نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۴ شماره ۱/ سال ۱۳۹۳

تاثیر دمای نگهداری بر زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد و کپسوله شده در آب سیب

شهره شیخ قاسمی[۱] و شهین زمردی[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۷

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (آیت الله آملی)

[۲] استادیار بخش فنی و مهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی

*مسئول مکاتبه: Email: shahinzomorodi@gmail.com

چکیده

در این تحقیق، تاثیر دمای نگهداری در زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به دو صورت* آزاد و کپسوله شده در آب سیب و خواص فیزیکی شیمیایی و حسی محصول نهایی در طول ٦٠ روز نگهداری در دمای محیط (۲۵±۵°C) و ۵±۱°C مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ۳ تیمار در ۲ تکرارتهیه شد که عبارت بودن از: ۱- شاهد (CAJ)، ۲-آب سیب حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به صورت آزاد (FPAJ) و ۳-آب سیب حاوی ل. *اسیدوفیلوس* به صورت کپسوله شده (EPAJ). نتایج نشان داد که کپسوله کردن تعداد *ل. اسیدوفیلوس* را در هر دو دما به میزان یک سیکل لگاریتمی از سلول‌های زنده افزایش می‌دهد. *همچنین* تعداد پروبیوتیک‌ها در تیمارهای نگهداری شده در دمای ۲۵±۵ °C در پایان زمان نگهداری در حدود ۱/۵ سیکل لگاریتمی بیشتر از دمای ۵±۱ °C بود. ل. *اسیدوفیلوس* کپسوله شده تغییرات معنی داری ($P\geq0.05$) در میزان شفافیت و کدورت ایجاد نکرد، اما ل. *اسیدوفیلوس* به صورت آزاد موجب کاهش میزان شفافیت و افزایش کدورت آب سیب شد. نتایج ارزیابی خواص حسی نیز نشان داد که افزودن *ل. اسیدوفیلوس* به آب سیب تاثیر نامطلوبی بر رنگ و طعم نمونه‌ها نداشت. در پایان دوره نگهداری (بعد از ٦٠ روز) به جز تیمارFPAJ نگهداری شده در دمای۵±۱ °C ، تعداد *ل. اسیدوفیلوس* در سایر تیمارها بیش از میزان پیشنهادی مورد نیاز برای تامین اثرات سلامتی بود (10^{6}واحد کلنی در گرم). با وجود بالا بودن تعداد *ل. اسیدوفیلوس* در تیمارهای نگهداری شده در دمای محیط، برای جلوگیری از امکان وقوع تخمیر در دمای محیط و برای افزایش عمر انبارمانی، بهتر است نمونه‌ها در یخچال نگهداری شوند. بنابراین، *ل. اسیدوفیلوس* به صورت کپسوله شده نه تنها تاثیر منفی بر خواص فیزیکی‌شیمیایی و حسی آب سیب نداشت، بلکه موجب افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک در طول نگهداری آب سیب نیز گردید.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، خواص حسی، شفافیت، کپسوله کردن، کدورت، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

مقدمه

یکی از اهداف تحقیقات در صنعت غذا تولید غذاهایی است که علاوه بر رفع گرسنگی سبب بهبود سلامتی میزبان شود، که این دسته از مواد غذایی غذاهای فراسودمند نامیده می‌شوند (کلان هامر و کولن ۱۹۹۹). افزودن پروبیوتیک به مواد غذایی یکی از روش‌هایی است که در تولید غذاهای فراسودمند مورد استفاده قرارمی‌گیرد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که پس ازمصرف، در روده ساکن شده و از طریق بهبود میکروفلور طبیعی روده، اثرات مفیدی درسلامتی انسان برجای می گذارند. اکثر پروبیوتیک های شناخته شده نژادهای لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها می‌باشند (بویلستون و همکاران ۲۰۰٤ و رس و همکاران ۲۰۰۲). در این خصوص تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده مانده در ماده غذایی باید حداقل$۱۰^{۶}$–$۱۰^{۷}$ کلنی در گرم یا در میلی‌لیتر باشد تا در تامین سلامتی مفید واقع شود (بلنچت و همکاران ۱۹۹٦).

آب میوه پروبیوتیک، یکی از جدیدترین فرصت‌های نوآوری در تجارت انواع نوشیدنی‌های سالم در سراسر جهان می باشد (سامون و روبینسون ۱۹۹۱). آب میوه‌ها غنی از مواد مغذی بوده و در ضمن کشت‌های استارتری که برای مواد مغذی با پروبیوتیک‌ها رقابت می کنند درآنها وجود ندارد. آب میوه‌ها حاوی میزان بالایی از قندها هستند که می تواند رشد پروبیوتیک را تقویت کرده و به راحتی با استفاده از رفراکتومتر اندازه گیری شوند. بنابراین، آب میوه می‌تواند به عنوان یک حامل برای پروبیوتیک‌ها باشد (گومز و مالکاتا ۱۹۹۹). اگر چه اطلاعات کمتری در مورد فاکتورهای مؤثر در بقای پروبیوتیک‌ها در آب میوه‌ها در مقایسه با محصولات لبنی در دسترس است، اما اغلب پارامترهای مهم موثر شامل pH، مقدار اسیدهای ارگانیک، فیبرهای رژیمی، پروتئین، ترکیبات فنولی، اکسیژن، نژادهای استفاده شده، دما و زمان نگهداری می‌باشد (ناکوئل ۲۰۱۲). امروزه روش‌های مختلفی به منظور افزایش بقای پروبیوتیک‌ها در آب میوه‌ها و سیستم گوارشی انسان به کارمی رود که یکی از این روش‌ها کپسوله کردن می باشد. کپسوله کردن یک فرایند فیزیکی یا مکانیکی جهت به دام انداختن یک ماده در یک حامل به منظور تولید ذرات با قطر کمتر از نانومتر یا میلی‌متر می‌باشد. کپسوله کردن پروبیوتیک‌ها برای محافظت سلول‌ها در برابر شرایط محیطی نامطلوب نسبت به آزاد سازی کنترل شده بیشتر استفاده می‌شود. انواع مختلفی از روش‌های کپسوله کردن وجود دارد که اکستروژن یکی از آنها است. اکستروژن یک روش فیزیکی برای کپسوله کردن سلول‌های پروبیوتیک زنده با استفاده از هیدروکلوئیدها (آلژینات و کاراگینان) به عنوان مواد کپسوله کننده می‌باشد. این روش آسان و ارزان بوده و آسیبی به پروبیوتیکها وارد نمی‌کند و قابلیت زیستی آنها را افزایش می‌دهد. این تکنولوژی حاوی محلول‌های زیان آور نمی‌باشد و می‌تواند در شرایط هوازی و بی‌هوازی انجام شود (بورگین و همکاران ۲۰۱۱).

