Archive of SID

مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال یازدهم، شماره 3، پاییز 1395، صفحات 102-93

بررسی اثر ریزپوشانی چند لایه‌ای به روش ژلاتیناسیون خارجی بر بقاء باکتری پروبیوتیک طی پاستوریزاسیون آب پرتقال

محمد دولت آبادی[1]، محسن مختاریان[2]، سید علی مرتضوی[3]، امیر حسین الهامی‌راد[1]

1- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

2- نویسنده مسئول: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران. پست الکترونیکی: mokhtarian.mo@gmail.com

3- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی، دانشکده کشاورزی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 94/3/20 تاریخ پذیرش: 94/7/3

چکیده

سابقه و هدف: محصولات غیر لبنی پروبیوتیک با خصوصیات ارزشمند تغذیه‌ای و درمانی، از موضوعات جدید در زمینهٔ صنعت، تغذیه و پزشکی می‌باشند. هدف از این مطالعه، امکان‌سنجی بررسی تأثیر درون‌پوشانی بر بقاء باکتری پروبیوتیک به روش امولسیون‌سازی طی فرآیند پاستوریزاسیون حرارتی آب پرتقال است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به عنوان گونهٔ پروبیوتیک در آب‌میوه پرتقال استفاده گردید. باکتری‌های پروبیوتیک به چهار حالت آزاد، بدون پوشش، پوشش تک لایه و دولایه به آب پرتقال تلقیح شدند. ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک به روش امولسیون‌سازی توسط آلژینات کلسیم انجام گرفت. شمارش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک به روش کشت مخلوط در محیط کشت MRS Agar تحت شرایط هوازی در دمای 37°C به مدت 48 تا 72 ساعت صورت گرفت. همچنین آنالیز آماری با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سطح احتمال 0/05 درصد انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان کاهش باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی پاستوریزاسیون آب پرتقال در حالت آزاد حدود 5/00 سیکل لگاریتمی بود در حالی که در نمونه‌های حاوی باکتری بدون پوشش، پوشش‌دار با یک و دو لایه آلژینات، این میزان بسیار کمتر و به ترتیب در حدود 3/33، 2/90 و 2/50 سیکل لگاریتمی گزارش گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد آب پرتقال ماده خام مناسبی جهت تأمین رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (محیط اسیدی) بوده و می‌تواند به عنوان یک حامل، برای انتقال باکتری‌های پروبیوتیک به بدن انسان در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: آب پرتقال، پاستوریزاسیون، درون‌پوشانی

• مقدمه

قابلیت زیستی (Viable count) اندک پروبیوتیک‌ها در شرایط دشوار فرآوری مواد غذایی (دمای بالا، نور و اکسیژن) و نیز شرایط اسیدی-صفراوی دستگاه گوارش، پژوهشگران را همواره به یافتن شیوه برای غلبه بر این دسته ناپایداری‌های و امکان رهایش کنترل شده آنها ترغیب کرده است و ریزپوشانی به عنوان یکی از نوین‌ترین این شیوه‌ها اثر قابل ملاحظه‌ای در این ارتباط داشته است (1). ریزپوشانی کاربردهای زیادی در صنایع غذایی دارد که برخی از آنها شامل: محافظت از مواد هسته در برابر شرایط نامطلوب محیط بیرونی، تنظیم رهایش مواد هسته در طول زمان یا در زمان خاص، پوشاندن طعم یا بوی نامطلوب مواد هسته و همچنین حفاظت رنگدانه‌ها، کاهش دادن فراریت (Volatility) برخی ترکیبات زیست فعال، حفاظت از ترکیبات غذا و حفظ ارزش تغذیه‌ای. بدین منظور از روش‌های مختلف، بسته به شرایط جهت ریزپوشانی مواد غذایی استفاده می‌شود که شامل: خشک کردن پاششی (Spray-drying)، پوشش دادن با بستر سیال (Fluidized bed coating)، درون‌پوشانی با روزن‌رانی (Extrusion)، کواسرواسیون (Coacervation)، اسپری

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:06 IRST on Sunday October 30th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:06 IRST on Sunday October 30th 2016

