

ارتقا خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس به وسیله ریزپوشانی اکستروژن دولایه با آلزینات سدیم و صمغ زودو

سعید سخاوتی زاده^۱، محمود امین لاری^{۲*}، حمیدرضا قیصری^۳

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، فارس، ایران و مربی، عضو هیئت علمی بخش تحقیقات فنی

مهندسی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی، شیراز، ایران

^۲ استاد، گروه بیوشیمی و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، فارس، ایران

^۳ دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، فارس، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۱)

چکیده

در محصولات غذایی که به صورت پرکردن داغ بسته بندی می شوند کاربرد باکتری های پروبیوتیک، بدلیل حساسیت حرارتی بسیار محدود است. ریزپوشانی باکتریهای پروبیوتیک به عنوان یک روش مناسب جهت کاهش آسیب حرارتی پیشنهاد می گردد. ریزپوشانی روش های مختلفی دارد که یکی از این روش ها اکستروژن می باشد. این روش در مقایسه با سایر روش ها، آسیب کمتری را به باکتری وارد می کند. اکستروژن دولایه با استفاده از یک هیدروکلرید با وزن مولکولی بالا از جمله صمغ زودو، می تواند از آسیب حرارتی ممانعت به عمل آورد. در این تحقیق ریزپوشانی به روش اکستروژن بر روی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس^۱ به صورت دولایه انجام شد. لایه اول سدیم آلزینات و لایه دوم صمغ زودو، در چهار غلظت (۰، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ درصد) بود. به منظور انتخاب بهترین درصد صمغ در ریزپوشانی، از نمونه ها توسط میکروسکوپ نوری عکس برداری شد و آزمون های بافتی شامل سختی، صمغیت، فنری و قابلیت جویدن و مولفه های رنگ L^* ، a^* ، b^* و BI بر روی دانک ها صورت پذیرفت. پس از انتخاب بهترین تیمار، آزمون های ماندگاری حرارتی، ماندگاری در شرایط اسیدی به همراه نمک همچنین تولید اسید و رشد باکتری آزاد و ریزپوشانی شده در محیط کشت MRS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیقات نشان داد که صمغ زودو ۰/۸٪ بکار رفته به عنوان لایه دوم، می تواند باعث تغییر معنادار در قطر لایه خارجی گردد. ولی افزایش غلظت زودو نتوانست باعث افزایش در مولفه سختی گردد. اگرچه تنها غلظت ۰/۲٪ با بقیه دارای اختلاف معنادار بود. ($p < 0.05$). غلظتهای (۰/۶، ۰/۸ درصد) زودو باعث افزایش مولفه صمغیت گردید ولی بر روی مولفه های دیگر تاثیری نداشت. در دمای $37^\circ C$ تعداد باکتری ریزپوشانی شده تا ۱۰ دقیقه ثابت ماند و در دقیقه ۵، تعداد آن حدود $5 \log CFU/ml$ بیشتر از باکتری آزاد بود. ($p < 0.05$). میزان ایجاد اسید و رشد باکتری در دانک نسبت به باکتری آزاد کندتر بود. باکتری ریزپوشانی شده دارای ماندگاری میکروبی $2 \log CFU/ml$ بیشتر در غلظت نمک ۱۵ درصد ($pH = 1/5$) در مقایسه با باکتری آزاد بود.

کلید واژگان: اکستروژن، ریزپوشانی، زودو، لاکتوباسیلوس رامنوسوس

* مسئول مکاتبات: aminlari@shirazu.ac.ir

1. *L. rhamnosus*

۱- مقدمه

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که اگر در مقادیر کافی مصرف شوند باعث بروز برخی خصوصیات سلامت بخشی در مصرف کننده می شوند. این خصوصیات عمدتاً به دلیل بهبود فلور میکروبی روده است، گونه های باکتریایی از جنس لاکتوباسیلوس^۱، بیفیدوباکتریوم^۲ و باسیلوس^۳، و به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و برای تهیه غذاهای آماده به کار می روند [۱].

یکی از گونه های مهم پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس رامنوسوس می باشد. این باکتری می تواند در روده به عنوان یک پروبیوتیک زنده بماند و تشکیل کلنی بدهد همچنین مقاوم به صفرا بوده و ضمن عبور از دستگاه گوارش انسان زنده می ماند و باعث تحریک سیستم ایمنی بدن نمی شود. لذا در موارد متعددی از جمله پیشگیری و درمان اسهال در بچه ها، درمان آلرژی و غیره مورد استفاده قرار می گیرد [۴-۲]. متأسفانه به دلیل اینکه بعضی محصولات غذایی دارای پروسه های حرارتی در زمان بسته بندی (پرکردن داغ) هستند؛ استفاده از این باکتری در این نوع غذاها کاربردی ندارد. چراکه حرارت باعث از بین رفتن این باکتری می شود، لذا جهت رفع این نقیصه دو روش پیشنهاد می گردد که یکی اضافه کردن پروبیوتیکها، بعد از پروسه حرارتی است که این امر شانس آلودگی ثانویه را بالا می برد [۱] و روش دوم استفاده از تکنیک هایی است که مقاومت حرارتی باکتری را بالا ببرد که یکی از این تکنیک ها ریزپوشانی است. نتایج مطالعات بر روی ماندگاری پروبیوتیکهای لاکتوباسیلوس پلانتاروم^۴، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس^۵، لاکتوباسیلوس پاراکازی^۶، لاکتوباسیلوس رامنوسوس^۷، بیفیدوباکتریوم لانگوم^۸، لاکتوباسیلوس سالیواریوس^۹، بیفیدوباکتریوم لاکتیس^{۱۰} 'بیوتا پ' Bi-04, Bi-07 در پروسه های حرارتی نشان داد که در دمای ۶۵°C به مدت ۳۰

۳۰ دقیقه، باکتری های پروبیوتیک آزاد از کاهشی معادل $\log$ CFU/ml ۶/۷۴ در مقایسه با باکتری های ریزپوشانی شده که کاهشی برابر $\log$ CFU/ml ۴/۱۷ داشتند را دارا بودند [۵]. از جمله مزایای ریزپوشانی می توان به تثبیت ترکیبات مواد غذایی، کنترل واکنش های اکسیداتیو، مهار یا کنترل رهاسازی پروبیوتیکها، پوشش دادن طعم و عطر نامناسب و ایجاد مانع بین مواد حساس و محیط اطراف اشاره نمود [۶].

پروسه ریزپوشانی باعث کاهش آسیب حرارتی به لاکتوباسیلوس ها می شود. لذا در محصولات که حرارت می بیند به عنوان روش مناسب پیشنهاد می گردد [۷]. همچنین شواهد نشان داده که ریزپوشانی علاوه بر مقاومت حرارتی، باعث ایجاد مقاومت به اسید معده نیز می گردد [۸ و ۹].

روش های مختلفی برای ریزپوشانی وجود دارد که از جمله آن می توان به اکستروژن، امولسیون، کوآکستروژن و روش خشک کن پاششی اشاره نمود. این روش ها بقاء پروبیوتیکها را ۸۰-۹۵ درصد افزایش می دهند. تکنیک ریزپوشانی می تواند باعث ماندگاری باکتری های لاکتوباسیلوس به واسطه کاهش آب محیط شود ولی پروسه هایی مانند ریزپوشانی توسط خشک کردن تحت خلاء، خشک کردن انجمادی یا خشک کردن به وسیله اسپری می تواند باعث کاهش تعداد یا مرگ باکتری ها شود. اکستروژن از جمله قدیمی ترین روشهای تولید میکروکپسول است. در این روش ابتدا باکتری با یک هیدروکلوئید مناسب مخلوط خواهد شد و سپس این مخلوط به صورت قطره به داخل کلرید کلسیم به عنوان محلول سفت کننده ریخته خواهد شد. این روش به دلیل سهولت کار و هزینه کم بسیار محبوب است. موادی که برای ریزپوشانی استفاده می شوند متنوع هستند معمول ترین آن ها آلژینات کلسیم است. علاوه بر آلژینات کلسیم از مواد دیگری نیز جهت ریزپوشانی استفاده می شود که از جمله آن ها می توان به پروتئین های آب پنیر و صمغ ها اشاره نمود [۹-۱۲].

