

## ● گزارش کوتاه

### تولید شیر کاکائوی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده به عنوان محصول فراویژه جهت استفاده در شرایط رزم

رضا قاسم نژاد<sup>۱</sup>، \*ودود رضویلر<sup>۲</sup>، کیانوش خسروی دارانی<sup>۳</sup>

#### چکیده

**مقدمه:** محصولات شیری پروبیوتیک با ویژگی‌های ارزشمند تغذیه‌ای و درمانی، از موضوعات مهم حال حاضر عرصه تغذیه و پزشکی هستند. هدف این مطالعه تولید شیر کاکائوی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم انیمالیس به صورت آزاد و ریزپوشانی شده به داخل شیرکاکائو تزریق شدند. برای ریزپوشانی کردن از آلژینات سدیم و نشاسته مقاوم با روش اکستروژن استفاده شد. تغییرات شمار باکتری‌ها و مقبولیت حسی نمونه‌ها طی ۲۱ روز نگهداری در دمای ۵ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با ایجاد شرایط شبیه‌سازی شده معدی روده‌ای میزان زنده‌مانی باکتری‌ها در محصول بررسی گردید.

**یافته‌ها:** در محصول شیر کاکائو و در شرایط شبیه‌سازی شده معدی روده‌ای میزان زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده در تمام شرایط، به طور معنی‌داری بیشتر از باکتری‌های آزاد بود ( $p < 0.05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** بر اساس ارزیابی حسی و فیزیکوشیمیایی انجام شده، می‌توان محصول شیر کاکائوی حاوی باکتری ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس کازئی با زمان ماندگاری ۶ روز و باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس با زمان ماندگاری ۹ روز تولید نمود. استفاده از این قبیل محصولات در شرایط رزم با توجه نقش مهم آنها در پیشگیری از بیماری‌ها و تقویت سیستم ایمنی پیشنهاد می‌شود.

**کلمات کلیدی:** لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدوباکتریوم، ریزپوشانی، پروبیوتیک‌ها

(سال هجدهم، شماره اول، بهار ۱۳۹۵، مسلسل ۵۴)  
تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۳

فصلنامه علمی پژوهشی ابن سینا / اداره بهداشت، امداد و درمان نهجا  
تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۹

۱. تهران، ایران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی
۲. استاد، تهران، ایران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده تخصصی دامپزشکی  
(\*مؤلف مسئول) vrazavi@ut.ac.ir
۳. دانشیار، تهران، ایران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، گروه تحقیقات صنایع غذایی

## مقدمه

شمار میکروارگانیسم‌های موجود در روده انسان ده برابر کل سلول‌های بدن می‌باشد. باکتری‌ها بخش عمده فلور روده را به خود اختصاص داده‌اند. فلور میکروبی روده وابستگی زیادی به ماده غذایی مورد استفاده شخص دارد، بنابراین می‌توان فلور میکروبی روده را تغییر داد و میکروب‌های مفید را جایگزین انواع مضر آن کرد. پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که علاوه بر کاهش بیماری‌زایی میکروب‌های مضر روده و گوارش مولکول‌های پیچیده، ترکیباتی مانند ویتامین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را تولید کرده که برای بدن مفید می‌باشد [۱۰]. همچنین پروبیوتیک‌ها دارای اثرات مفید ذیل می‌باشند: مفید برای درمان انواع اسهال‌ها و سایر عفونت‌های گوارشی؛ بهبود هضم لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها و همچنین بهبود هضم لاکتوز در عارضه عدم تحمل به لاکتوز؛ کمک به پیشگیری از سرطان کولون و جلوگیری از تولید موادی که باعث ایجاد سرطان می‌گردند؛ کمک به پایین آوردن کلسترول و کاهش فشار خون در انسان؛ کمک به بهبود جذب مواد معدنی و مغذی و کاهش التهاب؛ کنترل رشد باکتری‌های مضر در شرایط استرس؛ کمک به تعادل هورمون‌های جنسی در شرایط استرس؛ مقابله با عفونت‌هایی مانند کاندیدیازیس؛ کنترل رشد ویروس‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا؛ شکستن توکسین‌ها و تولید آنتی‌بادی‌ها و مواد ضد سرطان؛ و به‌عنوان جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با عوامل پاتوژن [۱، ۲].

