Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Food Processing and Preservation

Print ISSN: 2322 - 2069
Online ISSN: 2322 - 2794

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Effect of encapsulation by emulsion method on survival of *Lactobacillus reuteri* in simulated gastric conditions

Hanieh Bagheri Kia[1] | Alireza Bassiri[2]*

[1] Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
[2] Department of Food Technology and processing, Institute of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran, Email: bassiri@irost.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 18.05.2021
Revised: 11.08.2021
Accepted: 17.08.2021

Keywords:
Lactobacillus reuteri
Encapsulation
Simulated gastric conditions
Survival.

ABSTRACT

Backgrounds and objectives: The health benefits of probiotic bacteria have increased their attraction and application in food products. The low stability of probiotic bacteria against adverse environmental conditions and the consequent reduction of survival during processing, storage and consumption, are among the most important limitations in the production and development of probiotic products. Encapsulation of probiotic bacteria is one of the technologies that has been successfully implemented in numerous studies to increase the stability of bacteria against environmental stresses. So, the aim of this study was to evaluate the effect of encapsulation technology with different wall materials (calcium alginate, xanthan, and gellan) on survival of *Lactobacillus reuteri* in simulated gastric conditions (pH 1.5) by emulsion method.

Materials and methods: *Lactobacillus reuteri* (ATCC 1655) was encapsulated with different wall materials including calcium alginate, xanthan, and gellan using emulsion method. The viability of encapsulated and free bacteria in simulated gastric conditions (pH 1.5) was evaluated at intervals of 0, 30, 60, 90 and 120 minutes at 37 °C. The morphology and size of the microcapsules were determined by scanning electron microscope (SEM) and particle size analyzer, respectively.

Results: Results of the morphology evaluation by SEM showed that the microcapsules prepared with different wall materials were spherical to oval. The mean diameter of microcapsules obtained from all wall materials had a significant difference ($P\leq0.05$) with each other, which indicates the effect of the type of wall material on the diameter of the microcapsules. On the other hand, the simultaneous use of alginate, xanthan and gelan as wall materials not only increased the diameter of the microcapsules, but also strengthened the microcapsules. The encapsulation efficiency of all the three wall materials was more than 90%, which indicates the suitability of the emulsion method in the encapsulation of *Lactobacillus reuteri*. The highest encapsulation efficiency was found in microcapsules obtained by alginate and alginate-gellan wall materials, which showed a significant difference ($P\leq0.05$) compared to other treatments. The lowest encapsulation efficiency was related to the microcapsules in which all three wall materials were used simultaneously. By increasing the duration of exposure to the simulated conditions of the stomach, bacterial survival showed a significant decrease ($P\leq0.05$) in the microcapsules obtained from all wall materials as well as the control sample (not encapsulated). The highest and lowest survival rates of bacteria in simulated gastric conditions

were related to microcapsules containing alginate-xanthan-gellan and alginate alone, respectively.

Conclusion: It was concluded that microencapsulation of *L. ruteri* by emulsion method using alginate, xanthan and gellan as wall materials while significantly improving survival in simulated gastric conditions, increases the average diameter of microcapsules

Cite this article: Bagheri Kia, H., Bassiri, A.R. 2022. Effect of encapsulation by emulsion method on survival of *Lactobacillus reuteri* in simulated gastric conditions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13 (4), 43-56.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/EJFPP.2021.19160.1665
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵۴۴-۲۴۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲۴۲۳

تأثیر درون‌پوشانی به روش امولسیون بر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط شبیه‌سازی شده معده

هانیه باقری کیا[۱] | علیرضا بصیری[۲*]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، رایانامه: bassiri@irost.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۸
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۶

واژه‌های کلیدی:
لاکتوباسیلوس روتری
درون‌پوشانی
شرایط شبیه‌سازی معده
زنده‌مانی

چکیده

سابقه و هدف: اثرات سلامت‌بخش باکتری‌های پروبیوتیک، افزایش کاربرد آن‌ها را در فرآورده‌های غذایی در پی داشته است. پایداری پایین باکتری‌های پروبیوتیک در برابر شرایط نامساعد محیطی و به دنبال آن کاهش زنده‌مانی طی فرآوری، دوره نگهداری و هم‌چنین در هنگام مصرف، مهم‌ترین محدودیت در تولید و توسعه فرآورده‌های پروبیوتیک به شمار می‌آید. درون‌پوشانی باکتری‌های پروبیوتیک از جمله فناوری‌های است که در تحقیقات متعدد جهت افزایش پایداری باکتری‌ها در برابر تنش‌های محیطی با موفقیت پیاده‌سازی گردیده است. هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی فن‌آوری درون‌پوشانی هسته-پوسته با استفاده از ترکیبات کلسیم‌آلژینات، زانتان و ژلان، بر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط شبیه‌سازی شده معده (pH =۱/۵) به‌روش امولسیون می‌باشد.

مواد و روش‌ها: درون‌پوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* (ATCC 1655) با ترکیبات کلسیم‌آلژینات، زانتان و ژلان به روش امولسیون انجام و قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های درون‌پوشانی شده و آزاد، در شرایط شبیه‌سازی شده معده در فواصل زمانی صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بررسی گردید. هم‌چنین مورفولوژی و اندازه ریزپوشینه‌ها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی SEM و دستگاه تجزیه اندازه ذرات تعیین گردید.