در این بین استفاده از صمغ های بومی بسیار مهم است. زودو، صمغی است شفاف که از درخت بادام کوهی تراوش می شود. زودو به سه رنگ سفید، زرد و قرمز دیده می شود. این صمغ که به نام های صمغ فارسی و شیرازی نیز معروف است. درخت بادام کوهی در مناطق وسیعی از کشور به ویژه استان های که در مرکز قرار دارند، می روید [۱۳].

1. *Lactobacillus*
2. *Bifidobacterium*
3. *Bacillus*
4. *Lactobacillus plantarum*
5. *L. acidophilus*
6. *L. paracasei*
7. *L. rhamnosus*
8. *Bifidobacterium longum*
9. *L. salivarius*
10. *B. lactis*

آهن، سولفات منگنز از شرکت مرک آلمان خریداری شد. توین، انکومایسین، مترونیدازول، آلزینات سدیم از شرکت سیگما خریداری گردید. صمغ زودو از شرکت اهورا دارو، مرودشت، فارس تهیه گردید

۲-۲-کشت باکتری

و به منظور فعال سازی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس از محیط MRS broth استفاده گردید. برای بی‌هوازی شدن محیط از پارافین استریل به قطر ۵ سانتی متر بر روی محیط استفاده شد. جهت ممانعت از ورود اکسیژن در زمان کشت، محیط به صورت گرم مورد تلقیح قرار گرفت. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. برای شمارش باکتری‌ها در آزمون‌های مختلف از محیط ۴M-RTL۷ شامل تریپتیکاز پپتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم، مونوپتاسیم فسفات ۶ گرم، تری آمونیوم سترات ۲ گرم، توین ۱۰ گرم، سدیم استات سه آبه ۲۵ گرم وانکومایسین هیدروکلرید ۱۰ میلی گرم، مترونیدازول ۱۰ میلی گرم، ۲،۳،۵ تری فنیل تترازولیوم کلراید ۳۰ میلی گرم، ال رامنوز ۲۰ گرم، باکتر آگار ۲۰ گرم، محلول نمک ۵ میلی لیتر شامل (سولفات منیزیم ۵ آبه ۱۱/۵ گرم، سولفات آهن ۷ آبه ۰/۶۸ گرم، سولفات منگنز دو آبه ۲/۴ گرم آب مقطر ۱۰۰ سی سی) و آب مقطر ۹۵۰ میلی لیتر استفاده شد. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از جابری هوازی و Gas Anaerocult® A Merk, Germany pack, گرمخانه گذاری شدند [۱۵].

۲-۳-آماده سازی صمغ زودو

ابتدا صمغ با آسیاب آزمایشگاهی پودر شد و از الک آزمایشگاهی با مش ۴۰۰ عبور داده تا پودری یکنواخت با اندازه ذرات کوچکتر از ۵۰ μm به دست آید. میزان پروتئین خام آن ۰/۲٪، خاکستر ۱/۵٪ و رطوبت ۱۱/۴٪ بود. این پودر، جهت انجام آزمون‌های بعدی، در کیسه‌های پلاستیکی غیرقابل نفوذ به رطوبت نگهداری گردید [۱۶]. غلظت‌های (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ درصد) زودو به طور جداگانه تهیه شد. این غلظت‌ها بر اساس پیش‌تست انتخاب شدند. از آن جهت که هدف از تولید باکتری

در رابطه با کاربرد صمغ زودو در ریزپوشانی مطالعات اندکی صورت گرفته است که از جمله آن، از این صمغ با ترکیبی از ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین به منظور ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس استفاده گردید. روش ریزپوشانی خشک کن انجمادی^۱، پاششی^۲ و الکترواسپری^۳ بود. نتایج این پژوهش نشان داد که در بین مواد ذکر شده صمغ زودو دارای بیشترین مقاومت حرارتی در پروسه های ریزپوشانی می باشد. ارزیابی ماندگاری حرارتی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس نیز نشان داد که در بین روش‌ها، الکترواسپری بیشترین تخریب سلولی را در بر دارد [۱۴].

تاکنون از این صمغ به صورت لایه خارجی در روش ریز پوشانی اکستروژن دو لایه استفاده نگردیده است. از سوی دیگر با توجه به اینکه اقبالی جهت تولید پروبیوتیک مقاوم به حرارت به روش ریزپوشانی اکستروژن در محصولاتی که دارای پروسه پر کردن داغ می باشند صورت نگرفته است. لذا هدف این پژوهش ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس به روش اکستروژن بوده است همچنین بررسی خصوصیات دانک تولید شده از جمله تعیین قطر لایه های مختلف دانک، رنگ و مولفه های بافتی در نظر گرفته شده است. از سوی دیگر چون هدف نهایی تولید این دانک، کاربرد آن در غذا می باشد لذا مقاومت به نمک و اسید، شرایط گرمایی و تولید اسید و رشد باکتری در محیط مشابه غذایی مورد مطالعه قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس (PTCC ۱۶۳۷) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه گردید MRS broth, Gas pack Anaerocult® A Merk, MRS Agar تریپتیکاز پپتون، عصاره مخمر، مونوپتاسیم فسفات، تری آمونیوم، سدیم استات تری فنیل تترازولیوم کلراید، کلسیم کلراید، ال رامنوز، باکتر آگار، سولفات منیزیم، سولفات

4. Modified-rhamnose-2,3,5-triphenyltetrazolium chloride-LBS-vancomycin agar (M-RTL۷ agar),

1. freeze drying
2. spray drying
3. electrospraying

بهترین غلظت زودو جهت ریزپوشانی، ریزپوشانی در چهار غلظت (۰/۸، ۰/۶، ۰/۴ و ۰/۲ درصد) بر اساس تست اولیه به طور مستقل انجام گرفت و آزمون‌های شکل و اندازه، رنگ و خصوصیات بافتی دانک‌های ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت [۱۷ و ۱۸].

۲-۵- اندازه گیری خصوصیات فیزیکوشیمیایی

دانک

۲-۵-۱- آزمون شکل و اندازه دانک‌ها

اندازه و شکل دانک‌های حاصل از ریزپوشانی سلول‌های میکروبی و طرز قرارگیری باکتری‌ها در درون دانک‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری Olympus BX51, Japan دارای لام میکرومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت طول به عرض ۲۰ عدد از دانک‌ها نیز سنجش گردید [۱۹].

۲-۵-۲- بررسی بافت دانک‌ها

به منظور سفت شدن بهتر بافت دانک، بافت دانک‌ها ریزپوشانی شده با درصد مختلف زودو (۰/۸، ۰/۶، ۰/۴ و ۰/۲ درصد)، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تولید، در دمای ۴ °C نگهداری و سپس دانک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور از دستگاه بافت سنج USA Brook field CT3 4500 استفاده گردید. در این دستگاه آزمون فشردگی دو مرحله‌ای با استفاده از پروب استوانه‌ای از جنس استیل ضدزنگ با قطر ۳۵ میلی‌متری استفاده شد و سرعت پروب 0.1 mms^{-1} در حالت فشردگی و فاصله گسستگی ۱ میلی‌متر در نظر گرفته شد. پارامترهای سفتی (میانگین نیرو در مرحله اول و دوم)، صمغیت، فنریت یا قابلیت ارتجاع و قابلیت جویدن از منحنی نیرو - زمان که از دستگاه به دست می‌آید، مورد بررسی قرار گرفت. برای هر نمونه تمام این اندازه‌گیری‌ها در دمای $7 \pm 1^\circ\text{C}$ در حداقل ۱۰ تکرار انجام شد و در هر تکرار از ۱۰ عدد دانک استفاده گردید [۲۰].

