DOI: http://dx.doi.org/ 110.22104/JIFT.2021.4789.2036

فصلنامه فناوری‌های جدید در صنعت غذا، دوره ۸، شماره ۴، صفحه ۴۱۴-۳۹۹، تابستان ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* ریزدرون پوشانی شده دو لایه با آلژینات سدیم و صمغ بنه (*Pistacia atlantica subsp. kurdica*)

سید سعید سخاوتی زاده[1*]، محسن عابدی[2]، فاطمه همتی[3]، ریحانه گودرزی نژاد[3]، نجمه میرزایی[3]، سیده نجمه افراء[3]

۱. استادیار، گروه صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی، شیراز

۲. مربی، گروه دامپزشکی، موسسه آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی، تهران

۳. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی، شیراز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۴۰۰/۰۳/۰۶، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹)

چکیده

هدف از این پژوهش عمل ریزدرون‌پوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* با استفاده از فن اکستروژن دولایه توسط سدیم آلژینات و صمغ دانه بنه (پسته وحشی) بود. صمغ دانه بنه در غلظت‌های (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸) درصد در ریزدرون‌پوشانی به کار رفت. خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ماندگاری فرم آزاد و ریزدرون‌پوشانی شده (دانک) در طول مدت نگهداری و شرایط مشابه معده‌ای و روده‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دانک‌های تولیدی کروی بودند. با افزایش غلظت صمغ بنه (پسته وحشی) قطر دانک افزایش معنی‌دار داشته، ولی مؤلفه L^* کاهش داشت. تمامی دانک‌ها و باکتری آزاد در دمای ۷۲ °C کاهش یافتند. ولی دانک‌ها دارای ماندگاری بیشتری نسبت به باکتری آزاد بودند. باکتری آزاد و دانک در طول مدت نگهداری در شرایط مشابه معده و روده کاهش یافتند. کاهش باکتری آزاد Log CFU/ml ۶/۲ بوده که به‌مراتب بیشتر از دانک Log CFU/ml ۲/۵۸ بوده است. باکتری آزاد تا روز بیستم از مینیمم حد مجاز باکتری پروبیوتیک CFU/mL $۱۰^۶$ در شرایط آزمایشگاهی برخوردار بوده است. در صورتی که این زمان برای دانک‌ها تا روز سی‌ام بود. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از صمغ بنه می‌تواند ماندگاری باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* را در شرایط نامناسب افزایش دهد.

کلید واژه‌ها: اکستروژن، ریزدرون‌پوشانی، لاکتوباسیلوس روتری، صمغ بنه

[*] نویسنده مسئول: s.sekhavati@areeo.ac.ir

۱. مقدمه

بر طبق تعریف FAO/WHO پروبیوتیک‌ها میکرو ارگانیزم‌های زنده‌ای هستند؛ که چنانچه به مقدار کافی در غذا وجود داشته باشند، می‌توانند به روده رسیده و باعث ایجاد تعادل میکروبی در روده می‌شوند. ایجاد سلامت روده و سیستم ایمنی بدن، اثرات ضد سرطان، ضد اسهال، هیپو کلسترومیک[1] و کاهش عدم تحمل لاکتوز ازجمله مزایای اثبات‌شده باکتری‌های پروبیوتیک است. باکتری‌های پروبیوتیک عمدتاً به گونه‌هایی از جنس‌های *لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریا* تعلق دارند [۱].

لاکتوباسیلوس روتری یک باکتری پروبیوتیک است. این باکتری ازجمله فلورنرمال دستگاه گوارش حیوانات می‌باشد، به راحتی در روده تشکیل کلنی داده و رشد باکتری‌های بیماری‌زا را مهار می‌کند. از سوی دیگر به‌عنوان باکتری پروبیوتیک در ماست و پنیر استفاده می‌شود. این باکتری به‌عنوان پروبیوتیک به محصولات خشک یا مواد غذایی منجمد که دارای ماندگاری بالایی هستند مانند شیر خشک، بستنی، غلات، حبوبات، شکلات، آب‌نبات نیز اضافه می‌شود [۲].

برای اعمال اثر مفید پروبیوتیک، غلظت باکتری‌های پروبیوتیک زنده باید در زمان مصرف حداقل 10^6 CFU/g در محصول غذایی باشد. ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیک به‌طور گسترده‌ای در بسیاری از محصولات لبنی تخمیری و شرایط مشابه دستگاه گوارش انسان مورد مطالعه قرارگرفته است. باکتری‌های پروبیوتیک در معرض شرایط نامناسب محیطی مانند اسید معده، اکسیژن مولکولی، آنتی‌بیوتیک‌ها و یون هیدروژن کاهش می‌یابند [۳].

امروزه استفاده از فناوری ریزدرون‌پوشانی، ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات غذایی، افزایش داده‌شده است. فناوری ریزدرون‌پوشانی باعث ایجاد مقاومت باکتری‌های پروبیوتیک در هنگام بسته‌بندی و پرکردن داغ شده است. همچنین مدت‌زمان نگهداری را افزایش داده و باعث ماندگاری بیشتر باکتری ضمن عبور از دستگاه گوارش، شده است. به‌علاوه، ریزدرون‌پوشانی از تخمیر ماده غذایی توسط باکتری پروبیوتیک جلوگیری می‌کند. درنتیجه از تأثیر نامناسب آن‌ها بر خواص حسی و بافتی محصولات می‌کاهد [۴].

روش اکستروژن ازجمله قدیمی‌ترین روش تولید میکرو کپسول (دانک) است. در این روش ابتدا باکتری با یک هیدروکلوئید مناسب مخلوط خواهد شد و سپس این محلول به‌صورت قطره‌قطره به داخل کلرید کلسیم ریخته می‌شود. کلرید کلسیم نقش سفت کننده دانک را دارد. این روش به دلیل سهولت کار و هزینه کم بسیار محبوب است. آلژینات یک هترو پلی‌ساکارید خطی است. معمولاً کلسیم موجود در کلرید کلسیم با پلیمر ال‌گلیورونیک اسید (L-guluronic acid) موجود در آلژینات پیوند برقرار کرده و تنها جزء آزاد ساختمان آلژینات که دی‌مانویورنیک اسید (D-mannuronic acid) است؛ در تشکیل ژل شرکت می‌کند. قطر کپسول‌های به وجود آمده بین ۲ mm تا ۳ است. اندازه دانک به ویسکوزیته محلول آلژینات سدیم، قطر سرنگ، فاصله سر سرنگ با محلول کلرید کلسیم بستگی دارد. بهتر است برای تهیه دانک‌های کوچک‌تر از آلژیناتی بهره برد؛ که میزان گلیورونیک اسید آن کم باشد [۵].

آلژینات دارای مشکلاتی در ریزدرون‌پوشانی نیز می‌باشد. به عنوان مثال متخلخل بودن ژل آلژینات باعث نفوذپذیری دانک به رطوبت، ازجمله شیره معده و شیره روده و نمک‌های صفراوی می‌شود که نتیجه آن، کاهش محافظت در برابر عوامل محیطی است؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود از موادی به‌عنوان پرکننده لایه آلژینات استفاده شود. یکی از این مواد کیتوزان است که برای پوشاندن لایه آلژینات استفاده می‌شود تا آن را پایدارتر کند [۶]. علاوه بر آلژینات کلسیم از مواد دیگری نیز جهت ریزدرون‌پوشانی استفاده می‌شود که ازجمله آن می‌توان به پروتئین‌های آب‌پنیر و صمغ‌ها اشاره نمود. دراین‌بین استفاده از صمغ‌های بومی بسیار مهم است. یکی از این صمغ‌های بومی صمغ دانه بنه است.

بنه یا پسته وحشی (*Pistacia atlantica subsp. kurdica*) گیاهی از خانواده *Ancardiaceae* است. کشت این گیاه بیش از ha ۱،۲۰۰،۰۰۰ وسعت داشته و عمدتاً در غرب (کوه‌های زاگرس) و به صورت محدود در قسمت مرکزی و شرقی ایران پوشیده شده است [۷].

1. Hypocholestromic

صمغ رزین گیاه که صمغ ماستیک[1] نیز نامیده می‌شود، با ایجاد زخم در تنه و شاخه‌ها ضخیم به‌صورت ترشح به دست می‌آید. صمغ بنه برای بیش از ۲۵۰۰ سال در طب سنتی یونان برای درمان انواع اختلالات دستگاه گوارش مانند درد عصبی معده، سوءهاضمه و زخم معده مورد استفاده قرار می‌گرفته است. پزشکان یونان باستان، مانند بقراط خواص آن را ذکر کرده و استفاده از آن را توصیه نموده‌اند. از سوی دیگر صمغ ماستیک (به صورت قابل‌توجهی) دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی است [۸].

