ارتقا خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس به‌وسیله ریزپوشانی اکستروژن دولایه با آلژینات سدیم و صمغ زودو

سعید سخاوتی زاده [۱]، محمود امین لاری [۲*]، حمیدرضا قیصری [۳]

۱دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، فارس، ایران و مربی، عضو هیئت‌علمی بخش تحقیقات فنی مهندسی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی، شیراز، ایران

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

۳دانشیار، 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 می‌شوند کاربرد باکتری های پروبیوتیک ،بدلیل حساسیت حرارتی بسیار محدود است. ریزپوشانی باکتریهای پروبیوتیک به‌عنوان یک روش مناسب جهت کاهش آسیب حرارتی پیشنهاد می‌گردد. ریزپوشانی روش‌های مختلفی دارد که یکی از این روش‌ها اکستروژن می باشد. این روش در مقایسه با سایر روش‌ها، آسیب کمتری را به باکتری وارد می‌کند. اکستروژن دولایه با استفاده از یک هیدروکلوئید با وزن مولکولی بالا ازجمله صمغ زودو، می‌تواند از آسیب حرارتی ممانعت به عمل آورد. در این تحقیق ریزپوشانی به روش اکستروژن بر روی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس[۱] به‌صورت دولایه انجام شد. لایه اول سدیم آلژینات و لایه دوم صمغ زودو، در چهار غلظت (۰، ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸درصد) بود. به‌منظور انتخاب بهترین درصد صمغ در ریزپوشانی، از نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شد و آزمون‌های بافتی شامل سختی ، صمغیت، فنریت و قابلیت جویدن و مولفه های رنگ L^*,a^*,b^* و BI بر روی دانک‌ها صورت پذیرفت. پس از انتخاب بهترین تیمار، آزمون‌های ماندگاری حرارتی، ماندگاری در شرایط اسیدی به همراه نمک همچنین تولید اسید و رشد باکتری آزاد و ریزپوشانی شده در محیط‌کشت MRS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیقات نشان داد که صمغ زودو۰/۸٪ بکار رفته به‌عنوان لایه دوم،می تواند باعث تغییر معنادار در قطر لایه خارجی گردد. ولی افزایش غلظت زودو نتوانست باعث افزایش درمولفه سختی گردد. اگرچه تنها غلظت ۰/۲٪ با بقیه دارای اختلاف معنادار بود. ($p<۰/۰۵$). غلظتهای (۰/٦و۰/۸درصد) زودو باعث افزایش مولفه صمغیت گردید ولی بر روی مولفه های دیگر تاثیری نداشت. در دمای ۷۲ $^{\circ}$ C تعداد باکتری ریزپوشانی شده تا ۱۰ دقیقه ثابت ماند و در دقیقه ۵، تعداد آن حدود ۵ log CFU/ml بیشتر از باکتری آزاد بود. ($p<۰/۰۵$) . میزان ایجاد اسید و رشد باکتری در دانک نسبت به باکتری آزاد کندتر بود. باکتری ریزپوشانی شده دارای ماندگاری میکروبی ۲ log CFU/ml بیشتر درغلظت نمک ۱۵درصد (pH =۱/۵) 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 زنده‌ای هستند که اگر در مقادیر کافی مصرف شوند باعث بروز برخی خصوصیات سلامت بخشی در مصرف کننده می شوند.این خصوصیات عمدتا به دلیل بهبود فلورمیکروبی روده است، گونه های باکتریایی از جنس لاکتوباسیلوس[1]، بیفیدوباکتریوم[2] و باسیلوس[3]، و به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و برای تهیه غذاهای آماده به کار می روند [۱].