۲-۵-۳- ارزیابی رنگ دانک‌ها

به منظور ارزیابی رنگ دانک‌ها از روش عکس‌برداری دیجیتال توسط دستگاه Chroma meter CR-400, Konica Minolta, INC, Osaka, Japan. استفاده گردید. دستگاه

ریزپوشانی شده، کاربرد آن در محصولات غذایی می‌باشد. لذا در نظر گرفتن مولفه‌های حسی نیز مد نظر بوده است. غلظت‌های بالاتر از زودو شاید بتواند حرارت بهتری را تحمل نماید ولی باعث سفتی بافت دانک می‌گردد. ز سوی دیگر غلظت‌های کمتر نیز مناسب جهت تیمار حرارتی نبودند. به منظور حل شدن بهتر صمغ، ۹۰ ml از این محلول با ۰/۴ اسید استیک گلاسیال اسیدی شد. در مرحله بعد به منظور خنثی کردن خاصیت باکتری کشی اسید استیک، با سود ۰/۱ نرمال تیترا تا به pH ۵/۷-۶ رسانده شد. سپس توسط فیلتر واتمن شماره ۴ صاف شد و حجم آن به ۱۰۰ ml رسید و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ °C و مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید.

۲-۴- روش ریزپوشانی

بعد از فعال سازی باکتری، کشت به وسیله سانتریفوژ در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، دومرتبه با پیتون واتر ۰/۱٪ استریل شستشو داده شد. حجم سلول‌های شستشو داده شده باکتری توسط نرمال سیلین به ۵ ml رسانده شد و به وسیله اسپکتوفتومتر سنجش میزان کدورت انجام شده و شمارش کلی باکتری‌ها در پلیت حاوی محیط کشت M-RTL۷ انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از جابجایی هوازی و Anaerocult® A Gas pack, Merk, Germany گرمخانه‌گذاری شدند. برای ریزپوشانی از تکنیک اکستروژن به صورت دولایه‌ای استفاده گردید لایه اول سدیم آلزینات و لایه دوم زودو در نظر گرفته شد. به منظور ریزپوشانی، ۵ میلی‌لیتر از کشت باکتریایی شسته شده (در غلظت حدود $10^9 \times 1/91$ CFU/ml) در ۱۵ میلی‌لیتر محلول آلزینات سدیم ۲٪ حل گردید. محلول فوق توسط نیدل ۰/۱۱ mm به صورت قطره‌قطره به ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار CaCl_2 استریل اضافه گردید پس از ۳۰ دقیقه حدود ۲۰ گرم از دانک‌های به وجود آمده را به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد. در مرحله بعد دانک‌ها توسط پیتون واتر ۰/۱٪ استریل چندین بار شستشو شد. سپس دانک‌ها به ۱۰۰ ml محلول زودو ۰/۲٪ اضافه شد و وبر روی شیکر ارلن در دور rpm ۱۸۰ به مدت ۴۰ دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد دانک‌ها توسط پیتون واتر ۰/۱٪ استریل چندین بار شستشو شد. به منظور ارزیابی

۶-۲- بررسی میزان بقای باکتری‌های ریزپوشانی

شده و آزاد در محلول نمک طعام

از رقت حدود 10^4 CFU/g از باکتری‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده و آزاد، از هر کدام به صورت جداگانه، به بافر glycine-HCl (pH ۱/۵) حاوی ۱۵٪ نمک طعام اضافه گردید. از باکتری آزاد و ریزپوشانی شده در زمان‌های ۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ دقیقه نمونه برداری کرده و بر روی محیط M-RTLV به صورت پورپلیت کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از Gas Anaerocult® A Merk, Germany و pack, گرمخانه‌گذاری شدند [۲۲].

۷-۲- روند تولید اسید در باکتری پروبیوتیک و

دانک

بدین منظور از رقت نهایی حدود 10^6 CFU/ml باکتری‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده و آزاد را به تفکیک در ۱۰۰ ml محیط MRS broth کشت داده و در دمای 37°C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از پارافین گرمخانه‌گذاری گردید. هر ۴ ساعت pH و میزان جذب نوری، در طول موج nm ۵۲۵ اندازه‌گیری گردید [۲۳].

۸-۲- ارزیابی مقاومت حرارتی باکتری‌های

ریزپوشانی شده و آزاد

برای سنجش مقاومت حرارتی از دمای 72°C استفاده شد. این دما میانگین دمایی بود که محصول غذایی در سرد کردن اولیه داشت. تعداد اولیه باکتری‌ها در حالت آزاد و ریزپوشانی در حدود 10^9 CFU/ml انتخاب گردید. محیط قرارگیری باکتری MRS broth بود. بعد از حرارت، رقت سازی در بافر فسفات در (pH= ۷) انجام شد که این بافر به جداسازی باکتری‌های ریزپوشانی شده کمک می‌کند. سپس کاهش تعداد باکتری‌ها در زمان‌های (۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷) دقیقه برای باکتری آزاد و

باکاشی سفید استاندارد $L^* = 92/23$ ، $a^* = -1/29$ و $b^* = 1/19$ کالبره شد. برای هر بار اندازه‌گیری رنگ، ۵ گرم دانک در داخل محفظه مخصوص قرار داده شد و مؤلفه‌های روشنایی L^* ، گرایش به قرمزی a^* ، گرایش به زردی b^* ، برای هر نمونه دانک اندازه‌گیری شد سپس با قرار دادن این شاخص‌ها در معادله ۱ و ۲ شاخص قهوه‌ای شدن BI به دست آمد. BI به عنوان شاخص مهم در تشخیص رنگ قهوه‌ای می‌باشد [۲۱].

$$X = (a^* + 1.75L^*) / (5.645L^* + a^* - 3.012b^*)$$

$$BI = [100(X - 0.31)] / 0.172$$

۵-۲-۴- شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در

کپسول‌ها

بعد از مخلوط کردن باکتری شسته شده و محلول آلزینات سدیم، تعداد باکتری‌های موجود در یک گرم مخلوط شمارش شد. بعد از اتمام تولید دانک، یک گرم از دانک‌های تهیه شده را با ۹ میلی‌لیتر محلول استریل بافر فسفات (M ۰/۱ و pH= ۷) مخلوط و بعد از پراکنده شدن و یکنواختی محلول و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق توسط دستگاه استوماکر هم زده گردید تا کپسول‌ها به طور کامل حل و باکتری‌ها در محلول استریل بافر، آزاد شوند. بر روی محلول بافر حاوی باکتری‌های آزاد شده رقت سازی انجام شد و شمارش میکروبی بر طبق شمارش استاندارد در محیط کشت MRS agar صورت پذیرفت. سپس پلیت‌های محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از Gas pack, Merk, Germany و Anaerocult® A بازده ریزپوشانی با استفاده از فرمول زیر به دست آمد

$$N/N_0 \times 100 = \text{بازده ریزپوشانی}$$

N تعداد سلول‌های آزاد شده از دانک بعد از اضافه شدن بافر و قرارگیری در استوماکر می‌باشد.

N_0 تعداد سلول‌های موجود در مخلوط آلزینات و باکتری شسته شده می‌باشد [۱۷].

