

تاثیر شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) در بستنی ماستی سین‌بیوتیک

الناز میلانی^{*۱} - هاجر نعیمی^۲ - سید علی مرتضوی^۳ - آرش کوچکی^۴

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۱۲

چکیده

در این تحقیق، بستنی ماستی سین بیوتیک حاوی سطوح مختلف اینولین (صفر، ۲/۵ و ۵ درصد) و باکتری *Lactobacillus casei* به عنوان باکتری پروبیوتیک، در دو شکل آزاد و ریزپوشانی شده با آلژینات-پروتئین آب پنیر تولید شد و بقای این باکتری‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده، طی ۳۰ روز انبارمانی در 4°C ، بررسی شد. بعد از یک ساعت قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی شده معده ($\text{pH}=2$ ، آنزیم پپسین)، تعداد باکتری آزاد از $9/78-9/812 \log \text{cfu/ml}$ به $6/97-7/26 \log \text{cfu/ml}$ کاهش یافت درحالی‌که در نمونه‌های حاوی باکتری کپسوله از $8/66 \log \text{cfu/ml}$ به $8/15 \log \text{cfu/ml}$ در پایان ۳۰ روز انبارمانی در 4°C ، کاهش یافت. بعد از قرارگیری نمونه‌ها تحت شرایط شبیه‌سازی شده معده به مدت یک ساعت، به مدت ۲/۵ ساعت تحت شرایط شبیه‌سازی شده روده ($\text{pH}=7/4$ ، آنزیم پانکراتین) قرار گرفتند که تعداد باکتری‌های آزاد بعد از این مدت از $8/80-9/35 \log \text{cfu/ml}$ به $5/159-5/9 \log \text{cfu/ml}$ در پایان ۳۰ روز انبارمانی در 4°C کاهش یافت، درحالی‌که تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده تحت شرایط شبیه‌سازی شده روده به مدت ۲/۵ ساعت بعد از قرارگیری تحت شرایط شبیه‌سازی شده معده، از $8/20 \log \text{cfu/ml}$ به $7/38 \log \text{cfu/ml}$ کاهش یافت. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در هر دو محیط بین نمونه‌های حاوی باکتری آزاد و ریزپوشانی شده وجود داشت ($p < 0/05$)، و همچنین باکتری‌های ریزپوشانی شده حفاظت بهتری نشان دادند، تعداد باکتری‌های زیست پذیر، در این حالت در دامنه پیشنهادی توسط کمیته بین المللی لبنیات (10^6-10^7cfu/g) بود.

واژه‌های کلیدی: بستنی ماستی، ریزپوشانی، آلژینات سدیم-پروتئین آب پنیر تغلیظ شده، سین بیوتیک، اینولین، *Lactobacillus casei*، محیط شبیه‌سازی شده معده-روده، میکروسکوپ الکترونی SEM

مقدمه

فرآوری و مصرف محصول غذایی زنده بمانند واز شرایط اسیدی بالای معده و آنزیم‌ها و نمک‌های صفر در روده‌ی کوچک عبور کنند. مصرف پروبیوتیک‌ها در سطح $10^9-10^{10} \text{cfu/g}$ در هر روز مقدار معمول برای مصرف کافی پروبیوتیک است که برابر است با ۱۰۰ گرم محصول غذایی با 10^6-10^7cfu/g (Kailasa pathy, 2002).

Lactobacillus casei یک باکتری پروبیوتیک، گرم مثبت، میله‌ای، غیر اسپورساز، هتروفرومنتاتیو و غیر متحرک است. اسید لاکتیک تولیدی این گونه از نوع L(+) است. *Lactobacillus casei* از مقاومت مطلوب به ونکومایسین برخوردار می باشد (همایونی، ۱۳۸۷).

بستنی ماستی یک دسر لبنی منجمد تخمیری پیچیده است که ویژگی‌های فیزیکی بستنی را با ویژگی‌های حسی و تغذیه‌ای فرآورده‌های شیر تخمیری ترکیب می‌کند. بستنی ماستی می‌تواند یک جایگزین سالم بستنی برای افرادی که از چاقی، بیماری‌های قلبی-

طبق تعاریف مختلف "پروبیوتیک" را می‌توان به عنوان میکروارگانیسم زنده تعریف کرد که می‌تواند برای سلامت بدن انسان/حیوان به دلیل حفظ و بهبود تعادل میکروبی محیط روده مفید باشد. گزارش شده که پروبیوتیک‌ها با تعدیل ایمنی، کاهش کلسترول، بهبود تحمل نسبت به لاکتوز و جلوگیری از برخی سرطان‌ها نقش درمانی ایفا می‌کنند (Kailasa pathy, 2002).

زیست‌پذیری باکتری‌های پروبیوتیک در یک محصول هنگام مصرف، موضوعی مهم برای کارایی آن‌هاست چون آن‌ها باید طی

۱- مربی پژوهشی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد
(*) نویسنده مسئول: (Email e_milani81@yahoo.com)

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

۳ و ۴- استاد و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

ویسکوزیته متوسط و آنزیم پانکراتین از شرکت مرک آلمان، نمک املاح صفاوی از شرکت سیگما، کنسانتره پروتئین آب پنیر ۸۰ درصد، روغن کلزا، توپین ۸۰، کلرور کلسیم، پیتون واتر، پودر شیر خشک پس چرخ (شرکت مولتی خراسان)، پانیسول، امولسیفایر، ترکیب پری‌بیوتیکی اینولین با نام تجاری HP[®]rafti، خامه ۳۰ درصد پگاه، وانیل، شکر، نمک طعام، اسید کلریدریک، میکروفیلتر ۰/۴۵.

آماده‌سازی کشت پروبیوتیکی

جهت آماده‌سازی باکتری *Lactobacillus casei* مقدار یک گرم از کشت به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS Broth تلقیح و در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۰ تا ۱۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. مقدار یک میلی‌لیتر از محیط فوق به ۹۹ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS Broth منتقل و در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۰ تا ۱۲ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. کشت مذکور در طول هفته بر حسب تعداد سلول مورد نیاز به محیط کشت تازه انتقال داده و بعد از ۱۰ تا ۱۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در یخچال و در دمای ۴ °C نگه‌داری شد. هدف از انجام این کار دسترسی دائم به فاز لگاریتمی بود. سلول‌های پروبیوتیکی حاصل بعد از سانتریفیوژ Herolab در ۴۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۴ °C جداسازی و سپس عمل شستشوی سلول‌های جدا شده، دوبار با استفاده از محلول ۰/۱ درصد پیتون‌واتر تحت شرایط مذکور صورت گرفت و از آن جهت تلقیح مستقیم استفاده شد (Mokarram et al., 2009).

ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی

روش آماده‌سازی مواد تشکیل دهنده دیواره طبق روشی که چن و سایبراد (۲۰۰۶) استفاده کردند، انجام شد، بدین صورت که ابتدا مقدار ۲ گرم از آلژینات سدیم با ویسکوزیته متوسط در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از همزن مغناطیسی حل شد. سپس به مدت یک شب در یخچال، در دمای ۴ °C نگهداری شد تا آلژینات به خوبی آب جذب کند. سپس به بیرون از یخچال منتقل و مدتی در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا با محیط هم‌دما شود. مقدار ۸ گرم از پودر پروتئین آب پنیر ۸۰ درصد را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه برای مدت یک ساعت بر روی همزن مغناطیسی قرار داده، سپس سوسپانسیون فوق را به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده، بعد با استفاده از سود ۱ نرمال، pH آن را به ۸ رسانیده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده، به دمای محیط رسانده و ۲ ساعت در دمای محیط نگهداری شد، سپس به نسبت ۱:۲ با محلول آلژیناتی که قبلاً تهیه شد، مخلوط گردید، به مدت نیم ساعت در دمای محیط توسط همزن همزده و به مدت یک شب در یخچال ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عمل ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی

عروقی و عدم تحمل لاکتوز رنج می‌برند، تلقی می‌گردد (Soukoulis et al., 2008).

اینولین و الیگوفروکتوز، جز مشهورترین پری بیوتیک‌ها بوده و نسبت به هیدرولیز در معده و روده‌ی کوچک مقاوم می‌باشند از این رو؛ به عنوان فیبر رژیمی و جایگزین چربی بر بافت و طعم فرآورده اثر می‌گذارند (Akalin et al., 2008).

ریز پوشانی فرایندی است که در آن سلول‌ها در یک بافت یا غشای کپسول‌دار نگه‌داری می‌شوند. یک میکروکپسول شامل یک غشای نیمه تراوا یا ناتراوا، کروی، نازک و محکم است که یک هسته‌ی جامد/مایع را دربر گرفته و قطر آن از چند میکرون تا یک میلی‌متر متغیر است (Doherty et al., 2010). ظاهراً پروتئین‌های آب پنیر^۱ کاندیدای بالقوه هستند چون کلاً از نظر زیستی قابل تجزیه‌اند و به طور گسترده در غذاهای مختلف کاربرد دارند. یکی از ویژگی‌های قابل توجه کنسانتره پروتئین آب پنیر، توانایی آن در نگهداری آب پس از دناتوره شدن می‌باشد. خاصیت تشکیل ژل کنسانتره پروتئین آب پنیر در بهبود قوام غذایی بسیار موثر است که در نتیجه تشکیل ژل حین فرایند حرارتی غذا می‌باشد. تشکیل ژل توسط کنسانتره پروتئین بستگی به ترکیب آن، درجه حرارت، pH و فرایند تولید دارد. هر چه درصد پروتئین کنسانتره بیشتر باشد، تشکیل ژل بهتر صورت می‌گیرد. وجود مقادیر بالای لاکتوز و چربی مانعی در برابر ژله‌ای شدن به شمار می‌آید. pH اسیدی باعث تشکیل ژل ضعیف می‌شود. علت این امر تجمع و رسوب پروتئین‌ها می‌باشد. در نهایت باید به این نکته توجه داشت که انتخاب یک کنسانتره پروتئین در فرمولاسیون غذایی بستگی به ویژگی‌های مورد نظر در محصول نهایی دارد. در یک فرآورده غذایی ممکن است به کنسانتره پروتئین با ویژگی تشکیل ژل قوی و در فرآورده‌ای دیگر به کنسانتره پروتئین با ویژگی تشکیل ژل ضعیف‌تر نیاز باشد تا ویژگی‌های بافتی مورد پسند مصرف کننده نهایی حاصل گردد (Chandramouli et al., 2004). هدف از این تحقیق تولید بستنی ماستی سین بیوتیک و ارزیابی بقای باکتری پروبیوتیک در دو فرم آزاد و ریز پوشانی شده، تحت شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری پروبیوتیکی *Lactobacillus casei* دارای شماره بچ ۲۴۶۸۳۳^۱ به صورت لیوفلیزه از شرکت DSM، کشت‌های آغازگر ماست از لاکتینا، سترات سدیم، سود ۱ نرمال، محیط کشت MRS^۲، آنتی بیوتیک ونکومایسین^۳، آنزیم پیپسین، آلژینات سدیم با

- 1 - WPC(whey protein concentration)
- 2-Batch number
- 3-Vancomycine

نمونه‌هایی که حاوی دیگر باکتری‌ها هستند، از جمله باکتری‌های موجود در ماست و پنیر، فراهم می‌آورد، بدین صورت که این آنتی‌بیوتیک از رشد باکتری‌های ماست و پنیر جلوگیری کرده و فقط *Lactobacillus casei* رشد می‌نماید. بعد از انجماد مخلوط در دستگاه بستنی ساز نیز طبق روشی که بیان شد، کشت صورت گرفت و همه نمونه‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت و در دمای 37°C تحت شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری گردید. میانگین همه نتایج به دست آمده به عنوان واحدهای شکل‌گیری کلنی^۱ در هر گرم از نمونه (cfu/g) بیان گردید. نمونه‌های بستنی ماستی حاوی باکتری‌های آزاد نیز در روش مشابهی (جایگزینی پپتون واتر ۰/۱ درصد با سترات سدیم ۱٪ w/v) به منظور حفظ شرایط یکسان، کشت مخلوط داده شد.

شرایط شبیه‌سازی شده معده

مطابق روش آنان^۲ و همکاران (۲۰۰۸)، پیسین به نمک طعام (0.2% w/v) اضافه گردید، تا غلظت‌نهایی آن در نمک به ۰/۳۵٪ برسد، pH را توسط HCl غلیظ به ۲ رسانده و با میکروفیلتر 0/۴۵ استریل شد. سپس براساس روش رضایی مکرّم و همکاران (۲۰۰۸)، مقدار یک گرم از نمونه بستنی‌ماستی را داخل تیوب حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از این محیط ریخته، مدت یک ساعت در انکوباتور 37°C درجه سانتی‌گراد قرار داده، سپس خارج نموده، با محلول سود خنثی نموده، نمونه‌های حاوی پروبیوتیک به صورت آزاد را با استفاده از روش رقیق‌سازی توسط پپتون واتر و کشت مخلوط، کشت می‌دهیم، درحالی‌که نمونه‌های حاوی دانک را ابتدا در محلول سترات سدیم ۱ درصد، بر روی همزن، همزده تا دیواره حل شده و بتوان توسط روش رقت‌سازی و کشت مخلوط، تعداد پروبیوتیک باقی‌مانده را بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت که در دمای 37°C در محیط کشت انتخابی MRS Agar همراه با ونکومایسین، گرمخانه‌گذاری شده، شمارش نمود (Doherty *et al.*, 2010). این کار با ۳ تکرار برای هر نمونه انجام شد.

