مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده در امولسیون دوگانه با صمغ فارسی در طول انبارداری و شرایط شبیه سازدستگاه گوارش

خزر پورعلی رشتی نژاد [۱]، محمد محسن زاده [۲*]، محمد مالکی [۳]

۱- کارشناس ارشد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران. .

۲- استاد گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران..

۳- پژوهشگر پسا دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۱۶

کلمات کلیدی:

پروبیوتیک، ریز پوشانی،

زنده‌مانی،

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس،

امولسیون.

DOI: 10.22034/FSCT.20.134.61

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9

* مسئول مکاتبات:

mohsenzadeh@um.ac.ir

چکیده

ریز پوشانی روشی رایج برای بهبود قابلیت زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک در برابر تنش‌های محیطی است. در این پژوهش با استفاده از امولسیون دوگانه با صمغ فارسی، پایداری امولسیون، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و مورفولوژیکی، راندمان ریز پوشانی و زنده مانی ریز پوشینه‌ها، در طول ذخیره‌سازی و محیط شبیه‌ساز دستگاه گوارش مورد بررسی قرار گرفت. اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی به ترتیب معادل ۵۲۵ nm، ٤٤/٦٨- mv و ۰/۳۳ بود. راندمان ریز پوشانی ۸۸ ٪ و پایداری امولسیون بین ۸۵ ٪ تا ۹۵/٤۳ ٪ بود. ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در امولسیون دوگانه (W/O/W) با صمغ فارسی باعث بهبود زنده مانی آن در شرایط نگهداری در دمای ٤ °C به مدت ۲۸ روز شد. جمعیت باکتریایی در تیمارهای ریز پوشانی نشده بعد از گذشت ۷ روز به صفر رسید درحالیکه در تیمارهای ریز پوشانی شده فقط log ۰/۵۸ کاهش داشت. در محیط شبیه‌ساز معده تعداد باکتری‌ها برای تیمار ریز پوشانی شده log ۱/۹۷ و برای تیمار حاوی باکتری آزاد log ۳/۹ کاهش یافت، و در محیط شبیه‌ساز روده نیز برای تیمار ریز پوشانی شده log ۰/٤۵ و برای تیمار حاوی باکتری آزاد log ۱/۳ کاهش یافت. نتایج نشان داد که استفاده از امولسیون دوگانه صمغ فارسی باعث بهبود زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در شرایط نگهداری در دمای ٤ °C و محیط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش می‌شود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-27]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.61]

۱- مقدمه

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم‌های زنده ایی هستند که تأثیرات فیزیولوژیکی مثبتی بر فلور میکروبی روده‌ی میزبان دارند. در سال‌های اخیر، استفاده از فراورده های حاوی باکتری های پروبیوتیک توجه محققان را به خود جلب کرده است [۱]. طبق تعریف اکثر محققان محصولات پروبیوتیک باید حاوی CFU/g $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۷}$ باکتری بودند تا برای سلامتی مفید باشند. اثرات مفید این سویه‌ها بر سلامت انسان شامل بهبود سلامت و عملکرد روده، کاهش کلسترول خون، بهبود مکانیسم‌های دفاعی و غیره می‌باشد [۲]. پروبیوتیک‌ها که عمدتا جزء باکتری‌های گرم مثبت می‌باشند طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها را شامل می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها نیز می‌توانند به‌عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته شوند [۳]. فعالیت و زنده ماندن پروبیوتیک‌ها هنگام رسیدن به روده شرط اساسی برای بروز اثرات دارویی می‌باشد ولی عواملی مانند شرایط تولید، تغییرات pH، تنش‌های مکانیکی و شرایط اسیدی- صفراوی دستگاه گوارش باعث کاهش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک می‌شود [۱]. ریز پوشانی از روش های مفید برای بهبود زنده مانی پروبیوتیک ها و کاهش اثرات تخریبی محیط می باشد [٤].

ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها به منظور تثبیت و افزایش زنده‌مانی آن‌ها در محیط‌های نامطلوب انجام می شود [۱]. درواقع ریزپوشانی کردن یک فناوری محافظتی برای پوشش دادن ترکیبات حساس در داخل یک پلیمر خوراکی می‌باشد. پروبیوتیک‌ها به عنوان ماده اصلی درون پلیمر پوشش دهنده پوشش داده می‌شوند و ازطریق کاهش واکنش‌پذیری آن با محیط خارج از تخریب، محافظت می‌شوند [۳]. مطالعات زیادی در خصوص استفاده از پلیمرها مانند آلژینات، کیتوزان، کربوکسی‌متیل‌سلولز و غیره به عنوان مواد پوششی وجود دارد [۳]. ساوامین و همکاران اثر پوشش چندلایه آلژینات را بر بقای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* محصور شده در محلول شبیه‌سازی شده معده و در حین نگهداری در آب انار در دمای ٤ °C مورد بررسی قرار دادند و نتایج، نشان دهنده بقای بالای باکتری‌های چند لایه بود [٥]. بر اساس مطالعات امین و همکاران پنیر چدار حاوی *B. longum* ریزپوشانی شده در آلژینات بقای خوبی را با کاهش ۲ log CFU/mL پس از ۲۱ روز در مقایسه با سلول‌های آزاد با کاهش ٤ log CFU/mL نشان داند [٦]. برای ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک از روش‌های مختلفی مانند خشک کردن پاششی، امولسیون و روش اکستروژن استفاده می شود[۱]. ارتاکی و همکاران زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* ریزپوشانی شده به روش اکستروژن در طول فرآیند ساخت پنیر مورد بررسی قرار دادند و زنده‌مانی بالای باکتری را گزارش کردند [۷]. همایونی و همکاران دو نوع بستنی سین بیوتیک حاوی ۱ ٪ نشاسته مقاوم با باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* ازاد و ریزپوشانی شده به روش امولسیون تولید کردند و بقای باکتری را به مدت ۱۸۰ روز مورد بررسی قرار داردند و نتایج میزان بالای زنده مانی باکتری ریزپوشانی شده را نشان داد [۸].

