مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

درون‌پوشانی دولایه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به روش‌های امولسیون و خشک‌کردن پاششی: بررسی ویژگی‌ها و زنده‌مانی ریزپوشینه‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده

حدیث ناصری فیروزوند[۱]، علیرضا بصیری[۲*]، انوشه شریفان[۳]

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

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

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

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰ /۰۳/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۹

کلمات کلیدی:

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس،

درون‌پوشانی دولایه،

امولسیون،

خشک‌کردن پاششی.

DOI: 10.52547/fsct.18.121.19

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7

* مسئول مکاتبات:

bassiri@irost.ir

چکیده

با افزایش سطح آگاهی جامعه، تقاضا برای مصرف غذاهای فراسودمند افزایش یافته است. مقاومت پایین باکتری‌های پروبیوتیک در برابر شرایط نامساعد محیطی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید و گسترش فرآورده‌های پروبیوتیک به شمار می‌آید. درون‌پوشانی با محصورکردن سلول‌های پروبیوتیک می‌تواند منجر به افزایش پایداری در برابر عوامل محدودکننده از جمله شرایط اسیدی معده گردد. در این پژوهش، کارایی درون‌پوشانی دولایه با آلژینات‌سدیم و کیتوزان به دو روش خشک‌کردن پاششی و امولسیون بر پایداری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در برابر شرایط شبیه‌سازی شده معده (pH=۲) طی زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بررسی گردید. اندازه ریزپوشینه‌ها توسطسنجش‌گر ابعاد ذراتو شکل ظاهری آنان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) تعیین گردیدند. منحنی رشد بدست‌آمده نشان داد که باکتری‌ها ۴۰ تا ۴۲ساعت پس از تلقیح وارد فاز ثابت رشد می‌شوند. ابعاد ریزپوشینه‌های حاصل از روش امولسیون به طور معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) 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 غنی‌شده با این باکتری می‌باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]

[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

۱- مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های 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*[1] و *بیفیدوباکتر*[2]، *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 صفراوی نیز از جمله عوامل مهم در کاهش زنده‌مانی این گروه از میکروارگانیسم‌ها هستند [۳]. برای مقابله، راهکارهایی از جمله استفاده از گونه‌های مقاوم به اسید، کنترل تولید اسید در فرآورده و افزودن سیستئین، یا چلاته‌کننده‌های اکسیژن مانند اسید آسکوربیک استفاده شده‌اند [٤]. تامین شرایطی برای بهبود زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی به وسیله ایجاد سد فیزیکی در برابر شرایط نامساعد محیطی راهی است که اخیرا مورد توجه زیادی قرار گرفته است [٥]. فناوری درون‌پوشانی پروبیوتیک‌ها در طی دهه گذشته پیشرفت چشم‌گیری داشته است. در این فناوری، دامنه گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها در داخل یک غشا نیمه تراوا و سازگار با میکروارگانیسم از نظر زیستی محصور شده که در کنار بهبود پایداری میکروارگانیسم‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی، قادر به رساندن میکروارگانیسم‌های زنده به نقاط هدف در بدن میزبان، خواهد بود [٦]. علاوه بر این، فناوری درون‌پوشانی، رهایش کنترل شده میکروارگانیسم‌ها و هم‌چنین رهایش در شرایط موردنظر را نیز، قابل دسترس می‌نماید [۷]. رضایی مکرم و همکاران (۲۰۱۰)، اثر درون‌پوشانی با آلژینات‌کلسیم بر قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[3] *(PTCC 1643)* در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده در فواصل زمانی صفر، ۳۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، را بررسی و نشان دادند که درون‌پوشانی باعث افزایش معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) پایداری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده می‌شود به گونه‌ای که تعداد سلول‌های زنده پس از ٦۰ دقیقه در شرایط شبیه‌سازی شده معده و ۱۲۰ دقیقه در شرایط شبیه‌سازی شده روده، در نمونه‌های درون‌پوشانی شده ٦/٥ log cfu/g در برابر log cfu/g ۲/۳ برای سلول‌های آزاد (شاهد) بود[۸]. پورجعفر و همکاران (۲۰۱۱)، تاثیر درون‌پوشانی با آلژینات‌کلسیم 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 (۲۰۱٦)، تاثیر درون‌پوشانی تک لایه و دو لایه با آلژینات‌کلسیم 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 ٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. نتایج نشان داد که زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La5)* به صورت آزاد در حد استاندارد (حداقل 10^{6}log cfu/g) سه هفته بوده و این میزان در حالت درون‌پوشانی شده به صورت دو لایه به شش هفته افزایش یافته است[۱۰].سابیکی و بابو (۲۰۱۰)، زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* درون‌پوشانی شده با آلژینات‌سدیم (٤ 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 درون‌پوشانی‌شده ۱/۷۱ سیکل لگاریتمی و در نمونه شاهد ٤/۹٤ سیکل لگاریتمی، کاهش یافت[۱۱]. سلتانا و همکاران (۲۰۰۰)، باکتری *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* را با آلژینات‌سدیم (۲ درصد، وزنی/حجمی) وپری‌بیوتیک نشاسته