شرایط شبیه‌سازی شده روده

تهیه این محیط طبق روشی که آنان و همکاران (۲۰۰۸) بیان نمودند، صورت گرفت، بدین صورت که پانکراتین و نمک صفرای در $\text{PB} (\text{pH}=8, 0.05 \text{ mol/L } \text{NaH}_2\text{PO}_4)$ تا به ترتیب به غلظت‌نهایی ۱ gr/L، ۴/۵ gr/L برسد و بعد، با استفاده از ۰/۱ NaOH، pH را به ۷/۴ رسانیده و با فیلتر ۰/۴۵ استریل شد. سپس مطابق روش رضایی مکرّم و همکاران (۲۰۰۸) انجام داد، بعد از اینکه نمونه بستنی‌ماستی تحت تاثیر محیط شبیه‌سازی شده معدی

Lactobacillus casei با استفاده از روش ژلاتیناسیون خارجی که توسط تراستراپ (۲۰۰۲) و الان (۲۰۰۸) و رضایی مکرّم و همکاران (۲۰۰۸) گزارش گردید، انجام شد. دانک‌های تشکیل شده، سپس با استفاده از سانتریفوژ در $500 \times \text{g}$ و در دمای 4°C به مدت ۵ دقیقه جداسازی و شستشو گردید. دانک‌های آلزینات سدیم-وی پروتئین حاصل، همانند بیومس، از آن جهت تلقیح مستقیم استفاده به عمل آمد (Homayouni *et al.*, 2004).

شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در دانک‌ها

جهت تعیین کارایی فرایند ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی، از روش رضایی مکرّم و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. این شمارش در سه تکرار صورت پذیرفت.

تولید بستنی ماستی

تولید بستنی ماستی مطابق روش میلانی و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت. مقدار ۹۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر با ۹/۱ گرم پودر شیر پس‌چرخ مخلوط، هموزنیزه و در دمای 85°C به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شد. برای تولید ماست، ۷۰ درصد از کل شیر محاسبه شده برای تهیه بستنی ماستی، در دمای 42°C با آغازگر آماده‌سازی شده تلقیح شد و برای تهیه ماست گرمخانه‌گذاری گردید. پایان گرمخانه‌گذاری، رسیدن به pH حدود ۴/۸ بوده است (Milani *et al.*, 2010). برای تولید فاز غیرماستی، ۳۰ درصد از شیر باقی‌مانده، ابتدا تا دمای 45°C در حمام آب حرارت داده شد، سپس ترکیبات دیگر (مواد جامد) به آرامی به شیر اضافه شد و عمل هموزنیزاسیون مخلوط تا آنجایی که هیچ ذره یا کلوخه‌ای باقی نماند، صورت گرفت. سپس، خامه با ۳۰ درصد چربی به مخلوط اضافه شد. این مخلوط به مدت ۲۰ ثانیه در حرارت 80°C پاستوریزه و بعد دمای مخلوط به سرعت به زیر 10°C رسانیده شد. ماست تهیه شده با فاز غیرماستی مخلوط و به مدت ۱۲ الی ۱۴ ساعت در دمای 4°C نگه‌داری شد تا عمل رسانیدن مخلوط، کامل گردد. پس از اتمام این مرحله، دانک‌های آلزینات سدیم- پروتئین آب پنیر حاوی بیومس پروبیوتیکی به مخلوط بستنی ماستی تلقیح شد، عمل شمارش تعداد سلول پروبیوتیکی قبل و بعد از انجماد با استفاده از روش رقت‌سازی ۹ لوله‌ای و کشت مخلوط، انجام شد. بدین ترتیب که مقدار ۱۰ گرم از نمونه بستنی ماستی در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر سترات سدیم ۱٪ w/v پراکنده شده و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از همزن مغناطیسی همزده شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول فوق داخل پلیت ریخته شده و با استفاده از محیط کشت MRS- Agar به همراه ونکومایسین مخلوط شد (۱۷ و ۱۴). این محیط کشت به عنوان محیط کشت انتخابی برای *Lactobacillus casei* که امکان شمارش این باکتری‌ها را در

1 - Colony forming units

2 - Annan

شکل ریز پوشانی شده و یا آزاد تلقیح شد، برقیای پروبیوتیک در محیط شبیه‌سازی شده معدی، معنی‌دار بود. ($p < 0/05$) مشاهده گردید، با اضافه کردن باکتری به شکل ریز پوشانی شده، بقاء بیشتر سلول‌های زیست‌پذیر، به‌دست آمد. با سپری شدن سی روز دوره انبارمانی، در 18°C ، از تعداد باکتری‌های قابل زیست کاسته شد. تعداد باکتری‌ها در اولین روز تولید و پس از انجام عمل انجماد، شمارش شد و در طی دوره انبارمانی، در روزهای مختلف (۱، ۱۰، ۲۰، ۳۰) بقاء پروبیوتیک‌ها بعد از یک ساعت قرارگیری نمونه‌های بستنی‌مستی حاوی لاکتوباسیلوس کازئی به صورت آزاد و ریز پوشانی شده و سطوح مختلف اینولین (صفر، ۲/۵، ۵ درصد) بررسی شد.

در مورد نمونه‌های حاوی پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در شکل ریز پوشانی شده، با افزایش اینولین تا سطح ۵ درصد، بقاء بالاتر باکتری‌ها مشاهده گردید که با توجه به شیب ملایم‌تر این نمونه‌ها، می‌توان به این موضوع پی‌برد.

اما در مورد نمونه‌های حاوی *Lactobacillus casei* آزاد، در حضور سطوح مختلف اینولین، کاهش زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک، روند کاهشی ثابتی را در طی سی روز انبارمانی و بعد از قرارگیری در معرض محیط شبیه‌سازی شده معده به مدت یک ساعت نشان داد. با مقایسه میانگین داده‌ها، زمانی که سطوح اینولین ۲/۵ و ۵ درصد بود، در مورد نمونه‌های حاوی باکتری آزاد و ریز پوشانی شده، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده ($p > 0/05$). کاهش بقاء باکتری‌ها هنگامی که نمونه فاقد اینولین بود، بعد از یک ساعت قرارگیری در معرض محیط شبیه‌سازی شده معدی، بین روزهای یکم و دهم، اختلاف معنی‌داری با هم نداشت ($p > 0/05$). ولی بین روزهای دهم با روزهای بیستم و سی‌ام، اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0/05$). که این مورد، درباره نمونه‌های حاوی ۲/۵ و ۵ درصد اینولین هم مشاهده شد. و بین روزهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/05$). در مورد نمونه‌های حاوی باکتری آزاد، در طول دوره ۳۰ روز انبارمانی، اختلاف معنی‌داری در بقای باکتری‌ها مشاهده شد ($p < 0/05$).