صمغ فارسی یا زدو شفاف بوده و از درخت بادام‌کوهی (*Amygdalus scoparia* Spach.) به دست می‌آید. این صمغ در اثر تنش‌های دمایی، رطوبتی و گزش حشرات ترشح می‌شود [۹]. به دلیل ساختار ویژه‌ای که دارد کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی پیدا کرده است. صمغ فارسی با رطوبت ۳ تا ۱۳ درصد در مقایسه با سایر صمغ‌ها از فعالیت سطحی و امولسیون کنندگی بسیار خوبی برخوردار است. صمغ فارسی یک هیدروکلوئید آنیونی با محتوای پروتئین کم و ظرفیت جذب آب بالا است [۱۰].

لاکتوباسیلوس‌ها باسیل‌های گرم مثبت منظم هستند که خاصیت تخمیر کنندگی دارند و پروبیوتیک می باشند. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جزو این خانواده بوده و به راحتی در سطوح pH پایین (زیر ٥) رشد می کند و دمای رشد بهینه آن ۳۷ °C است. اثرات آنتاگونیستی (ماده‌ایی که عملکرد فیزیولوژیکی ماده دیگر را مختل می‌کند یا برای آن مزاحمت ایجاد می‌کند) آن برروی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *کلستریدیوم پرفرنجنس* مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۱]. امولسیون‌ها که در صنایع مختلف کاربرد دارند به صورت آب در روغن (W/O) یا روغن در آب (O/W) هستند که به‌صورت مکانیکی یا خود به خودی ایجاد می‌شوند. امولسیون‌های دوتایی قطرات یک مایع پراکنده در مایع دیگر هستند و به دلیل خصوصیات و ساختار مجزا، مورد توجه محققان قرارگرفته‌اند. دو نوع امولسیون چندگانه با ساختار آب در روغن

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-27]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.61]

در آب (W1/O/W2) یا روغن در آب در روغن (O1/W/O2) وجود دارد، که در کاربردهای صنعتی مانند مواد غذایی، دارویی و آرایشی مورداستفاده قرار می‌گیرند. ازآنجاکه در صنایع غذایی بسیاری از امولسیون‌های غذایی، فاز پیوسته آبی دارند و تثبیت‌کننده‌های آب‌گریز با درجه غذایی بیشتر در دسترس هستند، تهیه امولسیون‌های آب در روغن در آب (W1/O/W2) بیشتر معمول می‌باشد. روش معمول پذیرفته‌شده در تهیه امولسیون‌های دوتایی استفاده از امولسیفایرهایی با مقادیر مختلف تعادل هیدروفیل-لیپوفیل (HLB) می باشد تا بتوان امولسیون‌های دوگانه مطلوب بر اساس نوع ماده‌ای که قرار است ریزپوشانی شود تشکیل داد. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر ریز پوشانی با صمغ فارسی با استفاده از تکنیک امولسیون دوگانه بر روی زنده مانی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول دوره نگهداری و بررسی محیط شبیه‌ساز گوارش و برخی خصوصیات امولسیون تولیدی است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

کشت خالص باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*(LA-5) از شرکت کریستین هانسن، دانمارک تهیه شد و در شرایط استریل فعال گردید. امولسیفایر لیپوفیلیک PGPR[1] (پیشگامان شیمی، مشهد، ایران) و امولسیفایر هیدروفیلیک DATEM[2] (شرکت دانش بنیان پارس بهبود آسیا، مشهد، ایران)، صمغ فارسی (ریحان گام پارسیان، اصفهان، ایران) و سایر مواد مصرفی از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

۲-۲- آماده سازی سوسپانسیون باکتری

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ۲۰۰ سی‌سی محیط کشت MRS Broth[3] در دمای ۳۷ °C در شرایط بی‌هوازی تا رسیدن به فاز لگاریتمی به مدت ۲٤ ساعت انکوبه گردید. پس از اینکه باکتری‌ها به فاز لگاریتمی خود رسیدند، در دور ۳٤۰۰ g در دمای ۱۰ °C به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس سوسپانسیون باکتریایی توسط بافر فسفات شست‌وشو شد. در نهایت سوسپانسیون سلولی با استفاده از سرم فیزیولوژی با غلظت ٤ مک فارلند تهیه گردید.

