول هیدروکسیدسدیم (Merck, Germany) ۰/۵ مولار به ۸/۵ رسانده شد. سپس ۲۰ گرم سوکسینیل‌آنهیدرید (Sigma-Aldrich, Germany) به آرامی به محلول آلژینات‌سدیم اضافه شده و جهت انجام واکنش یک ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شد. پس از طی یک ساعت، pH با محلول هیدروکسیدسدیم ۰/۵ مولار به ۷ رسانده شد. محصول واکنش با افزودن اتانول خالص (Merck, Germany) به نسبت ۱:۳ رسوب داده شد و از طریق سانتریفیوژ کردن با

دور ۱۵۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری گردید. رسوب جمع‌آوری شده مجدداً در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و با ستفاده از کیسه دیالیز به‌مدت یک شب در دمای اتاق جهت حذف فرآورده‌های جانبی دیالیز گردید. محصول به‌دست آمده دوباره با اتانول خالص رسوب داده شد. رسوب حاصل با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون خالص (Merck, Germany) و نگه‌داری در گرمخانه ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت به‌صورت پودر خشک درآمد (Le-Tien et al., 2004).

- آماده‌سازی پروبیوتیک

باکتری خالص لیوفیلیزه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ((Lactobacillus acidophilus (PTCC 1643) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شد. باکتری در محیط MRS (De Man Rogosa Sharpe) مایع (Merck, Germany) کشت داده شد و به‌مدت ۲٤ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی در جار بی‌هوازی و حضور گازپک (Merck, Germany) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. سپس جهت دسترسی به کلونی خالص، در محیط MRS آگار (Merck, Germany) کشت داده شد. مجدداً کلونی خالص به‌دست آمده، به محیط MRS مایع منتقل شد. پس از یک شب گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، توده سلولی حاصل با سانتریفیوژ (Sorval, USA) در دمای ٤ درجه سلسیوس با سرعت ٤۲۰۰g به‌مدت ۵ دقیقه جداسازی شد. توده سلولی به‌دست آمده در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد به‌صورت سوسپانسیون درآمد و از طریق مقایسه با استاندارد مک‌فارلند غلظت مورد نظر تهیه گردید.

- ریزپوشانی کردن پروبیوتیک

ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با روش امولسیون‌سازی در بستر آلژینات‌کلسیم انجام شد. تمامی مواد و محیط‌های کشت مورد استفاده در فرآیند ریزپوشانی در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه و کلیه لوازم شیشه‌ای در آون با دمای ۱۸۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ ساعت استریل شدند.

برای تهیه ریزپوشینه‌های حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، یک قسمت از سوسپانسیون باکتریای حاوی CFU/ml ۱۰۱۰–۱۰۹ با چهار قسمت محلول ۳ درصد وزنی- حجمی ریزپوشانی‌کننده (آلژینات طبیعی/آلژینات سوکسینیله شده) استریل شده مخلوط و یک قسمت از این مخلوط با استفاده از سرنگ استریل به پنج قسمت روغن کانولا (فامیلا، ایران) حاوی ۵g/l توین ۸۰ (Merck, Germany) که توسط هم‌زن مغناطیسی با سرعت ٤۰۰ دور در دقیقه در حال هم‌خوردن بود به‌صورت قطره قطره اضافه شد. جهت تشکیل امولسیون آلژینات و روغن، خلوط به‌مدت ۲۰ دقیقه دیگر با سرعت ٤۰۰ دور در دقیقه هم‌زده شد. سپس جهت شکستن امولسیون و تشکیل ریزپوشینه‌های آلژینات‌کلسیم ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول کلریدکلسیم (Merck, Germany) ۰/۱ مولار با دمای ٤ درجه سلسیوس با استفاده از سرنگ استریل به‌صورت قطره قطره به داخل امولسیون در حال هم‌خوردن با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه اضافه شد و

به‌مدت ۲۰ دقیقه مخلوط گردید. آن‌گاه مخلوط برای تکمیل عمل ژلاتیناسیون و تشکیل ریزپوشینه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه به‌حالت سکون باقی ماند. فاز روغنی فوقانی توسط پیپت استریل تخلیه شد. جهت جداسازی ریزپوشینه‌ها فاز پایینی با سرعت ۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. ریزپوشینه‌های به‌دست آمده با محلول استریل آب‌پپتونه ۰/۱ درصد شستشو شد و تا زمان استفاده در محلول کلریدکلسیم ۰/۱ مولار پراکنده و در دمای ٤ درجه سلسیوس نگه‌داری گردید (Sheu and Marshall., 1993; Sultana et al, 2000).