1. *Lactobicillus*
2. *Bifidobacterium*
3. *Lactobacillus acidophilus*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

ذرت (۲ درصد، وزنی/حجمی)، به روش امولسیون درون‌پوشانی و بیان کردند که میزان زنده‌مانی باکتری پس از طی دوره زمانی ۳ ساعته در شرایط اسیدی با pH=۲، ۵ سیکل لگاریتمی کاهش‌می‌یابد[۱۲]. مکرم و همکاران (۲۰۰۹)، باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسس*[1] را با آلژینات‌کلسیم، به روش امولسیون درون‌پوشانی 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 آلژینات بر افزایش پایداری باکتری‌ها در شرایط اسیدی معده (pH=۱/۵) بودند. از سوی دیگر تعداد سلول‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسس* درون‌پوشانی شده با دو لایه از آلژینات پس از ۶۰ دقیقه در محیط شبیه‌سازی شده روده (pH= ۷/۲۵) به ترتیب ۲/۳ سیکل لگاریتمی و ۲ سیکل لگاریتمی کاهش یافت، در صورتی‌که برای سلول‌های آزاد این کاهش به ترتیب ۶/۵ و۷/۶ سیکل لگاریتمی گزارش شد[۱۳]. طالب زاده و همکاران (۲۰۱۴)، در مطالعه‌ای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را با آلژینات‌سدیم ۳ درصد (وزنی/حجمی)، کلریدکلسیم ۰/۱ مولار و کیتوزان ۰/۴درصد (وزنی/حجمی) با روش امولسیون پوشش‌دهی کردند و میزان زنده‌مانی باکتری درون‌پوشانی شده را پس از آزمون حرارتی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه بررسی کردند. تعداد باکتری‌های زنده در نمونه‌های درون‌پوشانی شده با آلژینات سدیم، (آلژینات 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 درون‌پوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری*[2] با ترکیبات دیواره‌ای شلاک در سه غلظت ۱۶، ۱۷و ۱۸درصد (وزنی/حجمی) و آلژینات‌سدیم در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵درصد (وزنی/حجمی) به روش خشک‌کردن بستر شناور بر زنده‌مانی سلول‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده را بررسی و نشان دادند که زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پوشش‌دهی شده با محلول آلژینات سدیم در غلظت ۱ درصد (وزنی/ حجمی) پس از طی دوره زمانی ۱ ساعت در شرایط شبیه‌سازی شده معده با (pH=۲) به طور معنی‌داری (p≤۰/۰۵) نسبت به پوشش‌های دیگر افزایش نشان داد[۱۵]. هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی کارایی درون‌پوشانی دولایه با آلژینات‌سدیم و کیتوزان به دو روش خشک‌کردن پاششی و امولسیون بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در شرایط شبیه‌سازی شده معده بود.

