ارزیابی میزان زنده مانی باکتری پروبیوتیک *لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس* (La-5) ریزپوشانی شده در سس کچاپ سینبیوتیک و محیط شبیه سازی شده معده و روده

محسن وظیفه دوست*[1]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران.

***نویسنده مسئول:** *m.vazifedoost@iau-neyshabur.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۰۷

چکیده

سس کچاپ گوجه فرنگی محصولی پر مصرف در جهان و ایران است به همین لحاظ تهیه محصولی سینبیوتیک از آن باعث ارتقاء سلامتی خواهد شد. در این تحقیق از طرح کاملا تصادفی و روش سطح پاسخ (طرح مرکب مرکزی چرخش پذیر) و از نرم افزار Design Expert (ورژن ۷) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده گردید. طبق نتایج بدست آمده بهترین تیمارها در بین نمونه‌های سس از نظر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بعد از ۳۰ روز نگهداری، نمونه حاوی ۲ درصد لاکتولوز و ۲/۵ درصد فیبر (چه دارای باکتری ریزپوشانی شده و یا آزاد) بود که تعداد باقیمانده باکتری‌ها در پایان دوره نگهداری در نمونه سس حاوی باکتری ریز-پوشانی شده $۴/۰۹ \times ۱۰^{۷}$ cfu/ml و در نمونه سس حاوی باکتری آزاد $۱/۱۹ \times ۱۰^{۷}$ cfu/ml بود. عکسبرداری الکترونی از نمونه‌های بهینه حاکی از آن بود که در نمونه‌های سس حاوی باکتری ریزپوشانی شده ابعاد باکتری بزرگتر از نمونه‌های سس حاوی باکتری آزاد بود. انتقال نمونه‌های بهینه به محیط شبیه سازی شده معده و روده نشان دهنده آن بود که نمونه سس حاوی باکتری ریزپوشانی شده که در فرمولاسیون آن ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز بکار رفته بود، اختلاف معنی‌داری ($p< 0.05$) با نمونه‌های دیگر داشت که بعلت حفظ باکتری‌ها در هر دو محیط معده و روده بالاتر از $۱۰^{۶}$ cfu/ml و داشتن ترکیبات پری بیوتیکی فیبر و لاکتولوز ، یک نمونه سینبیوتیک محسوب می گردد.

کلید واژه ها: سس کچاپ، لاکتولوز، سینبیوتیک، ریزپوشانی.

مقدمه

گوجه فرنگی یکی از مهمترین سبزی‌هایی است که به واسطه داشتن ترکیبات کارتنوئیدی (لیکوپن)، ترکیبات فنلی و ویتامین C بالا ارزش غذایی قابل ملاحظه‌ای دارد . بررسی‌های جدید حاکی از این است افرادی که در هفته دوبار غذاهای تهیه شده با گوجه فرنگی و حتی سس گوجه فرنگی مصرف می‌کنند از خواص پیشگیرانه گوجه فرنگی بهره مند خواهند شد. به گفته پژوهشگران لیکوپن، رنگدانه‌ای از خانواده کاروتنوئیدهاست که موجب قرمزشدن رنگ گوجه فرنگی می‌شود و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است. سس گوجه فرنگی یکی از محبوب-ترین محصولات گوجه فرنگی در بازار جهانی است و نیاز به تجهیزات محدود و فرآوری ساده را دارد (Sharoba et al., 2005). امروزه سس گوجه فرنگی به یکی از مهمترین چاشنی‌های غذایی تبدیل شده است و از رایجترین محصولات صنعتی گوجه فرنگی محسوب می‌شود. درآمد حاصل از بخش سس کچاپ گوجه فرنگی در کشور امریکا در سال ۲۰۲۰ به ۵۴۰۱ میلیون دلار رسیده است. انتظار می‌رود این بازار سالانه ۲/۴ درصد رشد کند. متوسط مصرف سرانه در کشور امریکا درسال ۲۰۲۰، ۵/۸ کیلوگرم است

statista.com/outlook/40070100/109/tomato-) .(ketchup/united-states

به دلیل مصرف بالای سس گوجه فرنگی، می‌توان با افزودن ترکیباتی به آن باعث فراسودمند شدن آن شد. تولید محصولات سینیوتیک یکی از روشهای فراسودمند کردن مواد غذایی است. سینبیوتیک‌ها ترکیبی از پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها هستند که اثرات سلامت بخش زیادی از آنها گزارش شده است (Rastall and