- تولید ماست

در این تحقیق چهار نوع نمونه ماست تولید گردید و در ادامه قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ویژگی‌های کیفی و حسی ماست حاوی آن مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت:

الف) ماست فاقد *لاکتویاسیلوس اسیدوفیلوس* (C)

ب) ماست حاوی *لاکتویاسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد (F)

ج) ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی (N)

د) ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده (M)

ابتدا شیر (۲ درصد چربی و ۱۰/۸ درصد ماده خشک بدون چربی) در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. سپس دمای آن تا ٤۲ درجه سلسیوس کاهش داده شد و به‌میزان ۲ درصد حجمی- حجمی از مایه کشت تجاری YC-280 (CHR Hansen, Denmark) آماده‌سازی شده به آن تلقیح گردید. سپس شیر تلقیح شده در ظرف‌های پلی‌اتیلنی ۱۰۰ گرمی پر شده و در دمای ٤۲ درجه سلسیوس به‌مدت ٤-۳ ساعت گرمخانه گذاری شدند تا pH نهایی به حدود ٤/8 برسد. نمونه‌های ماست تهیه شده از گرمخانه خارج گردید و در یخچال با دمای ٤ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. برای تهیه نمونه‌های ماست پروبیوتیک، قبل از گرمخانه‌گذاری به‌میزان CFU/gr ۱۰۹ باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (آزاد و ریزپوشانی شده) تحت شرایط استریل به نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه‌های ماست تهیه شده طی ۲۱ روز دوره نگه‌داری در دمای ٤ درجه سلسیوس با آزمون‌های زیر و در سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند (Tamine and Robinson, 1985).

- اندازه‌گیری pH

pH نمونه‌های ماست با pH متر (CG 824, Germany) و مطابق با استاندارد ملی ایران اندازه‌گیری شد (ISIRI, 2852/2006).

- اندازه‌گیری اسیدیته

اسیدیته نمونه‌های ماست مطابق استاندارد ملی ایران از طریق تیتراسیون با هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال در حضور معرف فنل فتالئین تا ظهور صورتی کم‌رنگ اندازه‌گیری شد و نتیجه بر حسب درصد اسید لاکتیک گزارش گردید (ISIRI, 2852/2006).

- اندازه‌گیری میزان آب‌اندازی

۳۰ گرم نمونه ماست در لوله سانتریفیوژ توزین و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس با سرعت ۲۲۲g سانتریفیوژ (Dynac, USA) شد. سپس لایه فوقانی جدا و توزین گردید. میزان آب‌اندازی ماست با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد(Nouri et al., 2011).

$$\text{آب‌اندازی ماست (٪)} = \frac{\text{وزن لایه فوقانی پس از سانتریفیوژ کردن}}{\text{وزن ماست}} \times ۱۰۰$$

- اندازه‌گیری میزان ظرفیت نگه‌داری آب

۵ گرم نمونه ماست در لوله سانتریفیوژ توزین و به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰g در دمای ۱۰ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. پس از این عمل مایع فوقانی جداسازی شده و رسوب حاصل وزن شد. با استفاده از فرمول زیر ظرفیت نگه‌داری آب در هر نمونه ماست به‌دست آمد (Nouri et al., 2011).

$$\text{ظرفیت نگه‌داری آب ماست (٪)} = \frac{\text{وزن رسوب حاصل پس از سانتریفیوژ کردن}}{\text{وزن ماست}} \times ۱۰۰$$

- بررسی زنده‌مانی پروبیوتیک

تعداد باکتری‌های زنده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نمونه‌های ماست تهیه شده در روزهای ۱، ۷، ١٤ و ۲۱ دوره نگهداری شمارش و با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت. به‌منظور شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مطابق استاندارد ملی ایران از محیط کشت اختصاصی MRS/CL/CIP agar که حاوی دو آنتی بیوتیک کلیندامایسین (Sigma-Aldrich, Germany) با غلظت ۰/۱mg/L و سیپروفلوکساسین (Sigma-Aldrich, Germany) با غلظت ۱۰mg/L است جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های آغازگر ماست شامل *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* استفاده شد (ISIRI, 9616/2008).

به‌منظور تخریب ریزپوشینه‌ها و آزادسازی سلول‌های باکتری، مقدار ۱۰ گرم از نمونه ماست حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده در ۹۰ میلی‌لیتر محلول بافر سیترات سدیم (Merck, Germany) ۱ درصد وزنی-وزنی با pH=٦ اضافه شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه هم‌زده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این مخلوط درون ۹ میلی‌لیتر محلول استریل آب‌پپتونه ۰/۱ درصد رقیق‌سازی شد و

پس از کشت سطحی در محیط کشت اختصاصی MRS/CL/CIP agar، به‌مدت ۷۲ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی در جار بی‌هوازی و حضور گازپک در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد (Sheu and Marshall., 1993).

- ارزیابی حسی

جهت ارزیابی حسی نمونه‌های ماست از یک گروه ۱۰ نفری بر اساس سیستم امتیازدهی ٤ رتبه‌ای استفاده شد. برای این منظور تعداد ۱۰ نفر از بین دانشجویان دانشکده دامپزشکی انتخاب شدند و پس از آموزش‌های لازم از آنان درخواست شد نمونه‌ها را از نظر بافت، رنگ، طعم و بو ارزیابی کرده و در فرم مربوطه امتیاز آن را درج کنند. ارزیابی نمونه‌ها توسط گروه ارزیاب چشایی در روز اول و روز آخر دوره نگه‌داری انجام شد (Amerine et al., 1965).

