مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۲ شماره ۱/ سال ۱۴۰۱/ صفحات ۱۳۷ تا ۱۴۹
DOI: 10.22034/FR.2021.46353.1795

بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم- اینولین در نوشیدنی چای سبز سرد

فرید نصیروند[۱] بهرام فتحی آچاچلویی[۲*] و نیما بابلانی مقدم[۳]

تاریخ دریافت: ۴۰۰/۴/۲ تاریخ پذیرش: ۴۰۰/۸/۱۸

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی- واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

[۲] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[۳] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبه: Email: bahram1356@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: امروزه غنی‌سازی موادغذایی با استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک و استفاده از پری‌بیوتیک‌ها در جهت افزایش جمعیت این باکتری‌ها یکی از روش‌های مورد توجه در صنعت غذا به شمار می‌رود. **هدف:** هدف از انجام این تحقیق بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* ریزپوشانی (انکپسوله) شده با آلژینات کلسیم- اینولین در نوشیدنی چای سبز سرد بود. **روش کار:** در این تحقیق با استفاده از ریزپوشانی کردن باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* با آلژینات کلسیم و همچنین افزودن اینولین در سطوح مختلف (صفر(نمونه کنترل)، ۳ و ۷ درصد وزنی-وزنی) در نوشیدنی چای سبز یک محصول سین‌بیوتیک تولید گردید. در طول دوره نگهداری شمارش باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در محیط کشت و ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی تیمارها انجام گرفت. **نتایج:** با ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک و افزایش میزان اینولین زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشتند ($P<0.05$). همچنین نتایج نشان داد در تمامی تیمارهای چای سبز میزان تغییرات pH تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P\geq0.05$). همچنین میزان اسیدیته در تیمارهای چای سبز دارای اینولین ۳٪ و ۷٪ در روز ۲۸ به‌صورت معنی‌داری بیشتر از همان میزان نسبت به نمونه کنترل بود ($P<0.05$). ارزیابی حسی نیز نشان داد که طعم و مزه در تمامی تیمارهای چای سبز هیچ تفاوت معنی‌داری نداشتند. **نتیجه گیری نهایی:** در کل، از این روش می‌توان به‌منظور افزایش بقای باکتری‌های پروبیوتیک طی فرآیند تولید و نگهداری نوشیدنی چای سبز استفاده کرد.

واژگان کلیدی: نوشیدنی چای سبزسرد، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*، ریزپوشانی، اینولین

مقدمه

بین ماده‌غذایی و سلامت مصرف‌کننده یک رابطه مستقیم و پیچیده وجود دارد. علاوه بر ارزش تغذیه‌ای موادغذایی می‌توان از آنها به‌عنوان وسیله‌ای برای افزایش سلامت مصرف‌کننده استفاده کرد که در واقع از

این موادغذایی تحت عنوان غذاهای فراسودمند یاد می‌شود(آف رسی ۱۸۹۰).

پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها به‌عنوان میکروارگانیسم‌های زنده و منابع تغذیه‌ای آنها، به دلیل برقرار کردن تعادل میکروبی در سیستم گوارش بدن میزبان منجر به افزایش سطح سلامت آن می‌شوند (آف رسی ۱۸۹۰). از بین پری‌بیوتیک‌ها، فروکتان‌های اینولینی به جهت سوق میکروفلور روده‌ای به سمت بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس‌ها مورد توجه‌اند. اینولین به‌عنوان فیبرغذایی قابل تخمیر ضمن بهبود عملکرد روده، دارای نقش بیفیدوژنیک و پری‌بیوتیک است. اینولین به‌عنوان یک فروکتوالیگوساکارید، به‌صورت بسیار گسترده‌ای در صنعت غذا به دلیل حلالیت بالا، نداشتن بو و ضد حساسیت بودن، کاربردهای فراوانی دارد. اختلاط این ماده با محصولات پروبیوتیکی، منجر به رشد باکتری‌های پروبیوتیک می‌گردد (گونزالز–فورتا و همکاران ۲۰۱٤). ازآنجایی‌که باکتری‌های پروبیوتیک به شرطی قادرند اثرات مفید خود را بر سلامتی انسان بگذارند که زنده و به تعداد زیاد ($۱۰^{۷}$cfu/g) به روده بزرگ برسند (چاواری و همکاران ۲۰۱۰)، از دغدغه‌های اصلی تولیدکنندگان این محصولات، زنده‌مانی این باکتری‌ها طی زمان نگهداری محصول و همچنین بقای این پروبیوتیک‌ها در شرایط خاص گوارشی در مواجهه با آنزیمهای گوارشی، اسید معده و املاح قلیایی صفرا در ابتدای روده باریک می‌باشد.

ریزپوشانی به‌عنوان یکی از نوین‌ترین این شیوه‌ها، اثر قابل‌ملاحظه‌ای در این ارتباط داشته است. از دیدگاه میکروب شناختی ریزپوشانی عبارت است از پوشش دادن لایه‌ای از ترکیبات به عنوان پوشش محافظ به دور سلول‌های میکروارگانیسم‌ها در مقیاس میکروسکوپی و محصور کردن آنها به‌منظور تفکیک کردن از محیط، طوری که آزادسازی هدفمند سلول‌ها (در مکان و زمان مناسب) را در پی داشته باشد. از جمله عوامل آزادسازی می‌توان به تغییرات pH، تنش‌های مکانیکی، گرما، فعالیت آنزیمی، زمان، فشار اسمزی، انتشار آهسته رطوبت از خلال پوشینه و حضور ترکیبات شیمیایی اشاره داشت (زوبیلاگا و همکاران ۲۰۰۱). آلژینات پلی ساکاریدی طبیعی (ساخته‌شده از واحدهای بتا- دی مانورونیک[1] اسید و آلفا- ال گلوکورونیک اسید[2]) است که از جلبک‌های دریایی به دست می‌آید. آلژینات به دلیل سهولت کاربرد، زیست سازگاری و قیمت مناسبی که دارد کاربرد وسیعی در ریزپوشانی دارد (کراساکوپت و همکاران ۲۰۰۳). از مهم‌ترین مزایای این ماده که آن را بر دیگر مواد جهت ریزپوشانی ارجحیت می‌دهد می‌توان به غیر سمی بودن آن بر روی باکتری و سلول‌های بدن مصرف‌کننده، شناخته شدن آن به‌عنوان افزودنی مجاز، سهولت استفاده آن اشاره کرد (دولیرز و همکاران ۲۰۰۵).

