

(مقاله پژوهشی)

اثر افزودن اینولین و گالاتواولیگوساکارید بر زنده مانگی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی ریزپوشانی شده در آبمیوه ترکیبی سیب-زردآلو

رقیه اشرفی یورقانلو^{۱*}، لاله مهربار^۲، نگین کریم پور^۳

۱- استادیار، گروه صنایع غذایی، دانشگاه فنی و حرفه‌ای، ارومیه، ایران.

۲- دکتری، علوم و صنایع غذایی، مدرس دانشگاه فنی و حرفه‌ای، ارومیه، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی گروه صنایع غذایی دانشگاه فنی و حرفه‌ای، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۰۸

چکیده

در سال‌های اخیر تقاضا برای محصولات پروبیوتیکی بر پایه محصولات غیر لبنی افزایش یافته است. در همین راستا هدف از این تحقیق بررسی امکان استفاده از آب میوه ترکیبی سیب- زردآلو بعنوان حامل باکتری پروبیوتیک میکروانکپسوله و ارزیابی اثر اینولین و گالاتواولیگوساکارید (GOS) در غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲٪ بر قابلیت زنده مانگی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله در طول ۲۸ روز نگهداری در آبمیوه و همچنین جایگزین نمودن شکر با شربت ذرت با فروکتوز بالا بدلیل کاهش اثرات سوء مصرف بالای ساکارز بود. نتایج آنالیز واریانس حاکی از اثر معنی دار اینولین و GOS بر قابلیت زنده مانگی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله در طول زمان نگهداری بود ($p < 0/05$). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین کاهش در میزان pH در نمونه کنترل بدست آمد که برابر ۰/۴۳-۰/۳۲ بود. در نمونه های تحت تیمار کمترین کاهش pH به نمونه های حاوی ۱٪ اینولین و GOS تعلق داشت که به ترتیب برابر ۰/۲۴ و ۰/۱۱ بود و در مقایسه با نمونه کنترل این اختلاف معنی دار بود ($p < 0/05$). به طور کلی نتایج نشان داد که اینولین و GOS باعث افزایش زنده مانگی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به نمونه کنترل گردید، به طوریکه با بررسی اثر این دو ترکیب بر تغییرات این باکتری در نمونه های آب میوه این نتیجه حاصل شد که در طول ۲۸ روز نگهداری محصول در دمای یخچال، در نمونه کنترل ۱/۷۸-۱/۷۴ سیکل لگاریتمی کاهش ولی در نمونه های حاوی ۱٪ اینولین و ۲٪ GOS کمترین کاهش در تعداد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به نمونه شاهد و سایر تیمارها صورت گرفت که به ترتیب برابر ۰/۶۶ و ۰/۶۳ سیکل لگاریتمی بود ($p < 0/05$). همچنین افزودن هر دو نوع پری بیوتیک GOS و اینولین در طی میکروانکپسولاسیون باعث افزایش مقاومت باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده به کاهش pH و حضور نمک‌های صفراوی در شرایط مشابه دستگاه گوارش گردید که در این شرایط نیز اختلاف معنی داری بین غلظت ۱٪ این دو ترکیب از نظر زنده مانگی لاکتوباسیلوس کازئی وجود نداشت در حالیکه غلظت ۲٪ GOS بهتر عمل کرده است. بنابراین طبق نتایج این تحقیق میتوان گفت که پری بیوتیک اینولین در حفظ زنده مانگی باکتری پروبیوتیک در محیط آبمیوه و دستگاه گوارش تا غلظت ۱٪ بهتر از GOS عمل کرده است ولی در غلظت بالاتر GOS بهتر بود.

واژه های کلیدی: اینولین، گالاتواولیگوساکارید، لاکتوباسیلوس کازئی، زردآلو، پرو بیوتیک

۱- مقدمه

غذای عملگرا به غذایی اطلاق می شود که علاوه بر ارزش غذایی باعث بهبود سلامتی و کاهش خطر ابتلا به بیماری ها می گردد (۱۹). مصرف محصولات غذایی حاوی باکتری های زنده پروبیوتیک برای مصرف کنندگان اثرات سلامت بخش فراوان از جمله بهبود عملکرد سیستم گوارشی، تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول خون و خواص ضد سرطانی دارد (۳۱، ۳۶). باکتری های پروبیوتیک، میکروارگانیسم های زنده ای هستند که بعد از مصرف در روده ساکن شده و از طریق بهبود میکروفلور طبیعی روده اثرات مفیدی در سلامتی انسان بر جای می گذارند (۲۹). در کشور ما بیشترین سهم محصولات پروبیوتیک عرضه شده به بازار را محصولات پروبیوتیک بر پایه لبنیات تشکیل می دهند (۲). اما در سال های اخیر تقاضا برای محصولات پروبیوتیکی بر پایه محصولات غیر لبنی افزایش یافته است و علت این امر وجود مشکلاتی از قبیل خصوصیات عدم تحمل لاکتوز در برخی از افراد و وجود کلسترول در فرآورده های لبنی است که باعث کاهش مصرف این محصولات گشته و به تدریج محصولات پروبیوتیک غیر لبنی توسعه یافته است. آب میوه ها می توانند حامل مناسبی برای پروبیوتیک و جایگزین خوبی برای فرآورده های لبنی پروبیوتیک باشند (۳۴، ۸، ۲۶)، زیرا این فرآورده ها بدلیل غنی بودن از نظر خواص آنتی اکسیدانی، پلی فنل ها و ویتامین ها در دسته غذاهای سالم قرار می گیرند. علاوه بر این حاوی قند فراوان و ترکیبات مهار کننده اکسیژن مانند اسید آسکوربیک بوده و باعث تقویت شرایط بی هوازی می گردند و تمامی این عوامل کنار هم باعث افزایش رشد پروبیوتیک ها می گردند (۲۶، ۲۴، ۲۸، ۱۷). قابلیت زنده ماندن این باکتری ها در طول تولید و نگهداری برای تأمین اثرات سلامتی بخش بسیار مهم می باشد، به طوری که در پایان تاریخ مصرف محصول تعداد سلول های زنده بایستی $10^6 - 10^7$ cfu در یک میلی لیتر یا یک گرم محصول باشد (۱۳). زیرا تعداد قابل توجهی از این باکتری ها در طول تولید و نگهداری و در حین عبور از دستگاه گوارش از بین می روند، بنابراین، یکی از پارامترهای مهم در

تولید محصولات پروبیوتیک انتخاب سوش مناسب می باشد که در برابر شرایط خاص معده و صفرا و همچنین شرایط نامناسب تولید و نگهداری مقاوم بوده و زنده بماند. لاکتوباسیلوس کازئی یکی از مهم ترین گونه های پروبیوتیک می باشد و کاربرد وسیعی در فرآورده های غذایی پیدا کرده است. لاکتوباسیلوس کازئی یک باکتری گرم مثبت، میله ای، غیر اسپورزا و غیر متحرک است. پیاد و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که پری بیوتیک ها ترکیبات غذایی غیر قابل هضمی هستند که رشد یا فعالیت باکتری ها در دستگاه گوارش را سرعت می بخشند. به طور کلی این ترکیبات تعداد یا فعالیت باکتری های اسید لاکتیک و بیفیدوباکترها را افزایش می دهند (۲۷). اینولین و گالاتو الیگوساکاریدها مثالی از همین ترکیبات هستند. اینولین یک ماده پری بیوتیک می باشد که منجر به تحریک رشد باکتری های پروبیوتیک و تولید اسید چرب کوتاه زنجیر و کاهش pH روده می گردد، در نتیجه از فعالیت باکتری های پاتوژن و جذب کلسترول جلوگیری میکند و از سرطان کولون کاسته و جذب املاح کلسیم و منیزیم را افزایش می دهد (۱۵). اینولین طعم خنثی و مطبوعی دارد و برای بهتر شدن احساس دهانی، پایداری و قابلیت پذیرش مواد غذایی کم چرب و بعنوان عامل تشکیل بافت کم کالری به کار می رود که این خصوصیت اینولین به توانایی اش برای پیوند با مولکول های آب و تشکیل ژل نسبت داده شده است (۵). گالاتو الیگوساکاریدها نیز ترکیبات غیر قابل هضم بر پایه کربوهیدرات می باشند که با فعالیت آنزیمی بتا گالاتوزیداز در طی واکنش ترانس گالاتوزیلاسیون لاکتوز تولید شده و ممکن است شامل گلوکز-گالاتوز، گالاتوز-گالاتوز و یا شامل چندین گالاتوز متصل به گلوکز باشند (۳۰). این ترکیبات حلالیت بالایی داشته، طعم آنها تا حدودی شیرین است و ویسکوزیته ای مشابه شربت ذرت با فروکتوز بالا دارند. همچنین حضور پیوندهای از نوع بتا، این ترکیبات را به تجزیه در دمای بالا و در محیط اسیدی مقاوم کرده است (۳۳). در مطالعات انجام شده، مشاهده گردیده است که گالاتو الیگوساکارید با افزایش باکتری های لاکتیک اسید باعث افزایش رشد و افزایش