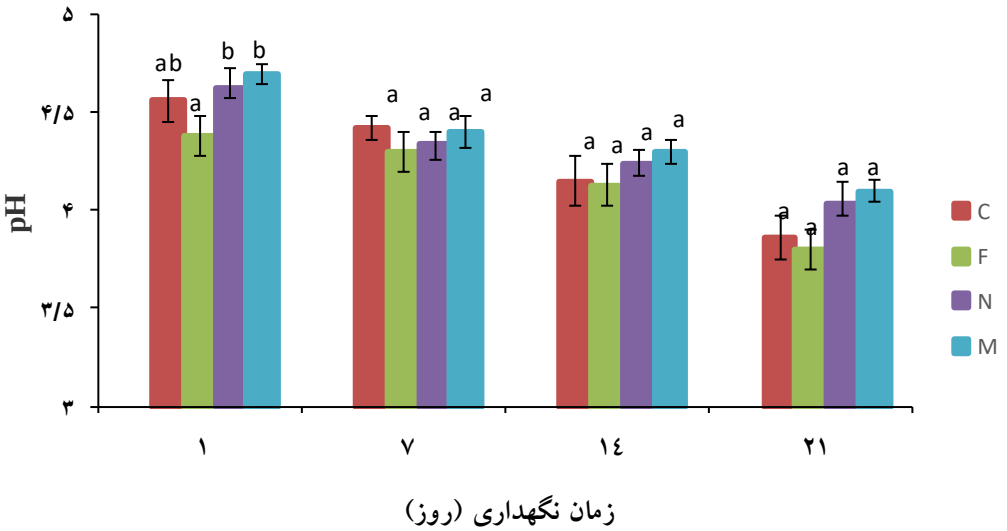
- تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Duncan برای داده‌های پارامتریک و آزمون Kruskal Wallis برای داده‌های غیرپارامتریک انجام شد. برای تمامی آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 صورت گرفت.

یافته‌ها

- pH

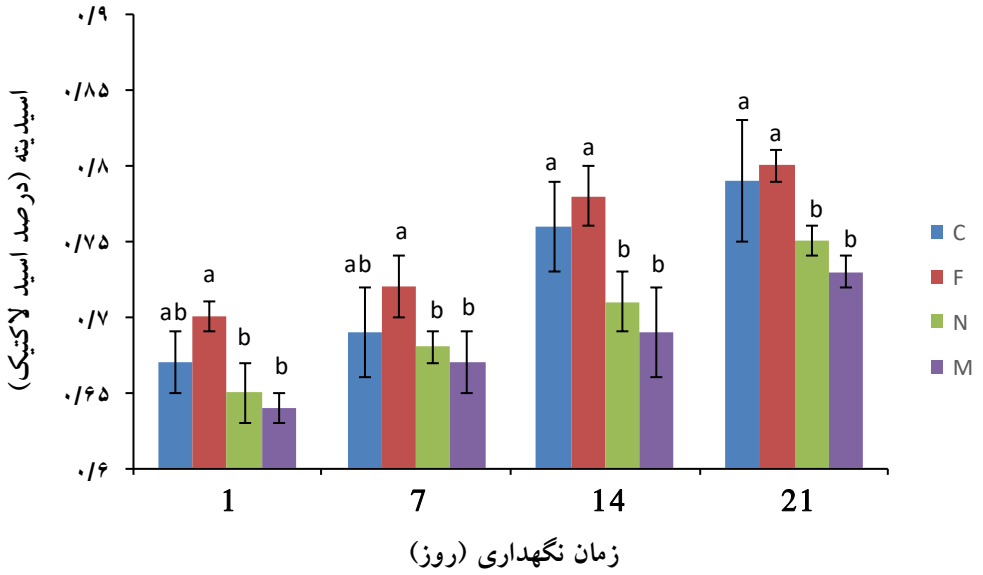
همان‌طور که در نمودار (۱) ملاحظه می‌شود pH نمونه ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد در روز اول به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر نمونه‌ها بوده است ($p<۰/۰۵$) که احتمالاً ناشی از فعالیت تخمیری پروبیوتیک آزاد است. در سایر روزهای دوره نگه‌داری بین pH نمونه‌های ماست تفاوت معنی‌داری وجود نداشته است.