چای سبز یکی از سالم‌ترین نوشیدنی‌های جهان محسوب می‌شود و در طی سال‌های اخیر اثرات سودمند مصرف این گیاه به اثبات رسیده است. خواص ضد سرطانی چای سبز ناشی از پلی فنل‌های موجود در آن می‌باشد. به احتمال زیاد این اثر ناشی از ممانعت از شروع رشد تومور و همچنین ارتقای القای اپوپتوز و مهار نرخ تکثیر سلولی در نتیجه تعویق رشد و توسعه تومور را باعث می‌شود. توانایی آنتی اکسیدانی چای سبز به صورت مستقیم وابسته به ترکیبات حلقه آروماتیکی و گروه هیدروکسیل است که ساختار آن را تشکیل می‌دهند و این نتیجه اتصال و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد به وسیله ی گروه‌های هیدروکسیل است. به علاوه پلی‌فنل‌های چای سبز فعالیت آنزیم‌های سم زدای کبدی را تحریک می‌کنند. بنابراین، میزان سم زدایی ترکیبات زنوبیوتیک[3]افزایش می‌یابد (اوزجان و همکاران ۲۰۰۸). به این دلیل هدف اصلی از تحقیق

[1] - β-D-mannuronic acid

2- α-L-glucuronic acid

[3]- Xenobiotic

حاضر بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* انکپسوله شده با آلژینات کلسیم-اینولین در نوشیدنی چای سبز سرد و ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی تیمارها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد اولیه

نوشیدنی چای سبز به‌وسیله مخلوط کردن برگ چای سبز (تهیه‌شده از شهرستان لاهیجان، استان گیلان) خشک‌شده در سایه و خردشده، با آب مقطر استریل (w/v۱:۱۰)، در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۳۰ دقیقه هم زدن و سپس سانتریفیوژ کردن (۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه: دمای ۵ درجه سلسیوس) و سپس فیلتر نمودن محلول رویی با فیلترهای شماره ۱ واتمن، تهیه گردید. این محلول تا زمان استفاده در دمای یخچالی نگهداری شد (دی لاسی و همکاران ۲۰۱٤). در این مطالعه از باکتری‌های پروبیوتیک لیوفیلیزه *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* تهیه‌شده از شرکت کریستین هانسن دانمارک[1] استفاده شد. ابتدا باکتری‌های لیوفیلیزه به محیط کشت MRS broth (خریداری شده از شرکت مرک) استریل اضافه شدند و در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت در شرایط هوازی و بی‌هوازی (درجار بی‌هوازی با استفاده از ساشه‌های AneroGen® (OXOID)) گرمخانه گذاری شدند.

تهیه میزان تلقیح باکتری‌ها

سلول‌های پروبیوتیک در انتهای فاز رشد لگاریتمی بعد از کشت سوم متوالی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ الی ۲۰ ساعت به‌وسیله سانتریفیوژ ٤۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس جداسازی شدند و پس از دو بار شستشو با سرم فیزیولوژی استریل رسوب باکتریایی را جدا کرده و سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری در طول‌موج ٦۲۵ نانومتر در محدوده عدد ۰/۱ تهیه گردید (براساس استاندارد نیم مک‌فارلند) و شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی با استفاده از محیط کشت MRS-agar انجام گرفت تا تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون مشخص گردد. همچنین در پایان ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری، کشت خطی در محیط کشت MRS-agar تهیه‌شده و در یخچال ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد. هدف از این کار، دسترسی دائم به باکتری‌های پروبیوتیک در فاز رشد لگاریتمی بعد از سه بار انتقال دادن بود (میرزایی و همکاران ۲۰۱۲).

تهیه دوز تلقیح باکتری

برای تهیه دوز تلقیح باکتری، بعد از تنظیم دستگاه اسپکتروفوتومتر روی طول‌موج ٦۲۰ نانومتر، با کووت حاوی سرم فیزیولوژی استریل، صفر گردید. از سوسپانسیون باکتریایی تهیه‌شده، مقدار مناسبی به داخل کووت منتقل شد و جذب نوری در طول‌موج ٦۲۰ نانومتر در محدوده ۰/۱ تنظیم گردید. از سوسپانسیون باکتریایی تهیه‌شده، ۱ میلی‌لیتر برداشته و با انتقال آن به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد، رقت‌های متوالی تهیه شد. از رقت‌های مناسب در پلیت‌های حاوی محیط MRS Agar به‌صورت سطحی و دو تکرار کشت داده شد و پس از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری، پرگنه‌ها شمارش شد (میرزایی و همکاران ۲۰۱۲). جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی جهت تلقیح به امولسیون ریزپوشانی، ۵۰ میلی‌لیتر از هر دو باکتری با جذب نوری ۰/۱ تهیه شد و بعد از سانتریفیوژ (۳٦۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس)، سلول‌ها جداسازی شده و پس از دو بار شستشو با محلول پپتون واتر ۰/۱ درصد در ۵ میلی‌لیتر از همان محلول نگهداری گردید و جهت ریزپوشانی در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت (کراساکوپت و همکاران ۲۰۰٦).