دینگ و شه (۲۰۰۸) در یک مطالعه ای بقا ۸ نژاد باکتری پروبیوتیک به شکل آزاد و کپسوله شده در آب پرتقال را مورد ارزیابی قرار دادند. آنها گزارش کردند که باکتری های کپسوله شده در آب میوه‌ها بعد از ٦ هفته زنده باقی ماندند ولی پروبیوتیک‌های آزاد در طول ٥ هفته قابلیت زنده مانی خود را از دست دادند. به طور کل پروبیوتیک کپسوله شده پایدارتر از باکتری آزاد در آب میوه‌ها بودند. موسوی و آدامز (۲۰۰۸) بقای *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس فرمانتوم* را در آب پرتقال و آب گوجه-فرنگی در دمای ٤، ۲۳ ، ۳۷ درجه سانتی گراد، به مدت ٤ هفته بررسی کردند. نتایج نشان داد که گونه *ل. رامنوسوس* و *ل. کازئی* در هر دو آبمیوه پایدار بودند.

هدف در این تحقیق بررسی اثر دمای نگهداری و کپسوله کردن به روش اکستروژن در زنده‌مانی *ل.*

اسیدوفیلوس در آب سیب و مطالعه تغییرات فیزیکوشیمیایی و حسی فرآورده نهایی می‌باشد.

مواد و روش ها

آب سیب از کارخانه شادلی ارومیه (با بریکس ۱۲/۲، اسیدیته قابل تیتر برحسب اسید مالیک ۰/۲٤ ٪، pH ۳/۸۳، رنگ، شفافیت و کدورت به ترتیب ٥٤/۷، ۹۹/۳ و ۷/۷۵)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (LAFTI-L10 DSL) از شرکت DSM استرالیا، محیط کشت MRS و گاز پک بی‌هوازی از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

کپسوله کردن

کپسوله کردن پروبیوتیک‌ها به روش اکستروژن انجام گرفت. پودر خشک شده انجمادی *ل. اسیدوفیلوس*، در ٥ میلی لیتر آب پپتون ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) استریل بصورت سوسپانسیون در آورده شد و با ۲۰ میلی لیتر از محلول سدیم آلژینات ۲ درصد (وزنی/حجمی) استریل (در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه) مخلوط گردید. سوسپانسیون سلولی توسط سرنگ استریل با قطر ۰/۲ میلی متر به ظرف حاوی محلول ۰/۰۵ مولار کلرید کلسیم استریل تزریق شد. کپسول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه برای سفت شدن در محلول فوق نگهداشته شدند. سپس آبکشی گردیدند و تا زمان مصرف در آب پپتون ۰/۱ درصد استریل در دمای ٤ °C نگهداری شدند (زمردی و همکاران ۲۰۱۱).

تیمارها

در این تحقیق ۳ تیمار در ۲ تکرار به شرح زیر تهیه شد. نمونه شاهد (CAP)، آب سیب بدون پروبیوتیک، آب سیب حاوی پروبیوتیک آزاد (FPAJ) که مقدار لازم از ل. *اسیدوفیلوس* در مقداری آب سیب استریل حل و در شرایط استریل به آب سیب اضافه گردید. پس از درب بندی، کاملا مخلوط شد. آب سیب با پروبیوتیک کپسوله (EPAJ)، کپسول هایی که قبلا تهیه شده بودند در وزن مشخص در شرایط استریل به آب سیب اضافه شدند. نمونه‌ها در دو دمای ٥± ۲٥ (دمای محیط) و ۱±٥ درجه سانتیگراد (دمای یخچال) به مدت ٦۰ روز نگهداری شدند.

شمارش *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

جهت متلاشی شدن کپسول‌ها و آزاد شدن محتویات آن، رقت اول از نمونه‌ها در محلول ۲ درصد تری سدیم سیترات تهیه شد. برای تهیه آن، مقدار ۱۰ گرم نمونه همگن شده در کیسه‌های زیپ دار استریل حاوی۹۰ میلی لیتر تری سدیم سیترات ۲ درصد استریل توزین شد و مدت ٥ دقیقه توسط استومیچر با دور۲٦۰ در دقیقه همگن گردید تا کپسول‌ها کاملا باز شوند. برای یکنواخت بودن شرایط، رقت ۰/۱ در نمونه های بدون کپسوله نیز از سیترات سدیم استفاده شد. سری رقت‌های بعدی با افزایش یک میلی لیتر از هر رقت به ۹ میلی‌لیتر آب پپتون ۰/۱ درصد استریل تهیه شد. شمارش *ل. اسیدوفیلوس* در محیط کشت MRS آگار حاوی سوربیتول (۱۰ میلی لیتر محلول ۱۰ درصد سوربیتول، استریل شده توسط فیلتر سر سرنگی، به ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت قبل از ریختن در پلیت ها اضافه شد) تحت شرایط بی هوازی توسط گاز پک، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت انجام گرفت (دینگ و شاه ۲۰۰۸).