غذاهایی که حاوی این باکتری‌ها هستند در کلاس غذاهای عملگر یا فراویژه قرار می‌گیرند. برطبق توصیه فدراسیون بین‌المللی فرآورده‌های لبنی<sup>۱</sup> این غذاها باید حاوی  $10^7$  cfu/ml باکتری پروبیوتیک باشد و مصرف کننده باید حداقل ۱۰۰ ml در روز از این غذاها را مصرف کند تا اثرات مفید این دسته از غذاها را دریافت کند [۱، ۳].

استفاده از این غذاها جهت مصرف نیروهای نظامی در شرایط رزم به‌علت داشتن انرژی زیاد و اثرات سلامت بخشی‌اش از جمله تقویت سیستم ایمنی و بالابردن مقاومت بدن در برابر عفونت‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. شرایط استرس‌زا که باعث بهم خوردن فلور طبیعی روده می‌شود و موجود بودن باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط محیط جنگی، اهمیت استفاده از غذاهای فراویژه در جلوگیری از عفونت‌ها و شایع شدن بیماری‌های روده‌ای را نشان می‌دهد. همچنین به‌علت مایع بودن شیر کاکائو سریع‌تر به روده بزرگ رسیده و باعث تقویت فلور طبیعی روده می‌شود.

قابلیت زیستی اندک پروبیوتیک‌ها در شرایط دشوار اسیدی-صفاوی دستگاه گوارش و نیز فرآورده‌های غذایی، پژوهشگران را همواره به یافتن شیوه‌های بهبود این شاخص ترغیب کرده است. ریزپوشانی به‌عنوان یکی از تازه‌ترین شیوه‌ها، اثر قابل ملاحظه‌ای در این مورد دارد. ریزپوشانی یکی از بزرگ‌ترین نوآوری‌ها و نقطه آغاز حیات به‌شمار می‌رود. طبیعت با محصور کردن مولکول‌های حیاتی در واحد ساختمانی به‌نام سلول امکان حیات را بر روی زمین میسر نموده است. انسان نیز سعی کرده تا ترکیبات مورد نیاز خود را پوشش‌دهی و حفاظت نماید که در مقیاس میکروسکوپی این پدیده را ریزپوشانی می‌نامند. ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها و دیواره‌های مورد استفاده در آنها، دستیابی باکتری‌های پروبیوتیک به داخل محصول را کمتر و باعث امکان انتقال و آزادسازی ایمن آنها در نقاط مختلف دستگاه گوارش می‌شود [۳].

شیر کاکائو حاوی مقدار بالای کلسیم و آنتی‌اکسیدان‌های مفید می‌باشد. جای دادن باکتری‌های پروبیوتیک در چنین محصول پرمصرفی به ارتقای سلامت جامعه، مخصوصاً در نیروهای نظامی در افزایش توان رزمی کمک شایانی می‌تواند ایفا کند.

هدف از این تحقیق ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک مورد نظر و بررسی میزان زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک آزاد و ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس کازئی و

1. International Dairy Federation (IDF)

بیفیدوباکتریوم انیمالیس در داخل محصول شیر کاکائو و شرایط شبیه‌سازی شده معدی روده‌ای، و در درجه بعد با ارزیابی‌های حسی و فیزیکی‌شیمیایی انجام شده سعی در تولید شیر کاکائوی پروبیوتیک‌دار می‌باشد.

## روش بررسی

باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیر گونه لاکتیس از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید. یک آمپول لیوفیلیزه از هر کدام از باکتری‌ها طبق دستورالعمل کارخانه بعد از تلقیح به محیط MRS broth به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس بیومس حاصل به وسیله سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. و رسوب باکتری ته میکروتیوپ‌ها دو بار توسط سرم فیزیولوژی سانتریفوژ شد تا کاملاً مورد شستشو قرار گیرد. از این امولسیون باکتریایی جهت تلقیح مستقیم به شیر کاکائو استفاده شد [۴].