[1]- Christian Hansen Denmark

ریزپوشانی کردن باکتری‌ها

ریزپوشانی باکتری‌ها با استفاده از روش امولسیون و تحت شرایط استریل انجام گرفت. برای این منظور ابتدا ۲ گرم آلژینات سدیم به ۹۰ میلی‌لیتر (۲ درصد) آب مقطر اضافه گردید و سپس استریل شد. پس‌از آن محلول آلژینات به مدت یک‌شب در یخچال قرار داده‌شد تا ذرات آلژینات به‌خوبی آب جذب نمایند. روز بعد محلول آلژینات از یخچال به محیط آزمایشگاه منتقل‌شده تا با محیط هم‌دما گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر از هر دو سوسپانسیون باکتریایی تهیه‌شده با جذب نوری ۰/۱ در مرحله قبل به داخل آلژینات تخلیه‌شده به‌نحوی‌که غلظت نهایی میکروبی هر باکتری، در محلول آلژینات برابر ۸/۸۵ و ۸/۸۱ Log CFU/ml به ترتیب برای باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* باشد، همراه با غلظت‌های مختلف اینولین (۰، ۳ و ۷ درصد) (استریل شده در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه)، به داخل آلژینات ریخته شده و حدود ۱ میلی‌لیتر توئین ۸۰ نیز به آن اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل جهت تشکیل دانک‌ها به روش اکستروژن و با استفاده از سرنگ انسولین (با قطر ۰/۲ میلی‌متر) وارد محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار گردیده و در مدت کوتاهی در اثر تماس آلژینات با یون‌های کلسیم، دیواره کپسول از جنس آلژینات کلسیم شکل‌گرفته و قطرات به‌صورت دانک‌هایی (باکتری‌های کپسول شده) در محلول کلرید کلسیم ته‌نشین شدند. دانک‌ها به‌منظور سفت شدن در داخل محلول کلرید کلسیم به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شده و سپس محلول کلرید کلسیم زهکشی و شستشو و جدا گردیده و دانک‌های حاصل جمع‌آوری و در داخل پپتون واتر ۰/۱ درصد نگهداری شد (زنجانی و همکاران ۲۰۱٤).

شمارش تعداد باکتری‌های موجود در دانک‌ها

جهت محاسبه بازده انکپسولاسیون، تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در دانک‌ها به روش زیر شمارش گردید. ۱ گرم از دانک‌های باکتری‌ها در ۹ میلی‌لیتر از بافر فسفاته ۰/۲ مول بر لیتر ریخته شد و در کیسه استومیکر استریل قرار گرفت و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس اجازه داده شد باکتری‌های موجود در کپسول‌های تهیه‌شده، آزاد گردند. بعد از رهایش باکتری‌های موردمطالعه، با استفاده از محلول پپتون واتر، رقت‌های مناسبی تهیه شد و در روی محیط کشت MRS-agar در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ الی ٤۸ ساعت، به‌صورت هوازی و بی‌هوازی به ترتیب برای باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*، انکوبه-گذاری و سپس شمارش گردید (کایلاساپاتی و همکاران ۲۰۰٦). بازده انکپسولاسیون با استفاده از تقسیم تعداد سلول‌های باکتری به دام افتاده در هر گرم کپسول بر تعداد سلول‌های اضافه‌شده به هر میلی‌لیتر محلول ریزپوشانی ضربدر ۱۰۰ به دست آمد. بعد از شمارش و مشخص شدن تعداد باکتری‌های موجود در هر گرم دانک‌های تهیه‌شده، ۵ گرم از هر تیمار باکتری انکپسوله تهیه‌شده را به ۵۰ میلی‌لیتر نوشیدنی چای سبز (حدوداً غلظت نهایی باکتری در تمامی تیمار به میزان Log ۷/٤CFU/ml تنظیم گردید) تهیه‌شده اضافه گردید. یک تیمار حاوی میزان مشابهی از باکتری‌ها به‌عنوان تیمار شاهد وجود داشت.

تهیه تیمارها

تیمارهای مورد مطالعه به‌صورت ۱- عصاره چای سبز دارای باکتری‌های پروبیوتیک به فرم آزاد ۲- عصاره چای سبز حاوی باکتری‌های پروبیوتیک میکروکپسوله شده با آلژینات و بدون اینولین ۳- عصاره چای سبز حاوی باکتری‌های پروبیوتیک میکروکپسوله شده با آلژینات و ۳ درصد اینولین ٤- عصاره چای سبز حاوی باکتری‌های پروبیوتیک میکروکپسوله شده با آلژینات و ۷ درصد اینولین بود که بعد از اضافه کردن کپسول باکتری‌ها درنهایت نوشیدنی چای سبز در دمای یخچال تا انجام آزمایش نگهداری گردید. نمونه‌گیری جهت

آنالیز میکروبی و شیمیایی در روزهای صفر (روز انجام آزمون)، ۷، ۱٤ و ۲۸ انجام گرفت.

آزمون‌های میکروبی

جهت انجام آزمون‌های میکروبی ابتدا ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه‌های نوشیدنی مورد مطالعه در ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول بافر فسفاته ۰/۲ مول بر لیتر مخلوط شد و با استفاده از استومیکر به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد (که باعث رهایش سلول‌های باکتری از دانک‌ها گردید) و سپس با استفاده از رقت‌های مناسب تهیه‌شده با محلول‌های ۹ میلی‌لیتری از بافر پپتونه، کشت میکروبی انجام گرفت.