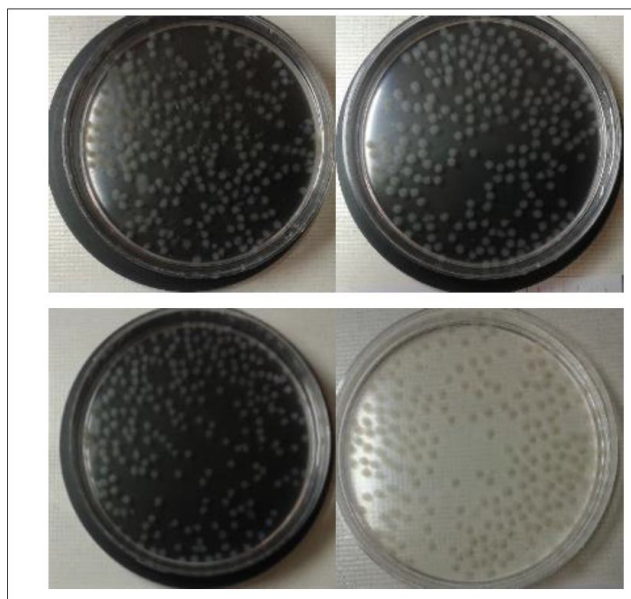


Fig 1 The images of the microencapsulated bacteria from left to right, the upper row: 0.2, 0.4 and lower rows of 0.6, 0.8% of the zedo gum that used in the microencapsulation

دانک‌ها توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند شکل دانک‌ها به صورت کروی بوده و لایه زودو به طور مشخص دیده شد. نسبت طول به عرض دانک‌ها نیز نشان داد که دانک‌ها به فرم کروی بوده اند (شکل ۲).

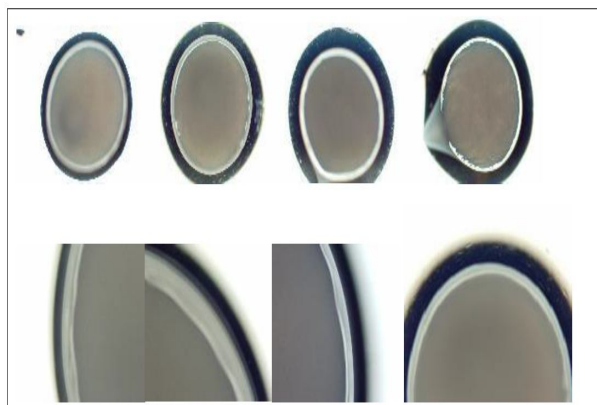


Fig 2 Light microscopy image from microencapsulated bacteria, from left to right, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8% of zedo gum respectively that used in microencapsulation

* Top row images with 25X magnification and lower row with 40X

ارزیابی قطر لایه‌های مختلف دانک بر اساس غلظت‌های مختلف زودو در جدول ۱ آورده شده است.

۰،۵،۱۰،۱۵،۲۰ دقیقه برای دانک) باهم مقایسه گردید. علت تفاوت زمانهای در نظر گرفته شده در این آزمون کاهش سریع باکتری آزاد نسبت به فرم ریزپوشانی شده، بوده است. از آنجاییکه هدف اندازه‌گیری D -value بوده است لذا از دماهای متفاوتی استفاده گردید [۵].

۲-۹-آزمون‌های آماری

دادها با استفاده از نرم‌افزار (SPSS ver 22) آنالیز گردیدند جهت آنالیز آماری بافت و رنگ دانک، از جدول آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای بررسی اختلاف معنادار بین میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد. جهت بررسی زمانی نتایج آزمون ماندگاری در نمک و حرارتی از آزمون Repeated measurement و برای اختلاف معنادار بین میانگین‌های زمانی از آزمون LSD استفاده گردید و برای مقایسه بین تعداد باکتری‌های موجود در دانک و باکتری آزاد در آزمون نمک و ماندگاری حرارتی از T test غیر زوجی در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ استفاده گردید.

۳-نتایج و بحث

۳-۱-نتایج ارزیابی فیزیکوشیمیایی دانک

۳-۱-۱-روش ریزپوشانی و آزمون شکل و اندازه دانک‌ها

در این روش ۴ نوع دانک با در نظر گرفتن رقت‌های مختلف زودو (۰/۲ تا ۰/۸ درصد) تولید شد. غلظت اولیه باکتری در محلول آلزینات 9×10^9 CFU/ml بود. دانک‌ها به شکل کروی^۱ و دارای ظاهری صاف بودند (شکل ۱). با توجه به رنگ زمینه که تاثیر گذار بر رنگ دانک می باشد لذا برای تشخیص تاثیر غلظت های زودو از تست رنگ سنجی توسط دستگاه هانتز لاب استفاده گردید

1. Spherical

Table 1 The determination of microencapsulated layers' dimension and thickness.

Layers (μm)	Zedo percent			
	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
Zedo thickness	52.5±6.6 ^b	59.2±10.1 ^b	70.8±15.02 ^b	137.5±7.2 ^a
alginate dimension	3250±253.72	3258.3±22.04	3616±108.32	3593.6±33.3

Data (mean ± standard deviation) are from three replications.

The results with different upper letters in each row are statistically significant ($p \leq 0.05$).

پیچ خورده و حفره دار می شوند [۲۵]. همچنین علاوه بر نوع ماده بکار رفته در ریزپوشانی، روش آن نیز بر شکل دانک موثر است. به عنوان مثال بر اساس گزارش مویدی و همکاران [۱۴] که از صمغ زودو، ایزوله پروتئین آب پنیر و اینولین به منظور ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس به روش های خشک کن انجمادی، پاششی و الکترواسپری استفاده کردند. دانکهای تولیدی در روش الکترواسپری به صورت کروی و در دو روش دیگر نامنظم و چروکیده بودند.

قطر نازل نیز در ایجاد فرم و اندازه دانک موثر است. در بررسی کیم و همکاران [۲۶] که به وسیله آلژینات سدیم، MRS، گلیسرول و تووین ۸۰ در حضور CaCl_2 ریزپوشانی را انجام شد دانکهای تولید شده کروی بوده و سطح آنها چروکیده و متوسط قطر آنها ۷۵ میکرومتر بود که با یافته های این تحقیق همخوانی نداشت یکی از دلایل آن تفاوت مواد ریزپوشانی شده بکار رفته و قطر نازل بود که در تحقیق مورد بحث ۰/۴mm بود؛ بنابراین ذرات متفاوتی را نسبت به این تحقیق تولید نموده است.

بازده ریزپوشانی در این تحقیق ۹۴/۱۱٪ بوده است. بازده ریزپوشانی بر اساس روش به کار رفته در ریزپوشانی متفاوت است. همچنین مواد به کار رفته در آن نیز نقش مهمی در این بازده دارند. به عنوان مثال در مطالعه ای میزان بازده ریزپوشانی را با آلژینات سدیم برای باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس ۸۳/۳۳ درصد ذکر گردید (۲۷). در بررسی دیگری عمل ریزپوشانی بر روی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس^۲ انجام شد. در این تحقیق از پکتین به عنوان لایه اول و از پروتئین آب پنیر تیمار حرارتی داده شده، به عنوان لایه دوم استفاده گردید بازده ریزپوشانی ۸۴/۳۵ درصد گزارش گردید [۲۸].