روش‌های اندازه گیری ترکیبات شیمیایی آب سیب

pH نمونه ها با استفاده از pH متر مدل 691- (Methrohm، ساخت سویس)،درصد اسیدیته قابل تیتر (بر حسب اسید مالیک)، از طریق تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال در حضور شناساگر فنل فتالئین، بریکس با استفاده از رفراکتومتر دستی (Jena Garlzeiss، ساخت آلمان) و رطوبت به روش خشک کردن در آون معمولی در دمای ۱۰۳±۲ °C تعیین شد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۲٦۸٥) .

تعیین شفافیت وکدورت

برای تعیین شفافیت مقدار عبور نور در طول موج ٦۲٥ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Pharmacia، ساخت انگلیس) تعیین گردید. برای استاندارد کردن دستگاه آب

مقطر مورد استفاده قرار گرفت. کدورت (NTU) نیز با استفاده از دستگاه 210 AN turbidimeter (ساخت کمپانی HACH امریکا) موجود در شرکت سیب تاک ارومیه تعیین شد (زمردی و همکاران ۱۳۸۱).

ارزیابی حسی

خواص حسی (رنگ، طعم و پذیرش کلی) توسط ۱۵ نفر گروه ارزیاب حسی با استفاده از آزمایش تمایل مصرف کننده و روش هدونیک ۵ نقطه‌ای تعیین شد. برای این منظور امتیاز ۵ برای کیفیت مطلوب و امتیاز یک برای کیفیت نامطلوب اختصاص داده شد (زمردی و همکاران ۱۳۸۱).

روش طرح آماری

نتایج با استفاده از آزمایشات فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو فاکتور و در دو تکرار تجزیه گردید. فاکتور اول زمان نگهداری در ۵ سطح و فاکتور دوم نوع تیمار در ٤ سطح بود. نتایج با استفاده از نرم افزار Minitab تجزیه و تحلیل شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از نرم افزار MSTAT-C و آزمون LSD انجام گرفت.

نتایج و بحث

تغییرات *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول نگهداری

تغییرات تعداد *ل. اسیدوفیلوس* در تیمارهای FPAJ (آب سیب حاوی *ل. اسیدوفیلوس* به صورت آزاد) و EPAJ (آب سیب حاوی *ل. اسیدوفیلوس* به صورت کپسوله شده) در شکل های ۱ و ۲ در طول نگهداری به مدت ٦۰ روز به ترتیب در دو دمای ۵±۲۵ و ۱±۵ درجه سانتی-گراد آورده شده است.

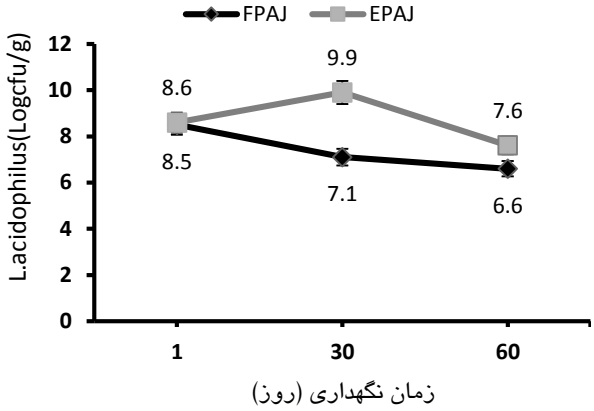
با توجه به شکل‌های ۱ و ۲ در هر دو دمای نگهداری تعداد *ل. اسیدوفیلوس* در تمام تیمارها (آزاد و کپسوله شده) در طول ٦۰ روز نگهداری به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0.05$). کاهش تعداد این پروبیوتیک در نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط بطور معنی-داری کمتر بود ($P<0.05$).

ثابت شده است که زنده‌مانی پروبیوتیک ها در محیط-های اسیدی پایین است (شیهان و همکاران ۲۰۰۷).

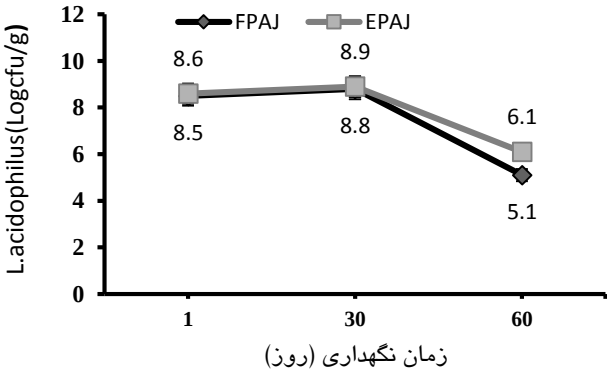
همچنین آب میوه ها ممکن است دارای مواد آنتی میکربی طبیعی یا مواد افزودنی همچون رنگ دهنده‌ها و طعم دهنده باشند که می تواند موجب کاهش زنده‌مانی میکروارگانیسم ها شوند (ویندیرولا و همکاران ۲۰۰۲) . بنابراین، از بین رفتن ل. *اسیدوفیلوس*در طول نگهداری می‌تواند مربوط به پایین بودن pH آب سیب (pH=۳/۸۳) و ترکیبات آب میوه باشد. وقتی که سلولها در محیطی با pH پایین قرار می‌گیرند، برای حفظ pH درون سلولی خود، نیاز به مصرف انرژی بالایی دارند. لذا سایر وظایف اصلی سلولی تحت تاثیر استرس کمبود ATP قرار گرفته و سلول‌ها نمی توانند زنده بمانند (شابالا و همکاران ۲۰۰٦). در واقع شیهان و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که pH بالاتر از ٤/۵ موجب ثبات پروبیوتیک‌ها در طول نگهداری می گردد.