یافته‌ها: شکل ظاهری ریزپوشینه‌های حاصل از ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی، کروی تا بیضوی بود. میانگین قطر ریزپوشینه‌ها، در تمامی ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) نشان داد. میانگین قطر ریزپوشینه‌ها متاثر از ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی بود و نشان داده شد که بکارگیری همزمان آلژینات، زانتان و ژلان به‌عنوان ترکیبات دیواره‌ای، علاوه بر استحکام بخشیدن به ریزپوشینه‌ها، منجر به افزایش قطر ریزپوشینه‌ها می‌شوند. راندمان درون‌پوشانی در تمامی ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی، بیش از ۹۰ درصد بود که بیانگر مناسب بودن روش امولسیون در درون‌پوشانی *لاکتوباسیلوس روتری* می‌باشد. بالاترین راندمان درون پوشانی مربوط به تیمارهای آلژینات و ترکیب آلژینات و ژلان بود که اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) نسبت به سایر ترکیبات دیواره‌ای را نشان دادند. کمترین راندمان درون پوشانی در بین ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی مربوط به تیمار آلژینات، زانتان و ژلان بود. با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض شرایط شبیه‌سازی شده معده، زنده‌مانی باکتری در تمامی ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی در ریزپوشینه‌ها و هم‌چنین نمونه شاهد کاهش معنی‌داری

(P≤۰/۰۵) نشان دادند. در تمامی زمان‌های تحت بررسی کمترین میزان زنده‌مانی مربوط به نمونه شاهد (بدون پوشش) بود. بالاترین و کمترین میزان زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده در بین ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی به ترتیب مربوط به ترکیبات دیواره‌ای (آلژینات، زانتان و ژلان) و (آلژینات به تنهایی) بود که با سایر ترکیبات دیواره‌ای اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) نشان دادند.

نتیجه‌گیری: درون‌پوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* به روش امولسیون با ترکیبات دیواره‌ای (آلژینات، زانتان و ژلان) در کنار بهبود معنی‌دار زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده، موجب افزایش میانگین قطر ریزپوشینه‌ها و همچنین کاهش راندمان درون‌پوشانی شد.

استناد: باقری‌کیا، ه.، بصیری، ع.ر. (۱۴۰۰). تأثیر درون‌پوشانی به روش امولسیون بر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط شبیه‌سازی شده معده. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۳ (۴)، ۵۶-۴۳.

DOI:10.22069/EJFPP.2021.19160.1665

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف آن‌ها در مقادیر مناسب، اثرات سلامت‌بخش خود را از طریق حفظ و یا بهبود تعادل فلور میکروبی روده بر میزبان خود اعمال می‌کنند. مزایای برشمرده مصرف پروبیوتیک‌ها مواردی مانند ویژگی‌های ضدجهش‌زایی، ضدسرطان، تقویت سیستم ایمنی بدن، افزایش مقاومت در برابر عفونت‌ها، کاهش سطح کلسترول و افزایش هضم مواد غذایی را شامل می‌گردد (۱۴). باکتری‌های قابل استفاده در تولید فرآوردهای غذایی پروبیوتیک باید دارای منشأ انسانی و غیربیماری‌زا باشند و افزون بر انتخاب گونه‌های مناسب، ویژگی‌هایی مانند پایداری بالا در مراحل فرآوری، دوره نگهداری و پس از مصرف حین انتقال از معده به روده، توانایی اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده، توانایی آنتاگونیزه کردن پاتوژن‌ها از طریق تولید ترکیبات ضدباکتری، حذف رقابتی آن‌ها با کاهش pH کولون و توانایی تثبیت فلور باکتریایی روده، نیز مدنظر می‌باشند (۲۴). امروزه پروبیوتیک‌هایی که بیش از همه در کانون تحقیقات قرار دارند باکتری‌های تولیدکننده لاکتیک‌اسید به ویژه گونه‌های لاکتوباسیل هستند. لاکتوباسیل‌ها، میله‌ای شکل، گرم مثبت، غیرمتحرک و غیر اسپورزا و ساکارولیتیک بوده و به شکل طبیعی به‌عنوان همزیست در روده بزرگ مستقر می‌باشند (۱۷ و ۱۳). درون‌پوشانی به فرآیند پوشش‌دهی یک ماده زیست فعال توسط ماده دیگری (مانند بیوپلیمرها، پلیمرهای سنتزی و یا ترکیبات لیپیدی) به‌منظور محصور و تفکیک آن‌ها از محیط پیرامون با هدف افزایش پایداری در برابر شرایط نامساعد محیطی و رهایش کنترل‌شده، اطلاق می‌گردد. بیوپلیمرهای قابل‌استفاده در دیواره ریزپوشینه‌ها باید دارای درجه خواکی، غیرسمی، فاقد ویژگی‌های ضدمیکروبی بوده و علاوه بر آن باید قابلیت حفاظتی بالایی از هسته در برابر تنش‌های محیطی از جمله pHهای پایین محیط معده را فراهم نموده و تعداد بالایی از باکتری‌ها را به صورت زنده به روده منتقل نمایند. بیوپلیمرهای آلژینات، زانتان، ژلان، کربوکسی‌متیل‌سلولز، کاراگینان، ژلاتین و پکتین عمده‌ترین ترکیبات دیواره‌ای بکاررفته در فرآیند درون‌پوشانی می‌باشند (۲۱، ۱۹). روش‌های رایج در درون‌پوشانی پروبیوتیک‌ها شامل امولسیون، اکستروژن و خشک‌کردن به حالت‌های انجمادی، پاششی و یا بسترشناور می‌باشد. هر یک از روش‌های نامبرده بر ویژگی‌های ریزپوشینه‌ها شامل ابعاد، پایداری و هم‌چنین راندمان درون‌پوشانی، تاثیرگذار می‌باشند (۷). صمغ آلژینات، پلی‌ساکاریدی خطی و ناهمگن متشکل از واحدهای D- مانورونیک اسید و L گلوکورونیک اسید با پیوندهای گلیکوزیدی است و به‌دلیل مزایایی مانند هزینه پایین، سهولت کاربرد، قابلیت دسترسی بالا، همخوانی زیستی و قابلیت حلالیت بالا و آزادسازی ترکیبات محصور شده در شرایط روده، به‌طور گسترده در درون‌پوشانی پروبیوتیک‌ها بکارگرفته می‌شود (۱۱). ژلان پلی‌ساکاریدی خارج سلولی است که توسط *اسفینگوموناس الودا*[1] ترشح می‌شود (۸) و برای ایجاد ژل به یک فرآیند حرارتی و هم‌چنین حضور کاتیون‌ها نیاز دارد (۲۲). زانتان پلی‌ساکاریدی خارج سلولی است که توسط میکروارگانیسم *گزانتوموناس کامپستریس*[2] ترشح می‌شود. زانتان در آب سرد محلول بوده و ویسکوزیته آن در گستره وسیعی از دما و pH پایدار است (۲۰).