چیلینگ (Spray chilling)، ترسیب پروتئین‌ها (Protein precipitation)، به دام انداختن در لیپوزوم (Liposome entrapment)، امولسیون‌سازی (Emulsification)، به دام انداختن در هیدروژل (Hydrogel entrapment) و ژلاتیناسیون خارجی درون‌پوشانی شده‌اند (3، 2). بنابر اهمیت حفظ قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی در محصولات فراسودمند، فرآیند ریزپوشانی ریزسازواره‌های پروبیوتیکی مورد توجه اکثر محققین قرار گرفته است. بیشتر فعالیت‌هایی که تاکنون در این زمینه انجام شده است، در خصوص قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی در فرآورده‌های لبنی بوده است. بدلیل شرایط خاص مرکبات از نظر pH و اسیدیته و نیز مصرف بالای آنها توسط مردم، محققان توجه‌شان را به تولید این محصولات پروبیوتیکی نیز معطوف داشته‌اند، به تبع آن فرآیند ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیکی نیز در این فرآورده‌ها گزارش شده است. همچنین به دلیل شرایط خاص محیط معده‌ای-روده‌ای، برخی محققین قابلیت زنده‌مانی این ریزسازواره‌ها را در شرایط شبیه‌سازی شده معده‌ای و روده‌ای (Gastro-intestinal conditions) ارزیابی کرده‌اند (4). Nualkaekul و همکاران تأثیر ریزپوشانی با ترکیبات پوشش‌دهنده مختلف (دانک‌های (beads) آلژینات و پکتین) را روی بقای باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* و *بیفیدوباکتریوم لانگوم* (مقدار اولیه برای هر دو گونه حدوداً 3×10^8 cfu/ml) در آب انار و کران‌بری (cranberry) در طی شش هفته در دمای 4°C را مطالعه نمودند. نتایج نشان داد که سلول‌های فاقد کپسول (سلول‌های آزاد) باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* و *بیفیدوباکتریوم لانگوم* به ترتیب در مدت زمان 4 و 1 هفته انبارمانی از بین رفتند در حالی که باکتری‌های فوق در آب کران‌بری در مدت یک هفته نابود شدند. دانک‌های پکتین پوشش یافته به صورت مضاعف با ژلاتین بیشترین نقش حفاظت‌کنندگی را در میان انواع دانک‌ها داشت، به طوری که به ترتیب غلظت نهایی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* و *بیفیدوباکتریوم لانگوم* در 6 هفته انبارمانی برای آب انار و کران‌بری به ترتیب cfu/ml 10^8 و cfu/ml 10^6 شمارش گردید (5). در تحقیقی که توسط Ding and Shah انجام شد، بقای 8 گونه باکتری پروبیوتیکی به دو صورت آزاد و میکروانکپسوله در آب‌میوه سیب و پرتقال در مدت 6 هفته نگهداری در یخچال مورد بررسی قرار گرفت و به این نتیجه رسیدند که آب‌میوه‌های دارای باکتری میکروانکپسوله بسیار بیشتر از آب‌میوه‌های محتوی باکتری پروبیوتیکی به صورت آزاد، با ثبات‌تر بودند (6). Sheehan و همکاران تأثیر نوع محیط پایهٔ اسیدی (آب پرتقال و آب آناناس و آب قره قاط (cranberry)) را بر روی مقاومت باکتری‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدو باکتریوم مطالعه نمودند. نتایج نشان داد که زنده‌مانی کلیهٔ گونه‌های مورد مطالعه طی 3 ماه انبارمانی در آب پرتقال (میزان زنده‌مانی گونه‌ها بالاتر از cfu/ml 10^7) و آب آناناس (میزان زنده‌مانی گونه‌ها بالاتر از cfu/ml 10^6) نسبت به قره قاط بیشتر بود. همچنین میزان تحمل گونه‌های پروبیوتیکی به فرآیند حرارتی (60 s /76°C و 30 s /90°C) و غیر حرارتی (فشار بالا در 400 MPa/ 300 s) نشان داد که هیچ یک از گونه‌های مورد مطالعه قادر به تحمل این تیمارها جهت دستیابی به آب‌میوه با میزان زنده‌مانی بالاتر از cfu/ml 10^6 نبودند (7). Yoon و همکاران مناسب بودن آب گوجه فرنگی برای تولید یک محصول پروبیوتیک با چهار گونه باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA39، *کازئی* A4، *پلانتاروم* C3 و *دلبروکی* D7 را مطالعه کردند. نتایج نشان داد که کشت‌های لاکتیک اسید باکتری میزان pH را تا 4/1 و همچنین پایین‌تر کاهش و میزان اسیدیته را تا 0/65 درصد افزایش دادند. همچنین شمارش زنده‌مانی سلول‌ها بعد از 72 ساعت تخمیر به حدود 9×10^9 تا 1×10^9 عدد در هر میلی‌لیتر رسید. شمارش زنده‌مانی سلول‌های چهار گونهٔ اسید لاکتیک باکتری‌ها در آب گوجه فرنگی تخمیری بعد از 4 هفته انبارمانی در 4 درجه سانتی‌گراد به cfu/ml 10^6 تا 10^8 رسید (8).