یکی از گونه‌های مهم پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس می‌باشد. این باکتری می‌تواند در روده به‌عنوان یک پروبیوتیک زنده بماند و تشکیل کلنی بدهد همچنین مقاوم به صفرا بوده و ضمن عبور از دستگاه گوارش انسان زنده می‌ماند و باعث تحریک سیستم ایمنی بدن نمی‌شود. لذا در موارد متعددی ازجمله پیشگیری و درمان اسهال در بچه‌ها، درمان آلرژی وغیره مورداستفاده قرار می‌گیرد [٤-۲]. متأسفانه به دلیل اینکه بعضی محصولات غذایی دارای پروسه‌های حرارتی در زمان بسته‌بندی (پرکردن داغ) هستند; استفاده از این باکتری در این نوع غذاها کاربردی ندارد. چراکه حرارت باعث از بین رفتن این باکتری می‌شود، لذا جهت رفع این نقیصه دو روش پیشنهاد می‌گردد که یکی اضافه کردن پروبیوتیکها، بعد از پروسه حرارتی است که این امر شانس آلودگی ثانویه را بالا می‌برد [۱] و روش دوم استفاده از تکنیک‌هایی است که مقاومت حرارتی باکتری را بالا ببردکه یکی از این تکنیک‌ها ریزپوشانی است. نتایج مطالعات بر روی ماندگاری پروبیوتیکهای لاکتوباسیلوس پلانتاروم[4]، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس[5]، لاکتوباسیلوس پاراکازیی[6]، لاکتوباسیلوس رامنوسوس[7]، بیفیدوباکتریوم لانگوم[8]، لاکتوباسیلوس سالیواریوس[9]، بیفیدوباکتریوم لاکتیس[10]بیوتایپ Bi-07، Bi-O4 در پروسه‌های حرارتی نشان داد که در دمای $65^{o}C$ به مدت ۳۰ ۳۰ دقیقه، باکتری‌های پروبیوتیک آزاد از کاهشی معادل log CFU/ml ٦/٧٤ در مقایسه با باکتری‌های ریزپوشانی شده که کاهشی برابر log CFU/ml ٤/١٧ داشتند را دارا بودند [٥]. ازجمله مزایای ریزپوشانی می‌توان به تثبیت ترکیبات مواد غذایی، کنترل واکنش‌های اکسیداتیو، مهار یا کنترل رهاسازی پروبیوتیک‌ها، پوشش دادن طعم و عطر نامناسب و ایجاد مانع بین مواد حساس و محیط اطراف اشاره نمود [٦].

پروسه ریزپوشانی باعث کاهش آسیب حرارتی به لاکتوباسیلوس‌ها می‌شود. لذا در محصولاتی که حرارت می‌بینند به‌عنوان روش مناسب پیشنهاد می‌گردد [۷]. همچنین شواهد نشان داده که ریزپوشانی علاوه بر مقاومت حرارتی، باعث ایجاد مقاومت به اسید معده نیز می‌گردد [۸و ۹].

روش‌های مختلفی برای ریزپوشانی وجود دارد که ازجمله آن می‌توان به اکستروژن، امولسیون، کواکستروژن و روش خشک‌کن پاششی اشاره نمود. این روش‌ها بقاء پروبیوتیک‌ها را ۹۵-۸۰ درصد افزایش می‌دهند. تکنیک ریزپوشانی می‌تواند باعث ماندگاری باکتری‌های لاکتوباسیلوس به‌واسطه کاهش آب محیط شود ولی پروسه‌هایی مانند ریزپوشانی توسط خشک‌کردن تحت خلاء، خشک‌کردن انجمادی یا خشک‌کردن به‌وسیله اسپری می‌تواند باعث کاهش تعداد یا مرگ باکتری‌ها شود..اکستروژن ازجمله قدیمی‌ترین روشهای تولید میکروکپسول است. در این روش ابتدا باکتری با یک هیدروکلوئید مناسب مخلوط خواهد شد و سپس این مخلوط به‌صورت قطره به داخل کلریدکلسیم به‌عنوان محلول سفت‌کننده ریخته خواهد شد. این روش به دلیل سهولت کار و هزینه کم بسیار محبوب است. موادی که برای ریزپوشانی استفاده می‌شوند متنوع هستند معمول‌ترین آن‌ها آلژینات کلسیم است. علاوه بر آلژینات کلسیم از مواد دیگری نیز جهت ریزپوشانی استفاده می‌شود که ازجمله آن‌ها می‌توان به پروتئین‌های آب‌پنیر و صمغ‌ها اشاره نمود [۱۲-۹].

دراین بین استفاده از صمغ‌های بومی بسیار مهم است. زودو، صمغی است شفاف که از درخت بادام‌کوهی تراوش می‌شود. زودو به سه رنگ سفید، زرد و قرمز دیده می‌شود. این صمغ که به نام‌های صمغ فارسی و شیرازی نیز معروف است. درخت بادام‌کوهی در مناطق وسیعی از کشور به‌ویژه استان‌های که در مرکز قرار دارند، می‌روید [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*

در رابطه با کاربرد صمغ زودو در ریزپوشانی مطالعات اندکی صورت گرفته است که از جمله آن، از این صمغ با ترکیبی از ایزوله پروتیین آب پنیر و اینولین به منظور ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس استفاده گردید.روش ریزپوشانی خشک کن انجمادی[1]، پاششی [2]والکترواسپری[3] 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 [۱٤].

