



ریز پوشانی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس توسط صمغ آمونیاکوم غنی شده با نانوسلنیوم: بررسی میزان زنده مانی در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش و دوره نگهداری

عزیز همایونی راد^۱، بهزاد ابراهیمی^{۲*}

۱- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم پزشکی مراغه، مراغه، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	<p>افزایش تقاضا برای هیدروکلوئیدهای با کارایی ویژه، محققان را برای معرفی منابع جدید هیدروکلوئیدی علاقه مند کرده است. یکی از روش های افزایش زنده مانی پروبیوتیک ها در شرایط استرس زا ریز پوشانی می باشد، تا بتوان این باکتری ها را به تعداد کافی به بدن رساند و از اثرات سلامت بخش آنها استفاده کرد. هدف از این مطالعه بررسی امکان سنجی ریزپوشانی پروبیوتیک <i>اسیدوفیلوس</i> توسط صمغ آمونیاکوم و غنی کردن آن با استفاده از نانوسلنیوم و تعیین میزان زنده مانی آن در شرایط استرس زا می باشد. صمغ آمونیاکوم با استفاده از حلال و سپس ترسیب توسط الکل از موسیلاژ حاصل از گیاه <i>Dorema Ammonacum</i> استخراج شد. محلول های ۱، ۵ و ۱۰٪ وزنی-حجمی از صمغ آمونیاکوم تهیه شد و سپس نانو ذرات سلنیوم سنتز شده در غلظت ۱/۵ درصد و سلول باکتری با میانگین تعداد $10^{11} \log \text{CFU g}^{-1}$، به سوسپانسیون اضافه شدند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت صمغ، بازده انکپسولاسیون به صورت معنی داری از ۶۶٪ به ۸۱٪ افزایش پیدا کرد. نرخ زنده مانی برای غلظت های ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪ صمغ آمونیاکوم در شرایط یخچالی به ترتیب ۶۲٪/۴۳، ۷۲٪/۳۷ و ۸۱٪/۸۳ بود. در شرایط شبیه سازی شده معده در سطوح pH مورد استفاده در این مطالعه در غلظت های ۵٪ و ۱۰٪ از صمغ آمونیاکوم شمارش سلول های زنده پس از ۳ ساعت انکوباسیون بالاتر از $7 \log \text{CFU g}^{-1}$ باقی ماند. پس از ۶ ساعت انکوباسیون در 10 g L^{-1} محلول صفراوی سلول های آزاد افت $5/93 \log \text{CFU g}^{-1}$ را نشان دادند، در حالی که برای سلول های ریزپوشانی شده در غلظت های ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪ به ترتیب تنها $3/93 \log \text{CFU g}^{-1}$، $3/15$ و $3/15 \log \text{CFU g}^{-1}$ بود. نتایج نشان داد صمغ آمونیاکوم خواص انکپسوله کنندگی بسیار خوبی دارد که می توان از آن در بسیاری از فرمولاسیون های غذایی با این اهداف مورد استفاده قرار داد.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۳	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۱۲	
کلمات کلیدی:	
صمغ آمونیاکوم، ریز پوشانی، نانو سلنیوم	
DOI:10.22034/FSCT.21.154.66.	
* مسئول مکاتبات: ebrahimib@tbzmed.ac.ir	

۱- مقدمه

می‌تواند کمبود آن را برطرف کرده و سلامت انسان را بهبود بخشد، استفاده می‌شود [۳].

به منظور جلوگیری از کاهش زنده ماننی پروبیوتیک‌ها در طول فراوری و عبور از دستگاه گوارش، برخی از فن‌آوری‌ها در دسترس هستند. ریزپوشانی یک تکنیک به دام انداختن است که می‌تواند از سلول‌های پروبیوتیک زنده در برابر استرس‌های نامطلوب محیطی محافظت کند [۴]. انتخاب مواد یک عامل مهم در ریزپوشانی است. این ماده باید فود گرید باشد و بتواند پروبیوتیک‌ها را به دام بیندازد و از آنها محافظت کند. رایج‌ترین مواد دیواری که برای ریزپوشانی پروبیوتیک استفاده می‌شود، کربوهیدرات‌هایی مانند آلزینات، کاراگینان و سایر صمغ‌ها هستند [۵]. هدف از این مطالعه بررسی امکان سنجی ریزپوشانی پروبیوتیک *L. اسیدوفیلوس* توسط صمغ آمونیاکوم و غنی کردن آن با استفاده از نانوسلنیوم و تعیین میزان زنده ماننی آن در شرایط استرس‌زا می‌باشد.

۲- روش کار

۲-۱- تولید نانوذرات سلنیوم

سنتز نانوذرات با استفاده از احیای محلول سلنیوم دی‌اکسید (SeO_2) با استفاده از آسکوربیک اسید و در حضور پایدارکننده پلی‌وینیل‌الکل (PVA) انجام شد. به این صورت که ابتدا مقادارهای مساوی (۱۰ میلی‌لیتر) از محلول‌های ۰/۰۲ مولار سلنیوم دی‌اکسید، ۰/۰۸ مولار آسکوربیک اسید و ۰/۱ مولار از پلی‌وینیل‌الکل تهیه شد. محلول سلنیوم به همراه مگنت روی همزن قرار داده شد و محلول‌های آسکوربیک اسید و پلی‌وینیل‌الکل به صورت همزمان و به آرامی (قطره قطره) به محلول سلنیوم اضافه شدند. با شکل‌گیری نانوذرات سلنیوم محلول به رنگ نارنجی مایل به قرمز درآمد که نشانه تشکیل نانو ذرات است. محلول قرمز رنگ به دست آمده پس از اولترا سوند توسط دستگاه فریزدرایر خشک شد [۶].

هیدروکلوئیدها، به مجموعه‌ای از پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها اطلاق می‌گردد که با حل یا پخش شدن در آب ویسکوزیته را به مقدار چشم‌گیری افزایش می‌دهند و امروزه به طور گسترده در صنایع مختلف با عملکردهایی نظیر ویسکوزکنندگی (قوام‌دهندگی)، تشکیل ژل، فیلم‌ها و امولسیون‌ها، تثبیت کف و دیسپرسیون‌ها، ممانعت از تشکیل کریستال‌های یخ و شکر، عوامل ضد بیاتی، فیبر رژیمی و همچنین انکیپسولاسیون (آزادسازی کنترل شده طعم‌ها و مواد زیست‌فعال) به کار می‌روند [۱].