فرآیند سنتی پاستوریزاسیون آب پرتقال، جهت غیر فعال کردن آنزیم پکتین متیل استراز و از بین بردن ریزسازواره‌های رشد یافته در آب پرتقال ضروری است (9). از این رو اگر پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل در آبمیوه‌ها مانند آب پرتقال مورد استفاده قرار گیرند، اطلاعاتی در رابطه با تأثیر پاستوریزاسیون و مقاومت آن‌ها در برابر فرآیند سالم‌سازی مورد نیاز است. محافظت پروبیوتیک‌ها بوسیله ریزپوشانی در کپسول‌های آلژینات یک روش بهبود بخشیدن به زنده‌مانی آنها، در غذاهای عملگراست. آلژینات اغلب به عنوان ماده ریزپوشانی استفاده می‌شود، زیرا مزایای غیر سمی بودن و در دسترس بودن را داراست. استفاده از ریزپوشانی به روش امولسیون‌سازی یک فرآیند آرام است که موجب زخمی شدن سلول‌های میکروبی نمی‌شود و می‌تواند به آسانی در مقیاس‌های بزرگ مورد استفاده قرار گیرد. لذا در این مطالعه تأثیر درون‌پوشانی چند لایه‌ای بر بقای باکتری پروبیوتیکی به روش امولسیون‌سازی طی فرآیند حرارتی آب پرتقال بررسی گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:06 IRST on Sunday October 30th 2016

• مواد و روش‌ها

مواد: مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل: ویال کشت باکتریایی پروبیوتیکی (باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به صورت خشک شده انجمادی به شماره 1643 PTCC از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (PTCC) زیر مجموعه سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران است، خریداری شد و تحت شرایط دمای یخچال و استریل شده نگه‌داری شد)، محیط‌های کشت (MRS Agar، MRS Broth و Pepton water Buffered)، توئین 80 به عنوان امولسیفایر، روغن کلزای لادن تولید شده در شرکت صنعتی بهشهر، آلژینات سدیم با ویسکوزیته متوسط، کلرور کلسیم، سیترات سدیم، سود است (تمامی مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت‌های سیگما آلدریچ آمریکا و مرک آلمان تهیه گردید). آب پرتقال پاستوریزه بدون مواد نگهدارنده و شکر، تولیدی شرکت سن‌ایچ استفاده شد.

آماده‌سازی کشت پروبیوتیکی: جهت آماده‌سازی باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس اسیوفیلوس*، LA-5، ابتدا ویال پودر خشک شده انجمادی باکتری در محیط کشت MRS Broth تلقیح شد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 تا 48 ساعت گرمخانه‌گذاری (Memmert, UFB 400, Germany) شد. سپس محیط کشت داده شدهٔ فوق تا 1% رقیق و در شرایط فوق مجدداً گرمخانه‌گذاری شد. بعد از رسیدن به تعداد سلول مورد نیاز، سلول‌های پروبیوتیکی حاصل بعد از سانتریفوژ (Sigma, 2-16KC, USA) در 3000g به مدت 5 دقیقه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد جداسازی شدند. سپس عمل شستشوی سلول‌های جدا شده دوبار با استفاده از محلول 0/1 درصد پپتون واتر تحت شرایط فوق انجام شد و پس از آن جهت تلقیح مستقیم استفاده گردید (10، 7، 6).

ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی: پوشش‌دار کردن باکتری پروبیوتیکی به روش ژلاتیناسیون خارجی (External gelation technique) انجام شد. ابتدا مقدار 2 گرم آلژینات سدیم با ویسکوزیته متوسط در 100 میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از همزن مغناطیسی (Raymand, HS 2000) حل شد. سپس به مدت یک شب در یخچال و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا آلژینات به خوبی آب جذب کند. سپس به بیرون از یخچال منتقل شد و مدتی در دمای آزمایشگاه نگه داشته شد تا با محیط هم‌دما شود. 18 گرم از محلول آلژینات سدیم استریل با 1 گرم از سوسپانسیون باکتریایی مخلوط شد. سوسپانسیون آلژینات و باکتری بطور آهسته با استفاده از پیپت استریل در 100 گرم روغن نباتی مایع کلزا حاوی 5 g/l توئین 80 که با استفاده از همزن مغناطیسی در 900 دور در دقیقه در حال بهم خوردن بود، اضافه شد و به مدت 20 دقیقه به صورت یکنواخت پراکنده گردید. در مرحله بعد با افزودن 32 میلی‌لیتر امولسیون حاوی یون کلسیم (تهیه شده از انحلال 60 گرم روغن نباتی مایع کلزا، 5 g/l توئین 80 و 62/5 میلی‌مولار کلرور کلسیم) عمل ژلاتیناسیون آغاز شد. عمل هم‌زدن به مدت 20 دقیقه، ادامه یافته تا دانک‌های آلژینات شکل بگیرد و سپس همزدن به مدت 30 دقیقه ادامه یافت تا ژلاتیناسیون کامل شود. در نهایت یک سیستم دو فازی بدست می‌آید که فاز رویی آن روغن و فاز پایینی آن دانک‌های آلژینات سدیم ته نشین شده در محلول کلرید کلسیم هستند. در این حالت فاز روغنی را جدا کرده و با استفاده از سانتریفوژ در 500 g و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه جداسازی گردیدند. عمل شستشوی دانک‌ها نیز با استفاده از محلول 0/1% پپتون واتر و با استفاده از سانتریفوژ تحت شرایط فوق انجام شد و سپس در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 ساعت اجازه داده شد تا دانه‌ها به طور کامل سخت شود. دانک‌های آلژینات حاصل سپس جهت تلقیح مستقیم استفاده گردید (10، 6).

پوشش‌دار کردن باکتری پروبیوتیکی: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*L. acidophilus*) ریزپوشانی شده با دانه‌های آلژینات طبق روش فوق الذکر آماده گردیده در مرحله بعد میکروکپسول‌های تهیه شده با کاغذ صافی واتمن شماره 4 فیلتر شده و سپس 15 گرم از آن با 100 میلی‌لیتر محلول 0/5% (وزنی/حجمی) آلژینات با ویسکوزیته متوسط مخلوط شد، و با سرعت 500 دور در دقیقه به مدت 20 دقیقه هم زده شد تا دانک‌ها پراکنده شدند. در مرحله بعدی دانک‌ها جمع‌آوری شده و در 75 گرم روغن کلزا حاوی 5 g/l توئین 80 و کلرور کلسیم 65/5 میلی مولار به مدت 20 دقیقه هم زده شد تا پیوندهای عرضی (cross-linking) یون کلسیم خارجی با لایه محیطی آلژینات تشکیل شود. برای شکستن امولسیون، 45 میلی‌لیتر محلول کلرور کلسیم 0/05 مولار که قبلاً آماده شده بود، اضافه شده و به یک قیف جداکننده انتقال داده شد. دانک‌های پوشش داده و درهم‌تنیدهٔ با کلسیم، جمع‌آوری و در محلول 0/1% محلول پپتون در دمای 4 درجه سانتی‌گراد برای آزمون‌های بعدی نگهداری شد. برای پوشش‌دار کردن مجدد دانک‌ها روشی که در این بخش شرح داده شد، با دانک‌های تک لایه تکرار شد (10، 6).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:06 IRST on Sunday October 30th 2016