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 پرکردن 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 ۱٦۳۷) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران به‌صورت 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، باکتو آگار، سولفات منیزیوم، سولفات آهن ، سولفات منگنز از شرکت مرک آلمان خریداری شد. توین، انکومایسین، مترونیدازول، آلژینات سدیم از شرکت سیگما خریداری گردید. صمغ زودو از شرکت اهورا دارو، مرودشت، فارس تهیه گردید

۲-۲-کشت باکتری

و به‌منظور فعال‌سازی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس از محیط MRS broth استفاده گردید. برای بی‌هوازی شدن محیط از پارافین استریل به قطر ۵ سانتی‌متر بر روی محیط استفاده شد. جهت ممانعت از ورود اکسیژن در زمان کشت، محیط به‌صورت گرم مورد تلقیح قرار گرفت. پلیت ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. برای شمارش باکتری‌ها در آزمون‌های مختلف از محیط ٤M-RTLV شامل تریپتیکاز پپتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم، مونوپتاسیم فسفات ٦ گرم، تری آمونیوم سیترات ۲ گرم، توین ۸۰ ۱ گرم، سدیم استات سه آبه ۲۵ گرم وانکومایسین هیدروکلرید ۱۰ میلی‌گرم، مترونیدازول ۱۰ میلی‌گرم، ۲،۳،۵ تری فنیل تترازولیوم کلراید ۳۰ میلی‌گرم، ال رامنوز ۲۰ گرم، باکتو آگار ۲۰ گرم، محلول نمک ۵ میلی‌لیتر شامل (سولفات منیزیوم ۵ آبه ۱۱/۵ گرم، سولفات آهن ۷ آبه ۰/٦۸ گرم، سولفات منگنز دو آبه ۲/٤ گرم آب مقطر ۱۰۰ سی‌سی) و آب مقطر ۹۵۰ میلی‌لیتر استفاده شد. پلیت ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷°C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از جاربی‌هوازی و Gas Anaerocult® A Merk,Germany pack, گرمخانه‌گذاری شدند [۱۵].

۲-۳-آماده‌سازی صمغ زودو

ابتدا صمغ بـا آسیاب آزمایشگاهی پودر شد و از الک آزمایشگاهی با مش ٤۰۰ عبور داده تـا پودری یکنواخت با اندازه ذرات کوچک‌تر از μ ۵۰ به‌دست آید. میزان پروتئین خام آن ۰/۲٪، خاکستر ۱/۵٪ ورطوبت ۱۱/٤٪ بود. این پودر، جهت انجام آزمون‌های بعدی، در کیسه‌های پلاستیکی غیرقابل نفوذ به رطوبت نگهداری گردید [۱٦]. غلظت‌های (۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ درصد) زودو به‌طور جداگانه تهیه شد. این غلظت‌ها بر اساس پیش‌تست انتخاب شدند. از آن جهت که هدف از تولید باکتری

1. freeze drying
2.spray drying
3. electrospraying

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

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 حل‌شدن بهتر صمغ، ۹۰ml از این محلول با ۰/٤ اسید استیک گلاسیال اسیدی شد. در مرحله بعد به منظور خنثی کردن خاصیت باکتری کشی اسید استیک، با سود ۰/۱ نرمال تیتر تا به pH ٦-۵/۷ رسانده شد. سپس توسط فیلتر واتمن شماره ٤ صاف شد و حجم آن به ml ۱۰۰ رسید و در اتوکلاو در دمای C ° ۱۲۱ و مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید.

۲-٤- روش ریزپوشانی

بعد از فعال‌سازی باکتری، کشت به‌وسیله سانتریفوژ در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، دومرتبه با پپتون واتر ۰/۱٪ استریل شستشو داده شد. حجم سلول‌های شستشو داده‌شده باکتری توسط نرمال سیلین به ۵ml رسانده شد و به‌وسیله اسپکتوفتومتر سنجش میزان کدورت انجام‌شده و شمارش کلی باکتری‌ها در پلیت حاوی محیط کشت M-RTLV انجام شد. پلیت ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷°C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از جاربی‌هوازی و Anaerocult® A Gas pack, Merk,Germany گرمخانه‌گذاری شدند. برای ریزپوشانی از تکنیک اکستروژن به‌صورت دولایه‌ای استفاده گردید لایه اول سدیم آلژینات و لایه دوم زودو در نظر گرفته شد. به‌منظور ریزپوشانی، ۵ میلی‌لیتر از کشت باکتریایی شسته شده (در غلظت حدود $۱/۹۱\times۱۰^{۹}$ CFU/ml) در ۱۵ میلی‌لیتر محلول آلژینات سدیم ۲٪ حل گردید. محلول فوق توسط نیدل ۰/۱۱mm به‌صورت 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 یک‌شب در یخچال قرار داده شد. در مرحله بعد دانک‌ها توسط پپتون واتر ۰/۱٪ استریل چندین با شستشو شد. سپس دانک‌ها به ۱۰۰ml محلول زودو ۰/۲٪ اضافه شد و وبر روی شیکر ارلن در دور rpm ۱۸۰ به مدت ٤۰ دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد دانک‌ها توسط پپتون واتر ۰/۱٪ استریل چندین بار شستشو شد. به‌منظور ارزیابی بهترین غلظت زودو جهت ریزپوشانی، ریزپوشانی در چهار غلظت (۰/۸، ۰/٦، ۰/٤ و ۰/۲ درصد) بر اساس تست اولیه به‌طور مستقل انجام گرفت و آزمون‌های شکل و اندازه، رنگ و خصوصیاتی بافتی دانک‌های ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت [۱۷و 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 به‌وسیله 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، ۰/٦، ۰/٤ و ۰/۲ درصد) ،بعد ازگذشت ۲٤ ساعت از زمان تولید، در دمای $٤\ ^{o}C$ نگهداری و سپس دانک ها 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 $۰/۱\ mms^{-۱}$ در حالت فشردگی و فاصله گسستگی[1] 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 به‌دست می‌آید، مورد بررسی قرار گرفت. برای هر نمونه تمام این اندازه‌گیری‌ها در دمای $۷\pm۱^{o}C$ در حداقل ۱۰ تکرار انجام شد و در هر تکرار از ۱۰ عدد دانک استفاده گردید [۲۰].