دلیل کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها در فرم کپسوله را نیز می‌توان **به** علت عدم خروج متابولیت‌های تولیدی توسط فعالیت پروبیوتیک ها از درون کپسول دانست که اثر باز دارنده برروی رشد باکتری‌ها داشته و سبب کاهش تعداد آنها شده است (گادوارد و کیلاسپاتی ۲۰۰۳).

کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها در آب میوه‌های مختلف توسط سایر محققان نیز گزارش شده است. دینگ و شاه (۲۰۰۸) نشان دادند که تعداد پروبیوتیک‌ها در طول ٤ هفته نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در آب پرتقال به طور سریع کاهش یافتند.



شکل۱-تغییرات تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در تیمارهای آب سیب نگهداری شده در دمای ۲۵±۵°C



شکل۲- تغییرات تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در تیمارهای آب سیب نگهداری شده در دمای ۵±۱°C

ویندرولا و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که در طول نگهداری آب آناناس و کیوی تعداد ل. *اسیدوفیلوس* و در آب سیب سبز نیز تعداد لاکتوکوکوس لاکتیس بطور معنی‌داری کاهش یافت که با نتایج این بررسی مطابقت دارند.

همچنین در هر دو دمای نگهداری کاهش تعداد *ل. اسیدوفیلوس*در تیمار FPAJ بطور معنی‌داری بیشتر از تیمار EPAJ بود ($P<0.05$). لذا کپسوله کردن زنده مانی *ل. اسیدوفیلوس* را در هر دو دما به میزان یک سیکل لگاریتمی از سلول¬های زنده افزایش داد. این نتایج نشان دهنده اثر حفاظتی کپسول ها بر پروبیوتیک‌ها در برابر شرایط محیط از جمله پایین بودنpH می‌باشد که از استرس کمبود ATP در سلول جلوگیری کرده و موجب افزایش رشد پروبیوتیک‌ها گردیده است. همچنین وجود شرایط بی‌هوازی در داخل کپسول‌ها، موجب رشد بیشتر ل. *اسیدوفیلوس*شده است (پونسلت و همکاران ۲۰۰۷). این نتایج با نتایج سایر تحقیقات مطابقت دارد (لی و هئو ۲۰۰۰؛ پیکوت و لاکرویکس ۲۰۰٤). این محققان نیز نشان دادند که در اثر کپسوله کردن، قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک ها در آب میوه های اسیدی به مدت چندین هفته افزایش یافت. بر اساس گزارش دینگ و شاه (۲۰۰۸) نیز قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک های کپسوله شده در مقایسه با پروبیوتیک آزاد بیشتر بود.

مکرم و همکاران (۲۰۰۹)، اثر کپسوله کردن را بر قابلیت زنده‌مانی ل. *اسیدوفیلوس* در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان بررسی کردند و نشان دادند که کپسوله کردن موجب کاهش مرگ آن در شرایط اسیدی معده (pH 1.5, 2h) شد. لذا کپسوله کردن علاوه بر حفظ پروبیوتیک‌ها در طول نگهداری محصولات غذایی، موجب زنده‌مانی بیشتر آن در شرایط دستگاه گوارش نیز می‌گردد.

در پایان دوره نگهداری تعداد ل. *اسیدوفیلوس* در دمای یخچال و دمای محیط در آب سیب حاوی پروبیوتیک به صورت آزاد، به ترتیب ۵/۱ و ٦/٦ سیکل لگاریتمی و در نمونه حاوی پروبیوتیک کپسوله شده، ٦/۱ و ۷/٦ سیکل لگاریتمی بود. لذا زنده‌مانی آن در هر دو تیمار نگهداری شده در دمای محیط ۱/۵ سیکل لگاریتمی از سلول¬های زنده بیشتر از دمای یخچال بود. چون دمای رشد بهینه این باکتری معمولا در محدوده مزوفیل‌ها بوده و در حدود۳۰°C –٤۰ است. لذا تعداد آن در دمای محیط بیشتر حفظ شده است.

همچنین در پایان دوره نگهداری (بعد از ٦۰ روز) به جز تیمار FPAJ نگهداری شده در دمای یخچال، تعداد ل. *اسیدوفیلوس* در سایر تیمارها بیش از میزان پیشنهادی مورد نیاز برای تامین اثرات سلامتی بود (بالاتر از $۱۰^{٦}$ سیکل لگاریتمی از سلول‌های زنده).

دینگ و شاه (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که بعد از ٦ هفته نگهداری تعداد پروبیوتیک‌ها به صورت آزاد در آب میوه بیشتر از 10^{5} سیکل لگاریتمی از سلول‌های زنده بود که نتایج این بررسی را تایید می‌کند. موسوی و آدامز (۲۰۰۸) بقای *لاکتوباسیلوس رامنوسوس، ل. کازئی و ل. فرمانتوم* را در آب پرتقال و آب گوجه‌فرنگی در دمای٤، ۲۳ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ٤ هفته بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که گونه *ل. رامنوسوس* و *ل. کازئی* در هر دو آب میوه پایدار بودند.