باکتری‌های پروبیوتیک‌ها زنده بالاتر از حداقل دوز درمانی بود (۲۳). از آنجایی که آب میوه ترکیبی سیب-زردآلو دارای ارزش تغذیه‌ای بالا و طعم مطلوبی می‌باشد، در این تحقیق مورد توجه قرار گرفت و بخاطر اینکه زنده ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات سلامتی بخش این باکتری‌ها می‌باشد، هدف از این تحقیق بررسی اثر ترکیبات پری بیوتیک اینولین و گالاکتو اولیگوساکاریدها بر زنده ماندن باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله در آب میوه ترکیبی سیب-زردآلو در طی نگهداری آبمیوه به مدت ۲۸ روز بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- روش تهیه آب میوه ترکیبی سیب-زردآلو

کنسانتره سیب و پوره زردآلوی ارگانیک از کارخانجات منطقه تهیه و در دمای 18°C تا زمان تهیه آب میوه نگهداری شدند. کنسانتره سیب و پوره زردآلو به نسبت ۱:۱ مخلوط و سپس تا بریکس 15° با استفاده از آب مقطر و شکر (یا شربت ذرت با فروکتوز بالا) آماده سازی شده و در دمای 80°C به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شد.

۲-۲- آماده کردن باکتری لاکتوباسیلوس کازئی

باکتری لاکتوباسیلوس کازئی از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی خریداری شد. سپس در شرایط استریل، بسته‌ها باز و در ۵mL محیط کشت مایع MRS^۲ به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C و با شرایط میکروآنروپیل گرمخانه گذاری شد. سپس با پاساژهای مکرر حجم محیط کشت به ۱۲۰ mL رسانده شد و تا بدست آمدن حجم مورد نظر از بیومس ادامه پیدا کرد. در نهایت بیومس توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار در دور $10000 \times g$ در دمای 4°C به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد و سپس با استفاده از محلول پیتون استریل ۱٪، دو بار شستشو شده و تا زمان تلقیح در دمای 4°C در یخچال نگهداری شد.

تحمل استرس و تعدیل میکروبیوت روده‌ای در موجودات خشک‌زی و آبی می‌شود (۲۱). به منظور بهبود زنده ماندن پروبیوتیکها و کاهش اثرات تخریبی ناشی از تغییرات pH، تنش‌های مکانیکی، شرایط ماده غذایی و شرایط نامساعد اسیدی- صفاوی دستگاه گوارش، از فرآیند ریزپوشانی^۱ نیز استفاده می‌شود (۲۲). از دیدگاه میکروبی شناسی، ریزپوشانی عبارت است از پوشش دادن لایه‌ای از هیدروکلویدها به دور سلولهای ریز زنده در مقیاس میکروسکوپی، به منظور محصور کردن و تفکیک کردن آن‌ها از محیط، که در نتیجه آن، زنده ماندن پروبیوتیک‌ها در شرایط مختلف محیطی افزایش می‌دهد و آزاد سازی هدفمند پروبیوتیک‌ها را (در مکان و زمان مناسب) در پی دارد در نتیجه ریزپوشانی، می‌تواند زنده ماندن پروبیوتیک‌ها را در شرایط دشوار و تخریبی دستگاه گوارش بهبود بخشد (۲۲). در همین راستا کاپلا و همکاران (۲۰۰۶)، بیان نمودند که میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها همراه با پروبیوتیک‌ها، باعث بهبود زنده ماندن سلول‌ها در محصولات می‌شود اما در سیستم‌های مشابه سازی شده گوارشی تأثیری ندارند (۱۰). ویوک در سال ۲۰۱۳ میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم ۳۲۱ و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ۲۳۵ را همراه با پری بیوتیک‌های فروکتو اولیگوساکارید در dahi (نوعی ماست محلی هندی) بررسی کردند و مشاهده کردند که تعداد سلول‌های میکروانکپسوله شده در مقایسه با سلول‌های آزاد در طی نگهداری در دمای 4°C بعد از ۲۰ روز بالاتر بود (۳۴). طبق مطالعه‌ای که توسط کراسیکوت و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت، میکروانکپسولاسیون لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در گرانول‌های آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان مورد بررسی قرار گرفته و نتایج قابل قبولی از زنده ماندن پروبیوتیک‌ها هم در ماست و هم در شرایط شبیه سازی شده گوارشی شامل شیره گوارشی و محلول‌های صفاوی به دست آمد و تعداد

باکتری لاکتوباسیلوس کازئی با دوز $10^9 \times 5-6$ باکتری در هر میلی لیتر تلقیح شد.

۲-۵-۰- آزمایشات

۲-۵-۱- اندازه گیری ترکیبات آب میوه

به منظور بررسی تأثیر باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بر pH آب میوه ترکیبی سیب-زردآلو، pH آب میوه در طول ۲۸ روز نگهداری با استفاده از دستگاه pH متر اندازه گیری شد. اندازه گیری اسیدیته با استفاده از روش پتانسیومتری مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۸۲ انجام گردید. اندازه گیری محتوی قند کل نیز بر اساس روش انجام آزمون قند کل مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۲۶۸۲ به روش فهلینگ انجام گردید (۳).

۲-۵-۲- شمارش باکتری های پروبیوتیک

شمارش باکتری های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی) در نمونه های آبمیوه تولید شده بلافاصله پس از تولید و در فواصل ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز بعد از نگهداری نمونه های در دمای یخچال با استفاده از محیط کشت MRS agar بر اساس روش استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۳۲۵ صورت گرفت (۱).

۲-۶- روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

جهت بررسی نتایج از طرح آماری کاملاً تصادفی به روش فاکتوریل استفاده شد. اطلاعات با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال آلفا برابر با ۰/۰۵ با همین نرم افزار انجام گرفت. متغیرهای فرآیند شامل نوع پری بیوتیک (اینولین و گالاکتوالیگوساکارید)، سطوح مورد استفاده (۰/۵، ۱ و ۲ درصد) و زمان نگهداری (۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز) می باشد که در سه تکرار انجام شد. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد.