موسیلاژ آمونیاکوم که تحت عنوان اوشق (ushaq)، واشا (Vasha) و یا Persian ammoniacum از آن یاد می‌شود از ساقه و برگ‌های گیاه *Dorema Ammoniacum* که متعلق به خانواده (*Umbelliferae* (*Apiaceae*)) می‌باشد بدست می‌آید. این گیاه یکی از مهمترین گیاهان از نظر دارویی می‌باشد که در نواحی خشک و نیمه خشک آسیای مرکزی شامل ایران، افغانستان و پاکستان رشد می‌کند. در ایران خاستگاه آن در یزد، کرمان، اصفهان و سمنان می‌باشد. این گیاه با دوام تا ۲/۵ متر ارتفاع رشد می‌کند و در بهار و اوایل تابستان عصاره شیری ماندنی از آن خارج می‌شود. برگ‌ها به شکل در هم پیچ خورده قرار گرفته‌اند. ساقه به صورت توخالی، گره دار و خط دار آبی است که در حدود ۵ سانتی‌متر ضخامت دارند. برای گرفتن موسیلاژ، ساقه‌های گیاه را با تیغ شکاف می‌دهند و موسیلاژ سقز ماندنی از آن خارج می‌شود که در مجاورت هوا سفت می‌شود. موسیلاژ به صورت توده روشنی که روی آن ترک خورده و خطوط درخشان زردی دیده می‌شود [۲].

سلنیوم (Se) یک جزء کلیدی برای حفظ سلامت پستانداران است و کمبود سلنیوم در رژیم غذایی یک مشکل عمده بهداشت جهانی است. کمبود سلنیوم افراد را مستعد ابتلا به چندین بیماری مزمن از جمله دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی، اختلالات التهابی، سرطان و عفونت‌های ویروسی می‌کند. روش‌های غنی‌سازی زیستی *Se-biofortification* ممکن است برای تولید مواد غذایی غنی‌شده با Se-که

۲-۲. استخراج صمغ از موسیلاژ ترشح شده گیاه آمونیاکوم

موسیلاژ تهیه شده از گیاه آمونیاکوم که متمایل به رنگ زرد بود به روش دستی تمیز و بو جاری شد و برای تهیه پودر توسط آسیاب آزمایشگاهی خرد شد. پس از تمیز کردن، موسیلاژ تحت شرایط همزدن مداوم به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر که قبلاً مقداری حرارت داده شده بود مخلوط شد. مخلوط آب و موسیلاژ به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به آرامی همزده شد. محلول تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت هیدراتاسیون کامل نگهداری شد. سپس به منظور حذف ذرات اضافی، محلول سانتریفیوژ شده (۲۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه و ۳۰۰g) و از کاغذ صافی عبور داده شد. در مرحله بعد، از اتانول ۹۶٪ به نسبت ۱ به ۳ برای رسوب دادن صمغ استخراج شده استفاده شد. صمغ رسوب داده شده با پارچه کتان فیلتر و سپس دو بار با اتانول ۷۰٪ دو بار با اتانول ۹۶٪ و یک بار توسط استون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در هر بار شستشو داده شد. این فرآیند شستشو جهت حذف کامل باقی مانده‌های احتمالی پوسته، بهبود هر چه بیشتر رنگ صمغ تولیدی، خروج مواد معدنی و خالص سازی صورت گرفت. بعد از شستشو، صمغ استحصال شده در آون (فن آزما گستر، ایران) با دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. صمغ خشک شده آسیاب و پس از بسته بندی در جای خشک و خنک جهت آزمایشات بعدی نگهداری شد [۲].

۲-۳. فعال سازی باکتری پروبیوتیک

سویه خریداری شده لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به شکل لیوفیلیزه شده در زیر هود لامینار باز شد و به داخل محیط کشت MRS broth منتقل شد. سپس در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا رشد نماید. به منظور اطمینان از خلوص باکتری، از محلول سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، بر روی پلیت MRS agar کشت خطی صورت گرفت. پلیت‌ها در انکوباتور به مدت

۲۴ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا کلنی‌های باکتری رشد نماید. تمامی تجهیزات و محیط کشت‌ها به کمک اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. سوسپانسیون میکروبی تهیه شده بر روی محیط کشت MRS broth جهت استفاده به منظور ریزپوشانی، با سرعت ۴۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا سلول باکتری از محلول دور ریز محیط کشت جدا گردد. سپس سلول باکتری به کمک محلول سدیم کلرید ۰/۸۵٪ استریل شستشو داده شد [۷].

۴-۲. تهیه سوسپانسیون جهت ریزپوشانی

محلول‌های ۱، ۵ و ۱۰٪ وزنی-حجمی از صمغ آمونیاکوم تحت شرایط همزدن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تهیه و در ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اتوکلاو شدند. دلیل انتخاب حد بالایی از صمغ، ویسکوزیته‌ی پایین صمغ آمونیاکوم و همچنین اثر محافظتی بالاتر بود. سلول باکتری سانتریفیوژ شده با میانگین تعداد سلول $10^{11} \times 6/85$ ، به سوسپانسیون اضافه شد.

۲-۵. فرایند ریزپوشانی به کمک خشک کن پاششی

در این مرحله سوسپانسیون آماده شده به دستگاه خشک کن پاششی (Dorsa tech، ایران) با فشار ۶-۵ بار، دمای ورودی ۹۰-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، اسپراتور ۹۰٪ و مکش پمپ ۲۵٪ (معادل با مکش محلول به میزان ۶ میلی لیتر بر دقیقه) تغذیه شد. در ابتدا جهت تنظیم شدن دمای ورودی بر روی عدد مورد نظر، مکش و تغذیه دستگاه به کمک آب مقطر انجام شد و سپس محلول سوسپانسیون اصلی به دستگاه خشک کن پاششی تزریق شد. پودر خشک شده از سیکلون جمع کننده پایینی دستگاه جمع آوری شده و توزین گردید. سپس هر نمونه داخل سه فالكون به طور مجزا ریخته و به کمک پارافیلیم درب آن پوشانده شده و داخل فویل آلومینیوم قرار داده شد. سپس در دمای دمای یخچال (۴ درجه سانتی-گراد) نگهداری شد [۸].

۲-۶. بررسی محتوای درصد رطوبت و فعالیت آبی

تنظیم pH به ۲ یا ۳ توسط محلول HCl 5 mol L^{-1} آماده سازی شد. پس از فیلتراسیون و استریل کردن $0/1$ گرم از نمونه‌های ریز پوشانی شده *ل. اسیدوفیلوس* یا $0/1$ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلول‌های آزاد به طور جداگانه در لوله‌های آزمایش حاوی $9/9$ میلی‌لیتر محلول شبیه سازی شده معده اضافه شد و در 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. پس از $0/5$ ، 1 ، 2 و 3 ساعت انکوباسیون، نمونه‌ها فوراً جهت شمارش تعداد سلول‌های زنده به صورت بی‌هوازی بر روی محیط کشت MRS آگار کشت داده شدند [۱۱].