ترکیبات شیمیایی

در جدول ۱ تغییرات pH، درصد بریکس، اسیدیته قابل تیتر و رطوبت آب سیب نگهداری شده در دو دمای ۱±۵ و ۵±۲۵ درجه سانتی گراد آورده شده است. همانطور که از جدول ۱ ملاحظه می گردد، درصد اسیدیته قابل تیتر و pH در تمام تیمارها در طول نگهداری در هر دو دما به ترتیب افزایش و کاهش یافت که این تغییرات فقط در تیمار FPAJ نگهداری شده در دمای محیط معنی‌دار بود ($P<0.05$). درصد اسیدیته قابل تیتر در آب سیب حاوی پروبیوتیک به صورت آزاد در دمای یخچال و محیط به ترتیب ۰/۰۱۷ و ۰/۱۵ درصد و در تیمار حاوی پروبیوتیک کپسوله شده به ترتیب ۰/۰۰۵ و ۰/۰٤درصد افزایش یافت ($P>0.05$).

دینگ و شاه (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که میزان اسید مالیک در آب سیب با پروبیوتیک آزاد در طول نگهداری به مدت ٦ هفته در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، ۰/۱۵ میلی گرم بر لیتر افزایش یافت، در حالیکه در پروبیوتیک کپسوله شده میزان اسید مالیک ۰/۰۷ میلی گرم بر لیتر افزایش پیدا کرد. نیالکوکیل و چارالامپوپولوس (۲۰۱۱) نیز گزارش کردند که در آب میوه‌های پرتقال، گریپ فروت، آناناس، انار و لیمو حاوی *ل. پلانتاروم*، در طول نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦ هفته اسیدیته قابل تیتر افزایش یافت که با نتایج این بررسی مطابقت دارد.

علت افزایش اسیدیته قابل تیتر در تیمار حاوی پروبیوتیک به صورت آزاد ممکن است در اثر فعالیت *ل. اسیدوفیلوس* در آب سیب باشد که در اثر مصرف قندها، اسید لاکتیک و اسید استیک تولید شده و موجب افزایش اسیدیته قابل تیتر و کاهش pH نمونه‌ها گردیده است. همچنین وقوع تخمیر در روزهای پایانی درنمونه-های نگهداری شده دردمای محیط موجب افزایش بیشتر اسیدیته قابل تیتر این نمونه‌ها شده است.

با توجه به جدول ۱ در تمام تیمارهای (CAJ، FPAJ وEPA) نگهداری شده در هر دو دما، در طول نگهداری رطوبت افزایش و بریکس کاهش یافت ($P>0.05$). اما فقط کاهش بریکس در تیمار FPAJ نگهداری شده در دمای محیط معنی‌دار بود ($P<0.05$). علت آن می‌تواند به دلیل مصرف قند توسط ل. *اسیدوفیلوس* باشد که به صورت آزاد استفاده شده‌اند. وقوع تخمیر در این دما نیز ممکن است با مصرف قندها موجب کاهش بریکس و افزایش اسیدیته قابل تیتر شده باشد. در تیمار FPAJ پروبیوتیک‌ها به آسانی می توانند قند را مصرف کنند ولی در تیمار EPAJ کپسول ها مانع دسترسی آسان پروبیوتیک ها به قند می شوند. بنابراین بریکس در نمونه کپسوله شده نسبت به نمونه با پروبیوتیک آزاد بریکس بالاتر بود.

دینگ و شاه (۲۰۰۸) گزارش کردند که بریکس نهایی آب سیب با پروبیوتیک کپسوله شده در پایان ٦ هفته نگهداری بالاتر از آب سیب با پروبیوتیک آزاد بود. شاه و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که بریکس آب میوه‌های مدل حاوی *ل. رامنوسوس، بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *ل. پاراکازئی* بعد از ٦ هفته نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد از ۱۱/۸ به ۹/۱ کاهش یافت.

تغییرات شفافیت و کدورت

با توجه به نتایج حاصل، در هر دو دمای نگهداری، تیمار FPAJ بطور معنی‌داری دارای کمترین میزان شفافیت (شکل۳ و ٤) **و** بیشترین میزان کدورت (شکل ٥ و ٦) بود ($P<0.05$). در حالیکه نمونه شاهد و نمونه

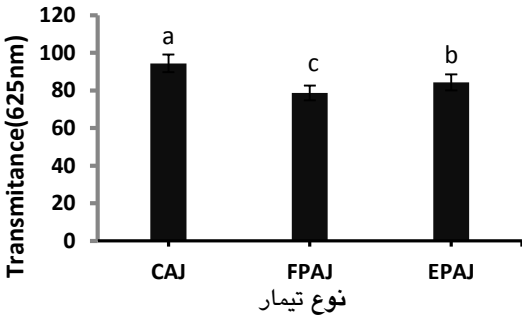
حاوی پروبیوتیک کپسوله بیشترین میزان شفافیت **و** کمترین میزان کدورت را داشتند.

جدول ۱- میانگین ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی آب سیب در طول نگهداری

آزمایش	نوع تیمار	دمای نگهداری ۵±۱°C			دمای نگهداری ۲۵±۵ °C		
		زمان نگهداری (روز)			زمان نگهداری (روز)		
		۱	۳۰	۶۰	۱	۳۰	۶۰
pH	CAJ	۳/۸۳b	۳/۹b	۳/۹۲b	۳/۸۳b	۳/۸۹b	۳/۹۱b
	FPAJ	۳/۸۴b	۳/۸۸b	۳/۹۳b	۳/۸۴b	۳/۸۲b	۳/۷۲c
	EPAJ	۳/۸۳b	۳/۹b	۳/۹۵b	۳/۸۳b	۳/۹۷b	۳/۸۶b
اسیدیته قابل تیتر (٪)	CAJ	۰/۲۴۰c	۰/۲۵۰c	۰/۲۴۵c	۰/۲۴۰c	۰/۲۳۰c	۰/۲۵۵c
	FPAJ	۰/۲۳۸c	۰/۲۵۵c	۰/۲۵۵c	۰/۲۴۸c	۰/۲۵۵c	۰/۳۹۵b
	EPAJ	۰/۲۴۱c	۰/۲۴۵c	۰/۲۴۶c	۰/۲۳۵c	۰/۲۱۰c	۰/۲۷۵c
بریکس (٪)	CAJ	۱۲/۲c	۱۲/۱c	۱۱/۹c	۱۲/۲c	۱۲/۲c	۱۱/۹c
	FPAJ	۱۲/۳c	۱۱/۹c	۱۲c	۱۲/۳c	۱۱/۹۳c	۱۱/۵۵d
	EPAJ	۱۲/۱c	۱۲c	۱۱/۹c	۱۲/۱c	۱۲c	۱۱/۹c
رطوبت (٪)	CAJ	۸۶/۶۵a	۸۷/۷a	۸۷/۹a	۸۶/۶۵a	۸۷/۹a	۸۸/۰a
	FPAJ	۸۸/۰۵a	۸۷/۸a	۸۷/۹۵a	۸۸/۰۵a	۸۸/۰۵a	۸۸/۱۵a
	EPAJ	۸۷/۹a	۸۷/۷۵a	۸۸/۰۵a	۸۷/۹a	۸۸/۲۵a	۸۷/۱۱a