۲-۳- تهیه امولسیون دوگانه

امولسیون دوگانه آب در روغن در آب در دمای اتاق (۲۵ °C) با استفاده از روش دو مرحله ایی تهیه گردید. امولسیون اولیه آب در روغن به‌وسیله‌ی سوسپانسیون سلولی که حاوی CFU/ml ۶×۱۰^۸ باکتری بود، تهیه شد و برای فاز روغن از روغن ذرت استفاده گردید. غلظت کلی امولسیفایر ها در امولسیون اولیه ۸ ٪ وزنی بود (۱ قسمت DATEM و ٤ قسمت PGPR). نسبت حجمی فاز پراکنده در امولسیون اولیه ۰/۳ بود. تهیه امولسیون به وسیله هموژنایزر با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سوسپانسیون سلولی توسط سرنگ استریل به‌صورت قطره‌قطره داخل روغن ریخته شد. در مرحله‌ی دوم ۳۰ میلی‌لیتر از امولسیون اولیه به ۷۰ میلی‌لیتر محلول صمغ ۸٪ اضافه شد و امولسیون دوگانه به‌وسیله‌ی هموژنایزر با دور ٤۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه یکنواخت گردید و در دمای ٤ °C نگهداری شد [۱۲].

۲-٤-شمارش سلول‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده

امولسیون دوگانه حاوی سلول‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس انکپسوله شده در ۱۵۸۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نتیجه، امولسیون‌های دوگانه شکسته شده و سلول‌های به دام افتاده آزاد شدند. ۱ میلی‌لیتر از امولسیون شکسته شده را به ۹ میلی‌لیتر فسفات بافر ۰/۲ مولار اضافه کرده و از آن رقت‌های متوالی تهیه شد. از رقت های تهیه شده روی محیط MRS agar به صورت پورپلیت کشت داده و در دمای ۳۷ °C در شرایط بی هوازی به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از این مدت پرگنه‌های رشد کرده شمارش شدند. شمارش باکتریایی در طی یک دوره‌ی ۲۸ روزه و به فواصل ۷ روزه تکرار گردید.

1. Polyglycerol polyricinoleate
2. Diacetyl tartaric acid ester of mono- and diglycerides
3. DE MAN, ROGOSA and SHARPE Broth

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-27]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.61]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-27]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.61]

۲-۵- راندمان ریز پوشانی

راندمان ریز پوشانی توسط روش ژانگ و همکاران (۲۰۱٦) محاسبه شد که در آن تعداد باکتری‌ها در سوسپانسیون اولیه (N_0)، تعداد باکتری‌های ریز پوشانی شده در امولسیون دوگانه (N_1) و تعداد کل باکتری‌های امولسیون (N_2) طبق فرمول زیر محاسبه شد [۱].

$$\text{Encapsulation efficiency} = \frac{N1 - N2}{N0}$$

۲-٦- پایداری امولسیون

پایداری امولسیون در طول دوره نگهداری در دمای اتاق پس از سانتریفیوژ با۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از معادله زیر محاسبه شد، که در آن Vt (میلی‌لیتر) حجم کل نمونه‌ها و Vs (میلی‌لیتر) حجم فاز زیرین بود [۳].

$$\text{Emulsion stability} = \frac{Vt - Vs}{Vt}$$

۲-۷- تعیین اندازه ذرات و شاخص پراکندگی

خواص فیزیکوشیمیایی ریزپوشینه‌های تهیه‌شده ازجمله توزیع اندازه ذرات و شاخص پراکندگی(PDI) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای میانگین اندازه قطرات و شاخص پراکندگی (PDI) ریزپوشینه ها از دستگاه پراکنش نور دینامیکی(DLS) استفاده شد. شدت نور در ۹۰ درجه تنظیم شد و نمونه به نسبت ۱:۱۰۰۰ با آب دیونیزه رقیق شد و pH آنها تنظیم شد و سپس در محفظه-ی اندازه گیری DLS قرار گرفتند [۱۳].

۲-۸- پتانسیل زتا

به‌منظور تعیین پتانسیل زتای نمونه‌ها، از دستگاه زتا سایزر (CAD، شرکت Zeta compact – فرانسه) استفاده شد [۱۳].

۲-۹- مورفولوژی

شکل ذرات به‌وسیله‌ی میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ٤۰ موردبررسی قرار گرفتند به این صورت که از امولسیون دوگانه یک اسمیر تهیه شد و زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید [۱٤].

۲-۱۰- بررسی میزان زنده مانی *لاکتوفیلوس اسیدوفیلوس* در شرایط شبیه‌ساز دستگاه گوارش

محیط شبیه ساز معده با حل کردن ۱/۱۲ گرم کلریدپتاسیم، ۲ گرم کلریدسدیم، ۰/۱۱ گرم کلریدکلسیم و ۰/٤ گرم فسفات‌پتاسیم بازیک در یک لیتر آب مقطر تهیه شد. ۱ گرم از سوسپانسیون باکتریایی با ۵۰ سی‌سی از محیط شبیه ساز معده مخلوط شد و ۲ ساعت در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۷ °C نگهداری شد و زنده‌مانی باکتری طی زمان‌های ۰، ٦۰ و ۱۲۰ دقیقه با کشت پور پلت در محیط MRS آگار موردبررسی قرار گرفت. برای محیط شبیه ساز روده ۱/۹۵ گرم در لیتر پانکراتین و ۱/۹۵ گرم در لیتر نمک صفراوی به ظرف حاوی محیط شبیه ساز معده اضافه شد و با سود ۱ نرمال pH آن به حدود۷ رسانده شد و به مدت ٤ ساعت در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۷ °C نگهداری گردید. برای بررسی میزان زنده مانی باکتری کشت پور پلیت بر روی محیط MRS آگار در زمان‌های ۰، ٦۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲٤۰ دقیقه انجام شد [۱۵].