1. *Lactobacillus rhamnosus*
2. *Lactobacillus reuteri*

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل محیط کشت MRS Broth[3]، محیط کشت MRS Agar، سدیم‌هیدروکسید، سدیم‌کلرید، سیتریک‌اسید، سدیم‌سیترات، دی‌سدیم‌هیدروژن‌فسفات، سدیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات از شرکت مرک (آلمان)، آلژینات‌سدیم، توین ۸۰، کیتوزان، پپسین از شرکت سیگما- آلدریچ (آلمان)، کلریدکلسیم، گلایسیال‌استیک اسید از شرکت ام پی بیومدیکالز (ایالات متحده آمریکا) و باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*La5(PTCC -۱۶۴۳)، 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 درون‌پوشانی نگه‌داری شد.سپس از محیط کشت براث بوسیله لوپ استریل یک کشت خطیروی 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 اسپکتروفتومتر Prekin (25 UV/VIS، ایالات متحده آمریکا)خوانده شد (نتایج، میانگین سه تکرار می‌باشند)[۱۷].

3. De Man, Rogosa and Sharpe agar

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

۲-٤- درون‌پوشانی

درون‌پوشانی باکتری‌ها به دو روش امولسیون و خشک‌کن پاششی انجام شد.

۲-٤-۱-روش امولسیون

در این روش ابتدا ۳ گرم آلژینات‌سدیم، در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونایز با استفاده از هم‌زن مغناطیسی کاملا 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 آلژینات به خوبی آب جذب کنند. در ادامه محلول از یخچال خارج و پس از همدما شدن با محیط، محلول با سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۵ دقیقه مخلوط گردید. برای تشکیل امولسیون مخلوط حاصله را به ۵۰۰ میلی‌لیتر روغن ذرت حاوی ۰/۲ درصد امولسیفایر توین 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 کلریدکلسیم ۰/۱ مولار به محلول مورد نظر اضافه گردید (افزودن کلریدکلسیم 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 جداشده با محلول آب مقطر شسته شده و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد حدود ۱۰ ساعت نگه‌داری شدند که کاملا سفت شوند (مکرم و همکاران، ۲۰۰۹). برای پوشش‌دهی لایه دوم، کیتوزان با وزن مولکولی پایین را در آب اسیدی شده با گلایسیال استیک اسید که pH آن در حدود ۳ می باشد حل شده و به غلظت نهایی ۰/٤ درصد (وزنی/حجمی) رسانده شد، سپس بوسیله افزودن سدیم‌هیدروکسید (Merck, Germany)، pH آن به حدود ٦-۵/۷ 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 آلژینات‌کلسیم ساخته شده در مرحله قبلبه محلول حاصله اضافه گردید و با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ٤۰ دقیقه هم زده شد تا عملیات پوشش‌دهی 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 ٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند[۱۸].

۲-٤-۲- روش خشک‌کردن پاششی

در این روش ابتدا ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاوی باکتری‌ها در دور ٦۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سلول‌های باقی‌مانده در ته فالکون برداشته شد. سلول‌ها با محلول رینگر با یک چهارم قدرت در حجم برابر با سلول‌های باقی‌مانده در ته فالکون شسته شد. سلول‌های باقی‌مانده، در ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول آلژینات ۳ درصد مخلوط و درون خشک‌کن پاششی آزمایشگاهی اسپری شد. دمای هوای ورودی ۱٤۰ درجه سانتی‌گراد و دمای هوای خروجی ۷۵-۷۰ درجه سانتی‌گراد، جریان ورودی پمپ ml/min ۱۵، 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 میلی‌گرم از کپسول‌های بدست آمده با ۲۵ میلی‌لیتر محلول کلسیم‌کلرید ۱ درصد با اولتراتوراکس در دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شد. کپسول‌های دارای اتصالات عرضی با سانتریفیوژ ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شدند. پوشش‌دهی کپسول‌ها با کیتوزان با استفاده از محلول ۰/٤ درصد کیتوزان و ۱ درصد اسید استیک (که با سود ۰/۱ مولار به pH برابر با 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 ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند[۱۹].

