

افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در بستنی فراسودمند به وسیله ریزپوشانی

عزیز همایونی راد^{۱*}، مینا جوادی^۲، ویولت قاسمی‌نژاد تبریزیان^۳ و مائده علی‌زاده^۴

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۳

^۱ استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۲ کارشناس تغذیه، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۳ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۴ مربی گروه آموزش پرستاری کودکان، دانشکده پرستاری و مامایی مراغه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

*مسئول مکاتبه: Email: Homayounia@tbzmed.ac.ir

چکیده

بستنی سین‌بیوتیک حاوی یک درصد نشاسته مقاوم به عنوان پری‌بیوتیک و دو گونه از باکتری‌های اسید لاکتیک به نام لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس به عنوان پروبیوتیک به دو صورت آزاد و ریزپوشانی شده با استفاده از روش‌های مرسوم بستنی‌سازی تولید گردید. سپس زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در طول ۶ ماه نگهداری محصول در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. ریزپوشانی دو گونه مذکور در دانک‌هایی از جنس آلژینات کلسیم در ترکیب با نشاسته مقاوم منجر به افزایش ۳۰ درصدی در زنده‌مانی باکتری‌ها گردید. به طوری که پس از دو ماه تعداد پروبیوتیک‌های زنده در هر گرم از بستنی فراسودمند بالاتر از 10^9 (cfu/g) بود که به مراتب بیشتر از تعداد توصیه شده از سوی فدراسیون بین‌المللی لبنیات (10^7 cfu/g) است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بستنی سین‌بیوتیک غذای مناسبی برای توزیع پروبیوتیک‌ها در بین مصرف‌کنندگان است.

واژه‌های کلیدی: بستنی فراسودمند، پروبیوتیک، ریزپوشانی، زنده‌مانی

Increasing the probiotic survival in functional ice cream by microencapsulation

A Homayouni Rad^{1*}, M Javadi², V Ghasemnezhad Tabrizian³ and M Alizadeh⁴

Received: January 17, 2010 Accepted: May 02, 2012

¹Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Health and Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²BSc of Nutrition, Department of Food Science and Technology, Faculty of Health and Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³MSc of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Health and Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴MSc of Pediatric Nursing, Faculty of Nursing and Midwifery of Maragheh, Tabriz University of Medical Sciences, Maragheh, Iran

*Corresponding author, Email: Homayounia@tbzmed.ac.ir

Abstract

A synbiotic ice cream containing 1% of resistant starch as a prebiotic component and two strains of lactic acid bacteria (*L. casei* and *B. lactis*) as probiotic bacteria was made by traditional ice cream manufacturing method. The survival of microencapsulated and free probiotics in ice cream was studied over a period of 6 months during storage at -20°C. Microencapsulated probiotics in alginate-starch beads were survived 30% more than uncapsulated bacteria. The number of viable probiotic bacteria in functional ice cream were more than 10⁹ CFU/g by two months, which is higher than that recommended by the International Dairy Federation (10⁷ CFU/g). In conclusions synbiotic ice cream is a good vehicle for delivery of probiotics in human diet.

Keywords: Functional ice cream, Probiotic, Microencapsulation, Survival

مقدمه

پروبیوتیک زنده در هر گرم از محصولات لبنی به هنگام مصرف را ضروری دانسته است. بستنی از قابلیت خوبی برای توزیع پروبیوتیک‌ها در میان مصرف کنندگان برخوردار است (اکین و همکاران ۲۰۰۷؛ همایونی و همکاران ۲۰۰۸a). کارایی پروبیوتیک‌ها در ماده غذایی، بستگی به تعداد اولیه پروبیوتیک‌های زنده، مدت زمان نگهداری محصول و نوع ماده غذایی دارد. به نظر می‌رسد کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها در بستنی ناشی از اثرات سمی اکسیژن و فرایند انجماد است (همایونی و همکاران ۱۳۸۵ (ب)). بنابراین، از ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها برای کاهش اثرات تخریبی فوق در این مطالعه استفاده به عمل آمد. ریزپوشانی باعث حفظ سلول‌های پروبیوتیکی از شرایط نامساعد محیطی در

