



## درون پوشانی دولایه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به روش های امولسیون و خشک کردن پاششی: بررسی ویژگی ها و زنده مانگی ریزپوشینه ها در شرایط شبیه سازی شده معده

حدیث ناصری فیروزوند<sup>۱</sup>، علیرضا بصیری<sup>۲\*</sup>، انوشه شریفان<sup>۳</sup>

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲- گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

با افزایش سطح آگاهی جامعه، تقاضا برای مصرف غذاهای فراسودمند افزایش یافته است. مقاومت پایین باکتری های پروبیوتیک در برابر شرایط نامساعد محیطی از مهم ترین عوامل محدود کننده تولید و گسترش فرآورده های پروبیوتیک به شمار می آید. درون پوشانی با محصور کردن سلول های پروبیوتیک می تواند منجر به افزایش پایداری در برابر عوامل محدود کننده از جمله شرایط اسیدی معده گردد. در این پژوهش، کارایی درون پوشانی دولایه با آلزینات سدیم و کیتوزان به دو روش خشک کردن پاششی و امولسیون بر پایداری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در برابر شرایط شبیه سازی شده معده (pH=۲) طی زمان های ۶۰، ۳۰، ۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بررسی گردید. اندازه ریزپوشینه ها توسط سنجش گر ابعاد ذراتو شکل ظاهری آنان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) تعیین گردیدند. منحنی رشد بدست آمده نشان داد که باکتری ها ۴۰ تا ۴۲ ساعت پس از تلقیح وارد فاز ثابت رشد می شوند. ابعاد ریزپوشینه های حاصل از روش امولسیون به طور معنی داری ( $p \leq 0/05$ ) کمتر از روش خشک کردن پاششی بود. شکل ظاهری ریزپوشینه ها کروی تا بیضی بود که نمونه های حاصل از روش خشک کردن پاششی دارای سطحی چروکیده بودند. بیشترین زنده مانگی را نمونه های درون پوشانی شده به روش امولسیون با کاهش ۱/۹ سیکل لگاریتمی و پس از آن باکتری های درون پوشانی شده به روش خشک کردن پاششی با کاهش ۲/۴ سیکل لگاریتمی نشان دادند. کمترین میزان زنده مانگی مربوط به نمونه شاهد (باکتری های آزاد) با کاهش ۳/۸۳ سیکل لگاریتمی بود. درون پوشانی باکتری های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به روش امولسیون با ایجاد پایداری مناسب در برابر شرایط شبیه سازی شده معده، روشی مناسب جهت دستیابی به فرآورده های پروبیوتیک غنی شده با این باکتری می باشد.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۹

کلمات کلیدی:

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، درون پوشانی دولایه، امولسیون، خشک کردن پاششی.

DOI: 10.52547/fsct.18.121.19

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7

\* مسئول مکاتبات:

bassiri@irost.ir

## ۱- مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیزم‌های زنده‌ای هستند که در غلظت مناسب با تعدیل فلور میکروبی روده، اثرات سلامت‌بخشی را بر روی میزبان اعمال می‌کنند [۱]. در طی سال‌های اخیر تقاضای رو به رشدی جهت استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در مواد غذایی به منظور افزایش ارزش تغذیه‌ای و اثرات سلامت‌بخش آن‌ها ایجاد شده است. در بین پروبیوتیک‌ها، باکتری‌های تولیدکننده لاکتیک اسید شامل جنس‌های لاکتوباسیلوس<sup>۱</sup> و بیفیدوباکتر<sup>۲</sup>، بیش از همه مورد توجه قرار دارند. با این وجود زنده‌مانی این باکتری‌ها طی فرآوری و در طول دوره نگهداری چالش اصلی در بکارگیری این فناوری، به شمار می‌آید [۲]. باکتری‌های پروبیوتیک برای ایجاد اثرات سلامت‌بخش خود، باید به صورت زنده و فعال به تعداد کافی  $10^6 - 10^7$  (log cfu/g) به روده انتقال یابند. زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله pH، اسیدی شدن ثانویه محصول، تولید هیدروژن پراکسید در طی عمل تخمیر و هم‌چنین دمای فرآوری و نگهداری قرار دارد. علاوه بر این، شرایط اسیدی معده و نمک‌های صفرآوری نیز از جمله عوامل مهم در کاهش زنده‌مانی این گروه از میکروارگانیزم‌ها هستند [۳]. برای مقابله، راهکارهایی از جمله استفاده از گونه‌های مقاوم به اسید، کنترل تولید اسید در فرآورده و افزودن سیستمین، یا چلاته‌کننده‌های اکسیژن مانند اسید آسکوربیک استفاده شده‌اند [۴]. تامین شرایطی برای بهبود زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی به وسیله ایجاد سد فیزیکی در برابر شرایط نامساعد محیطی راهی است که اخیراً مورد توجه زیادی قرار گرفته است [۵]. فناوری درون‌پوشانی پروبیوتیک‌ها در طی دهه گذشته پیشرفت چشم‌گیری داشته است. در این فناوری، دامنه گسترده‌ای از میکروارگانیزم‌ها در داخل یک غشا نیمه تراوا و سازگار با میکروارگانیزم از نظر زیستی محصور شده که در کنار بهبود پایداری میکروارگانیزم‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی، قادر به رساندن میکروارگانیزم‌های زنده به نقاط هدف در بدن میزبان، خواهد بود [۶]. علاوه بر این، فناوری درون‌پوشانی، رهایش کنترل شده میکروارگانیزم‌ها و هم‌چنین رهایش در شرایط موردنظر را نیز، قابل دسترس می‌نماید [۷]. رضایی مکرم و