همان طور که ملاحظه می شود. قطر کل آلژینات بین ۳۲۵۰ تا ۳۵۹۱ میکرومتر بوده است و قطر لایه زودو بین ۵۲ تا ۱۳۷ میکرومتر اندازه گیری شده است. در بین دانکها، دانک حاوی ۰/۸ درصد زودو دارای بیشترین قطر لایه خارجی (زودو) در بین دانکها بوده است ($p < ۰/۰۵$) (جدول ۱). در این تحقیق تمام دانکهای تولید شده کروی شکل بودند و نسبت صوری^۱ آن $۱/۰۳۵ \pm ۰/۰۴$ بود. همچنین ریزپوشانی در غلظت ۰/۸٪ تغییر معناداری در قطر لایه زودو به وجود آورد ($p < ۰/۰۵$). بر اساس پژوهش حاضر، تنها در غلظت ۰/۸٪ زودو، ضخامت لایه خارجی متفاوتی با سایر دانکها ایجاد شد. در مطالعه ای بر روی باکتریهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۵۴۷، و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ATCC 1994 و لاکتوباسیلوس کازی ۰۱ عمل ریزپوشانی انجام شد و نتایج نشان داد که ضخامت دانه های آلژینات با اضافه کردن مواد ثانویه افزایش می یابد [۲۰].

نسبت صوری محاسبه شده حاکی از کروی بودن دانکها بود. بر اساس پژوهش پیشین تمام دانکهای تولید شده به روش اکستروژن حالت کروی داشتند و از نسبت صوری $۱/۰۷ \pm ۰/۰۳$ (برخوردار بوده که اندازه و قطر دانک می تواند از چند میکرون تا یک میلی متر متغیر باشد [۱۷ و ۲۴].

در تحقیقی بر روی دانکهای تولید شده با کیتوزان-آلژینات و اینولین به صورت اکستروژن دولایه انجام شد مشخص شد که دانکهای تولید شده کروی شکل بودند. میانگین اندازه دانکهای تولید شده $۱/۰۴ \pm ۰/۰۸$ تا $۱/۳۹ \pm ۰/۰۶$ mm بود (۱۷)؛ که با یافته های این تحقیق مطابقت ندارد یک از دلایل آن می تواند اختلاف در ماده بکار رفته جهت ریزپوشانی باشد. به عنوان مثال لستین باعث ایجاد حالت کروی در دانک می شود و عدم وجود آن باعث ایجاد حالت بیضوی می گردد در این حالت دانکها

2. *L.acidophilus*

1. Aspect ratio

۳-۱-۲- بررسی بافت دانک‌ها

نتایج ارزیابی بافت در جدول ۲ آورده شده است.

Table 2 Hardness, gumminess, springiness and chewingness in the microencapsulated bacteria

Parameters	Zedo percent			
	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
Hardness/g	15.18±1.53 ^a	19.17±1.23 ^b	19.0±0.36 ^b	21.50±0.51 ^b
Gumminess/g	12.22±0.58 ^c	12.9±1.07 ^c	16.7±0.27 ^d	16.33±0.11 ^d
Springiness/mm	0.785±0.07	0.742±0.02	0.73±0.03	0.66±0.07
Chewingness /mJ	0.06±0.006	0.08±0.02	0.21±0.17	0.12±0.03

Data (mean ± standard deviation) are from three replications.

The results with different upper letters in each row are statistically significant ($p < 0.05$).

Gumminess, springiness and chewingness are not statistically significant ($p \leq 0.05$).

اختلاف معناداری داشتند مؤلفه b^* شاخص رنگ زرد -آبی است

که در بین نمونه ها اختلاف معناداری در این مؤلفه مشاهده نگردید. بررسی مؤلفه BI که شاخص قهوه ای بودن است نیز نشان داد که با افزایش میزان زودو افزایش رنگ قهوه‌ای حاصل گردیده است. مؤلفه قهوه‌ای دانک‌های (۰/۲ و ۰/۴ درصد) باهم اختلاف معناداری نداشته ولی با نمونه (۰/۶ و ۰/۸ درصد) که دارای رنگ قهوه‌ای تری بوده اند، تفاوت معنادار داشته‌اند.

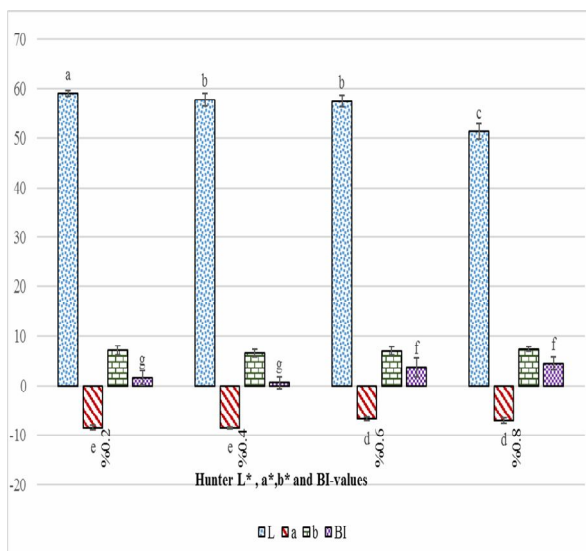


Fig 3 The determination of color parameters in microencapsulated bacteria

1- Data (mean ± standard deviation) are from three replications.

2-The results with different upper letters in each row are statistically significant ($p \leq 0.05$).

۳-۱-۳- شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در

کپسول‌ها

محاسبه درصد ریزپوشانی بر اساس روش گندمی و همکاران [۱۷] انجام گردید. در این تحقیق تعداد باکتری‌های اولیه در

نتایج نشان داد که دانک‌ها از لحاظ فنریت و قابلیت جویدن هیچ‌گونه تفاوت معناداری باهم نداشتند. اگرچه در غلظت ۰/۶٪ زودو بیشترین میزان قابلیت جویدن مشاهده گردید ولی بدلیل بالا بودن خطای استاندارد، با سایر تیمارها از اختلاف معناداری با سایرین برخوردار نبود. میزان سختی با افزایش غلظت زودو افزایش یافته است ولی این افزایش معنادار نبوده است و تنها نمونه ۰/۲ درصد با بقیه دارای تفاوت معنادار بوده است. صمغیت در نمونه های (۰/۲ و ۰/۴ درصد) از نمونه های دیگر کمتر بود ($p < 0.05$).

پژوهش حاضر نشان داد که غلظت زودو در ریزپوشانی دولایه، نمی‌تواند اثر بسزایی بر سفتی بافت و استحکام دانک داشته باشد. ولی صمغیت نمونه ها تا حدودی تحت تاثیر غلظت زودو قرار می‌گیرند. از سوی دیگر جنس مواد ریزپوشانی در استحکام دانک تاثیری ندارد به عنوان مثال در دانکهای تولیدی از سدیم آلژینات، کیتوزان و پلی ال لایزین اختلاف معنا داری در سفتی دانک مشاهده نگردید [۲۰].

۳-۱-۳- ارزیابی رنگ دانک‌ها

ارزیابی رنگ دانک در شکل ۳ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش میزان زودو به کاررفته در ریزپوشانی از ارزش عددی مؤلفه L^* با مؤلفه روشنایی کاسته شده است. از لحاظ مؤلفه a^* یا گرایش به قرمزی، دانک‌های (۰/۲ و ۰/۴ درصد) باهم اختلاف معناداری نداشته ولی با نمونه های (۰/۶ و ۰/۸ درصد) که دارای رنگ قرمزتری بودند؛

باکتری‌های آزاد نسبت به دانک دارای مقاومت به اسید و نمک کمتری بودند. لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده حدود ۱/۵ برابر قدرت زنده‌مانی بیشتری نسبت به باکتری آزاد در سه ساعت در حضور محلول ۱۵٪ نمک و (pH ۱/۵) داشتند. ولی از سوی دیگر بین باکتری آزاد و دانک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ریزپوشانی شده با فروکتوالیگوساکارید، لاکتولوز و رافینوز با روش هیبریداسیون، تفاوت معناداری در تحمل نمک وجود نداشت ($p > 0.05$) اختلاف در نوع باکتری انتخابی و استفاده از مواد ریزپوشانی با وزن مولکولی کمتر نسبت به زودو می‌تواند باعث این اختلاف در این تحقیق گردد [۲۹].