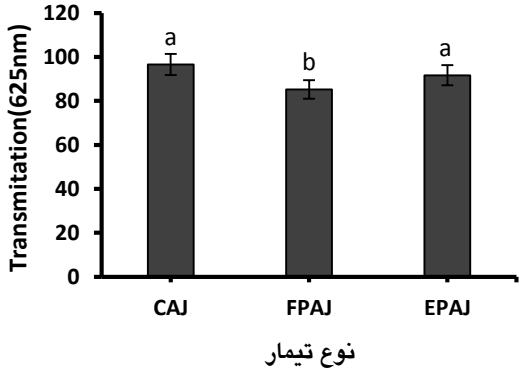
اعداد حداقل با یک حرف مشابه از لحاظ آماری معنی‌دار نیستند($P<0.05$).

CAJ (آب سیب شاهد)، FPAJ (آب سیب حاوی ل. *اسیدوفیلوس* به صورت آزاد) و EPAJ (آب سیب حاوی ل. *اسیدوفیلوس* به صورت کپسوله شده)

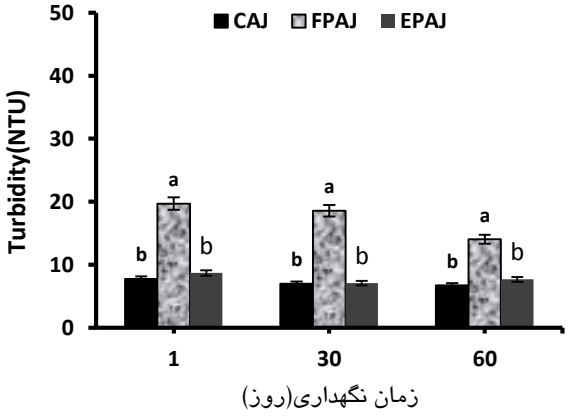


شکل ۳-تاثیر نوع تیمار بر شفافیت آب سیب در طول نگهداری در دمای ۵±۱°C

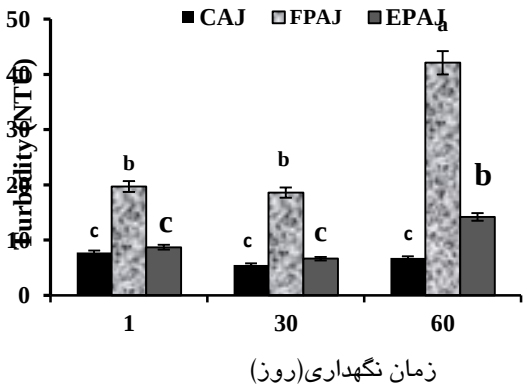
بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت ل. *اسیدوفیلوس* به صورت آزاد سبب کاهش معنی‌دار میزان شفافیت و افزایش کدورت در آب سیب شده است ($P<0.05$) اما استفاده از فرم کپسوله آن تغییرات معنی‌داری در شفافیت و کدورت ایجاد نکرده است ($P>0.05$). در تیمار EPAJ، بیومس پروبیوتیک‌ها و متابولیت های حاصل از فعالیت آنها در درون کپسول‌ها باقی مانده است و موجب کاهش کمتر شفافیت **شده است**. در نتیجه کپسول ها در حفظ شفافیت در آب سیب موثر بودند. اما پایان دوره نگهداری (در روز ۶۰) احتمالا از پایداری کپسول‌ها کاسته شده و کدورت افزایش یافته است



شکل ۴-تاثیر نوع تیمار بر شفافیت آب سیب در طول نگهداری در دمای ۲۵±۵°C



شکل ۵-اثر تیمارها بر کدورت آب سیب در طول نگهداری در دمای ۵±۱°C



شکل ۶-اثر تیمارها بر کدورت آب سیب در طول نگهداری در دمای ۲۵±۵°C

در طول دوره نگهداری به مدت ۱۲۰ روز در دمای ۱±۵ درجه سانتی‌گراد کدورت در تیمار EPAJ نسبت به تیمار FPAJ پایین تر بود ($P<0.05$). شاه و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که کدورت آب میوه‌های مدل حاوی *ل. رامنوسوس*، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *ل. پاراکازئی* بعد از ٦ هفته نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به طور میانگین به میزان ۰/۲۳ افزایش یافت که نتایج بررسی حاضر را تایید می‌کند.