همکاران (۲۰۱۰)، اثر درون‌پوشانی با آلژینات کلسیم بر قابلیت زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس<sup>۳</sup> (PTCC 1643) در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده در فواصل زمانی صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، را بررسی و نشان دادند که درون‌پوشانی باعث افزایش معنی‌دار ( $p \leq 0.05$ ) پایداری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده می‌شود به گونه‌ای که تعداد سلول‌های زنده پس از ۶۰ دقیقه در شرایط شبیه‌سازی شده معده و ۱۲۰ دقیقه در شرایط شبیه‌سازی شده روده، در نمونه‌های درون‌پوشانی شده  $6.5 \log \text{ cfu/g}$  در برابر  $2.3 \log \text{ cfu/g}$  برای سلول‌های آزاد (شاهد) بود [۸]. پورجعفر و همکاران (۲۰۱۱)، تاثیر درون‌پوشانی با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم به روش اکستروژن بر پایداری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ( $La5$ ) در شرایط شبیه‌سازی معده-روده را بررسی و نشان دادند که زنده‌مانی باکتری‌های درون‌پوشانی شده در شرایط شبیه‌سازی شده معده و هم‌چنین روده، بطور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های آزاد است [۹]. قبادی دانا و رشنوادی (۲۰۱۶)، تاثیر درون‌پوشانی تک لایه و دو لایه با آلژینات کلسیم بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ( $La5$ ) در آب گوجه‌فرنگی طی دوره نگهداری را بررسی کردند. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ( $La5$ ) به سه روش آزاد، درون‌پوشانی تک لایه و درون‌پوشانی دو لایه به آب گوجه‌فرنگی تلقیح گردید و نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نتایج نشان داد که زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ( $La5$ ) به صورت آزاد در حد استاندارد (حداقل  $10^6 \log \text{ cfu/g}$ ) سه هفته بوده و این میزان در حالت درون‌پوشانی شده به صورت دو لایه به شش هفته افزایش یافته است [۱۰]. سایبکی و بابو (۲۰۱۰)، زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس درون‌پوشانی شده با آلژینات سدیم (۴ درصد، وزنی/حجمی) و نشاسته ذرت (۲ درصد، وزنی/حجمی) به روش امولسیون در شرایط شبیه‌سازی شده معده را بررسی و نتیجه گرفتند که میزان سلول‌های زنده در نمونه‌های درون‌پوشانی شده  $1/71$  سیکل لگاریتمی و در نمونه شاهد  $4/94$  سیکل لگاریتمی، کاهش یافت [۱۱]. سلطانا و همکاران (۲۰۰۰)، باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را با آلژینات سدیم (۲ درصد، وزنی/حجمی) و پری‌بیوتیک نشاسته

1. *Lactobacillus*
2. *Bifidobacterium*

3. *Lactobacillus acidophilus*

ارزیابی کارایی درون پوشانی دولایه با آلزینات سدیم و کیتوزان به دو روش خشک کردن پاششی و امولسیون بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط شبیه‌سازی شده معده بود.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل محیط کشت MRS Broth<sup>۱</sup>، محیط کشت MRS Agar، سدیم هیدروکسید، سدیم کلرید، سیتریک اسید، سدیم سیترات، دی‌سدیم هیدروژن فسفات، سدیم دی‌هیدروژن فسفات از شرکت مرک (آلمان)، آلزینات سدیم، توپین ۸۰، کیتوزان، پپسین از شرکت سیگما-آلد ریچ (آلمان)، کلرید کلسیم، گلاسیال استیک اسید از شرکت ام پی بیومدیکالز (ایالات متحده آمریکا) و باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La5 (۱۶۴۳-PTCC)، به صورت خشک شده انجمادی از مرکز منطقه‌ای میکروارگانیسم‌های صنعتی (ایران) تهیه شدند.

### ۲-۲- کشت میکروبی

مقدار ۱ گرم از پودر لیوفیلیزه در ۹۹ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS Broth تلقیح شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. عمل جداسازی بیوماس در انتهای فاز لگاریتمی توسط سانتریفیوژ در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. پس از سانتریفیوژ، توده سلولی ته‌نشین شده از محیط کشت جدا گردید. سپس شستشوی بیوماس باکتریایی توسط سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد طی دو مرحله انجام و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا بکارگیری در فرآیند درون پوشانی نگه‌داری شد. سپس از محیط کشت براث بوسیله لوپ استریل یک کشت ختیریوی محیط کشت MRS Agar جامد تهیه گردید [۱۶].

### ۲-۳- منحنی رشد

به منظور رسم منحنی رشد باکتری، جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر در طول مدت کشت در مقایسه با محیط کشت اولیه بر اساس جدول مک‌فارلند در اسپکتروفوتومتر (Prekin 25 UV/VIS، ایالات متحده آمریکا) خوانده شد (نتایج، میانگین سه تکرار می‌باشند) [۱۷].

ذرت (۲ درصد، وزنی/حجمی)، به روش امولسیون درون پوشانی و بیان کردند که میزان زنده‌مانی باکتری پس از طی دوره زمانی ۳ ساعته در شرایط اسیدی با  $pH=2$ ، ۵ سیکل لگاریتمی کاهش می‌یابد [۱۲]. مکرم و همکاران (۲۰۰۹)، باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوسس<sup>۱</sup> را با آلزینات کلسیم، به روش امولسیون درون پوشانی و زنده‌مانی آن‌ها را تحت شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده با حالت آزاد (شاهد) مقایسه کردند. یافته‌های بدست آمده نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار پوشش‌دهی با آلزینات بر افزایش پایداری باکتری‌ها در شرایط اسیدی معده ( $pH=1/5$ ) بودند. از سوی دیگر تعداد سلول‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوسس درون پوشانی شده با دو لایه از آلزینات پس از ۶۰ دقیقه در محیط شبیه‌سازی شده روده ( $pH=7/25$ ) به ترتیب ۲/۳ سیکل لگاریتمی و ۲ سیکل لگاریتمی کاهش یافت، در صورتی که برای سلول‌های آزاد این کاهش به ترتیب ۶/۵ و ۷/۶ سیکل لگاریتمی گزارش شد [۱۳]. طالب زاده و همکاران (۲۰۱۴)، در مطالعه‌ای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را با آلزینات سدیم ۳ درصد (وزنی/حجمی)، کلرید کلسیم ۰/۱ مولار و کیتوزان ۰/۴ درصد (وزنی/حجمی) با روش امولسیون پوشش‌دهی کردند و میزان زنده‌مانی باکتری درون پوشانی شده را پس از آزمون حرارتی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه بررسی کردند. تعداد باکتری‌های زنده در نمونه‌های درون پوشانی شده با آلزینات سدیم، (آلزینات سدیم و کیتوزان) و نمونه شاهد به ترتیب ۲/۴۶، ۲/۱ و ۴/۸۹ سیکل لگاریتمی کاهش یافت [۱۴]. زاغری و همکاران (۲۰۲۰) اثرات درون پوشانی باکتری لاکتوباسیلوس روتسری<sup>۲</sup> با ترکیبات دیواره‌ای شلاک در سه غلظت ۱۶، ۱۷ و ۱۸ درصد (وزنی/حجمی) و آلزینات سدیم در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی) به روش خشک کردن بستر شناور بر زنده‌مانی سلول‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده را بررسی و نشان دادند که زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پوشش‌دهی شده با محلول آلزینات سدیم در غلظت ۱ درصد (وزنی/حجمی) پس از طی دوره زمانی ۱ ساعت در شرایط شبیه‌سازی شده معده با ( $pH=2$ ) به طور معنی‌داری ( $p \leq 0/05$ ) نسبت به پوشش‌های دیگر افزایش نشان داد [۱۵]. هدف از انجام این پژوهش،