۲-۵- راندمان درون‌پوشانی (EE)[1]

برای شمارش باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها، ۱ گرم از کپسول‌های تهیه شده با ۹ میلی‌لیتر 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 وباکتری‌ها 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 سیترات‌سدیم و

1. Encapsulation efficiency (EE)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

دستگاه استومکر استفاده شد، بـه ایـن صـورت کـه ۱ گـرم از کپـسول‌هـا بـا ۹ میلـی‌لیتـر از محلـول بـافر سـدیم‌سـیترات (۰/۱M و۶/۳=pH) 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 ذکـر شده شمارش باکتری‌ها در ۳ تکرار انجام گرفت [۱۹].راندمان درون‌پوشانی با استفاده از رابطه ۱ بدست آمد:

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

که در این رابطه N برابر با باکتری‌هـای زنـده بـدام افتـاده در ریزپوشینه‌ها و N_0 نشان دهنده تعداد اولیـه بـاکتری‌هـای آزاد اولیه می‌باشد.

۲-۶- شکل ظاهری و اندازه ریزپوشینه‌ها

اندازه ریزپوشینه‌های تشکیل شده، به وسیله دستگاهسنجش‌گر ابعاد ذراتصورت گرفت. بدین منظور کپسول‌ها در آب دیونایز پراکنده شدند و بعد از کالیبره کردن دستگاه بـا آب دیونـایز، ۲ میلی‌لیتر از محلول حاوی ریزپوشینه‌ها به دسـتگاه اضـافه شـد ونتایج بر اساس قطر میانگین ریزپوشینه‌ها گزارش شـد. بـرای تعیین شکل ریزپوشینه‌ها، از میکروسکوپ نوری استفاده شد و هم‌چنین برای مشاهده سـطح ریزپوشـینه‌هـا از میکروسـکوپ الکترونی SEM[1] استفاده شد. برای این کار ریزپوشـینه‌هـا بـه وسیله چسب دوطرفه بر روی صفحه مخصوص دستگاه تثبیت و به مدت ۲ دقیقه به وسیله طلا پوشش‌دهی شـدند. مـشاهده ریزپوشینه‌ها بوسیله میکروسکوپ الکترونی، با تابش الکترونی ۱۵ کیلوولت انجام گرفت[۱۳].

۲-۷- قابلیت زنده‌مانی باکتریدر شرایط شبیه‌سازی شده معده

شرایط شبیه‌سازی شده اسید معده با انحلال پپسین در محلـول نمکی (۰/۵ درصد وزنی/حجمی NaCl) تا رسیدن به غلظـت نهایی ۳ گرم در لیتـر انجـام شـد. pH محلـول بـا اسـتفاده از اسیدکلریدریک (۰/۱ مـولار) بـه ۱/۵ رسـانده شـد و محلـول حاصله با میکروفیلتر ۰/۲۲μm استریل گردیـد. جهـت تعیـین میزان زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده معـده، یـک گرم از کپسول‌های تهیـه شـدهو ۱ میلـی‌لیتـر از سوسپانـسیون پروبیوتیـک آزاد بـه طـور جداگانـه در ۱۰ میلـی‌لیتـر محلـول شبیه‌سازی شده معده اضافه گردید، سپس مخلوط حاصـله در دمـای ۳۷ درجـه سـانتی‌گـراد گرمخانـه‌گـذاری و شـمارش پروبیوتیک‌های آزاد و درون‌پوشانی شده در زمـان‌هـای صـفر، 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 کـاملا تـصادفی بـه صـورت فاکتوریـل و در ۳ تکـرار انجـام بـا اسـتفاده از نـرم افـزار SPSS(ویرایش ۲۱)انجام پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنـه‌ای دانکنـدر سـطح معنـی‌داری ($p\leq$۰/۰۵) انجـام گرفـت. رسـم نمودارهـا بـا اسـتفاده از نـرم‌افـزار اکسل(ویرایش ۲۰۱۹) انجام شد.

۳- نتایج

۳-۱- منحنی رشد باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

باکتری‌ها در زمـان ورود بـه فـاز ثابـت (پایـان مرحلـه رشـد لگاریتمی)، دارای بالاترین مقاومت در برابر تنش‌های محیطـی بوده که مناسب‌ترین زمـان بـرای جداسـازی تـوده سـلولی از محیط کشت می‌باشد[۲۲]. منحنی رشد *بدست آمده* (شکل ۱)، نشان‌داد که باکتری در ۱۲ ساعت اولیه در فـاز تـاخیری بـوده پس از آن وارد مرحلـه رشـد لگـاریتمی و پـس از ۴۰ تـا ۴۲ ساعت پس از انکوباسیون، وارد فاز ثابت رشد می‌شود که بـر این اساس، برهه زمـانی بدسـت آمـده بـرای جداسـازی تـوده سلولی از محیط کشت مورداستفاده قرار گرفت.