پروبیوتیک‌ها ریز زنده‌هایی هستند که اگر به تعداد کافی و به صورت زنده به روده برسند، اثرات سلامت‌بخش در میزبان بر جای می‌گذارند. پری‌بیوتیک‌ها نیز کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم یا با قابلیت هضم اندک‌اند که رشد و یا فعالیت پروبیوتیک‌ها را تشدید می‌کنند (فائو/سازمان بهداشت جهانی ۲۰۰۲). به ماده غذایی که حاوی هر دو عامل پروبیوتیک و پری‌بیوتیک به صورت همزمان باشد، سین‌بیوتیک یا فراسودمند اطلاق می‌گردد (فائو/سازمان بهداشت جهانی ۲۰۰۲؛ همایونی و همکاران ۱۳۸۵ (الف)). فعالیت و زنده ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات سلامت‌بخشی است. به همین دلیل فدراسیون بین‌المللی لبنیات وجود حداقل ۱۰^۷ (cfu/g) باکتری

شدن ژل نشاسته می‌گردد که با نیروی اندکی به هم زده می‌شود. در همین موقع ۲۰ گرم نشاسته مقاوم ذرت با استفاده از هم‌زن شیشه‌ای مخلوط گردید. همه مراحل فوق در شرایط استریل انجام پذیرفت. از سوی دیگر یک گرم باکتری برداشت شده در مقداری آب مقطر به حالت معلق درآمد و به مخلوط آلزینات/نشاسته افزوده شد و حجم مخلوط با استفاده از آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. سپس دو لیتر روغن کلزا با ۰/۲ درصد امولسیون‌کننده (تویین ۸۰) در یک بشر پنج لیتری مخلوط گردید و مخلوط باکتری/آلزینات/نشاسته بر مخلوط روغن اضافه و به هم زده شد تا به حالت امولسیون درآید. سپس دو لیتر محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار به مخلوط حاصل از طریق دیواره بشر افزوده و به شدت هم زده شد و بعد به حال خود رها گردید تا مخلوط به دو فاز روغن و آب تفکیک گردد. در ابتدای تفکیک فازها، محلول کلرید کلسیم در پایین بشر قرار گرفت و سپس به تدریج قطرات ریز باکتری/آلزینات/نشاسته پراکنده شده در فاز روغنی از روغن جدا گشته و قطره قطره وارد محلول کلرید کلسیم گردیده و در اثر تماس آلزینات با یون‌های کلسیم، دیواره کپسول شکل گرفت و قطرات به صورت دانک‌هایی در فاز پایینی ته‌نشین شدند. سپس لایه روغنی جدا گردید. دانک‌های تشکیل شده در فاز آبی به وسیله دکانتور جدا شدند و یک بار با هم‌حجم خود محلول آب نمک ۰/۹ درصد حاوی پنج درصد گلیسرول شستشو و در دمای چهار درجه سانتیگراد قرار داده شدند. به منظور خشک کردن انجمادی دانک‌ها، حجم اندکی از شیر خشک بدون چربی بازساخته شده ۱۲ درصد استریل، مورد استفاده قرار گرفت و پس از انجماد در نیتروژن مایع، به روش خشک کردن انجمادی خشک گردید. همه مراحل فوق در شرایط استریل و به دور از هر گونه آلودگی میکروبی انجام پذیرفت. قطر ۱۲۰ دانک به طور تصادفی به وسیله میکرومتر در زیر میکروسکوپ نوری (Philips, Poland) با بزرگنمایی ۱۰۰× اندازه‌گیری شد و به صورت میانگین بیان گردید.

بستنی (مثل وجود بلورهای یخ و اکسیژن هوا) و نیز شرایط اسیدی معده و قلیایی ابتدای روده گردیده و بدین ترتیب موجبات افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را فراهم می‌سازد. در نتیجه مدت زمان ماندگاری بستنی فراسودمند نیز افزایش می‌یابد (همایونی و همکاران ۲۰۰۸a).