تحقیقات گسترده‌ای جهت بهبود زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک با ترکیبات دیواره‌ای مختلف در برابر شرایط نامساعد محیطی از جمله pHهای

1. *Sphingomonas Elodea*
2. *Xanthomonas campestri*

پایین محیطی معده، انجام گرفته‌اند. مکرمی و همکاران (۲۰۰۹)، چوسراوی سنجانی و همکاران (۲۰۱۲)، کاظمی گرجی و همکاران (۲۰۱۳) و نجفی و کدخدایی (۲۰۱۶)، به‌ترتیب تأثیر درون‌پوشانی بر زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (PTCC 1643)، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (La7) و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده در مقایسه با حالت آزاد باکتری‌ها را بررسی و نشان دادند درون‌پوشانی باعث افزایش معنی‌دار پایداری باکتری‌های تحت بررسی در برابر تنش‌های سیستم گوارش می‌گردد (۱۶، ۲، ۱۰ و ۱۸). جعفری و همکاران (۲۰۱۶) بیان نمودند که درون‌پوشانی *لاکتوباسیلوس کازئی* با سدیم‌آلژینات و اینولین به‌روش امولسیون، پایداری باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده را تا ۳ سیکل لگاریتمی بهبود می‌بخشد. از سوی دیگر درون‌پوشانی باکتری با ترکیبات دیواره‌ای بکاررفته منجر به تولید ریزپوشینه‌هایی کروی-بیضوی با قطر کمتر از ۱۰۰ میکرومتر می‌گردد (۹). نتایج مشابهی توسط درجالی و همکاران (۲۰۰۶)، گندمی و همکاران (۲۰۱۶)، گائودریائو و همکاران (۲۰۱۶) و ماساکاماراسامی و همکاران (۲۰۰۶) ارائه شده است که به بررسی اثرات فرآیند درون‌پوشانی بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده سیستم گوارش پرداخته بودند (۱۷، ۳، ۵، ۶).

کاهش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طول فرآوری، نگهداری و هم‌چنین تحت تاثیر شرایط اسیدی معده، مهم‌ترین محدودیت‌ها در تولید فرآورده‌های پروبیوتیک به‌شمار می‌آیند. فناوری درون‌پوشانی با محافظت از باکتری‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی، می‌تواند باعث افزایش پایداری و به دنبال آن، زنده‌مانی گردد. در این تحقیق، فن‌آوری درون‌پوشانی هسته-پوسته به روش امولسیون و با استفاده از ترکیبات کلسیم‌آلژینات، زانتان و ژلان، بر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط شبیه‌سازی شده معده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: سدیم‌آلژینات، توین ۸۰، پپسین، ژلان و محیط‌های کشت MRS broth و MRS Agar از شرکت سیگما آلدریچ (ایالات متحده آمریکا) و کلریدریک‌اسید، سدیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات، دی‌سدیم‌هیدروژن‌فسفات، کلسیم‌کلرید و سدیم‌کلرید از شرکت مرک (آلمان) و زانتان از شرکت فلوکا (سوییس) تهیه گردید.

آماده‌سازی باکتری لاکتوباسیلوس روتری: *لاکتوباسیلوس روتری (PTCC 1655)* از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. یک گرم باکتری در ۵ میلی‌لیتر محیط MRS براث تلقیح و به مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شد. سپس نمونه حاصل در ۹۵ میلی‌لیتر محیط MRS براث تلقیح و تحت شرایط فوق مجددا در انکوباتور قرار گرفت. بیومس حاصل بوسیله سانتریفیوژ در g×۳۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد جداسازی و در دو مرحله با محلول استریل ۰/۱ درصد پپتون واتر شستشو و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد. شمارش باکتری‌ها به دو روش سنجش جذب سوسپانسیون باکتریایی حاصل با محلول نیم مک فارلند توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر و روش شمارش مستقیم با کشت در محیط MRS Agar و گرمخانه‌گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۱۶).