1. *Lactobacillus rhamnosus*

2. *Lactobacillus reuteri*

3. De Man, Rogosa and Sharpe agar

## ۲-۴- درون پوشانی

درون پوشانی باکتری‌ها به دو روش امولسیون و خشک‌کن پاششی انجام شد.

### ۲-۴-۱- روش امولسیون

در این روش ابتدا ۳ گرم آلزینات سدیم، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونایز با استفاده از هم‌زن مغناطیسی کاملاً حل شد، سپس محلول بدست آمده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. محلول به مدت یک شب در دمای یخچال نگه‌داری تا ذرات آلزینات به خوبی آب جذب کنند. در ادامه محلول از یخچال خارج و پس از هم‌دم شدن با محیط، محلول با سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۵ دقیقه مخلوط گردید. برای تشکیل امولسیون مخلوط حاصله را به ۵۰۰ میلی لیتر روغن ذرت حاوی ۰/۲ درصد امولسیفایر تویین ۸۰ و به کمک هم‌زن مغناطیسی (Heidoph, Germany) با سرعت ۳۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه پراکنده گشت. سپس برای شروع ژلاتیناسیون، به آرامی کلرید کلسیم ۰/۱ مولار به محلول مورد نظر اضافه گردید (افزودن کلرید کلسیم طی ۲۰ دقیقه و در سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت)، سپس محلول به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ذکر شده باقی ماند تا ژلاتیناسیون و ته‌نشینی کپسول‌ها، تکمیل گردد. در نهایت به منظور جداسازی کپسول‌ها، از دکانتور و سانتریفیوژ (Sigma 3-18 K, Germany) با سرعت ۳۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد و کپسول‌های جدا شده با محلول آب مقطر شسته شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حدود ۱۰ ساعت نگه‌داری شدند که کاملاً سفت شوند (مکرم و همکاران، ۲۰۰۹). برای پوشش دهی لایه دوم، کیتوزان با وزن مولکولی پایین را در آب اسیدی شده با گلاسیال استیک اسید که pH آن در حدود ۳ می باشد حل شده و به غلظت نهایی ۰/۴ درصد (وزنی/حجمی) رسانده شد، سپس بوسیله افزودن سدیم هیدروکسید (Merck, Germany)، pH آن به حدود ۵/۷-۶ رسانیده شد. مخلوط حاصله بوسیله کاغذ واتمن صاف شد و در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، استریل گردید. ۱۵ گرم از کپسول‌های آلزینات کلسیم ساخته شده در مرحله قبله محلول حاصله اضافه گردید و با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۴۰ دقیقه هم زده شد تا عملیات پوشش دهی به طور کامل صورت گیرد، سپس کپسول‌های پوشش داده شده با کیتوزان بوسیله سانتریفیوژ با دور ۳۵۰ دور

در دقیقه جدا شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند [۱۸].

### ۲-۴-۲- روش خشک کردن پاششی

در این روش ابتدا ۲۰۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع حاوی باکتری‌ها در دور ۶۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سلول‌های باقی مانده در ته فالكون برداشته شد. سلول‌ها با محلول رینگر با یک چهارم قدرت در حجم برابر با سلول‌های باقی مانده در ته فالكون شسته شد. سلول‌های باقی مانده، در ۲۰۰ میلی لیتر محلول آلزینات ۳ درصد مخلوط و درون خشک‌کن پاششی آزمایشگاهی اسپری شد. دمای هوای ورودی ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد و دمای هوای خروجی ۷۵-۷۰ درجه سانتی‌گراد، جریان ورودی پمپ ۱۵ ml/min، سرعت پاشش ۵۰۰ لیتر بر ساعت و قطر نازل ۰/۷ میلی‌متر بود. کپسول‌های بدست آمده فاقد اتصالات عرضی با کلسیم بوده و برای ایجاد اتصالات، ۲۵۰ میلی گرم از کپسول‌های بدست آمده با ۲۵ میلی لیتر محلول کلسیم کلرید ۱ درصد با اولتراتوراکس در دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شد. کپسول‌های دارای اتصالات عرضی با سانتریفیوژ ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شدند. پوشش دهی کپسول‌ها با کیتوزان با استفاده از محلول ۰/۴ درصد کیتوزان و ۱ درصد اسید استیک (که با سود ۰/۱ مولار به pH برابر ۵/۲ رسانده شد) انجام شد. برای این منظور با استفاده از اولتراتوراکس در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند و کپسول‌های پوشش داده شده با کیتوزان از این محلول با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند [۱۹].

### ۲-۵- راندمان درون پوشانی (EE)<sup>1</sup>

برای شمارش باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها، ۱ گرم از کپسول‌های تهیه شده با ۹ میلی لیتر محلول استریل بافر فسفات (۰/۱M و pH=۷) پراکنده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شد تا کپسول‌ها به طور کامل حل و باکتری‌ها در محلول استریل بافر، آزاد شوند. سپس با استفاده از محیط کشت جامد MRS آگار و روش پورپلیت، باکتری‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. شمارش باکتری‌ها در ۳ تکرار انجام شد [۲۰]. برای کپسول‌هایی که با کیتوزان پوشش داده شدند، از محلول بافر سیترات سدیم و

1. Encapsulation efficiency (EE)

شبه‌سازی شده معده اضافه گردید، سپس مخلوط حاصله در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و شمارش پروبیوتیک‌های آزاد و درون‌پوشانی شده در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه، مطابق روش ذکر شده در ۳ تکرار انجام گرفت [۸، ۲۱].

## ۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

طراحی آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل و در ۳ تکرار انجام با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۲۱) انجام پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکندر سطح معنی‌داری ( $p \leq 0.05$ ) انجام گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل (ویرایش ۲۰۱۹) انجام شد.

## ۳- نتایج

### ۳-۱- منحنی رشد باکتری لاکتوباسیلوس

#### اسیدوفیلوس

باکتری‌ها در زمان ورود به فاز ثابت (پایان مرحله رشد لگاریتمی)، دارای بالاترین مقاومت در برابر تنش‌های محیطی بوده که مناسب‌ترین زمان برای جداسازی توده سلولی از محیط کشت می‌باشد [۲۲]. منحنی رشد بدست آمده (شکل ۱)، نشان‌داد که باکتری در ۱۲ ساعت اولیه در فاز تاخیری بوده پس از آن وارد مرحله رشد لگاریتمی و پس از ۴۰ تا ۴۲ ساعت پس از انکوباسیون، وارد فاز ثابت رشد می‌شود که بر این اساس، برهه زمانی بدست آمده برای جداسازی توده سلولی از محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت.

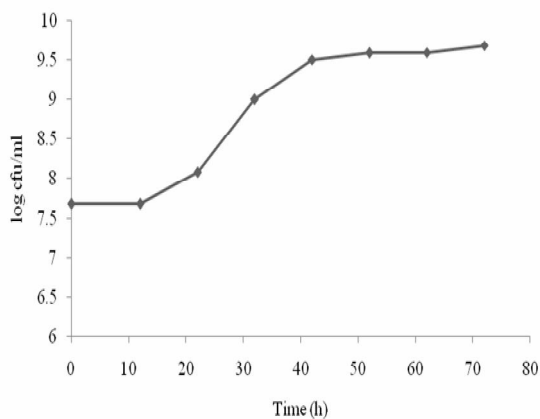


Fig 1 Growth curve of *Lactobacillus acidophilus*

دستگاه استومکر استفاده شد، به این صورت که ۱ گرم از کپسول‌ها با ۹ میلی‌لیتر از محلول بافر سدیم‌سیترات ( $0.1M$  و  $pH=6.3$ ) ترکیب کرده و تحت شرایط استریل و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه استومکر هم زده شد تا باکتری‌ها به طور کامل در محلول بافر آزاد شوند، سپس مطابق روش ذکر شده شمارش باکتری‌ها در ۳ تکرار انجام گرفت [۱۹]. راندمان درون‌پوشانی با استفاده از رابطه ۱ بدست آمد:

$$EE (\%) = N / N_0 \quad \text{رابطه ۱}$$

که در این رابطه  $N$  برابر با باکتری‌های زنده بدام افتاده در ریزپوشینه‌ها و  $N_0$  نشان دهنده تعداد اولیه باکتری‌های آزاد اولیه می‌باشد.

## ۲-۶- شکل ظاهری و اندازه ریزپوشینه‌ها

اندازه ریزپوشینه‌های تشکیل شده، به وسیله دستگاه‌سنجش‌گر ابعاد ذرات صورت گرفت. بدین منظور کپسول‌ها در آب دیونایز پراکنده شدند و بعد از کالیبره کردن دستگاه با آب دیونایز، ۲ میلی‌لیتر از محلول حاوی ریزپوشینه‌ها به دستگاه اضافه شد و نتایج بر اساس قطر میانگین ریزپوشینه‌ها گزارش شد. برای تعیین شکل ریزپوشینه‌ها، از میکروسکوپ نوری استفاده شد و هم‌چنین برای مشاهده سطح ریزپوشینه‌ها از میکروسکوپ الکترونی SEM<sup>۱</sup> استفاده شد. برای این کار ریزپوشینه‌ها به وسیله چسب دوطرفه بر روی صفحه مخصوص دستگاه تثبیت و به مدت ۲ دقیقه به وسیله طلا پوشش‌دهی شدند. مشاهده ریزپوشینه‌ها بوسیله میکروسکوپ الکترونی، با تابش الکترونی ۱۵ کیلوولت انجام گرفت [۱۳].

## ۲-۷- قابلیت زنده‌مانی باکتریدر شرایط

### شبه‌سازی شده معده

شرایط شبه‌سازی شده اسید معده با انحلال پپسین در محلول نمکی (۰/۵ درصد وزنی/حجمی NaCl) تا رسیدن به غلظت نهایی ۳ گرم در لیتر انجام شد. pH محلول با استفاده از اسیدکلریدریک (۰/۱ مولار) به ۱/۵ رسانده شد و محلول حاصله با میکروفیلتر  $0.22 \mu m$  استریل گردید. جهت تعیین میزان زنده‌مانی باکتری در شرایط شبه‌سازی شده معده، یک گرم از کپسول‌های تهیه شده ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون پروبیوتیک آزاد به طور جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر محلول

1. Scanning electron microscope (SEM)

قطر منافذ دستگاه خشک کن پاششی، ارتفاع دستگاه و تجمع ذرات و کلوخه‌های شدن آن‌ها پس از غوطه‌وری در محلول‌های کلسیم کلرید و کیتوزان باشد. (جدول ۱).

راندمان درون پوشانی به روش امولسیون نسبت به روش خشک کردن پاششی به طور معنی داری ( $p \leq 0/05$ ) بالاتر بود. بیشترین میزان زنده‌مانی باکتری‌های درون پوشانی شده در زمان‌های تحت بررسی قرارگیری تحت شرایط شبیه‌سازی شده معده، در روش امولسیون با  $8/49 \log \text{ cfu/gr}$  مشاهده گردید که اختلاف معنی داری ( $p \leq 0/05$ ) با روش خشک کردن پاششی و هم‌چنین تیمار شاهد نشان داد. نمونه‌های درون پوشانی به روش خشک کردن پاششی نسبت به نمونه‌های باکتری بدون پوشش (شاهد) زنده‌مانی بالاتری را داشته و کمترین مقدار زنده‌مانی با  $4/44 \log \text{ cfu/gr}$  در تیمار شاهد بدست آمد که نسبت به دو حالت تحت بررسی درون پوشانی، کاهش معنی داری ( $p \leq 0/05$ ) را نشان می‌دهد (جدول ۱).