روش ریزپوشانی نیز در تحمل نمک موثر است مثلاً ریزپوشانی لاکتوباسیلوس پاراکازی^۱ NFBC 338 توسط روش خشک‌کن پاششی توانست باعث افزایش حساسیت به نمک شود. لذا یکی از دلایل آن، حساس شدن غشاء باکتری طی روش خشک‌کن پاششی است که باعث کاهش مقاومت به نمک می‌شود. بنابراین استفاده از روش خشک‌کن پاششی باعث ایجاد استرس در سلول شده و مقاومت به نمک را کاهش می‌دهد که در بررسی حاضر با توجه به کاربری روش اکستروژن این مشکل وجود نداشت [۲۲].

روشهای مختلف ریزپوشانی تأثیرات متفاوتی بر تحمل نمک دارد به عنوان مثال لاکتوباسیلوس پلانتاروم B₁ و لاکتوباسیلوس پاراکازی زیرگونه پاراکازی E6 که به‌وسیله روش هم‌انباشت^۲ با استفاده از ایزوله پروتئین آب‌پنیر (۳ W/V درصد) و صمغ عربی (۳ W/V درصد) به نسبت ۲:۱ ریزپوشانی شدند. هر دو نوع دانک باکتری در (pH=۲) و شرایط معدی دارای ماندگاری بیش از ۷۳ درصد بودند. در صورتی‌که در سلول‌های آزاد ماندگاری کمتر از ۱۹ درصد بوده است. همچنین دانک‌ها در pH=۷ و شرایط روده‌ای حل‌شده و میکروب‌ها را آزاد کردند [۳۰].

۳-۳- روند تولید اسید و کدورت باکتری پروبیوتیک و دانک

روند تولید اسید در باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد در شکل ۵ آورده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در طی ۵۶

محلول آلزینات ۱۰^{-۱}×۱/۰۲ و تعداد باکتری‌های موجود در دانک ۱۰^{-۹}×۹/۶ بود. لذا میزان ریزپوشانی ۹۴/۱۱ درصد محاسبه گردید

۲-۳- بررسی میزان بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد در محلول نمک طعام

بررسی میزان بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد در محلول نمک طعام در شکل ۴ آورده شده است. تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد در برابر نمک کاهش یافته است.

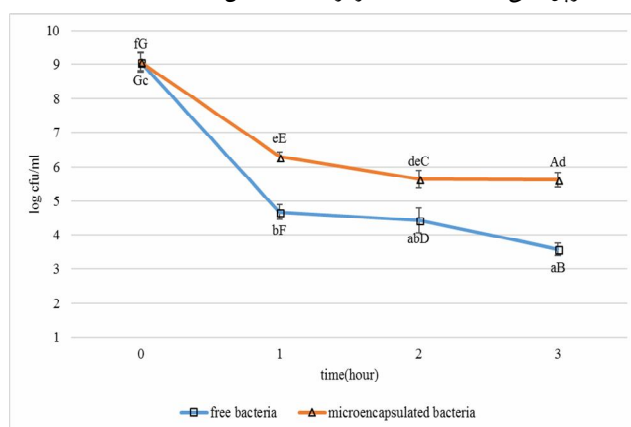


Fig 4 The free and microencapsulated bacterial resistance against the salt

1- Data (mean ± standard deviation) are from three replications.

2- Same lowercase letters in each line represents no significant difference during the time ($p > 0.05$).

3- Different capital letters indicate significant differences between the microencapsulated and the free bacteria at the same time (0, 1, 2, 3 hour separately) ($p \leq 0.05$).

هرچه زمان مواجه شدن بانمک بیشتر باشد، کاهش تعداد باکتری نیز بیشتر شده است. بیشترین میزان کاهش در یک ساعت اول بود. باکتری ریزپوشانی شده نسبت به باکتری آزاد از مقاومت بیشتری برخوردار بود. از آنجایی‌که کاهش تعداد در باکتری آزاد و ریزپوشانی به ترتیب از ۹/۰۷ به ۴/۴۸ log CFU/ml و از ۹/۰۹ به ۷/۳۱ log CFU/ml بوده است. لذا حدود ۴/۵ واحد لگاریتمی کاهش در نیم ساعت اول مشاهده گردید. از سوی دیگر در باکتری ریزپوشانی شده، حدود ۳ لگاریتم در تعداد باکتری‌ها در یک ساعت اول کاهش مشاهده شده است. در پایان سه ساعت مواجه شدن با محلول نمک طعام تعداد باقیمانده باکتری‌های ریزپوشانی شده نزدیک به ۵ و تعداد باکتری‌های آزاد نزدیک به ۳/۵ log CFU/ml بود.

1. *Lactobacillus paracase*

2. Coacervation

باکتری آزاد نسبت به دانک دارای روند رشد، ایجاد کدورت و تولید اسید سریع تر بود. آزاد شدن باکتری در دانک به کندی صورت می گیرد لذا سرعت آزاد شدن باکتری ها از درون دانک کمتر و در نتیجه تولید کدورت کمتر است و از سوی چون باکتری های آزاد در تولید اسید نقش مهمی را بر عهده دارند. لذا همین مسئله بر روی میزان تولید اسید تولیدی نیز اثر می گذارد [۳۲ و ۲۴].

۳-۴- ارزیابی مقاومت حرارتی باکتری های ریزپوشانی شده و آزاد

ارزیابی حرارت اعمال شده بر باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس آزاد و ریزپوشانی شده در شکل ۷ آورده شده است. همان طور که مشهود است D-value باکتری آزاد ۱/۵۶۷ دقیقه ولی در باکتری ریزپوشانی شده متغیر بوده است. ماندگاری باکتری های ریزپوشانی شده نسبت به آزاد بیشتر بوده و حرارت ۷۲ °C را تا ۱۲ دقیقه تحمل نموده است.

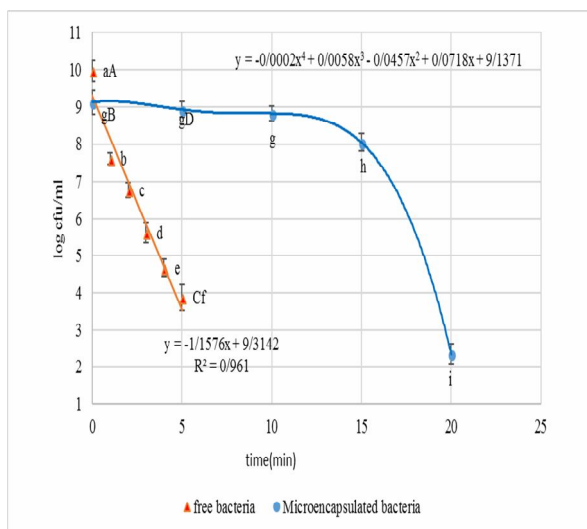


Fig 7 The free and microencapsulated *Lactobacillus Rhamonusus* survivenss at 72 °C

- 1- Data (mean $\pm$ standard deviation) are from three replications.
- 2- Same lowercase letters on each line represents no significant difference during the time ($p > 0.05$).
- 3- Different capital letters indicate significant differences between the microencapsulated and the free bacteria at the same time (0 and 5 min separately) ($p \leq 0.05$).