Maitain, 2002). سینبیوتیک‌ها دارای اثرات سودمندی بر میزبان توسط ایجاد و تقویت میکروارگانیسم‌های مفید موجود در دستگاه گوارش آنها هستند (Xu et al., 2003). هدف اصلی در تهیه فرآورده‌های سینبیوتیک حفظ زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک موجود در ماده غذایی است که بدین منظور به راهکارهای مختلفی مثل استفاده از ترکیبات پری‌بیوتیک در داخل مواد غذایی و ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک می توان اشاره کرد. باکتری پروبیوتیک نه تنها بایستی در طول نگهداری ماده غذایی زنده بماند بلکه باید در طول عبور از معده و روده توانایی زنده‌مانی خود را حفظ کند (Mokarram et al., 2009). یکی از راهکارهای ارایه شده برای حفظ زنده‌مانی در حین عبور باکتری از دستگاه گوارش روش ریزپوشانی است که به روش‌های مختلفی از جمله خشک کردن پاششی ، خشک کردن انجمادی ، پوشش‌دهی به طریق بستر سیال ، اکستروژن ، کریستالیزاسیون مرکب ، دخول ملکولی ، کوآسرواسیون و روش امولسیون انجام می‌شود (یوسفی و همکاران، ۱۳۹۵). در همین خصوص Mohammadi و همکاران (۲۰۱۲) بقای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* میکروانکپسوله شده را در سس مایونز حاوی پری بیوتیک نشاسته مقاوم و آلژینات بررسی کردند. این مطالعه نشان داد که نشاسته مقاوم می‌تواند در شرایط اسیدی زنده‌مانی بیشتری برای *L acidophilus* ایجاد کند و تفاوت معنی‌داری از نظر زنده-مانی بین حالتهای آزاد و اینکپسوله شده باکتری مذکور در سس مایونز ایجاد نماید و زنده مانی در حالتی که باکتری کپسوله شده بود نسبت به حالت آزاد بیشتر بود (Mohammadi et al., 2012) و همچنین Fahimdanesh و همکاران (۲۰۱۲)، *L. casei* و *Bifidobacterium bifidum* را به شکل سلولهای آزاد یا ریزپوشانی شده با نشاسته مقاوم به سس مایونز اضافه کردند و میزان زنده‌مانی آنها را ارزیابی نمودند. نتایج آنها نشان داد که عمل ریزپوشانی با نشاسته مقاوم در مدت زمان ۳۰ روز نگهداری ، باعث افزایش زنده‌مانی *L. Casei* و *B. bifidum* در مقایسه با سلول‌های آزاد شد (Fahimdanesh et al., 2012). هدف از این مطالعه ارزیابی میزان زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*(La-5) ریزپوشانی شده در سس کچاپ سینبیوتیک و محیط شبیه سازی شده معده و روده بوده است.

روش کار

مواد

لاکتولوز، فیبر خالص گندم، پودر پپسین ، اسید کلریدریک، سود، پودر نمک صفرا ، پودر پانکراس، نشاسته ذرت، آلژینات سدیم و توئین ۸۰، MRS Broth و MRS Agar از شرکت مرک آلمان تهیه و باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La-5 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران- سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری گردید. رب با درجه بریکس ۲۶/۵ از شرکت یک و یک و سرکه از یک شرکت صنایع آزمایشگاهی واقع در شهرستان نیشابور خریداری گردید.

آماده سازی سس کچاپ

تولید سس کچاپ طبق جدول ۱ و با استفاده از غلظت-های مشخص شده رب گوجه فرنگی، شکر، سرکه، نمک و سطوح مختلف فیبر گندم (۰ ، ۱/۵ و ۲/۵ درصد) و همچنین سطوح مختلف لاکتولوز (۰ ، ۱ و ۲ درصد) و آب تا رسیدن به ۱۰۰ درصد انجام گرفت بدینصورت که ابتدا آب و رب گوجه فرنگی مخلوط شده و در دمای ۹۰ درجه حرارت داده شدند و سپس نمک اضافه گردید و ۲۰ دقیقه بصورت ملایم حرارت داده شد و پس از آن شکر و سرکه ، لاکتولوز و فیبر گندم مخلوط شده و پس از ۵ دقیقه همزدن با مخلوط‌کن داخل ظروف استریل شده تقسیم گردید و داخل یخچال جهت مراحل بعدی نگهداری گردید.

جدول ۱- ترکیبات مورد استفاده در فرمولاسیون نمونه‌های سس کچاپ

ترکیبات	درصد مقادیر
رب گوجه فرنگی	۲۰
شکر	۱۰
سرکه	۸
نمک	۲
فیبر گندم	۲-۰/۵
لاکتولوز	۲-۰
آب	تا رسیدن به ۱۰۰

آماده سازی باکتری پروبیوتیک و تهیه کدورت ۱۰ مک فارلند

در ابتدا باکتری پروبیوتیک به داخل محیط MRS براث منتقل و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد داخل انکوباتور شیکردار قرار گرفت تا باکتری‌ها در فاز رشد قرار گرفته و تعداد آنها زیاد شد. بعد از ۲۴ ساعت باکتری‌ها از داخل محیط براث به محیط MRS آگار منتقل و سپس پلیت‌ها تحت شرایط بیهوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۷۲ ساعت انکوبه گذاری گردیدند و بعد از ۷۲ ساعت کلنی‌ها رشد کردند. سپس کدورت ۱ مک فارلند تهیه شد. کدورت ۱ مک فارلند معادل $۱۰^{۹}$ × ۳ باکتری پروبیوتیک در هر سی سی از آب مقطر بود. جهت تایید با استفاده ازدستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر جذب قرائت گردید.

ریزپوشانی باکتری

ریزپوشانی به روش املسیون انجام شد (Marshall, Sheu and 1993). ۱۰ سی سی از سوسپانسون میکروبی به ۵۰ سی سی محلول استریل حاوی غلظت های مختلف آلژینات سدیم و نشاسته ذرت (۲ درصد آلژینات سدیم + ۲ درصد نشاسته ذرت) اضافه شد. این مخلوط با یک سرنگ استریل در شرایط استریل بصورت قطره قطره به ۲۵۰ سی سی روغن آفتابگردان حاوی ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰ اضافه گردید. جهت تشکیل املسیون به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط حاصل روی همزن مغناطیسی با سرعت g × ۲/۲۲ قرار گرفت تا دو فاز آلی و آبی آن کاملا با یکدیگر مخلوط شوند. برای شکل‌گیری ریزپوشینه ها ۲۵۰ سی سی محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار با دمای ۴ درجه سانتی گراد به آرامی به املسیون اضافه و املسیون به مدت ۵ دقیقه با سرعت g × ۱/۱۱ روی همزن مغناطیسی با محلول کلرید کلسیم مخلوط شد. پس از اتمام زمان مخلوط شدن ۳۰ دقیقه زمان داده شد تا ریزپوشینه‌ها در کف ظرف ته نشین شوند. سپس با استفاده از سانتریفیوز با شتاب g ×۳۵۰ در دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه از فاز آبی جمع‌آوری شد. ریز پوشینه-های تهیه شده دو بار با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد و با استفاده از سانتریفیوژ شسته شد تا روغن باقیمانده بین ذرات خارج شوند. در انتها به منظور خارج کردن سرم اضافی، ریزپوشینه‌ها با کاغذ صافی استریل ، صاف و تا زمان استفاده در مراحل بعدی در ظروف شیشه ای استریل در یخچال نگهداری شد.