امروزه از صمغ بنه در تولید آدامس‌ها، شیرینی‌ها، دسرها، محصولات شیری، بستنی، ماست، نوشیدنی‌های الکلی و غیرالکلی استفاده می‌شود. این صمغ علاوه بر اثر طعم‌دهندگی، باعث ایجاد تغییرات قابل‌توجهی در پروفایل بافت این محصولات نیز شده است [۹].

با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی بر روی ریزدرون‌پوشانی دولایه توسط صمغ بنه بر روی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* صورت نگرفته است. لذا در این مطالعه، از روش اکستروژن دولایه (شامل آلژینات سدیم به‌عنوان لایه اول و صمغ بنه به‌عنوان لایه دوم) برای ریزدرون‌پوشانی *لاکتوباسیلوس روتری* استفاده شد. اهداف اصلی این مطالعه افزایش ماندگاری باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در بافر سدیم سیترات در طی مدت نگهداری در دمای ۴ °C با تکنیک ریزدرون‌پوشانی دولایه بود. همچنین ماندگاری باکتری و دانک در شرایط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش، تیمارهای حرارتی و محیط نمکی نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

۲. مواد و روش کار

۱.۲. مواد

باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* (PTCC ۱۷۴۴) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه گردید. MRS ، Gas pack Anaerocult® A Merck MRS Agar،broth، پپتون‌واتر، کلرید کلسیم، بافر فسفات شامل دی پتاسیم هیدروژن فسفات و دی پتاسیم هیدروژن فسفات، نمک طعام، دی سدیم هیدروژن فسفات از شرکت مرک آلمان خریداری شد. آلژینات سدیم، (oxgall, Sigma B838)، پپسین (porcine stomach mucosa, sigma)، پانکراتین (Pancreatin from porcine pancreas. Sigma, 1750) از شرکت سیگما - آلدریچ نمایندگی فرانسه خریداری شد. آنزیم لیپاز (Protease from *Bacillus licheniformis*, Fluka 62305) از شرکت فولکا، آمریکا خریداری گردید.

۲.۲. روش آماده‌سازی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری*

باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* (PTCC 1655) به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران، سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید و برای فعال‌سازی از محیط MRS مایع (Merck, Germany) و به‌منظور بی‌هوازی شدن محیط از پارافین مایع استریل استفاده شد. محیط کشت در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۸ h گرمخانه گذاری شد. در مرحله بعد محیط کشت میکروبی به‌وسیله سانتریفوژ با دور ۲۴۲۵ g به مدت ۱۰ min سانتریفوژ شد و رسوب ته لوله جداسازی گردید. رسوب به‌وسیله محلول آب پپتونه ۱/۵٪ دو مرتبه شستشو داده شد. سپس به وسیله آب مقطر حجم رسوب به ۱ ml رسانده شد. در مرحله بعد تعداد باکتری‌های موجود در رسوب به وسیله روش شمارش استاندارد پلیت هوازی تعیین گردید. پلیت‌ها به مدت ۴۸ h در دمای ۳۷ °C و شرایط بی‌هوازی گازپک نوع A (Merck, Germany) گرمخانه گذاری شدند.

۳.۲. روش ریزدرون‌پوشانی

بعد از فعال‌سازی باکتری، باکتری‌های کشت داده‌شده در محیط مایع، به‌وسیله سانتریفوژ در دور ۲۸۰۰g به مدت ۱۰ min سانتریفوژ شد، رسوب باکتری با پپتون‌واتر ۰/۱٪ استریل دو مرتبه شستشو داده شد. حجم سلول‌های شستشو داده‌شده باکتری، توسط نرمال سالین به ۵ ml رسانده شد و جذب نوری آن به وسیله طیف سنجی (در طول موج ۶۰۰ nm) اندازه‌گیری شد. هم‌زمان شمارش کلی باکتری‌ها در پلیت حاوی محیط کشت MRS انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ h در دمای ۳۷ °C تحت شرایط بی‌هوازی با

1 . Mastic gum

استفاده از جار بی‌هوازی و Anaerocult® A merck, Gas pack, Germany گرمخانه گذاری شدند. برای ریزدرون-پوشانی از تکنیک اکستروژن به صورت دولایه‌ای استفاده گردید. لایه اول سدیم آلژینات و لایه دوم صمغ بنه در نظر گرفته شد. به منظور ریزدرون‌پوشانی، ۵ ml از کشت باکتریایی شسته شده (در غلظت حدود $۱۰^{۱۰}$CFU/ml ×۳/۸) در ۱۵ ml محلول آلژینات سدیم ۲٪ حل گردید. محلول فوق توسط نیدل ۰/۱۱ mm به صورت قطره قطره به ۵۰ml محلول $CaCl_2$ ۰/۱M استریل اضافه گردید. پس از ۳۰ min حدود ۲۰ g از دانک‌های به وجود آمده، به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد. در مرحله بعد دانک‌ها توسط پپتون‌واتر ۰/۱٪ استریل چندین بار شستشو شد. سپس دانک‌ها به۱۰۰ ml محلول صمغ بنه در چهار غلظت (۰/۸، ۰/۶، ۰/۴، ۰/۲٪) به تفکیک اضافه شد. سپس روی شیکر ارلن در دور ۳۰ rpm به مدت ۴۰min قرار داده شد. در مرحله بعد دانک‌ها توسط پپتون‌واتر ۰/۱٪ استریل چندین بار شستشو شد. آزمون‌های زیر بر روی دانک‌های تولیدی انجام گردید [۱۰].

۴.۲. شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در کپسول

بعد از مخلوط کردن باکتری شسته شده و محلول آلژینات سدیم، تعداد باکتری‌های موجود دریک گرم مخلوط شمارش شد (N_O). بعد از اتمام تولید دانک، یک گرم از دانک‌های تهیه‌شده را با ۹ ml محلول استریل بافر فسفات (۰/۱ M و pH= ۷) مخلوط و بعد از پراکنده شدن و یکنواختی محلول و به مدت ۱۰ min در دمای اتاق توسط دستگاه استوماکر (Bag mixer 400 P, Interscince) ساخت کشور فرانسه در دمای آزمایشگاه و سرعت حرکت پادل ۱ بار در ثانیه هم زده گردید؛ تا کپسول‌ها به‌طور کامل حل و باکتری‌ها در محلول استریل بافر، آزاد شوند. بر روی محلول بافر حاوی باکتری‌های آزادشده رقت سازی انجام شد و شمارش میکروبی بر طبق شمارش استاندارد در محیط کشت MRS agar صورت پذیرفت. سپس پلیت‌های محیط کشت به مدت ۴۸ h در دمای ۳۷ °C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از جار بی‌هوازی و Anaerocult® A Gas pack, merck,Germany گرمخانه گذاری شدند. بازده ریزدرون‌پوشانی با استفاده از فرمول زیر به دست آمد.

$$\text{بازده ریزدرون‌پوشانی} = N/N_O \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

N_0 تعداد باکتری‌های موجود دریک گرم مخلوط آلژینات، N تعداد سلول‌های آزادشده از دانک بعد از اضافه شدن بافر و قرارگیری در استوماکر می‌باشد [۱۱].

۵.۲. آزمون شکل و اندازه دانک‌ها

اندازه و شکل دانک‌های حاصل از ریز درون پوشانی سلول‌های میکروبی به‌وسیله میکروسکپ نوری Olympus BX51, Japan دارای لام میکرومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت طول به عرض ۲۰ عدد از دانک‌ها نیز سنجش گردید. جهت تعیین نسبت ابعاد از تقسیم دو قطر دانک بر هم استفاده گردید.

۶.۲. بررسی شکل و ساختار دانک‌ها توسط میکروسکپ الکترونی روبشی

نمونه‌های خشک‌کن پوششی قبل از بررسی در میکروسکپ الکترونی روبشی (SEM, VEGA3, TESCAN, Czech Republic) بر روی نگه دارنده آلومینیوم ثابت شده و در یک دستگاه پاششی با طلا (Desk Sputter Coater DSR1, Nanostructural Coating Co. Iran) پوشش داده شد. سپس نمونه‌ها تحت ولتاژ ۱۰/۰ kv مشاهده شدند. فاصله کار لنز میکروسکپ و سطح نمونه ۸/۹۱-۷/۰۳ mm بود.

۷.۲. اندازه‌گیری بافت دانک

به منظور سفت شدن بهتر بافت دانک، بافت دانک‌ها ریز درون‌پوشانی شده با درصد مختلف صمغ بنه (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸٪)، بعد از گذشت ۲۴ h از زمان تولید، در دمای ۴ °C نگهداری و سپس دانک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور از دستگاه بافت سنج، Brookfield CT3 4500 USA استفاده گردید. در این دستگاه آزمون فشردگی دومرحله‌ای با استفاده از پروب استوانه‌ای از جنس استیل ضد زنگ با

قطر ۳۵ mm استفاده شد و سرعت پروب mms^{-1} ۰/۱ در حالت فشردگی و فاصله گسستگی[1] ۱ mm در نظر گرفته شد. برای هر نمونه تمام این اندازه‌گیری‌ها در دمای ۱°C ±۷ در حداقل ۴ تکرار انجام شد و در هر تکرار از ۱۰ عدد دانک استفاده گردید [۱۲].