۲-۳- میکروانکپسولاسیون باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و ترکیبات پری بیوتیک

میکروانکپسولاسیون توسط تکنیک اکستروژن طبق روش کراسیکوت و همکارا (۲۰۰۴) انجام گرفت (۲۳). کشت های باکتری بعد از شستشو به ۵ mL از محلول های اینولین (۰/۵، ۱ و ۲٪) یا گالاکتوالیگوساکارید (۰/۵، ۱ و ۲٪) افزوده شدند. سپس با ۲۰ mL از محلول آلژینات سدیم ۲٪ (w/v) که قبلاً در 121°C به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده بود، مخلوط گردیدند. سوسپانسیون سلولی با استفاده از یک سوزن 1 mm به داخل کلرید کلسیم ۰/۰۵ مولار استریل تزریق شد. به گرانول ها^۱ به مدت ۳۰ دقیقه جهت تشکیل ژل زمان داده شد و سپس آب آنها حذف گردیده و در محلول پیتون ۰/۱٪ در 4°C نگهداری شدند. به منظور پوشش دهی با کیتوزان، گرانول های آلژینات توسط کیتوزان در یک روش ۲ مرحله ای پوشش داده شدند. کیتوزان با وزن مولکولی پایین (۰/۴ گرم و ویسکوزیته ۱۴MPa در محلول w/v ۱٪ سیگما) در ۹۰ mL آب مقطر حل شده، سپس با ۰/۴ mL از اسید استیک گلاسیال تا حصول غلظت نهایی ۰/۴ درصد (w/v) اسیدی گردید. pH نمونه ها نیز با افزودن ۱ مولار NaOH در محدوده ۵/۷ تا ۶ تنظیم گردید. مخلوط حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ صاف شده و حجم محلول به ۱۰۰ mL رسانده و سپس در دمای 121°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. ۱۵ گرم از گرانول های شسته شده در ۱۰۰ mL از محلول کیتوزان غوطه ور شده و به مدت ۴۰ دقیقه به منظور پوشش دهی هم زده شد. گرانول های پوشش داده شده با کیتوزان شسته شده و در محلول پیتون ۰/۱٪ در دمای 4°C نگهداری شدند.

۲-۴- تلقیح سلول های باکتری لاکتوباسیلوس کازئی

به آب میوه ترکیبی سیب-زرد آلو

در ظروف آزمایش ۴۰۰mL آب میوه ترکیبی سیب-زردآلو پاستوریزه شده ریخته شد و سپس تمام نمونه ها با

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مقایسه‌ای تأثیر شکر و شربت ذرت با فروکتوز بالا در محیط رشد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی

ابتدا به عنوان پیش مطالعه تأثیر جایگزینی شکر با شربت ذرت با فروکتوز بالا بر زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی انکپسوله شده بررسی شد و تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. لذا در ادامه مطالعه تهیه آب میوه با استفاده از شربت ذرت با فروکتوز بالا انجام گرفت. برای انتخاب سوش مناسب از باکتری بایستی ابتدا شرایط فیزیوشیمیایی آب میوه ترکیبی سیب- زردآلو مورد بررسی قرار گیرد تا سازگاری باکتری مورد نظر با شرایط آب میوه مشخص گردد. نتایج آزمون‌های ویژگی‌های فیزیوشیمیایی آب میوه ترکیبی سیب- زردآلو در جدول ۱ آورده شده است. نتایج حاصل بیانگر این بود که این آب میوه یک محیط رشد اسیدی برای باکتری است. از جمله معیارهایی که منجر

به قابلیت یک آب میوه به عنوان حامل پروبیوتیک می‌گردد تا رشد باکتری پروبیوتیک فراهم شده و در زمان نگهداری تعداد باکتری‌های مذکور کاهش شدید نیابد، عبارتند از: مطلوب بودن pH و میزان قند کل موجود در آب میوه. بررسی خصوصیات فیزیوشیمیایی نشان داد که میزان قند کل آب میوه ترکیبی سیب-زردآلو قابل توجه می‌باشد و باکتری لاکتوباسیلوس کازئی با دارا بودن قابلیت تخمیر قندهای فروکتوز، گالاکتوز، ساکارز، مانوز و تراهالوز قابلیت رشد در محیط این آب میوه ترکیبی را پیدا می‌کند (۱۴). pH آب میوه ترکیبی سیب- زردآلو طبق جدول ۳/۸ می‌باشد. باکتری مذکور یکی از گونه‌های مقاوم به شرایط اسیدی مانند شیره معده و نمک‌های صفاوی می‌باشد و در داخل فرآورده‌های تخمیری نیز وجود دارد. بنابراین، آب میوه ترکیبی سیب- زردآلو نیاز تغذیه‌ای این باکتری را تا حدودی تأمین می‌کند.

جدول ۱- خصوصیات فیزیوشیمیایی آب میوه ترکیبی سیب- زردآلو

محتوای قند کل (g/L)	اسیدیته (100g/mL)	pH
۱۶۰±۵	۱/۴±۰/۳	۳/۸±۰/۲

۳-۲- بررسی تغییرات pH

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر ساده اینولین و همچنین اثر متقابل آن با زمان نگهداری بر تغییرات pH معنی‌دار بود ($p < 0/05$). در مورد GOS نیز اثر ساده آن معنی‌دار بود ولی اثر متقابل آن با زمان نگهداری بر کاهش pH موثر نبود ($p > 0/05$). تغییرات pH در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم برای آب میوه ترکیبی سیب- زردآلو حاوی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. نتایج اثر اینولین بر pH در طول ۲۸ روز نگهداری آب میوه ترکیبی سیب- زردآلو نشان داد که با گذشت زمان نگهداری از میزان pH در همه تیمارها کاسته شد بطوریکه در نمونه کنترل از مقدار ۳/۷۵ در روز تولید تا ۳/۴۳ در پایان دوره

نگهداری کاهش نشان داد و در مورد نمونه های حاوی اینولین نیز نتیجه مشابهی حاصل شد. طبق نتایج در زمان ثابت نگهداری افزودن اینولین منجر به افزایش pH نمونه های آبمیوه نسبت به نمونه شاهد گردید ($p < 0/05$) ولی بین سطوح مختلف این ترکیب اختلاف معنی‌داری به دست نیامد ($p > 0/05$). در مورد GOS نیز روند مشابهی به دست آمد بدین صورت که در غلظت ثابتی از این ترکیب با گذشت زمان نگهداری pH همه تیمارها کاهش یافت که البته این تغییرات در نمونه شاهد بیشتر بود به طوری که از مقدار ۳/۷۹ در روز تولید تا ۳/۳۶ در روز ۲۸ام کاهش یافت و این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0/05$). در حالیکه در مورد تیمارهای حاوی مقادیر مختلف GOS بجز نمونه حاوی ۰/۵٪، اختلاف معنی‌داری در طول زمان نگهداری از نظر میزان pH مشاهده نگردید ($p > 0/05$).

این مطالعه با نتایج به دست آمده توسط نال نالکیکول و چارالامپوپولوس (۲۰۱۱) همخوانی دارد. این محققان باکتری لاکتوباسیلوس پلاتاروم را در آب میوه های انار و لیمو مورد بررسی قرار دادند و pH آب انار از ۳/۲۵ به ۳/۲۱ و pH آب لیمو از ۲/۵۲ به ۲/۵۱ رسید که این نتایج نشان دهنده تغییرات جزئی در pH آب میوه در طی زمان بوده است (۲۵). همچنین نتایج دینگ و شاه در سال ۲۰۰۸ که قابلیت زنده مانگی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را در آب سیب بررسی کردند حاکی از کاهش pH آب سیب از ۲/۹ به ۲/۴ بود که این تغییرات pH در آب سیب پروبیوتیک معنی دار نبود (۱۷). نتایج تحقیقات تونچی و همکاران در سال ۱۳۹۴ نیز در تولید آب انگور قرمز پروبیوتیک نشان داد که تغییرات pH در آب انگور قرمز تلقیح شده با لاکتوباسیلوس کازئی در طول نگهداری بسیار کم بود در حالی که این تغییرات در تلقیح با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس قابل توجه بود و علت این مسئله فعالیت بالا و قابلیت زنده مانگی بیشتر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و توانایی آن در تولید مقادیر بیشتری از اسید لاکتیک در مقایسه با لاکتوباسیلوس کازئی بود (۲).