۲-۱- بررسی میزان زنده‌مانی *ل. اسیدوفیلوس* ریز پوشانی شده در شرایط شبیه سازی شده صفرا

بررسی میزان مقاومت *ل. اسیدوفیلوس*‌های ریزپوشانی شده در حضور نمک‌های صفراوی مطابق روش شبیه سازی شده معده است، با این تفاوت که از $9/9$ میلی‌لیتر محلول نمک صفراوی حاوی 5 یا 10 گرم در لیتر نمک‌های صفراوی استفاده شد [۱۱].

۲-۱۱- میکروسکوپ الکترونی روبشی

مورفولوژی پودرهای پروبیوتیک در میکروسکوپ الکترونی روبشی (JSM-6610LV, JEOL Ltd. Japan) مشاهده شد.

۲-۱۲- آنالیز آماری

برای آنالیز داده‌ها از روش ANOVA استفاده شد. در صورتی که F-values در ANOVA معنی دار شد ($P < 0/05$) برای مقایسه میانگین‌ها از روش دانکن استفاده شد. تمام آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد.

۳- یافته‌ها و بحث

۳-۱- اندازه ذرات و پراکندگی نانوسلنیوم

برای تأیید اینکه اندازه نانوذرات سنتز شده در محدوده نانومتری است از زتاسایزر (Malvern Zetasizer) استفاده شد. توزیع اندازه ذرات بر اساس شدت، میانگین اندازه ذرات ($Z\text{-average}(d.nm)$) و شاخص پراکندگی (PdI) آن‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که میانگین قطر

اندازه‌گیری فعالیت آبی پودرها توسط دستگاه AquaLab Pawkit انجام شد. درصد رطوبت پودر بر اساس استاندارد AOAC (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد.

۷-۲- بازده انکپسولاسیون

به منظور بررسی میزان افت زنده‌مانی باکتری در طی فرایند خشک کردن افشانی، بلافاصله پس از خشک کردن شمارش میکروبی صورت گرفت. بازده انکپسولاسیون با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Encapsulation yield (EY)} = \left(\frac{\log N}{\log N_0} \right) \times 100$$

که در این رابطه، N ، تعداد سلول‌های زنده در پودر (CFU g^{-1}) و N_0 تعداد سلول‌های زنده در مواد انکپسوله کننده قبل از خشک کردن می‌باشد [۹].

۸-۲- بررسی زنده مانی باکتری *ل. اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده طی مدت زمان نگهداری در دمای یخچالی

زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی شده طی مدت زمان یک ماه نگهداری در دمای یخچالی (4 درجه سانتی‌گراد) بررسی شد. میزان $0/1$ گرم از پودر باکتری بدست آمده در $9/9$ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی ریخته و برای هموژنیزاسیون کامل تحت شرایط همزدن قرار گرفت. سپس برای رهایش کامل باکتری‌های ریزپوشانی شده، به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و با سرعت 10 g در انکوباتور همزن دار قرار گرفت. پس از تهیه رقت سریالی، در محیط کشت MRS agar با روش پورپلیت کشت انجام شد. سپس به مدت 72 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. تمامی شمارش‌ها با سه بار تکرار صورت گرفت و پلیت‌های حاوی $300-30$ کلنی شمارش شدند [۱۰].

۹-۲- بررسی میزان زنده‌مانی *ل. اسیدوفیلوس* ریز پوشانی شده در شرایط شبیه سازی شده معده

محلول شبیه‌سازی شده معده حاوی NaCl بوسیله معلق کردن پپسین (3 g L^{-1}) در محلول نمکی ($5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$) و

نانو ذرات سنتز شده حدود ۱۷۰ d.nm و شاخص پراکندگی آنها ۰/۱۳۲ بود.

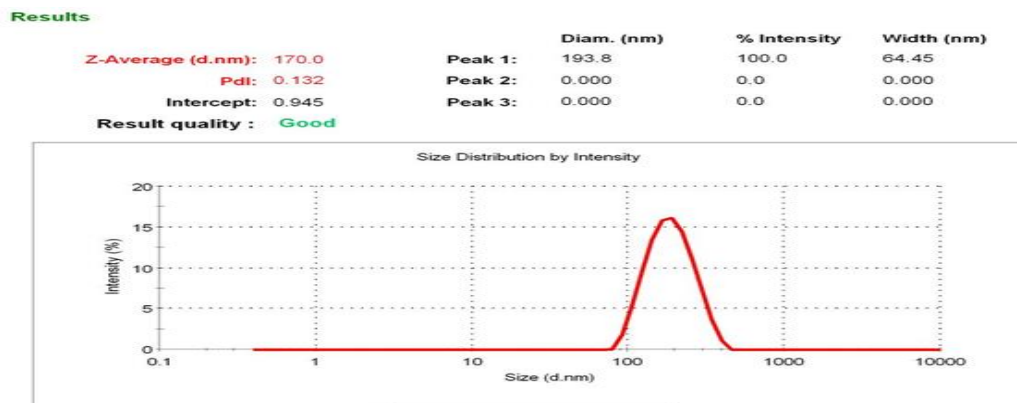


Fig 1. Particle size distribution of selenium nanoparticles.

که با افزایش غلظت صمغ عربی از ۰٪ به ۰/۵٪ a_w از ۰/۵۲ به ۰/۴۴ کاهش یافت. آنها این کاهش a_w را به حضور مقادیر بالای کربوهیدرات و ساختار انشعابی صمغ عربی مرتبط دانستند که باعث می شود تمایل زیادی به جذب آب و اتصال با آن داشته باشد [۱۳]. در بیشتر مطالعات اپتیمم زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در a_w کمتر از ۰/۲ گزارش شده است. به طور مثال *L. پاراکازئی* خشک شده توسط روش پاششی در a_w کمتر از ۰/۳ زنده‌مانی بهتری را نشان داد [۱۴].

محتوی رطوبتی پودرهای پروبیوتیکی تاثیر زیادی بر روی پایداری محصول و همچنین زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در طول دوره نگهداری گذاشته و به عنوان یک پارامتر کیفی در پودرهای حاوی سلول در نظر گرفته می شود [۱۵]. نتایج نشان داد که محتوی رطوبتی پودرهای تولید شده با افزایش غلظت صمغ کاهش یافت. با افزایش غلظت صمغ، ماده جامد کل افزایش پیدا کرد، بنابراین مقدار آب برای تبخیر کاهش یافت. Arepally و همکاران در سال ۲۰۱۹ گزارش کردند که با افزایش غلظت صمغ عربی تا ۱۰٪ محتوی رطوبتی در پودرهای پروبیوتیکی خشک شده توسط روش پاششی کاهش پیدا می کند [۱۳]. کاهش محتوی رطوبت در اثر افزودن پلی ساکارید به فرمولاسیون پودرهای پروبیوتیکی توسط Tao و همکاران در سال ۲۰۱۹ گزارش شد [۱۶].