مواد و روش‌ها

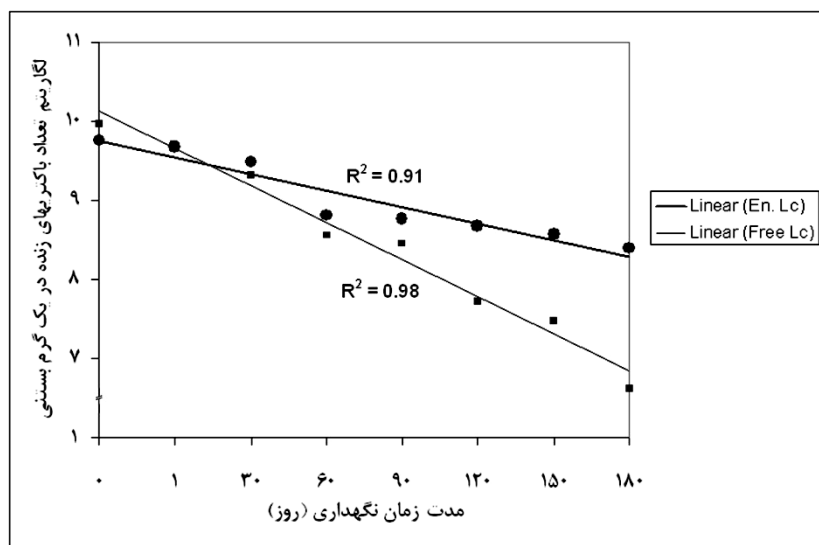
کشت‌های آغازگر لاکتوباسیلوس کازئی (Lc-01) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (Bb-12) به صورت خالص و خشک شده انجمادی از شرکت هنسن (Horsholm, Denmark) تهیه شده و در محیط کشت إم-آر-اس-برات (de Man-Rogosa-Sharpe) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت فعال گردیدند. سلول‌های پروبیوتیکی در انتهای فاز رشد لگاریتمی به وسیله سانتریفوژ (Sorvall, model RC-5C, rotorGS-3, Newtown, CT) با نیروی گریز از مرکز ۶۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد جدا گردید و به دو صورت آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی سین‌بیوتیک غیرتخمیری مورد استفاده قرار گرفت. برای ریزپوشانی از روش اصلاح شده امولسیون‌سازی استفاده به عمل آمد (همایونی و همکاران ۲۰۰۷a).

برای ریزپوشانی، مخلوطی از دو درصد آلزینات (Merck, Darmstadt, Germany)، دو درصد نشاسته مقاوم ذرت (Merck, Darmstadt, Germany) با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد و ۰/۱ درصد کشت در یک لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. ۲۰ گرم آلزینات سدیم به آرامی به ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در حالی که به وسیله مگنت با دور منظم هم زده می‌شد، اضافه گشت تا آلزینات کلوخه‌ای نشود و سپس استریل گردید. پس از آن محلول آلزینات به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد تا ذرات آلزینات به خوبی آب جذب کنند. روز بعد محلول آلزینات از یخچال به محیط آزمایشگاه منتقل شد تا با محیط هم‌دم شود. هم‌دم شدن با محیط منجر به رقیق

نتایج و بحث

اسیدیته و pH شیر مورد استفاده در تولید بستنی فراسودمند به ترتیب برابر $6/55 \pm 0/02$ (°SH) و $6/60 \pm 0/01$ بود. نتایج آزمایش‌های شیمیایی و فیزیکی نشان داد که بستنی فراسودمند دارای $38/5 \pm 0/15$ درصد ماده خشک، $8/1 \pm 0/05$ درصد چربی و 95 ± 5 درصد ضریب انبساط بود. میانگین قطر دانک‌ها نیز در حدود $17/80 \pm 3/55$ میکرومتر به دست آمد. نتایج حاصل از بررسی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس پس از سپری شدن شش ماه در بستنی فراسودمند، نشان داد که بین گونه باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. یعنی مقاومت گونه‌های باکتریایی در برابر شرایط بستنی متفاوت بود.