کارایی فرآیند ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی: جهت تعیین کارایی فرآیند ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی، مقدار 1 گرم از نمونه‌های دانک تولید شده را در 99 میلی‌لیتر از محلول 1% (وزنی/حجمی) سیترات سدیم استریل که pH آن در حدود 6 تنظیم شده است پراکنده کرده و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق توسط همزن مغناطیسی، مخلوط گردید. در طی این فرآیند دیواره دانک‌های آلژینات تخریب شده و سلول‌های باکتریایی به بیرون رها می‌شوند. بعد از این مرحله عمل رقت‌سازی انجام شده و با استفاده از محیط MRS Agar در شرایط هوازی و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 تا 72 ساعت کشت میکروبی انجام گردید. در نهایت تعداد باکتری‌ها شمارش گردید. این شمارش در دو تکرار صورت گرفت (10). کارایی ریزپوشانی (Encapsulation yield) توسط معادله زیر محاسبه گردید:

(1)

$$EY = \frac{N}{N_o} \times 100$$

در این معادله، EY کارایی درون‌پوشانی (درصد)، N تعداد سلول‌های محبوس شده زندهٔ رها شده از میکروسفر (cfu/ml) و N_o تعداد سلول‌های آزاد اضافه شده به مخلوط پلیمر طی تولید میکروسفر (cfu/ml) است.

شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در دانک‌ها: دانک‌های آلژینات سدیم حاوی بیومس پروبیوتیکی به آب پرتقال به میزان 10 درصد (حجمی/حجمی) تلقیح شدند. سپس عمل شمارش تعداد سلول پروبیوتیکی قبل و بعد از پاستوریزاسیون انجام شد. بدین ترتیب که مقدار 10 میلی‌لیتر از نمونه در 100 میلی‌لیتر از بافر سیترات سدیم 1% حجمی/ حجمی پراکنده شده و سپس به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق با استفاده از همزن مغناطیسی هم‌زده شد. سپس 1 میلی‌لیتر از محلول فوق به داخل پلیت منتقل شده و با استفاده از محیط کشت MRS Agar در دو تکرار کشت مخلوط (pure plate) داده شد. همه نمونه‌ها به مدت 48 تا 72 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد تحت شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شد. میانگین همه نتایج بدست آمده به عنوان واحد شکل‌گیری کلنی (cfu) در هر میلی‌لیتر از نمونه (cfu/ml) بیان شد. نمونه‌های آب‌میوه محتوی باکتری‌های آزاد نیز در شرایط مشابه (جایگزینی پپتون واتر 0/1 درصد با سیترات سدیم 1% وزنی/حجمی) به منظور حفظ شرایط یکسان، کشت مخلوط داده شدند. در این تحقیق برای پاستوریزاسیون نمونه از دمای 70 درجه سانتی‌گراد بمدت 30 ثانیه استفاده شد. همچنین نمونه‌های آب‌میوه در زمان‌های نگهداری، 15، 30، 60 روز بعد از پاستوریزاسیون به روش فوق مورد شمارش قرار گرفت (7، 6).

آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی: آزمون‌های انجام شده روی محصول تولیدی شامل: pH، بریکس و اسیدیتهٔ قابل تیتراسیون بود. جهت تعیین pH و بریکس به ترتیب از دستگاه‌های pHمتر (Metrohm، 780 pH Meter) و رفراکتومتر (RX-500، ATAGO) استفاده گردید (11، 6).

ارزیابی حسی: آزمون ارزیابی حسی به وسیلهٔ یک گروه ارزیاب حسی آموزش دیده به روش امتیازبندی هدونیک (Hedonic) پنج نقطه‌ای (عدد 1 مربوط به نمونه با کمترین امتیاز حسی و عدد 5 مربوط به نمونه با بیشترین امتیاز حسی) صورت گرفت. بدین ترتیب که پرسشنامه‌هایی تهیه و بین تیم ارزیاب توزیع گردید. برای هر سؤال 5 گزینه به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد. سؤالات مطرح شده عبارتند از: طعم و مزه، رایحه، بافت، رنگ، پذیرش کلی.