۳-۲- محتوی رطوبتی و فعالیت آبی پودرها

فعالیت آبی (a_w) و درصد رطوبت پودرهای حاوی پروبیوتیک *L. اسیدوفیلوس* در غلظت‌های مختلف صمغ آمونیاکوم در جدول ۱ نشان داده شده است. فعالیت آبی پودرهای صمغ آمونیاکوم حاوی *L. اسیدوفیلوس* تحت تاثیر غلظت به طور معنی داری کاهش پیدا کرد. همانطور که در جدول نشان داده شده است a_w در رنج ۰/۳۱-۰/۲۴ قرار گرفت. a_w نشان‌دهنده آب آزاد (آبی که با مولکول‌ها باند نشده است) است و بر روی حفظ زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها تاثیر مهمی دارد. مطابق گزارش Viernstein و همکاران در سال ۲۰۰۵ a_w پایین (۰/۳-۰/۲) زنده‌مانی بهتری را برای سلول‌ها در طی نگهداری ایجاد می کند. در صورتی که a_w کمتر از ۰/۱ باشد، لپیدهای غشایی اکسید شده و زنده‌مانی کاهش پیدا می کند [۱۲]. مقادیر بالای a_w نیز سبب کاهش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها می شود و ریسک آلودگی در طی نگهداری را افزایش می دهد. فعالیت آبی پودرهای صمغ آمونیاکوم حاوی *L. اسیدوفیلوس* تحت تاثیر غلظت به طور معنی داری کاهش پیدا کرد. نتایج مشابهی توسط Arepally و همکاران در سال ۲۰۱۹ برای صمغ عربی گزارش کردند. آنها مشاهده کردند

مطالعات قبلی نشان داد که غلظت ماده جامد در حدود ۳۰-۲۰٪ در محلول تغذیه شونده یکی از بهترین شرایط جهت تضمین زنده‌مانی می‌باشد [۱۹]. قند موجود در ساختار صمغ نیز به عنوان یک عامل محافظتی برای پروبیوتیک‌ها عمل می‌کند که توسط فرضیه جایگزینی آب توجیه می‌شود. مطابق این فرضیه، در شرایط هیدراته، پیکربندی و یکپارچگی پروتئین‌ها و غشای سلولی توسط واکنش با مولکول‌های آب و تشکیل پیوندهای هیدروژنی حفظ می‌شود. پس از حذف آب گروه‌های قطبی قندها می‌توانند جانشین مولکول‌های آب شوند [۲۰].

Table 2. Encapsulation efficiency of AMG in different concentrations.

Concentration (%)	Initial count	Final count	Encapsulation efficiency
1	12.23	8.15	66.63±0.5 ^c
5	11.96	9.11	76.17±0.7 ^b
10	12.15	9.85	81.6±0.9 ^a

زنده‌مانی در همه غلظت‌ها بالاتر از حداقل مقدار پیشنهاد شده $6 \log \text{CFU g}^{-1}$ بود. در مطالعه ای ریز پوشانی ل. اسیدوفیلوس توسط صمغ عربی نشان داد که با افزایش غلظت صمغ عربی از ۰٪ به ۱۰٪ بازده ریز پوشانی افزایش می‌یابد. آنها بیان داشتند که حضور پروتئین در صمغ عربی باعث ایجاد یک لایه محافظتی در اطراف سلول‌های باکتری شده و در نتیجه مانع تخریب آنها می‌شود [۱۳].

۳-۴- بررسی زنده‌مانی باکتری ل. اسیدوفیلوس ریز پوشانی شده طی مدت زمان نگهداری در دمای یخچالی

امروزه به دلیل تقاضای رو به افزایش برای غذاهای سالم، مغذی و فراسودمند، صنعت غذا توسعه غذاهای حاوی پروبیوتیک که بتوانند زنده‌مانی بالاتری را در طول فرایند و شرایط نگهداری داشته باشند، مد نظر قرار داده است [۱۴]. به هر حال زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در مواد غذایی در معرض

Table 1- Moisture percentage of AMG powders in different concentrations.

Concentration (%)	Water activity	Moisture (%)
1	0.31±0.05 ^a	7.94±1.62 ^a
5	0.26±0.01 ^b	4.63±0.02 ^b
10	0.24±0.01 ^c	2.78±0.21 ^c

۳-۳- بازده انکپسولاسیون (EY)

در طی خشک کردن به دلیل استفاده از دماهای بالا در فرایند، زنده‌مانی کاهش پیدا می‌کند. بازده انکپسولاسیون صمغ آمونیاکوم در غلظت‌های مختلف در جدول ۲ آورده شده است. شمارش اولیه باکتری‌های زنده برای همه غلظت‌ها تقریباً یکسان و در رنج $96/23-11/12 \text{ CFU g}^{-1}$ شمارش شدند. مطابق جدول ۲ با افزایش غلظت صمغ بازده ریز پوشانی به صورت معنی داری افزایش پیدا کرده است. در طی خشک کردن به دلیل استفاده از دماهای بالا در فرایند، زنده‌مانی کاهش پیدا می‌کند. با افزایش غلظت صمغ آمونیاکوم بازده ریز پوشانی به صورت معنی داری افزایش پیدا کرده است که می‌تواند به دلیل اثر محافظتی صمغ آمونیاکوم بر روی زنده‌مانی سلول‌ها در طی خشک کردن باشد. زنده‌مانی در همه غلظت‌ها بالاتر از حداقل مقدار پیشنهاد شده $6 \log \text{CFU g}^{-1}$ بود. در مطالعه‌ای که توسط Arepally و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام شد، ریز پوشانی ل. اسیدوفیلوس توسط صمغ عربی انجام شد و نتایج نشان داد با افزایش غلظت صمغ عربی از ۰٪ به ۱۰٪ بازده ریز پوشانی افزایش یافت. آنها بیان داشتند که حضور پروتئین در صمغ عربی باعث ایجاد یک لایه محافظتی در اطراف سلول‌های باکتری شده و در نتیجه مانع تخریب آنها می‌شود [۱۳]. Rajam و همکاران در سال ۲۰۱۵ بازده ریز پوشانی را برای فروکتو اولیگو ساکارید $70/77-72/82 \%$ گزارش کردند [۱۷]. مقاومت پروبیوتیک‌ها در مقابل خشک کردن وابسته به نوع گونه پروبیوتیک است [۱۸]. نرخ زنده‌مانی بالای بدست آمده در این مطالعه می‌تواند به دلیل ماتریکس مورد استفاده برای ریز پوشانی و غلظت ماده دیواره‌ای (۱۰٪) باشد.