قرار گرفت، آن را به تیوبی که حاوی ۱۸ میلی‌لیتر محیط شبیه‌سازی شده روده میباشد، انتقال داده و ۲/۵ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده، و بقیه مراحل مانند آنچه در بخش ۲-۵ گفته شد، انجام پذیرفت.

بررسی تیمارهای انجام شده

در این تحقیق از اینولین به عنوان یک ترکیب پری‌بیوتیکی در سه سطح (صفر، ۲/۵ و ۵ درصد) استفاده شد. همچنین کشت پروبیوتیکی در دو حالت ریز پوشانی شده و آزاد به محصول تلقیح شد. و در نهایت محصول در سطوح مختلف زمان نگهداری صفر، ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز بعد از قرارگیری تحت شرایط شبیه‌سازی شده معده-روده مورد ارزیابی قرار گرفت.

طرح آماری

تجزیه و تحلیل نتایج در رابطه با بستنی‌مستی با طرح آماری دو فاکتوره کاملاً تصادفی و در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. برای انجام آنالیز واریانس از نرم‌افزار Minitab ver 13.1 و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار Mstatc استفاده شد. برآش خطوط و ترسیم منحنی‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار Slide Write انجام شد.

نتایج و بحث

تأثیر متقابل افزودن اینولین و مدت زمان رسیدگی بر بقای پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در دو فرم آزاد و ریز پوشانی شده تحت شرایط شبیه‌سازی شده معدی

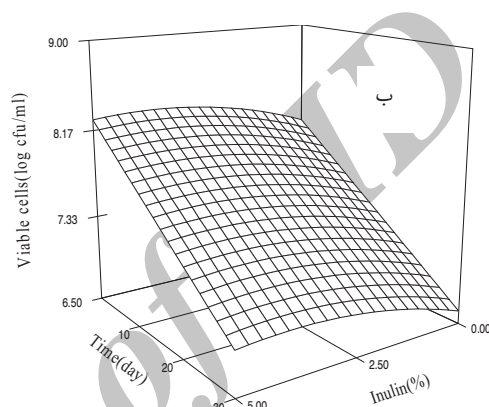
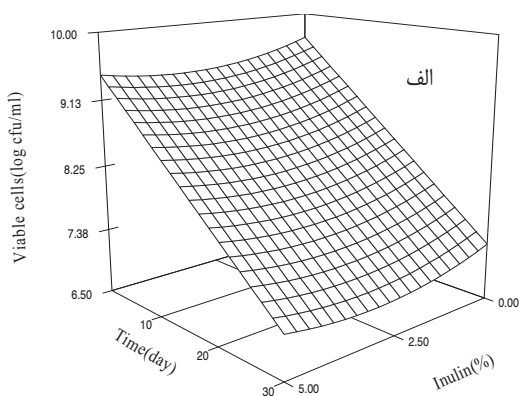
با توجه به داده‌های به‌دست آمده از جدول آنالیز واریانس، تأثیر افزایش اینولین، زمانی که یک ساعت نمونه‌های منجمد حاوی باکتری‌های آزاد و ریز پوشانی شده پروبیوتیک، تحت تأثیر محیط شبیه‌سازی شده معده ($\text{pH}=2$ و آنزیم پپسین) قرار گرفت، معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). اما تأثیر زمان و باکتری پروبیوتیک که به

جدول ۱- بقاء *Lactobacillus casei* در بستنی‌مستی فاقد اینولین در طی ۳۰ روز انبارمانی در 18°C و یک ساعت قرارگیری در معرض محیط شبیه‌سازی شده معده

تعداد باکتری پروبیوتیک $\log \text{cfu/ml} \pm$ خطای استاندارد		زمان
حالت ریز پوشانی	حالت آزاد	
$1/661 \pm 0/26$	$9/801 \pm 0/144$	۰ (بعد انجماد و قبل از قرارگیری در محیط شبیه‌سازی شده)
$7/389 \pm 0/124$	$9/227 \pm 0/21$	۱
$7/389 \pm 0/12$	$8/998 \pm 0/09$	۱۰
$7/094 \pm 0/074$	$8/331 \pm 0/142$	۲۰
$6/801 \pm 0/144$	$6/972 \pm 0/097$	۳۰
$0/6418$	$0/9278$	R^2 (ضریب تعیین)

جدول ۲- بقاء *Lactobacillus casei* در بستنی ماستی حاوی ۵ درصد اینولین در طی سی روز انبارمانی در 18°C - و بعد از یک ساعت قرارگیری در معرض محیط شبیه سازی شده معده

زمان	تعداد باکتری پروبیوتیک $\log\text{cfu/ml}$ \pm خطای استاندارد	حالت آزاد	حالت ریزپوشانی
(بعد از انجماد و قبل قرارگیری در محیط شبیه سازی شده)		$9/78 \pm 0/06$	$8/427 \pm 0/09$
۱		$9/355 \pm 0/1$	$8/021 \pm 0/03$
۱۰		$8/256 \pm 0/2$	$7/772 \pm 0/1$
۲۰		$7/759 \pm 0/4$	$7/54 \pm 0/08$
۳۰		$7/267 \pm 0/01$	$6/801 \pm 0/14$
R^2 (ضریب تعیین)		$0/9612$	$0/9239$



شکل ۱- اثر متقابل افزودن اینولین و زمان رسیدگی بر میزان بقاء *Lactobacillus casei* آزاد (الف) و ریزپوشانی شده در نمونه های بستنی ماستی تحت محیط شبیه سازی شده معده

۲ pH پس از گذشت دو ساعت جمعیت اولیه آن ها پنج سیکل لگاریتمی کاهش یافت، که کپسولاسیون آلژینات، به شکل معنی داری قابلیت زندهمانی این باکتری ها را افزایش داد. این نتایج با یافته های برخی از محققین تفاوت دارد. براساس نظر این گروه، در شرایط اسیدی، کپسولاسیون تأثیری بر زندهمانی باکتری های پروبیوتیک ندارد (Kim et al., 2008).