در این پژوهش ریزپوشانی پروبیوتیک‌های مورد نظر به وسیله آلزینات سدیم و نشاسته مقاوم با روش اکستروژن انجام گرفت [۴]. ابتدا ۲۰ گرم آلزینات سدیم با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط بعد ۱۰ میلی لیتر امولسیون باکتریایی تهیه شده به آن اضافه گشت و سوسپانسیون حاصل توسط سرنگ انسولینی به درون محلول کلرید کلسیم ۱/ مولار تزریق گردید. بعد از تشکیل دانک‌ها در داخل محلول کلرید کلسیم، آنها زهکشی و شسته شدند. و ۱۰ گرم از این دانک‌ها به درون ۱۰۰ میلی لیتر محلول ۱٪ نشاسته وارد شد و به مدت ۱۰ دقیقه به هم زده شد. دانک‌های پوشش داده شده با نشاسته مقاوم در محلول پیتون استریل در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای آزمایشات مربوطه نگهداری گردید [۵]. باکتری‌های پروبیوتیک مورد نظر در دو شکل آزاد و ریزپوشانی شده در شرایط کاملاً استریل به شیر کاکائوی استریل تلقیح شد. و تولید در ۲ تکرار برای همه نمونه‌ها صورت گرفت.

از ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی pH، اسیدیته و چربی در روز

اول اندازه‌گیری شد. و pH تا روز ۲۱ به فاصله ۷ روز اندازه‌گیری شد. برای سنجش pH از pH متر، اسیدیته از روش دورنیک و چربی از روش ژربر استفاده شد و بررسی خصوصیات حسی با استفاده از آزمون پانل ۳۲ نفره تحت شرایط مکان، نور و ظروف یکسان انجام شد. در این روش از پرسشنامه‌ای که حاوی ۳ امتیازدهی به رنگ و ظاهر (۵-۱ امتیاز)، بافت (۵-۱ امتیاز) و بو و مزه (۱۰-۱ امتیاز) بود استفاده شد و پذیرش کلی (۲۰-۱ امتیاز) برای محصول ثبت شد [۶].

تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در هر یک از نمونه‌ها بلافاصله پس از آماده سازی و طی ۲۱ روز نگهداری به فاصله ۷ روز یک‌بار اندازه‌گیری شد. برای شمارش باکتریایی نمونه‌های حاوی باکتری‌های آزاد ابتدا ۱۰ میلی لیتر از نمونه شیر کاکائو حاوی باکتری‌های آزاد به ۹۰ میلی لیتر پیتون واتر اضافه شده و کاملاً مخلوط و تا رقت  $10^{12}$  رقت‌سازی شد. سپس ۱ میلی لیتر از هر کدام این رقت‌ها در پلیت حاوی محیط MRS-Salicin-agar در دو تکرار کشت داده شد. پلیت‌های حاوی باکتری‌های بیفیدوباکتریوم انیمالیس در جار بی‌هوازی و پلیت‌های حاوی لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط هوازی به مدت ۷۲ ساعت به ترتیب در دماهای ۳۷ و ۳۰ درجه سانتیگراد گرم‌خانه‌گذاری شد [۷، ۸] و تعداد کلنی‌های رشد کرده در دو تکرار شمارش شد.

برای ارزیابی باکتری‌های پروبیوتیکی ریزپوشانی شده، ابتدا باید باکتری‌ها از داخل دانک‌ها آزاد شوند. برای این منظور ۹ میلی لیتر از سیترات سدیم با یک گرم از دانک‌ها روی شیکر به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. تا باکتری‌ها از داخل دانک‌ها آزاد شوند. بعد مراحل بالا برای شمارش باکتری‌ها استفاده شد.

۱ گرم دانک حاوی باکتری‌های کپسول‌دار و ۱ گرم شیر کاکائو حاوی باکتری‌های آزاد تحت شرایط مشابه به داخل ۹ میلی لیتر شیر شبیه‌سازی معده (اسید کلریدریک ۰/۰۸ مولار حاوی ۰/۲٪ کلرید سدیم و با pH برابر ۱/۵۵) افزوده و همچنین ۱ گرم دانک حاوی باکتری‌های کپسول‌دار و ۱ گرم شیر کاکائو

جدول ۱- بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک (CFU/ml) در شیر کاکائو