توضیح دادند که در دمای یخچالی سینتیک انرژی محدود شده و حرکت مولکول‌ها کاهش پیدا می‌کند. بنابراین متابولیسم باکتری‌ها کاهش پیدا می‌کند. باکتری‌ها در نتیجه متابولیسم پایین نه تنها پس ماند کمتری تولید می‌کنند بلکه فرایندهای مخرب بیرونی نیز محدود خواهد شد [۲۲]. Reyes و همکاران در سال ۲۰۱۸ صمغ عربی را بهترین ماده دیواره‌ای جهت محافظت از *L. acidophilus* ریز پوشانی شده در طول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به مالتو دکسترین و نشاسته عنوان کردند. بدون شک نوع ماده انکپسوله کننده تاثیر مستقیمی بر روی پایداری میکروکپسول‌ها خواهد گذاشت [۲۳].

عوامل مخربی از جمله حضور ترکیبات ضد میکروبی، سمیت اکسیژن، محیط اسیدی و دمای نگهداری قرار می‌گیرند [۲۱].

شکل ۲ کاهش زنده‌مانی *L. acidophilus* ریز پوشانی شده و سلول‌های آزاد در طی ۴ هفته نگهداری در دمای یخچالی را نشان می‌دهد. به طور واضح می‌توان مشاهده کرد که سلول‌های ریز پوشانی شده در مقایسه با سلول‌های آزاد زنده‌مانی بیشتری را مخصوصاً پس از ۳۰ روز نگهداری در دمای یخچالی نشان می‌دهند. Broeckx و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که *L. acidophilus* ریز پوشانی شده توسط مالتو دکسترین در طول دوره نگهداری ۲۸ هفته‌ای در دمای یخچالی بیش از ۱ log کاهش را نشان ندادند. آنها

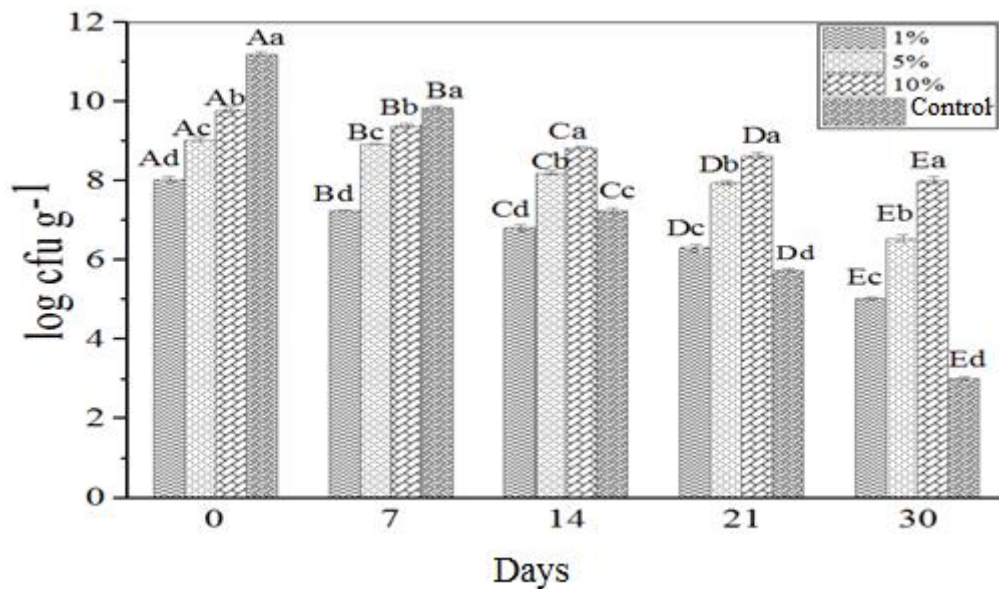


Figure 2. Viability (log CFU g⁻¹) of *L. acidophilus* as a free cell and encapsulated by AMG in refrigerated conditions.

شده و آزاد در شرایط شبیه سازی شده معده در pH = ۲ و ۳ در شکل ۳ به تصویر کشیده شده است. نتایج نشان داد که زنده‌مانی وابسته به غلظت صمغ آمونیاکوم مورد استفاده بود به طوری که با افزایش غلظت اثر محافظتی بر روی سلول‌ها افزایش پیدا کرد. سلول‌های آزاد کاهش قابل توجهی را در این دو شرایط نشان دادند و بنابراین نیاز است تا از طریق ریزپوشانی محافظت شوند. در سلول‌های آزاد شمارش سلول‌های زنده در pH ۲ به ۳/۹۹ log CFU g⁻¹ و در pH

۳-۵- بررسی میزان زنده‌مانی *L. acidophilus* ریز پوشانی شده در شرایط شبیه سازی شده معده

برخی از پروبیوتیک‌ها مقاومت کمی در برابر شرایط نامطلوب مجرای معده‌ای-روده‌ای دارند. برای غلبه بر این شرایط ریزپوشانی کردن سلول‌ها توسط خشک کردن پاششی معرفی شده است. زنده‌مانی *L. acidophilus* ریز پوشانی

مطالعه Pham و همکاران در سال ۲۰۰۸ پروبیوتیک‌ها بسته به نوع گونه تفاوت‌هایی را در مقاومت به اسید و قلیا نشان می‌دهند [۲۴]. Hashami و همکاران در سال ۲۰۲۳ گزارش کردند که سلول‌های ریز پوشانی شده *L. کازئی* توسط مخلوط پیسیلوم-ژلاتین در شرایط شبیه سازی شده معده ۴ log کاهش را نشان دادند در حالی که سلول‌های آزاد ۷ log کاهش را ثبت کردند [۱۱]. نتایج مشابهی توسط سایر مطالعات گزارش شد که کاهش قابل توجهی در زنده ماندن سلول‌های آزاد در طول شبیه‌سازی‌های دستگاه گوارش در شرایط pH پایین محیط مشاهده کردند [۲۵]. علاوه بر این روش ریز پوشانی و مواد مورد استفاده بر روی زنده‌مانی میکروکپسول‌ها در محیط اسیدی تاثیر گذار هستند. بنابراین استفاده از صمغ آمونیاکوم به عنوان ماده ریز پوشاننده می‌تواند از سلول‌ها در شرایط اسیدی محافظت کند.