نمودار (۱)- pH نمونه‌های ماست طی ۲۱ روز نگه‌داری در ٤ درجه سلسیوس. C: ماست فاقد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، F: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد، N: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی، M: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده.
a, b: حروف غیرمشابه در هر یک از روزهای آزمایش نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

- اسیدیته

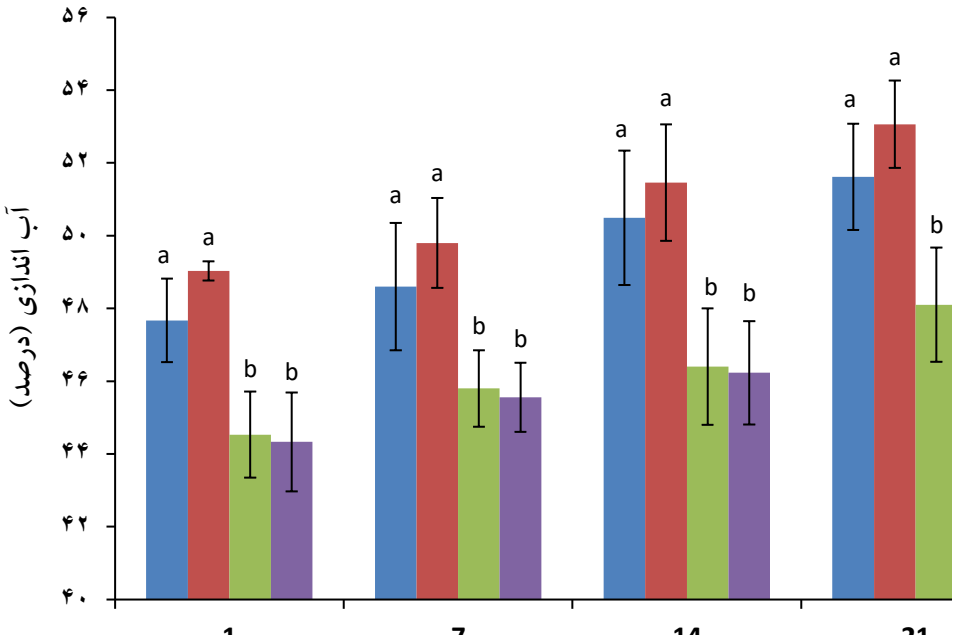
نمودار (۲) نشان می‌دهد اسیدیته نمونه‌های ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات طبیعی و سوکسینیله شده به‌طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های ماست فاقد و حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد طی دوره نگه‌داری بوده است (p<۰/۰۵). هم‌چنین هر چند اسیدیته نمونه ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات سوکسینیله شده طی دوره نگه‌داری کمتر از نمونه ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات طبیعی هست ولی این اختلاف معنی‌دار نیست.



نمودار (۲)- اسیدیته نمونه‌های ماست طی ۲۱ روز نگه‌داری در ٤ درجه سلسیوس. C: ماست فاقد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، F: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد، N: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی، M: ماست حاوی *لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده؛ a, b: حروف غیرمشابه در هر یک از روزهای آزمایش نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

- آب‌اندازی

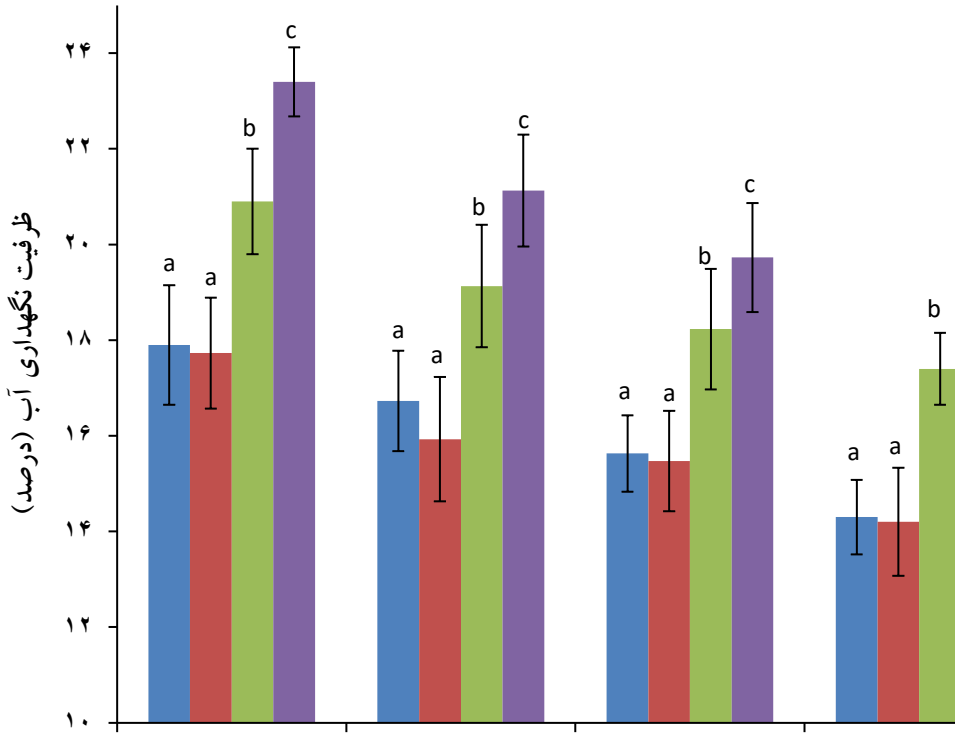
همان‌گونه که در نمودار (۳) مشاهده می‌شود میزان آب‌اندازی نمونه‌های ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات طبیعی و سوکسینیله شده به‌طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های ماست فاقد و حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد طی دوره نگه‌داری بوده است (p<۰/۰۵). در ضمن با وجود آن‌که کمترین میزان آب‌اندازی طی دوره نگه‌داری مربوط به نمونه ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات سوکسینیله شده است ولی تفاوت معنی‌داری با نمونه ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات طبیعی نداشته است.