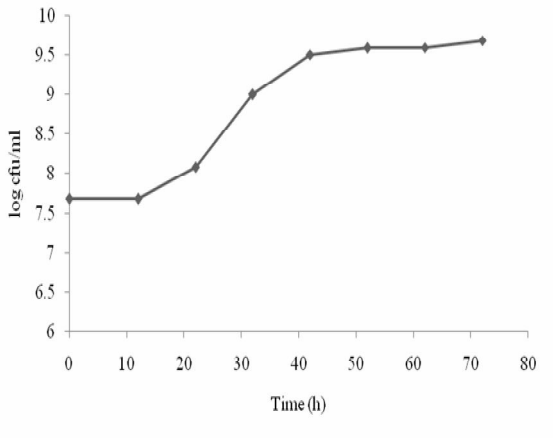

Fig 1 Growth curve of *Lactobacillus acidophilus*

1. Scanning electron microscope (SEM)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

۳-۲- اندازه، شکل ظاهری، راندمان درون‌پوشانی و میزان زنده‌مانی ریزپوشینه‌ها حاصل از دو روش امولسیون و خشک‌کردن پاششی در شرایط شبیه‌سازی شده معده

ریزپوشینه‌های حاصل از دو روش امولسیون و خشک‌کردن پاششی، شکلی کروی- بیضوی داشته ونمونه‌های حاصل از روش خشک‌کردن پاششی در مقایسه با ریزپوشینه‌های حاصل از روش امولسیون، دارای سطحی چروکیده بودند. چروکیدگی مشاهده شده در ذرات حاصل از خشک‌کردن پاششی احتمالا به دلیل افت ناگهانی فشار و تبخیر آب موجود در ماتریکس می‌باشد (شکل ۲). ابعاد ریزپوشینه‌های تولید شده به روش امولسیون به شکل معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) کوچک‌تر از روش خشک‌کردن پاششی بوده است که این امر ممکن است به دلیل قطر منافذ دستگاه خشک‌کن پاششی، ارتفاع دستگاه و تجمع ذرات و کلوخه‌ای شدن آن‌ها پس از غوطه‌وری در محلول‌های کلسیم‌کلرید و کیتوزان باشد. (جدول ۱).

راندمان درون‌پوشانی به روش امولسیون نسبت به روش خشک‌کردن پاششی به طور معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) بالاتر بود. بیشترین میزان زنده‌مانی باکتری‌های درون‌پوشانی شده در زمان‌های تحت بررسی قرارگیری تحت شرایط شبیه‌سازی شده معده، در روش امولسیون با ۸/۴۹ log cfu/gr مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$) با روش خشک‌کردن پاششی و هم‌چنین تیمار شاهد نشان داد.نمونه‌های درون‌پوشانی به روش خشک‌کردن پاششی نسبت به نمونه‌های باکتری بدون پوشش (شاهد) زنده‌مانی بالاتری را داشته و کمترین مقدار زنده‌مانی با ۷/۴۴ log cfu/grدر تیمار شاهد بدست آمد که نسبت به دو حالت تحت بررسی درون‌پوشانی، کاهش معنی‌داری ($p\leq۰/۰۵$)را نشان می‌دهد (جدول ۱).