همان طور که مشاهده می شود مشابه اینولین در مورد GOS نیز در بیشتر موارد در زمان ثابت نگهداری افزایش این ترکیب در فرمولاسیون آبمیوه تاثیر معنی داری بر pH نداشته است (جدول ۲). در واقع باکتری های میکروانکپسوله شده با استفاده از پری بیوتیک ها در طول زمان نگهداری آبمیوه اسید تولید کرده و باعث کاهش pH محصول می گردند که این کاهش pH در هفته اول به طور معنی داری بیشتر از هفته دوم، سوم و چهارم است ($p < 0.05$). می توان نتیجه گرفت که با کاهش تعداد باکتری ها، مصرف قند و تولید اسید نیز از هفته دوم به بعد کاهش می یابد. در نهایت با مقایسه میزان کاهش pH در تیمارهای حاوی اینولین و GOS مشخص شد که در هر دو حالت بیشترین کاهش pH به نمونه شاهد تعلق داشت که ۰/۴۳-۰/۳۲ می باشد. کمترین تغییرات pH نیز در نمونه های حاوی ۱٪ اینولین و ۱٪ GOS بدست آمد که به ترتیب برابر ۰/۲۴ و ۰/۱۱ بود (جدول ۲). بنابراین می توان گفت که نمونه های حاوی GOS نسبت به تیمارهای حاوی اینولین کمتر دچار تغییرات pH شده اند که شاید به دلیل مصرف کمتر این ترکیب توسط باکتری های پروبیوتیک و مخمرهای موجود در آبمیوه و همچنین نقش بافری این ترکیبات باشد. نتایج

جدول ۲- اثر اینولین و گالاتوالیگوساکارید بر تغییرات pH آب میوه ترکیبی سیب-زردآلو حاوی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده در در طول ۴ هفته نگهداری در دمای یخچال

تیمار	زمان نگهداری (روز)				
	۱	۷	۱۴	۲۱	۲۸
شاهد	۳/۷۵±۰/۰۵۵ ^{ab}	۳/۷۰±۰/۰۱ ^{abc}	۳/۴۷±۰/۰۲۵ ^e	۳/۴۵±۰/۰۹۲ ^e	۳/۴۳±۰/۰۵۷ ^c
اینولین ۰/۰۵٪	۳/۸۰±۰/۰۱۱ ^a	۳/۶۳±۰/۰۵۷ ^{bcd}	۳/۶۳±۰/۰۷۶ ^{bcd}	۳/۷۷±۰/۰۵۱ ^{ab}	۳/۴۹±۰/۰۹۶ ^{ed}
اینولین ۱٪	۳/۷۴±۰/۰۴ ^{ab}	۳/۶۸±۰/۰۳۲ ^{abc}	۳/۶۹±۰/۰۱۰ ^{abc}	۳/۵۷±۰/۰۱۵ ^{cde}	۳/۵۰±۰/۰۸۹ ^{cd}
اینولین ۲٪	۳/۷۸±۰/۰۷۲ ^{ab}	۳/۷۲±۰/۰۷۵ ^{abc}	۳/۶۶±۰/۰۱۱ ^{abc}	۳/۶۳±۰/۰۰۶ ^{bcd}	۳/۴۷±۰/۰۱۱ ^e
شاهد	۳/۷۹±۰/۰۵ ^a	۳/۷۱±۰/۰۱ ^{abcd}	۳/۵۳±۰/۰۰۷ ^{cdef}	۳/۴۶±۰/۰۸۶ ^{ef}	۳/۳۶±۰/۰۵۷ ^f
GOS ۰/۰۵٪	۳/۷۴±۰/۰۸۳ ^{abc}	۳/۷۲±۰/۰۲۵ ^{abcd}	۳/۷۱±۰/۰۱۷۵ ^{abcd}	۳/۵۶±۰/۰۱۵۲ ^{cdef}	۳/۵۳±۰/۰۱۵۸ ^{cdef}
GOS ۱٪	۳/۷۳±۰/۰۵۷ ^{abc}	۳/۷۰±۰/۰۱۱ ^{abcd}	۳/۶۸±۰/۰۱۲۶ ^{abcd}	۳/۶۹±۰/۰۱۳۱ ^{abcd}	۳/۶۲±۰/۰۱۵۸ ^{bcde}
GOS ۲٪	۳/۷۷±۰/۰۵۵ ^{ab}	۳/۶۳±۰/۰۱۴۱ ^{bcde}	۳/۵۲±۰/۰۱۷۰ ^{cdef}	۳/۴۸±۰/۰۰۸ ^{ef}	۳/۵۳±۰/۰۲۳۶ ^{cdef}

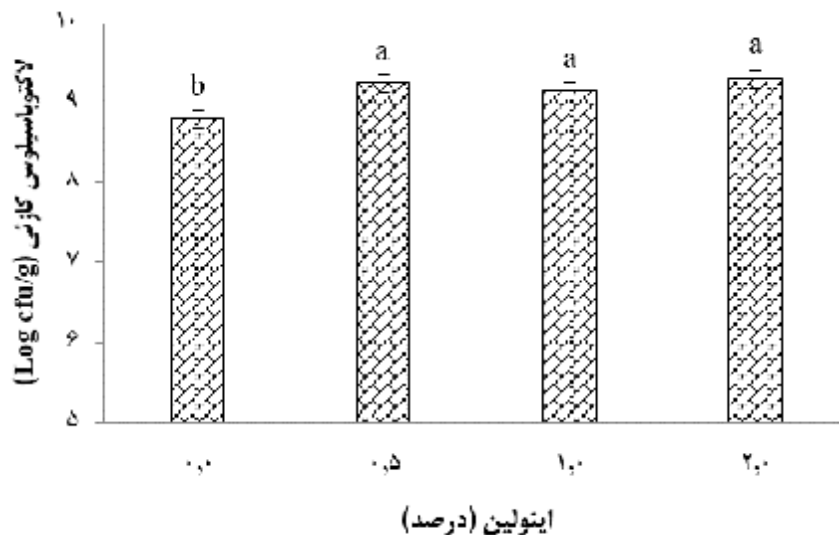
حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی داری بودن اختلاف میانگین ها در سطح $p < 0.05$ می باشد.

۳-۳- اثر اینولین بر زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس

کازئی

قابلیت زنده مانی سلول‌های باکتری به گونه‌های مورد استفاده، شرایط موجود در محیط، اسیدیته نهایی محصول و میزان اکسیژن موجود بستگی دارد (۱۶) با مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن مشخص شد که افزودن اینولین در غلظت‌های مختلف تاثیر مثبتی بر زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در آبمیوه ترکیبی سیب-زردآلو نسبت به نمونه کنترل داشته است ولی اختلاف معنی داری بین غلظت‌های مختلف این ترکیب مشاهده نشد (شکل ۱). تعداد اولیه باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده تلقیح شده در محدوده $10^{8.9-9.8}$ cfu/g بود. نتایج اثر اینولین در طول ۴ هفته نگهداری نمونه‌های آب سیب بر تغییرات باکتری پروبیوتیک در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در نمونه شاهد تعداد اولیه باکتری‌های میکروانکپسوله شده در ابتدای دوره نگهداری برابر $10^{9.77}$ cfu/g بود که در انتهای هفته اول و دوم نگهداری به ترتیب تا میزان $10^{9.65}$ و $10^{8.45}$ cfu/g کاهش نشان داد و این روند کاهشی تا انتهای دوره نگهداری (روز ۲۸ ام) ادامه یافت و در پایان هفته چهارم این میزان به $10^{8.03}$ cfu/g رسید. بدین ترتیب پس از ۴ هفته نگهداری تعداد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی ریزپوشانی شده در نمونه شاهد حدود $10^{1.8}$ سیکل لگاریتمی کاهش نشان داد. با افزودن اینولین در مقادیر ۰/۵، ۱ و ۲ درصد به فرمولاسیون آبمیوه این روند کاهشی با شیب کندتری صورت گرفت که حاکی از افزایش قدرت زنده مانی این باکتری در حضور ترکیب پری بیوتیک اینولین می‌باشد، بطوریکه پس از ۴ هفته نگهداری نمونه‌های آبمیوه تعداد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده در تیمارهای حاوی ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اینولین به ترتیب برابر $10^{8.60}$ ، $10^{8.70}$ و $10^{8.76}$ cfu/g بود که بترتیب معادل ۱، ۰/۶۶ و ۰/۹ سیکل لگاریتمی کاهش در تعداد باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی می‌باشد و طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها اختلاف معنی داری هم بین این تیمارها از