نمودار (۳)- میزان آب‌اندازی نمونه‌های ماست طی ۲۱ روز نگه‌داری در ٤ درجه سلسیوس. C: ماست فاقد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، F: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد، N: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی، M: ماست حاوی *لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده؛ a, b: حروف غیرمشابه در هر یک از روزهای آزمایش نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

- ظرفیت نگه‌داری آب

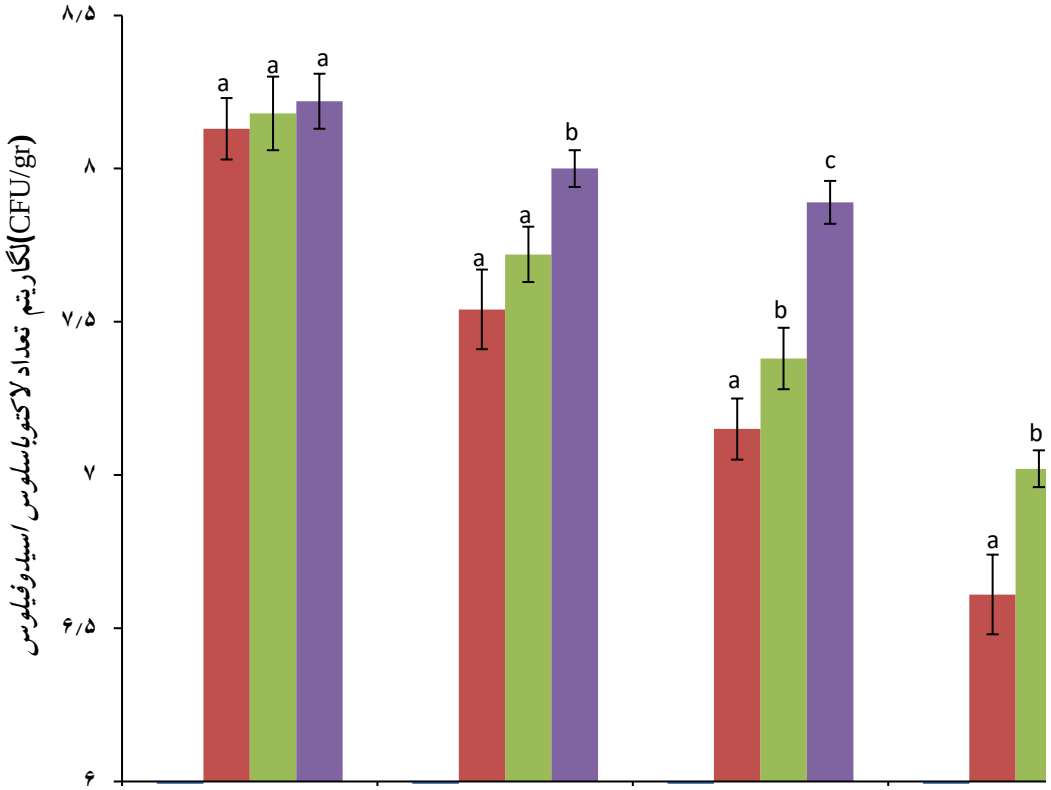
نمودار (٤) بیانگر آن است که ظرفیت نگه‌داری آب نمونه‌های ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات طبیعی و سوکسینیله شده به‌طور معنی‌داری بیش از نمونه‌های ماست فاقد و حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد طی دوره نگه‌اری بوده است (p<۰/۰۵). ضمناً ظرفیت نگه‌داری آب نمونه ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات سوکسینیله شده در روزهای ۱ و ۲۱ دوره نگه‌داری به‌طور معنی‌داری بیش از نمونه ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات طبیعی است (p<۰/۰۵) لیکن این اختلاف در روزهای ۷ و ١٤ دوره نگه‌داری معنی‌دار نبوده است.



نمودار (٤)- ظرفیت نگه‌داری آب نمونه‌های ماست طی ۲۱ روز نگه‌داری در ٤ درجه سلسیوس. C: ماست فاقد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، F: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد، N: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی، M: ماست حاوی *لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده؛ a, b, c: حروف غیرمشابه در هر یک از روزهای آزمایش نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

- زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

نتایج مربوط به‌شمارش تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* زنده موجود در نمونه‌های ماست طی ۲۱ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس در نمودار (۵) آورده شده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود به‌جز روز اول، تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نمونه ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات سوکسینیله شده به‌طور معنی‌داری بیش از نمونه‌های ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد و ریزپوشینه‌های آلژینات طبیعی بوده است ($p<۰/۰۵$). شایان ذکر است برای نمونه ماست فاقد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* هیچ‌گونه کلونی در محیط کشت اختصاصی MRS/CL/CIP agar طی دوره نگه‌داری مشاهده نگردید.