از محیط کشت MRS agar در شرایط هوازی و بی‌هوازی، به ترتیب، برای جداسازی و شمارش باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* به‌صورت کشت سطحی و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، استفاده شد (تارماراج و شاه ۲۰۰٤). تمامی آزمون‌های میکروبی به‌صورت سه تکرار و با توجه به فاکتور رقت تعداد آن‌ها به‌صورت log CFU/gr گزارش گردید.

اندازه‌گیری pH و اسیدیته قابل تیتر

در زمان‌های مورد مطالعه، ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه مورد نظر را در یک بشر ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و الکترود pH متر پس از کالیبراسیون، کاملاً داخل نمونه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. اسیدیته با روش تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال، محاسبه شد. نتایج برحسب گرم اسیدلاکتیک در ۱۰۰ میلی لیتر محصول بیان گردید (چای کاو و همکاران ۲۰۱۷).

آزمون حسی

ارزیابی حسی نمونه‌ها در روز ۷ آزمون، در دمای محیط توسط ۱۰ داور انجام گردید. تیمارهای تهیه‌شده توسط داوران نیمه آموزش‌دیده و با استفاده از آزمون هدونیک پنج امتیازی (امتیاز ۱ الی ۵)، از نظر خصوصیات ارگانولپتیکی (طعم و مزه) مورد ارزیابی قرار گرفت (سینگ و همکاران ۲۰۱۱).

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های مستخرج از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام پذیرفت و تفاوت میان تیمارها با یکدیگر و با گروه کنترل، توسط آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) ارزیابی شد. همچنین تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار و در زمان‌های صفر، ۷، ۱٤ و ۲۸ انجام گردید.

نتایج و بحث

مطابق جدول ۱، شمارش باکتری‌های لاکتوباسیلوس شاهد و همچنین انکپسوله شده با آلژینات حاوی غلظت‌های مختلف اینولین در طی نگهداری در نوشیدنی چای سبز به‌صورت معنی‌داری ($p<0/05$) کاهش پیدا کردند که در روز نهایی آزمون بیشترین کاهش ($p<0/05$) مربوط به تیمار شاهد و کمترین کاهش ($p<0/05$) مربوط به تیمار باکتری انکپسوله شده با آلژینات و ۷ درصد اینولین بود. همچنین شمارش باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* شاهد و همچنین انکپسوله شده با آلژینات حاوی غلظت‌های مختلف اینولین در طی نگهداری در نوشیدنی چای سبز (جدول ۲) به‌صورت معنی‌داری ($p<0/05$) کاهش پیدا کردند، این روند مشابه روند زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس مورد مطالعه در طی همین تحقیق بود.

مطابق جدول ۳، میزان تغییرات pH در تیمارهای مورد مطالعه حاوی باکتری‌های پروبیوتیک شاهد و همچنین انکپسوله شده با آلژینات حاوی غلظت‌های مختلف اینولین در طی نگهداری در نوشیدنی چای سبز به‌صورت معنی‌داری ($p<0/05$) در تمامی روزهای آزمون ثابت بود. همین‌طور که در جدول ٤ مشاهده می‌گردد، میزان تغییرات اسیدیته در تیمارهای مورد مطالعه حاوی باکتری‌های پروبیوتیک شاهد و همچنین انکپسوله شده با آلژینات حاوی غلظت‌های مختلف اینولین در طی نگهداری در نوشیدنی چای سبز

به‌صورت معنی‌داری ($p<0/05$) در تمامی روزهای آزمون افزایش‌یافته است که این میزان در تیمار نوشیدنی چای سبز حاوی باکتری‌های پروبیوتیک میکروکپسوله شده با آلژینات و ۷ درصد اینولین در روز نهایی آزمون از تمامی تیمارها به‌صورت معنی‌داری ($p<0/05$) بالاتر بود که نشان دهنده این قضیه هست که این باکتری‌ها در طی زمان از کپسول خارج و در شرایط دمای پایین فعالیت کرده و باعث تولید اسید شده‌اند. همچنین این باکتری‌ها به خوبی توانسته اند شرایط نامناسب از جمله اکسیژن محیط، pH پایین نوشیدنی را هم تحمل کنند. نتایج تحقیقات هاشمی و همکاران(۲۰۱۵) نشان داد که تولید دوغ سین-بیوتیک با استفاده از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و اینولین در طول نگهداری منجر به کاهش pH نمونه های دوغ تولیدی شد. همچنین هاشمی و همکاران (۲۰۱۵) اذعان داشتند که اضافه کردن اینولین به دوغ منجر به بهبود زنده مانی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌شود. نتایج این تحقیق مطابق با نتایج هاشمی و همکاران (۲۰۱۵) بود.