۸.۲. ارزیابی رنگ دانک

به منظور ارزیابی رنگ دانک از روش عکس‌برداری دیجیتال توسط دستگاه رنگ‌سنج (Chroma meter CR-400, Japan) استفاده گردید. دستگاه با کاشی سفید استاندارد L^*= ۹۲/۲۳، a^*= -۱/۲۹ و b^*= ۱/۱۹ 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.

۹.۲. بررسی میزان بقای باکتری‌های ریزدرون‌پوشانی شده و آزاد در محلول نمک طعام و اسیدی

باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* ریزدرون‌پوشانی شده و آزاد، از هرکدام به‌صورت جداگانه، به بافر glycine–HCl (pH ۱/۵) حاوی ۱۵٪ نمک طعام اضافه گردید. از دو نمونه در زمان‌های ۰،۳۰، ۶۰، ۹۰ min نمونه برداری شد و بر روی محیط MRS به صورت پورپلیت کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۴۸ h در دمای ۳۷ °C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از جار بی‌هوازی و Anaerocult® A Gas pack, Merck,Germany گرمخانه گذاری شدند [۱۳].

۱۰.۲. ارزیابی مقاومت حرارتی باکتری‌های ریزدرون پوشانی شده و آزاد

ابتدا باکتری آزاد و دانک به‌طور مجزا، به محیط MRS broth تلقیح شد و در حمام آب گرم ۷۲ °C قرار گرفت. سپس در زمان‌های min (۴، ۳،۲،۱،۰) از باکتری آزاد و دانک نمونه‌برداری انجام شد و بعد از رقیق‌سازی، در محیط MRS agar به‌صورت Pourplate و تحت شرایط بی‌هوازی کشت داده شده و برای رقیق‌سازی دانک از بافر فسفات با (pH= ۷) استفاده شد.

۱۱.۲. ماندگاری باکتری‌های ریزدرون‌پوشانی شده و آزاد در شرایط مشابه غذایی

بقای سلول‌های *لاکتوباسیلوس روتری* آزاد و میکروکپسوله شده در طولانی مدت ذخیره سازی یخچال مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا نمونه‌ها در محیط MRS broth به طور مستقل کشت داده شدند. سپس در دمای ۴ °C قرار گرفتند. در مرحله بعد در روز اول و هر ۷ روز یک بار از نمونه‌های موجود در یخچال، نمونه‌برداری و در محیط MRS agar تحت شرایط بی‌هوازی کشت داده شد [۱۴].

۱۲.۲. ماندگاری در شرایط مشابه معدی و روده‌ای انسان

به این منظور ۱ g دانک در ۹ ml محلول ۰/۵٪ نمک طعام در لوله‌های استریل ریخته سپس pH همه نمونه‌ها با استفاده از اسیدکلریدریک ۱ N به ۱/۴ الی ۱/۹ رسانیده شد. سپس آنزیم لیپاز (Fluka 62305) و پپسین (porcine mucosa, sigma stomach) آن‌قدر اضافه شد تا غلظت نهایی این دو ترکیب به ترتیب به ۰/۹ mg/l و ۳۰۰ نمونه رسید. سپس نمونه‌ها در انکوباتور متحرک (Lab tech, korea) با سرعت ۱۵۰ rpm و دمای ۳۷ °C به مدت ۲ h قرار گرفتند (فاز معدی). در مرحله بعد pH نمونه‌ها به ۵/۲-۴/۳ با استفاده از محلول قلیایی (که شامل ۱۵۰ml سود یک نرمال که حاوی ۱۴ g/L دی سدیم هیدروژن فسفات بود)، رسانده شد. سپس صفرا (oxgall, Sigma B838) و پانکراتین (Pancreatin from porcine pancreas. Sigma, 1750) به ترتیب با غلظت ۱۰ g و ۱ بر لیتر به نمونه‌ها اضافه شدند و مجدداً نمونه‌ها در انکوباتور متحرک با سرعت ۱۵۰rpm و دمای ۳۷ °C به مدت ۲ h قرار داده شدند (فاز اول روده‌ای). درنهایت با استفاده از محلول قلیایی قبلی pH نمونه‌ها به ۷/۵- ۶/۷ رسانیده شد و صفرا و پانکراتین در همان غلظت مرحله قبل اضافه شد. مجدداً نمونه‌ها در انکوباتور متحرک با سرعت ۱۵۰rpm و دمای ۳۷ °C به مدت ۲ h قرار داده شدند (فاز دوم روده‌ای). نمونه‌گیری به منظور

1. Rupture

شمارش پروبیوتیک‌های مورد نظر در min ۳۰، h (۲، ۴ و ۶) با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی ذکرشده، انجام شد [۱۵].

۱۳.۲. آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (SPSS نسخه ۲۲) آنالیز گردیدند. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. جهت آنالیز آماری داده‌ها در طول مدت نگهداری از جدول آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای بررسی اختلاف میانگین‌ها در سطح احتمال خطای ۵٪ از آزمون دانکن استفاده گردید. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ استفاده گردید.

۳. نتایج و بحث

باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* به‌خوبی در آلژینات سدیم و صمغ بنه ریزدرون‌پوشانی گردید. بازده ریزدرون‌پوشانی ۹۱/۲٪ بود. دانک‌های به‌دست‌آمده همگی کروی بودند و دارای نسبت ابعاد ۱/۰۸ بودند. لایه سدیم آلژینات به‌عنوان لایه داخلی نسبت به لایه بیرونی که صمغ بنه بود به‌طور مستقل در میکروسکپ نوری شناسایی شد (شکل ۱).

۱.۳. شکل، اندازه، رنگ، بافت و بازده ریز درون پوشانی دانک

قطر لایه آلژینات در تمام دانک‌های تولید شده ثابت بود ولی با تغییر غلظت صمغ بنه در ریزدرون‌پوشانی، قطر دانک افزایش معنی‌دار داشته است ($p\leq$۰/۰۵) ضخامت قطر لایه صمغ بنه بین µm ۱۹/۷۱ تا ۲۴/۳۹ بود.

در این تحقیق دانک‌ها کروی بوده و قطری در حدود µm ۳۴۰۰ را داشتند. در تحقیق فوم[1] و همکاران در سال ۲۰۱۵ باکتری *بیفیدوباکتریوم لانگوم*[2] را با استفاده از سدیم آلژینات و عصاره سوسن آمریکایی[3] ریزدرون‌پوشانی نمودند. دانک‌های تولید شده به وسیله تکنیک اکستروژن µm ۱ تا ۳ میکرون قطر داشت که با یافته‌های این تحقیق مطابقت دارد [۱۶].

در تحقیق حاضر با افزایش صمغ بنه، قطر لایه صمغ بنه نیز افزایش‌یافته است. در همین راستا در مطالعه‌ای ریزدرون پوشانی بر روی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[4] ATCC ۵۴۷، *بیفیدوباکتریوم‌بیفیدوم*[5] ATCC ۱۹۹۴ و *لاکتوباسیلوس کازیی*[6] انجام شد. نتایج نشان داد که ضخامت دانه‌های آلژینات با اضافه کردن لایه دوم ریزدرون‌پوشانی افزایش می‌یابد [۱۲]. ولی نوع ماده به‌کاررفته در ریز پوشانی تأثیری بر قطر، اندازه و مرفولوژی دانک تولیدی نداشت [۱۷].

کروی بودن دانک‌ها ازآن‌جهت مهم است که لایه‌های محافظ دانک به یک نسبت در اطراف باکتری‌ها قرار می‌گیرند. این لایه‌ها جلوی برخورد باکتری با مواد غذایی درون نمونه را می‌گیرند تا باکتری‌های ریزرون‌پوشانی در غذا رشد نکنند [۱۱]. همچنین بزرگ بودن دانک‌های تولیدشده به روش اکستروژن (µm ۰/۵ تا ۳) و افزایش قطر لایه‌های محافظ دانک نسبت به سایر فن‌های ریزدرون پوشانی، باعث افزایش حفاظت فیزیکی دانک‌ها می‌شود [۱۸].

میزان بازدهی ریزدرون‌پوشانی (۹۱/۲٪) در این تحقیق بسیار مناسب است. یکی از دلایل آن می‌تواند ایجاد ترکیبی از آلژینات با الیگوساکاریدها (آرابینوگالاکتان) باشد؛ که احتمالاً تخلخل سطح دانک‌ها را کاهش می‌دهد و از سوی دیگر از نشت باکتری‌ها را به داخل محیط جلوگیری می‌کند. به‌عنوان‌مثال در تحقیقی که سولتانا[7] و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام دادند، مشخص گردید که اضافه کردن نشاسته ذرت به آلژینات سدیم می‌تواند بازده ریزدرون‌پوشانی را افزایش بدهد [۱۹].