نوع	نوع باکتری	روز ۱	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱
شاهد	بدون باکتری	-	-	-	-
آزاد	لاکتوباسیلوس کازئی	$1/6 \pm 0/1 \times 10^9$	$2/6 \pm 0/1 \times 10^9$	$2/7 \pm 0/5 \times 10^8$	$7/0 \pm 0/4 \times 10^7$
	بیفیدوباکتریوم انیمالیس	$4/1 \pm 0/6 \times 10^9$	$8/6 \pm 0/7 \times 10^9$	$5/2 \pm 0/6 \times 10^8$	$5/6 \pm 0/4 \times 10^7$
ریزپوشانی شده با نشاسته	لاکتوباسیلوس کازئی	$2/3 \pm 0/9 \times 10^9$ *	$2/4 \pm 0/1 \times 10^9$ *	$1/8 \pm 0/2 \times 10^9$ *	$1/6 \pm 0/7 \times 10^9$ *
	بیفیدوباکتریوم انیمالیس	$3/6 \pm 0/6 \times 10^9$	$5/4 \pm 0/3 \times 10^9$	$2/3 \pm 0/1 \times 10^9$	$1/0 \pm 0/1 \times 10^9$

\*در هر ستون تعداد سلول‌های زنده ریزپوشانی شده به‌طور معنی‌دار بیشتر از سلول‌های آزاد می‌باشد ( $p < 0/05$ )

نشان می‌دهد. تغییرات کاهشی و افزایشی کمی در زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده مشاهده شد. این موضوع تأییدی بر عمل دیواره‌های دانک‌ها در محافظت از باکتری‌های پروبیوتیکی است.

پروبیوتیک‌هایی که در داخل کپسول‌ها هستند فعالیت اسیدی کمتری داشته و در نتیجه pH نمونه‌های حاوی پروبیوتیک کپسوله شده بالاتر از فرم آزاد بود. همچنین روند اسیدی شدن در نمونه‌های حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده کاهش یافت.

ریزپوشانی تأثیری بر رنگ نمونه‌ها نداشت. این نشان دهنده مزایای آلزینات سدیم و نشاسته مقاوم به‌عنوان ترکیبات بدون رنگ می‌باشد. که در این مطالعه اندازه کپسول‌ها ۳۰۰-۵۰۰ میکرومتر بود که به‌میزان کم بافت نمونه‌ها را تحت تأثیر قرار داد. از نظر بو و مزه ریزپوشانی تأثیری بر نمونه‌های شیر کاکائو نداشت. همچنین میزان پذیرش کلی شیر کاکائوی حاوی باکتری آزاد در روز ۷، کمتر از شیر کاکائوی حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده بود.

با توجه به جدول ۲ ریزپوشانی، زنده‌مانی دو باکتری پروبیوتیک را در شرایط شبیه‌سازی شده معده چندین سیکل

حاوی باکتری‌های آزاد تحت شرایط مشابه به داخل ۹ میلی‌لیتر مایع شبیه‌سازی شده روده (فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم ۰/۰۵ مولار و با pH برابر ۷/۵۵ و نمک‌های صفرای گاوی استریل ۰/۰۶٪) افزوده و هر کدام جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری شد هر کدام از محیط‌ها به‌وسیله پیتون واتر ۰/۱٪ رقیق شده و در محیط MRS agar به‌صورت کشت مخلوط و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرم‌خانه‌گذاری گشت. سپس میزان بقاء باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده مورد شمارش قرار گرفت [۹].

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تی مستقل استفاده شد. داده‌ها در نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## یافته‌ها

ارزش اساسی فرآورده حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، تعداد سلول‌های زنده پروبیوتیک در هر میلی‌لیتر از فرآورده در لحظه مصرف می‌باشد. جدول ۱ روند تغییرات تعداد سلول‌های زنده این دو باکتری در ۵ نمونه مورد بررسی طی دوره نگهداری را

جدول ۲- میزان بقای سلول‌های آزاد و ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک (CFU/ml) در محلول شبیه‌سازی شده معده و روده در طی ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد

شبه‌سازی	نوع	نوع باکتری	۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه
معده	آزاد	لاکتوباسیلوس کازئی	$6/1 \pm 0/7 \times 10^9$	$3/6 \pm 0/7 \times 10^8$	$5/4 \pm 0/2 \times 10^6$	$< 10^6$	$< 10^6$
		بیفیدوباکتریوم انیمالیس	$3/3 \pm 0/6 \times 10^9$	$5/1 \pm 0/3 \times 10^7$	$1/4 \pm 0/1 \times 10^6$	$< 10^6$	$< 10^6$
ریزپوشانی شده با نشاسته	آزاد	لاکتوباسیلوس کازئی	$4/7 \pm 0/1 \times 10^{10}$	$3/7 \pm 0/3 \times 10^9$	$8/5 \pm 0/3 \times 10^8$	$4/1 \pm 0/7 \times 10^8$	$9/4 \pm 0/3 \times 10^6$
		بیفیدوباکتریوم انیمالیس	$3/2 \pm 0/2 \times 10^{10}$ *	$6/1 \pm 0/9 \times 10^8$	$3/8 \pm 0/6 \times 10^8$	$4/2 \pm 0/3 \times 10^7$	$1/2 \pm 0/5 \times 10^6$
روده	آزاد	لاکتوباسیلوس کازئی	$3/7 \pm 0/6 \times 10^9$	$4/5 \pm 0/2 \times 10^7$	$7/6 \pm 0/4 \times 10^6$	$< 10^6$	$< 10^6$
		بیفیدوباکتریوم انیمالیس	$5/4 \pm 0/5 \times 10^9$	$7/3 \pm 0/6 \times 10^8$	$4/3 \pm 0/2 \times 10^7$	$6/2 \pm 0/5 \times 10^6$	$< 10^6$
ریزپوشانی شده با نشاسته	آزاد	لاکتوباسیلوس کازئی	$5/7 \pm 0/9 \times 10^{10}$	$3/6 \pm 0/1 \times 10^9$	$3/6 \pm 0/2 \times 10^8$	$1/1 \pm 0/7 \times 10^8$	$7/6 \pm 0/3 \times 10^7$
		بیفیدوباکتریوم انیمالیس	$5/4 \pm 0/5 \times 10^{11}$ *	$6/7 \pm 0/2 \times 10^{10}$	$7/2 \pm 0/3 \times 10^{10}$	$4/5 \pm 0/5 \times 10^9$	$3/4 \pm 0/6 \times 10^8$

\*در هر ستون تعداد سلول‌های زنده ریزپوشانی شده به‌طور معنی‌دار بیشتر از سلول‌های آزاد می‌باشد ( $p < 0/05$ )

لگاریتمی بهبود بخشید و باعث شد بعد از ۱۲۰ دقیقه میزان باکتری‌های پروبیوتیک بیش از  $10^6$  CFU/ml باشد.

همچنین با توجه به جدول ۲ کاهش تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی در همه نمونه‌ها بیشتر از بیفیدوباکتریوم انیمالیس بود. ریزپوشانی، زنده‌مانی دو باکتری پروبیوتیک را در شرایط شبیه‌سازی شده روده چندین سیکل لگاریتمی بهبود بخشید.

همچنین با توجه به استفاده شیر کاکائوی تولید شده در آزمون پانل ۳۲ نمره رضایت کامل از محصول با امتیاز پذیرش کلی معادل ۱۷ (از ۲۰ امتیاز) برای هر دو نوع محصول حاصل شد.

## بحث و نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج از این مطالعه ریزپوشانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم انیمالیس روند اسیدی شدن را در شیر کاکائو به تأخیر می‌اندازد. یکی از عوامل مؤثر بر فعالیت متابولیکی باکتری‌های ریزپوشانی شده در محصولات، اندازه لایه آلزینات است. و هر چه لایه‌های به‌کار رفته در تشکیل کپسول‌ها بیشتر باشد روند اسیدی شدن کاهش می‌یابد [۱۰]. ریزپوشانی منجر به بقای بیشتر پروبیوتیک‌ها در شرایط دشوار محیطی می‌شود که در مناطق جنگی که شرایط استرس‌زا وجود دارد و اسید معده زیاد ترشح می‌شود ریزپوشانی باعث بقای بیشتر باکتری‌ها تا رسیدن به نقطه هدف می‌شود [۱۱، ۱۲]. در این مطالعه اندازه دانک‌ها ۵۰۰-۳۰۰ میکرومتر بود که به‌میزان کم بافت نمونه‌ها را تحت تأثیر قرار می‌داد. یکی از فاکتورهای مهم در پذیرش بافت نمونه‌ها یکنواختی آن می‌باشد. کوچک‌تر بودن دانک‌ها تغییرات کمتری در بافت محصول و همچنین مانع از بروز پدیده شنی شدن در ماده غذایی می‌شود [۱۳].