نمودار (۵)- لگاریتم تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نمونه‌های ماست طی ۲۱ روز نگه‌داری در ٤ درجه سلسیوس. F: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد، N: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی، M: ماست حاوی *لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده؛ a, b, c: حروف غیرمشابه در هر یک از روزهای آزمایش نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

- ارزیابی حسی

مطابق جداول (۱) و (۲) در روز اول و آخر دوره نگه‌داری تفاوت آماری معنی‌داری در شاخص‌های حسی (بافت، رنگ، طعم و بو) بین نمونه‌های مختلف ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (آزاد و ریزپوشانی شده) و نمونه ماست فاقد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌عنوان نمونه کنترل وجود نداشته است.

جدول (۱) – ارزیابی شاخص‌های حسی (میانگین ± انحراف از معیار) نمونه‌های ماست در روز اول نگه‌داری در ٤ درجه سلسیوس

نمونه‌ها	شاخص‌های حسی			
	بافت	رنگ	طعم	بو
C	۳/۱۰ ± ۰/۵٦^{a}	۳/۵۰ ± ۰/۵۲^{a}	۳/۰۰ ± ۰/٦٦^{a}	۳/۰۰ ± ۰/٤۷^{a}
F	۳/۱۰ ± ۰/۳۱^{a}	۳/٤۰ ± ۰/۵۱^{a}	۳/۱۰ ± ۰/۵٦^{a}	۲/۹۰ ± ۰/۵٦^{a}
N	۲/۹۰ ± ۰/۵٦^{a}	۳/۲۰ ± ۰/٦۳^{a}	۳/۲۰ ± ۰/٤۲^{a}	۳/۳۰ ± ۰/٤۸^{a}
M	۳/۰۰ ± ۰/٤۷^{a}	۳/۱۰ ± ۰/۳۱^{a}	۳/۲۰ ± ۰/٦۳^{a}	۳/۳۰ ± ۰/٤۸^{a}

C: ماست فاقد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، F: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد، N: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی، M: ماست حاوی *لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده؛ a: حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اختلاف آماری معنی‌داری است.

جدول (۲)– ارزیابی شاخص‌های حسی (میانگین ± انحراف از معیار) نمونه‌های ماست در روز آخر نگه‌داری در ٤ درجه سلسیوس

نمونه‌ها	شاخص‌های حسی			
	بافت	رنگ	طعم	بو
C	۲/۹۰ ± ۰/٤۲^{a}	۳/٤۰ ± ۰/۵۱^{a}	۳/۲۰ ± ۰/٦۳^{a}	۳/۲۰ ± ۰/٦۳^{a}
F	۲/۹۰ ± ۰/۳۱^{a}	۳/۳۰ ± ۰/٤۸^{a}	۳/۱۰ ± ۰/۵٦^{a}	۳/۲۰ ± ۰/٤۲^{a}
N	۳/۳۰ ± ۰/٤۸^{a}	۳/۲۰ ± ۰/٤۲^{a}	۳/٤۰ ± ۰/۵۱^{a}	۳/٤۰ ± ۰/۵۱^{a}
M	۳/۲۰ ± ۰/٤۲^{a}	۳/۰۰ ± ۰/٤۷^{a}	۳/۳۰ ± ۰/٤۸^{a}	۳/۵۰ ± ۰/۵۲^{a}

C: ماست فاقد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، F: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد، N: ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی، M: ماست حاوی *لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده؛ a: حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اختلاف آماری معنی‌داری است.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی نتایج اسیدیته و pH نمونه‌های ماست بیانگر افزایش اسیدیته و افت pH طی دوره نگه‌داری است که ناشی از فعالیت باکتری‌های موجود در ماست و تولید اسید می‌باشد. هم‌چنین یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد روند تغییرات اسیدیته و pH طی دوره نگه‌داری در نمونه‌های ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده در مقایسه با نمونه‌های ماست فاقد و حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد کندتر بوده و شدت این تغییرات در نمونه ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده نسبت به سایر نمونه ها کمتر است. مشکلی که در خصوص فرآورده‌های تخمیری مانند ماست وجود دارد این است که میزان اسید طی مدت زمان نگه‌داری محصول افزایش پیدا می‌یابد که تحت عنوان اسیدی شدن ثانویه (Post acidification) نامیده می‌شود که علت آن فعال ماندن آنزیم بتا گالاکتوزیداز در دمای ۵-۰ درجه سلسیوس است. در این مواقع ممکن است pH حتی به

زیر ٤/٢ برسد و باعث جدا شدن سرم ماست شده و زنده‌مانی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک (LAB) به‌دلیل افزایش یون‌های هیدروژن در مقایسه با یون‌های لاکتات تحت تأثیر قرار بگیرد (Kailasapathy *et al*., 2006). نتایج برخی مطالعات نشان داده است که میزان اسیدی شدن ثانویه در ماست حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده در مقایسه با ماست حاوی پروبیوتیک آزاد کمتر است (Kailasapathy *et al*., 2006; Mortazavian *et al*., 2007) که با یافته‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد.