یکی از مهم‌ترین عواملی که بر روی بازده ریزدرون‌پوشانی مؤثر است؛ نوع مواد به‌کاررفته در دانک می‌باشد. به عنوان مثال در مطالعه‌ای میزان بازده ریزدرون‌پوشانی را با آلژینات سدیم برای باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* ۸۳/۳۳ درصد ذکر گردید [۲۰]. با این حال، بازده ریزدرون‌پوشانی بر باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس[8] در پژوهشی دیگر متفاوت بود

1. Phoem
2. *Bifidobacterium longum*
3. *Eleutherine americana*

4. *Lactobacillus acidophilus*
5. *Bifidobacterium bifidum*
6. *Lactobacillus casei*
7. Sultana
8. *L.acidophillus*

(۸۴/۳۵٪) که دلیل آن ممکن است تفاوت در مواد ریز درون پوشانی باشد (لایه‌ی اول پکتین و لایه‌ی دوم پروتئین آب‌پنیر تیمار حرارت داده‌شده) [۲۱].

با افزایش غلظت صمغ بنه مؤلفه L^* کاهش معنی‌دار داشت؛ که نشان‌دهنده تیره‌تر شدن رنگ محصول می‌باشد.

مؤلفه‌های b^* و a^* نیز با افزایش غلظت صمغ بنه، افزایش معنی‌دار داشتند ($p\leq$۰/۰۵) که نشان‌دهنده تمایل به زردی و قرمزی در دانک تولیدشده با افزایش غلظت صمغ بنه در لایه خارجی می‌باشد.

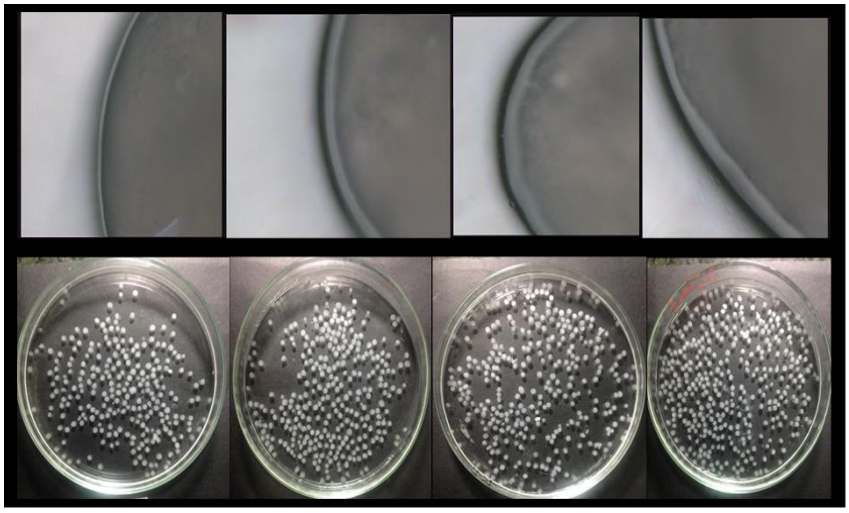
جدول (۱) بررسی خصوصیات فیزیکی دانک‌های تولیدشده با مقادیر مختلف صمغ بنه

Table 1. The determination of physical properties of beads produced with different amounts of mastic gum

خصوصیات فیزیکی دانک/ غلظت صمغ بنه برحسب درصد Physical properties of beads / mastic gum Concentration	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
قطر سدیم آلژینات (µm) Sodium alginate	3300.56+22.74[a]	3408.67+39.15 [a]	3343.78+32.82[a]	3351.86+18.06 [a]
قطر لایه بنه (µm) mastic diameter(µm)	19.71+0.24 [b]	19.99+0.52 [b]	21.12+0.33 [ab]	24.39+2.28 [a]
سفتی بافت(g) Hardness (g)	17.88+0.88 [a]	18.9+1.98 [a]	19.00+3.18 [a]	20.17+0.85 [a]
L*	59.00+1.07[a]	54.44+1.63 [b]	53.33+0.69 [b]	55.11+1.15 [b]
a*	-1.56+0.34 [a]	-0.67+0.24 [b]	-0.69+0.29 [b]	0.33+0.29 [b]
b*	7.88+0.35 [a]	8.00+0.67 [a]	7.89+0.39 [a]	10.22+0.32 [b]

* اعداد (میانگین سه تکرار± خطای استاندارد) هستند؛ میانگین‌های با حروف غیر یکسان در هر ردیف دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند($p\leq$۰/۰۵).

Data (mean ± standard error) are from three replicates.
The results with different upper letters in each row are statistically significant ($p\leq0.05$).

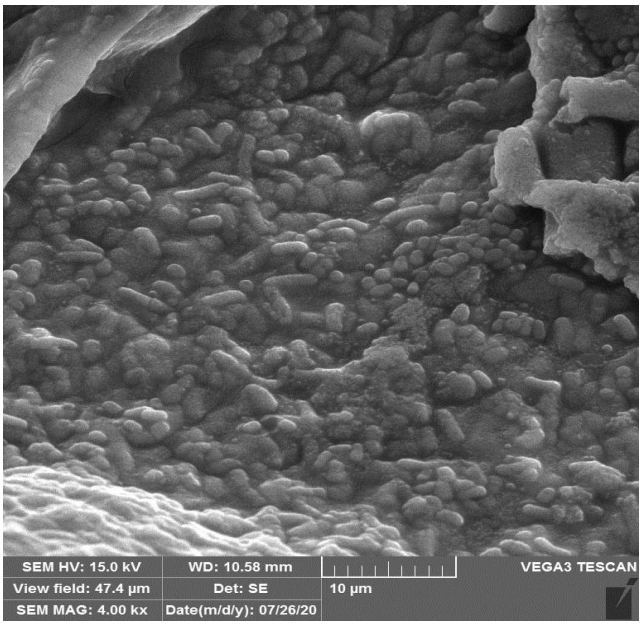


شکل (۱) ردیف بالا از چپ به راست تصویر دانک تولیدی با صمغ بنه به ترتیب در غلظت‌های (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸٪)؛ ردیف پایین تصویر میکروسکپی (۴۰X) انواع دانک به همان ترتیب بالا

Fig 1. Top row from left to right, the image of the produced beads with mastic gum in concentrations (0.2, 0.4, 0.6, 0.8%) respectively; Bottom row microscopic image (X40) of the same type of beads as above

۲.۳. تصویر میکروسکپ الکترونی

تصاویر (شکل ۲) نشان‌دهنده لایه آلژینات و بنه در دانک تولیدشده است. در این شکل توزیع همگن *L. reuteri* در لایه آلژینات مشاهده می‌شود. با پوشانده شدن آلژینات توسط بنه، مورفولوژی سطح تغییر می‌کند. افزودن بنه باعث ایجاد سطح صاف‌تر دانک می‌شود؛ بنابراین، دانک یک مانع فیزیکی سالم برای سلول‌های محصورشده فراهم می‌کند [۱۷].



شکل (۲) از چپ به راست دانک تک لایه حاوی سدیم آلژینات و دانک دولایه حاوی سدیم آلژینات و صمغ بنه

Fig 2. From left to right, the single-layer beads containing sodium alginate and double layers with sodium alginate and mastic gum respectively