نظر آماری وجود نداشت ($p > 0.05$). در واقع اینولین که یکی از مهمترین ترکیبات پری بیوتیکی بوده، بعنوان منبع کربن و انرژی توسط باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته و باعث افزایش بقای آن‌ها در محصول شده است (۳۲)، در نهایت تعداد باقی مانده باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در محصول در سطح قابل قبولی قرار داشت. لازم به ذکر است که با وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها و نمونه کنترل بدلیل اینکه در همه نمونه‌ها چه شاهد و چه تحت تیمار، باکتری پروبیوتیک بصورت ریزپوشانی شده استفاده گردید لذا اثر مثبت فرایند ریزپوشانی در حفظ بقا و زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی باعث شده است که حتی در نمونه شاهد نیز در طول ۲۸ روز نگهداری میزان این باکتری فقط $10^{1.8}$ سیکل کاهش یافته است. در تحقیقی مشابه گلستانی و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی اثر اینولین بر زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی بستنی سینیبتیک تخمیری و غیر تخمیری گزارش دادند که قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک نمونه‌های بستنی حاوی ۲ درصد اینولین بطور معنی داری بالاتر از نمونه‌های حاوی یک درصد اینولین و فاقد آن بود. در این نمونه‌ها تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در روز اول پس از تولید $10^{6.9}$ cfu/ml بود که پس از گذشت ۱۶ هفته به $10^{6.83}$ cfu/ml رسید. همچنین طبق گزارش این محققین اینولین بر افزایش حجم و سرعت ذوب شدن بستنی نیز تاثیر معنی داری داشت، بطوریکه نمونه‌های حاوی ۲درصد اینولین، افزایش حجم و سرعت ذوب بالاتری نشان دادند ولی خصوصیات فیزیکوشیمیایی تحت تاثیر زمان نگهداری قرار نگرفت (۴). آکین و همکاران (۲۰۰۷) نیز بستنی سین بیوتیک حاوی اینولین (در دوز ۱ و ۲٪) تولید کرده و اظهار داشتند که افزودن اینولین باعث بهبود زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس شده و تعدادشان با افزایش اینولین افزایش پیدا کرد که علت آن به تاثیر پری بیوتیکی اینولین مربوط می‌باشد (۶).



شکل ۱- اثر اینولین بر زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده در آبمیوه ترکیبی سیب-زردآلو

جدول ۳- اثر اینولین بر قابلیت زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (Log cfu/g) میکروانکپسوله شده در آبمیوه ترکیبی سیب-زردآلو در طول ۴ هفته نگهداری در دمای یخچال

سیکل کاهش	زمان نگهداری (روز)					تیمار
	۲۸	۲۱	۱۴	۷	۱	
۱/۷۴	۸/۰۳±۰/۱۵۲ ^g	۸/۳۳±۰/۱۱۵ ^{fg}	۸/۴۵±۰/۲۵۱ ^{ef}	۹/۶۵±۰/۲۰۵ ^{ab}	۹/۷۷±۰/۲۰۸ ^a	شاهد
۱/۰۵	۸/۶۰±۰/۳۴۶ ^{ef}	۹/۰±۰/۱۷۳ ^{cde}	۹/۳۳±۰/۲۰۸ ^{abc}	۹/۴۰±۰/۳۸ ^{abc}	۹/۶۵±۰/۱۱۵ ^{ab}	اینولین ۰/۵٪
۰/۶۶	۸/۷۰±۰/۳۶۰ ^{def}	۸/۹۵±۰/۲۵۱ ^{cde}	۹/۱۰±۰/۴۱۶ ^{bcd}	۹/۳۳±۰/۱۵۲ ^{abc}	۹/۳۶±۰/۳۲۱ ^{abc}	اینولین ۱٪
۰/۹	۸/۷۶±۰/۲۰۸ ^{def}	۹/۰۵±۰/۱۲۰ ^{cde}	۹/۳۶±۰/۴۸۰ ^{abc}	۹/۴۵±۰/۲۵۰ ^{abc}	۹/۶۶±۰/۲۰۷ ^a	اینولین ۲٪
۱/۷۸	۷/۹۸±۰/۱۵۲ ^g	۸/۲۹±۰/۱۱۵ ^{fg}	۸/۵۱±۰/۲۵۱ ^{efg}	۹/۶۳±۰/۲۰۵ ^a	۹/۷۶±۰/۲۰۸ ^a	شاهد
۱/۱۲	۸/۴۴±۰/۳۱۰ ^{efg}	۸/۷۷±۰/۳۲۱ ^{edf}	۹/۰۶±۰/۲۵۲ ^{bcd}	۹/۴۳±۰/۱۵۲ ^{ab}	۹/۵۵±۰/۰۵۷ ^a	GOS ۰/۵٪
۰/۸۰	۸/۸۵±۰/۲۰۵ ^{ed}	۹/۰۳±۰/۲۰۸ ^{bcd}	۹/۳۳±۰/۳۲۲ ^{abc}	۹/۴۷±۰/۱۱۵ ^{ab}	۹/۶۵±۰/۳۰۵ ^a	GOS ۱٪
۰/۶۳	۸/۳۳±۰/۴۰۵ ^{fg}	۸/۴۳±۰/۲۱۰ ^{efg}	۸/۶۵±۰/۲۳۱ ^{edf}	۸/۸۳±۰/۳۰۵ ^{cd}	۸/۹۶±۰/۲۰۸ ^{cd}	GOS ۲٪

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی داری بودن اختلاف میانگین ها در سطح $p < 0.05$ می باشد

($p < 0.05$). طبق نتایج مقایسه میانگین ها توسط آزمون دانکن مشخص شد که به طور کلی افزودن مقادیر مختلف این ترکیب به فرمولاسیون آبمیوه ترکیبی سیب-زرد آلو، تاثیر مثبت و فزاینده ای بر قابلیت زنده مانی باکتریهای پروبیوتیک داشته است و بیشترین تاثیر به تیمار حاوی ۱٪ GOS می باشد که نسبت به سایر تیمارها معنی دار می باشد

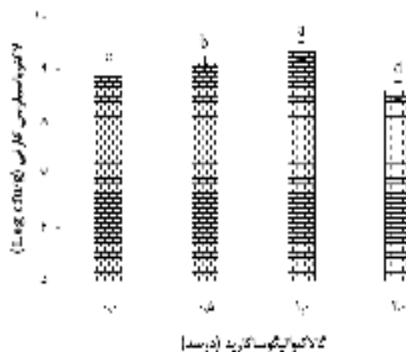
۳-۴- اثر گالاکتوالیگوساکارید بر زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی

طبق نتایج آنالیز واریانس که در جدول ۱ نشان داده شده است، ترکیب گالاکتوالیگوساکارید (GOS) نیز مانند اینولین بر قابلیت زیستی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی ریزپوشانی شده در طول زمان نگهداری معنی دار بود

(شکل ۲). اثر GOS بر قابلیت زنده مانگی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (Log cfu/g) میکروانکپسوله شده در آب میوه ترکیبی سیب-زردآلو در طول ۴ هفته نگهداری در دمای یخچال در جدول ۳ ارائه شده است. طبق نتایج این جدول تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در طی ۴ هفته نگهداری به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0.05$)، که مشاهده روند کاهش باکتری مشخص نمود که باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در تیمارهای حاوی مقادیر مختلف GOS بویژه در سطح ۱-۲٪ توانستند تعداد خود را در سطح مطلوب و مورد نیاز حفظ کنند. همانطور که مشاهده می شود در تیمارهای حاوی ۰/۵، ۱ و ۲ درصد GOS در پایان دوره نگهداری تعداد باکتری پروبیوتیک به ترتیب برابر ۸/۴۴، ۸/۸۵ و ۸/۳۳ سیگل لگاریتمی بود که نشان دهنده ۱/۱۲، ۰/۸ و ۰/۶۳ سیگل لگاریتمی کاهش در تعداد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بود (جدول ۳). بنابراین در طول ۴ هفته نگهداری نمونه های آمیوه ترکیبی سیب-زردآلو در دمای یخچال بیشترین حفظ و بقای باکتری در تیمار ۲٪ GOS نسبت به تعداد اولیه آن می باشد که البته اختلاف معنی داری با نمونه حاوی ۱٪ این ترکیب نداشته است ($p > 0.05$). در این تیمارها نیز مانند نمونه های حاوی اینولین به دلیل استفاده از فرایند ریزپوشانی برای حفظ بقای بیشتر باکتری پروبیوتیک تفاوت بین نمونه شاهد و تحت تیمار اگرچه معنی دار است ولی چندان چشمگیر نیست. در تحقیقاتی مشابه چن و همکاران (۲۰۰۵) گزارش دادند که زنده مانگی لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم انکپسوله شده در آلژینات با استفاده از فروکتو اولیگوساکارید، در مقایسه با سلول های آزاد در شیر در نگهداری یخچالی ۱۰۰ بار بالاتر بود (۱۲). مطالعات یئو و لیونگ (۲۰۱۰) نیز نشان داد که افزودن فروکتو اولیگوساکارید به شیر سویا موجب افزایش زنده مانگی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تا cfu/mL 10^7 می شود (۳۵). فرگوسن و همکاران (۲۰۱۰) هم اثر

GOS را به عنوان یک مکمل غذایی پری بیوتیکی بر میکروبیوت روده و ایمنی تیلاپیا قرمز پروراری بررسی کردند و نتیجه گرفتند که این مکمل غذایی موجب تعادل جمعیت فلور باکتریایی روده شده و همچنین موجب تحریک پاسخ ایمنی غیراختصاصی می شود (۱۸). در نهایت با مقایسه کلی اثر اینولین و GOS بر قابلیت زنده مانگی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در نمونه آمیوه ترکیبی سیب-زردآلو مشخص شد که اینولین بهتر از GOS عمل نموده است (شکل ۳). همانطور که در جدول ۲ نیز مشاهده می شود اینولین در غلظت های ۰/۵ و ۱٪ سبب حفظ بیشتر این باکتری پروبیوتیک نسبت به نمونه کنترل و تیمارهای حاوی غلظت یکسانی از GOS گردیده است به طوری که در تیمارهای حاوی ۰/۵ و ۱٪ اینولین میزان کاهش این باکتری در طول ۲۸ روز نگهداری آمیوه در دمای یخچال به ترتیب برابر ۱/۰۵ و ۰/۶۶ سیگل لگاریتمی بود ولی در تیمارهای حاوی ۰/۵ و ۱٪ GOS میزان این کاهش به ترتیب برابر ۱/۱۲ و ۰/۸۰ سیگل بود که البته در غلظت یکسان اختلاف قابل توجهی با هم نداشتند ($p > 0.05$). این در حالی بود که در غلظت ۲٪ روند تاثیرگذاری متفاوت بود بطوریکه با افزایش غلظت اینولین قابلیت زنده مانگی باکتری پروبیوتیک کاهش معنی داری نسبت به غلظت های پایین تر نشان داد و میزان کاهش باکتری به ۰/۹۰ سیگل افزایش یافت. در مورد پری بیوتیک GOS با افزایش غلظت قابلیت زنده مانگی باکتری بیشتر شد و پس از ۴ هفته نگهداری محصول میزان کاهش به ۰/۶۳ سیگل رسید که با اینولین ۱٪ در یک سطح قرار داشتند (جدول ۳). بنابراین به طو کلی میتوان گفت که اینولین تا غلظت ۱٪ اثر مطلوبی بر زنده مانگی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی داشته است در حالی که غلظت های بالاتر این ترکیب منجر به کاهش بیشتر باکتری می گردد، ولی در مورد GOS تا غلظت ۲٪ نیز زنده مانگی باکتری ها افزایش یافته است.

حضور نمک‌های صفراوی در شرایط مشابه دستگاه گوارش گردید. همانطور که نتایج نشان می‌دهد تعداد باکتری انکپسوله شده بدون ترکیبات پری بیوتیک (شاهد) در شرایط مشابه دستگاه گوارشی از مقدار اولیه ۹/۰ تا ۲/۶۶ $\log \text{cfug}^{-1}$ کاهش یافت که معادل ۶/۳۴ سیکل لگاریتمی کاهش در میزان باکتری پروبیوتیک می باشد و این تغییرات از نظر آماری معنی دار می باشد ($p < 0.05$). افزودن GOS و اینولین تأثیر مثبتی بر زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده داشت به طوری که در تیمارهای حاوی ۱٪ و ۲٪ اینولین میزان کاهش باکتری در طول ۱۲۰ دقیقه قرار گرفتن در شرایط مشابه دستگاه گوارش به ترتیب برابر ۳/۴۱ و ۳/۵۱ سیکل لگاریتمی بود که اختلاف معنی داری بین آن‌ها وجود نداشت ($p > 0.05$) ولی نسبت به نمونه کنترل اختلاف قابل توجهی دارند (جدول ۶). افزودن GOS نیز با تاثیری مشابه با اینولین در غلظت های ۱ و ۲ درصد باعث افزایش قابلیت زیستی باکتری پروبیوتیک گردید به طوری که در تیمارهای حاوی ۱ و ۲ درصد این ترکیب، میزان کاهش باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط دستگاه گوارش به ترتیب برابر ۳/۵۳ و ۲/۸۱ سیکل لگاریتمی بود. همانطور که مشاهده می شود در مقایسه این دو ترکیب پری بیوتیکی GOS نسبت به اینولین در زنده‌مانی تاحدودی مؤثرتر بود به طوری که پایین‌ترین میزان کاهش تعداد باکتری در غلظت ۲٪ GOS بود که معادل $\log \text{cfug}^{-1}$ ۲/۸۱ بود و در مقایسه با نمونه شاهد (نمونه بدون پری بیوتیک) ۱۰۰۰ بار بهتر بود. به طور کلی ترکیبات پری بیوتیک تأمین کننده منابع کربن و نیتروژن برای باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند (۷). در طی گذشت زمان تعداد باکتری‌ها کاهش یافت و این کاهش تعداد سلول‌ها در ۶۰ دقیقه اول بسیار قابل توجه بود و علت این مسأله شرایط اسیدی شیره معده بود و سپس به طور قابل توجهی بعد از ۱۲۰ دقیقه تعداد باکتری‌ها افزایش یافتند. نتایج مطالعات چن و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که میزان زنده مانگی باکتری‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارشی در صورت استفاده از پری بیوتیک‌ها (فروکتو اولیگوساکاریدها) ۱۰۰۰ بار بیشتر