شمارش باکتری‌های پروبیوتیک زنده در بستنی فراسودمند بلافاصله قبل و پس از انجماد در روزهای ۱، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ و نیز آزمونهای معمول بستنی شامل اندازه‌گیری pH، اسیدیته، ماده خشک، چربی و ضریب انبساط حجمی در سه تکرار انجام پذیرفت (استاندارد ملی شماره ۲۴۵۰؛ همایونی و همکاران (الف) ۱۳۸۴، همایونی و همکاران (ب) ۱۳۸۴). در نهایت ارزیابی حسی بستنی فراسودمند به وسیله ۳۲ ارزیابی آموزش دیده به عمل آمد. کلیه آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل (سه فاکتوره $2 \times 2 \times 8$) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام گرفت و داده‌های به دست آمده پس از تبدیل، به وسیله نرم‌افزار اس-اس-اس (SAS) آنالیز گردید.



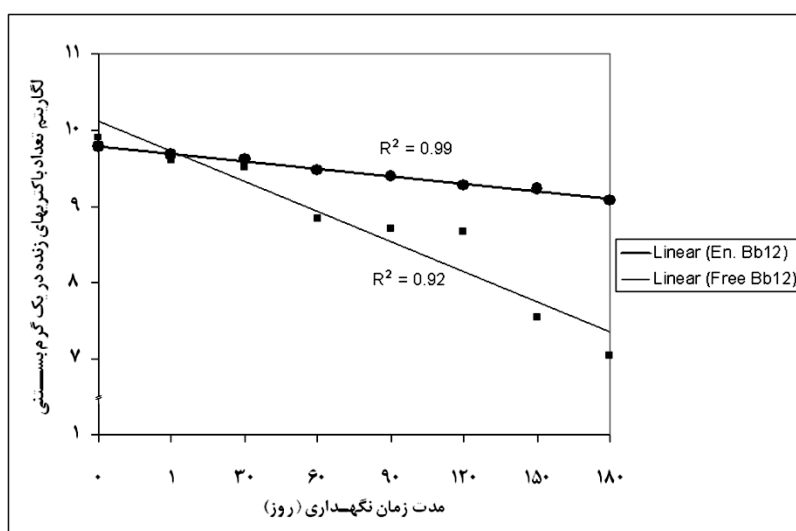
شکل ۱- روند کاهش تعداد سلول‌های لاکتوباسیلوس کازئی آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی فراویژه در طول ۱۸۰ روز نگهداری در -20 درجه سانتیگراد

بلورهای یخ، اکسیژن و فشار اسمزی داخل بستنی) مصون می‌دارد. همچنین زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس ریزپوشانی شده در بستنی پس از شش ماه نگهداری در -20 درجه سانتیگراد نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی ریزپوشانی شده، دو برابر بیشتر (کاهش $0/7$ سیکل لگاریتمی در مقایسه با کاهش $1/4$

همچنین نتایج نشان داد که باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به سلول‌های آزاد، در همان دما و زمان نگهداری به میزان ۳۰ درصد بیشتر زنده می‌مانند. علت اصلی این پدیده مربوط به اثر حفاظتی روکش آلژیناتی بر باکتری‌های پروبیوتیک است که آنها را از شرایط نامساعد محصول (دمای انجماد، صدمات فیزیکی

ریزپوشانی شده با سرعت بیشتری کاهش می‌یابد و شیب نمودار مربوطه تندتر است (شکل ۱ و ۲). همچنین الگوی کاهش شمار سلول‌های زنده لاکتوباسیلوس کازئی متفاوت از بیفیدوباکتریوم لاکتیس بود. نتایج نشان داد که سلول‌های لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به سلول‌های بیفیدوباکتریوم لاکتیس در طول نگهداری انباری در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد با سرعت بیشتری از بین می‌روند (همایونی و همکاران ۲۰۰۷b).