افزودن باکتری پروبیوتیک به نمونه های سس

سوسپانسیون میکروبی به دو صورت آزاد و ریزپوشانی شده به نمونه‌های سس تحت شرایط استریل اضافه شدند. لذا با توجه به تعداد اولیه باکتری‌ها، در هر سی سی سس ۱×۱۰^{۸} عدد باکتری وجود داشت. که با چند کشت تصادفی انجام گرفته روی نمونه‌های سس در محیط MRS آگار تعداد باکتری‌های فوق در روز اول تولید تایید

گردید و پس از سی روز نگهداری نمونه‌های سس در یخچال شمارش باکتری پروبیوتیک نیز انجام شد.

شمارش باکتری پروبیوتیک

برای شمارش باکتری پروبیوتیک از محیط کشت MRS agar ، استفاده گردید. روش پورپلیت بکار گرفته شد و گرمخانه‌گذاری در شرایط بیهوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ - ۴۸ ساعت انجام گرفت (Tharmaraj and Shah, 2003).

ارزیابی زنده مانی باکتری پروبیوتیک در محیط شبیه سازی شده معده و روده

طبق روش نقی‌ها و همکاران (۱۳۹۴) با کمی اصلاحات انجام شد. بدین منظور ۱۰ سی سی از نمونه سس کچاپ با بالاترین زنده‌مانی که طبق روش RSM بعد از ۳۰ روز نگهداری مشخص شده بود به لوله‌های حاوی ۱۰ سی سی محیط شبیه سازی شده معده و روده اضافه و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت برای لوله حاوی محیط شبیه سازی شده معده و ۴ ساعت برای لوله حاوی محیط شبیه سازی شده روده نگهداری و سپس شمارش باکتری پروبیوتیک انجام گرفت.

تهیه محیط شبیه سازی شده معده و روده

برای تهیه محیط شبیه سازی شده معده و روده مطابق روش Kos و همکاران (۲۰۰۰) و به شرح ذیل انجام گرفت.

برای فراهم کردن شیره معده، ۳ گرم پودر پپسین و ۱ لیتر محلول نمکی ۰/۵ درصد مخلوط و pH شیره‌ی معده با کمک اسید کلریدریک غلیظ به ۲/۵ رسانیده و سپس با میکروفیلتر سترون شد. برای فراهم کردن شیره روده کوچک ، سه گرم پودر نمک صفرا و ۱ گرم از پودر پانکراس و یک لیتر محلول نمکی ۰/۵ درصد مخلوط و pH با کمک سود ۰/۱ نرمال به ۸ رسانیده شد. سپس با میکروفیلتر سترون و برای ادامه‌ی پژوهش در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

عکسبرداری توسط میکروسکوپ الکترونی(SEM)

بدین منظور ۵ گرم از نمونه سس با ۳۰ سی سی آب دیونیزه شده مخلوط شد و در g × ۱۰۷۵۲ سانتریفوژ گردید، سوپر ناتانت دور ریخته شد و سپس رسوب باقیمانده با آب دیونیزه دوباره آبکشی شد و دوباره در g × ۱۰۷۵۲ سانتریفیوژ گردید، سوپر ناتانت دور ریخته شد و سپس قسمتی از رسوب بدست آمده به هولدر میکروسکوپ الکترونی انتقال داده شد و در دمای آون خشک گردید (با دمای ۳۵ درجه) و سپس با لایه نازکی از کربن بعنوان یک ماده هدایتی روکش شد و با میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی ۵۰۰۰ تصویربرداری شد.

روش آماری

در این تحقیق از طرح کاملا تصادفی و روش سطح پاسخ (طرح مرکب مرکزی چرخش پذیر و نرم افزار Design Exper 7) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده گردید. تعداد نمونه‌های آزمایشی برای آزمون سطح پاسخ برابر ۱۳ عدد بود که در این میان ۵ آزمون تکرار در نقطه مرکزی در نظر گرفته شد و از این نقاط برای تعیین خطای آزمایش استفاده گردید . روش سطح پاسخ، مطابق جدول شماره ۲ طراحی و سپس انجام گرفت .آنالیز رگرسیون با مدل درجه دوم ذیل انجام شد :

$$Y=\beta^{\circ}+\beta 1X1+\beta 2X2+\beta 11X1^{2}+\beta 22X2^{2}+\beta 12X1X2$$

جدول شماره ۲ : طراحی آزمون‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ

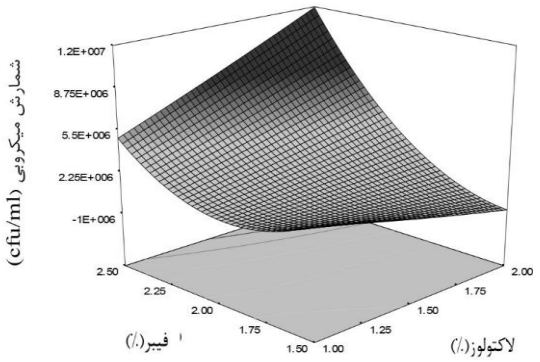
تیمار	درصد لاکتولوز	درصد فیبر	
۱	۱/۵۱۳	۲	۱/۵
۲	۱۲	۱/۵	۲
۳	۱۱	۱	۱/۵
۴	۱۰	۱/۵	۲
۵	۹	۱/۵	۱/۲۹
۶	۸	۲	۲/۵
۷	۷	۱/۵	۲/۷۱
۸	۶	۱/۵	۲
۹	۵	۲/۲۱	۲
۱۰	۴	۱	۲/۵
۱۱	۳	۰/۷۹	۲
۱۲	۲	۱/۵	۲
۱۳	۱	۲	۱/۵