آب‌اندازی یکی از ویژگی‌های نامطلوب ماست است که در نتیجه بازآرایی شبکه ژلی روی می‌دهد و سبب افزایش تعداد اتصالات ذرات شده و لذا شبکه تمایل به چروکیدگی پیدا کرده و مایع داخلی به خارج ترشح می‌کند (Tamine and Robinson, 1985). هیدروکلوئیدها از طریق افزایش ویسکوزیته ظاهری فاز پیوسته و ایجاد شبکه ژلی ضعیف و به دام انداختن آب و میسل‌های کازئینی در این شبکه، جداسازی فاز سرم و رسوب لخته‌های کازئین را طبق قانون استوک به تعویق می‌اندازند و یا این‌که طی برهم‌کنش‌های کلوئیدی و برقراری ارتباط بین آب و کازئین مشکل آب‌انداختگی را کاهش و ظرفیت نگه‌داری آب را افزایش می‌دهد (Amice-Quemeneur *et al*., 1995). بررسی نتایج آب‌اندازی و ظرفیت نگه‌داری آب نمونه‌های ماست نشان دهنده افزایش آب‌اندازی و کاهش ظرفیت نگه‌داری آب طی ٢١ روز نگه‌داری در ٤ درجه سلسیوس است. ضمناً یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که افزودن *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده بیش‌ترین تأثیر را در کاهش آب‌اندازی و افزایش ظرفیت نگه‌داری آب ماست نسبت به سایر نمونه‌ها داشته است. این امر می‌تواند ناشی از پایین‌تر بودن میزان اسیدیته در نمونه ماست حاوی ریزپوشینه‌های آلژینات سوکسینیله شده و نیز تأثیر سوکسینیله کردن آلژینات در افزایش تعداد گروه‌های کربوکسیل در ساختار آلژینات و در نتیجه افزایش بار الکتریکی شبکه باشد (Le-Tien *et al*., 2004, Kailasapathy *et al*., 2006).

نتایج شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نمونه‌های ماست طی ٢١ روز نگه‌داری در ٤ درجه سلسیوس بیانگر آن است که جمعیت اولیه باکتری در حالت آزاد، ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی و آلژینات سوکسینیله شده به‌ترتیب ١/٥٢، ١/١٥ و ٠/٥١ سیکل لگاریتمی کاهش داشته‌اند. علت اصلی زنده‌مانی بیشتر باکتری‌های ریزپوشانی شده به اثر حفاظتی ریزپوشینه احاطه‌کننده باکتری در ارتباط است که با یافته‌های مطالعات قبلی انطباق دارد (Sultana *et al*., 2000; Kailasapathy *et al*., 2005; Homayouni *et al*., 2008; Prantedael *et al*., 2012). هم‌چنین نتایج این تحقیق نشان داد که اثر ریزپوشینه‌های آلژینات سوکسینیله شده در حفاظت از زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی ٢١ روز نگه‌داری ماست به‌طور معنی‌داری بیش از ریزپوشینه‌های آلژینات طبیعی بوده است ($p<0/05$). سوکسینیله کردن آلژینات از طریق افزایش تعداد گروه‌های کربوکسیل در زنجیره پلیمری سبب بالا بردن ظرفیت بافری آلژینات شده و از این طریق پایداری باکتری‌ها در

برابر شرایط اسیدی افزایش می‌یابد. یافته‌های مطالعه‌ای نشان داد در شرایط شبیه‌سازی شده اسیدی معده زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*Lactobacillus rhamnosus*) ریزپوشانی شده با آلژینات طبیعی نسبت به فرم آزاد حداکثر ۲۶ درصد افزایش یافته است درحالی‌که ریزپوشانی باکتری با آلژینات سوکسینیله شده این میزان را به ۶۶ درصد افزایش داد (Le-Tien *et al.*, 2004). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که ریزپوشانی *بیفیدوباکتریوم لانگوم* (*Bifidobacterium longum*) با آلژینات پالمیته شده در مقایسه با آلژینات طبیعی تأثیر قابل ملاحظه‌ای در حفظ بقای این باکتری در پنیر چدار طی ۲۰ روز نگه‌داری در دمای ٤ درجه سلسیوس داشته است (Amine *et al.*, 2014).