ساعت گرمخانه گذاری دردمای ۳۷ °C میزان pH از ۵/۶۳ به ۳/۹ در باکتری آزاد رسیده است و برای باکتری ریزپوشانی از ۵/۷ به ۳/۹۶ رسیده است. روند کاهش pH در باکتری آزاد از ۲ ساعت اول به مراتب سریع تر از باکتری ریزپوشانی شده بود.

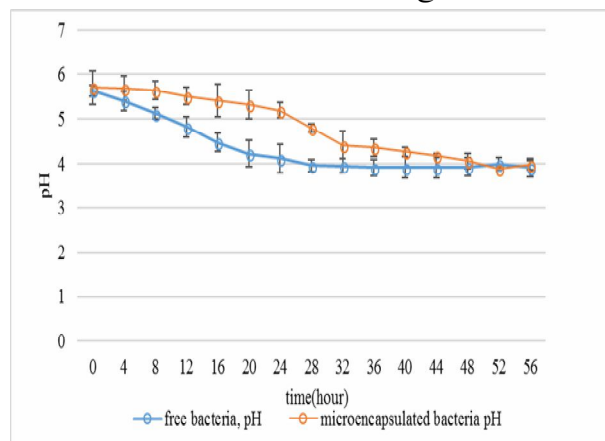


Fig 5 Acid Production in free and microencapsulated *Lactobacillus Rhamonusus*
Data (mean $\pm$ standard deviation) are from three replications.

ولی بعد از ۴۸ ساعت همسان گردید. همچنین بررسی جذب نوری باکتری های ریزپوشانی و آزاد نشان داد که جذب نوری در باکتری های آزاد دارای سیر صعودی بیشتری نسبت به باکتری ریزپوشانی بوده است. افزایش جذب نوری در باکتری های آزاد از ۰/۲۴۲ به ۰/۸۵۴ و در باکتری ریزپوشانی از ۰/۰۵۲ به ۰/۷۸۹ در طی ۲۰ ساعت رسید و در باکتری ریزپوشانی شده در مدت ۲۴ ساعت به ۰/۹۰۳ رسیده است (شکل ۶).

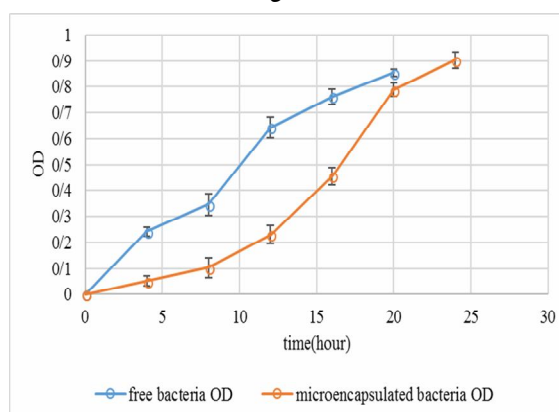


Fig 6 Optical density in free and microencapsulated *Lactobacillus Rhamonusus*
Data (mean $\pm$ standard deviation) are from three replications.

مطالعه، که باکتری‌های ریزپوشانی مقاوم‌تر از باکتری آزاد بودند تطابق دارد [۳۳].

۴- نتیجه گیری کلی

همان‌طور که در مقدمه ذکر گردید هدف از اجرای این طرح تولید دانک مقاوم به شرایط پرکردن داغ می باشد. استفاده از صمغ زودو در ریزپوشانی دولایه به عنوان لایه خارجی توانست تعداد باکتری‌های پروبیوتیک را تا ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C ثابت نگه دارد. همچنین مقاومت دانک تولیدی در برابر نمک و اسید نیز به مراتب بالاتر از باکتری معمولی بوده و دارای اختلاف ماندگاری ۲ لگاریتمی بیشتر نسبت به باکتری آزاد است ($p < 0.05$). لذا باکتری ریزپوشانی شده فوق در غذاهای نمکی و اسیدی نیز می تواند به کار رود. دانک های تولیدی حالت کروی داشتند. همچنین دانک تولیدی با افزایش غلظت زودو، پر رنگ تر شده ولی سختی آن به غلظت زودو وابسته نبود و تنها غلظت ۰/۲٪ با بقیه دارای اختلاف معنا دار بود. لذا کاربرد آن در محصولات غذایی اثر نامطلوب حسی ایجاد نمی کند. میزان غلظت زودو بر روی صمغیت موثر است و از سوی دیگر قطر دانک را نیز تحت تاثیر قرار می دهد. بنابراین استفاده از این دانک در محصولات که دارای رنگ تیره هستند، پیشنهاد می گردد. البته در ادامه این پژوهش می توان امکان استفاده از ترکیبی از هیدروکلوئیدهای مختلف را در ریزپوشانی بررسی کرد. تعارض منافع:

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلان نکرده‌اند.

۵- منابع

- [1] Corona, Hernandez R.I., Álvarez, Parrilla E., Lizardi-Mendoza J., Islas, Rubio A. R., Rosa L., and Wall, Medrano A. (2013). Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 614-628..
- [2] Doron S., Snyderman D.R., and Gorbach S.L. (2005). *Lactobacillus GG*: bacteriology and clinical applications. *Gastroenterology Clinics*, 34, 483-498.

مطالعاتی بر روی ماندگاری حرارتی، باکتری آزاد و ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پاراکازی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، بیفیدوباکتریوم لانگوم، لاکتوباسیلوس سالیاریوس، بیفیدوباکتریوم لکتیس یوتایپ Bi-07, Bi-07 انجام شد. نتایج نشان داد که باکتری آزاد در دمای ۶۵ °C در پایان زمان آزمون از بین رفته ولی باکتری ریزپوشانی شده در زمان ۳۰ دقیقه زنده مانده اند. نرخ کاهش دانک باکتری به میزان $\log 4/17 \text{ CFU/ml}$ نسبت به باکتری‌های آزاد که $\log 6/4 \text{ CFU/ml}$ بوده است. نتایج تحقیقات نشان داد که ماتریکس آلژینات بعد از ۱ ساعت مقاومت کمی نسبت به حرارت داشته است. که با نتایج این پژوهش همخوانی ندارد. زیرا در مطالعه قبلی، درصد اختلاط آلژینات با باکتری ۱:۴ با روش امولسیون بود. در صورتی که در این تحقیق درصد اختلاط ۱:۳ و روش اکستروژن دولایه بوده است. به علاوه تعداد باکتری‌های اولیه نیز در تحقیق دینگ و همکاران (۷) برابر 10^{11} CFU/ml بوده که در مقایسه به مراتب بالاتر از $10^9 \times 1/5 \text{ CFU/ml}$ بوده است. همان‌طور که مشخص است یکی از عواملی که بر ماندگاری باکتری اثر می‌گذارد تعداد اولیه باکتری‌ها می‌باشد از سوی دیگر اختلاف دمایی بین این تحقیق و روش دینگ وجود دارد که دمای به کاررفته در این تحقیق ۷۲ °C و محیط کشت استفاده شده MRS بود. در صورتی که در تحقیق دینگ دما ۶۵ °C و محیط آب پپتونه استفاده شده است. لذا تفاوت در دما و محیط می‌تواند بر ماندگاری باکتری‌ها مؤثر باشد در هر دو تحقیق نرخ زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی بیشتر از باکتری‌های طبیعی بوده است.