۲-۱۱- تجزیه‌وتحلیل آماری

در این پژوهش آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد انجام پذیرفت. جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ (SPSS Inc. Chicago,USA) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طی دوره نگهداری

میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول دوره نگهداری در دمای ٤ °C در شکل ۱ نشان داده شده است. تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* برای همه‌ی تیمارها پس از نگهداری ٤ هفته ایی به‌طور معنی‌دار ($P< 0.05$) کاهش یافت ولی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طول دوره نگهداری به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) افزایش یافت. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آزاد در طول دوره نگهداری در یخچال بعد از گذشت ۷ روز تعداد آن‌ها به‌شدت کاهش پیدا کرد ولی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریز پوشانی شده در صمغ فارسی

بعد از گذشت ۲۸ روز فقط log ۰/۵۸ کاهش داشت و تا روز ۲۸ نگهداری، تعداد آن‌ها مطابق با میزان موردنظر (log ٦) بود. اثر محافظت‌کنندگی صمغ فارسی باعث شد میزان *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بالاتر از میزان موردنظر باشد. برینکس و همکاران (۲۰۱۱) و گندمی و همکاران (۲۰۱٦) به ترتیب زنده‌مانی سلول‌های آزاد و ریز پوشانی شده باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در آلژینات سدیم و پکتین و ریز پوشانی *لاکتوباسیلوس رامنسوس* با آلژینات و کیتوزان در آب سیب طی ۹۰ روز نگهداری در دمای ٤°C و ۲۵°C را بررسی کردند و نشان دادند که ریز پوشانی باکتری موجب افزایش زنده‌مانی می‌شود [۱٦و ۱۷].

۳-۲- راندمان ریزپوشانی

راندمان ریزپوشانی یکی از فاکتورهای مهم در تعیین ترکیبات کپسوله شده می باشد. راندمان ریزپوشانی ۸۸ ٪ محاسبه شد، این راندمان بالای ریزپوشانی مربوط به روش ریزپوشانی یعنی امولسیون دوگانه می باشد. در امولسیون دوگانه باکتری‌ها ابتدا در داخل قطرات آب حفظشده و سپس در قطرات روغن پراکنده می‌شوند و در انتها با صمغ فارسی پوشانده می‌شوند، که می تواند مانع خوبی برای باکتری‌ها در برابر تنش‌های خارجی باشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان گفت که ریزپوشانی با روش امولسیون دوگانه با استفاده از صمغ فارسی در افزایش زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مؤثر بوده است. سیلوا و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهش خود با بهره‌گیری از ژلاتین و صمغ عربی در pH ٤ برای ریز پوشانی باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*، بازدهی ریزپوشانی ۸٦٪ را به دست آوردند که با نتایج بدست آمده در این مطالعه همخوانی دارد و نشان‌دهنده اثر مثبت ریزپوشانی می‌باشد [۱۸]. ارات و همکاران (۲۰۱۵) ریزپوشانی امگا ۳ و باکتری‌های پروبیوتیک را با استفاده از پروتئین آب‌پنیر و صمغ عربی انجام دادند که بازده ریز پوشانی را ۸٤/۹۵ ٪ اعلام کردند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد [۱۹]. ریز پوشانی به روش امولسیون دوگانه منجر به راندمان بالا در ریزپوشانی می‌شود و باعث حفاظت موثر از ماده ریزپوشانی شده در مقابل فشار مکانیکی و تغییرات دما می شود [٤].

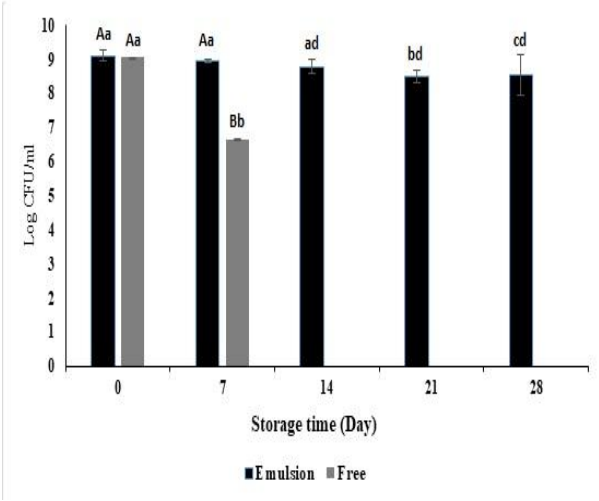

Fig 1 Bacterial survival during storage at 4°C

۳-۳- پایداری امولسیون

اصطلاح "پایداری امولسیون" به توانایی مقاومت یک امولسیون نسبت به تغییر خصوصیات آن در طول زمان اشاره دارد. هرچه امولسیون پایدارتر باشد، تغییر خواص آن آهسته‌تر صورت می‌گیرد. یک امولسیون ممکن است به دلیل انواعی از فرایندهای فیزیکی و شیمیایی ناپایدار شود [۲۰]. نتایج مربوط به پایداری امولسیون در شکل ۲ آمده است و با توجه به نتایج در روز صفر میزان پایداری ۹۵/٤۳ ٪ و در روز ۲۸، ۸۵ ٪ بود که با یافته‌های پژوهش جیانگ و همکاران (۲۰۰٦) برای امولسیون آب در روغن در آب مطابقت دارد [۲۱]. افزایش غلظت صمغ باعث افزایش پایداری امولسیون گردید این افزایش احتمالاً به این دلیل است که در غلظت‌های بالاتر، مولکول‌های پلی ساکارید با تشکیل زنجیره‌های پیچیده پلیمری می‌توانند یک شبکه سه‌بعدی برای به دام انداختن قطرات روغن تشکیل دهند، و حرکت آن‌ها را مسدود کنند. رئیسی و همکاران (۲۰۱۹) روغن ماهی و اسانس سیر را با کیتوزان و صمغ فارسی ریزپوشانی کردند و نتایج نشان داد که بیشترین پایداری در نسبت صمغ: کیتوزان ۱:۲ با پایداری ۱۰۰ ٪ و کمترین پایداری در نسبت صمغ:کیتوزان ۲:۱ با پایداری ۸۰ ٪ بود که با نتایج پژوهش ما هم راستا بود [۲۲].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-27]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.61]

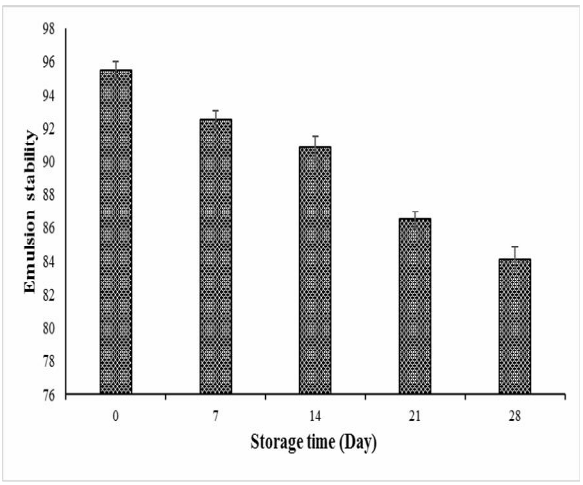

Fig 2 Emulsion stability during storage period

۳-٤- مورفولوژی کپسول‌ها

از فاکتورهای مهم در ریزپوشانی باکتری ها مورفولوژی سطحی کپسول می باشد زیرا هرچه این سطح کروی تر و دارای شکاف کمتر باشد، بهتر می باشد. مورفولوژی کپسول‌ها در شکل ۳ نشان داده‌شده است. با توجه به شکل مشخص می شود که قطرات داخلی آب (W1) به‌طور متراکم گروه‌بندی‌شده و در داخل قطرات روغن (O) توزیع‌شده‌اند و در فاز آبی خارجی (W2) پراکنده‌شده‌اند، بنابراین ساختار مشخص امولسیون‌های دوگانه را نشان می‌دهند و با نتایج تحقیقات پائولا و همکاران مطابقت دارد [٤].

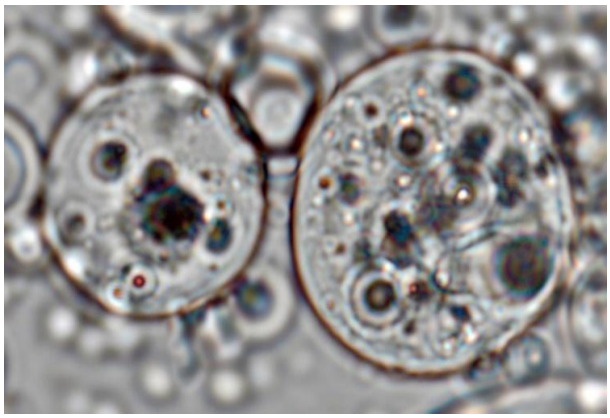

Fig 3 The image from the light microscope (400x) of the microcapsules

۳-۵- زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در محیط شبیه ساز دستگاه گوارش

در تهیه غذاهای حاوی باکتری های پروبیوتیک، ضروری است که این باکتری‌ها نه‌تنها در طول فرایند تولید و شرایط ذخیره‌سازی، بلکه در طول دستگاه گوارش، زنده‌مانی خود را حفظ کنند. باکتری‌ها باید در برابر قرار گرفتن در معرض اسیدیته معده و نمک صفراوی در روده کوچک مقاومت کنند. فلور روده در انسان رابطه‌ی نزدیکی با سلامت دارد و اطمینان از رسیدن تعداد کافی باکتری پروبیوتیک به روده‌ی کوچک و روده‌ی بزرگ موجب تامین فلور روده می شود. نتایج زنده مانی باکتری‌ها در محیط شبیه ساز دستگاه گوارش در شکل ٤ ارائه‌شده است. با توجه به نتایج ارائه‌شده اثر زمان‌بر تیمارهای مختلف معنی‌دار ($P<0.05$) بود. تعداد باکتری‌های هر دو تیمار در محیط شبیه‌ساز گوارش در طول دوره نگهداری کاهش پیدا کردند. بر اساس شکل ٤ تعداد باکتری در تیمار ریز پوشانی شده و آزاد در محیط شبیه‌سازی‌شده معده به ترتیب از log ۹/۰٦±۰/۰۳ و log ۸/۸±۰/۲ به log ۷/۰۹±۰/۲ و log ٤/۹±۰/۰۵ و در شرایط شبیه‌سازی‌شده روده به ترتیب برای تیمار ریز پوشانی شده و آزاد از log ٦/۹±۰/۰۵ و log ٤/۹±۰/۰۷ به log ٦/٤٥±۰/۱۵ و log ۳/٦±۰/۰٤ کاهش یافت. نتایج نشان داد که باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریز پوشانی شده در امولسیون دوگانه، در شرایط سخت دستگاه گوارش مقاومت می‌کند و بیشتر از حد استاندارد (10^6) به اندام موردنظر می‌رسند تا مزایای سلامتی بخش را برای میزبان فراهم کند. گاباسی و همکاران (۲۰۱۱) سه سویه‌ی (*L. plantarum* Lp299v, Lp159 and Lp800) را دردانه‌های آلژینات کلسیم و پروتئین آب‌پنیر محصور کردند و تحت محیط شبیه ساز دستگاه گوارش قرار دادند نتایج نشان داد که کپسولاسیون باعث حفظ باکتری در محیط شبیه ساز دستگاه گوارش شد که با نتایج ما همسو بود [۲۳]. براش و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که تعداد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* کپسوله شده در دانه‌های آلژینات که در معرض محیط شبیه‌ساز معده قرار گرفتند، از log ۸/۹ به log ۵/۲ در طول دوره نگهداری رسید و نشان دادند که کپسوله کردن باکتری موجب حفظ باکتری در محیط شبیه ساز دستگاه گوارش می شود و مطابق با نتایج ما بود [١٦]. رودریگز و همکاران (۲۰۱٤) زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* انکپسوله شده در امولسیون دوگانه در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-27]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.61]