فرآیند درون‌پوشانی: استرلیزاسیون وسایل شیشه‌ای و محلول‌های مورد استفاده، در اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، انجام شد. محلول‌های چهارگانه مورداستفاده در تحقیق شامل محلول ۲ درصد سدیم‌آلژینات، محلول ۲ درصد سدیم‌آلژینات و ۰/۲ درصد ژلان، محلول ۲ درصد سدیم‌آلژینات و ۰/۵ درصد زانتان و در نهایت محلول ۲ درصد سدیم‌آلژینات، ۰/۵ درصد زانتان و ۰/۲ درصد ژلان تهیه و پس از استریلیزاسیون و هم‌دما شدن با محیط با ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی به‌مدت ۵ دقیقه کاملاً مخلوط گردید. مخلوط بدست آمده به تدریج به ۵۰۰ میلی‌لیتر روغن کلزا حاوی ۰/۲ درصد توئین ۸۰ اضافه و در ادامه توسط همزن مغناطیسی در ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه، هم‌زده شد تا امولسیونی کرم رنگ بدست آید. سپس محلول ۰/۱ مولار کلسیم‌کلرید به تدریج به امولسیون اضافه شد تا در اثر تماس آلژینات، دیواره ریزپوشینه‌ها شکل گیرند. در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط در حالت سکون باقی مانده تا ریزپوشینه‌های کلسیم آلژینات جداسازی و در کف ته‌نشین گردند. لایه روغنی به‌وسیله دکانتور و ریزپوشینه‌ها توسط سانتریفیوژ در ۳۵۰×g به مدت ۱۵ دقیقه، جداسازی شدند. عملیات شستشو توسط سرم فیزیولوژیک حاوی ۵ درصد گلیسرول طی دو مرحله انجام و بیومس بدست آمده تا بکارگیری در فرآیند درون‌پوشانی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۳، ۲۶، ۲۵).

راندمان درون‌پوشانی: جهت تعیین راندمان درون‌پوشانی، مقدار ۱ گرم از ریزپوشینه‌های تهیه شده در ۹ میلی‌لیتر از محلول استریل بافر فسفات سدیم (۰/۱ M ،pH=۷) پراکنده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط توسط همزن مغناطیسی همزده شد. طی این فرآیند، دیواره ریزپوشینه‌ها تخریب و سلول‌های باکتری رهاسازی شدند. سپس با استفاده از محیط جامد MRS آگار در شرایط هوازی، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت کشت میکروبی انجام و در نهایت شمارش باکتری‌ها در ۳ تکرار صورت پذیرفت. راندمان درون‌پوشانی (EE) با استفاده از رابطه ۱ تعیین گردید (۱۵)، که در آن N تعداد باکتری‌های زنده (logCFU / g) و N_0 تعداد باکتری‌های زنده در سوسپانسیون اولیه (/ log CFU g) را نشان می‌دهند.

$$EE(\%) = (N / N_0) \times 100$$ رابطه ۱.

تعیین اندازه و ریخت شناسی ریزپوشینه‌ها: تعیین اندازه ریزپوشینه‌های تشکیل شده، بوسیله دستگاه تجزیه اندازه ذرات و در دمای محیط صورت گرفت. بدین منظور ریزپوشینه‌ها در آب دیونیزه پراکنده و پس از کالیبراسیون دستگاه با آب دیونیزه، ۲ میلی‌لیتر از محلول حاوی ریزپوشینه‌ها به دستگاه اضافه گشت و نتایج بر اساس میانگین قطر ریزپوشینه‌ها گزارش شد. برای تعیین مورفولوژی و مشاهده شکل ظاهری ریزپوشینه‌ها، از میکروسکوپ الکترونی روبشی[1] (SEM) استفاده شد. بدین منظور ریزپوشینه‌ها به وسیله چسب دو طرفه بر روی لام تثبیت و به وسیله طلا و پالادیم پوشش داده شدند. مشاهده ریزپوشینه‌ها در میکروسکوپ الکترونی روبشی با تابش الکترونی ۱۰ کیلوولت انجام گرفت (۱۶).

آماده‌سازی شرایط شبیه‌سازی شده معده: پپسین با محلول سدیم کلرید ۰/۵ درصد تا رسیدن به غلظت ۳ گرم بر لیتر مخلوط و سپس pH آن به وسیله کلریدریک‌اسید استریل ۰/۱ مولار به ۱/۵ رسانده شد و با میکروفیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل شد (۱).