شکل ۲- اثر ساده گالاکتولیگوساکارید بر تغییرات شمارش باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده در آب‌میوه ترکیبی سیب-زردآلو



شکل ۳- اثر نوع پری بیوتیک بر زنده مانگی باکتری پروبیوتیک

۳-۵- زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله در سیستم شبیه سازی شده دستگاه گوارشی

نتایج به دست آمده از بررسی قابلیت زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده در سیستم شبیه سازی شده دستگاه گوارشی در آب میوه ترکیبی سیب زرد- آلو و جداول تجزیه واریانس مربوطه در جداول ۵ و ۶ آورده شده است. همان طور که از جدول تجزیه واریانس نیز مشخص می‌شود، مقدار اینولین، GOS، زمان نگهداری و اثرات متقابل آنها بر زنده مانگی باکتری معنی دار بود ($p < 0.05$). بر طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق، افزودن هر دو نوع پری بیوتیک GOS و اینولین در طی میکروانکپسولاسیون باعث افزایش مقاومت باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده به کاهش pH و

تحقیق با گزارش کاواری و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز تطابق دارد. این محققین تأثیر کوثرستین در زنده مانی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس گاسری میکروانکپسوله شده را بررسی کردند و اثر مثبت این ترکیب را بر قابلیت زیستی باکتریهای پروبیوتیک تایید کردند (۱۱). بابو و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ گزارش دادند که افزودن اینولین باعث افزایش زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی MTCC 1423 میکروانکپسوله شده با آلزینات- نشاسته با مقاومت بالا با استفاده از تکنیک امولسیون گردید (۹). فرتیزن- فریر و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش دادند که میکروانکپسوله کردن بیفیدوباکتریوم BB12 با استفاده از خشک کن پاششی با شیر پس چرخ بازسازی شده و همچنین پری بیوتیک‌هایی از قبیل اینولین، اولیگوفروکتوز و اینولین غنی سازی شده با اولیگوفروکتوز باعث افزایش میزان زنده مانی این باکتری در طی دوره نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با محصول تولیدی که فقط از شیر پس چرخ بازسازی شده استفاده نموده بودند، گردید (۲۰).

از شرایط مشابه بدون پری بیوتیک بود که با نتایج این تحقیق مطابقت کامل دارد (۱۲). خسروی زنجانی و همکاران (۱۳۹۲) نیز تأثیر ریزپوشانی بر روی زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در شرایط شبیه سازی شده معده و روده را مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه آن‌ها باکتریهای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به روش امولسیون با آلزینات کلسیم، نشاسته مقاوم ذرت و اینولین ریزپوشانی شدند و در شرایط شبیه سازی شده مایع معده (با حضور پپسین و pH=۱/۵) و روده (با حضور پانکراتین و نمکهای صفرای و pH=۱/۵) به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. نتایج نشان داد، ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها در سطح معنی دار منجر به افزایش بقای پروبیوتیک‌ها در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان شد. نشاسته مقاوم ذرت، بقای پروبیوتیک‌ها را در شرایط معده و روده انسان بهبود بخشید و هیچ تأثیری بر اندازه کپسولها نداشت (۳). نتیجه این

جدول ۶- اثر اینولین و گالاکتوالیگوساکارید بر قابلیت زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (Log cfu/g) میکروانکپسوله

شده در سیستم شبیه سازی شده دستگاه گوارشی در طول ۱۲۰ دقیقه نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

میزان کاهش (سیکل لگایتمی)	زمان نگهداری (دقیقه)			تیمار
	۱۲۰	۶۰	۱	
۶/۳۴	۲/۶۶±۰/۲۸۸ ^c	۴/۷۷±۰/۴۷۲ ^c	۹/۰±۰/۲۶۴ ^a	شاهد
۳/۴۱	۴/۹۵±۰/۲۵۰ ^c	۴/۰۶±۰/۲۵۱ ^d	۸/۳۶±۰/۱۵۲ ^b	اینولین ٪۱
۳/۵۱	۵/۱۵±۰/۳۷۸ ^c	۳/۸۵±۰/۴۱۶ ^d	۸/۶۶±۰/۳۰۵ ^{ab}	اینولین ٪۲
۶/۳۴	۲/۶۶±۰/۲۸۸ ^c	۴/۷۷±۰/۴۷۲ ^c	۹/۰±۰/۲۶۴ ^a	شاهد
۳/۵۳	۵/۰۷±۰/۲۸۸ ^c	۳/۸۶±۰/۴۷۲ ^d	۸/۶۰±۰/۲۶۴ ^a	GOS ٪۱
۲/۸۱	۴/۹۷±۰/۳۰۵ ^c	۳/۵۵±۰/۱۵۵ ^d	۷/۷۸±۰/۳۶۰ ^b	GOS ٪۲

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی داری بودن اختلاف میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ می باشد

۴- نتیجه گیری

ریزپوشانی به عنوان یکی از جدیدترین شیوه‌ها، تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر زنده مانی پروبیوتیک‌ها دارد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر ترکیبات پری بیوتیک اینولین و گالاکتوالیگوساکارید بر زنده مانی باکتریهای پروبیوتیک ریزپوشانی شده در آبمیوه ترکیبی سیب- زرد آلو و همچنین در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان بود. نتایج این مطالعه نشان داد که زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله شده تحت تاثیر میزان ترکیبات پری بیوتیک قرار گرفت، به طوری که نمونه های حاوی مقادیر مختلف (۵/۰، ۱ و ۲ درصد) اینولین و GOS پس از ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال دارای باکتری پروبیوتیک بیشتری نسبت به نمونه کنترل بودند و این اختلاف از نظر آماری معنی دارد بود. همچنین طبق نتایج مشخص شد که فرایند ریزپوشانی به همراه افزودن ترکیبات اینولین و GOS به طور قابل ملاحظه ای زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی را در شرایط مشابه دستگاه گوارش بهبود بخشید، بطوریکه بقای باکتری های پروبیوتیک ریزپوشانی شده پس از ۱۲۰ ساعت نگهداری در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش، به صورت معنی داری بیشتر از تیمار فاقد ترکیبات پری بیوتیک بود. در مجموع موثرترین تیمارها در شرایط این پژوهش شامل غلظت ۱٪ اینولین و ۲٪ GOS بود که از نظر آماری در یک سطح قرار داشتند. بر اساس نتایج به دست آمده، می‌توان از اینولین و GOS در غلظت های مناسب به عنوان پری بیوتیک در افزایش زنده مانی باکتری های پروبیوتیک بهره جست.

۵-منابع

۱. اسیدوفیلوس La-5. نشریه پژوهشهای صنایع غذایی. دوره ۲۵، شماره ۴، صفحه ۶۵۵-۶۶۶.
۲. خسروی زنجانی، م. ع.، محمدی، ن.، بهروز نسب، ک.، صولتی، ا. ع. ۱۳۹۲. تاثیر ریزپوشانی بر روی زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی ویفیدوباکتریوم بیفیدوم در شرایط شبیه سازی شده معده و روده. مجله پژوهش های بالینی دامپزشکی، دوره چهارم، شماره اول. ۳۹-۲۹.
۳. گلستانی، م.، پوراحمد، ر.، مهدوی عادل، ح. ر. ۱۳۹۵. اثر اینولین بر زنده مانی باکتری های پروبیوتیک و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی بستنی سینتتیک تخمیری و غیر تخمیری. مجله علوم غذایی و تغذیه، سال سیزدهم، شماره سوم؛ ۳۲-۲۵.
5. Akalin, A. S., Karagozlu, C. and Unal, G. 2007. Rheological properties of reduced-fat and low-fat ice cream containing whey protein isolate and inulin. *European Food Research Technology*, 227: 889-895.
6. Akin, M. B., Akin, M. S. and Kirmaci, Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chemistry*, 104: 93-99.
7. Ann, E. Y., Kim, Y., Oh, S., Imm, J. Y., Park, D. J., Han, K. S., and Kim, S. H. 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *International journal of food science & technology*, 42(4): 411-419.
8. Antunes, A. E. C., Liserre, A. M., Coelho, A. L. A., Menezes, C. R., Moreno, I., Yotsuyanagi, K., and Azambuja, N. C. 2013. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1): 125-131.
9. Babu, G., Rath, S., and Nithyalakshmi, V. 2011. Probiotic viability of freeze dried synbiotic microcapsules in skim milk powder at ambient storage condition. *Int J Food Saf*, 13, 62-68.