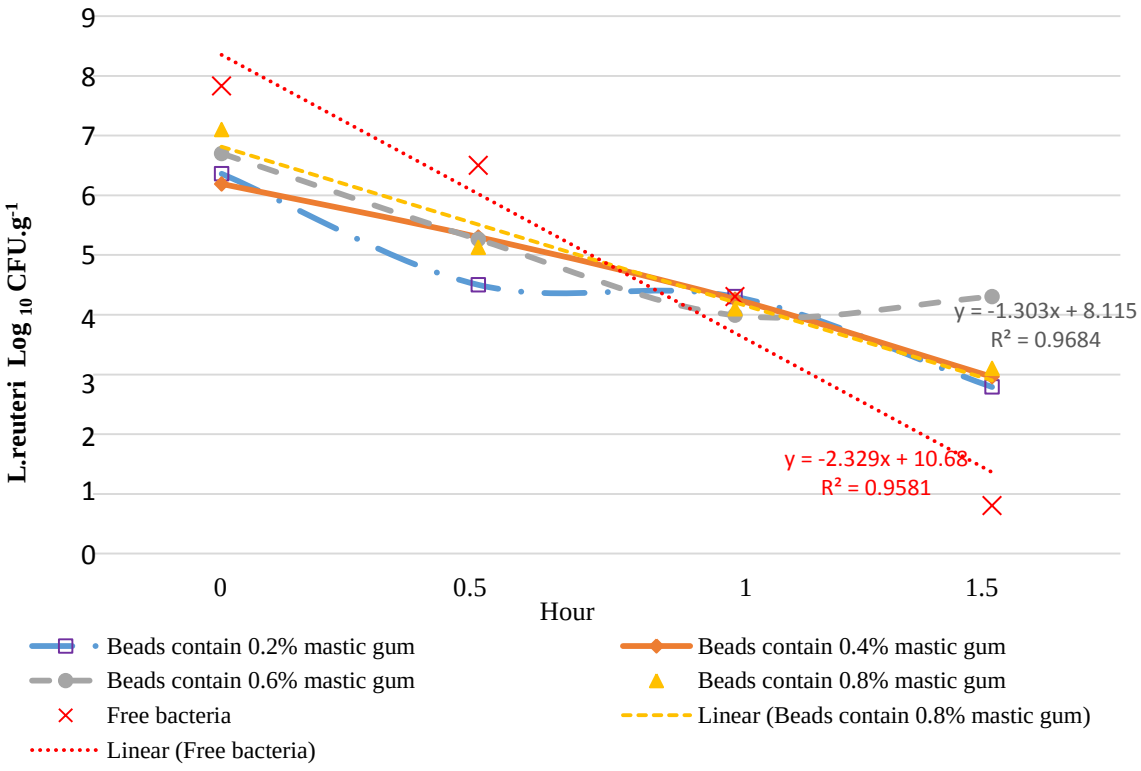
۳.۳. بررسی میزان بقای باکتری‌های ریزدرون‌پوشانی شده و آزاد در محلول نمک طعام و اسیدی

ماندگاری باکتری آزاد و انواع دانک *لاکتوباسیلوس روتری* در نمک ۱۵٪ و pH ۱/۵ (شکل ۳) نشان داد که باکتری آزاد و فرم ریز درون پوشانی شده در طول مدت‌زمان ۱/۵ h کاهش یافته‌اند. میزان کاهش در باکتری آزاد حدود ۷/۳ Log CFU/ml در ۱/۵ h بوده است. درصورتی‌که در دانک حاوی ۰/۸ درصد صمغ بنه کاهش ۴ Log CFU/ml بوده است. دانک‌ها با درصد مختلف صمغ بنه باهم اختلاف معنی‌داری در ماندگاری به اسید و نمک نداشتند. یکی از دلایل ماندگاری باکتری پروبیوتیک ریزدرون‌پوشانی‌شده در شرایط نمک و اسید، نفوذکردن این مواد به درون دانک است که با غلظت و قطر لایه‌ی آلژینات ارتباط مستقیم دارد؛ بنابراین، احتمال دارد که بر اثر زیادبودن مقدار سدیم آلژینات به‌کاررفته در این تحقیق (۲٪) مقاومت زیادی در دانک در برابر غلظت به‌کاررفته‌ی صمغ بنه ایجاد شده باشد. نمک و شرایط اسیدی می‌تواند باعث تخریب میکروارگانیزم‌ها در فرم آزاد گردد. لذا ریزدرون‌پوشانی می‌تواند به‌عنوان یک تکنیک مؤثر در مقابله با این اثر تخریبی، بکار رود. در این راستا اندازه دانک تولیدی می‌تواند به‌عنوان عاملی تأثیرگذار در ماندگاری باکتری به دام افتاده باشد. در تحقیقی تروستروپ هانسن[1] و همکاران در سال ۲۰۰۲ ارتباط بین اندازه دانک و مقاومت به عوامل استرس‌زا ازجمله نمک را بیان کردند [۲۳]. اندازه دانک بین ۲۰ تا ۷۰ میکرون نمی‌تواند باعث محافظت باکتری *بیفیدوباکتریوم* در مقابل عوامل استرس‌زا، ازجمله نمک و اسید گردد. افزایش قطر دانک باعث مقاومت بیشتر دانک می‌شود [۲۲].

1. Truelstrup Hansen

در تحقیق حاضر استفاده از صمغ بنه توانست باعث ماندگاری باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در فرم دانک شود که با یافته‌های آن[1] و همکاران ۲۰۰۷ سازگاری نداشت. ایشان باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[2] را با فروکتوالیگو ساکارید، لاکتولوز و رافینوز با روش هیبریداسیون، ریز درون پوشانی کردند. نتایج تحقیقات ایشان نشان داد که بین باکتری آزاد و دانک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تفاوت معنی‌داری در تحمل نمک وجود نداشت ($p>0/05$). اختلاف در استفاده از مواد ریزدرون‌پوشانی با وزن مولکولی کمتر نسبت به صمغ بنه و نوع باکتری انتخابی می‌تواند باعث اختلاف نتایج با تحقیق حاضر باشد [۲۳].

یکی دیگر از عوامل مؤثر بر مقاومت نمک بر دانک، روش ریزدرون‌پوشانی است. به‌عنوان‌مثال باکتری *لاکتو باسیلوس پاراکازیی*[3] NFBC ۳۳۸ ریز درون پوشانی شده توسط خشک‌کن پاششی نسبت به فرم آزاد از تحمل کمتری نسبت به نمک برخوردار بود. پیش‌بینی می‌شود که حساس شدن غشاء باکتری طی روش خشک‌کن پاششی، عامل کاهش مقاومت به نمک بوده است. احتمالاً استفاده از روش خشک‌کن پاششی باعث ایجاد استرس در سلول شده و مقاومت به نمک را کاهش داده است؛ که در این تحقیق با توجه به روش اکستروژن بکار رفته، این مشکل وجود نداشت [۱۳].



شکل (۳) ماندگاری باکتری آزاد و انواع دانک *لاکتوباسیلوس روتری* در نمک ۱۵ درصد و pH ۱/۵؛
اعداد میانگین سه تکرار هستند؛ غلظت‌های صمغ بنه بکار رفته در *ریزدرون‌پوشانی* و تولید دانک (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸) درصد بود. معادلات ریگراسیون مربوط به باکتری آزاد و دانک حاوی ۰/۸ درصد صمغ بنه بود.

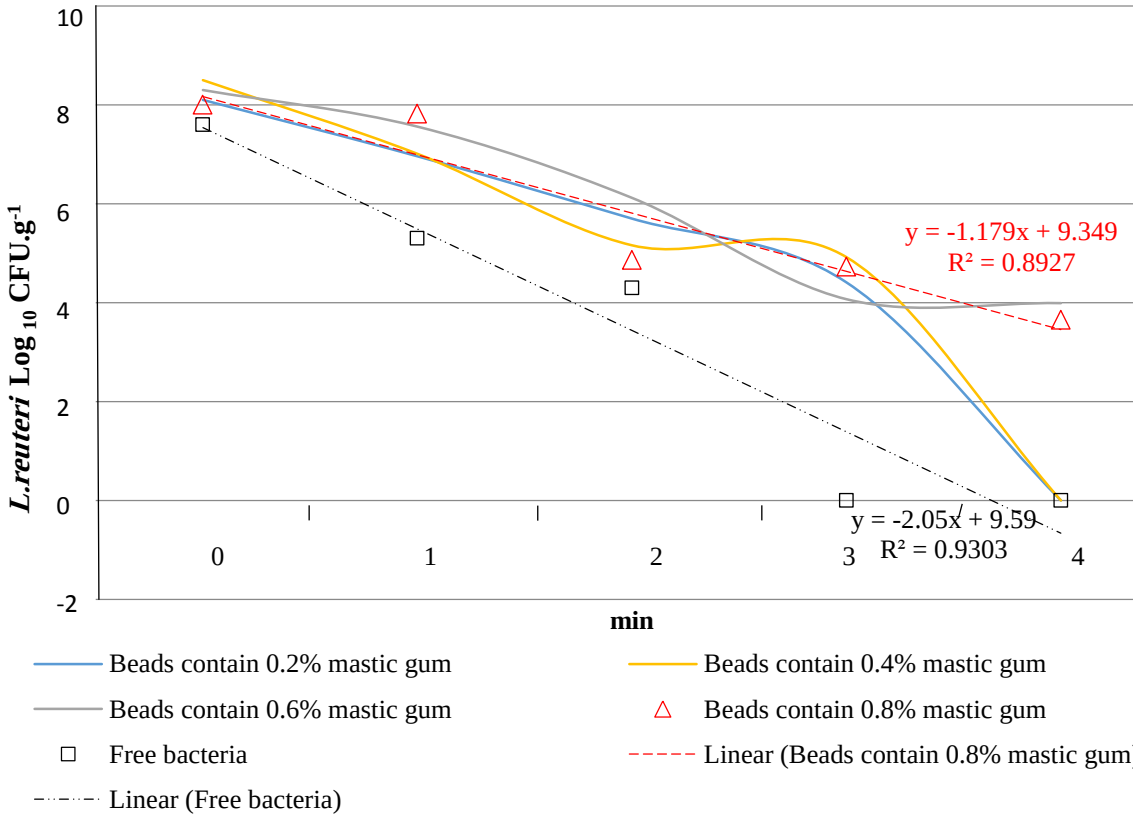
Fig 3. The survival of free and micoencapsulated *Lactobacillus ruteri* in 15% salt and pH 1.5; Values are the average of three replicates; the concentrations of mastic gum used in beads were (0.2, 0.4, 0.6, 0.8)% respectively. Regression curves belong to free and beads containing 0.8% of mastic gum.