ویژگی‌های حسی

در جدول ۲ اثر تیمارها بر خواص حسی آب سیب در طول نگهداری در دو دمای ۱±۵ و ۵±۲۵ درجه سانتی-گراد نشان داده شده است. با توجه به جدول۲، در هر دو دمای نگهداری تیمارهای آب سیب با پروبیوتیک آزاد و کپسوله شده از لحاظ خواص حسی (رنگ، طعم و پذیرش کلی) با آب سیب شاهد تفاوت معنی داری نداشتند ($P>0.05$). افزودن *ل. اسیدوفیلوس* به آب سیب بر خواص حسی آن تاثیر منفی نداشت و افراد مایل به استفاده از آب سیب پروبیوتیک به شکل آزاد و کپسوله شده بودند. آگاهی مصرف کننده از مزایای سلامتی پروبیوتیک ها و عرضه آنها در بازار سبب افزایش ترجیح مصرف کننده به این محصول می‌شود. نتایج مشابهی نیز توسط لوکو و دلاهانتی (۲۰۰٤) گزارش شده است. آنها نیز بیان کردند که آگاهی از مزایای سلامتی پروبیوتیک‌ها موجب افزایش ترجیح مصرف کنندگان نسبت به آب پرتقال معمولی گردید.

زمردی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که پنیر سفید فراپالایش محتوی مقدار *لاکتوباسیلوس‌ها* از نظر طعم و بافت اختلاف معنی‌داری با نمونه شاهد نداشتند که نشان می دهد افزایش *لاکتوباسیلوس‌ها* اثرات نامطلوبی بر خواص حسی ندارند. از این لحاظ نتایج این تحقیق با نتایج زمردی و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد. اوزر و همکاران (۲۰۰۹)نیز نشان دادند که پنیرهای سفید ترکیه حاوی باکتری‌های پروبیوتیک *ل. اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* کپسوله شده دارای خواص

ارگانولپتیکی مشابه کنترل بود و اختلاف معنی‌داری با آن نداشت که نتایج این بررسی را تایید می‌کند.

جدول ۲- اثر تیمارها در ویژگی‌های حسی تیمارهای آب سیب

نوع تیمار	میانگین‌ها در دمای ۱±۵°C			میانگین‌هادر دمای۵±۲۵°C		
	رنگ	طعم	پذیرش کلی	رنگ	طعم	پذیرش کلی
CAJ	٤/٢٤^{a}	٤/١٢^{a}	٤/٢^{a}	٤/٨^{a}	٤/٤^{a}	٤/٦٦^{a}
FPAJ	٤/٢^{a}	٤/٢٤^{a}	٤/٢٨^{a}	٤/٠٤^{a}	٣/٩٣^{a}	٣/٩٣^{a}
EPAJ	٣/٩٦^{a}	٣/٩٦^{a}	٤/١٦^{a}	٤^{a}	٣/٣٨^{a}	٣/٧٣^{a}

اعداد حداقل با یک حرف مشابه از لحاظ آماری معنی‌دار نیستند($P<0.05$).

CAJ (شاهد)،FPAJ (*حاوی ل. اسیدوفیلوس* به صورت آزاد) و EPAJ (حاوی *ل. اسیدوفیلوس* به صورت کپسوله شده)

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کپسوله کردن، زنده مانی *ل. اسیدوفیلوس* را در هر دو دما به میزان یک سیکل لگاریتمی از سلول¬های زنده افزایش داد. در پایان دوره نگهداری تعداد پروبیوتیک‌ها در تیمارهای نگهداری شده در دمای محیط ۱/۵ سیکل لگاریتمی از سلول¬های زنده بیشتر از دمای یخچال بود. تغییرات خواص شیمیایی در تیمارهای آب سیب نگهداری شده در دمای ۱±۵ درجه سانتی‌گراد و نیز نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط در تیمار حاوی ل. *اسیدوفیلوس* کپسوله شده معنی‌دار نبود. اما استفاده از فرم آزاد پروبیوتیک موجب کاهش خواص کیفی آب سیب گردید. استفاده از فرم کپسوله پروبیوتیک‌ها تغییرات معنی داری در شدت شفافیت و کدورت ایجاد نکرد، اما در آب سیب حاوی ل. *اسیدوفیلوس* به صورت آزاد، شدت شفافیت و کدورت به ترتیب کاهش و افزایش یافت. با توجه به ارزیابی خواص حسی، افزودن ل. *اسیدوفیلوس* به آب سیب تاثیر منفی بر رنگ و طعم نمونه‌ها نداشت و افراد مایل به استفاده از آب سیب پروبیوتیک به شکل آزاد و کپسوله شده بودند. در پایان دوره نگهداری (بعد از ٦٠ روز) به جز تیمار FPAJ نگهداری شده در دمای یخچال، تعداد ل. *اسیدوفیلوس* در سایر تیمارها بیش از میزان پیشنهادی مورد نیاز برای تامین اثرات سلامتی بود (بالاتر از 10^{6} سیکل لگاریتمی از سلول‌های زنده). با وجود بالا بودن تعداد ل. *اسیدوفیلوس* در تیمارهای نگهداری شده در دمای محیط، برای جلوگیری از امکان وقوع تخمیر در دمای محیط و برای افزایش عمر انبارمانی، بهتر است نمونه‌ها در یخچال نگهداری شوند.

در نتیجه استفاده از کپسوله کردن نه تنها تاثیر منفی بر خواص فیزیکی‌شیمیایی و حسی آب سیب نداشت، بلکه موجب افزایش زنده‌مانی *ل. اسیدوفیلوس* در طول نگهداری آب سیب نیز گردید. بنابراین، می‌توان از ل. *اسیدوفیلوس کپسوله شده* با موفقیت در تولید آب سیب پروبیوتیک بهره جست.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله مراتب سپاس خود را از همکاری آزمایشگاه صنایع غذایی بخش فنی ومهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی آذربایجان غربی به دلیل قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی‌می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

زمردی ش، خسروشاهی اصل ا و عزیزی ا، ۱۳۸۱. تاثیر مواد زلال کننده بر کیفیت شیره انگور. تحقیقات مهندسی کشاورزی، جلد ۳ شماره ۱۲، صفحات ٦٥-٧٨.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷. آب میوه: ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. استاندارد شماره۲٦۸٥.