تجزیه و تحلیل آماری: آنالیز آماری با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال 0/05 درصد انجام گرفت. جهت آنالیز آماری از نرم افزار Statistix نسخه 8 استفاده گردید. تیمارهای مورد مطالعه در این پژوهش شامل کشت پروبیوتیکی در چهار حالت آزاد، بدون پوشش، با پوشش یک لایه و با پوشش دو لایه به محصول تلقیح شد. همچنین از فرآیند پاستوریزاسیون به عنوان یک تیمار در دو سطح قبل و بعد از پاستوریزاسیون استفاده شد. محصول تهیه شده در داخل ظروف مخصوص بسته‌بندی و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد (شرایط یخچال) در مدت زمان‌های 0، 15، 30 و 60 روز بعد از پاستوریزاسیون انبارمانی و مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین جهت مقایسه میانگین دادهٔ آزمون ارزیابی حسی نیز از آزمون LSD در سطح احتمال 0/05 درصد استفاده گردید.

• یافته‌ها

در این بررسی از آب پرتقال حاوی باکتری پروبیوتیکی به صورت آزاد، بدون پوشش، با پوشش تک لایه و با پوشش دو لایه استفاده شد. با توجه به داده‌های بدست آمده، مشاهده شد که پوشش‌دار کردن و فرآیند پاستوریزاسیون حرارتی، تأثیر معنی‌داری بر pH آب پرتقال داشت ($p<0/05$) به طوری که کمترین مقدار pH در نمونهٔ آب پرتقال حاوی باکتری پروبیوتیک به صورت آزاد (فاقد پوشش) و قبل از پاستوریزاسیون و بیشترین مقدار مربوط به آب پرتقال حاوی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:06 IRST on Sunday October 30th 2016

باکتری پروبیوتیک به صورت پوشش تک لایه بعد از پاستوریزاسیون مشاهده شد. همچنین پوشش‌دار کردن و فرآیند پاستوریزاسیون حرارتی، تأثیر معنی‌داری بر اسیدیته آب پرتقال داشت ($p<0/05$) (جدول 1) و کمترین مقدار اسیدیته در نمونه آب پرتقال پاستوریزه شده حاوی باکتری پروبیوتیک به صورت پوشش دو لایه مشاهده شد. بررسی تأثیر پوشش‌دار کردن و فرآیند پاستوریزاسیون حرارتی بر بریکس و زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک آب پرتقال معنی‌دار بود ($p<0/05$). آب پرتقال‌های تولیدی پاستوریزه نشده حاوی باکتری پروبیوتیک به صورت آزاد، دارای بیشترین بریکس بوده که تفاوت آماری چشمگیری با نمونه بدون پوشش (البته در شرایط مشابه)، نداشت. فرآیند پاستوریزاسیون سبب کاهش زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک گردید. در دو حالت قبل و بعد از اعمال فرآیند پاستوریزاسیون حرارتی، بیشترین میزان زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در حالت استفاده از پوشش دو لایه مشاهده شد که این امر بر نقش محافظتی پوشش‌دار کردن باکتری‌های پروبیوتیک تأکید دارد.

جدول 1. برهمکنش (اثر متقابل) تأثیر فرآیند پاستوریزاسیون حرارتی و درون‌پوشانی بر روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و زندمانی باکتری پروبیوتیک

شرایط فرآیند	نوع ریزکپسول	میانگین				
		pH	اسیدیته (اسید لاکتیک)	بریکس (درجه)	زنده‌مانی سلولی (Log cfu/ml)	کارایی درون‌پوشانی (%)
قبل از پاستوریزاسیون						
	آزاد	4/05 ±0/07 ^{e}	0/765 ±0/007 ^{a}	13/55 ±0/07 ^{a}	12/20 ±0/14 ^{a}	-
	بدون پوشش	4/25 ±0/07 ^{d}	0/755 ±0/007 ^{a}	13/45 ±0/07 ^{a}	11/63 ±0/11 ^{b}	94/93 ±0/02
	پوشش تک لایه	4/30 ±0/00 ^{cd}	0/740 ±0/00 ^{b}	13/15 ±0/07 ^{b}	11/85 ±0/08 ^{b}	96/73 ±0/07
	پوشش دو لایه	4/40 ±0/00 ^{bc}	0/740 ±0/00 ^{b}	13/05 ±0/07 ^{bc}	12/15 ±0/07 ^{a}	99/18 ±0/01
بعد از پاستوریزاسیون						
	آزاد	4/40 ±0/00 ^{bc}	0/735 ±0/007 ^{bc}	12/95 ±0/07 ^{cd}	7/25 ±0/03 ^{f}	-
	بدون پوشش	4/45 ±0/07 ^{ab}	0/740 ±0/00 ^{b}	12/80 ±0/00 ^{d}	8/30 ±0/14 ^{e}	-
	پوشش تک لایه	4/55 ±0/07 ^{a}	0/725 ±0/007 ^{c}	12/55 ±0/07 ^{e}	8/95 ±0/07 ^{d}	-
	پوشش دو لایه	4/50 ±0/00 ^{ab}	0/725 ±0/007 ^{c}	12/45 ±0/07 ^{e}	9/65 ±0/21 ^{c}	-