۲-۵-۳-ارزیابی رنگ دانک‌ها

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

1. Rupture

باکاشی سفید استاندارد ۹۲/۲۳= L^*، ۱/۲۹- = a^* و ۱/۱۹= b^* کالیبره 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 به‌دست آمد. BI به‌عنوان شاخص مهم در تشخیص رنگ قهوه‌ای می‌باشد [۲۱].

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

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

۲-۵-٤-شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها

بعد از مخلوط کردن باکتری شسته شده و محلول آلژینات سدیم، تعداد باکتری‌های موجود دریک گرم مخلوط شمارش شد. بعد از اتمام تولید دانک، یک گرم از دانک‌های تهیه‌شده را با ۹ میلی‌لیتر محلول استریل بافر فسفات (۰/۱ M 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 به‌طور کامل حل و باکتری‌ها در محلول استریل بافر، آزاد شوند. بر روی محلول بافر حاوی باکتری های آزاد شده رقت سازی انجام شد وشمارش میکروبی بر طبق شمارش استاندارد در محیط‌کشت MRS agar صورت پذیرفت. سپس پلیت‌های محیط‌کشت به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷°C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از جار بی‌هوازی و Anaerocult® A Gas pack, Merk,Germany گرمخانه‌گذاری شدند. بازده ریزپوشانی با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد

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

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

N_0 تعداد سلول‌های موجود در مخلوط آلژینات و باکتری شسته شده می باشد [۱۷].

۲-٦- بررسی میزان بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد در محلول نمک طعام

از رقت حدود 10^9 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 ۱۸۰،۱۲۰،٦۰،۰ دقیقه نمونه برداری کرده و بر روی محیط M-RTLV به‌صورت پورپلیت کشت داده شدند. پلیت ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷°C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از جاربی‌هوازی و Gas Anaerocult® A Merk,Germany pack, گرمخانه‌گذاری شدند [۲۲].

۲-۷- روند تولید اسید در باکتری پروبیوتیک و دانک

بدین منظور از رقت نهایی حدود 10^6CFU/ml باکتری‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده و آزاد را به تفکیک در ۱۰۰ ml محیط MRS broth کشت داده و در دمای ۳۷°C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از پارافین گرمخانه‌گذاری گردید. هر ٤ ساعت pH و میزان جذب نوری، در طول‌موج nm ۵۲۵ اندازه‌گیری گردید [۲۳].

۲-۸- ارزیابی مقاومت حرارتی باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد

برای سنجش مقاومت حرارتی از دمای ۷۲°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 10^9CFU/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،٤،۵،٦،۷) دقیقه برای باکتری آزاد و

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 اندازه‌گیریD- 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 LSDاستفاده 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 ٤ نوع دانک با در نظر گرفتن رقت‌های مختلف زودو (۰/۲ تا ۰/۸ درصد) تولید شد. غلظت اولیه باکتری در محلول آلژینات $۹/٦\times۱۰^{۹}$CFU/ml بود. دانک‌ها به شکل کروی[1] 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 هانتر لاب استفاده گردید

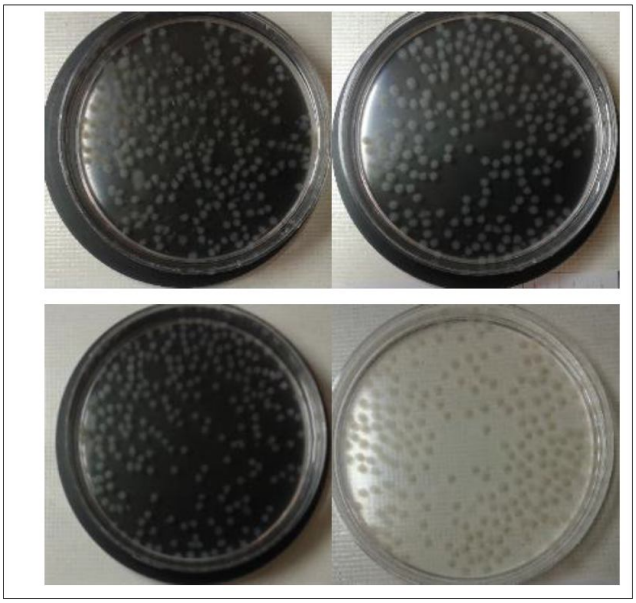

Fig 1 The images of the microencapsulated bacteria from left to right, the upper row: 0.2, 0.4 and lower rows of 0.6, 0.8% of the zedo gum that used in the microencapsulation

دانک‌ها توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند شکل دانک‌ها به‌صورت کروی بوده و لایه زودو به‌طور مشخص دیده شد. نسبت طول به عرض دانک‌ها نیز نشان داد که دانک‌ها به فرم کروی بوده اند (شکل۲).

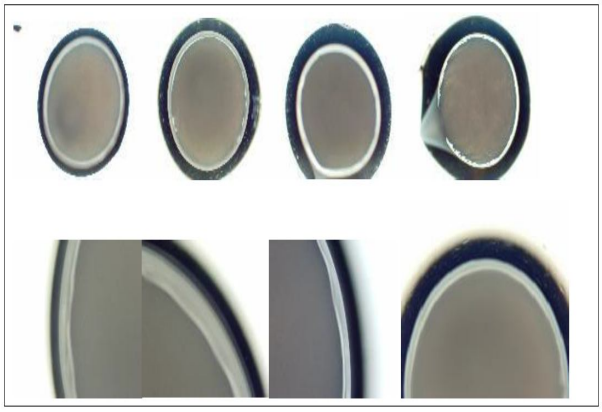

Fig 2 Light microscopy image from microencapsulated bacteria, from left to right, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8% of zedo gum respectively that used in microencapsulation
* Top row images with 25X magnification and lower row with 40X

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

1. Spherical

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

	Zedo percent			
Layers (µm)	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 ($p \leq 0.05$).

همان‌طور که ملاحظه می‌شود. قطر کل آلژینات بین ۳۲۵۰ تا ۳۵۹۱ میکرومتر بوده است و قطر لایه زودو بین ۵۲ تا ۱۳۷ میکرومتر اندازه‌گیری 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 تولیدشده کروی شکل بودند و نسبت صوری[1] آن ۱/۰۳۵±۰/۰٤ 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 مطالعه‌ای بر روی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ٥٤٧، و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم1994 ATCC و لاکتوباسیلوس کازیی ۰۱ عمل ریزپوشانی انجام شد و نتایج نشان داد که ضخامت دانه‌های آلژینات با اضافه کردن مواد ثانویه افزایش می یابد [۲۰].

نسبت صوری محاسبه شده حاکی از کروی بودن دانک ها بود . بر اساس پژوهش پیشین تمام دانک‌های تولیدشده به روش اکستروژن حالت کروی داشتند واز نسبت صوری (۰/۰۳ ± ۱/۰۷) برخوردار بوده که اندازه و قطر دانک می‌تواند از چند میکرون تا یک میلی‌متر متغیر باشد [۱۷ و ۲٤].

در تحقیقی بر روی دانک‌های تولیدشده با کیتوزان- آلژینات و اینولین به‌صورت اکستروژن دولایه انجام شد مشخص شد که دانک‌های تولیدشده کروی شکل بودند. میانگین اندازه دانک‌های تولیدشده ۱/۰٤±۰/۰۸ تا ۱/۳۹ ۰±۰/۰٦ mm بود (۱۷)؛ که با یافته‌های این تحقیق مطابقت ندارد یک از دلایل آن می‌تواند اختلاف در ماده بکار رفته جهت ریزپوشانی باشد. به‌عنوان‌مثال لسیتین باعث ایجاد حالت کروی در دانک می‌شود وعدم وجود آن باعث ایجاد حالت بیضوی می‌گردد در این حالت دانک‌ها پیچ‌خورده و حفره‌دار می‌شوند [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 [۱٤] که از صمغ زودو، ایزوله پروتیین 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 موثراست. در بررسی کیم و همکاران [۲٦] که به‌وسیله آلژینات سدیم، MRS، گلیسرول و توین ۸۰ در حضور $CaCl_2$ ریزپوشانی را انجام شد دانک‌های تولیدشده کروی بوده و سطح آن‌ها چروکیده و متوسط قطر آن‌ها ۷۵ میکرومتر بود که با یافته‌های این تحقیق همخوانی نداشت یکی از دلایل آن تفاوت مواد ریزپوشانی شده بکار رفته و قطر نازل بود که در تحقیق موردبحث ۰/٤mm بود؛ بنابراین ذرات متفاوتی را نسبت به این تحقیق تولید نموده است.

بازده ریزپوشانی در این تحقیق ۹٤/۱۱٪بوده است .بازده ریزپوشانی بر اساس روش به‌کاررفته در ریزپوشانی متفاوت است همچنین مواد به‌کاررفته در آن نیز نقش مهمی در این بازده دارند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای 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[2] انجام شد. در این تحقیق از پکتین به‌عنوان لایه اول و از پروتئین آب‌پنیر تیمار حرارتی داده‌شده ، به‌عنوان لایه دوم استفاده گردید بازده ریزپوشانی ۸٤/۳۵ درصد گزارش گردید [۲۸].

1. Aspect ratio

2. *L.acidophillus*

۲-۱-۳-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($p\leq0.05$).

نتایج نشان داد که دانک‌ها ازلحاظ فنریت و قابلیت جویدن هیچ‌گونه تفاوت معناداری باهم نداشتند.اگرچه در غلظت ۰٪/٦ 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 (۰/۲و۰/٤درصد) از نمونه های دیگر کمتر بود ($p<$ ۰/۰۵)۰

پژوهش حاضر نشان داد که غلظت زودو در ریزپوشانی دولایه، نمی‌تواند اثر بسزایی برسفتی بافت و استحکام دانک داشته باشد. ولی صمغیت نمونه ها تا حدودی تحت تاثیر غلظت زودو قرار می گیرند. 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 به‌کاررفته در ریزپوشانی از ارزش عددی مولفهL^* یا مؤلفه روشنایی کاسته شده است. ازلحاظ مؤلفه a* یا گرایش به قرمزی، دانک‌های (۰/۲ و ۰/٤ درصد) باهم اختلاف معناداری نداشته ولی با نمونه های (۰/٦ و ۰/۸ درصد) که دارای رنگ قرمزتری بودند; اختلاف معناداری داشتند مولفه b* شاخص رنگ زرد –آبی است که در بین نمونه ها اختلاف معناداری در این مولفه 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 ۰/٤ درصد) باهم اختلاف معناداری نداشته ولی با نمونه (۰/٦ و ۰/۸ درصد) که دارای رنگ قهوه‌ای‌تری بوده اند، تفاوت معنادار داشته‌اند.

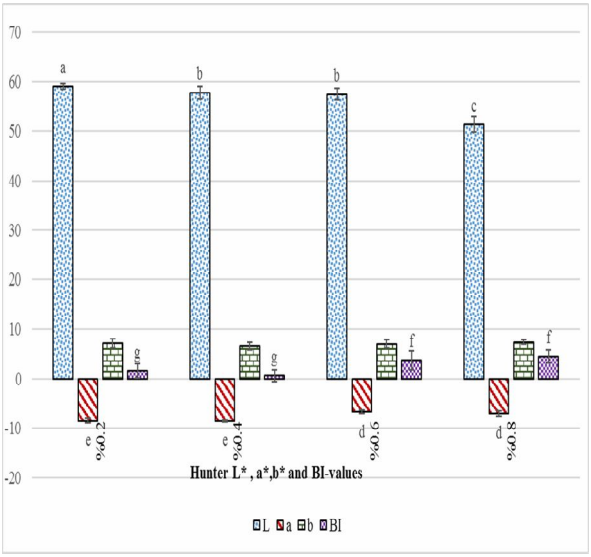

Fig 3 The determination of color parameters in microencapsulated bacteria
1- Data (mean ± standard deviation) are from three replications.
2-The results with different upper letters in each row are statistically significant ($p\leq0.05$).

۳-۱-٤-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

محلول آلژینات $۱/۰۲\times۱۰^{۱۰}$ و تعداد باکتری‌های موجود در دانک $۹/٦\times۱۰^{۹}$ بود. لذا میزان ریزپوشانی ۹٤/۱۱ درصد محاسبه گردید

۳-۲-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 شکل٤ آورده شده است. تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد در برابر نمک کاهش یافته است.

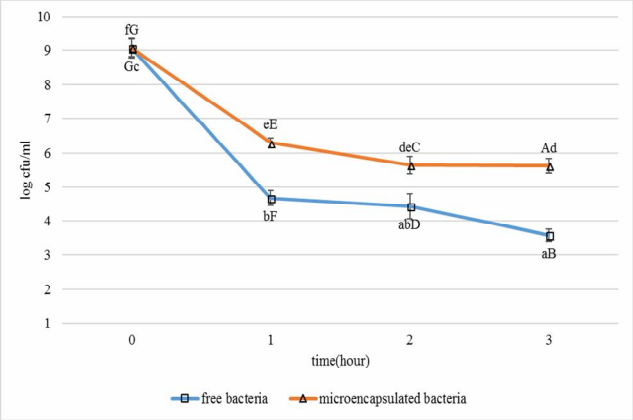

Fig 4 The free and microencapsulated bacterial resistance against the salt

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) ($p\leq0.05$).

هرچه زمان مواجه‌شدن 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. ازآنجایی‌که کاهش تعداد در باکتری آزاد و ریزپوشانی به ترتیب از ۹/۰۷ به٤/٤۸ log CFU/ml و از ۹/۰۹ به٦/۳۱ ۷٤ log CFU/ml بوده است. لذا حدود ٤/٥ 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 مواجه‌شدن با محلول نمک طعام تعداد باقیمانده باکتری‌های ریزپوشانی شده نزدیک به ٥ و تعداد باکتری‌های آزاد نزدیک به ۳/٥ log CFU/ml بود.

باکتری‌های آزاد نسبت به دانک دارای مقاومت به اسید و نمک کمتری بودند. لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس ریزپوشانی شده حدود ۱/٥ برابر قدرت زنده‌مانی بیشتری نسبت به باکتری آزاد در سه ساعت در حضور محلول ۱٥٪ نمک و (pH ۱/٥) 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 ($p>۰/۰٥$)۰ 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 مثلا ریزپوشانی لاکتوباسیلوس پاراکازیی[1] 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 تاثیرات متفاوتی بر تحمل نمک دارد به عنوان مثال لاکتوباسیلوس پلانتاروم B_1 و لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی E6 که به‌وسیله روش هم انباشت[2] با استفاده از ایزوله پروتئین آب‌پنیر (W/V ۳ درصد) و صمغ عربی (W/V ۳ 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. درصورتی‌که 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 شکل٥ آورده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در طی ٥٦

1. *.Lactobacillus paracasie*
2. Coacervation

ساعت گرمخانه‌گذاری 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 به‌مراتب سریع‌تر از باکتری ریزپوشانی شده بود.

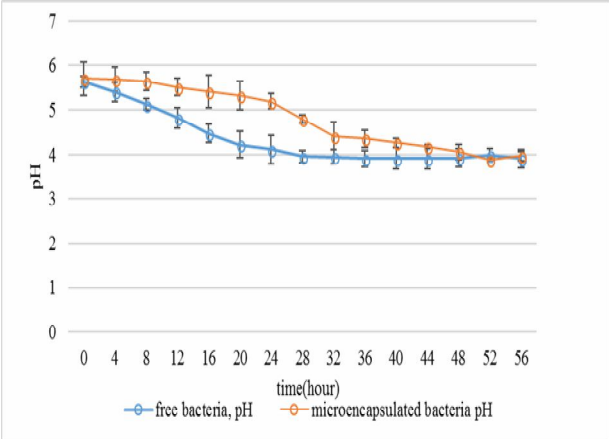

Fig 5 Acid Production in free and microencapsulated *Lactobacillus Rhamonosus*
Data (mean ± standard deviation) are from three replications.

ولی بعد از ٤٨ ساعت همسان گردید. همچنین بررسی جذب نوری باکتری‌های ریزپوشانی و آزاد نشان داد که جذب نوری در باکتری‌های آزاد دارای سیر صعودی بیشتری نسبت به باکتری ریزپوشانی بوده است. افزایش جذب نوری در باکتری‌های آزاد از ۰/۲٤۲ به ۰/۸٥٤ و در باکتری ریزپوشانی از ۰/۰٥۲ به ۰/۷۸۹ در طی ۲۰ ساعت رسید و در باکتری ریزپوشانی شده در مدت ۲٤ ساعت به ۰/۹۰۳ رسیده است(شکل ٦).

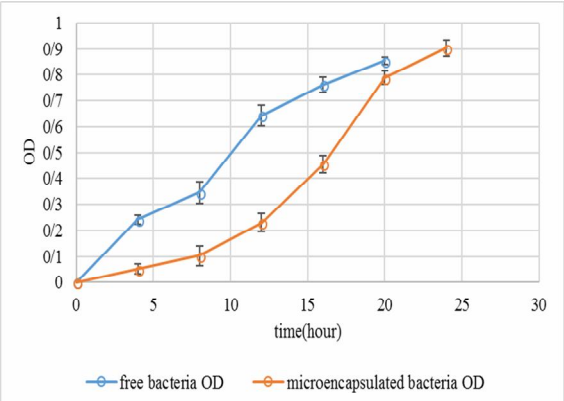

Fig 6 Optical density in free and microencapsulated *Lactobacillus Rhamonosus*
Data (mean ± standard deviation) are from three replications.

باکتری آزاد نسبت به دانک دارای روند رشد ، ایجاد کدورت و تولید اسید سریع‌تر بود. آزاد شدن باکتری در دانک به کندی صورت می‌گیرد لذا سرعت آزاد شدن باکتری ها از درون دانک کمتر و در نتیجه تولید کدورت کمتراست 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 می‌گذارد [۳۲و ۲٤].

۳-٤- ارزیابی مقاومت حرارتی باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد

ارزیابی حرارت اعمال‌شده بر باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس آزاد و ریزپوشانی شده در شکل۷ آورده شده است. همان‌طور که مشهود است D-value باکتری آزاد ۱/٥٦۷ دقیقه ولی در باکتری ریزپوشانی شده متغیر بوده است. ماندگاری باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به آزاد بیشتر بوده و حرارت ۷۲ °C را تا ۱۲ دقیقه تحمل نموده است.

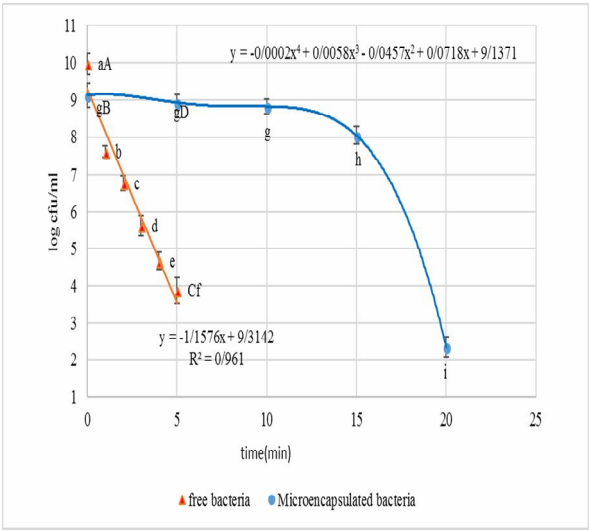

Fig 7 The free and microencapsulated *Lactobacillus Rhamonosus* surviveness at 72 ° C
1- Data (mean ± standard deviation) are from three replications.
2- Same lowercase letters in each line represents no significant difference during the time($p>0.05$).
3-Different capital letters indicate significant differences between the microencapsulated and the free bacteria at the same time (0 and 5 min separately)($p\leq0.05$).

مطالعاتی بر روی ماندگاری حرارتی، باکتری آزاد و ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پاراکازیی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، بیفیدوباکتریوم لانگوم، لاکتوباسیلوس سالیواریوس، بیفیدوباکتریوم لاکتیس یوتایپ Bi-07،Bi-07 انجام شد. نتایج نشان داد که باکتری آزاد در دمای ٦٥ ^{o}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 ٤/١٧CFU/ml نسبت به باکتری‌های آزاد که log ٦/٧٤CFU/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 ۱:٤ با روش امولسیون بود. درصورتی‌که در این تحقیق درصد اختلاط ۱:۳ و روش اکستروژن دولایه بوده است. به‌علاوه تعداد باکتری‌های اولیه نیز در تحقیق دینگ و همکاران (۷) برابر 10^{10}CFU/ml بوده که در مقایسه به مراتب بالاتر از 10^{9}CFU/ml× ۱/۵ 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 به‌کاررفته در این تحقیق ۷۲^{o}C و محیط‌کشت استفاده شده MRS بود. درصورتی‌که در تحقیق دینگ دما ٦٥^{o}C و محیط آب پپتونه استفاده‌شده است. لذا تفاوت در دما و محیط می‌تواند برماندگاری باکتری‌ها مؤثر باشد در هر دو تحقیق نرخ زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی بیشتر از باکتری‌های طبیعی بوده است .

همچنین نتایج تحقیقات کیم و همکاران [٢٦] نشان داد که دانک حاوی آلژینات دارای مقاومت حرارتی بالاتری نسبت به باکتری آزاد می‌باشد که با نتایج این تحقیق تطابق دارد .بعلاوه در گزارش‌های دیگری ماندگاری حرارتی دانک‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA1 مورد بررسی قرار گرفت دانک‌ها نسبت به باکتری‌های آزاد از ماندگاری بالاتری در دماهای ۹۰^{o}C، ۸۵ و ۷۲ برخوردار بودند. دردمای ۷۲^{o}C تعداد باکتری‌های آزاد از log ۹/۱۳CFU/ml به ۰/۸٤log CFU/ml کاهش یافت. درصورتی‌که در باکتری‌های ریزپوشانی از ۷/٤٤log CFU/ml به ٦/٢٥log CFU/ml کاهش داشته است که با یافته‌های این مطالعه، که باکتری‌های ریزپوشانی مقاوم‌تر از باکتری آزاد بودند تطابق دارد [۳۳].

٤-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 ^{o}C ثابت نگه دارد. همچنین مقاومت دانک تولیدی در برابرنمک و اسید نیز به مراتب بالاتر از باکتری معمولی بوده و دارای اختلاف ماندگاری ۲ لگاریتمی بیشتر نسبت به باکتری آزاد است ($p<۰/۰۵$). 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 محصولاتی که دارای رنگ تیره هستند، پیشنهاد می‌گردد.. البته در ادامه این پژوهش می توان امکان استفاده از ترکیبی از هیدروکلوییدهای مختلف را در ریزپوشانی بررسی کرد.

تعارض منافع:

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلان نکرده‌اند.

٥-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., Snydman D.R., and Gorbach S.L. (2005). *Lactobacillus GG*: bacteriology and clinical applications. *Gastroenterology Clinics*, 34, 483-498.

[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.

[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-RTLV 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., Zargarran 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].

[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.

[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., Thompkinson 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.

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

Sekhavatizadeh, 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 chewingness. 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