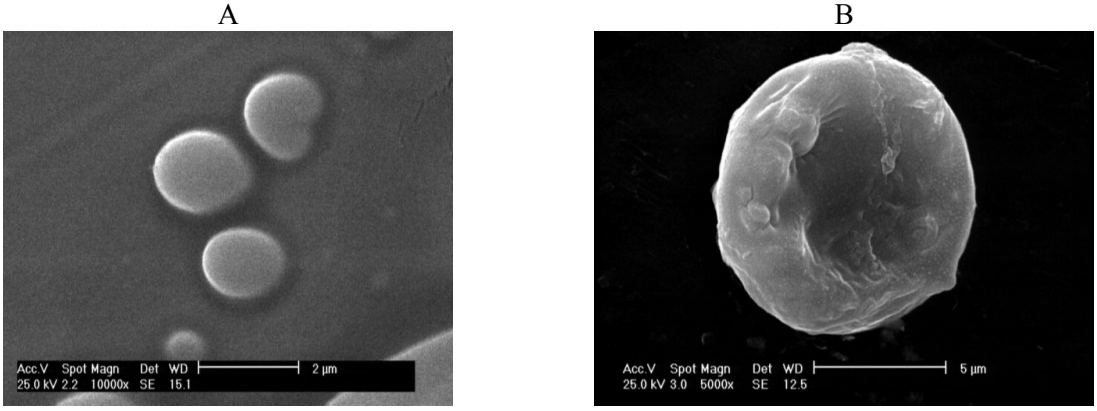

Fig 2 Images of microcapsules by emulsion methods(A) and spray drying method (B)

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(µm)	Encapsulation method
8.49[a]	84.84[a]	91.63[a]	Emulsion
8.08[b]	76.81[b]	454.2[b]	Spray drying
7.44[c]			Control sample (free bacteria)

Different letters indicate a statistically significant difference ($p\leq0.05$).

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

ریزپوشینه‌های حاصل از روش‌های درون‌پوشانی 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

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

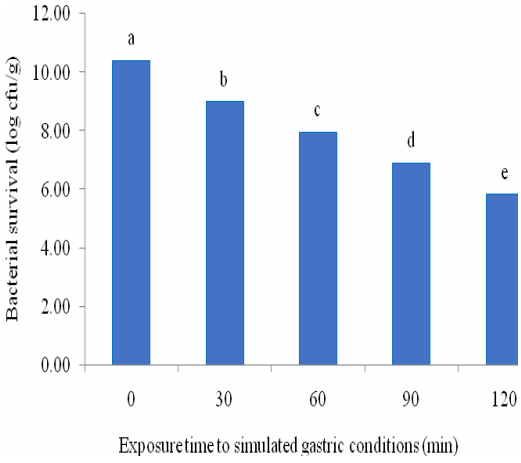

Fig 3 Evaluation of the effects of exposure time to simulated gastric conditions on survival of *Lactobacillus acidophilus*
Different letters indicate a statistically significant difference (p≤0.05).

زمان قراگیری ریزپوشینه‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده بر زنده‌مانی باکتری‌ها اثرات معنی‌داری دارد (p≤۰/۰۵). نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان قرار گرفتن باکتری در معرض اسید، زنده‌مانی باکتری‌ها کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (p≤۰/۰۵). 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≤۰/۰۵). 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)					
120	90	61	30	0	Encapsulation methods
5.39^{Ce}	6.03^{Cd}	7.24^{Cc}	8.04^{Cb}	10.51^{Ca}	Control sample
6.15^{Ae}	7.44^{Ad}	8.61^{Ac}	9.84^{Ab}	10.45^{Aa}	Emulsion
5.91^{Be}	7.22^{Bd}	7.99^{Bc}	9.08^{Bb}	10.24^{Ba}	Spray drying

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

با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض شرایط شبیه‌سازی شده معده، زنده‌مانی باکتری در تمامی روش‌های درون‌پوشانی و هم‌چنین نمونه شاهد کاهش معنی‌داری (p≤۰/۰۵) 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≤۰/۰۵). درون‌پوشانی به طور معنی‌داری زنده‌مانی ریزپوشینه‌ها را در شرایط شبیه‌سازی شده معده بهبود بخشید، به طوریکه تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس* درون‌پوشانی شده به روش امولسیون با جمعیت اولیه ۱۰/۴۴ cfu/glog 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 اسیدفیلوس*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