***بررسی زنده‌مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط شبیه‌سازی شده معده:** زنده‌مانی باکتری

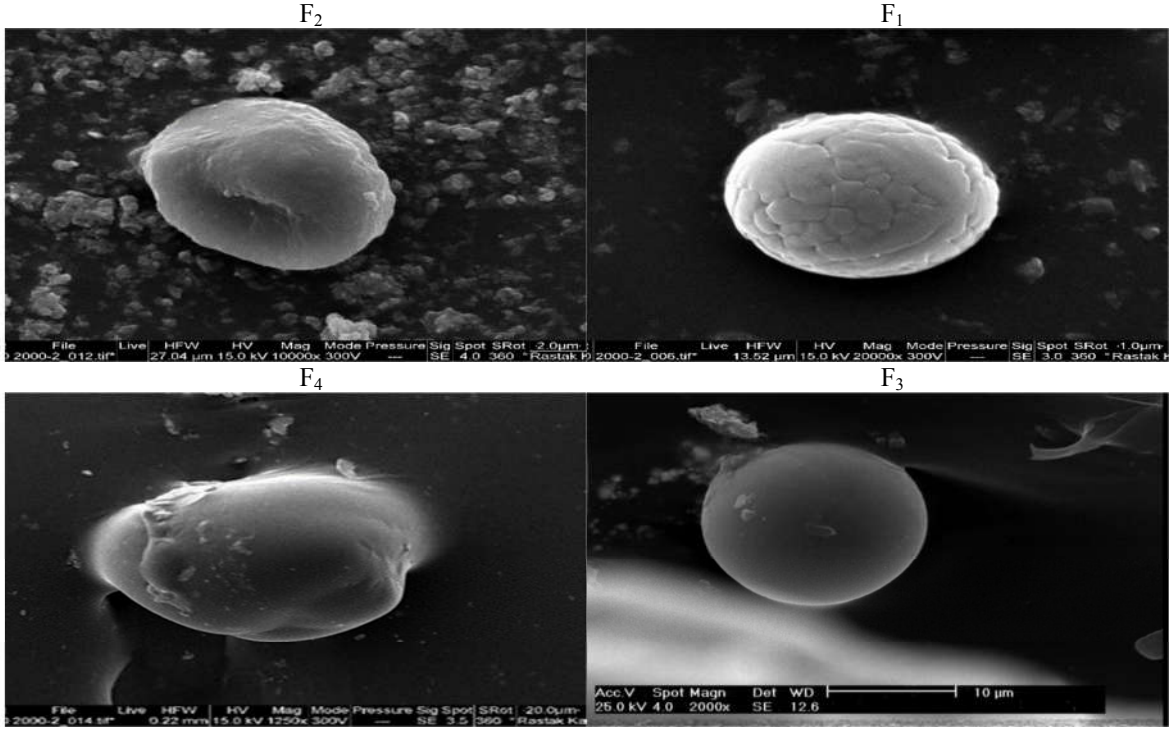
1. Scanning Electron Microscopy

لاکتوباسیلوس روتری در پنج حالت، آزاد (درون‌پوشانی نشده، F_0)، درون‌پوشانی شده با آلژینات به تنهایی(F_1)، آلژینات و زانتان (F_2)، آلژینات و ژلان (F_3) و آلژینات، زانتان و ژلان (F_4)، در شرایط شبیه‌سازی شده معده تعیین گردید. بدین منظور، یک گرم از ریزپوشینه‌ها و یا معادل آن یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی باکتری‌های آزاد، به طور جداگانه با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول شبیه‌سازی شده معده مخلوط و به مدت ۱۲۰ دقیقه در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری شد. شمارش باکتری‌ها در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه انجام گرفت (۱۵، ۱۶).

تجزیه و تحلیل آماری: طراحی آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت فاکتوریل و در ۳ تکرار با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه۲۱) انجام پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) انجام گرفت. از نرم‌افزار اکسل (ویرایش ۲۰۱۹) برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج و بحث

ریخت‌شناسی ریزپوشینه‌ها: مشاهدات حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که ریزپوشینه‌های تشکیل شده، دارای شکلی کروی تا بیضوی و یکنواخت هستند. نوع ترکیبات دیواره‌ای به کاررفته در فرآیند درون‌پوشانی، بر شکل ظاهری ریزپوشینه‌های تشکیل شده، تاثیرگذار بود (شکل۱).



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونیSEM از ریزپوشینه‌ها با ترکیبات دیواره‌ای مورد بررسی

Figure 1- Scanning electron microscopy (SEM) images of microcapsules with wall materials used in this study

اندازه ریزپوشینه‌ها: میانگین قطر ریزپوشینه‌ها (جدول ۱) در تمامی ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) نشان می‌دهند. کوچکترین ابعاد بدست آمده مربوط به هنگامی است

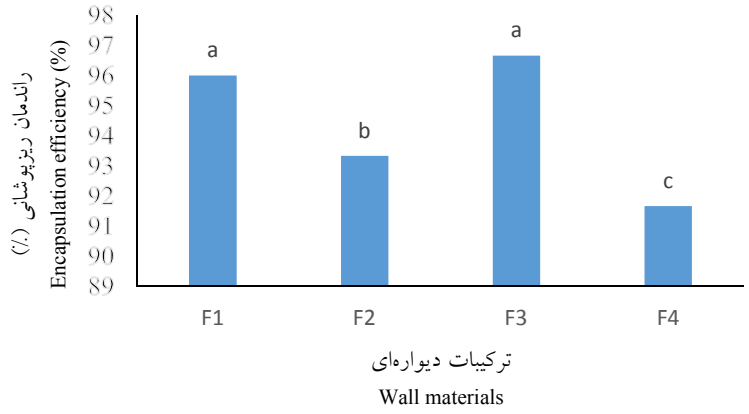
که از آلژینات به تنهایی در درون‌پوشانی استفاده شده است (تیمار F_1). افزودن زانتان و ژلان به آلژینات منجر به افزایش معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) میانگین قطر ریزپوشینه‌ها می‌گردد.