مطابق ارزیابی حسی تفاوت معنی‌داری در بافت، رنگ، طعم و بوی نمونه‌های ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (آزاد و ریزپوشانی شده) در مقایسه با نمونه ماست فاقد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد به‌عنوان نمونه کنترل مشاهده نشده است که با نتایج برخی محققان در خصوص عدم اثر قابل ملاحظه افزودن پروبیوتیک‌ها به‌صورت آزاد و ریزپوشانی شده بر روی خصوصیات حسی ماست مطابقت دارد (Ribeiro *et al.*, 2014).

در مجموع یافته‌های این پژوهش مشخص نمود که استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سوکسینیله شده ضمن افزایش ظرفیت نگه‌داری آب و کاهش آب‌اندازی ماست، می‌تواند به‌طور چشم‌گیری موجب افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در ماست شود بدون آن‌که اثر منفی معنی‌داری بر ویژگی‌های حسی آن داشته باشد.

سپاسگزاری

از کارشناسان محترم بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی شیراز به‌خاطر همکاری در انجام آزمایش‌ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Amerine, M.A., Pangborn, R.M., and Roessler, E.B. (1965). Principles of Sensory Evaluation of Food. 1st Edition, Academic press, New York, pp. 53-63.
- Amice-Quemeneur, N., Haluk, J.P. and Hardy, J. (1995). Influence of the acidification process on the colloidal stability of acidic milk drinks prepared from reconstituted nonfat dry milk. Journal of Dairy Science. 78(12): 2683-2690.
- Amin, T., Thakur, M., and Jain., S.C. (2013). Microencapsulation the future of probiotic cultures. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 9(4): 35-43.
- Anal, A.K., and Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science and Technology. 18(5): 240–251.

- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. and Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. Journal of Food Engineering. 104(4): 467-483.
- Chen, H.Y., Li, X.Y., Liu, B.J. and Meng, X.H. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. Journal of Functional Foods, 29: 248–255.
- Ding, W.K. and Shah, N. P. (2009). Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. Journal of Food Science, 74(2): 100-107.
- Doleyres, Y., and Lacroix, C. (2005). Technologies with free and immobilised cells for probiotic *bifidobacteria* production and protection. International Dairy Journal, 15(10): 973-988.
- Gebara, C., Chaves, K.S., Ribeiro, M.C.E., Souza, F.N., Grosso, C.R.F. and Gigante, M.L. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. Food Research International, 51(2): 872–878.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S. and Razavi, S.H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chemistry. 111(1): 50–55.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2006). Milk and milk products- Determination of titrable acidity and value pH- test method. 1st revision, ISIRI No. 2852. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2008). Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium – Colony-count technique at 37˚C. 1st revision, ISIRI No. 9616. [In Persian]
- Islam, M.A., Yun, C.H., Choi, Y.J. and Cho, C.S. (2010). Microencapsulation of live probiotic bacteria. Journal of Microbiology and Biotechnology. 20(10): 1367-1377.
- Jiménez-Pranteda, M.J., Poncelet, D., Náder-Macías, M.E., Arcos, A., Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M. *et al.*, (2012). Stability of *lactobacilli* encapsulated in various microbial polymers. Journal of Bioscience and Bioengineering. 113(2): 179–184.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal. 13(1): 3-13.
- Le-Tien, C., Millette, M., Mateescu, M.A. and Lacroix, M. (2004). Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization. Biotechnology and Applied Biochemistry. 39(3): 347–354.
- Mohebbi, M. and Ghoddusi, H.B. (2008). Rheological and sensory evaluation of yogurts containing probiotic cultures. Journal of Agriculture Science Technology. 10: 147-155.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M.R. and Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian Journal of Biotechnology. 5: 1-18.
- Naeemi, H., Mortazavi, S.A., Milani, E., Koochaki, A. (2013). The influence of adding inulin and encapsulation on survivability *Lactobacillus casei* storage of symbiotic yoghurt. Journal of Food Science and Technology. 40(10): 27-36.
- Nouri, M., Ezzatpana, H. and Abbasi, S. (2011). Application of renneted skim milk as a fat mimetics in nonfat yogurt. Food and Nutrition Sciences. 2: 541-548.
- Ribeiro, M.C.E., Chaves, K.S., Gebara, C., Souza, F.N., Grosso, C.R.F. and Gigante, M.L. (2014). Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. Food Research International. 66: 424-431.

- Savoie, S., Champagne, C.P., Chiasson, S. and Audet, P. (2007). Media and process parameters affecting the growth, strain ratios and specific acidifying activities of a mixed lactic starter containing aroma producing and probiotic strains. Journal of Applied Microbiology. 103(1): 163–174.
- Sheu, T.Y. and Marshall, R.T. (1993). Microencapsulation of *lactobacilli* in calcium alginate gels. Journal of Food Science. 54(3): 557–561.
- Sultana, K.H., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. International Journal of Food Microbiology. 62(1-2): 47–55.
- Tamine, A.Y. and Robinson, R.K. (1985). Yogurt Science and Technology. Pergamon Press, London, pp. 365–373.