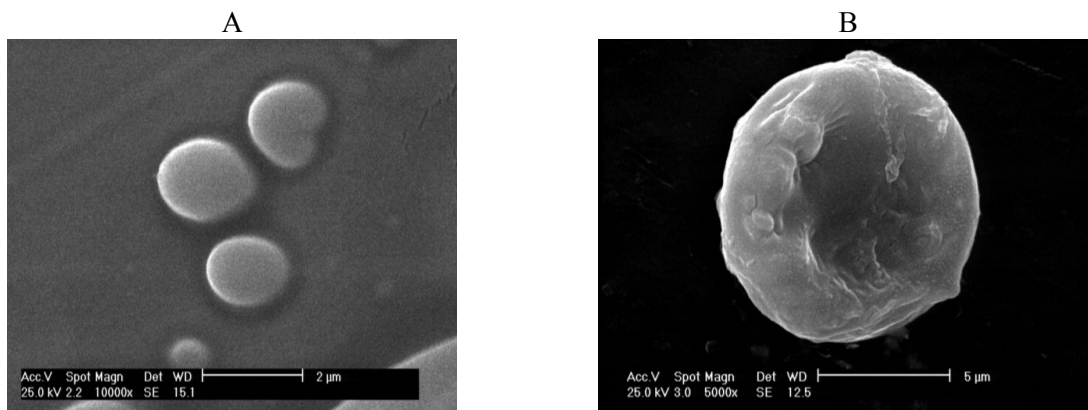


Fig 2 Images of microcapsules by emulsion methods(A) and spray drying method (B)

Table 1 Size, encapsulation efficiency and survival of encapsulated bacteria by emulsion and spray drying methods in simulated gastric conditions

survival of encapsulated bacteria by emulsion and spray drying methods in simulated gastric conditions (log CFU/g)	encapsulation efficiency(%)	microcapsule diameter ( $\mu\text{m}$ )	Encapsulation method
8.49 <sup>a</sup>	84.84 <sup>a</sup>	91.63 <sup>a</sup>	Emulsion
8.08 <sup>b</sup>	76.81 <sup>b</sup>	454.2 <sup>b</sup>	Spray drying
7.44 <sup>c</sup>			Control sample (free bacteria)

Different letters indicate a statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

ریزپوشینه‌های حاصل از روش‌های درون پوشانی تحت بررسی به همراه تیمار شاهد به مدت ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در معرض شرایط شبیه‌سازی شده معده اسید قرار گرفته و سپس میزان زنده‌مانی تعیین گردید. در شکل ۳ اثرات زمان قرارگیری

### ۳-۲- اندازه، شکل ظاهری، راندمان درون پوشانی و میزان زنده‌مانی ریزپوشینه‌ها حاصل از دو روش امولسیون و خشک کردن پاششی در شرایط شبیه‌سازی شده معده

ریزپوشینه‌های حاصل از دو روش امولسیون و خشک کردن پاششی، شکلی کروی- بیضوی داشته و نمونه‌های حاصل از روش خشک کردن پاششی در مقایسه با ریزپوشینه‌های حاصل از روش امولسیون، دارای سطحی چروکیده بودند. چروکیدگی مشاهده شده در ذرات حاصل از خشک کردن پاششی احتمالاً به دلیل افت ناگهانی فشار و تبخیر آب موجود در ماتریکس می‌باشد (شکل ۲). ابعاد ریزپوشینه‌های تولید شده به روش امولسیون به شکل معنی داری ( $p \leq 0/05$ ) کوچک‌تر از روش خشک کردن پاششی بوده است که این امر ممکن است به دلیل

### ۳-۳- اثر زمان قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی شده معده بر زنده‌مانی باکتری‌های درون پوشانی شده

زمان قراگیری ریزپوشینه‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده بر زنده‌مانی باکتری‌ها اثرات معنی‌داری دارد ( $p \leq 0.05$ ). نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان قرار گرفتن باکتری در معرض اسید، زنده‌مانی باکتری‌ها کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p \leq 0.05$ ). نتایج زنده‌مانی باکتری در زمان‌های تحت بررسی در پنج سطح آماری جداگانه در آزمون دانکن قرار گرفته و زنده‌مانی باکتری‌ها در تمامی زمان‌های تحت بررسی با هم اختلاف آماری معنی‌دار دارد ( $p \leq 0.05$ ). بیشترین و کمترین میزان زنده‌مانی باکتری‌ها به ترتیب در زمان‌های صفر و ۱۲۰ دقیقه می‌باشد که مقادیر ۱۰/۴۰ و ۵/۸۲ log cfu/gr را به خود اختصاص می‌دهند.

### ۳-۴- زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در

#### روش‌های درون‌پوشانی تحت بررسی در طول

#### زمان قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی شده معده

میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در روش‌های درون‌پوشانی تحت بررسی در طول زمان قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی شده معده در جدول ۲ آورده شده است.

**Table 2** Survival of *Lactobacillus acidophilus* by different encapsulation methods during exposure to simulated gastric conditions (log CFU/g)

Exposure time to simulated gastric conditions (min)					Encapsulation methods
120	90	61	30	0	
5.39 <sup>Ce</sup>	6.03 <sup>Cd</sup>	7.24 <sup>Cc</sup>	8.04 <sup>Cb</sup>	10.51 <sup>Ca</sup>	Control sample
6.15 <sup>Ae</sup>	7.44 <sup>Ad</sup>	8.61 <sup>Ac</sup>	9.84 <sup>Ab</sup>	10.45 <sup>Aa</sup>	Emulsion
5.91 <sup>Be</sup>	7.22 <sup>Bd</sup>	7.99 <sup>Bc</sup>	9.08 <sup>Bb</sup>	10.24 <sup>Ba</sup>	Spray drying

Different capital letters indicate a significance difference ( $p \leq 0.05$ ) among encapsulation methods and control sample and lower-case letters indicate a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) among exposure time to simulated gastric conditions

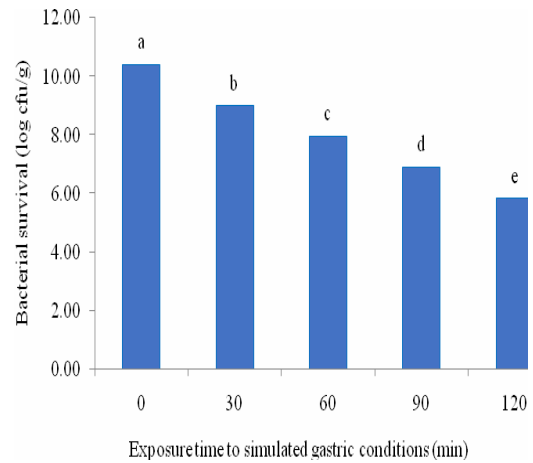
معده بهبود بخشید، به طوریکه تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس درون‌پوشانی شده به روش امولسیون با جمعیت اولیه ۱۰/۴۴ log cfu/g در شرایط شبیه‌سازی شده شیره معده پس از ۱۲۰ دقیقه به ۶/۱۴ log cfu/g رسید، که زنده‌مانی باکتری‌ها را در مقایسه با نوع آزاد، بهبود بخشید.