نتایج

بررسی زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک اضافه شده به سس کچاپ

جدول ۳- آنالیز واریانس زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک به روش سطح پاسخ در نمونه‌های سس حاوی باکتری آزاد

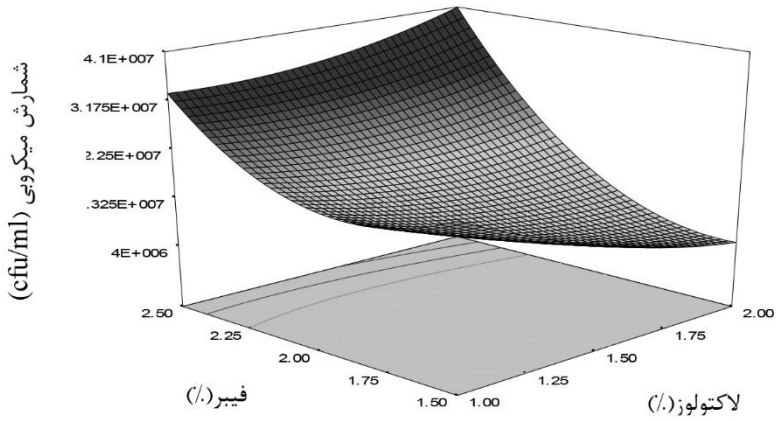
منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۱/۹۳۷E+۰۱٤	۵	۳/۸۷۴E+۰۱۳	۶/۱۸	۰/۰۱۶۶
لاکتولوز	۴/۷۷۴E+۰۱۲	۱	۴/۷۷۴E+۰۱۲	۰/۷۶	۰/۴۱۱۷
فیبر	۱/۰۵۰E+۰۱۴	۱	۱/۰۵۰E+۰۱۴	۱۶/۷۵	۰/۰۰۴۶
اثر متقابل فیبر و عصاره	۲/۹۴۳E+۰۱۳	۱	۲/۹۴۳E+۰۱۳	۴/۷۰	۰/۰۶۶۹
مربع لاکتولوز	۸/۲۶۹E+۰۱۰	۱	۸/۲۶۹E+۰۱۰	۰/۰۱۳	۰/۹۱۱۸
مربع فیبر	۵/۴۰۷E+۰۱۳	۱	۵/۴۰۷E+۰۱۳	۸/۶۳	۰/۰۲۱۸
باقی مانده	۴/۳۸۶E+۰۱۳	۷	۶/۲۶۶E+۰۱۲		
فقدان تناسب	۳/۲۱۶E+۰۱۳	۳	۱/۰۷۲E+۰۱۳	۳/۶۶	۰/۱۲۱۰
خطای خالص	۱/۱۷۰E+۰۱۳	۴	۲/۹۲۶E+۰۱۲		



شکل شماره ۱- بررسی زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک آزاد در سس کچاپ

جدول ۴- آنالیز واریانس زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک به روش سطح پاسخ در نمونه‌های سس حاوی باکتری ریز پوشانی شده

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۲/۰۰۲E+۰۱۵	۵	۴/۰۰۳E+۰۱۴	۵/۵۸	۰/۰۲۱۸
لاکتولوز	۵/۳۸۷E+۰۱۳	۱	۵/۳۸۷E+۰۱۳	۰/۷۵	۰/۴۱۴۹
فیبر	۱/۱۰۵E+۰۱۵	۱	۱/۱۰۵E+۰۱۵	۱۵/۴۰	۰/۰۰۵۷
اثر متقابل فیبر و عصاره	۱/۶۳۸E+۰۱۴	۱	۱/۶۳۸E+۰۱۴	۲/۲۸	۰/۱۷۴۵
مربع لاکتولوز	۴/۵۳۶E+۰۱۳	۱	۴/۵۳۶E+۰۱۳	۰/۶۳	۰/۴۵۲۶
مربع فیبر	۶/۶۷۹E+۰۱۴	۱	۶/۶۷۹E+۰۱۴	۹/۳۱	۰/۰۱۸۶
باقی مانده	۵/۰۲۲E+۰۱۴	۷	۷/۱۷۴E+۰۱۳		
فقدان تناسب	۱/۷۶۳E+۰۱۴	۳	۵/۸۷۵E+۰۱۳	۰/۷۲	۰/۵۸۹۶
خطای خالص	۳/۲۵۹E+۰۱۴	۴	۸/.۱۴۸E+۰۱۳		



شکل شماره ۲- بررسی زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک ریز پوشانی شده در سس کچاپ

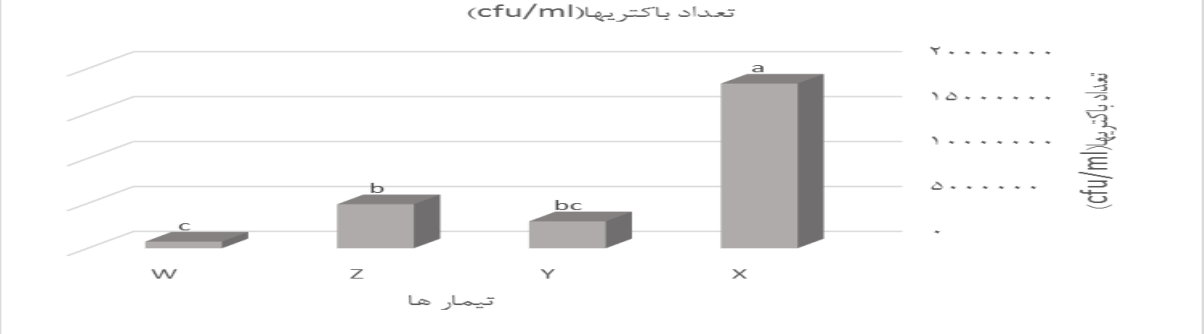
همانطور که در جداول آنالیز واریانس شماره ۳ و ۴ و شکل‌های شماره ۱ و ۲، ملاحظه می‌گردد، نتایج بدست آمده توسط نرم افزار RSM نشان داد که رابطه بین رشد و بقاء باکتری پروبیوتیک و غلظت‌های مختلف فیبر و لاکتولوز در هر دو مورد نمونه‌های سس حاوی باکتری ریزپوشانی شده و آزاد معنی‌دار بود ($P<0.05$) و R^2 در نمونه حاوی باکتری آزاد مساوی ۰/۸۲ و در نمونه‌های حاوی باکتری ریزپوشانی شده عدد ۰/۸ بود. در بین روابط برازش داده شده اثر مدل و فیبر و مربع فیبر در سطح $P<0.05$ معنی‌دار بود.