1. Ann
2. *Lactobacillus acidophilus*
3. *Lactobacillus paracasie*

۴.۳. ارزیابی مقاومت حرارتی باکتری‌های ریزدرون پوشانی شده و آزاد

شکل (۴) نشان‌دهنده روند ماندگاری باکتری آزاد و انواع دانک در حرارت ۷۲ °C می‌باشد. تمامی دانک‌ها و باکتری آزاد در دمای ۷۲ °C کاهش یافتند. دانک‌ها دارای ماندگاری بیشتری نسبت به باکتری آزاد بودند. اگرچه بین انواع باکتری‌های ریزدرون‌پوشانی شده (دانک) اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. بعد از ۳ دقیقه حرارت دهی، میزان کاهش دانک ۳/۲۷ Log CFU/ml در مقایسه با باکتری آزاد ۷/۶ Log CFU/ml بوده است. باکتری آزاد بعد از ۳ min حرارت دهی ماندگاری نداشت.

در تحقیقی کاوال هریرو[1] و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی تنش حرارتی اعمال‌شده به باکتری *لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم* ATCC ۸۰۱۴ در فرم آزاد و ریزدرون‌پوشانی شده به وسیله اکستروژن در دمای ۷۰°C کارکردند. نتایج نشان داد که ریز درون پوشانی با سدیم آلژینات، اینولین، پودر شیر و ترهالوز باعث افزایش ماندگاری این باکتری در شرایط حرارتی ۷۰°C شده است که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد [۲۴]. جنس مواد بکار رفته در ریزدرون‌پوشانی بسیار مهم است به‌عنوان‌مثال در مطالعه‌ای از نشاسته ذرت معمولی و نشاسته ذرت تغییر شکل یافته در ریزدرون‌پوشانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* استفاده شد.



شکل (۴) ماندگاری باکتری آزاد و انواع دانک لاکتوباسیلوس روتری در دمای ۷۲ °C

اعداد میانگین سه تکرار هستند؛ غلظت‌های صمغ بنه بکار رفته در *ریزدرون‌پوشانی* و تولید دانک ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ درصد بود. معادلات رگراسیون مربوط به باکتری آزاد و دانک حاوی ۰/۸ درصد صمغ بنه بود.

Figure 4. The survival ability of free and *Lactobacillus ruteri* beads at 72° C
Values are the average of three replicates; Concentrations of mastic gum used in encapsulation were (0.2, 0.4, 0.6, 0.8) %. Regression curves belong to free and beads containing 0.8% of mastic gum.

1. Cavalheiro

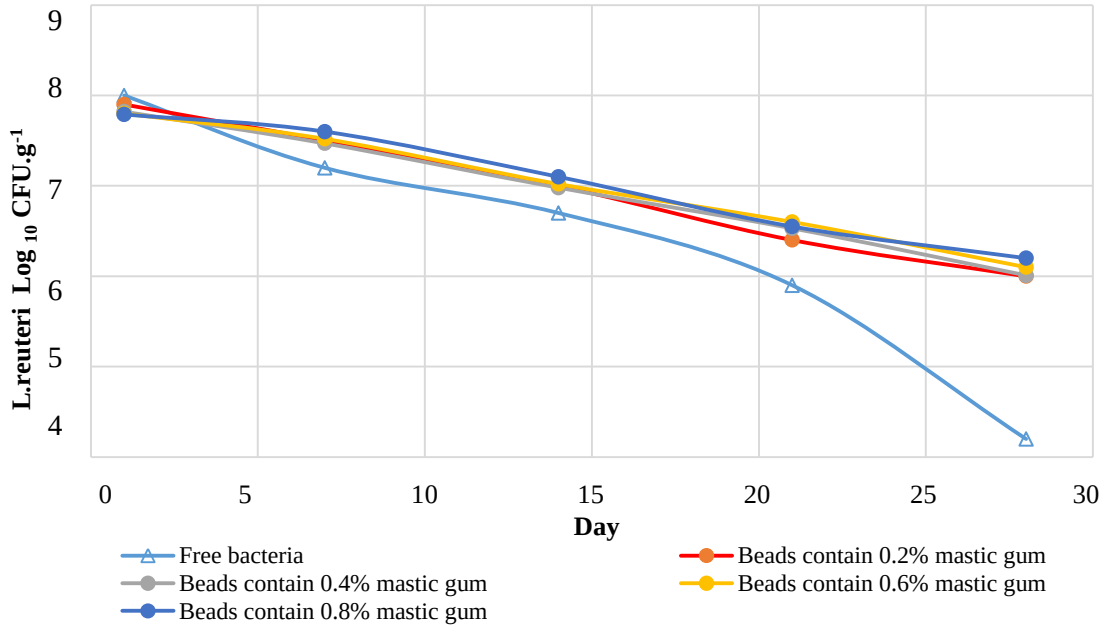
نتایج این تحقیق نشان داد که حرارت ۶۰°C به مدت ۱۵ min باعث کاهش معنی‌دار فرم دانک نسبت به باکتری آزاد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نمی‌شود؛ که با یافته‌های این تحقیق هم‌خوانی ندارد. چراکه دمای به‌کاررفته در تحقیق جاری ۷۲ °C و زمان ۵ min بوده است. همچنین جنس مواد تشکیل‌دهنده دانک در این تحقیق صمغ بنه و فرم ریزشانی به‌صورت دولایه تعبیه گردیده بود [۲۵]. در استرس حرارتی یکی از دلایل از بین رفتن باکتری‌ها، دناتور شدن نوکلئیک اسید و پروتئین‌ها می‌باشد؛ که منجر به مرگ سلولی می‌شود [۲۶].

۵.۳. ماندگاری باکتری‌های ریزدرون‌پوشانی شده و آزاد در شرایط مشابه غذایی

ماندگاری باکتری آزاد و انواع دانک دمای نگهداری ۴ °C در محیط MRS broth مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۵).

نتایج نشان داد که باکتری آزاد تا روز بیستم از مینیمم حد مجاز باکتری پروبیوتیک 10^6 CFU/ml در محیط برخوردار بوده است. در صورتیکه این زمان برای دانک‌ها تا روز سی‌ام بوده است.

میزان کاهش باکتری‌ها در شرایط نگهداری یخچال به مراتب بیشتر از نوع دانک است به‌عنوان‌مثال در تحقیق لیائو[1] و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی ماندگاری باکتری آزاد و دانک *لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط یخچالی کارکردند و متوجه شدند هر دو فرم در طول مدت نگهداری کاهش می‌یابد. میزان این کاهش برای باکتری آزاد CFU/ml ۲/۶۳ و برای دانک (۰/۸۳CFU/ml تا ۰/۶۵) می‌باشد [۱۵]. همچنین در مطالعه دیگری مشخص شد که ریزدرون‌پوشانی با الیگوساکارید توانست ماندگاری باکتری پروبیوتیک را در شرایط ذخیره‌سازی در یخچال افزایش دهد [۲۷].



شکل (۵) ماندگاری باکتری آزاد و انواع دانک *لاکتوباسیلوس روتری* در دمای نگه‌داری C ۴°؛ اعداد میانگین سه تکرار هستند؛ غلظت‌های صمغ بنه بکار رفته در *ریزدرون‌پوشانی* و تولید دانک ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ درصد بود.

Figure 5. The survival ability of free and *Lactobacillus ruteri* beads at 4 ° C
Values are the average of three replicates; Concentrations of mastic gum used in encapsulation were (0.2, 0.4, 0.6, 0.8) %.

1. Liao

در تحقیق دیگری باجاج[1] و همکاران در سال (۲۰۱۰) بر روی ماندگاری باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* آزاد و نوع ریز درون پوشانی شده با میکروکریستالین سلولز و سدیم آلژینات به عنوان لایه‌های پوشاننده در دانک کارکردند. نتایج آزمون ماندگاری حرارتی در دمای C ° ۴۰، ۵۰ و ۶۰ در min ۳۰ به تفکیک نشان داد؛ که دمای ۶۰°C به مدت min ۳۰ می‌تواند برای باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* آزاد کشنده باشد.

دانک باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در دمای ۶۰°C می‌تواند زنده بماند و تنها Log CFU/ml ۳ کاهش داشته باشد. درصورتی‌که فرم آزاد باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* دارای کاهشی معادل Log CFU/ml ۶ بوده است. نتایج نشان می‌دهد که ریزدرون‌پوشانی می‌تواند باعث ایجاد محافظت باکتری در مقابل استرس حرارتی گردد. این نتایج با نتایج این تحقیق هم‌خوانی ندارد؛ چراکه دمای به‌کاررفته در این تحقیق ۷۲°C بوده است. همچنین جنس مواد ریزدرون پوشانی در ماندگاری حرارتی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* نقش اساسی را ایفا می‌کند [۲۸].

ازآن‌جهت که حدنصاب تعداد باکتری‌ها در محصولات غذایی می‌بایست بیشتر از 10^6 CFU/g در طول مدت نگهداری باشد تا آن محصول به عنوان پروبیوتیک شناخته شود. لذا آزمون ماندگاری در دمای ۴ °C بسیار مهم است. در این راستا باجاج[2] و همکاران در سال ۲۰۱۰ دانک باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* را در طول نگهداری ۲۱ روزه در شرایط آزمایشگاهی موردمطالعه قراردادند. نتایج نشان داد که اگرچه تعداد کاهش *لاکتوباسیلوس روتری* ریزدرون‌پوشانی شده Log CFU/ml ۴ بود ولی تا روز ۲۱ از حد مجاز ماندگاری باکتری 10^6CFU/ ml برخوردار بود [۲۸].

ریزدرون‌پوشانی با آلژینات سدیم ممکن است باعث افزایش‌یافتن زمان ماندگاری در شرایط یخچال شود. به علاوه، به‌کاربردن لایه‌ی دوم صمغ بنه ممکن است حفره‌های بزرگ ژل آلژینات را پرکند و ورود آب و مواد غذایی را به درون سلول کاهش دهد. از سوی دیگر، به دلیل کاهش دما، فعالیت آنزیمی و سیال‌بودن غشای سیتوپلاسمی نیز کاهش می‌یابد [۲۹-۳۰]. پژوهش یونگ[3] و همکاران نیز نشان داد که ریزدرون‌پوشانی باکتری *بیفیدوباکتریوم لانگوم*[4] با سدیم آلژینات باعث افزایش‌یافتن مدت نگه‌داری این باکتری تا ۴ هفته می‌شود [۳۱].

۶.۳. ماندگاری در شرایط مشابه معدی و روده‌ای انسان

ماندگاری باکتری آزاد و دانک باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* حاوی ۰/۸٪ صمغ بنه در شرایط مشابه معدی روده‌ای در شکل (۶) نشان داده‌شده است. باکتری آزاد و دانک در طول مدت نگهداری در شرایط مشابه معدی روده‌ای کاهش یافتند. کاهش باکتری آزاد (۶/۲CFU/ml) به مراتب بیشتر از دانک (Log CFU/ml ۵۸ /۲) بوده است.

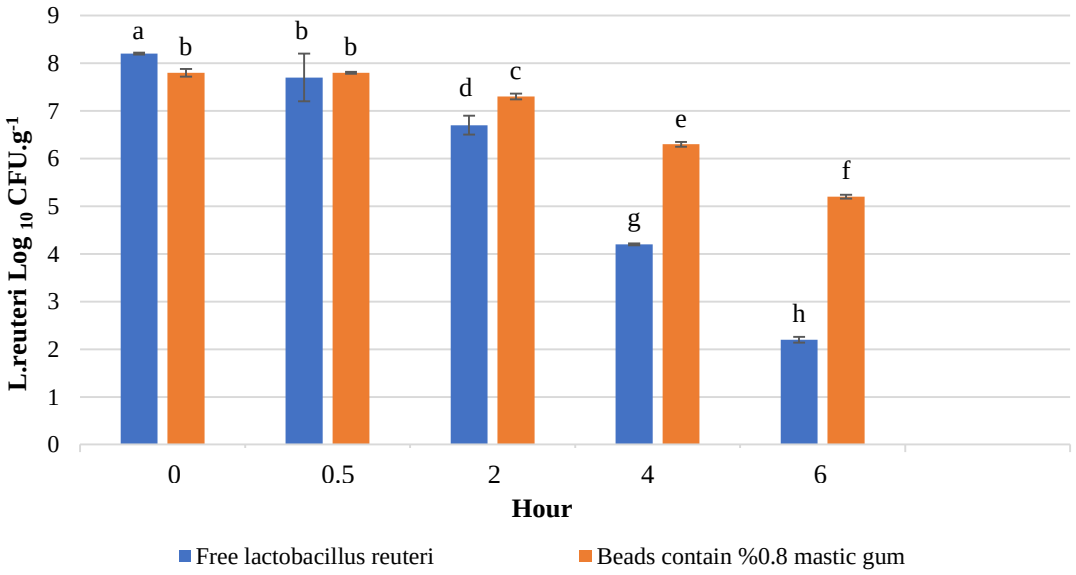
لیو[5] و همکاران در سال ۲۰۱۹ با استفاده از فرکتو الیگوساکارید، ایزومالتو الیگو ساکارید، گالاکتو الیگو ساکارید، زیلو الیگوساکارید، ریزدرون‌پوشانی باکتری *لاکتو باسیلوس روتری* را انجام دادند. نتایج نشان داد که استفاده از الیگوساکاریدها به‌عنوان لایه دوم در ریزدرون‌پوشانی به روش اکستروژن می‌تواند باعث ماندگاری بیشتر دانک نسبت به باکتری آزاد گردد. یکی از دلایل مقاومت دانک به شرایط معده این است که لایه سدیم آلژینات به عنوان محافظی برای ورود آنزیم‌های معدی به داخل کپسول دانک عمل می‌کند. همچنین الیگوساکاریدها می‌توانند محافظت مناسبی را در مقابل نفوذ آنزیم‌های روده‌ای از خود بروز دهند. از سوی دیگر، اثر منفی را بر باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در دانک ندارند. بعلاوه الیگوساکاریدها به‌سختی توسط آنزیم‌های معدی و روده‌ای تجزیه می‌شوند [۱۴]. شکل دانک نقش مهمی در ماندگاری معدی و روده‌ای باکتری‌های ریزدرون پوشانی شده دارد. چراکه احتمالاً ثابت بودن ضخامت لایه‌های محافظ در دانک کروی، باعث ایجاد مقاومت یکسان در سطح کل دانک می‌شود. به عنوان‌مثال نتایج تحقیقات ساندوول‌کاستیلا[6] و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که کرویت دانک‌های تولیدشده، نقش مهمی در ماندگاری باکتری *لاکتوباسیلوس‌کازئی*[7] در شرایط معده‌ای روده‌ای دارد

1 .Bajaj
2. Bajaj

3.Yeung
4. *Bifidobacterium longum*
5. Liao
6. Sandoval-Castilla
7. *Lactobacillus casei*

[۲۷]. لذا با توجه به اینکه دانک‌های تولیدشده در این تحقیق کروی بوده است. لذا یکی از دلایل ماندگاری بیشتر پروبیوتیک، کرویت دانک پیشنهاد می‌گردد. شاه[1] و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ماندگاری باکتری‌های لاکتو باسیلوس کازئی، *لاکتوباسیلوس بریوویس*[2] و *لاکتو باسیلوس - پلانتاروم*[3] که به‌وسیله‌ی بتاگلوکان ریزدرون‌پوشانی شده بود، کارکردند. هدف ایشان حفظ باکتری‌ها در مقابل شرایط معده روده‌ای بوده است. در این تحقیق ماندگاری فرم آزاد و ریز پوشانی باکتری‌ها در شرایط معده‌ای روده‌ای قرار گرفت و با یکدیگر مقایسه شد.

نتایج این تحقیق نشان داد که فرم ریز پوشانی شده باکتری با بتاگلوکان، می‌تواند در شرایط اسید معده، ماندگاری معنی داری را نسبت به فرم آزاد داشته باشد [۲۶]. در تحقیقات گذشته از صمغ زودو، دانه ریحان، بهدانه و... در تولید دانک استفاده‌شده است. ولی تاکنون از صمغ بنه استفاده نگردیده است. استفاده از صمغ‌های گیاهان دارویی نه‌تنها باعث افزایش خصوصیات عمل‌گرا در دانک تولیدشده می‌شود؛ بلکه خاصیت سلامت بخشی به محصول می‌بخشد.



شکل (۶) ماندگاری باکتری آزاد و دانک *لاکتوباسیلوس روتری* شرایط مشابه معدی و روده‌ای؛ اعداد میانگین سه تکرار هستند؛ غلظت صمغ بنه بکار رفته در *ریزدرون‌پوشانی* و تولید دانک، ۰/۸ درصد بود. میانگین‌های دارای حروف غیر یکسان در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند ($p\leq$۰/۰۵).