مواد غذایی عملگر باید حداقل  $10^7$  باکتری پروبیوتیک باشد تا اثرات مفید سلامتی را در مصرف‌کننده ایجاد نماید [۹]. در این مطالعه در تمام دوره نگهداری در یخچال شمار

باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده بالاتر از این میزان بود. در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد ریزپوشانی باعث افزایش معنی‌داری در بقای این باکتری‌ها در شرایط دشوار محیطی می‌شود. با توجه به آزمایشات انجام شده، می‌توان محصول حاوی لاکتوباسیلوس کازئی ریزپوشانی شده را با حداکثر زمان ماندگاری ۶ روز و محصول حاوی بیفیدوباکتریوم انیمالیس ریزپوشانی شده را با حداکثر زمان ماندگاری ۹ روز، تولید و به بازار عرضه نمود که علاوه بر خصوصیات شیر کاکائو از اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها نیز بر سلامت انسان استفاده نمود.

با توجه به اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها، در صورت تولید انبوه در کارخانجات لبنی می‌تواند به‌عنوان غذای فرآوری‌شده در مناطق جنگی و شرایط‌های محیطی استرس‌زا و همچنین در سطح جامعه مخصوصاً در مدارس مورد استفاده قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

از شرکت شیر پگاه تبریز و همچنین از دکتر هادی پورجعفر و دکتر اکبر مختاری توانا که در این مطالعه همکاری داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

## References

1. Doyle MP, Buchanan RL. Food microbiology: fundamentals and frontiers. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2012.
2. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. *International dairy journal*. 1999;9(1):43-52.
3. Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in food science & technology*. 2007;18(5):240-251.
4. Pourjafar H, Mirzaei H, Ghasemnezhad R, Homayouni Rad A. Study of morphological and protective characteristics of beads obtained from microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* probiotic as a predominant and natural flora in human gut. *Ann Mil Health Sci Res*. 2012;9(4):233-240. [Persian]
5. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth HC. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT-and conventionally treated milk during storage. *LWT-food science and technology*. 2006;39(2):177-183.
6. Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS, Razavi SH. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food chemistry*. 2008;111(1):50-55.
7. Laroia S, Martin J. Methods for enumerating and propagating bifidobacteria. *Cultured dairy products journal*. 1991;26:32-33.
8. Shah NP. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of dairy science*. 2000;83(4):894-907.
9. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International dairy journal*. 2004;14(8):737-743.
10. Larisch BC, Poncelet D, Champagne CP, Neufeld RJ. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Journal of microencapsulation*. 1994;11(2):189-195.
11. Aragon-Alegro LC, Alegro JHA, Cardarelli HR, Chiu MC, Saad SMI. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT-food science and technology*. 2007;40(4):669-675.
12. Rivera-Espinoza Y, Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*. 2010;27(1):1-11.
13. Hansen LT, Allan-Wojtas P, Jin Y-L, Paulson A. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food microbiology*. 2002;19(1):35-45.

## Producing of chocolate milk containing microencapsulated probiotic bacteria as a functional food for use in time of war

Ghasemnezhad R<sup>1</sup>, \*Razavilar V<sup>2</sup>, Khosravi Darani K<sup>3</sup>

### Abstract

**Background:** Probiotic milk products with valuable nutritional and health properties is one the most important issues of nutrition and medicine. The aim of present study was to produce chocolate milk containing microencapsulated probiotic bacteria.

**Materials and methods:** In the present study, the *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* were injected into chocolate milk both in free and microencapsulated forms. Sodium alginate and resistant starch were used for microencapsulation via extrusion method. The changes in probiotic bacteria count and their sensory acceptability were evaluated at 5°C for 21 days. Also, survival rate of bacteria was determined in simulated gastrointestinal conditions.

**Results:** The significant survival rates of microencapsulated bacteria was observed in chocolate milk and also in simulated gastrointestinal condition in all conditions ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Based on the sensory physicochemical evaluations, the chocolate milk can be produced containing microencapsulated *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* with expiration time of 6 and 9 days, respectively. Given the important role of such products in disease prevention and boosting the immune system, so the use of them is recommended in time of war.

**Keywords:** *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium*, Microencapsulation, Probiotics

1. Department of health and food quality control, Science and research branch, Islamic Azad University of Tehran, Tehran, Iran

2. Professor, Faculty of veterinary medicine, Science and research branch, Islamic Azad University of Tehran, Tehran, Iran  
(\* Corresponding Author)  
vrazavi@ut.ac.ir

3. Associate professor, Research Department of Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran