

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

حديث ناصری فیروزوند^۱، علیرضا بصیری^{۲*}، انوشه شریفان^۳

- ۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۲- گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های 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 پاکتری‌های پروبیوتیک در برابر شرایط نامساعد محیطی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید و گسترش فرآورده‌های پروبیوتیک به شمار می‌آید. درونپوشانی با محصور کردن سلول‌های پروبیوتیک می‌تواند منجر به افزایش پایداری در برابر عوامل محدودکننده از جمله شرایط اسیدی معده گردد. در این پژوهش، کارایی درونپوشانی دولایه با آلزینات‌سدیم و کیتوزان به دو روش خشک‌کردن پاششی و امولسیون بر پایداری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در برابر شرایط شبیه‌سازی شده معده (pH=۲) طی زمان‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بررسی گردید. اندازه ریزپوشینه‌ها توسط سنجش گر ابعاد ذرات تو شکل ظاهری آنان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) تعیین گردیدند. منحنی رشد بدست آمده نشان داد که باکتری‌ها ۴۰ تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح وارد فاز ثابت رشد می‌شوند. ابعاد ریزپوشینه‌های حاصل از روش امولسیون به طور معنی‌داری ($p \leq 0.05$) 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.

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

همکاران (۲۰۱۰)، اثر درونپوشانی با آژینات کلسیم بر قابلیت زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس^۳ (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 $\log \text{cfu/g}$ ۶/۵ در برابر $\log 2/3 \text{ cfu/g}$ برای سلول‌های آزاد (شاهد) بود^[۸]. پورجعفر و همکاران (۲۰۱۱)، تاثیر درونپوشانی با آژینات 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 آژینات 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 $\log \text{cfu/g}$ ۱۰^۷) سه هفتگه بوده و این میزان در حالت درونپوشانی شده به صورت دو لایه به شش هفته افزایش یافته است^[۱۰]. ساییکی و بابو (۲۰۱۰)، زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس درونپوشانی شده با آژینات‌سدیم (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 ۱/۷۱ سیکل لگاریتمی و در نمونه شاهد ۴/۹۴ سیکل لگاریتمی، کاهش یافت^[۱۱]. سلطانا و همکاران (۲۰۰۰)، باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را با آژینات‌سدیم (۲ درصد، وزنی/حجمی) و پری‌بیوتیک نشاسته

۱- مقدمه

پری‌بیوتیک‌ها میکرووارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در غاظت مناسب با تعديل فلور میکروبی روده، اثرات سلامت‌بخشی را بر روی میزبان اعمال می‌کنند^[۱]. در طی سال‌های اخیر تقاضای رو به رشدی جهت استفاده از باکتری‌های پری‌بیوتیک در مواد غذایی به منظور افزایش ارزش تغذیه‌ای و اثرات سلامت‌بخش آن‌ها ایجاد شده است. در بین پری‌بیوتیک‌ها، باکتری‌های تولیدکننده لاکتیک اسید شامل جنس‌های لاکتوباسیلوس^۱ و بیفیدوباکتر^۲، 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 پری‌بیوتیک برای ایجاد اثرات سلامت‌بخش خود، باید به صورت زنده و فعال به تعداد کافی (10^7 cfu/g)^[۳] به روده انتقال یابند. زنده‌مانی پری‌بیوتیک‌ها 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 صفوای نیز از جمله عوامل مهم در کاهش زنده‌مانی این گروه از میکرووارگانیسم‌ها هستند^[۳]. برای مقابله، راهکارهایی از جمله استفاده از گونه‌های مقاوم به اسید، کنترل تولید اسید در فرآورده و افزودن سیستئین، یا چلات‌کننده‌های اکسیژن مانند اسید آسکوربیک استفاده شده‌اند^[۴]. تامین شرایطی برای بهبود زنده‌مانی باکتری‌های پری‌بیوتیکی به وسیله ایجاد سد فیزیکی در برابر شرایط نامساعد محیطی راهی است که اخیرا مورد توجه زیادی قرار گرفته است^[۵]. فناوری درونپوشانی پری‌بیوتیک‌ها در طی دهه گذشته پیشرفت چشم‌گیری داشته است. در این فناوری، دامنه گستردگی از میکرووارگانیسم‌ها در داخل یک غشا نیمه تراوا و سازگار با میکرووارگانیسم از نظر زیستی محصور شده که در کنار بهبود پایداری میکرووارگانیسم‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی، قادر به رساندن میکرووارگانیسم‌های زنده به نقاط هدف در بدن میزبان، خواهد بود^[۶]. علاوه بر این، فناوری درونپوشانی، رهایش کنترل شده میکرووارگانیسم‌ها و همچنین رهایش در شرایط موردنظر را نیز، قابل دسترس می‌نماید^[۷]. رضایی مکرم و

1. *Lactobacillus*

2. *Bifidobacterium*

ارزیابی کارایی درونپوشانی دولایه با آلتیناتسدیم و کیتوزان به دو روش خشک کردن پاششی و امولسیون بر زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط شبیه سازی شده معده بود.

۲- مواد و روش ها

۱-۲ مواد

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل محیط کشت MRS،^۳ محیط کشت Agar Broth، سدیم هیدروکسید، سدیم سیترات، سدیم کلرید، سیتریک اسید، سدیم سیترات، دی سدیم هیدروژن فسفات، سدیم دی هیدروژن فسفات از شرکت مرک (آلمان)، آلتیناتسدیم، تویین ۸۰ کیتوزان، پیسین از شرکت سیگما-آلدریچ (آلمان)، کلرید کلسیم، گلایسیال استیک اسید از شرکت ام پی بیومدیکالز (ایالات متحده آمریکا) و باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC-۱۶۴۳) La5، به صورت خشک شده انجام داده از مرکز منطقه ای میکرو ارگانیسم های صنعتی (ایران) تهیه شدند.

۲-۲ کشت میکروبی

مقدار ۱ گرم از پودر لیوفیلیزه در ۹۹ میلی لیتر از محیط کشت MRS Broth تلقیح شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمانه گذاری شد. عمل جداسازی بیوماس در انتهای فاز لگاریتمی توسط سانتریفیوژ در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گردید. پس از سانتریفیوژ، توده سلولی تهشیش 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 سانتی گراد 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]

۳-۲ منحنی رشد

به منظور رسم منحنی رشد باکتری، جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر در طول مدت کشت در مقایسه با محیط کشت اوایله بر اساس جدول مکفارلندر در اسپکترو فوتومتر UV/VIS 25 آیالات متحده آمریکا (خوانده شد (نتایج، میانگین سه تکرار می باشند)^[۱۷].

3. De Man, Rogosa and Sharpe agar

ذرت (۲ درصد، وزنی / حجمی)، به روش امولسیون درونپوشانی و بیان کردند که میزان زنده مانی باکتری پس از طی دوره زمانی ۳ ساعته در شرایط اسیدی با $pH=2$ ، ۵ سیکل لگاریتمی کاهش می یابد^[۱۲]. مکرم و همکاران (۲۰۰۹)، باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوس^۱ را با آلتینات کلسیم، به روش امولسیون درونپوشانی و زنده مانی آنها را تحت شرایط شبیه سازی شده معده و روده با حالت آزاد (شاهد) مقایسه کردند. یافته های بدست آمده نشان دهنده تاثیر معنی دار پوشش دهی با آلتینات بر افزایش پایداری باکتری ها در شرایط اسیدی معده $pH=1/5$ بودند. از سوی دیگر تعداد سلول های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوس درونپوشانی شده با دو لایه از آلتینات پس از ۶۰ دقیقه در میان روده و معده رامنوس^۲ بود^[۱۳]. به ترتیب $pH=7/25$ در ۲/۳ سیکل لگاریتمی و ۲ سیکل لگاریتمی کاهش یافت، در صورتی که برای سلول های آزاد این کاهش به ترتیب $6/5$ و $7/6$ سیکل لگاریتمی گزارش شد^[۱۴]. طالب زاده و همکاران (۲۰۱۴)، در مطالعه ای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را با آلتینات سدیم ۳ درصد (وزنی / حجمی)، کلرید کلسیم $0/1$ مولار و کیتوزان $4/0$ درصد (وزنی / حجمی) با روش امولسیون پوشش دهی کردند و میزان زنده مانی باکتری درونپوشانی شده را پس از آزمون حرارتی در دمای 70 درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ دقیقه بررسی کردند. تعداد باکتری های زنده در نمونه های درونپوشانی شده با آلتینات سدیم، (آلتینات سدیم و کیتوزان) و نمونه شاهد به ترتیب $2/46$ ، $2/1$ و $4/89$ سیکل لگاریتمی کاهش یافت^[۱۴]. زاغری و همکاران (۲۰۲۰) اثرات درونپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس روتری^۳ با ترکیبات دیواره ای شلاک در سه غاظت 16 ، 17 و 18 درصد (وزنی / حجمی) و آلتینات سدیم در غاظت های 1 ، $0/5$ و $1/5$ درصد (وزنی / حجمی) به روش خشک کردن بستر شناور بر زنده مانی سلول ها در شرایط شبیه سازی شده معده را بررسی و نشان دادند که زنده مانی نسبی باکتری (%) پوشش دهی شده با محلول آلتینات سدیم در غاظت ۱ درصد (وزنی / حجمی) پس از طی دوره زمانی ۱ ساعت در شرایط شبیه سازی شده معده با $pH=2$ به طور معنی داری ($p\leq 0/05$) نسبت به پوشش های دیگر افزایش نشان داد^[۱۵]. هدف از انجام این پژوهش،

1. *Lactobacillus rhamnosus*

2. *Lactobacillus reuteri*

در دقیقه جدا شدن و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۱۸].

۲-۴-۲- روش خشک کردن پاششی

در این روش ابتدا ۲۰۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع حاوی باکتری ها در دور ۶۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سلول های باقیمانده در ته فالکون برداشته شد. سلول ها با محلول رینگر با یک چهارم قدرت در حجم برابر با سلول های باقیمانده در ته فالکون شسته شد. سلول های باقیمانده، در ۲۰۰ میلی لیتر محلول آلرینات ۳ درصد مخلوط و درون خشک کن پاششی آزمایشگاهی اسپری شد. دمای هوای ورودی ۱۴۰ درجه سانتی گراد و دمای هوای خروجی ۷۰-۷۵ درجه سانتی گراد، جریان ورودی پمپ ml/min ۱۵، سرعت پاشش ۵۰۰ لیتر بر ساعت و قطر نازل ۰/۷ میلی متر بود. کپسول های بدست آمده فاقد اتصالات عرضی با کلسیم بوده و برای ایجاد اتصالات، ۲۵۰ میلی گرم از کپسول های 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. کپسول های دارای اتصالات عرضی با سانتریفیوژ ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا سازی شدند. پوشش دهی کپسول ها با کیتوزان با استفاده از محلول ۰/۴ 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 شدن و کپسول های 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 درونپوشانی (EE¹)

برای شمارش باکتری های به دام افتاده در کپسول ها، ۱ گرم از کپسول های تهیه شده با ۹ میلی لیتر محلول استریل بافر فسفات (pH=۷/۰ و ۱M) پراکنده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد تا کپسول ها به طور کامل حل و باکتری ها در محلول استریل بافر، آزاد شوند. سپس با استفاده از محیط کشت جامد MRS آگار و روش پورپلیت، باکتری ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. شمارش باکتری ها در ۳ تکرار انجام شد [۲۰]. برای کپسول هایی که با کیتوزان پوشش داده شدند، از محلول بافر سیترات سدیم و

۲-۴- درونپوشانی

درونپوشانی باکتری ها به دو روش امولسیون و خشک کن پاششی انجام شد.

۲-۱- روش امولسیون

در این روش ابتدا ۳ گرم آلرینات سدیم، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونایز با استفاده از همزن مغناطیسی کاملا حل شد، سپس محلول بدست آمده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. محلول به مدت یک شب در دمای یخچال نگهداری تا ذرات آلرینات به خوبی آب جذب کنند. در ادامه محلول از یخچال خارج و پس از همدما شدن با محیط، محلول با سوسپانسیون باکتریابی به مدت ۵ دقیقه مخلوط گردید. برای تشکیل امولسیون مخلوط حاصله را به ۵۰۰ میلی لیتر روغن ذرت حاوی ۰/۲ درصد امولسیفایر توین ۸۰ و به کمک همزن مغناطیسی (Heidolph, Germany) با سرعت ۳۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه پراکنده گشت. سپس برای شروع ژلاتیناسیون، به آرامی کلرید کلسیم ۱/۰ مولار به محلول مورد نظر اضافه گردید (افزومن 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 تهشیینی کپسول ها، تکمیل گردد. در نهایت به منظور جدا سازی کپسول ها، از دکاتتور و سانتریفیوژ (Sigma 3-18 K, Germany) با سرعت ۳۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد و کپسول های جدا شده با محلول آب مقطر شسته شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد حدود ۱۰ ساعت نگهداری شدنده کاملا سفت شوند (مکرم و همکاران، ۲۰۰۹). برای پوشش دهی 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 ۰/۴ درصد (وزنی/حجمی) رسانده شد، سپس بواسیله افزودن سدیم هیدروکسید (Merck, Germany) pH آن به حدود ۵/۷-۶/۷ رسانیده شد. مخلوط حاصله بواسیله کاغذ و اتمن صاف شد و در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، استریل گردید. ۱۵ گرم از کپسول های آلرینات کلسیم ساخته شده در مرحله قبلیه 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 کپسول های پوشش دهی شده با کیتوزان بواسیله سانتریفیوژ با دور ۳۵۰ دور

1. Encapsulation efficiency (EE)

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

۸-۲- 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 ($p < 0.05$) انجام گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل (ویرایش ۲۰۱۹) انجام شد.

۳- نتایج

۱-۳- منحنی رشد باکتری لاكتوباسیلوس 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.

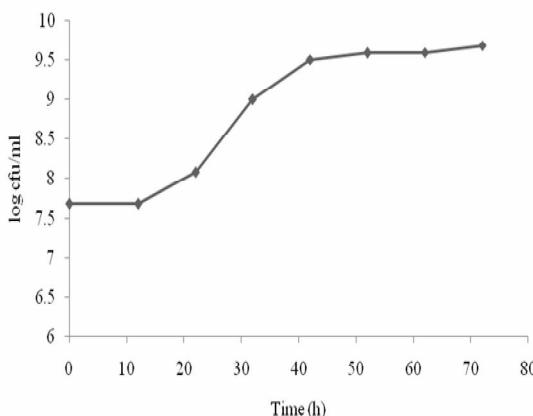


Fig 1 Growth curve of *Lactobacillus acidophilus*

دستگاه استومکر استفاده شد، به این صورت که ۱ گرم از کپسول‌ها با ۹ میلی‌لیتر از محلول بافر سدیم‌سیترات ($M/10$ و $pH=7.۳$) 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:

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

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

۶- ۲- شکل ظاهری و اندازه ریزپوشینه‌ها

اندازه ریزپوشینه‌های تشکیل شده، به وسیله دستگاه‌سنجش گر ابعاد ذرا تصورت 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 استفاده شد. برای این کار ریزپوشینه‌ها به وسیله چسب دوطرفه بر روی صفحه مخصوص دستگاه ثبت و به مدت ۲ دقیقه به وسیله طلا پوشش دهی شدند. مشاهده ریزپوشینه‌ها بواسطه میکروسکوپ الکترونی، با تابش الکترونی ۱۵ کیلوولت انجام گرفت [۱۳].

۷- ۲- قابلیت زنده‌مانی باکتریدر شرایط

شبیه‌سازی شده معده

شرایط شبیه‌سازی شده اسید معده با اتحلال پیسین در محلول نمکی (۰/۵ درصد وزنی/حجمی NaCl) تا رسیدن به غلظت نهایی ۳ گرم در لیتر انجام شد. $\text{pH}=7$ محلول با استفاده از اسید کلریدریک (۰/۱ مولار) به ۱/۵ رسانده شد و محلول حاصله با میکروفیلتر $0.22\mu\text{m}$ استریل گردید. جهت تعیین میزان زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده معده، یک گرم از کپسول‌های تهیه شده‌و ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون پروریوتیک 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 کلوخه‌ای شدن آنها پس از غوطه‌وری در محلول‌های کلسیم کلرید و کیتوزان باشد. (جدول ۱).

راندمان درونپوشانی به روش امولسیون نسبت به روش خشک‌کردن پاششی به طور معنی‌داری ($p \leq 0.05$) بالاتر بود. بیشترین میزان زنده‌مانی باکتری‌های درونپوشانی شده در زمان‌های تحت بررسی قرار گیری تحت شرایط شبیه‌سازی شده معده، در روش امولسیون با $\log \text{cfu/gr} 8/49$ مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) 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 $\log \text{cfu/gr} 4/4$ دارد. تیمار شاهد بدست آمد که نسبت به دو حالت تحت بررسی درونپوشانی، کاهش معنی‌داری ($p \leq 0.05$) را نشان می‌دهد (جدول ۱).

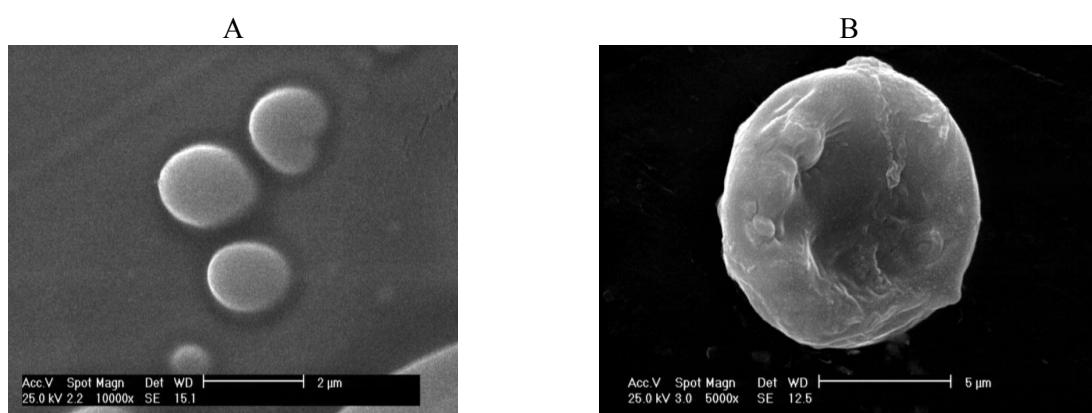


Fig 2 Images of microcapsules by emulsion methods(A) and spray drying method (B)

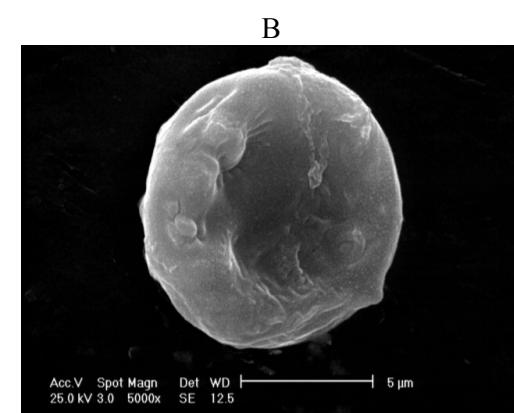
Table 1 Size, encapsulation efficiency and survival of encapsulated bacteria by emulsion and spray drying methods in simulated gastric conditions

survival of encapsulated bacteria by emulsion and spray drying methods in simulated gastric conditions (log CFU/g)	encapsulation efficiency(%)	microcapsule diameter(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 ($p \leq 0.05$).

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 قرار گیری

۲-۳-۱- 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 و نمونه‌های حاصل از روش خشک‌کردن پاششی در مقایسه با ریزپوشینه‌های حاصل از روش امولسیون، دارای سطحی چروک‌کرده بودند. چروک‌کرگی مشاهده شده در ذرات حاصل از خشک‌کردن پاششی احتمالاً به دلیل افت ناگهانی فشار و تغییر آب موجود در ماتریکس می‌باشد (شکل ۲). ابعاد ریزپوشینه‌های تولید شده به روش امولسیون به شکل معنی‌داری ($p \leq 0.05$) کوچک‌تر از روش خشک‌کردن پاششی بوده است که این امر ممکن است به دلیل



۳-۳-۱- اثر زمان قرار گیری در شرایط شبیه‌سازی شده معده بر زنده‌مانی باکتری‌های درونپوشانی شده

زمان قرارگیری 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 $10^{4.0}$ و $5.82 \log \text{cfu/gr}$ را به خود اختصاص می‌دهند.

۳-۴- زنده‌مانی لاکتوبراسیلوس 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 ($\log \text{CFU/g}$)

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

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 بخشدید، به طوریکه تعداد لاکتوبراسیلوس اسیدوفیلوس درون‌پوشانی شده به روش امولسیون با جمعیت اولیه $10^{4.4} \text{ cfu/g}$ در شرایط شبیه‌سازی شده شیره معده پس از ۱۲۰ دقیقه به $6.14 \log \text{cfu/g}$ رسید، که زنده‌مانی باکتری‌ها را در مقایسه با نوع آزاد، بهبود بخشدید.

۳-۵- برهمکنش روش‌های درون‌پوشانی تحت بررسی و زمان قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی شده معده بر بقای لاکتوبراسیلوس اسیدوفیلوس

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

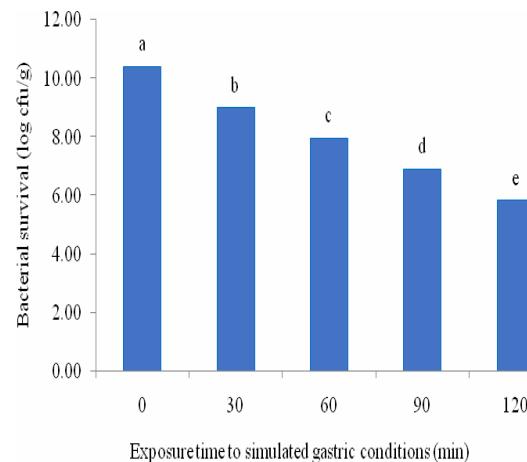


Fig 3 Evaluation of the effects of exposure time to simulated gastric conditions on survival of *Lactobacillus acidophilus*
Different letters indicate a statistically significant difference ($p \leq 0.05$).

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 لاکتوبراسیلوس 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 $95\% \leq p \leq 0.05$ معنادار بوده است. درون‌پوشانی به طور معنی‌داری زنده‌مانی ریزپوشینه‌ها را در شرایط شبیه‌سازی شده

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. روز و همکاران (۲۰۱۰) منحنی رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را در محیط کشت MRS در دمای گرماخانه‌گذاری 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 است [۲۴].

۴- 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 ۴۵/۶۲۰ 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 رشنوادی (۲۰۱۶) اندازه ریزپوشینه‌های تولیدی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با آلزینات کلسیم 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 شنی شدن در ماده غذایی می‌شود [۲۶].

۴-۳- 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 (۲۰۰۴) گزارش کردند که سلول‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ریزپوشینه در مقایسه با سلول‌های آزاد به خوبی در شرایط

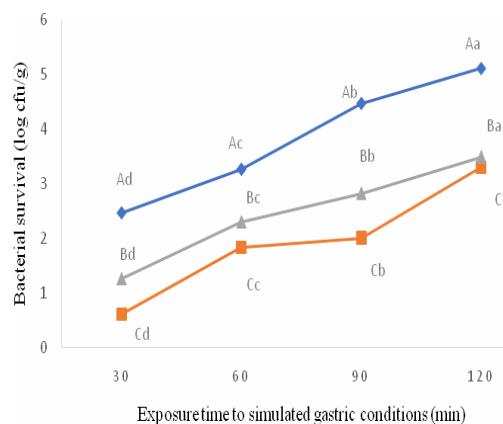


Fig 4 Interaction of different encapsulation methods and exposure time to simulated gastric conditions on survival of *Lactobacillus acidophilus*
 (♦Control, ▲Spray drying, ■Emulsion)
 Different capital letters indicate a significance difference ($p \leq 0.05$) among encapsulation methods and control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

در روش‌های درونپوشانی تحت بررسی، جمعیت باکتری‌های درونپوشانی شده به روش امولسیون با اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) نسبت به روش خشک‌کردن پاششی و تیمار شاهد در زمان‌های ۹۰، ۶۰، ۳۰ و ۲۰ دقیقه) به ترتیب با ۰/۶۱، ۱/۸۳، ۰/۶۱ و ۲/۰۱ (دقیقه) قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی شده معده (۹۰، ۶۰، ۳۰ و ۲۰ دقیقه) به ترتیب با ۰/۶۱، ۱/۸۳، ۰/۶۱ و ۲/۰۱ (دقیقه) 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 فاز تاخیری بوده پس از آن وارد مرحله رشد لگاریتمی و پس از ۴۰ تا ۴۲ ساعت به فاز ثابت رسید.

۵- نتیجه‌گیری

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 لاکتوپاسیلوس 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 لاکتوپاسیلوس 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 مانند [۲۷]. لی و هو (۲۰۰۰) نشان دادند که درون‌پوشانی باعث افزایش پایداری باکتری‌های لاکتوپاسیلوس 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 صفرار 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 لاکتوپاسیلوس پلاتنتاریوم با آژینات‌کلسیم و کیتوزان، قابلیت زنده‌مانی این باکتری را در شرایط شبیه‌سازی شده معده بهبود دادند [۳۲]. 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 تولید با روش خشک‌کردن پاششی از نظر فرایند حرارتی باشد. باکتری‌های لاکتوپاسیلوس 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 لاکتوپاسیلوس 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 ۲/۴ 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] Krasaeko 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, 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.

- 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.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 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.

ARTICIE 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