۳ به $1/56 \log \text{CFU g}^{-1}$ افت پیدا کرد. استفاده از ریزپوشانی برای *L. اسیدوفیلوس* اثری محافظتی داشت از آنجا که کاهش زنده‌مانی در نمونه‌های با غلظت ۱۰٪ صمغ آمونیاکوم تنها $0/96 \log \text{CFU g}^{-1}$ و $0/78 \log \text{CFU g}^{-1}$ به ترتیب در pH ۲ و ۳ بود. علاوه بر این، غلظت صمغ آمونیاکوم مورد استفاده برای پوشش دادن نقش معنی‌داری بر روی زنده‌مانی دارد، به طوری که غلظت ۱۰٪ از صمغ آمونیاکوم اثر محافظتی بیشتری نسبت به غلظت‌های ۱٪ و ۵٪ داشت. در سطوح pH مورد استفاده در این مطالعه در غلظت‌های ۵٪ و ۱۰٪ از صمغ آمونیاکوم شمارش سلول‌های زنده پس از ۳ ساعت انکوباسیون بالاتر از $7 \log \text{CFU g}^{-1}$ باقی ماند.

کاهش زنده‌مانی *L. اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده توسط صمغ آمونیاکوم در pH پایین (۲ و ۳) زمانی که با نتایج مطالعات قبلی مقایسه شد، کمتر بود. این کاهش ممکن است به دلیل گونه‌های متفاوت میکروارگانیسم‌ها باشد، زیرا مطابق

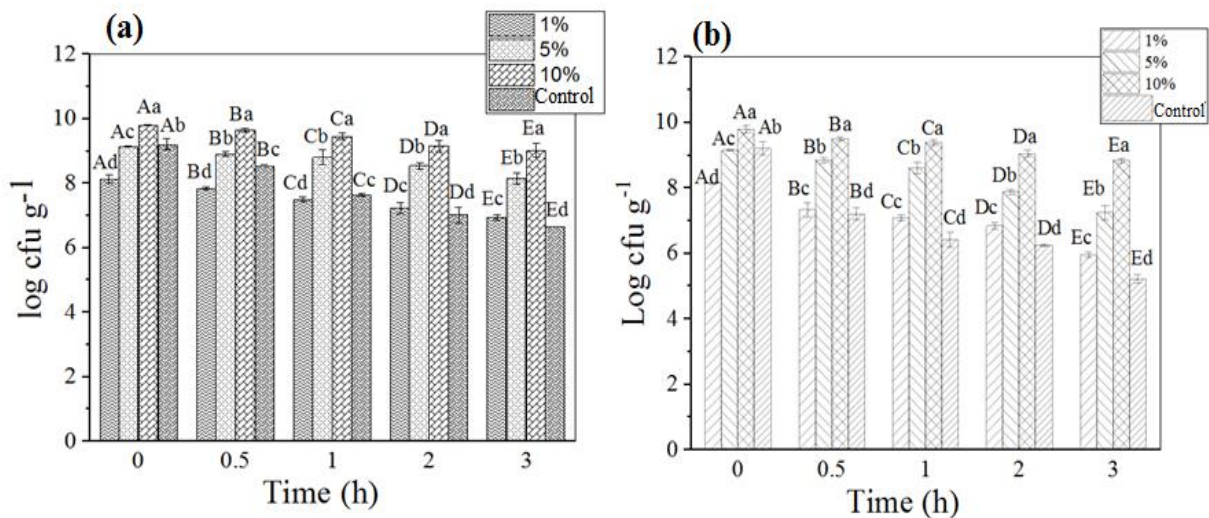


Figure 3. Viability ($\log \text{CFU g}^{-1}$) of *L. acidophilus* as a free cell and encapsulated by AMG in simulated gastric conditions (a) pH=3 and (b) pH=2.

ویژگی‌های مهم باکتری‌های پروبیوتیک توانایی زنده‌ماندن در شرایط قلبایی ایجاد شده در روده کوچک انسان است تا بتوانند به سکنی‌گزینی ادامه داده و در روده بزرگ تکثیر شوند. ریز پوشانی به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بر روی زنده‌مانی سلول‌های *L. اسیدوفیلوس* در محلول نمک‌های صفرایی حتی پس از ۶ ساعت انکوباسیون تاثیر گذار بود و

۳-۶- بررسی میزان زنده‌مانی *L. اسیدوفیلوس* ریز پوشانی شده در شرایط شبیه سازی شده نمک‌های صفرای

تاثیر ریز پوشانی بر روی زنده‌مانی *L. اسیدوفیلوس* در محلول نمک‌های قلبایی (5 g L^{-1} و 10 g L^{-1}) بررسی شد و نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است. یکی دیگر از

ریز پوشانی شده توسط غلظت ۱۰٪ صمغ آمونیاکوم (log) را در معرض نمک صغراوی 10 g L^{-1} به مدت ۶ ساعت قرار دادند کاهش $2.71 \log \text{ CFU g}^{-1}$ را مشاهده کردند که بیشتر از نتایج بدست آمده برای ل. اسیدوفیلوس ریز پوشانی شده توسط ۱۰٪ صمغ آمونیاکوم ($1.9 \log \text{ CFU g}^{-1}$) و کمتر از ۱٪ ($3.93 \log \text{ CFU g}^{-1}$) و ۵٪ ($3.15 \log \text{ CFU g}^{-1}$) صمغ آمونیاکوم بود [۲۷]. مقایسه بین نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر نشان می‌دهد که زنده‌مانی ل. اسیدوفیلوس ریز پوشانی شده توسط صمغ آمونیاکوم در صغرا قابل قبول است. علاوه بر این زنده‌مانی سلول‌های ریز پوشانی شده در غلظت‌های ۵٪ و ۱۰٪ صمغ آمونیاکوم پس از ۶ ساعت انکوباسیون بالاتر از $6 \log \text{ CFU g}^{-1}$ بود.

وابسته به غلظت صمغ آمونیاکوم مورد استفاده بود به طوری که با افزایش غلظت اثر محافظتی بر روی سلول‌ها افزایش پیدا کرد. نتایج مشابهی در مطالعات پیشین برای ل. کازئی ریز پوشانی شده توسط پروتئین آب پنیر گزارش شده است به طوری که سلول‌های آزاد ل. کازئی پس از ۶ ساعت انکوباسیون در 10 g L^{-1} محلول صغرای، کاهش معادل $5.96 \log \text{ CFU g}^{-1}$ را نشان دادند در حالی که سلول‌های ریز پوشانی شده تنها $2.95 \log \text{ CFU g}^{-1}$ کاهش پیدا کردند [۲۶].