میکروانکپسولاسیون یک روش جدید در محافظت فیزیکی از پروبیوتیک‌ها و در نتیجه افزایش بقای آن‌هاست. شرایط نامساعد محیطی که طی فرایندهای مختلف از تولید تا مصرف اتفاق می‌افتد و همچنین شرایط موجود در دستگاه گوارش منجر به کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها می‌شود که میکروکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها می‌تواند به‌عنوان یک روش جدید و کارآمد در افزایش زنده‌مانی آنها مؤثر واقع شود. در این مطالعه، میکروکپسولاسیون *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* با آلژینات و اینولین در نوشیدنی چای سبز طی نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) در کاهش تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بین فرم آزاد و میکروکپسوله در تیمارهای مورد مطالعه در طی نگهداری می‌باشد. شاه و راولا در سال ۲۰۰۰، از میکروکپسولاسیون به‌عنوان یک روش مؤثر در افزایش بقای پروبیوتیک‌ها در دسرهای سرد و یا منجمد شده، نام بردند. کراساکوپت و همکاران نیز در سال ۲۰۰٤ تائید کردند که میکروکپسولاسیون با آلژینات و یک فیبر دیگر بهترین روش جهت محافظت از پروبیوتیک‌ها در شرایط مختلف است. گاندومی و همکاران در سال ۲۰۱٦ گزارش نمودند استفاده از آلژینات و کیتوزان بازده بالاتری از استفاده از این مواد همراه با اینولین جهت به دام اندازی باکتری‌های پروبیوتیک در میکروکپسول‌ها داشت. در این تحقیق نیز گزارش‌شده است که استفاده از اینولین در ساختار ریزپوشانی باعث افزایش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک موردمطالعه در دمای یخچالی و دمای اتاق در ماده غذایی، گردیده است که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. میزان بقای پروبیوتیک‌ها در مواد غذایی سرد و یا منجمد در شرایط نامطلوب محیطی مثل وجود اکسیژن، فرایند انجماد و صدمات ناشی از آن به دلیل استرس‌های مکانیکی موجود در پروسه تولید و همچنین نگهداری در درجه حرارت‌های پایین تحت تأثیر قرارگرفته و به گونه آنها بستگی دارد. بیشتر گونه‌های بیفیدوباکتریوم‌ها به pH پایین حساس هستند، بنابراین، pH اسیدی مواد غذایی سین‌بیوتیک نظیر نوشیدنی چای سبز که دارای pH کمتر از ۵/۵ است باعث کاهش جمعیت آنها می‌گردد. نوشیدنی چای سبز یک فراورده‌ای است که به علت فرایند جابه‌جایی و در طی پروسه تولید، حجمی هرچند اندک از آن را اکسیژن تشکیل می‌دهد و گونه‌های بیفیدوباکتریوم به‌شدت بی‌هوازی هستند؛ بنابراین، سمیت ناشی از اکسیژن یکی از فاکتورهای مرگ سلولی در آن‌هاست که با محصور کردن بیفیدوباکتریوم در دانک‌ها می‌توان از آنها محافظت نمود و درنهایت میکروکپسولاسیون به بقای بیشتر آنها کمک می‌کند (کایلاساپاتی و همکاران ۲۰۰۳). همایونی و همکاران در سال ۲۰۰۸، اثر نشاسته مقاوم

را بر بقای *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* میکروکپسوله با آلژینات در بستنی سین‌بیوتیک مورد بررسی قراردادند و به این نتیجه رسیدند که بکار بردن یک ماده پری‌بیوتیک همراه با آلژینات می‌تواند منجر به بقای پروبیوتیک‌ها شود و در نمونه‌های بستنی حاوی پروبیوتیک‌های میکروکپسوله، مدت‌زمان بیشتری لازم است تا یک لگاریتم از جمعیت باکتریایی کاسته شود و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* میکروکپسوله مقاومت بیشتری نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی* دارد که این می‌تواند به علت بیفیدوژنیک بودن نشاسته مقاوم و اثر حفاظتی میکروکپسولاسیون در مقابل سمیت اکسیژن موجود باشد. نتایج مطالب فوق با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد و کمترین کاهش در تعداد بیفیدوباکتریوم میکروکپسوله طی نگهداری نوشیدنی چای سبز سین‌بیوتیک در شرایط یخچالی می‌تواند ناشی از اثر حفاظتی میکروکپسولاسیون در مقابل شرایط نامساعد محیطی باشد. در مطالعه حاضر، علاوه بر مدت‌زمان ماندگاری پروبیوتیک‌ها، هیچ‌گونه تغییرات خاصی در ارزیابی حسی نوشیدنی چای سبز مورد مطالعه ایجاد نگردید که نشان‌دهنده عدم تأثیر این محصول بر بازارپسندی آن می‌باشد. نتایج بدست آمده از تحقیقات مظلومی و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که اضافه کردن ۲ درصد اینولین به ماست پروبیوتیک تاثیر قابل توجه ای روی طعم ماست تولیدی نداشت. همچنین نتایج مطالعه روی ویژگی‌های حسی پنیر سین-بیوتیک محتوی اینولین نشان داد که اضافه کردن اینولین تاثیر معنی‌داری روی طعم و دیگر خصوصیات حسی پنیر سین‌بیوتیک نداشت (کاردارلی و همکاران ۲۰۰۸). ودنار و همکاران در سال ۲۰۱۲ عنوان نمودند که عصاره چای سبز باعث بقای بیفیدوباکتریوم میکروکپسوله با آلژینات –کیتوزان در شرایط مختلف می‌شود و پیشنهاد نمودند که ۵ و ۱۰ درصد عصاره چای سبز باعث افزایش تعداد پروبیوتیک ها بعد از ۱۲۰ دقیقه در شرایط معده و روده‌ای می‌شود، در حالیکه در نمونه‌های فاقد چای سبز به‌سرعت و طی ۲ ساعت، تعداد آنها از ۹log CFU/ml به log CFU/ml ۲/٦ رسید. همچنین در شرایط نگهداری یخچالی نیز این اثر مثبت دیده شد و بعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس، اختلاف معنی‌داری در تعداد پروبیوتیک‌ها بین نمونه‌های حاوی و فاقد عصاره چای سبز دیده شد. مولان و همکاران در سال ۲۰۰۹ اظهار داشتند که عصاره چای سبز حاوی سلنیوم سبب رشد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در شرایط آزمایشگاهی می‌شود و مکانیسم اثر آن را به پلی فنل‌های موجود در چای سبز، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد رادیکالی چای سبز نسبت دادند تا در نهایت محیط مناسب‌تری برای رشد پروبیوتیک ها فراهم گردد.