### ۳-۵- برهمکنش روش‌های درون‌پوشانی تحت

#### بررسی و زمان قراگیری در شرایط شبیه‌سازی

#### شده معده بر بقای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

در شرایط شبیه‌سازی شده معده بر زنده‌مانی باکتری‌های درون‌پوشانی شده در روش‌های درون‌پوشانی تحت بررسی، نشان داده شده است.



**Fig 3** Evaluation of the effects of exposure time to simulated gastric conditions on survival of *Lactobacillus acidophilus*. Different letters indicate a statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض شرایط شبیه‌سازی شده معده، زنده‌مانی باکتری در تمامی روش‌های درون‌پوشانی و هم‌چنین نمونه شاهد کاهش معنی‌داری ( $p \leq 0.05$ ) نشان می‌دهد. یافته‌های تحقیق نشان دادند که بیشترین میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ترتیب مربوط به نمونه‌های درون‌پوشانی به روش امولسیون، درون‌پوشانی به روش خشک‌کردن و باکتری‌های فاقد پوشش بوده است که اختلاف مشاهده شده بین این حالات باکتری، نیز در سطح ۹۵٪ معنادار بوده است ( $p \leq 0.05$ ). درون‌پوشانی به طور معنی‌داری زنده‌مانی ریزپوشینه‌ها را در شرایط شبیه‌سازی شده

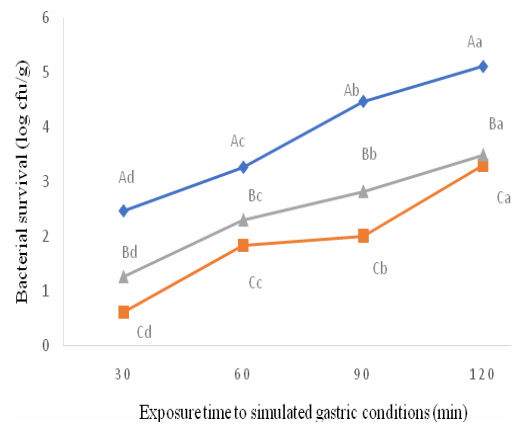
ساعت پس از انکوباسیون، وارد فاز ثابت رشدی شود که بر این اساس، برهه زمانی بدست آمده برای جداسازی توده سلولی از محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. روژ و همکاران (۲۰۱۰) منحنی رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را در محیط کشت MRS در دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی و نشان دادند که باکتری پس از ۴۸ ساعت وارد فاز ثابت رشد می‌شود [۲۳]. تفاوت موجود می‌تواند مربوط به شرایط محیطی و متفاوت بودن نوع سویه باکتری مورد آزمایش می‌باشد که بر سرعت رشد تاثیرگذار هستند [۲۴].

#### ۴-۲- بررسی ابعاد و راندمان درون پوشانی کپسول‌های تولید شده

میانگین قطر ذرات بدست آمده برای ریزپوشینه‌ها به روش امولسیون و خشک کردن پاششی به ترتیب حدود ۹۱/۶۳ و ۴۵۶/۲۰ میکرون بود که این ابعاد در مقایسه با نتایج ارایه شده از سوی یوسفی و همکاران (۲۰۱۶) کوچک‌تر بود [۲۵]. در نتایجی مشابه، قبادی و رشوادی (۲۰۱۶) اندازه ریزپوشینه‌های تولیدی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با آلژینات کلسیم را کمتر از ۱۰۰ میکرون گزارش نمودند [۱۰]. هم‌چنین مشخص شد که اندازه ریزپوشینه‌های حاصل از روش خشک کردن پاششی، بزرگتر از روش امولسیون است. در صورتی که این ریزپوشینه‌ها وارد مواد غذایی شوند، کوچک‌تر بودن آنان موجب تغییرات کمتری در بافت محصول و هم‌چنین مانع از بروز پدیده سنی شدن در ماده غذایی می‌شود [۲۶].

#### ۴-۳- بررسی زنده‌مانی و کاهش لگاریتمی باکتری‌های درون پوشانی شده

یافته‌های تحقیق نشان دادند که با افزایش زمان قرارگیری ریزپوشینه‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده، زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس کاهش معناداری نشان می‌دهد، بیشترین قابلیت زنده‌مانی را باکتری‌های درون پوشانی شده به روش امولسیون و کمترین پایداری مربوط به باکتری‌های فاقد پوشش (شاهد) بود. نمونه‌های درون پوشانی شده به روش خشک کردن پاششی نسبت به نمونه‌های فاقد پوشش (شاهد) زنده‌مانی بالاتر و در مقایسه با روش امولسیون، زنده‌مانی کمتری را داشتند. چاندرامولی و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که سلول‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ریزپوشینه در مقایسه با سلول‌های آزاد به خوبی در شرایط



**Fig 4** Interaction of different encapsulation methods and exposure time to simulated gastric conditions on survival of *Lactobacillus acidophilus* (◆Control, ◄ Spray drying, ■ Emulsion) Different capital letters indicate a significance difference ( $p \leq 0.05$ ) among encapsulation methods and control sample and lower-case letters indicate a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) among exposure time to simulated gastric conditions

در روش‌های درون پوشانی تحت بررسی، جمعیت باکتری‌های درون پوشانی شده به روش امولسیون با اختلاف معنی‌داری ( $p \leq 0.05$ ) نسبت به روش خشک کردن پاششی و تیمار شاهد در زمان‌های قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی شده معده (۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه) به ترتیب با ۰/۶۱، ۱/۸۳، ۲/۰۱ و ۳/۳، کمترین کاهش سیکل‌های لگاریتمی را نشان دادند. بیشترین کاهش سیکل لگاریتمی را نمونه‌های آزاد (شاهد) پس از ۱۲۰ دقیقه در معرض شرایط شبیه‌سازی شده معده با کاهش ۵/۱ سیکل لگاریتمی نشان دادند.