طی ساخت پنیر اکساکا[4] و همچنین در محیط شبیه‌ساز دستگاه گوارش بررسی کردند و نتایج نشان داد که سلول‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* انکپسوله شده در امولسیون‌های دوگانه، در برابر شرایط سخت گوارشی مقاومت می‌کنند که با نتایج ما هم‌راستا بود [۱۲].

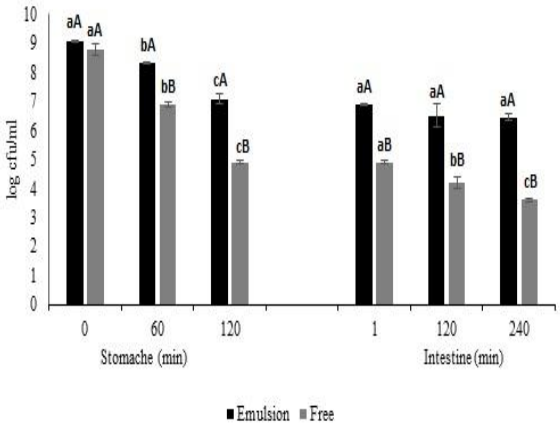

Fig 4 Survival of bacteria under conditions simulating digestion during storage

۳-٦- اندازه ذرات و شاخص پراکندگی

جدول ۱ اندازه ذرات و شاخص پراکندگی(PDI) را نشان می‌دهد. تجزیه‌وتحلیل پراکندگی نور دینامیکی (DLS) نشان داد که ریز پوشینه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با صمغ فارسی دارای اندازه متوسط ۵۲۵ نانومتر بودند. میزان عملکرد ریز پوشینه‌ها (قابلیت محصور کردن، محافظت کردن و رساندن اجزا زیست فعال) مستقیماً تحت تأثیر ویژگی‌های فیزیکیو شیمیایی آن، مانند اندازه، مورفولوژی و بار الکتریکی سطحی می باشد [۱]. بنابراین اندازه ذرات پارامتر مهمی ازنظر حفظ ساختار ریز پوشینه‌ها در طول عبور از دستگاه گوارش هستند. اندازه ذرات بزرگ با تولید منافذ بزرگ در هیدروژل‌ها بر زنده مانی باکتری‌های ریز پوشینه شده تأثیر می‌گذارد و به مولکول‌های کوچک مانند اکسیژن، اسیدها، نمک‌های صفراوی یا آنزیم‌های گوارشی اجازه می‌دهند تا به‌راحتی باکتری‌های محصورشده را منتشر و غیرفعال کنند [۲٤]. بااین‌حال، دانه‌های بزرگ منجر به احساس دهانی نامناسب هنگام مصرف می‌شود [۲۵و ۲٦]. کپسول‌هایی با اندازه بزرگ‌تر از ۱۰۰ میکرومتر به دلیل احساس دهانی شن مانند، نباید استفاده شوند، و اندازه ۳۰ میکرومتر هیچ‌گونه احساس نامطلوبی را در دهان ایجاد نمی کند [۲٦]. مقدار PDI توزیع اندازه نانو ذرات کلوئیدی را نشان می‌دهد و هرچه میزان PDI کمتر باشد نشان دهنده یکنواختی بیشتر ذرات می باشد و به‌طورمعمول، مقدار PDI کمتر از ۰/۳ یک سوسپانسیون کلوئیدی نسبتاً همگن را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر میزان PDI ۰/۳۳ محاسبه شد[[۲۷].