Fig 6. Survival of free and Lactobacillus reuteri beads in simulated gastrointestinal conditions. Values are the average of three replicates. The concentration of mastic gum used in microencapsulation and bead production was 0.8%. Non-identical lowercase letters demonstrate a significant difference ($P \leq 0.05$).

۴. نتیجه‌گیری

در نهایت با استناد به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که از صمغ بنه می‌توان در ریزدرون‌پوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* استفاده نمود.

1. Shah
2. *Lactoacillus brevis*
3. *Lactobacillus plantarum*

دانک تولیدشده ازلحاظ ماندگاری حرارتی در ۷۲ °C، مقاومت به نمک و اسیدیته بالا و ماندگاری در ۴ °C جهت کاربرد در غذاها بخصوص آن‌هایی که گرم بسته‌بندی می‌شوند می‌تواند مفید باشد. از سوی دیگر با بهبود ماندگاری در شرایط معدی روده‌ای، اثر سلامت بخشی بهتری را در باکتری پروبیوتیک ایجاد می‌کند.

مراجع

[1] Awaisheh, S., AlDmoor, H., Omar, S., Hawari, A., & Alroyli, M. (2012). Impact of selected nutraceuticals on viability of probiotic strains in milk during refrigerated storage at 4 C for 15 days. *Int J Dairy Technol*., 65(2), 268-273.

[2] Huang, X., Gänzle, M., Zhang, H., Zhao, M., Fang, Y., & Nishinari, K. (2020). Microencapsulation of probiotic lactobacilli with shellac as moisture barrier and to allow controlled release. *J. Sci. Food Agric.*, (accepted article).

[3] Riaz, Q. U. A., & Masud, T. (2013). Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. *Crit Rev Food Sci Nutr., 53*(3), 231-244.

[4] Capela, P., Hay, T., & Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res. Int., 39*(2), 203-211.

[5] Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J., 12*(2-3), 173-182.

[6] Lopes, L. A. A., Carvalho, R. D. S. F., Magalhães, N. S. S., Madruga, M. S., Athayde, A. J. A. A., Portela, I. A., ... & Stamford, T. C. M. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion. *Food Res Int.*, 135, 109295

[7] Farhoosh, R., Tavakoli, J., & Khodaparast, M. H. H. (2008). Chemical composition and oxidative stability of kernel oils from two current subspecies of Pistacia atlantica in Iran. *J Am Oil Chem Soc*., 85(8), 723-729.

[8] Taran, M., Mohebali, M., & Esmaeli, J. (2010). In vivo efficacy of gum obtained Pistacia atlantica in experimental treatment of cutaneous leishmaniasis. *Iran J Public Health., 39*(1), 36-41.

[9] Kristbergsson, K., & Otles, S. (2016). *Functional properties of traditional foods* (Vol. 12) (1st ed.). USA: Springer.

[10] Sekhavatizadeh, S.S., Abedi, M., Abbasi Saadi, M., Mohammadi Gale Zan, S., & Chatr Abnous, Z (1399). The improvement of the physicochemical properties of *Lactobacillus reuteri* probiotic by dual layers extrusion microencapsulation with sodium alginate and basil mucilage. *Appl Microbio Food Indust.*, 6(1):1-14. [In Persian]

[11] Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & 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 Sci Technol.*, 69, 365-371

[12] Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int Dairy J*., 14(8), 737-743.

[13] Gardiner, G. E., O'sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., ... & Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivariusstrains* during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol*., 66(6), 2605-2612.

[14] Liao, N., Luo, B., Gao, J., Li, X., Zhao, Z., Zhang, Y., . . . Tian, F. (2019). Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnol Lett.*, 41(2), 263-272.

[15] Buriti, F. C., Castro, I. A., & Saad, S. M. (2010). Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Int. J. Food Microbiol*., 137(2-3), 121-129.

[16] Phoem, A. N., Chanthachum, S., & Voravuthikunchai, S. (2015). Preparation of eleutherine americana-alginate complex microcapsules and application in *Bifidobacterium longum*. *J Nutrients*., 7(2), 831-848.

[17] Koo, S. M., Cho, Y. H., Huh, C. S., Baek, Y. J., & Park, J. Y. (2001). Improvement of the stability of *Lactobacillus casei YIT 9018* by microencapsulation using alginate and chitosan. *J. Microbiol. Biotechnol*., 11(3), 376-383.

[18] Muthukumarasamy, P., & Holley, R. A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *Int. J. Food Microbiol*., 111(2), 164-169.

[19] Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. J. Food Microbio*l., 62(1-2), 47-55.

[20] Corbo, M. R., Bevilacqua, A., & Sinigaglia, M. (2011). Shelf life of alginate beads containing *Lactobacilli* and *bifidobacteria:* characterisation of microspheres containing *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Int. J. Food Sci. Technol*., 46(10), 2212-2217.

[21] Gebara, C., Chaves, K. S., Ribeiro, M. C. E., Souza, F. N., Grosso, C. R., & Gigante, M. L. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus La5* in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food. Res. Int*, 51(2), 872-878.

[22] Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., & Paulson, A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol*., 19(1), 35-45

[23] Ann, E. Y., Kim, Y., Oh, S., Imm, J. Y., Park, D. J., Han, K. S., & Kim, S. H. (2007). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *Int J Food Sci Technol*., 42(4), 411-419.

[24] Cavalheiro, C. P., Menezes, C., Fries, L., Herrero, A., Jimenez-Colmenero, F., & Ruiz-Capillas, C. (2015). Alginate beads to improve viability of *Lactobacillus plantarum* to heat stress. *J Food Process Technol*., 6, 126.

[25] Li, H., Turner, M. S., & Dhital, S. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* in porous maize starch. *Lwt Food Sci Technol*., 74, 542-549.

[26] Shah, A., Gani, A., Ahmad, M., Ashwar, B. A., & Masoodi, F. A. (2016). β-Glucan as an encapsulating agent: Effect on probiotic survival in simulated gastrointestinal tract. *Int J Biol Macromol*., 82, 217-222.

[27] Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Res Int*., 43(1), 111-117.

[28] Bajaj, P. R., Survase, S. A., Bule, M. V., & Singhal, R. S. (2010). Studies on viability of *Lactobacillus fermentum* by microencapsulation using extrusion spheronization. *Food Biotechnol*., 24(2), 150-164.

[29] Corcoran, B., Stanton, C., Fitzgerald, G., & Ross, R. (2008). Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated. *Curr. Pharm. Des.*, 14(14), 1382-1399.

[30] Lu, J., Zhang, Y., Zhu, D., Wang, J., Ye, C., Zhang, X., . . . Li, L. (2016). Improvement of short-term hypothermic preservation of microencapsulated hepatocytes. *Biotechnol. Lett*, 38(6), 909-917.

[31] Yeung, T. W., Üçok, E. F., Tiani, K. A., McClements, D. J., & Sela, D. A. (2016). Microencapsulation in alginate and chitosan microgels to enhance viability of *Bifidobacterium longum* for oral delivery. *Front. Microbiol.*, 7, 494.

Research Article

Investigation of physicochemical properties of Lactobacillus ruteri coated with two layers of sodium alginate and mastic gum

Seyed Saeed Sakhvatizadeh [1*], Mohsen Abedi [2], Fatemeh Hemmati [3], Reyhaneh Goodarzinejad [3], Najmeh Mirzaei [3,] Seyedeh Najmeh Afra[3]

1.Assistance Proffesor, Dept of Food Technology, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz
2.Lecturer, Dept of Veterinary, Agricultural Education and Extension Institute, Agricultural Research, education and Extension Organization (AREEO), Tehran
3. MSc in Food Science and Technology, Dept of Food Technology, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz

Abstract

The aim of this study was to microencapsulate *Lactobacillus reuteri* using two-layer extrusion technique consisting of sodium alginate and mastic gum at concentrations of 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8%. Physicochemical properties and survival ability of free and microencapsulated form during the storage and similar gastrointestinal conditions were evaluated. The results showed that, the produced beads were spherical in shape. By increasing the concentration of the mastic gum, the diameter of the beads increased significantly, but the L* parameter decreased. All free and microencapsulated form were reduced at 72° C. While, the beads had a longer shelf life than the free bacteria. The free bacteria and the microencapsulated form decreased during the storage and under the simulated gastrointestinal conditions. The reduction of the free form was 6.2 Log CFU/ml, which was much higher than the beads (2.58 Log CFU/ml). Free bacteria had a minimum of 10^6 CFU/ml probiotic bacteria in the MRS broth after 20 days. While this time for the beads was 30 days in 4° C. The results of this study showed that the use of mastic gum could increase the shelf life of *Lactobacillus reuteri* under harsh conditions.

Keywords: Extrusion, *Lactobacillus reuteri*, microencapsulation, mastic gum

* Corresponding author: s.sekhavati@areeo.ac.ir