کپسولاسیون *Lactobacillus rhamenosus* در آلژینات، بقاء آن را در $\text{pH}=2$ تا ۴۸ ساعت بهبود بخشیده درحالی که سلول های آزاد، به طور کامل تخریب شدند (گودرسکا و همکاران ۲۰۰۳). در تحقیقی که مندل و همکاران (۲۰۰۶) انجام دادند غلظت سلول های آزاد $10^{11} \times 10$ cfu/ml بود که در پایان ۱ و ۳ ساعت در $\text{pH} = 1/5$ ، شدیداً تا $4/25 - 3/38$ log cfu/ml کاهش یافت. به علاوه، بعد از سه ساعت در معرض شرایط شبیه سازی معدی قرار گرفت، بالاترین بقاء سلول ها در دانک های ۴ درصد آلژینات و بعد از آن ۳ و ۲ درصد، مشاهده شد. وی پروتئین ایزوله دنا توره شده، حفاظت پروبیوتیکی به دنبال ۳ ساعت انکوباسیون در شرایط معدی در

شمار باکتری های زیست پذیر بعد از انجماد در مورد نمونه های حاوی باکتری آزاد و سطوح مختلف اینولین بین $9/78 - 9/81$ log cfu/ml بود که در پایان ۳۰ روز انبارمانی در 18°C - و یک ساعت قرارگیری در معرض محیط شبیه سازی شده معدی، به $6/97 - 7/26$ log cfu/ml رسید که حدود ۳-۲/۵ سیکل لگاریتمی کاهش را نشان داد (جدول ۲ و ۱).

شمار باکتری های زیست پذیر بعد از انجماد در مورد نمونه های حاوی باکتری ریزپوشانی شده و سطوح مختلف اینولین بین $8/15 - 8/66$ log cfu/ml بود که در پایان ۳۰ روز انبارمانی در 18°C - و یک ساعت قرارگیری در معرض محیط شبیه سازی شده معدی، به $6/80 - 7/09$ log cfu/ml رسید که حدود $1/18 - 1$ سیکل لگاریتمی کاهش را نشان می داد (شکل ۱-ب). از نتایج حاصل می توان دریافت که فرآیند ریزپوشانی به حفظ بقای پروبیوتیک تحت شرایط اسیدی بالا کمک کرده و افزایش اینولین نیز به عنوان ترکیب پریبیوتیکی، این اثر را تقویت می کند. نتایج به دست آمده از این تحقیق در تأیید نتایج رضایی مکرّم و همکاران (۲۰۰۸) بود که بیان کردند که لاکتو باسیلوس اسید فیلوس در حالت فاقد کپسول در

محیط شبیه‌سازی معدی، زمانی که نمونه‌های بستنی‌ماستی حاوی پروبیوتیک در شکل آزاد و سطوح مختلف اینولین بود، بین \log ۳۵cfu/ml - ۸/۸۰ به دست آمد که بعد از ۲/۵ ساعت قرار گرفتن در معرض محیط شبیه‌سازی شده روده (آنزیم پانکراتین و $\text{pH}=7/4$)، بعد از طی ۳۰ روز انبارمانی مقدار آن به \log cfu/ml ۵/۱۵-۵/۹ رسید. (جدول ۳ و ۴) که نسبت به ابتدای فرآیند تولید و قبل از قرار گرفتن تحت شرایط شبیه‌سازی شده معدی- روده‌ای حدود ۴ - ۳ سیکل لگاریتمی کاهش در آن نشان داد، در صورتی که تعداد باکتری‌های با قابلیت زیستی، در نمونه‌های حاوی باکتری ریزپوشانی شده، در روز اول پس از تولید و بعد از یک ساعت قرارگیری در معرض محیط شبیه‌سازی شده معدی، بین \log cfu/ml ۸/۲۰ - ۷/۳۸ بود که بعد از ۲/۵ ساعت قرار گرفتن در معرض محیط شبیه‌سازی شده روده، \log cfu/ml ۶/۱۵-۶/۷۷ روز ۳۰ روز انبارمانی در 18°C - رسید که حدود ۲-۲/۵ سیکل لگاریتمی کاهش در بقای باکتری‌ها را نشان داد (جدول ۳ و ۴).

بقاء باکتری‌ها در بستنی ماستی حاوی باکتری‌های آزاد و دارای سطوح مختلف اینولین، روند کاهش، در طول ۳۰ روز انبارمانی بعد از ۲/۵ ساعت قرار گرفتن در معرض محیط شبیه‌سازی شده روده را به صورت یکنواخت برای سه سطح اینولین (۰، ۲/۵ و ۵ درصد) نشان داد (شکل ۲-الف). بقاء باکتری‌ها در بستنی‌ماستی حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده دارای سطوح مختلف اینولین، روند کاهشی در طول ۳۰ روز انبارمانی بعد از ۲/۵ ساعت قرار گرفتن در معرض محیط شبیه‌سازی روده، برای نمونه‌های فاقد اینولین، بیشتر و با شیب تندتر بود که با افزایش اینولین، شیب نمودار ملایم‌تر شده و کاهش کمتری را نشان داد، به طوری که نمونه‌های حاوی ۵ درصد اینولین و باکتری ریزپوشانی شده، بقاء بیشتر باکتری‌های پروبیوتیکی را نشان داد (شکل ۲-ب).

۳۷ درجه سانتی‌گراد را بهبود بخشید (\log cfu/ml $0/2 \pm 8/9$). مقاومت بهبود یافته *Lactobacillus rhamenosus* GG در طول سیستم‌های هیدورلیز شده و تیمار شده حرارتی، به طور احتمالی به خاطر ظرفیت بافری محیط پیرامون میکروبی می‌باشد و می‌تواند فاکتور کلیدی مسئول برای محافظت سلول توسط پروتئین‌های لبنی باشد. از این رو ساکن‌سازی در WPI تیمار شده حرارتی، ممکن است یک مکانیسم موثر محافظتی برای *Lactobacillus rhamenosus* در محیط‌های اسیدی شدید، نظیر معده باشد که سرانجام اجازه دریافت روده‌ای موفق پروبیوتیک‌های زیست‌پذیر را می‌دهد (Doherty et al., 2008). تخریب در محیط معده با توجه به آنچه انتظار می‌رفت، ادامه پیدا نکرد، بنابراین ممکن است گفته شود که قطعات هیدروفوبیک در معرض حرارت بالا در نواحی مرکزی تجمع یافته تشکیل شده، پوشانده می‌شود که به طور بالقوه از رهاسازی سلول‌ها از شبکه پروتئینی جلوگیری می‌کند. (بیولوژی و همکاران، ۲۰۰۲). حدود \log ۲ کاهش در زیست‌پذیری سلول‌های *Lactobacillus acidophilus* csc2400 ریزپوشانی شده، بعد از ۳ ساعت انکوباسیون در $\text{pH}=2$ در مقایسه با \log ۵ کاهش در سلول‌های آزاد وجود داشت در حالی که نژاد ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس csc2409 ریزپوشانی شده، \log ۲ کاهش را در مقایسه با \log ۴ کاهش در تعداد سلول‌های آزاد، تحت شرایط مشابه، نشان داد (Chandramouli et al., 2004). چاندرا مولی و همکاران (۲۰۰۴) افزایش قابل توجه در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس زیست‌پذیر در $\text{pH}=2$ را زمانی که در آلزینات ریزپوشانی شده بود، گزارش کردند.