۳-۷- پتانسیل زتا

پتانسیل زتا پارامتری برای ثبات بالقوه سیستم کلوئیدی می‌باشد.اگر همه ذرات داخل سوسپانسیون دارای بار منفی یا مثبت باشند، ذرات تمایل به دفع یکدیگر دارند و موجب عدم انباشتگی می شود. تمایل ذرات هم‌بار به دفع یکدیگر، رابطه مستقیمی با پتانسیل زتا دارد. به‌طورکلی مرز پایداری و ناپایداری سوسپانسیون را می‌توان برحسب پتانسیل زتا تعیین کرد[۲۸]. طبق نتایج مطالعات قبلی، پتانسیل زتا منفی بالاتر از ۳۰ میلی ولت برای جلوگیری از ادغام قطرات کافی است[۲۹]. مقدار پتانسیل زتای بدست آمده در این پژوهش (جدول ۱) ٤٤/٦۸- بود که نشان می‌دهد ریز پوشینه‌های تولیدی دارای تعادل کلوئیدال مناسبی هستند. بار منفی کم امولسیون ممکن است مربوط به محتوای اسید اورونیک صمغ فارسی باشد. این پایداری در جلوگیری از انباشته شدن مهم می‌باشد. با توجه به نتایج تحقیقات عبدوالخالق و همکاران (۲۰۱۸) افزایش غلظت صمغ منجر به افزایش بار منفی سطح قطرات امولسیون و درنتیجه پتانسیل زتا با بار منفی می‌شود که سیستم امولسیون را پایدار می‌کنند و مطابق با نتایج ما بود [۳۰].

Table 1 Properties of emulsion

Treatment	Zeta potential	PDI	Particle size
Emulsion	-44.68	0.33±0.35	525nm

٤- نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که استفاده از صمغ فارسی برای تهیه امولسیون‌های w/o/w برای ریزپوشینه‌دار کردن باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* باعث بهبود زنده مانی آن شد. اندازه

4. Oaxaca cheese

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-27]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.61]

ذرات، پتانیل زتا و شاخص پراکندگی نشان داد که امولسیون ازپایداری مناسبی برخوردار بود. باکتری های ریزپوشانی شده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در مقایسه با باکتری های آزاد در محیط شبیه ساز دستگاه گوارش مقاومت خوبی از خود نشان دادند. نتایج نشان داد که استفاده از امولسیون دوگانه صمغ فارسی باعث بهبود زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در برابر شرایط ذخیره‌سازی و محیط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش می‌شود.

۵- منابع

[1] Zhang Y, Lin J, Zhong Q. S/O/W emulsions prepared with sugar beet pectin to enhance the viability of probiotic Lactobacillus salivarius NRRL B-30514. Food Hydrocolloids. 2016 Jan 1;52:804-10.

[2] Flores-Andrade E, Pascual-Pineda LA, Alarcón-Elvira FG, Rascón-Díaz MP, Pimentel-González DJ, Beristain CI. Effect of vacuum on the impregnation of Lactobacillus rhamnosus microcapsules in apple slices using double emulsion. Journal of Food Engineering. 2017 Jun 1;202:18-24.

[3] Eslami P, Davarpanah L, Vahabzadeh F. Encapsulating role of β-cyclodextrin in formation of pickering water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing Lactobacillus dellbrueckii. Food hydrocolloids. 2017 Mar 1;64:133-48..

[4] de Almeida Paula D, Martins EM, de Almeida Costa N, de Oliveira PM, de Oliveira EB, Ramos AM. Use of gelatin and gum arabic for microencapsulation of probiotic cells from Lactobacillus plantarum by a dual process combining double emulsification followed by complex coacervation. International journal of biological macromolecules. 2019 Jul 15;133:722-31.

[5] Nualkaekul S, Lenton D, Cook MT, Khutoryanskiy VV, Charalampopoulos D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated Lactobacillus plantarum in pomegranate juice. Carbohydrate polymers. 2012 Oct 15;90(3):1281-7.

[6] Amine KM, Champagne CP, Raymond Y, St-Gelais D, Britten M, Fustier P, Salmieri S, Lacroix M. Survival of microencapsulated Bifidobacterium longum in Cheddar cheese during production and storage. Food Control. 2014 Mar 1;37:193-9

[7] Ortakci FA, Broadbent JR, McManus WR, McMahon DJ. Survival of microencapsulated probiotic Lactobacillus paracasei LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. Journal of dairy science. 2012 Nov 1;95(11):6274-81

[8] Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS, Razavi SH. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food chemistry. 2008 Nov 1;111(1):50-5 .

[9] Nami Y, Lornezhad G, Kiani A, Abdullah N, Haghshenas B. Alginate-Persian Gum-Prebiotics microencapsulation impacts on the survival rate of Lactococcus lactis ABRIINW-N19 in orange juice. LWT. 2020 Apr 1;124:109190

[10] Maleki M, Mohsenzadeh M. Optimization of a biodegradable packaging film based on carboxymethyl cellulose and Persian gum containing titanium dioxide nanoparticles and Foeniculum vulgare essential oil using response surface methodology. Journal of Food Processing and Preservation. 2022 Apr;46(4):e16424.

[11] Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited review: the scientific basis of Lactobacillus acidophil us NCFM functionality as a probiotic. Journal of dairy science. 2001 Feb 1;84(2):319-31

[12] Rodríguez-Huezo ME, Estrada-Fernández AG, García-Almendárez BE, Ludeña-Urquizo F, Campos-Montiel RG, Pimentel-González DJ. Viability of Lactobacillus plantarum entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions. LWT-Food Science and Technology. 2014 Dec 1;59(2):768-73..

[13] Li K, Wang B, Wang W, Liu G, Ge W, Zhang M, Yue B, Kong M. Microencapsulation of Lactobacillus casei BNCC 134415 under lyophilization enhances cell viability during cold storage and pasteurization, and in simulated gastrointestinal fluids. Lwt. 2019 Dec 1;116:108521 .