جدول ۱- اثرات ترکیبات دیواره‌ای بکاررفته در درون‌پوشانی بر میانگین قطر ریزپوشینه‌ها

Table 1- Effects of wall materials used in encapsulation on the average diameter of microcapsules (µm)

ترکیبات دیواره‌ای wall materials	F_1	F_2	F_3	F_4
میانگین قطر ریزپوشینه‌ها (µm) average diameter of microcapsules (µm)	92.03^{a}	141.47^{b}	254.81^{c}	556.58^{d}

راندمان درون‌پوشانی: راندمان درون‌پوشانی در تمامی ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی (شکل ۲) بیش از ۹۰ درصد بود. تیمارهای F_1 و F_3 با اختلاف معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) نسبت به سایر ترکیبات دیواره‌ای بیشترین راندمان درون پوشانی را نشان دادند. کمترین راندمان درون پوشانی در بین ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی مربوط به تیمار F_4 بود.



شکل ۲- اثرات ترکیبات دیواره‌ای بر راندمان درون‌پوشانی

Figure 2- Effects of wall materials on encapsulation efficiency

اثر زمان قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی شده معده بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس روتری* درون‌پوشانی شده: ریزپوشینه‌های حاصل به همراه تیمار شاهد به مدت ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در معرض شرایط شبیه‌سازی شده معده قرار گرفته و سپس میزان زنده‌مانی تعیین گردید. با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض شرایط شبیه‌سازی شده معده، زنده‌مانی باکتری در تمامی ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی در ریزپوشینه‌ها و همچنین نمونه شاهد کاهش معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) نشان داد. در تمامی زمان‌های تحت بررسی کمترین میزان زنده‌مانی مربوط به نمونه شاهد (بدون پوشش) بود. بالاترین میزان زنده‌مانی بین ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی مربوط به تیمار F_4 (آلژینات، زانتان و ژلان) بود که با سایر ترکیبات دیواره‌ای اختلاف معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) نشان داد. میزان زنده‌مانی در تیمارهای F_2 (آلژینات و زانتان) و F_3 (آلژینات و ژلان) در زمان‌های تحت بررسی، با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). تیمار F_1 (آلژینات به تنهایی) کمترین میزان زنده‌مانی در بین ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی را داشت.

جدول ۲- زنده‌مانی سلول‌های آزاد و درون‌پوشانی شده *لاکتوباسیلوس روتری* پس از قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی شده معده در زمان‌های تحت بررسی (log CFU/g).

Table 2- Survival of free and encapsulated *Lactobacillus reuteri* cells after exposure to simulated gastric conditions at different times in this study (log CFU/g)

زمان (دقیقه) Time (min) / ترکیب دیواره‌ای Wall materials	0	30	60	90	120
F_0	11.29 ± 0.06^{Aa}	8.22 ± 0.04^{Ab}	7.33 ± 0.05^{Ac}	5.75 ± 0.18^{Ad}	4.40 ± 0.07^{Ae}
F_1	11.03 ± 0.03^{Aa}	8.59 ± 0.06^{Bb}	7.87 ± 0.04^{Bc}	6.47 ± 0.43^{Bd}	4.95 ± 0.07^{Be}
F_2	11.26 ± 0.07^{Aa}	9.22 ± 0.04^{Cb}	8.15 ± 0.10^{Cc}	6.87 ± 0.13^{Bd}	5.38 ± 0.08^{Ce}
F_3	11.28 ± 0.05^{Aa}	9.32 ± 0.05^{Cb}	8.17 ± 0.09^{Cc}	6.75 ± 0.39^{Bd}	5.45 ± 0.06^{Ce}
F_4	11.26 ± 0.07^{Aa}	10.73 ± 0.08^{Db}	9.87 ± 0.04^{Dc}	8.19 ± 0.60^{Cd}	6.41 ± 0.06^{De}

داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار می‌باشند. حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۵) می‌باشد. حروف کوچک متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۵) می‌باشد.

Data are mean ± standard deviation of 3 replicates. Different uppercase letters in each column indicate a significant difference ($P<0.05$) between treatments. Different lowercase letters indicate a significant difference ($P<0.05$) between time.