سیکل لگاریتمی به ترتیب برای بیفیدوباکتریوم لاکتیس و لاکتوباسیلوس کازئی است. کاهش تعداد باکتری‌های زنده لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس آزاد و ریزپوشانی شده تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد از خود نشان داد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک به گونه باکتری و حالت آن (آزاد یا داخل دانک) بستگی دارد. به طوری که سلول‌های آزاد پروبیوتیکی نسبت به حالت



شکل ۲- روند کاهش تعداد سلول‌های بیفیدوباکتریوم لاکتیس آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی فراویژه در طول ۱۸۰ روز نگهداری در ۲۰- درجه سانتیگراد

صورت ریزپوشانی شده به مخلوط اولیه بستنی بلافاصله قبل از انجماد، روش مناسبی برای تولید بستنی فراسودمند است و تغییری در خصوصیات حسی محصول در مقایسه با بستنی معمولی ایجاد نمی‌کند. از سوی دیگر نشان داده شد که ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها در داخل دانک‌هایی از جنس آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم، زنده‌مانی باکتری‌ها را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. تعداد پروبیوتیک‌ها در بستنی فراسودمند پس از گذشت سه ماه در حدود 10^8 - 10^9 (cfu/g) در هر گرم بود که به مراتب از میزان توصیه شده از سوی فدراسیون بین‌المللی لبنیات بالاتر است.

نتایج به دست آمده از ارزیابی حسی نمونه‌های بستنی فراسودمند نشان داد که افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به صورت آزاد و یا ریزپوشانی شده، تاثیری بر رنگ، طعم و بافت بستنی فراسودمند غیرتخمیری ندارد (همایونی و همکاران ۲۰۰۸b).

نتیجه‌گیری

بستنی فراسودمند به دلیل داشتن ماده خشک بالا و pH خنثی، غذای مناسبی برای توزیع پروبیوتیک‌ها در بین مصرف‌کنندگان است. این مطالعه نشان داد که افزودن باکتری‌های پروبیوتیک چه به صورت آزاد و چه به

منابع مورد استفاده

- بی‌نام، ۱۳۸۳. استاندارد شماره ۲۴۵۰، بستنی، سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ویرایش اول، تهران- ایران.
- همایونی ع، احسانی م ر، موسوی م ع، ولیزاده م و امام جمعه ز، ۱۳۸۴(الف). بهبود کیفیت بستنی کم‌چرب به کمک هیدرولیز نسبی پروتئین‌های مخلوط بستنی با کیموزین یک، مجله علوم کشاورزی ایران ۷۷۳-۷۶۵:۳۶.
- همایونی ع، احسانی م ر، موسوی م ع، ولیزاده م و امام جمعه ز، ۱۳۸۴(ب). بهبود کیفیت بستنی کم‌چرب به کمک هیدرولیز نسبی پروتئین‌های مخلوط بستنی با کیموزین دو، مجله علوم کشاورزی ایران ۱۵۱۵-۱۵۰۹:۳۶.
- همایونی ع، احسانی م ر، عزیزی ا، رضوی س ه و یارمند م س، ۱۳۸۵ (الف). مقدمه ای بر غذاهای عملگر لبنی، کتابچه مجموعه مقالات اولین کنگره ملی غذای فراسودمند، صفحه ۶۰.
- همایونی ع، احسانی م ر، عزیزی ا، یارمند م س و رضوی س ه، ۱۳۸۵ (ب). مروری بر روش‌های افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در غذاهای فرآورده لبنی، کتاب مجموعه مقالات نهمین کنگره تغذیه ایران، صفحات ۲۹۷-۲۸۸.
- Akin MB, Akin MS and Kirmaci Z, 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chemistry* 104: 93-99.
- FAO/WHO, 2002. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/Probio.htm>.
- Homayouni A, Ehsani MR, Azizi A, Yarmand MS and Razavi SH, 2007a. Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads. *Iranian Polymer Journal* 16: 597-606.
- Homayouni A, Ehsani MR, Azizi A, Yarmand MS and Razavi SH, 2007b. Selection of appropriate probiotic strains for use in ice cream. In proceedings of the third IDF international symposium on ice cream (p. 124).
- Homayouni A, Ehsani MR, Azizi A, Razavi SH and Yarmand MS, 2008a. Spectrophotometrically evaluation of probiotic growth in liquid media. *Asian Journal of Chemistry* 20: 2414-2420.
- Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS and Razavi SH, 2008b. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry* 111: 50-55.
- Homayouni A, Ehsani MR, Azizi A, Razavi SH and Yarmand MS, 2008c. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. *Journal of Applied Sciences* 8: 379-382.