#### ۴- بحث

##### ۴-۱- منحنی رشد باکتری لاکتوباسیلوس

##### اسیدوفیلوس

باکتری‌ها در زمان ورود به فاز ثابت (پایان مرحله رشد لگاریتمی)، دارای بالاترین مقاومت در برابر تنش‌های محیطی بوده که مناسب‌ترین زمان برای جداسازی توده سلولی از محیط کشت می‌باشد [۲۲]. منحنی رشد بدست آمده (شکل ۱)، نشان داد که باکتری در ۱۲ ساعت اولیه در فاز تاخیری بوده پس از آن وارد مرحله رشد لگاریتمی و پس از ۴۰ تا ۴۲



## ۵- نتیجه گیری

نتایج حاصل از آزمایشات نشان دادند که زمان ۴۰ تا ۴۲ ساعت پس از تلقیح، پایان دوره رشد لگاریتمی و مناسبترین زمان جهت جداسازی توده سلولی باکتری لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* از محیط کشت، می‌باشد. ابعاد ریزپوشینه‌های حاصل از روش امولسیون به طور معنی‌داری کمتر از روش خشک‌کردن پاششی بود. شکل ظاهری ریزپوشینه‌ها کروی تا بیضی بود که نمونه‌های حاصل از روش خشک‌کردن پاششی دارای سطحی چروکیده بودند. بیشترین زنده‌مانی را نمونه‌های درون‌پوشانی شده به روش امولسیون با کاهش ۱/۹ سیکل لگاریتمی و پس از آن باکتری‌های درون‌پوشانی شده به روش خشک‌کردن پاششی با کاهش ۲/۴ سیکل لگاریتمی نشان دادند. کمترین میزان زنده‌مانی مربوط به نمونه شاهد (باکتری‌های آزاد) با کاهش ۳/۸۳ سیکل لگاریتمی بود. درون‌پوشانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* به روش امولسیون با ایجاد پایداری مناسب در برابر شرایط شبیه‌سازی شده معده، روشی مناسب جهت دستیابی به فرآورده‌های پروبیوتیک غنی شده با این باکتری می‌باشد.

## ۶- منابع

- [1] Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* 2001; 11(1-2):1-17.
- [2] Etchepare M, Raddatz GC, Flores EM. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT- Food Science and Technology* 2016; 65:511-517.
- [3] Juneja VK, Goktepe I, Ahmedna M. Probiotics in food safety and human health. CRC Press 2005.
- [4] Forghani S, Paighamberdust SH, Hesari J, Mokharam R. Evaluation of the effect of adding millet milk on the survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, yogurt-initiating bacteria and some physicochemical properties of probiotic yogurt. *Food science and technology* 2018; 76(15):207-219 [Persian].
- [5] O'sullivan MG, Thornton G, O'sullivan GC, Collins JK. Probiotic bacteria: myth or reality?. *Trends in food science & technology* 1992; 3: 309-314.

شبیه‌سازی شده معده زنده ماندند [۲۷]. لی و هو (۲۰۰۰) نشان دادند که درون‌پوشانی باعث افزایش پایداری باکتری‌های لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس*، بیفیدو و باکتریوم لانگوم در شرایط شبیه‌سازی شده معده شد [۲۸]. شل و بیرمن (۲۰۱۴)، هم‌چنین به این نتیجه رسیدند که ریزپوشینه‌هایی با اندازه بزرگتر تاثیر بیشتری در حفاظت از سلول‌ها تحت شرایط اسید و صفرا دارند [۲۹]. ماندال و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که درون‌پوشانی باعث افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری‌ها در pH برابر با ۱/۵ می‌شود. افضل و همکاران (۲۰۲۰) نیز گزارش کردند که درون‌پوشانی پروبیوتیک‌ها، زنده‌مانی آن‌ها را در شرایط شبیه‌سازی شده معده، چندین سیکل لگاریتمی بهبود می‌بخشد [۳۱]. برینکوئیس و همکاران (۲۰۱۱) با درون‌پوشانی لاکتوباسیلوس پلاناریوم با آلزینات کلسیم و کیتوزان، قابلیت زنده‌مانی این باکتری را در شرایط شبیه‌سازی شده معده بهبود دادند [۱۶]. در مجموع نتایج این پژوهش، راندمان درون‌پوشانی به صورت امولسیون به طور قابل توجهی نسبت به روش خشک کن پاششی بالاتر بوده که این امر ممکن است به دلیل ملایم‌تر بودن شرایط تولید نسبت به شرایط تولید با روش خشک‌کردن پاششی از نظر فرایند حرارتی باشد. باکتری‌های لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* به دو روش امولسیون و خشک‌کردن پاششی درون‌پوشانی شده در چهار زمان مختلف ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در معرض شرایط شبیه‌سازی شده معده قرار گرفتند. باکتری‌های درون‌پوشانی شده با باکتری‌های آزاد از نظر قابلیت زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده بررسی و نتایج نشان داد که بیشترین زنده‌مانی را نمونه‌های درون‌پوشانی شده به روش امولسیون و بعد از آن باکتری‌های درون‌پوشانی شده به روش خشک‌کردن پاششی داشته است و کمترین مقادیر مربوط به باکتری‌های آزاد بوده است که بیشترین کاهش سیکل لگاریتمی را نشان دادند. با افزایش مدت زمان قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی شده معده، تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* کاهش معنادار داشته است که منطبق با نتایج ارائه شده، کمترین کاهش را نمونه‌های درون‌پوشانی شده به روش امولسیون با کاهش ۱/۹ سیکل لگاریتمی و بعد از آن باکتری‌های درون‌پوشانی شده به روش خشک‌کردن پاششی با کاهش ۲/۴ سیکل لگاریتمی داشته است و بیشترین سیکل کاهش مربوط به باکتری‌های آزاد با کاهش ۳/۸۳ سیکل لگاریتمی بوده است.