Blanchette L, Roy D, Belanger G and Gauthier S F, 1996. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. Journal of Dairy Science, 79: 8–15.

Boylston T D, Vinderola C G, Ghoddusi H B and Reinheimer J A, 2004. Incorporation of *bifodobacterium* into cheeses: challenges and rewards. International Dairy Journal, 14: 375–387.

BurgainG, Gaiani C, Linder M and Scher J, 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial Applications. Journal of Food Engineering, 104: 467–483.

Carlos K, Ferrai B and Faculdade, 2007. Functional Food and Physical Activities in Health Promotion of Again People. Maturitas, 58: 327-339.

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: 219-232.

Godward G and Kailaspathy k, 2003. Viability and survival of free and encapsulated probiotic bacteria in Cheddar cheese. Milchwissenschaft, 58: 624-627.

Gomes AMP and Malcata FX, 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science and Technology, 10: 139-57.

Klaenhammer T R and Kullen M J, 1999. Selection and design of probiotics. International Journal of Food Microbiol, 50:45-57.

Lee K Y and Heo T R, 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Applied and Environmental Microbiology, 66: 869–873.

Mokarram R, Mortazavi S A, Habibi Najafi M and Shahidi F, 2009. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice, Food Research International, 42: 1040–1045.

Moussavi M P and Adams MC, 2008. A Study on the Survival of Probiotic Lactobacilli in Tomato and Orange Juice, Asia Pac Journal Nutrition, 17: 141-142.

Nualkaekul S and Charalampopoulos D, 2011. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices, International Journal of Food Microbiology, 146: 111–117.

Ozer B, Kirmaci HA, Senel E, Atamer M and Hayaloglu A, 2009. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. International Dairy Journal, 19: 22–29.

Picot A and Lacroix C, 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Dairy Journal, 14: 505–515.

Poncelet D, Dreffier C, Subra-Paternault P and Vandamme TF, 2007. Introduction aux techniques de microencapsulation. In: Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P, (Eds.), Microencapsulation: des Sciences aux Technologies. Ed. Tec and doc, Paris. 3–7.

Ross R P, Fitzgerald G, Collins K and Stanton C, 2002. Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. Ausralian. Journal of Dairy Technology, 57: 785-793.

Samona A and Robinson RK, 1991. Enumeration of bifidobacteria in dairy products, Journal of the Society of Dairy Technology, 44: 64-66.

Shabala L, McMeekin T, Budde B B and Siegumfeldt H, 2006. Listeria innocua and *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* employ different strategies to cope with acid stress. International Journal of Food Microbiology, 110: 1–7.

Shah NP, Ding WK, Fallourd MJ and Leyer G, 2010. Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. Journal of Food Science, 75: 278–282.

Sheehan V M, Ross P and Fitzgerald G F, 2007. Assessing the acid tolerance andthe technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices.Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8: 279–284.

Vinderola C G, Costa G A, Regenhardt Sand Reinheimer J A, 2002. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. International Dairy Journal, 12: 579–589.

Yoon K Y, Woodams E E and Hang Y D, 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. Bioresource Technology, 97: 1427–1430.

Zomorodi Sh, Khosrowshahi Asl A, Razavi Rohani S M and Miraghaei S, 2011. Survival of *Lactobacilluscasei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. International Journal of Dairy Technology, 64: 84-91.

Effect of storage temperature on survival of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* in apple juice

S Shaykhgasemi[1] and S Zomorodi[2]*

Received: August 18, 2013 Accepted: February 26, 2014
[1]MSc Student, Department of Food Science, Islamic Azad University, Science and Research Ayatollah Amoli branch, Amol, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Engineering, Agricultural Research Center, West Azarbijan, Iran
*Corresponding author: Email: shahinzomorodi@gmail.com

Abstract
In this study, effect of storage temperature on survival of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus*in in apple juice and physicochemical and sensorial properties of final products was investigated during 60 days storage at ambient (25 ± 5°C) and 5 ± 1°C. There were three treatments in two replicates, including: 1. Control apple juice (CAJ), 2. Apple juice containing *Lactobacillus acidophilus* in free form (FPAJ) and 3. Apple juice containing *Lactobacillus acidophilus* in encapsulated form (EPAJ). The results showed that the encapsulation caused an increase of 1 log in the number of *L. acidophilus* in both storage conditions. Moreover, the number of probiotics in the kept samples at ambient was 1.5 log cycle greater than those kept at 5 ± 1$^{\circ C}$ at the end of storage. The *Lactobacillus acidophilus* in encapsulated form had not significant effect in transparency and turbidity (P>0.05), but the *L. acidophilus* in free form decreased transparency and increased turbidity in apple juice. The results of sensorial evaluation showed that using of *L. acidophilus* in apple juice had not adverse effect on color and flavor in samples. At the end of the storage period, except the treatment FPAJ stored at 5 ± 1 °C, the number of *L. acidophilus* in the rest of samples was greater than minimum number of the recommended therapeutic products (10^6cfu/g). In despite of high number of *L. acidophilus* in treatments stored at 25 ± 5 $^{\circ C}$, to prevent the possibility of fermentation in ambient temperature and to increase shelf-life, it is recommended to store such products at 5 ± 1°C. Therefore, *L. acidophilus* in capsulated form could be used successfully in apple juice not only caused no adversary affects in the physicochemical and sensorial properties, but also increased survival of it's probiotics.

Keywords: Encapsulated, *Lactobacillus acidophilus*, Probiotic, Sensorial properties, Transparency and Turbidity