۱. بی نام، ۱۳۸۷. استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۳۲۵، ماست پروبیوتیک، ویژگی ها و روش آزمون، چاپ اول.
۲. توتونچی، پ.، حصاری، ج.، مرادی، م.، فتحی آچاچلویی، ب. ۱۳۹۴. ارزیابی امکان تولید آب انگور قرمز پروبیوتیک با استفاده از لاکتوباسیلوس کازئی ۴۳۱ و لاکتوباسیلوس

- J.L. and Davies, S.J. 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology* ISSN. Vol. 507, pp: 215-292.
19. Ferrari, C. K. 2007. Functional foods and physical activities in health promotion of aging people. *Maturitas*, 58(4), 327-339.
 20. Fritzen-Freire, C. B., Prudencio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrao- Murakami, A. N., & Murakami, F. S. 2011. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45(1): 306-312.
 21. Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Khoshbavar Rostami, H. and Esteban, M.A. 2013. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish and Shellfish Immunology* xxx. 5-10.
 22. Kailasapathy, K. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT - Food Science and Technology* 39(10): 1221-1227.
 23. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., and Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International dairy journal*, 14(8): 737-743.
 24. Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., de Oliveira Pinto, C. L., and Martins, J. M. 2013. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2): 764-770.
 25. Nualkaekul, S., and Charalampopoulos, D. 2011. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 146 (2): 111-117.
 10. Capela, P., Hay, T.K.C. Shah, N.P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International* 39(2): 203-211.
 11. Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., and del Carmen Villarán, M. 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *International journal of food microbiology*, 142(1): 185-189.
 12. Chen, K. N., Chen, M. J., Liu, J. R., Lin, C. W., and Chiu, H. Y. 2005. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70: 260-266.
 13. De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., and Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4): 292-302.
 14. De Vuyst, Luc. and Vandamme, Erick J. 1994. "Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance." *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Springer US, 1-11.
 15. Di Criscio, T., Fratianni, A., Mignogna, R., Cinquanta, L., Coppola, R., Sorrentino, E. and Panfil, G. 2010. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *Journal of Dairy Science*, 93: 4555-4564.
 16. Dickerman, J. M., and Liberman, S. 1952. Studies on the chemical nature of an antibiotic present in water extracts of cabbage. *Journal of Food Science*, 17(1-6): 438-441.
 17. Ding, W. K., and Shah, N. P. 2008. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal*, 15(2): 219-232.
 18. Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchiatti, S., Balcazar,

- improvement of performance during storage. *International Dairy Journal*, 12: 183-190.
32. Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Van Sinderen, D. 2005,b. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current opinion in biotechnology*, 16(2): 198-203.
 33. Torres, D. P. M., Goncalves, M. F., Teixeira, J. A. and Rodrigues, L. R. 2010. Galacto-Oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 438-454.
 34. Vivek, K. B. 2013. Use of encapsulated probiotics in dairy based foods. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, 3(1), 188-199.
 35. Yeo, S. K., and Liong, M. T. 2010. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 267-275.
 36. Yoon, K. Y., Woodams, E. E., and Hang, Y. D. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource technology*, 97(12): 1427-1430.
 26. Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., and Rodrigues, S. 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44(5): 1276-1283.
 27. Piad, R., Samaniego, L. M., Perez, M., Boucourt, R., Medina, E., Laurencio, M., and Milián, G. 2006. Prebiotic activity of an enzymatic yeast cream hydrolyzate on egg-laying hens productive indicator. *Cienciy Tecnologia Alimentari*, 5, 226-230.
 28. Rivera-Espinoza, Y., and Gallardo-Navarro, Y. 2010. Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*, 27(1): 1-11.
 29. Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K., and Stanton, C. 2002. Cheese delivering biocultures--probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57 (2): 71-78.
 30. Sangwan, V., Tomar, S. K., Singh, R. R. B., Singh, A. K. and Ali, B. 2011. Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *Journal of Food Science*, 76(4): 103-111.
 31. Stanton, C., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K. and Ross, R. P. 2005.a. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli toward

(Original Research Paper)

The Effect of Addition Inulin and Galactooligosaccharide on the Viability of Microencapsulated *Lactobacillus casei* in Combined Apple-Apricot Juice

Roghayyeh Ashrafi Your Ghanloo^{1*}, Haleh Mehryar², Negin Karim Pour³

1-Assistant Professor, Department Food Science and Technology, Technical and Vocational University, Urmia, Iran.

2-Ph.D Graduated of Food Science and Technology, Technical and Vocational University, Urmia, Iran

3-BSc Student of Food Science and Technology, Technical and Vocational University, Urmia, Iran.

Received:29/05/2017

Accepted:16/09/2017

Abstract

In recent years the demand for probiotic products based on non-dairy products increased. In this regard, the purpose of this study was to investigate the possibility of using a combined apple-apricot juice as a carrier for encapsulated probiotic bacteria and evaluate the effect of inulin and galactooligosaccharide (GOS) at concentrations of 0.5, 1 and 2% on the survival rate of the encapsulated *Lactobacillus casei* bacteria during 28 days in the juice. The results of analysis of variance showed that the effect of inulin and GOS on the survival rate of encapsulated *Lactobacillus casei* and pH changes was significant during storage ($p < 0.05$). The results showed that the highest decrease in pH was in the control sample, which was 0.32-0.43. In the treated samples, the lowest pH decreased belonged to samples containing 1% inulin and GOS, which was equal to 0.24 and 0.11 respectively, and compared to the control sample, this difference was significant ($p < 0.05$). Generally, the results indicated that the prebiotics compound (inulin and GOS) increased viability of probiotic bacteria compared to the control sample. By investigating the effect of these two compounds on the bacteria changes in the juice samples, it was concluded that during the 28 days of storage of the product at refrigerator temperature, in the control sample 1.74-1.78 logarithmic cycles were reduced, but in samples containing 1% inulin and 2% GOS, the least reduction was observed in the number of *Lactobacillus casei* bacteria in comparison with the control and other treatments, which was 0.66 and 0.63 logarithmic cycles respectively ($p < 0.05$). The addition of both prebiotics of GOS and inulin, during the microencapsulation of *Lactobacillus casei* increase the resistance of probiotic bacteria to reduced pH and the presence of bile salts in the simulated gastro-intestinal conditions, and in these conditions too, there was no significant difference between the concentration of 1% of these two compounds in terms of the survival of *Lactobacillus casei*, while the 2% GOS was better. Therefore, according to the results of this study, it can be said that inulin has been effective in preserving the life of probiotic bacteria in juice and simulated gastro-intestinal conditions to concentration of 1% better than GOS, but at higher concentrations, GOS was better.

Key words: Inulin, Galactooligosaccharide, *Lactobacillus casei*, Apricot, Probiotics.

*Corresponding Author: r.ashrafi1@yahoo.com