اندازه ریزپوشینه‌های تشکیل شده: سنجش‌های بعمل‌آمده با دستگاه سنجش اندازه ذرات نشان دادند که میانگین قطر ریزپوشینه‌های آلژینات ۹۲/۰۳ میکرومتر، آلژینات کلسیم و ژلان ۱۴۱/۴۷میکرومتر، آلژینات کلسیم و زانتان ۲۵۴/۸۱ و آلژینات کلسیم با زانتان و ژلان ۵۵۶/۵۸ میکرومتر بود. میانگین قطر ریزپوشینه‌ها، در تمامی ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) نشان دادند. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که افزون زانتان و ژلان علاوه بر خاصیت پوشش‌دهندگی و استحکام بخشیدن به ریزپوشینه‌ها، منجر به افزایش قطر ریزپوشینه‌ها نیز می‌شوند. در درون‌پوشانی به‌روش امولسیون می‌توان به ریزپوشینه‌های در حد میکرون دست یافت؛ در حالی که اندازه ریزپوشینه‌ها در روش‌های متعارف درون‌پوشانی مانند اکستروژن و خشک‌کردن پاششی، بزرگتر و در برخی موارد در حد میلی‌متر هستند (۱۲). گزارش شده است که تلقیح پروبیوتیک‌های درون‌پوشانی شده به سوسپس تخمیری به روش اکستروژن، باعث بروز پدیده شنی شدن در بافت محصول می‌شود؛ در حالی که در نمونه‌های تهیه شده با روش امولسیون این امر مشاهده نشد (۱۷). ابعاد ریزپوشینه‌ها بر اثرات پایداری آن‌ها موثر می‌باشد به‌گونه‌ای که ریزپوشینه‌های کوچک‌تر از ۱۰۰ میکرومتر، پایداری مناسبی برای پروبیوتیک‌ها در مواد غذایی ایجاد نکرده و این امر باعث تخریب پروبیوتیک‌ها در شرایط اسیدی معده و هم‌چنین شرایط قلیایی ابتدای روده کوچک می‌شود (۲۷، ۲۸). در تحقیق دیگری بیان گردید که ریزپوشینه‌های کوچکتر از ۱۰۰ میکرومتر نمی‌توانند در سطح معنی‌داری موجب افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط اسیدی معده شوند (۱۳). از سوی دیگر نشان داده شده است که ریزپوشینه‌های بزرگتر از یک میلی‌متر موجب ایجاد بافت شنی در مواد غذایی می‌شود. افزایش میانگین قطر ریزپوشینه‌های حاصل از ترکیبات آلژینات به همراه زانتان وژلان باعث بهبود زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط شبیه‌سازی شده معده بدون اثرات منفی بر بافت محصول می‌گردد.

راندمان درون‌پوشانی: یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تعیین‌کننده کارایی در فرآیند درون‌پوشانی، راندمان درون‌پوشانی است. نتایج بدست آمده نشان دادند که راندمان درون‌پوشانی در تمامی ترکیبات دیواره‌ای

تحت بررسی، بیش از ۹۰ درصد بود که با نتایج ارایه شده توسط مکرمی و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد (۱۶).

زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط شبیه‌سازی معده: با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض شرایط شبیه‌سازی شده معده، زنده‌مانی باکتری درون‌پوشانی در تمامی ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی و هم‌چنین نمونه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($P\leq$۰/۰۵). در تمامی زمان‌های تحت بررسی کمترین میزان زنده‌مانی مربوط به نمونه شاهد (بدون پوشش) بود. بالاترین میزان زنده‌مانی بین ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی مربوط به تیمار F_4 (آلژینات، زانتان و ژلان) بود که با سایر ترکیبات دیواره‌ای اختلاف معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) نشان می‌دهد. صمغ آلژینات به تنهایی مقاومت کمی در برابر شرایط اسیدی معده دارد، وجود یون تک ظرفیتی (به دلیل رقابت یونی) در مواد غذایی و عواملی که باعث خروج یون کلسیم از ساختار ریزپوشینه‌ها می‌شود مانند فسفات، لاکتات و سیترات می‌توانند منجر به از هم‌پاشی ریزپوشینه‌های آلژینات کلسیم و آزاد شدن باکتری‌ها گردد. ولی افزودن زانتان و ژلان در ترکیبات دیواره‌ای، نه تنها مقاومت به اسید را افزایش می‌دهد بلکه به تثبیت یون‌های کلسیم نیز کمک نموده و از سلول‌ها در برابر صدمات اسیدی محافظت می‌کند. صمغ ژلان سبب افزایش قدرت ژل و تامین ثبات و محافظت مناسب برای پروبیوتیک‌ها طی شرایط حرارت‌دهی می‌گردد. اما صمغ آلژینات به اندازه ژلان، ثبات حرارتی ندارد و ممکن است در اثر حرارت ساختار ژل تغییر کند و ژل ضعیف شود. اگر ماتریکس کپسول‌کننده، ژل آلژینات باشد مقاومت حرارتی کافی ندارد و باید با ژلان همراه شود. استفاده از آلژینات و صمغ ژلان ثبات حرارتی و اسیدی خوبی ایجاد می‌نمایند. بالاترین میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس روتری* در بین ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی در این تحقیق مربوط به ترکیبات آلژینات، زانتان و ژلان بود که با نتایج ارایه شده سان و گیفیس (۲۰۰۰)، روساس-فلوئس و همکاران (۲۰۱۳)، دپریسکو و همکاران (۲۰۱۴) همخوانی دارد (۲۶، ۲۳، ۴).

نتیجه‌گیری

شکل ظاهری ریزپوشینه‌ها حاصل از ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی، کروی تا بیضی بود. میانگین قطر ریزپوشینه‌ها متاثر از ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی بود و نشان داده شده که افزودن زانتان و ژلان، منجر به افزایش قطر ریزپوشینه‌ها نیز می‌شوند. راندمان درون‌پوشانی در تمامی ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی، بیش از ۹۰ درصد بود که بیانگر مناسب بودن روش امولسیون در درون‌پوشانی *لاکتوباسیلوس روتری* می‌باشد. بالاترین میزان زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده در بین ترکیبات دیواره‌ای تحت بررسی مربوط به ترکیبات دیواره‌ای آلژینات، زانتان و ژلان، بود که با ایجاد پایداری مناسب در برابر شرایط شبیه‌سازی شده معده، روشی مناسب جهت دستیابی به فرآورده‌های پروبیوتیک غنی‌شده با این باکتری می‌باشد.