بهینه سازی

طبق نتایج بدست آمده اپتیمم زنده‌مانی باکتری‌ها در بین نمونه‌های سس حاوی باکتری‌های ریز پوشانی نشده طبق روش سطح پاسخ دارای مطلوبیت ۰/۷۹۲ بوده که تحت این شرایط غلظت فیبر ۲/۵ و لاکتولوز ۲ درصد و میزان باکتری‌ها $۱/۱۹ \times ۱۰^{۷}$ cfu/ml بود و از طرفی طبق نتایج بدست آمده بررسی اپتیمم زنده‌مانی باکتری‌ها در بین نمونه‌های سس حاوی باکتری‌های ریز پوشانی شده طبق روش سطح پاسخ دارای مطلوبیت ۰/۷۹۲ بوده که تحت این شرایط غلظت فیبر ۲/۵ و لاکتولوز ۲ درصد و میزان باکتری‌ها $۴/۰۹ \times ۱۰^{۷}$ cfu/ml بود. در مجموع بهترین تیمارها از نظر زنده‌مانی باکتری‌ها بعد از ۳۰ روز نگهداری چه در نمونه‌های حاوی باکتری آزاد و یا ریز پوشانی شده ، نمونه‌های حاوی ۲ درصد لاکتولوز و ۲/۵ درصد فیبر بود که تعداد باقی مانده باکتری‌ها بعد از ۳۰ روز نگهداری در نمونه سس حاوی ریز پوشانی شده $۴/۰۹ \times ۱۰^{۷}$ cfu/ml و در نمونه سس حاوی باکتری آزاد $۱/۱۹ \times ۱۰^{۷}$ cfu/ml

بود که این نمونه‌ها با همین تعداد باکتری به محیط‌های شبیه سازی شده معده و روده اضافه شدند.

ارزیابی زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک انتقال یافته از نمونه-های سس حاوی باکتری ریزپوشانی شده و آزاد به محیط شبیه سازی شده معده و روده

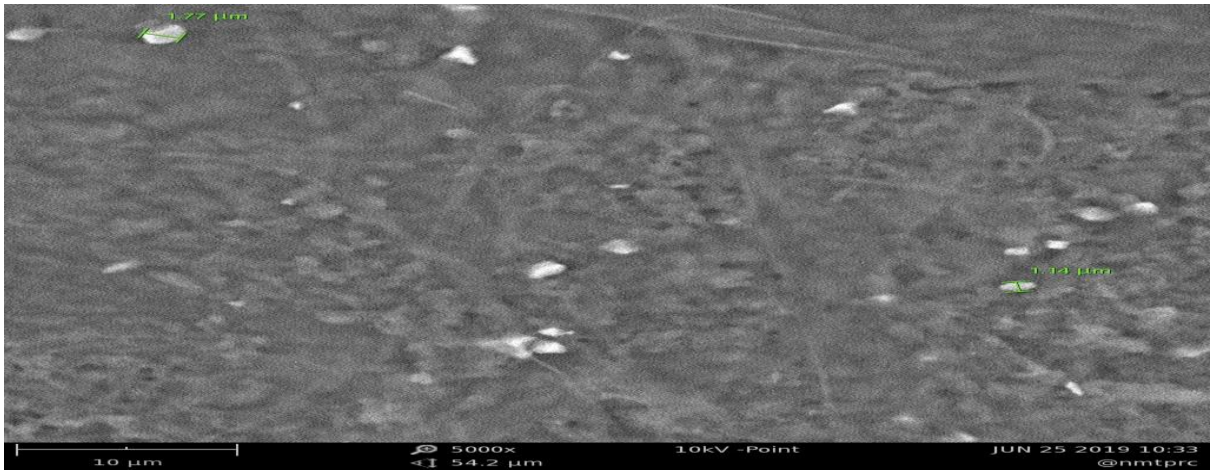


محیط شبیه سازی شده معده شامل نمونه سس حاوی باکتری ریز پوشانی شده (بعلاوه ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز) =X
محیط شبیه سازی شده روده شامل نمونه سس حاوی باکتری ریز پوشانی شده (بعلاوه ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز) =Y
محیط شبیه سازی شده معده شامل نمونه سس حاوی باکتری آزاد (بعلاوه ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز) =Z
محیط شبیه سازی شده روده شامل نمونه سس حاوی باکتری آزاد (بعلاوه ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز) =W