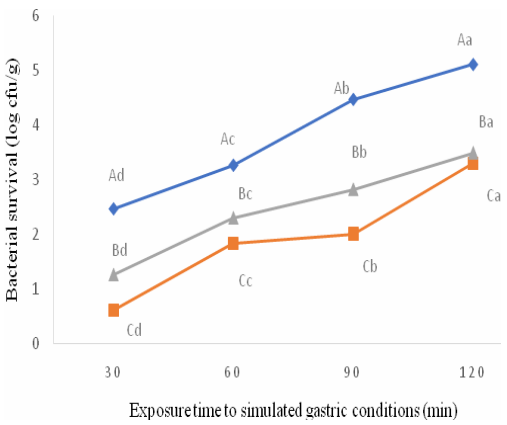

Fig 4 Interaction of different encapsulation methods and exposure time to simulated gastric conditions on survival of *Lactobacillus acidophilus* (◆Control ،◀Spray drying ،■Emulsion) Different capital letters indicate a significance difference (p≤0.05) among encapsulation methods and control sample and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

در روش‌های درون‌پوشانی تحت بررسی، جمعیت باکتری‌های درون‌پوشانی شده به روش امولسیون با اختلاف معنی‌داری (p≤۰/۰۵) نسبت به روش خشک‌کردن 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.

٤- بحث

٤-١- 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 ٤٠ تا ٤٢ ساعت پس از انکوباسیون، وارد فاز ثابت رشدمی‌شود که بر این اساس، برهه زمانی بدست آمده برای جداسازی توده سلولی از محیط کشت مورداستفاده قرار گرفت.روژ و همکاران (۲۰۱۰) منحنی رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را درمحیط* کشت MRS در دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی و نشان دادند که باکتری پس از ٤٨ 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[٢٤].

٤-٢-بررسی ابعاد و راندمان درون‌پوشانی کپسول‌های تولید شده

میانگین قطر ذرات بدست آمده برای ریزپوشینه‌ها به روش امولسیون و خشک‌کردن پاششی به ترتیب حدود ۹۱/۶۳ و ٤٥٦/٢٠ میکرون بودکه این ابعاد در مقایسه با نتایج ارایه شده از سوی یوسفی و همکاران (۲۰۱٦) کوچک‌تر بود[۲۵]. در نتایجی مشابه، قبادی و رشنوادی(۲۰۱٦) اندازه ریزپوشینه‌های تولیدی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با آلژینات‌کلسیم را کمتر از ۱۰۰ میکرون گزارش نمودند[۱۰]. هم‌چنین مشخص شد که اندازه ریزپوشینه‌های حاصل از روش خشک‌کردن 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 شنی‌شدن در ماده غذایی می‌شود [٢٦].

٤-٣- بررسی زنده‌مانی و کاهش لگاریتمی باکتری‌های درون‌پوشانی 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 درون‌پوشانی شده به روش امولسیون و کمترین پایداری مربوط به باکتری‌های فاقد پوشش (شاهد) بود. نمونه‌های درون‌پوشانی شده به روش خشک‌کردن پاششی نسبت به نمونه‌های فاقد پوشش (شاهد) زنده‌مانی بالاتر و در مقایسه با روش امولسیون، زنده‌مانی کمتری را داشتند. چاندرامولی و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کردند که سلول‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشینه در مقایسه با سلول‌های آزاد به خوبی در شرایط

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

شبیه‌سازی شده معده زنده ماندند[۲۷]. لی و هو (۲۰۰۰) نشان دادند که درون‌پوشانی باعث افزایش پایداری باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم 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 pHبرابر 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 وهمکاران (۲۰۱۱) با درون‌پوشانی لاکتوباسیلوس پلانتاریوم با آلژینات‌کلسیم 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 با روش امولسیون با کاهش ۱/۹ سیکل لگاریتمی و بعد از آن باکتری‌های درون‌پوشانی شده به روش خشک‌کردن پاششی با کاهش ۲/٤ سیکل لگاریتمی داشته است و بیشترین سیکل کاهش مربوط به باکتری‌های آزد با کاهش ۳/۸۳ سیکل لگاریتمی بوده است.

۵- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از آزمایشات نشان دادند که زمان ٤۰ تا ٤۲ 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 ۲/٤ 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 غنی‌شده با این باکتری می‌باشد.

٦- 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]

[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

[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 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, Thompkinson 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.

[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 gastro-intestinal 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]

[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

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. [1], Bassiri, A. [2*], Sharifan, A. [3]

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 shrinked 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-06-25]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.13.7]

[DOI: 10.52547/fsct.18.121.19]