همان‌طور که نتایج ارزیابی در شکل شماره ۱ مشاهده می‌گردد، هیچ تفاوت معنی‌داری($p>0/05$) در خصوصیات ارگانولپتیکی (طعم و مزه) بین تیمارهای مورد مطالعه در این تحقیق نبود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه بر طبق دستورالعمل فدراسیون بین‌المللی شیر (IDF)، باکتری‌های پروبیوتیک به شرطی قادرند اثرات مفید خود را بر سلامتی انسان بگذارند که در مواد غذایی به‌صورت زنده باشند و به تعداد حداقل ۷ log CFU/g به روده بزرگ برسند، با استناد به مطالعه فوق و مطالعه حاضر می‌توان از این روش برای انکپسوله کردن باکتری‌های پروبیوتیک در چای سبز به‌عنوان یک روش مناسب جهت افزایش مدت‌زمان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها استفاده نمود. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن است که بکار بردن انکپسولاسیون با آلژینات و اینولین در نوشیدنی چای سبز به‌عنوان یک روش مناسب در میکروکپسوله کردن پروبیوتیک‌ها در یک محصول جدید می‌تواند به‌طور معنی‌داری سبب افزایش بقای آنها در مواد غذایی شود.

جدول ۱- شمارش باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* انکپسوله در نوشیدنی چای سبز در طول نگهداری در دمای یخچالی

Table 1- Counts of encapsulated *Lactobacillus casei* in green tea drink during the storage at glacial temperature

	Test time			
	1th day	7th day	14th day	28th day
control	7.40±0.01 Ba	7.27±0.05 Bb	7.11±0.03 Bc	6.69±0.09 Bd
Encapsulated bacteria without inulin	7.40±0.02 Ba	7.32±0.05 ABb	7.17±0.04 Abc	6.77±0.04 Bd
Encapsulated bacteria with 3% inulin	7.40±0.01 Ba	7.32±0.06 ABa	7.23±0.06 Ab	7.18±0.05 Ab
Encapsulated bacteria with 7% inulin	7.43±0.02 Aa	7.38±0.06 Aa	7.26±0.07 Ab	7.20±0.06 Ab

Values are in the Log CFU/ml form and Each value in the table represents the mean ±standard deviation of triplicate analysis. Different of lowercase letters, represent significant differences in row and different uppercase represent significant differences in each column (P<0/05).

جدول ۲- شمارش باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* انکپسوله در نوشیدنی چای سبز در طول نگهداری در دمای یخچالی

Table 2- Counts of encapsulated *Biphidobacterium lactis* in green tea drink during the storage at glacial temperature

	Test time			
	1th day	7th day	14th day	28th day
control	7.41±0.03 Aa	7.14±0.06 Cb	6.92±0.06 Cc	6.21±0.02 Cd
Encapsulated bacteria without inulin	7.34±0.02 Ba	7.25±0.04 Bb	7.13±0.03 Bc	6.68±0.06 Bd
Encapsulated bacteria with 3% inulin	7.39±0.01 Aa	7.37±0.03 Aa	7.34±0.04 Aa	7.15±0.06 Ab
Encapsulated bacteria with 7% inulin	7.40±0.01 Aa	7.33±0.07 ABab	7.33±0.03 Aab	7.24±0.08 Ab

Values are in the Log CFU/ml form and Each value in the table represents the mean ±standard deviation of triplicate analysis. Different of lowercase letters, represent significant differences in row and different uppercase represent significant differences in each column (P<0/05).

جدول۳- میزان pH در نوشیدنی چای سبز در طول نگهداری در دمای یخچالی

Table 3-The PH level in green tea drink during the storage at glacial temperature

	Test time			
	1th day	7th day	14th day	28th day
control	5.24±0.06 Aa	5.26±0.04 Aa	5.24±0.03 Aa	5.24±0.05 Aa
Encapsulated bacteria without inulin	5.25±0.01 Aa	5.26±0.02 Aa	5.26±0.02 Aa	5.27±0.02 Aa
Encapsulated bacteria with 3% inulin	5.24±0.03 Aa	5.22±0.01 Aa	5.26±0.02 Aa	5.27±0.01 Aa
Encapsulated bacteria with 7% inulin	5.24±0.02 Aa	5.23±0.02 Aa	5.23±0.01 Aa	5.24±0.03 Aa

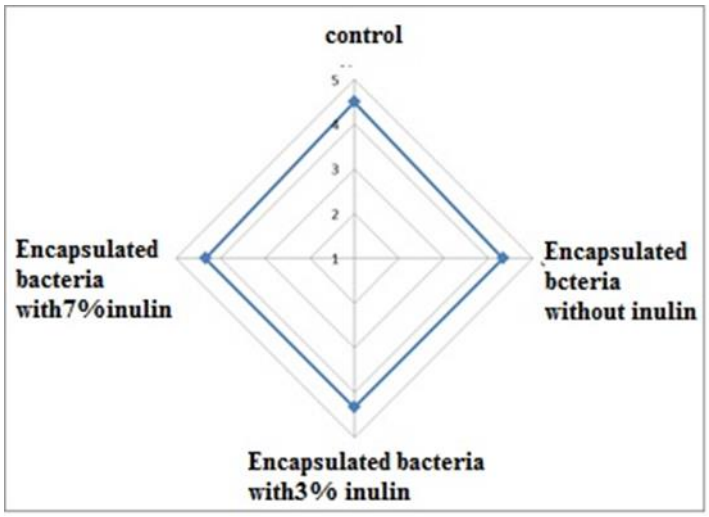
Values are in the Log CFU/ml form and Each value in the table represents the mean ±standard deviation of triplicate analysis. Different of lowercase letters, represent significant differences in row and different uppercase represent significant differences in each column (P<0/05).