زنده‌مانی سلول‌های آزاد و ریز پوشانی شده بیفیدوباکتریوم Bb-۱۲ بوسیله خشک کردن پاششی توسط آب پنیر در غلظت‌های مختلف صغرا توسط Castro-cislaghi و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش شد. آنها دریافتند که در صغرا با غلظت 5 g L^{-1} زنده‌مانی سلول‌های ریز پوشانی شده پس از ۶ ساعت انکوباسیون $1.71 \log \text{ CFU g}^{-1}$ کاهش پیدا کرد که مشابه نتایج بدست آمده برای ل. اسیدوفیلوس

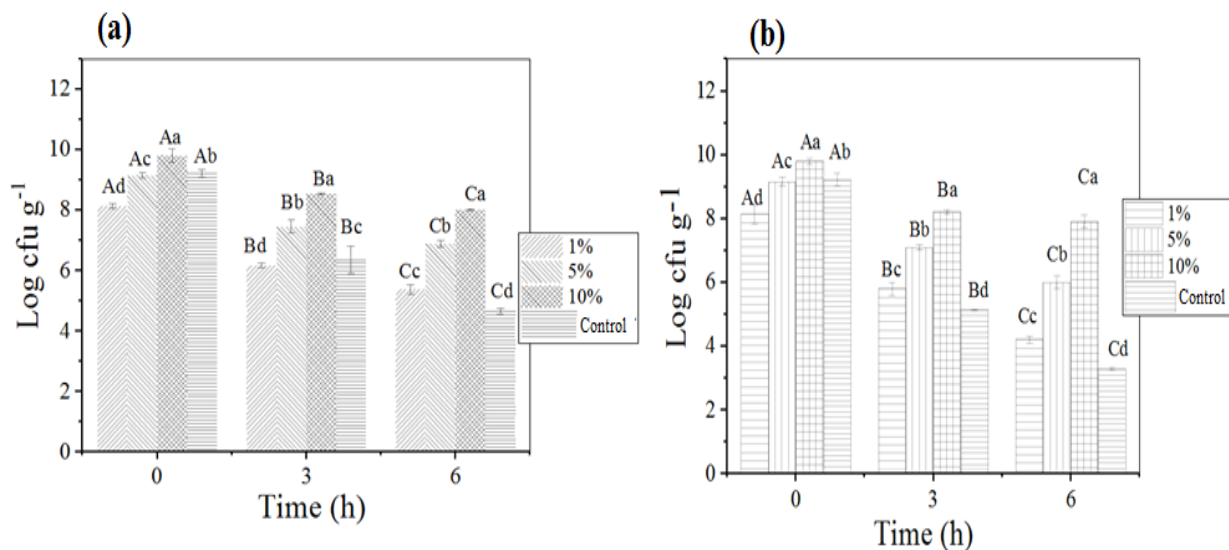


Figure 4. Viability ($\log \text{ CFU g}^{-1}$) of *L. acidophilus* as a free cell and encapsulated by AMG in simulated bile conditions (a) 0.5% and (b) 1%.

و در شکل ۵ نشان داده شده است. پودرهای خشک شده به روش پاششی دارای شکلی کروی با سطحی بدون ترک یا فشار مکانیکی و دارای تو رفتگی رایج مواد تولید شده توسط خشک کردن پاششی بودند. تشکیل تو رفتگی در سطح قطرات اتمایز شده می‌تواند به جمع شدگی (چروک) در طول

۳-۷- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

پودرهای ل. اسیدوفیلوس خشک شده به روش پاششی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مشاهده شد

می‌شود. صمغ آمونیاکوم توانایی انکپسوله کنندگی بسیار خوبی نشان داد که می‌توان از آن در بسیاری از فرمولاسیون‌های غذایی با این اهداف مورد استفاده قرار داد. از این صمغ

فرایند خشک کردن نسبت داده شود که به دلیل تبخیر سریع قطرات مایع است [۱۱].

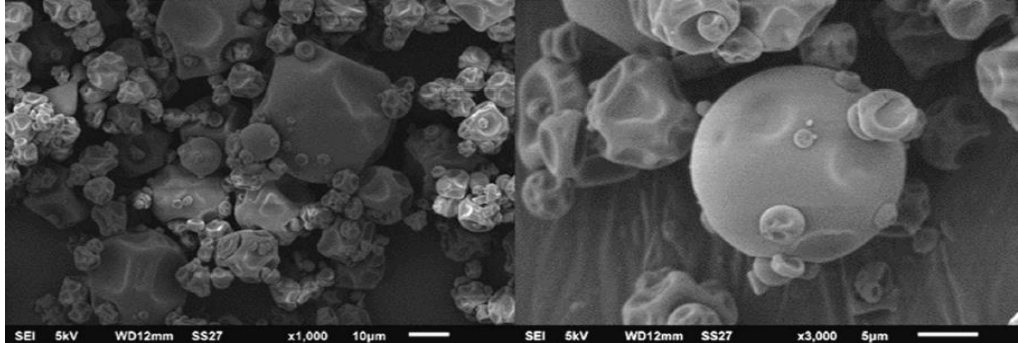


Figure 5. Scanning electron microscope (SEM) images

می‌توان در صنعت دارویی به عنوان اتصال دهنده در قرص‌ها و یا پایدار کردن سوسپانسیون‌ها مورد استفاده قرار داد. این خصوصیات بی نظیر در صمغ آمونیاکوم آن را به عنوان یک هیدروکلوئید کاربردی معرفی می‌کند.

۴- نتیجه گیری

موسیلاژ آمونیاکوم از گیاه *Dorema ammoniacum* ترشح شده و در برخی از مناطق ایران، افغانستان و پاکستان یافت

۵- منابع

- [1] Yoha KS, Moses JA, Anandharamakrishnan C (2023) Effect of different drying methods on the functional properties of probiotics encapsulated using prebiotic substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 107:1575–1588
- [2] Ebrahimi B, Ghanbarzadeh B, Rad AH, Hemmati S, Moludi J, Arab K, Karimi S (2021) Structural and physicochemical characterization of a novel water - soluble polysaccharide isolated from *Dorema*. *Polym Bull*. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03952-y>
- [3] Barchielli G, Capperucci A, Tanini D (2022) The role of selenium in pathologies: An updated review. *Antioxidants* 11:251
- [4] Xu C, Ban Q, Wang W, Hou J, Jiang Z (2022) Novel nano-encapsulated probiotic agents: Encapsulate materials, delivery, and encapsulation systems. *J Control Release* 349:184–205
- [5] Zhang R, Belwal T, Li L, Lin X, Xu Y, Luo Z (2020) Recent advances in polysaccharides stabilized emulsions for encapsulation and delivery of bioactive food ingredients: A review. *Carbohydr Polym* 242:116388
- [6] Zibaei R, Ebrahimi B, Rouhi M, Hashami Z, Roshandel Z, Hasanvand S, de Toledo Guimarães J, Mohammadi R (2023) Development of packaging based on PLA/POE/SeNPs nanocomposites by blown film extrusion method: Physicochemical, structural, morphological and antioxidant properties. *Food Packag Shelf Life* 38:101104
- [7] Ebrahimi B, Mohammadi R, Rouhi M, Mortazavian AM, Shojaee-Aliabadi S, Koushki MR (2018) Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT - Food Sci Technol* 87:54–60
- [8] Suryabhan P, Lohith K, Anu-Appaiah KA (2019) Sucrose and sorbitol supplementation on maltodextrin encapsulation enhance the potential probiotic yeast survival by spray drying. *Lwt* 107:243–248