References

1.Brinques, G.B., and Ayub, M.A.Z. 2011. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. J. of Food Engineering. 103: 2. 123-128.

2.Chosravi Sanjani, M.A., and Mohammadi, N. 2012. Evaluation of the effect of microencapsulation on the survival of probiotics in simulated conditions of

human stomach and intestine and evaluation of capsule structure with FTIR. First National Conference on Molecular Cellular Innovations .Parand, Islamic Azad University, Parand Branch. (In Persian)

3.Darjani, P., Nezhad, M.H., Kadkhodaee, R., and Milani, E. 2016. Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. LWT-Food Science and Technology. 73: 162-167.

4.De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., and Mauriello, G. 2014. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. Food Science and Technology. 58: 2. 1-11.

5.Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., and Noori, N. 2016. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. LWT-Food Science and Technology. 69: 365-371.

6.Gaudreau, H., Champagne, C.P., Remondetto, G.E., Gomaa, A., and Subirade, M. 2016. Co-encapsulation of *Lactobacillus helveticus* cells and green tea extract: Influence on cell survival in simulated gastrointestinal conditions. J. of Functional Foods. 26: 451-459.

7.Ghahremanifar, A., Najafi, M., and Mohammadi, A. 2014. Evaluation of the effect of carbohydrates on the shelf life of limonene encapsulated with concentrated whey protein. J. of Innovation in Food Science and Technology. 6: 3. 67-73. (In Persian)

8.Hasheminia, S.M., Ebrahimzade Mousavi, S.A., Ehsani, M.R., and Dehghan Nia, J. 2011. The effect of adding gelan hydrocolloid on rheological properties and stabilization of fibrous dough. J. of Food Technologies Research. 21: 2. 179-193.

9.Jafari, S., Najafi, A., and Nasiraie, L. 2016. The effect of microencapsulation with sodium alginate on the survival of the probiotic bacterium *Lactobacillus casei* in simulated gastric and intestinal conditions. Second National Conference on Life Sciences. Damghan, Islamic Azad University, Damghan Branch. (In Persian)

10.Kazemi Gorji, M., Abbassi, H.A., Nasirai, L., and Milani, A. 2013. Effect of microencapsulation with calcium alginate on the survival of *Lactobacillus plantarum* (La7) probiotic bacterium in simulated gastric and intestinal conditions. Innovation in Food Science and Technology. 5: 1. 179-185. (In Persian)

11.Krasaekoopt, W., and Watcharapoka, S. 2014. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. LWT-Food Science and Technology. 57: 2.761-766.

12.Larisch, B.C., Poncelet, D., Champagne, C.P., and Neufel, R.J. 1994. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris. J. of Microencapsulation. 11:189-195.

13.Mandal, S., Puniya, A.K., and Singh, K. 2006. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. International Dairy J. 16: 10. 1190-1195.

14.Martín, M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A., and Morales, M.E. 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 27: 15-25.

15.Mohammadi, J., Mirdamadi, S., Javanmard, M., Safavi, M., and Bassiri, A. 2016. Effect of encapsulation on viability of *Lactobacillus casei* in simulated gastrointestinal conditions and heat treatment. J. of Novel Food Technologies. 14: 13. 31-43. (In Persian)

16.Mokarram, R., Mortazavi, S., Najafi, M.H., and Shahidi, F. 2009. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and

intestinal juice. Food Research International. 42: 8.1040-1045.
17. Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P., and Holley, R.A. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. J. of Food Science. 71: 1. 21-29.
18. Najafi, M., and kadkhodai, R. 2016. Limonine encapsulation by freeze-drying method: The effect of type and concentration of wall material. Iranian J. of Food Science and Technology Research. 7: 3. 210-217. (In Persian)
19. Nazzaro , F., Orlando, P., Fratianni, F., and Coppola, R. 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. 23: 2.182-186.
20. Pandey, S.M., and Mishra, H. 2015. Optimization of the prebiotic & probiotic concentration and incubation temperature for the preparation of synbiotic soy yoghurt using response surface methodology. LWT-Food Science and Technology. 62: 1. 458-467.
21. Pham-Hoang, B.N., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., and Waché, Y. 2013. Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. Applied microbiology and biotechnology. 97: 15. 6635-6645.
22. Rahmen, A., Hosseini, S.A, and Otadey, M. 2013. Evaluation of the effect of salt (calcium, magnesium and potassium chloride), fat and gelan gum on sausage texture. Innovation in food science and technology. 5: 1.1-11. (In Persian)
23. Rosas-Flores, W., Ramos-Ramírez, E.G., and Salazar-Montoya, J.A. 2013. Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. Carbohydrate polymers. 98: 1.1011-1017.
24. Sarao, L.K., and Arora, M. 2017. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 57: 2.344-371.
25. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., and Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International J. of Food Microbiology. 62: 1. 47-55.
26. Sun, W., and Griffith, M.W. 2000. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads. International J. of Food Microbiology. 61: 1. 17-25.
27. Truelstrup-Hansen, L., Allan-wojtas, P.M., Jin, Y.L., and Paulson, A.T. 2002. Survival of Ca- alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiology. 19: 1. 35-45.
28. Woraharn, S., Chaiyasut, C., Sirithunyalug, B., and Sirithunyalug J. 2010. Survival enhancement of probiotic *Lactobacillus plantarum* CMU-FP002 by granulation and encapsulation techniques. African Journal Microbiology Research. 4: 2086-2093.