[14] Flores-Andrade E, Pascual-Pineda LA, Alarcón-Elvira FG, Rascón-Díaz MP,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-27]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.61]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-27]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.61]

[22] Raeisi S, Ojagh SM, Quek SY, Pourashouri P, Salaün F. Nano-encapsulation of fish oil and garlic essential oil by a novel composition of wall material: Persian gum-chitosan. LWT. 2019 Dec 1;116:108494.

[23] Gbassi GK, Vandamme T, Yolou FS, Marchioni E. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated Lactobacillus plantarum strains in a gastrointestinal tract model. International Dairy Journal. 2011 Feb 1;21(2):97-102.

[24] Ding WK, Shah NP. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. Journal of food science. 2007 Nov;72(9):M446-50.

[25] 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 Feb 1;19(1):35-45.

[26] Çabuk B, Harsa ŞT. Protection of Lactobacillus acidophilus NRRL-B 4495 under in vitro gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules. Journal of bioscience and bioengineering. 2015 Dec 1;120(6):650-6.

[27] Su J, Wang X, Li W, Chen L, Zeng X, Huang Q, Hu B. Enhancing the viability of Lactobacillus plantarum as probiotics through encapsulation with high internal phase emulsions stabilized with whey protein isolate microgels. Journal of agricultural and food chemistry. 2018 Oct 31;66(46):12335-43

[28] Shi L, Li Z, Yu L, Jia H, Zheng L. Effects of surfactants and lipids on the preparation of solid lipid nanoparticles using double emulsion method. Journal of dispersion science and technology. 2011 Jan 20;32(2):254-9.

[29] Wiącek A, Chibowski E. Zeta potential, effective diameter and multimodal size distribution in oil/water emulsion. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 1999 Dec 1;159(2-3):253-61.

[30] Golkar A, Taghavi SM, Aghili Dehnavi F. The emulsifying properties of Persian gum (Amygdalus scoparia Spach) as compared with gum Arabic. International Journal of Food Properties. 2018 Jan 1;21(1):416-36

Pimentel-González DJ, Beristain CI. Effect of vacuum on the impregnation of Lactobacillus rhamnosus microcapsules in apple slices using double emulsion. Journal of Food Engineering. 2017 Jun 1;202:18-24..

[15] Gebara C, et al., Viability lactobacillus acidophilus La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal condition food research international, 2013. 51: p. 8-872.

[16] Brinques GB, Ayub MA. Effect of microencapsulation on survival of Lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. Journal of food engineering. 2011 Mar 1;103(2):123-8.

[17] Gandomi H, Abbaszadeh S, Misaghi A, Bokaie S, Noori N. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of Lactobacillus rhamnosus GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. LWT-Food Science and Technology. 2016 Jun 1;69:365-71.

[18] da Silva TM, Lopes EJ, Codevilla CF, Cichoski AJ, de Moraes Flores ÉM, Motta MH, da Silva CD, Grosso CR, de Menezes CR. Development and characterization of microcapsules containing Bifidobacterium Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying. LWT. 2018 Apr 1;90:412-7.

[19] Eratte D, McKnight S, Gengenbach TR, Dowling K, Barrow CJ, Adhikari BP. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. Journal of functional foods. 2015 Dec 1;19:882-92.

[20] McClements DJ. Food emulsions: principles, practices, and techniques. CRC press; 2004 Dec 16.

[21] Su J, Flanagan J, Hemar Y, Singh H. Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water–oil–water emulsions. Food Hydrocolloids. 2006 Mar 1;20(2-3):261-8

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-27]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.134.61]

Investigating the survival of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* in double emulsion with Persian gum during storage and digestive simulating conditions

Pourali Rashti-Nejad, Kh. [1], Mohsenzadeh, M. [2*], Maleki, M. [3]

1. Department of Food Hygiene and Aquaculture, Factulty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
2. Department of Food Hygiene and Aquaculture, Factulty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
3. Department of Food Hygiene and Aquaculture, Factulty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 12/ 26
Accepted 2023/ 04/ 05

Keywords:

Probiotic,
Microencapsulation,
Survival,
Lactobacillus acidophilus,
Emulsion.

DOI: 10.22034/FSCT.20.134.61
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.5.9

*Corresponding Author E-Mail:
mohsenzadeh@um.ac.ir

ABSTRACT

Microencapsulation is a common method to improve the viability of probiotic bacteria against environmental stresses. In this research, by using double emulsion with Persian gum, emulsion stability, physicochemical properties, microcoating efficiency and microcoating viability were investigated during storage and in a simulated gastrointestinal conditions of the digestive system. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in double emulsion (W/O/W) with Persian gum improved the survival under storage conditions at 4 °C for 28 days, and encapsulation treatment only 0.58 log decreased and the treatment without capsules reached zero after 7 days. The microcoating efficiency was 88% and the emulsion stability was between 85% and 95.43%. The optical microscope image showed a distinct double emulsion. In the simulating conditions of the stomach, the number of bacteria for encapsulation treatment decreased by 1.97 log and the treatment without capsules 3.9 log, and in the simulating conditions of the intestine, for encapsulation treatment it decreased by 0.45 log and for the treatment without capsules 1.3 log decreased. The particle size, zeta potential and dispersion index was 525 nm, -44.68 mv and 0.33 respectively. The results showed that the use of Persian gum double emulsion improves the survival of *Lactobacillus acidophilus* against storage conditions and the simulated environment of the digestive system.