- [9] Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, del Carmen Villarán M (2010) Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *Int J Food Microbiol* 142:185–189
- [10] Afzaal M, Khan AU, Saeed F, Ahmed A, Ahmad MH, Maan AA, Tufail T, Anjum FM, Hussain S (2019) Functional exploration of free and encapsulated probiotic bacteria in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *Food Sci Nutr* 7:3931–3940
- [11] Hashami Z, Sadeghi E, Ebrahimi B, Zibaei R, Hasanvand S, Roshandel Z, de Toledo Guimarães J, Mohammadi R (2023) Microencapsulation of *Lactobacillus casei* in psyllium–gelatin gum enriched with selenium: effects on bacterial survival under gastrointestinal and storage conditions. *Int J Food Sci Technol* 58:3502–3510
- [12] Guerin J, Petit J, Burgain J, Borges F, Bhandari B, Perroud C, Desobry S, Scher J, Gaiani C (2017) *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *J Food Eng* 193:10–19
- [13] Arepally D, Goswami TK (2019) Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *Lwt* 99:583–593
- [14] Poddar D, Das S, Jones G, Palmer J, Jameson GB, Haverkamp RG, Singh H (2014) Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by the drying method. *Int Dairy J* 39:1–7
- [15] Guerin J, Petit J, Burgain J, Borges F, Bhandari B, Perroud C, Desobry S, Scher J, Gaiani C (2017) *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *J Food Eng* 193:10–19
- [16] Tao T, Ding Z, Hou D, Prakash S, Zhao Y, Fan Z, Zhang D, Wang Z, Liu M, Han J (2019) Influence of polysaccharide as co-encapsulant on powder characteristics , survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 by spray drying. *J Food Eng* 252:10–17
- [17] Rajam R, Anandharamkrishnan C (2015) Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Sci Technol* 60:773–780
- [18] Paéz R, Lavari L, Vinderola G, Audero G, Cuatrin A, Zaritzky N, Reinheimer J (2012) Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Res Int* 48:748–754
- [19] Huang S, Vignolles M-L, Chen XD, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, Jeantet R (2017) Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends food Sci Technol* 63:1–17
- [20] Garvey CJ, Lenné T, Koster KL, Kent B, Bryant G (2013) Phospholipid membrane protection by sugar molecules during dehydration—insights into molecular mechanisms using scattering techniques. *Int J Mol Sci* 14:8148–8163
- [21] Krisch J, Kerekes EB, Takó M, Vágvölgyi C (2020) Application of immobilized cells and enzymes in the food industry. In: *Microb. Ferment. Enzym. Technol.* CRC Press, pp 115–127
- [22] Broeckx G, Vandenheuvél D, Henkens T, Kiekens S, van den Broek MFL, Lebeer S, Kiekens F (2017) Enhancing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after spray drying and during storage. *Int J Pharm* 534:35–41
- [23] Reyes V, Chotiko A, Chouljenko A, Sathivel S (2018) Viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 encapsulated with high maize starch, maltodextrin, and gum arabic. *LWT - Food Sci Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.017>
- [24] Pham M, Lemberg DA, Day AS (2008) Probiotics: sorting the evidence from the myths. *Med J Aust* 188:304–308

- [25] Dehkordi SS, Alemzadeh I, Vaziri AS, Vossoughi A (2020) Optimization of alginate-whey protein isolate microcapsules for survivability and release behavior of probiotic bacteria. *Appl Biochem Biotechnol* 190:182–196
- [26] Dimitrellou D, Kandylis P, Petrovi T, Levi S (2016) Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.007>
- [27] De Castro-Cislaghi FP, Carina Dos Reis ES, Fritzen-Freire CB, Lorenz JG, Sant'Anna ES (2012) *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *J Food Eng* 113:186–193



Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* by ammoniacum gum enriched with nanoselenium : investigating the survival rate in simulated gastrointestinal tract and storage period

Aziz Homayouni Rad¹, Behzad Ebrahimi^{2*}

1. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Maragheh University of Medical Sciences, Maragheh, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2023/7/4

Accepted: 2024/6/1

Keywords:

ammoniacum gum,

Microencapsulation,

nanoselenium

DOI: 10.22034/FSCT.21.154.66.

*Corresponding Author E-
ebrahimib@tbzmed.ac.ir

The increasing demand for hydrocolloids with specific functionality has led researchers to seek new hydrocolloid sources. One of the methods to enhance the viability of probiotics under stressful conditions is microencapsulation, to deliver these bacteria to the body in sufficient numbers and utilize their health-promoting effects. The aim of this study is to investigate the feasibility of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulation by ammonium gum (AMG) and its enrichment using nanoselenium, and determine its viability under stressful conditions. AMG was extracted from the mucilage of *Dorema Ammoniacum* plant using a solvent and then precipitated by alcohol. 1%, 5%, and 10% w/v solutions of AMG were prepared, and then nanoselenium particles synthesized at a concentration of 1.5% were added to the bacterial suspension with an average count of 6.85×10^{11} log CFU g⁻¹. The results showed that with an increase in the concentration of gum, the encapsulation efficiency significantly increased from 66% to 81%. The viability rate for 1%, 5%, and 10% concentrations of AMG under refrigeration conditions was 62.43%, 72.37%, and 81.83%, respectively. Under simulated gastric conditions at the pH levels used in this study, the counts of viable cells after 3 h of incubation for 5% and 10% concentrations of AMG remained higher than 7 log CFU g⁻¹. After 6 h of incubation in a 10 g L⁻¹ solution, the free cells showed a decrease to 5.93 log CFU g⁻¹, while for microencapsulated cells at concentrations of 1%, 5%, and 10%, it was only 3.93 log CFU g⁻¹, 3.15 log CFU g⁻¹, and 1.9 log CFU g⁻¹, respectively. The results showed that AMG has very good encapsulation properties, which can be used in many food formulations for these purposes.