تأثیر متقابل افزودن اینولین و مدت زمان رسیدگی بر بقاء پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در دو فرم آزاد و ریزپوشانی شده تحت شرایط شبیه‌سازی شده روده:

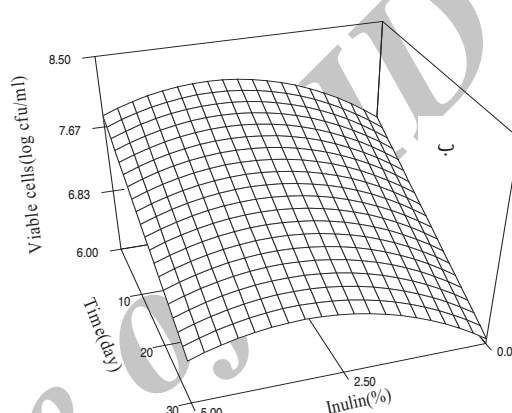
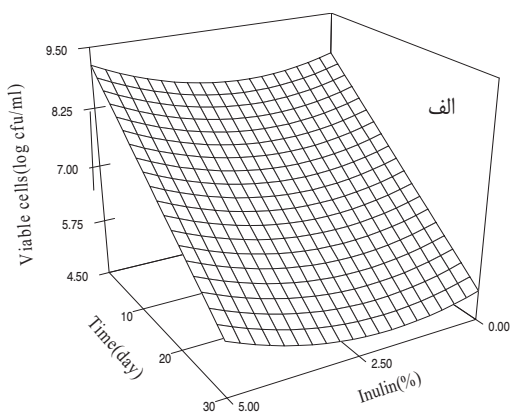
در روز اول پس از تولید (بعد از انجام فرآیند انجماد) تعداد باکتری‌های با قابلیت زیستی، بعد از یک ساعت قرارگیری در معرض

جدول ۳- بقاء لاکتوباسیلوس کازائی در بستنی ماستی فاقد اینولین در طی ۳۰ روز انبارمانی در 18°C - بعد از ۲/۵ ساعت قرارگیری در معرض محیط شبیه‌سازی شده روده.

زمان	تعداد باکتری پروبیوتیک \log cfu/ml \pm خطای استاندارد	
	حالت آزاد	حالت ریزپوشانی
۰ (بعد از یک ساعت قرارگیری در محیط شبیه‌سازی شده معده)	$9/227 \pm 0/02$	$7/38 \pm 0/1$
۱	$8/43 \pm 0/04$	$7/06 \pm 0/02$
۱۰	$7/094 \pm 0/07$	$6/74 \pm 0/04$
۲۰	$6/078 \pm 0/05$	$6/054 \pm 0/08$
۳۰	$5/159 \pm 0/06$	$6/151 \pm 0/2$
R^2 (ضریب تعیین)	۰/۹۷۹۴	۰/۹۵۸۲

جدول ۴- زنده مانی *Lactobacillus casei* بعد از ۲/۵ ساعت قرار گیری در معرض محیط شبیه سازی شده روده ای در بستنی ماستی حاوی ۵ درصد اینولین در طول ۳۰ روز انبار مانی در 18°C -

تعداد باکتری پروبیوتیک $\log \text{cfu/ml}$ \pm خطای استاندارد		زمان
حالت آزاد	حالت ریزپوشانی	
$9/355 \pm 0/1$	$8/021 \pm 0/3$	۰ (بعد از یک ساعت قرارگیری در محیط شبیه سازی شده معده)
$8/537 \pm 0/37$	$7/5 \pm 0/28$	۱
$7/87 \pm 0/2$	$7/182 \pm 0/2$	۱۰
$6/962 \pm 0/16$	$7/04 \pm 0/06$	۲۰
$5/9 \pm 0/07$	$6/772 \pm 0/1$	۳۰
$0/8344$	$0/9612$	R^2 (ضریب تعیین)



شکل ۲- اثر متقابل افزودن اینولین و زمان رسیدگی بر میزان بقاء *Lactobacillus casei* آزاد (الف) و ریزپوشانی شده در نمونه‌های بستنی ماستی تحت محیط شبیه‌سازی شده روده

میکروارگانسیم در برابر شرایط خاص می‌شود. بعلاوه، برخلاف شرایط آزمایشگاهی، مقدار اسیدهای صفراوی در روده ثابت نیست و تا زمان مصرف غذاهای پرچرب، مقدار این ترکیبات در روده بسیار کم است، این خود عاملی است که می‌تواند در جهت سازگار شدن باکتری‌ها و افزایش مقاومت آن‌ها در برابر صفرا عمل کند. بعلاوه، وجود مواد غذایی در روده می‌تواند سبب ایجاد سپر حفاظتی برای میکروارگانسیم‌ها شود و برخی از پروبیوتیک‌ها بدون اینکه با صفرا تماس یابند، در روده به فعالیت بپردازند.

فعالیت نمک‌های صفراوی در شرایط آزمایشگاهی ممکن است بسیار بیشتر از عمل واقعی آن‌ها در روده باشد، زیرا در روده امکان ترکیب این نمک‌ها با فسفولیپیدها نیز وجود دارد. از سوی دیگر، علت را می‌توان وجود آنزیم پانکراتین و اثر آن بر روی تجزیه دیواره سلولی باکتری‌های پروبیوتیک از طریق انجام فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم در مورد سلول‌های باکتریایی در حالت آزاد دانست و نیز در مورد سلول‌های باکتریایی ریز پوشانی شده، علت را می‌توان تجزیه دیواره دانک از طریق فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم بر روی WPC به کار رفته

در طول زمان نگهداری ۳۰ روزه در 18°C ، بعد از ۲/۵ ساعت قرارگیری در محیط شبیه‌سازی شده روده، کاهش معنی‌داری در بقاء پروبیوتیک‌ها در نمونه‌های بستنی ماستی حاوی سه سطح اینولین در روزهای مختلف (صفر، ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰) وجود دارد ($p < 0/05$). تأثیر همه تیمارها (اینولین، زمان، حالت آزاد و ریزپوشانی شده پروبیوتیک‌ها *Lactobacillus casei*) بر میزان بقاء در محیط شبیه‌سازی شده روده ۲/۵ ساعت، معنی‌دار بود ($p < 0/05$).