همچنین نتایج تحقیقات کیم و همکاران [۲۶] نشان داد که دانک حاوی آلژینات دارای مقاومت حرارتی بالاتری نسبت به باکتری آزاد می‌باشد که با نتایج این تحقیق تطابق دارد. به علاوه در گزارش‌های دیگری ماندگاری حرارتی دانک‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA1 مورد بررسی قرار گرفت دانک‌ها نسبت به باکتری‌های آزاد از ماندگاری بالاتری در دماهای ۸۵، ۹۰ و ۷۲ برخوردار بودند. در دمای ۷۲ °C تعداد باکتری‌های آزاد از $\log 9/13 \text{ CFU/ml}$ به $\log 0/84 \text{ CFU/ml}$ کاهش یافت. در صورتی که در باکتری‌های ریزپوشانی از $\log 7/4 \text{ CFU/ml}$ به $\log 6/25 \text{ CFU/ml}$ کاهش داشته است که با یافته‌های این

- [14] Moayyedi M., Eskandari M.H., Rad A.H.E., Ziaee E., Khodaparast M.H.H., and Golmakani, M.T.(2018). Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Functional Foods*, 40, 391-399.
- [15] Sakai T., Oishi K., Asahara T., Takada T., Yuki N., Matsumoto K., Nomoto K., and Kushiro A.(2010). M-RTL agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 154-160.
- [16] Fadavi G., Mohammadifar MA., Zargarra A., Mortazavian A.M., and Komeili R.(2014). Composition and physicochemical properties of zedo gum exudates from *Amygdalus scoparia*. *Carbohydrate Polymers*, 30, 1074-1080.
- [17] 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.
- [18] Krasaekoopt W., and Watcharapoka S.(2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT-Food Science and Technology*, 57, 761-766.
- [19] 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, 1966-1970.
- [20] 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, 737-743.
- [21] Abbasi S., and Azari S.(2009). Novel microwave-freeze drying of onion slices. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 974-979. [article in Persian].
- [3] Gardiner G.E., Heinemann C., Baroja M.L., Bruce AW., Beuerman D., Madrenas J., and Reid, G.(2002). Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 for human intestinal applications. *International Dairy Journal*, 12, 191-196.
- [4] Reid G., Charbonneau D., Gonzalez S., Gardiner G., Erb J., Poehner R., and Bruce A. W.(2002). Ability of *Lactobacillus GR-1* and RC-14 to stimulate host defences and reduce gut translocation and infectivity of *Salmonella typhimurium*. *Nutraceuticals and Food*, 7, 168-73.
- [5] Ding W., and Shah N.(2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72, 446-450.
- [6] Anal A.K., Singh H.(2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 240-251.
- [7] Arihara K.(2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219-229.
- [8] Adhikari K., Mustapha A., Grün I., Fernando L.(2000). Viability of microencapsulated *Bifidobacteria* in set yogurt during refrigerated storage, *Journal of Dairy Science*, 83, 1946-1951.
- [9] Picot A., and Lacroix C.(2003). Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. *International Dairy Journal*, 13, 455-462.
- [10] Krasaekoopt W., Bhandari B., and Deeth H.(2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13, 3-13.
- [11] Ananta E., Volkert M., and Knorr D.(2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15, 399-409.
- [12] Favaro-Trindade C.S., Pinho S. C. D., and Rocha G.A. (2008). Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11, 103-112.
- [13] Kashki M., and Amirabadizadeh H.(2011). Approach to plant communities in desert regions of Khorasan province in Iran. *International Journal of Science and Nature*, 2, 42-46.

- [28] Gebara C., Chaves K.S., Ribeiro M.C.E., Souza F.N., Grosso C.R., and Gigante M.L.(2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. Food Research International, 51, 872-878.
- [29] Ann EY., Kim Y., Oh S., Imm J.Y., Park D.J., Han K.S., and Kim, S. H.(2007). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. International Journal of Food Science and Technology, 42(4):411-9.
- [30] Bosnea LA., Moschakis T., and Biliaderis C.G.(2014). Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. Food and Bioprocess Technology, 7, 2767-2781.
- [31] Soodbakhsh S., Gheisari H., Aminlari M., and Dehnavi T.(2012). Viability of encapsulated *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* in synbiotic frozen yogurt and their survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. International Journal of Probiotics and Prebiotics, 7, 121-128.
- [32] Sabikhi L., Babu R., Thompson D.K., and Kapila S.(2010). Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. Food and Bioprocess Technology, 3, 586-593.
- [22] Gardiner G., O'sullivan E., Kelly J., Auty M., Fitzgerald G., Collins J., and Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. Applied and Environmental Microbiology, 66, 2605-2612.
- [23] Homayouni A., Azizi A., Ehsani M., Yarmand M., and Razavi S.(2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chemistry, 111, 50-55.
- [24] Abdel, Salam MH., and El-Shibiny S.(2012). Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: a review. International Journal of Dairy Technology, 65, 13-21.
- [25] Donthidi A., Tester R., and Aidoo K.(2010). Effect of lecithin and starch on alginate-encapsulated probiotic bacteria. Journal of Microencapsulation, 27, 67-77.
- [26] Kim S.J., Cho S.Y., Kim S.H., Song O.J., Shin I.S., Cha D.S., and Park H.J.(2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. LWT-Food Science and Technology, 41, 493-500.
- [27] Corbo M.R., Bevilacqua A., and Sinigaglia M.(2011). Shelf life of alginate beads containing *lactobacilli* and *bifidobacteria*: characterisation of microspheres containing *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. International Journal of Food Science & Technology, 46, 2212-2217.

The improvement of the physicochemical properties of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic by dual layers extrusion microencapsulation with sodium alginate and zedo gum

Sekhvatizadeh, S.¹, Aminlari, M.^{2*}, Ghaisari, H. R.³

1. Ph.D student, Food hygiene Dep., School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Fars, Iran and Lecturer, Faculty of Agricultural Engineering Research Institute, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Fars, Iran

2-Professor, Biochemistry and Food hygiene Dep., School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Fars, Iran

3- Associate Professor, Food hygiene Dep., School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Fars, Iran

(Received: 2017/09/18 Accepted: 2018/02/10)

In food products packed in hot filling mode, the use of probiotic bacteria is very limited due to thermal sensitivity. The microencapsulation of probiotic bacteria is suggested as a suitable method for reducing thermal damage. The microencapsulation is done by several methods, one of which is the extrusion. This method causes less damage to the bacterium than the others. Dual layer extrusion using a high molecular weight hydrocolloid, such as zedo gum, can prevent thermal damage. In this research, the microencapsulation by extrusion method was performed as the two layers on *Lactobacillus rhamnosus*. The first layer was sodium alginate and the second was zedo gum, at four concentrations (0.2, 0.4, 0.6, 0.8%). The best gum percentage for microencapsulation was determined by light microscopy and texture analysis including hardness, gumminess, springiness and chewiness. The color components L*, a*, b* and BI on microencapsulated bacteria were also assessed. After selecting the optimum condition, thermal stability, acid and salt stability, acid production tests and the growth of microencapsulated bacteria during storage conditions in MRS medium were investigated. The results showed that 0.8% zedo gum used as the second layer could significantly change the outer layer diameter. However, the increase of zedo concentration did not increase the hardness component. However, only at 0.2% zedo gum had a significant difference with the rest ($p < 0.05$). Concentrations of 0.6% and 0.8% zedo gum resulted in the increased gumminess component, but did not affect other components. At 72 °C, the number of microencapsulated bacteria remained stable for 10 minutes, and at the 5th minute their count was about 5 log CFU/ml higher than free bacteria ($p < 0.05$). The amount of acid production and bacterial growth in the microencapsulated bacteria were slower than free bacteria. The microencapsulated bacteria had microbial survival of 2 log CFU/ml more than the normal form in a salt concentration of 15% (pH = 1.5) compared with free bacteria.

Keywords: Microencapsulation, *Lactobacillus rhamnosus*, Extrusion, Zedo gum

* Corresponding Author E-Mail Address: aminlari@shirazu.ac.ir