جدول ۴- میزان اسیدیته در نوشیدنی چای سبز در طول نگهداری در دمای یخچالی

Table 4-The amount of acidity in green tea drink during the storage at glacial temperature

	Test time			
	1th day	7th day	14th day	28th day
control	2.80±0.02 ^{Bc}	2.84±0.04 ^{Abc}	2.87±0.02 ^{Bb}	2.94±0.03 ^{Ba}
Encapsulated bacteria without inulin	2.86±0.02 ^{Ab}	2.87±0.03 ^{Ab}	2.95±0.03 ^{Aa}	2.97±0.03 ^{Ba}
Encapsulated bacteria with 3% inulin	2.84±0.01 ^{ABb}	2.88±0.03 ^{Ab}	2.98±0.04 ^{Aa}	3.04±0.05 ^{Aa}
Encapsulated bacteria with 7% inulin	2.85±0.05 ^{ABc}	2.86±0.02 ^{Ac}	2.97±0.03 ^{Ab}	3.04±0.04 ^{Aa}

Values are in the Log CFU/ml form and Each value in the table represents the mean ±standard deviation of triplicate analysis. Different of lowercase letters, represent significant differences in row and different uppercase represent significant differences in each column (P<0/05).



شکل ۱- نمودار ارزیابی حسی (طعم و مزه) در تیمارهای نوشیدنی چای سبز

Figure 1-Sensory evalution (Flavour and taste) chart in green tea drink tratments

منابع مورد استفاده

AFRC, R F. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Microbiology 66(5): 365-378.

Cardarelli HR, Buriti FCA, Castro IA, and Saad SMI. 2008. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. LWT-Food Science and Technology 41(6): 1037–1046.

Chaikaew S, Baipong, S, Sone T, Kanpiengjai A, Chui-Chai N, Asano K and Khanongnuch C. 2017. Diversity of lactic acid bacteria from Miang, a traditional fermented tea leaf in northern Thailand and their tannin-tolerant ability in tea extract. Journal of Microbiology 55(9): 720-729.

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 gastro-intestinal conditions. International journal of food microbiology 142(1-2): 185-189.

De Lacey AL, Pérez-Santín E, López-Caballero ME\ and Montero P. 2014. Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. LWT-Food Science and Technology 55(1): 314-322.

Doleyres Y, Lacroix C. 2005. Technologies with free and immobilized cells for probiotic bifidobacteria production and protection. International Dairy Journal 15: 973–988.

Gandomi H, Abbaszadeh S, Misaghi A, Bokaie S, and Noori N. 2016. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of Lactobacillus rhamnosus GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. LWT-Food Science and Technology 69: 365-371.

González-Forte L, Bruno E, and Martino M. 2014. Application of coating on dog biscuits for extended survival of probiotic bacteria. Animal Feed Science and Technology 195: 76-84.

IDF 1991. Yogurt: determination of titratable acidity- potentiometric method. International Dairy Federation Standard 150. Brussels – Belgium.

Hashemi FS, Gharibzahedi SMT, and Hamishehkar H. 2015. The effect of high methoxyl pectin and gellan including psyllium gel on Doogh stability. RSC Advances 5(53): 42346–42353.

Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS, and Razavi SH.2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food chemistry 111(1):50-5.

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.

Kailasapathy K, and Sultana k. 2003. Survival and b-D-galactosidase activity of encapsulated and free Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis in ice cream. Australian Journal of Dairy Technology 58(3): 223–227.

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.

Krasaekoopt W, Bhandari B, and Deeth H. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. LWT 39(6): 177-183.

Krasaekoopt W, Bhandari B, and Deeth H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal 13(1): 3-13.

Mazloumi SM, Shekarforoush SS, Ebrahimnejad H, and Sajedianfard J. 2011. Effect of adding inulin on microbial and physico-chemical properties of low fat probiotic yogurt. Iranian Journal of Veterinary Research 12(2):93-98.

Mirzaei H, Pourjafar H, and Homayouni A. 2012. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of Lactobacillus acidophilus La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. Food Chemistry 132(4): 1966-1970.

Molan AL, Flanagan J, Wei W and Moughan PJ. 2009. Selenium-containing green tea has higher antistidant and prebiotic activities than regular green tea. Food Chemistry 829:114–835.

Özcan M M, Ünver A, Uçar T, and Arslan D. 2008. Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. Food Chemistry 106(3): 1120-1127.

Shah NP and Ravula R R. 2000. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. Australian Journal of Dairy Technology 55:139–144.

Singh G, Kapoor I PS and Singh, P. 2011. Effect of volatile oil and oleoresin of anise on the shelf life of yogurt. Journal of Food Processing and Preservation 35(6): 778-783.

Tharmaraj N, and Shah N P. 2004. Survival of Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium animalis and Propionibacterium in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. International Dairy Journal 14(12): 1055-1066.

Vodnar D and Socaciu C. 2012. Green tea increases the survival yield of Bifidobacteria in simulated gastrointestinal environment and during refrigerated conditions. Chemistry Central Journal 6-61.

Zanjani M A K, Tarzi BG, Sharifan A, and Mohammadi N. 2014. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. Iranian journal of pharmaceutical research IJPR 13(3): 843.

Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, Caro R, and Boccio J. 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. Nutrition Research 21(3): 569-579.