- [15] Zaghari L, Basiri AR, Rahimi S. Preparation and characterization of double-coated probiotic bacteria via a fluid-bed process: a case study on *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Engineering* 2020; 16(9):1-8.
- [16] Brinques GB, Ayub MAZ. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering* 2011; 103(2): 123-128.
- [17] Sinha A, Dudani T, Ranganathan B. Protective effect of fortified skim milk as suspending medium for freeze drying of different Lactic acid bacteria. *Journal of food science* 1974; 39(3): 641-642.
- [18] Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H.C. 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.
- [19] Malmo C, La Storia A, Mauriello G. Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cells coated in alginate beads with chitosan by spray drying to use as a probiotic cell in a chocolate soufflé. *Food and Bioprocess Technology* 2013; 6(3): 795-805.
- [20] Ahmadi A, Motadavi A, Milani A, Mokaram R. Evaluation of survival of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* during the storage period of synbiotic yogurt. *Iranian Journal of Food Science and Technology Research* 2012; 1:271-278 [Persian].
- [21] Annan NT, Borza AD, Hansen LT. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International* 2008; 41(2): 184-193.
- [22] Meng XC, Stanton C, Fitzgerald GF, Daly C, Ross RP. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* 2006; 106: 1406-1416.
- [23] Rooj RK, Kimura Y, Buddington RK. Metabolites produced by probiotic *Lactobacilli* rapidly increase glucose uptake by Caco-2 cells. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 16-26.
- [24] Kahm M, AhrCampus R, Hasenbrink G. Grofit: Fitting Biological Growth Curves.
- [6] Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002; 82(1-4): 279-289.
- [7] Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition* 2001; 73(2): 365-373.
- [8] Mokaram R, Mortasavi SA, Habibi MB, Shahidi F, Chamiri M. Effect of calcium alginate microencapsulation on the viability of *Lactobacillus acidophilus* 1643 PTCC in simulated human gastrointestinal tract. *Iranian Food Science and Technology* 2010; 7(25): 51-60 [Persian].
- [9] Pourjafar H, homaioni H. Effect of microencapsulation with calcium alginate and resistant starch on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* (La5) in similar conditions of gastrointestinal fluid. *Journal of Veterinary Research* 2011; 66(4): 337-342 [Persian].
- [10] Ghobadi M, Reshnoadi T. Evaluation of the effect of bilayer encapsulation with calcium alginate on the survival of *Lactobacillus acidophilus* during tomato juice storage. *Novel food technologies* 2016; 4(14): 151-160 [Persian].
- [11] Sabikhi L, Babu R, Thompson DK, Kapila S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food Bioproc. Tech.* 2010; 3: 586-593.
- [12] Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International journal of food microbiology* 2000; 62(1-2): 47-55.
- [13] Mokarram RR, Mortazavi SA, Najafi MH, Shahidi F. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International* 2009; 42(8): 1040-1045.
- [14] Talebzadeh S, Sharifan A, Tarzi B, Panah HE. Assessment the possibility of probiotic jelly production using microencapsulation technique of *Lactobacillus acidophilus* bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)* 2014; 5(1): 143-154.

- calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66: 869–873.
- [29] Schell D, Beermann C. Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. *Food Research International* 2014; 62: 308.
- [30] Mandal S, Puniya AK, Singh K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal* 2006; 16(10):1190-1195.
- [31] Afzaal M, Saeed F, Saeed M, Ahmed A, Ateeq H, Nadeem MT, Tufail T. Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in pasteurized grape juice. *Journal of food processing and preservation* 2020; 44(3): 43-46.
- Journal of Statistical Software* 2010; 33: 1-21.
- [25] Yousefi H, Solaymanianzad S, Shahedi M. Microencapsulation of probiotics by emulsion method in the production of probiotic bread. *Nutrition sciences and food technology* 2016; 11(4): 99-106 [Persian].
- [26] Hansen LT, Allan-Wojtas PM, Jin YL, Paulson AT. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology* 2002; 19(1): 35-45.
- [27] Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, Jones M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods* 2004; 56(1): 27-35.
- [28] Lee KY, Heo T. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in



## Double layer encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* by emulsion and spray-drying techniques: study of characteristics and survival of microcapsules under simulated gastrointestinal conditions

Naseri Firouzmand, H. <sup>1</sup>, Bassiri, A. <sup>2\*</sup>, Sharifan, A. <sup>3</sup>

1. Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
2. Department of Food Technology and processing, Institute of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

### ABSTRACT

With increasing public awareness, the demand for healthy foods has increased. Low resistance of probiotic bacteria against adverse environmental conditions is one of the most important factors limiting the production and development of probiotic products. Encapsulation by enclosing probiotic cells can increase stability against limiting factors such as gastric acidity. In this study, the efficiency of double layer encapsulation with sodium alginate and chitosan by spray drying and emulsion methods on the stability of *Lactobacillus acidophilus* under simulated gastric conditions (pH=2) during 0, 30, 60, 90 and 120 minutes were examined. The size of the microcapsules was determined by the particle size analyzer and their morphology using a scanning electron microscope (SEM). The obtained growth curve showed that the bacteria enter a stationary growth phase 40 to 42 hours after inoculation. The size of the microcapsules obtained from the emulsion method were significantly ( $p \leq 0.05$ ) smaller than the spray drying method. The morphology of the microcapsules was spherical to oval, and the samples obtained from the spray drying method had a shranked surface. The highest survival was shown by emulsion encapsulated samples with a decrease of 1.9 logarithmic cycles, followed by spray dried encapsulated bacteria with a reduction of 2.4 logarithmic cycles. The lowest survival rate was related to the control sample (free bacteria) with a decrease of 3.83 logarithmic cycles. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* probiotic bacteria by the emulsion technique by creating appropriate stability under simulated gastric conditions is a suitable method to obtain probiotic products enriched with this bacterium.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2021/ 06/ 12  
Accepted 2021/ 11/ 10

#### Keywords:

*Lactobacillus acidophilus*,  
Double layer encapsulation,  
Emulsion,  
Spray drying.

**DOI:** 10.52547/fsct.18.121.19

**DOR:** 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7

\*Corresponding Author E-Mail:  
bassiri@irost.ir