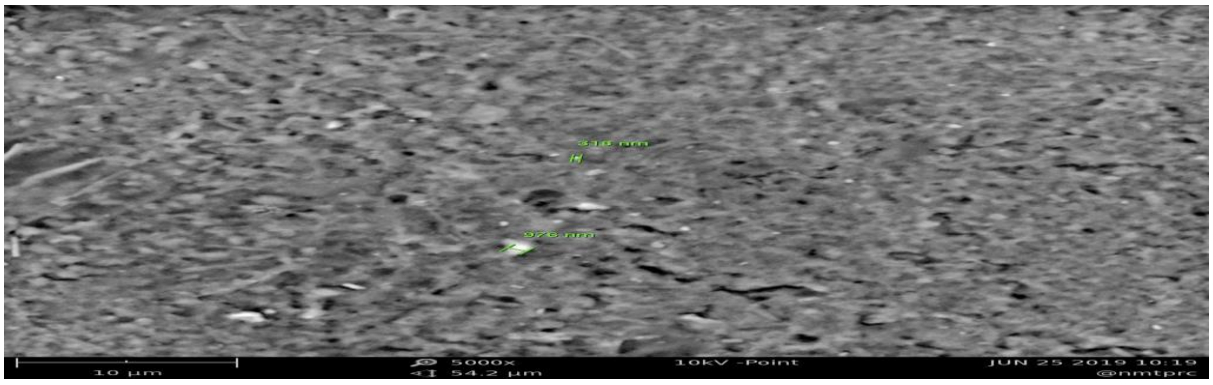
طبق شکل شماره ۳، بیشترین زنده‌مانی باکتریها مربوط به نمونه سس کچاپ حاوی باکتری ریز پوشانی شده بعلاوه ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز در محیط معده (X) بوده که اختلاف معنی‌داری ($p< 0.05$) با نمونه‌های دیگر دارد. کمترین میزان زنده‌مانی باکتری‌ها مربوط به نمونه سس حاوی باکتری آزاد در محیط شبیه سازی شده روده است (W). اختلاف معنی‌داری بین زنده‌مانی باکتری در محیط شبیه سازی شده روده شامل نمونه سس حاوی باکتری ریز پوشانی شده (بعلاوه ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز (Y)) با محیط شبیه سازی شده روده و معده شامل نمونه سس حاوی باکتری آزاد (بعلاوه ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز (Z و W)) وجود ندارد.

عکسبرداری الکترونی (SEM) بافت سس کچاپ

به منظور اطلاع از چگونگی ساختار باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی شده و مقایسه با ساختار باکتری پروبیوتیک آزاد با دستگاه میکروسکوپ الکترونی از نمونه سس حاوی باکتری ریزپوشانی شده و آزاد عکسبرداری انجام گردید. مشاهدات حاصل از SEM نشان داد که عرض متوسط باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی شده ۱/۴۷ میکرون می باشد (شکل ۴) و همچنین عرض متوسط باکتری پروبیوتیک آزاد ۶۴۷ نانومتر می باشد (شکل ۵). در نمونه‌های سس ابعاد باکتری‌های ریزپوشانی شده بزرگتر از باکتری‌های آزاد است.



شکل شماره ۴: عکسبرداری الکترونی از بافت سس کچاپ حاوی باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی شده



شکل شماره ۵: عکسبرداری الکترونی از بافت سس کچاپ حاوی باکتری پروبیوتیک آزاد

بحث

همانطور که نمودارهای ۲ و ۳ نشان می‌دهند، با افزایش غلظت فیبر و افزایش غلظت لاکتولوز رشد باکتری پروبیوتیک افزایش پیدا کرده است. بالاترین بقاء باکتری در بالاترین غلظت فیبر و لاکتولوز مشاهده گردید. میکروارگانیسم پروبیوتیک از ترکیبات فوق استفاده نموده و با توجه به این که فیبر و لاکتولوز جزو ترکیبات پری-بیوتیک هستند لذا رشد باکتری پروبیوتیک را تحریک نموده اند و لذا زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در نمونه-های سس حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده بالاتر از نمونه‌های سس حاوی باکتری پروبیوتیک آزاد می باشد. ریزپوشانی باکتری‌ها به عنوان یکی از جدیدترین روشها تأثیر قابل توجهی در بقای پروبیوتیک دارد (Singh and Anal, 2007). با توجه به اینکه در این تحقیق از روش امولسیون برای ریزپوشانی استفاده شده است، مطالعات مختلف نشان داده است که افزودن نشاسته به عنوان ماده پرکننده در ماتریس کپسول آلژینات باعث افزایش زنده-مانی پروبیوتیک می شود (یوسفی و همکاران ، ۱۳۹۵ ; et Homayouni al., 2008). در همین راستا محمدی و همکاران (۲۰۱۲) بقای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* میکروانکپسوله شده را در سس مایونز حاوی پری‌بیوتیک نشاسته مقاوم و آلژینات بررسی کردند. این مطالعه نشان داد که نشاسته مقاوم می تواند در شرایط اسیدی زنده‌مانی بیشتری برای *L acidophilus* ایجاد می‌کند و تفاوت معنی‌داری از نظر زنده‌مانی بین حالت‌های آزاد و اینکپسوله شده باکتری مذکور در سس مایونز ایجاد نمود و زنده‌مانی در حالت اینکپسوله نسبت به حالت آزاد بیشتر بود. Chen و همکاران (۲۰۰۵) پری‌بیوتیک‌هایی نظیر فروکتوالیگوساکارید و ایزو مالتوالیگوساکارید، یک تقویت کننده رشد (پپتید) و آلژینات سدیم را به عنوان مواد پوشش دهنده برای ریزپوشانی پروبیوتیک‌هایی نظیر

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* آزمایش کرده و مشاهده کردند که استفاده از این ترکیبات باعث افزایش بقای باکتری‌ها می‌گردد (Chen et al., 2005). همچنین Kishk و همکاران (۲۰۰۷) و Donthidi و همکاران (۲۰۱۰) که بر روی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بصورت ریزپوشانی و آزاد در سس مایونز مطالعه نمودند، اظهار کردند که باکتری پروبیوتیک بصورت ریزپوشانی شده زنده‌مانی بیشتری نسبت به باکتری آزاد داشت (Kishk et al., 2007; Donthidi et al., 2010). لذا مطالعه انجام گرفته در مطابقت با تحقیقات سایر محققین است.