Journal of Food Research, 2022,32(1):137-149
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/FR.2021.46353.1795

Investigation of survival of probiotic *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* encapsulated with calcium alginate-inulin in cold green tea drink

F Nasirvand [1], B Fathi-Achachlouei [2*] and N Babolanimogadam[3]

Received: June 23, 2021 Accepted: November 10, 2021
[1]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University of Sarab Branch, Sarab, Iran
[2]Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[3]PhD Student, Department of Health and Food Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[*]Corresponding author: bahram1356@yahoo.com

Introduction: Nowadays, food enrichment using probiotic bacteria and prebiotics to increase the population of the bacteria is one of the most important methods in the food industry. Probiotics are live organisms, which when consumed in adequate amounts confer a healthy benefit on the host apart from basic nutrition. Probiotics have been incorporated into a wide range of foods including yogurt, cheese, ice cream, and non-dairy products such as chocolate, fruit, biscuits, meat, etc. (González-Forte L et al., 2014). Prebiotic foods are defined as non-digestible food ingredients that benefit the host by stimulating the growth and activity of one or of a limited number of bacteria in the colon, improving in this way the host's health (González-Forte L et al., 2014). The reported results showed that fructooligosaccharides (FOS) consumption leads to a better absorption of several minerals, such as calcium and magnesium, essential components in bones and teeth. Among FOS, inulin is widely used in the food industry as a soluble, odourless and hypoallergenic fibre. Combination of these specific chemical substances with the administration of probiotics produces a synergistic effect on a wide variety of metabolic processes (González-Forte L et al., 2014). Related to this, Results showed that inulin stimulated the growth of L. Plantarum in the gastrointestinal tract of a mouse. When adding probiotics to foods, the survival of bacteria during processing and while exposed to gastric conditions should be considered. Several techniques involving encapsulation and immobilization of bacteria have been used so that a more number of viable bacteria can reach the intestine. Starch, alginate, carrageenan and chitosan are included among the hydrocolloids used to encapsulate or to obtain films and coatings (González-Forte L et al., 2014). The effects of carbohydrate-type prebiotics may not always be beneficial, as they can also encourage the growth of non-probiotic bacteria. The results of one study demonstrated that the use of fructo-oligosacharides (FOS) resulted in enhanced growth of *Eubacterium biforme* and *Clostridium perfringens*. Therefore, new alternatives such as non-carbohydrate sources to stimulate the growth of probiotics are needed (Vodnar DC and Socaciu C. 2012). The other results also indicated that encapsulated the mentioned probiotic bacteria in calcium alginate beads, raised the probiotic survival at rate of 30% during the same period of storage at same temperature. Overally, the results showed that encapsulation can significantly increase the survival rate of probiotic bacteria in ice

cream over an extended shelf-life (Homayouni A et al., 2008). Green tea (*Camelia sinensis*) is one of the most widely consumed beverages in the world and has multiple health benefits, such as anti-stress, anticancer, antioxidant and neuroprotective effects. Green tea is a source of many essential dietary compounds, active polyphenols and trace elements for human health (Molan, Abdul Lateef, et al. 2009, Vodnar DC and Socaciu C. 2012). The objective of this study was to evaluate the viability and growth of beneficial lactic acid bacteria i.e *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* encapsulated with calcium alginate-inulin in cold green tea drink under in vitro conditions.

Material and methods: In this study, by encapsulating probiotic bacteria *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* with calcium alginate and also adding inulin at different levels (0 (Control), 3 and 7% by weight) in green tea drink, a synbiotic product was investigated. For statistical analysis, the effects of different treatments on probiotic bacteria count, Acidity, pH and sensorial properties were evaluated by the repeated measures analysis of variance. According to the results of repeated-measures analysis of variance, Duncan's test was used to determine the groups significantly different from each other. All statistical analyses were done by using SAS (9.3) package software. The level of significance was determined at $p<0.05$. Analysis of variance was performed using a mixed procedure and general linear model (GLM) procedure using SAS (9.3); during the storage period, probiotic bacteria *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* were counted in medium and physicochemical and sensory properties of the treatments were evaluated.

Results and discussion: By encapsulating probiotic bacteria and increasing the amount of inulin, the survival of probiotic bacteria was significantly increased compared to the control treatment ($P<0.05$). The results also showed that there was no significant difference in pH changes in all green tea treatments ($P>0.05$). Also, the acidity level in green tea treatments containing 3% and 7% inulin at 28 th day was significantly higher than control ($P<0.05$). Sensory evaluation also showed that there was no significant difference in flavor and taste in all green tea treatments. According to Vodnar DC and Socaciu C (2012) that investigated green tea effects on the survival yield of Bifidobacteria in simulated gastrointestinal environment and during refrigerated conditions which their results indicated that green tea coencapsulated with *B. infantis* or *B. breve* exert a protective effect of bacteria during exposure to gastrointestinal conditions and refrigerated storage. For a health perspective, the results confirm the growing interest probiotic bacteria and the perceived benefit of increasing their numbers in the gastrointestinal tract by microencapsulation. The results of Molan, Abdul Lateef, et al. (2009) also showed that addition of 10% and 25% of selenium-containing green tea (SGT) extract resulted in a significant increase ($P<0.05$) in the number of lactobacilli and bifidobacteria recovered from batch fermentation while China green tea (CGT) did not increase the number of bifidobacteria. The higher prebiotic activity of SGT over CGT may be related to the higher total phenolic contents (TPC) or minerals, notably selenium or a combination of these factors.

Conclusion: This study indicated that encapsulation can significantly improve the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* with calcium alginate and also adding inulin at different levels (0 (Control), 3 and 7% by weight) in green tea drink. Based on the above study, this method can be used to increase the survival of probiotic bacteria during the production and storage of green tea drinks.

Keywords: Cold green tea drink, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium lactis*, Encapsulation, Inulin