به‌طور کلی قابلیت زنده‌مانی *Lactobacillus acidophilus* در شرایط ترکیبی معده و روده، کمتر از حالت معده به تنهایی است که نتایج به‌دست آمده با نتایج تحقیق رضایی مکرّم و همکاران (۲۰۰۸) همخوانی دارد، آن‌ها دلیل آن را نامناسب بودن pH روده (۷/۲۵) برای این باکتری اسید دوست دانستند. البته باید توجه داشت که مقاومت باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی در برابر صفرا، گویای رفتار واقعی آن‌ها در دستگاه گوارش نیست، زیرا همانند سایر شوک‌های فیزیولوژیک، شبیه‌سازی واقعی آن‌ها مشکل است. بسیار مشاهده می‌شود که عوامل محیطی باعث تقویت یا تضعیف رفتار

ریزپوشانی با روش امولسیون، توانسته راندمان بالایی در به دام‌اندازی سلول پروبیوتیکی داشته باشد. روشی که در این پژوهش استفاده شد، روش ژلاتیناسیون خارجی بود که قبلاً توسط تراستراپ (۲۰۰۲) و الان (۲۰۰۸) گزارش شد.

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 و با استفاده از آن، بافت نرم‌تری را در مواد غذایی ایجاد کرد. در تحقیقی که رضایی مکرّم و همکاران در (۲۰۰۹) انجام دادند، مشاهده با روش SEM از نظر شکل ظاهری، کپسول‌هایی با ظاهری کاملاً کروی را نتیجه داد. این نتایج با آنچه در این تحقیق به دست آمد، مطابقت داشته و همچنین با گزارش تراستراپ و همکاران (۲۰۰۲) که اظهار کردند دانک‌های بزرگتر از یک میلی‌متر موجب خشن شدن بافت افزودنی‌های غذایی می‌شود، مطابقت دارد. همان‌گونه که در شکل (۳) مشخص است، با روش امولسیون می‌توان دانک‌هایی یک شکل، منظم و کروی تولید کرد. نیز مشاهده گردید که آلژینات به خوبی باکتری‌ها را پوشش داده و دیواره‌ای کروی و یکنواخت را تشکیل داده، که WPC به عنوان ماده پوشش دهنده دانک عمل کرده و در بعضی قسمت‌ها پوشش دو لایه‌ای دانک مشاهده گردید. شاه و مارشال (۱۹۹۳) گزارش کردند که قطر متوسط $30 \mu m$ برای استفاده در دسرهای لبنی منجمد مناسب است. مهره‌های بزرگ باعث سختی بافت شیر یخی شد، درحالی‌که مهره‌های کوچک، حفاظت کافی را برای باکتری‌ها فراهم نمود (Homayouni et al., 2006).

سلطانا و همکاران (۲۰۰۰) بهبود در بازده کپسولاسیون لاکتوبا سیلوس کازنی را در دانک‌های آلژینات، همان‌گونه که غلظت بیوبلی‌مر با افزایش نشاسته مقاوم *Hi-maize* در درصدهای وزنی از صفر تا ۲ افزایش یافت، را گزارش کردند. تراستراپ و همکاران (۲۰۰۵)، گزارش کردند که دانک‌های خیلی بزرگ $1000 \mu m$ منجر به زبر شدن بافت در غذاهای مکمل شده با باکتری‌های زنده شده، و دانک‌های کوچک با سایز کم‌تر از $100 \mu m$ به گونه‌ای معنی‌دار، باکتری‌های پروبیوتیکی را در محیط معدی شبیه‌سازی شده در مقایسه با سلول‌های آزاد محافظت نمودند (Chandramouli et al., 2004).

پروبیوتیک‌ها هنگامی که در آلژینات کلسیم پوشش یافته بودند، ۳۰ درصد بیشتر از زمانی که پوشش نداشتند، زنده ماندند. مطالعات نشان داد که کنترل اندازه ریز دانک‌های آلژینات با استفاده از سرعت هم زدن (۴۰۰ rpm برای ۲۰ دقیقه) امولسیون جهت تولید دانک‌هایی در محدوده ۱۰ تا ۳۰ میکرومتر را ممکن ساخت (Homayouni et al., 2006).

در پوشش دانک دانست. که آن را زودتر در معرض محیط روده و صرفاً قرار می‌دهد نسبت به نتایج کار سایر محققان (رضایی مکرّم و همکاران، ۲۰۰۸) که از آنزیم در محیط شبیه‌سازی استفاده نکردند. نتایج تحقیق مندل^۱ و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که سلول‌های آزاد *Lactobacillus casei*-NCDC، وقتی به ترتیب در معرض ۱ و ۲ درصد نمک صفراوی به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند، از $9/45 \log cfu/ml$ به $7/29 \log cfu/ml$ و از $9/34 \log cfu/ml$ به $5/60 \log cfu/ml$ کاهش یافت. زنده‌مانی *Lactobacillus casei* متناسب با مدت زمانی که در معرض نمک صفراوی قرار گرفت، کاهش یافت و بقاء بالاتر سلول‌ها در کپسولاسیون با آلژینات به‌دست آمد (Mandal et al., 2006).

در تحقیق چاندرامولی^۲ و همکاران (۲۰۰۴)، نتایج به‌دست آمده نشان داد که یک سیکل لگاریتمی و $0/8$ سیکل لگاریتمی کاهش در تعداد سلول‌های زیست‌پذیر *Lactobacillus acidophilus* CSCC ۲۴۰۰ و CSCC ۲۴۰۱ به ترتیب وجود داشت. در غلظت $1/5$ درصد نمک صفراوی^۳ بعد از ۶ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد فقط $0/5$ سیکل لگاریتمی و $0/3$ کاهش در تعداد سلول‌های زیست‌پذیر لاکتوباسیلوس ریز پوشانی شده CSCC ۲۴۰۰ و CSCC ۲۴۰۹ به ترتیب تحت شرایط مشابه، وجود داشت (Chandramouli et al., 2004).

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، در تناقض با نتایج گیلداس و همکاران (۲۰۰۹) می‌باشد که بیان کردند ریزپوشانی باکتری‌ها در مهره‌های آلژینات، به شکل مؤثر از ارگانیس‌م‌ها در برابر اسیدیته‌ی بالا محافظت نکرد. چاندرامولی و دیگران دریافتند که کپسول‌دار کردن *Lactobacillus acidophilus* در آلژینات به میزان زیادی زیست‌پذیری در نمک صفراوی یک درصد را افزایش داد (Mandal et al., 2006).

شمارش تعداد باکتری‌های بدام افتاده در دانک‌ها و تعیین

ریخت شناسی دانک‌ها:

نتایج به‌دست آمده نشان داد که تعداد سلول‌های زنده باکتریایی قبل از ریزپوشانی با آلژینات سدیم-WPC برابر $10/11 \log cfu/ml$ الی $10/30 \log cfu/ml$ بوده است، که بعد از فرایند ریزپوشانی، تعداد سلول زنده باکتریایی به دام افتاده، برابر با $9/28 \log cfu/ml$ الی $9/44 \log cfu/ml$ بود.