همچنین طبق شکل شماره ۳، زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* گونه LA-5 در محیط معده بیشتر از روده بوده ثانیا ریزپوشانی تاثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* داشته و موثر بوده است. ریزپوشانی روشی مفید برای محافظت از پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شود (Burgain et al., 2011). آزمایشات Lee و Heo در سال ۲۰۰۰ نشان داد که بقای *بیفیدو باکتریوم لانگوم* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم در شرایط شبیه سازی شده اسید معده به طور قابل ملاحظه-ای افزایش می‌یابد (Lee and Heo, 2000) و همچنین Rao و همکاران در ۱۹۸۹ دریافتند که ریزپوشانی *بیفیدوباکتریوم سودولانگوم* با پوشینه سلولز استات فتالات بقای آن را در شرایط شبیه سازی شده اسید معده افزایش می‌دهد (Rao et al., 1989).

کمترین میزان زنده‌مانی مربوط به نمونه سس حاوی باکتری آزاد بعلاوه ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز در محیط روده (W) بوده است. یکی از دلایل مهمی که میکروارگانیسم پروبیوتیک ریزپوشانی شده بوسیله آلژینات در محیط معده نسبت به روده زنده‌مانی بیشتری دارد این است که آلژینات در محیط اسیدی معده به صورت پوسته متخلخل نامحلول پلی‌آلژینیک اسید در می آید که با افزایش pH در روده این پوسته به یک لایه محلول تبدیل و این لایه در محیط خنثی و قلیایی خیلی سریع حل می شود (Zheng et al., 2006). نمونه سس کچاپ حاوی باکتری آزاد بعلاوه ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز در محیط روده (W) به دلیل اینکه تعداد باکتری‌های پروبیوتیک موجود در هر سی سی آن به زیر cfu/ml ۱۰^۶رسیده است لذا سینبیوتیک نیست اما نمونه سس کچاپ حاوی باکتری ریزپوشانی شده بعلاوه ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز در محیط‌های معده و روده (Y وX) به دلیل داشتن ترکیبات پری‌بیوتیکی و هم چنین تعداد باکتری باقی مانده بیشتر از cfu/ml ۱۰^۶سینبیوتیک محسوب می‌شود (shah, 2007) لذا نمونه سس حاوی باکتری ریزپوشانی شده که در فرمولاسیون آن ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز بکار رفته بود، سینبیوتیک محسوب می‌گردد.

نتایج عکسبرداری الکترونی دلالت بر آن دارد که ابعاد باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده کمتر از ۱۰۰ میکرومتر است. در اهمیت اندازه ریزپوشینه ها باید گفت که اندازه ریزپوشینه بر بافت و احساس دهانی مصرف کننده محصول حاوی باکتری ریزپوشانی شده موثر است. ریزپوشینه‌های با اندازه خیلی بزرگ باعث نامناسب شدن بافت فرآورده‌های غذایی می‌شود و به طور کل برای استفاده در فرآورده‌های غذایی ریز پوشینه‌های با اندازه کم تر از ۱۰۰ میکرومتر مناسب است (Barbosa-Canovas santamos et al., 2003; et al., 1987) که نتایج بدست آمده با نتایج فوق همخوانی دارد.

نتیجه گیری کلی

سس کچاپ محصولی پر مصرف در جهان و ایران است به همین لحاظ تهیه محصولی سینبیوتیک و مصرف آن باعث ارتقاء سلامتی خواهد شد. بدین لحاظ این پژوهش انجام گردید. طبق نتایج بدست آمده بهترین تیمار ها از نظر زنده مانی باکتری پروبیوتیک بعد از ۳۰ روز نگهداری چه در نمونه های سس حاوی باکتری آزاد و یا ریز پوشانی شده ، نمونه حاوی ۲ درصد لاکتولوز و ۲/۵ درصد فیبر

بعلاوه باکتری آزاد و هم چنین نمونه حاوی ۲ درصد لاکتولوز و ۲/۵ درصد فیبر بعلاوه باکتری ریزپوشانی شده بود که تعداد باقی مانده باکتری ها بعد از ۳۰ روز نگهداری در نمونه سس حاوی باکتری ریز پوشانی شده cfu/ml $۱۰^{۷}$ × ۴/۰۹ و در نمونه سس حاوی باکتری ریز پوشانی نشده cfu/ml $۱۰^{۷}$ × ۱/۱۹ بود. عکسبرداری الکترونی از نمونه های بهینه حاکی از آن بود که در نمونه های سس ابعاد باکتر ی های ریزپوشانی شده بزرگتر از باکتری های آزاد بود. انتقال نمونه های بهینه به محیط شبیه سازی شده معده و روده نشان دهنده آن بود که نمونه سس حاوی باکتری ریز پوشانی شده که در فرمولاسیون آن ۲/۵ درصد فیبر و ۲ درصد لاکتولوز بکار رفته بود، بعلت حفظ باکتری ها در هر دو محیط معده و روده بالاتر از cfu/ml $۱۰^{۶}$ سینبیوتیک محسوب گردیده و بعنوان تیمار برتر معرفی می گردد.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور که حمایت های لازم را از انجام طرح پژوهشی با عنوان " بررسی خواص فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی، میکروبی و حسی سس گوجه فرنگی سینبیوتیک" که این مقاله از آن استخراج شده است را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱. نقی ها، رضا.، کشتکاران، علی نقی و حسینی، حمیرا. (۱۳۹۴). تاثیر افزودن گیاه شیرابه اتانولی گیاه چویل روی رشد باکتری های لاکتوباسیلوس و سالمونلا ، در محیط شبیه سازی شده معده – روده و شیر پس چرخ در شرایط آزمایشگاهی. مجله ارمغان دانش، دوره ۲۰، شماره ۵، ۳۹۳-۴۰۳.