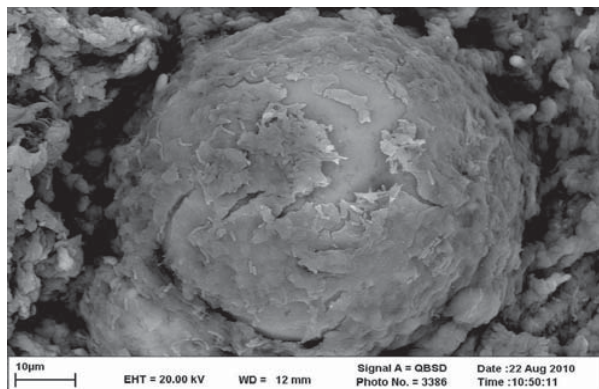
بنابراین با مقایسه تعداد سلول زنده در این دو حالت، یعنی قبل و بعد از فرایند ریزپوشانی، این نتیجه حاصل می‌گردد که فرایند

- 1 - Mandal et. al
- 2 - Chandramouli et. al
- 3 - Bile salf

نتیجه گیری

انسان داشته و بقاء این باکتری‌ها با مقادیر پیشنهادی از سوی فدراسیون بین المللی لبنیات 10^6-10^7 cfu/g در این محصول مطابقت دارد، که آن را می‌توان به عنوان یک محصول دارای خواص سلامت بخشی بالا برای تولید صنعتی، معرفی نمود.

نتایج حاصل از این پژوهش، نشان داد که عمل ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک و افزودن ترکیب پری بیوتیک اینولین به محصول بستنی ماستی، نقش اساسی در حفظ و افزایش زنده‌مانی *Lactobacillus casei* در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش



شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی از دانک‌های آلژینات-وی پروتئین (wpc) حاوی باکتری بدام افتاده *Lactobacillus casei*

منابع

- رضایی مکرم، رضا. سیدعلی، مرتضوی. محمدباقر. حبیبی نجفی. فخری، شهیدی. مرتضوی، خمیری. ۱۳۸۸. اثر میکروانکسیپولاسیون آلژینات کلسیم بر قابلیت زنده ماندن لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ptcc1643 در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده انسان. هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران. مشهد. ۹۴-۹۳.
- میلانی، الناز. بقایی، هما. مرتضوی، سید علی. ۱۳۸۹. اثر جایگزینی عسل خرما و گوار بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و رئولوژیکی دسر بستنی ماستی کم چرب پرتقالی. مجله علمی-پژوهشی (پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران)، دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۱۵-۱۲۰: (۲)۷
- همایونی، عزیز. ۱۳۸۷. خواص سلامت بخش غذاهای فراسودمند، پروبیوتیک، پری بیوتیک و سین بیوتیک. تبریز. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز.
- Akalin A.S and Erisir .D. 2008. Effects of Inulin and oligo fructose on the Rheological characteristics and probiotic culture survival in low- fat probiotic Ice cream. *JFS M: Food Microbiology and Safty*, 73(4); 184-188
- Allan. P- L. Woj tas, truelstrp Hansen, Daulson. A. T. 2008. Micro structural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and a hydrous fixation. *LWT*, 41; 101-108.
- Annan.N.T, Borza.A.D, Truelstrup Hansen.L.2008.Encapsulation in alginate coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic bifidobacterium adolescentis 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions.*Food Research International*, 41: 184-193.
- Chandramouli.V, Kailasapathy, .K. P.peireis, Jones .M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect lactobacillus spp. In simulated gastric conditions. *Journal of Microbilogical Methods*, 56: 27-35.
- Doherty. S.B, Gee. V.L., Ross, .R.P. Stanton. C, Fitzgerald .G-F, Brodkorb .A. 2010. Efficacy of whey protein gel networks, as potential viability- enhancing scaffolds for cell immobilization of lactobacillus

- rhamnosus GG. *Journal of Microbiological Methods*, 80; 231-241.
- Gildas komenan Gbassi, Thierry randamme, said Ennahar, Eric Marchioni .2009. Microencapsulation of lactobacillus plantarum spp in an alginate matrix coated with wehy proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 103-105.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S. & Razavi, S. H., 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111; 50-55.
- Kailas pathy, Kaila. 2002. Microencapsulation of probiotics Bacteria. Technology and potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbial*, 3, 39-48.
- kim, S., Cho, S., kim, S., ok- Ja song, II- Shink shin, Dong su cha, Hyun Jin park. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other, characteristics in *lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT*, 41; 493-500.
- Lingyun Chen, Muriel subirade .2006. Alginate- whey protein granular mic rospheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*, 27; 4646-4654.
- Mandal, S, Puniy. A.K, singh. K. 2006. Effects of alginate concentrations on survival of microencapsulated lactobacillus casei NCDC. 298. *International Dairy Journal*.16; 1190- 1195.
- Michael, phillip.Kailasapathy, kasipathy.Tran, Lai. 2006. Viability of commercial probiotic culture (*Lacidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *L.casei*, *L.paracasei* and *L.rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*.108:276-280
- Milani, elnaz.Koocheki, arash. 2011. The effects of date syrup and guar gum on physical, rheological and sensory properties of low fat frozen yoghurt dessert. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1): 121-129
- Mokarram, R., Mortazavi, S.A., Habibi Najafi M.B., F. Shahidi, 2009. The influence of alginate microencapsulation on survivability of microencapsulated probiotic Lactobacillus acidophilus PTCC 1643 in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International* 42:1040-1045
- Navidghasemizad,sahar.Hesari,Javad.Saris,Per and Nahaei,mohammad raza. 2009.Isolation of lactic acid bacteria from Lighvan cheese,a semi-hard cheese made from raw sheep milk in Iran.*International Journal of Dairy Technology*,260-264.
- O.Sandoval- castilla, C. lobato- calleros, H.S. Garcia- Galindo, J. Alvarez- Ramirez, E. J. Vernon- carter .2009. Textural properties of alginate- pectin beads and survivability of entrapped lb. casei in simulated gastro intestinal conditions and in yogurt. *Food Research International*, 43(1); 111-117
- Pimentel-Gonzalez.D.J., Campos-Montiel.R.G, Lobato-Calleros.C, Pedroza-Islas. R .2009. Encapsulation of *lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 42; 292-297.
- Soukoulis. Ch and Zia C .2008. Impact of the acidification process, hydrocolloids and protein fortifiers on the physical and sensory properties of fro Zen yogurt. *International Fournal of Dairy Technology*, 2: 170-177.