۲. یوسفی، هاجر، سلیمانیان زاد، صبیحه و شاهدی باغ خندان، محمد. (۱۳۹۵). ریزپوشانی پروبیوتیکها با روش امولسیون در تولید نان پروبیوتیک. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال یازدهم ، شماره ۴، ۹۹ -۱۰۶.

3. Anal, A.K and Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends Food Sci. Technol, 18:240–251.

4. Barbosa-Canovas, G.V., Malave-Lopez, J and Peleg, M. 1987. Density and compressibility of selected food powders mixture. J. Food Process Eng. 10 (1): 1-19.

5. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M and Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. J Food Eng. 104(4): 467–483.

6. Donthidi, A.R., Tester, R.F and Aidoo, K.E. 2010. Effect of lecithin and starch on alginate-encapsulated probiotic bacteria. J. Microencapsul. 27: 67–77.

7. Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S and Razavi, S.H. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chem.111:50–55.

8. Https://www.statista.com/outlook/40070100/109/tomato-ketchup/united-states.

9. Fahimdanesh, M., Mohammadi, N., Ahari, H., Zanjani, M., Hargalani, F and Behrouznasab, K. 2012. Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of Lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum in mayonnaise sauce. Afr J Microbiol Res. 6: 6853–6858.

10. Kishk, Y. F. M., Abd El-Razik, M. M. M and Ibrahim, M.T. 2007. Quality characteristics of mayonnaise enriched by probiotic bacteria. Ann. Agric. Sci. Moshtohor. 45 (2):701-718.

11. Kos, B., Suskovic, J., Goreta, J and Matosic, S. 2000. Effect of protectors on the viability of lactobacillus acidopHilus M92 in simulated gastrointestinal conditions. Food Tech Biotechnol. 38(2):121-127.

12. Lee, K.I and Heo, T.R. 2000. Survival of Bifudobacterium longum immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric

juices and bile salt solution. Appl Environ Microbiol. 66: 869-973.

13. Mohammadi, N., Ahari, H., Fahimdanesh, M., Zanjani, M.A.K., Anvar, A and Shokri, E. 2012. Survival of alginate-prebiotic microencapsulated Lactobacillus acidophilus in mayonnaise sauce. Iranian J Vet Med. 6(4): 259-264.

14. Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Najafi, M.B.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 Res Int. 42: 1040-1045.

15. Rao, A.V., Shiwnarin, N and Maharij, I. 1989. Survival of microencapsulated Bifidobacterium pseudolongum in simulated gastric and intestinal juices. Can Inst Food Sci Technol J. 22: 345-349

16. Rastall, R.A and Maitain, V. 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. Curr Opin Biotech. 13: 490-496.

17. Santomaso, A., Lazzaro, P and Canu, P. 2003. Powder flowability and density ratios: the impact of gran-ules packing. Chem. Eng. Sci. 58 (13): 2857-2874.

18. Shah, N.P. 2007. Functional cultures and health benefits. Int Dairy J. 17: 1262-1277.

19. Sharoba, A.M., Senge, B., El-Mansy, H.A., Bahlol, H.E and Blochwitz, R. 2005. Chemical, sensory and rheological properties of some commercial German and Egyptian tomato ketchups. Eur Food Res Tech. 220(2):142-151.

20. Sheu, T. Y., Marshall, R. T and Heymann, H. 1993. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. J Dairy Sci. 76(7): 1902–1907.

21. Tharmaraj, N and Shah, N.P. 2003. Selective Enumeration of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Streptococcus thermopHilus, Lactobacillus acidopHilus, Bifidobacteria, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus and Propionibacteria. J Dairy Sci. 86: 2288–2296.

22. Xu, Z.R., Hu, C.H., Xia, M.S., Zhan, X.A and Wang, M.Q. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities .Intestinal Microflora and morphology of male broilers. Poultry Sci. 82: 1030-1036.

23. Zheng, C., Sun, D.W and Zheng, L. 2006. Recent developments and applications of image features for food quality evaluation and inspection–a review. Trends Food Sci Tech. 17(12):642-655.

Evaluation of survival of probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* (La-5) microencapsulated in symbiotic ketchup sauce and simulated gastric and intestinal environment

Vazifedoost M [1*]

1. Department of Food Science and Technology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

[*]**Corresponding author:** *m.vazifedoost@iau-neyshabur.ac.ir*

Received: 28 August 2020 Accepted: 27 November 2020

Abstract

Tomato ketchup is a widely used product in the world and in Iran, therefore, preparing symbiotic products from it will promote health. In this study, a completely randomized design and response surface method (rotating central composite design) and Design Expert software (version 7), and Duncan test were used to compare the means. According to the results, the best treatments among the sauce samples in terms of survival of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* after 30 days of storage, the sample contained 2% lactulose and 2.5% fiber (whether encapsulated or free bacteria). Bacterial residue at the end of the storage period was 4.09 $*10^7$ cfu/ml in the sauce sample containing encapsulated bacterium and 1.19 $* 10^7$ cfu/ml in the sauce sample containing the free bacterium. Electron imaging of optimal specimens showed that dimensions of the encapsulated bacterium were larger than those of the sauce containing the free bacteria. The transfer of optimal samples to the simulated environment of the stomach and intestines indicated that the sample of the sauce contained encapsulated bacteria in the formulation of which 2.5% fiber and 2% lactulose were used, having a significant difference ($p < 0.05$) with other samples and due to the preservation of bacteria in both stomachs and Intestine above 10^6 cfu/ml and having prebiotic compounds of fiber and lactulose is a symbiotic sample.

Keywords: Tomato ketchup, lactulose, symbiotic, encapsulation.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.