* نتایج: در هر ستون میانگین‌های دارای بالانویس مشابه اختلاف آماری معنی‌دار ندارند.

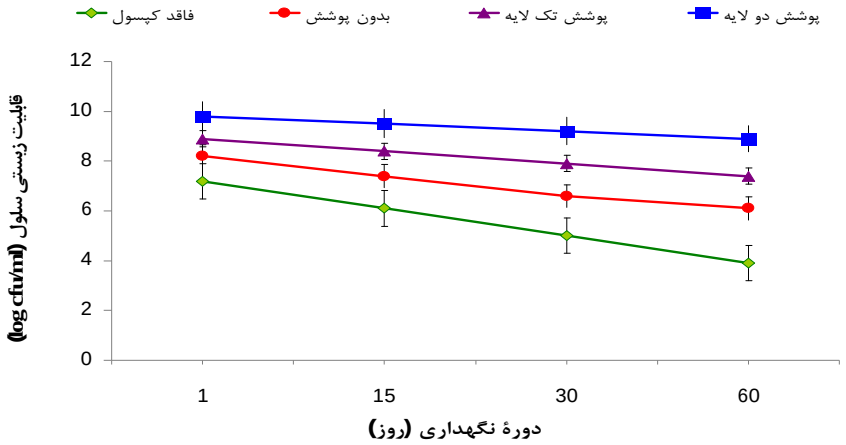
تغییرات زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در آب‌میوه پرتقال پاستوریزه شده در شکل 1 ارائه شده است. با گذشت 60 روز انبارمانی در دمای 4 درجه سانتی‌گراد، بقاء باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در آب پرتقال حاوی این باکتری؛ در حالت آزاد، بدون پوشش، پوشش تک لایه و پوشش دو لایه کاهش یافت که میزان این کاهش برای چهار حالت آزاد، بدون پوشش، پوشش تک لایه و پوشش دو لایه به ترتیب 45/83%، 25/60%، 16/85% و 9/18% گزارش گردید. همچنین در این تحقیق مشخص شد که بعد از 60 روز نگهداری، تعداد سلول باکتریایی قابل زیست برای باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* پوشش‌دار نسبت به نوع آزاد، تقریباً بالاتر از 6 log cfu/ml شمارش شد که این سطح تقریباً معادل سطح پیشنهادی صنعت غذا است (طبق استاندارد ملی ایران به شماره‌های 11324، 11325 و 14683، به ترتیب قابلیت زیستی هر یک از سویه‌های پروبیوتیک به کار رفته در دوغ، ماست و بستنی پروبیوتیک تا پایان تاریخ انقضای مصرف نباید از 10^{5} cfu/g، 10^{6} cfu/g و 10^{6} cfu/g کمتر باشد). در این تحقیق مشخص شد که تعداد بالای سلول باکتریایی ابتدایی، می‌تواند مقدار توصیه شده در محصول نهایی را فراهم نماید. همچنین نتایج نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده نسبت به باکتری‌های فاقد پوشش (به صورت آزاد)، در محیط اسیدی آب پرتقال بهتر حفاظت شدند و بعد از 6 هفته نگهداری مقدار شمارش شده این باکتری‌ها بیشتر از 5 سیکل لگاریتمی (یا 10^{5} cfu/ml<) گزارش شد. در جدول 2 یافته‌های پژوهش حاضر با سایر موارد مشابه مورد مقایسه قرار گرفت. همانطور که مشاهده می‌شود نتایج پژوهش حاضر با نتایج سایر محققان همخوانی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2. مقایسه تأثیر شرایط ریزپوشانی، نوع گونهٔ پروبیوتیک و شرایط نگهداری محصول بر روی زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک

گونهٔ پروبیوتیک/محصول	تلقیح اولیه (log cfu/ml)	نوع پوشش	شرایط نگهداری محصول	کاهش گونهٔ پروبیوتیکی طی دورهٔ انبارمانی (%)	مرجع
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس/دوغ	8/60	-	4°C / 21 روز	10/81	12
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس/آب گوجه فرنگی	10/0	آلژینات کلسیم	4°C / 75 روز	30/00	11
لاکتوباسیلوس پلانتاریوم/آب هلو	8/00	-	4°C / 30 روز	37/50	13
لاکتوباسیلوس کازئی/آب هلو	8/00	-	4°C / 30 روز	شناسایی نشد	13
لاکتوباسیلوس دلبروکی/آب هلو	9/00	-	4°C / 30 روز	22/22	13
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس/آب پرتقال	8/40	آلژینات سدیم	4°C / 45 روز	~36/90	6
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس/آب سیب	8/50	آلژینات سدیم	4°C / 45 روز	~35/29	6
لاکتوباسیلوس پلانتاریوم/آب انار	8/60	آلژینات/کیتوزان	4°C / 45 روز	~16/86	5
بیفیدوباکتریوم لانگوم/آب انار	8/60	آلژینات/کیتوزان	4°C / 45 روز	~17/60	5
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس/آب پرتقال	7/2-9/8	آلژینات سدیم	4°C / 60 روز	9/18-45/83	پژوهش حاضر



شکل 1. تغییرات سلول باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در چهار حالت آزاد، بدون پوشش، با پوشش تک لایه و با پوشش دو لایه آلژینات در آب پرتقال طی 60 روز نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد

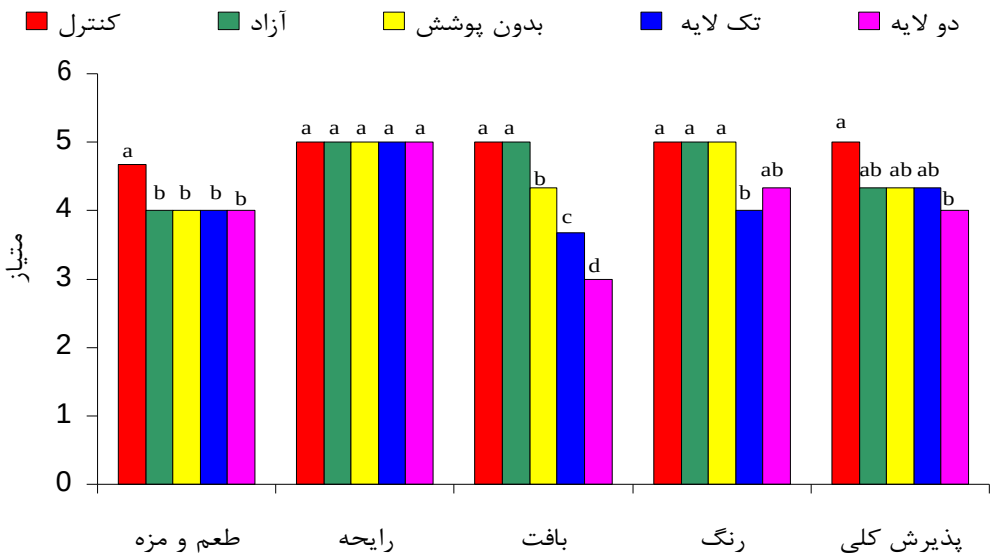
در نمونه‌های آب پرتقال حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در حالت آزاد حدود 5/00 سیکل لگاریتمی کاهش (40/81 درصد کاهش) در طی پاستوریزاسیون حرارتی مشاهده شد (جدول 1). اما در مورد نمونه‌های آب پرتقال حاوی باکتری به شکل بدون پوشش، پوشش‌دار با یک و دو لایه آلژینات، این میزان بسیار کمتر و به ترتیب در حدود 3/33، 2/90 و 2/50 سیکل لگاریتمی بود (به ترتیب 28/63، 24/47 و 20/57 درصد کاهش در تعداد باکتری پروبیوتیک نسبت به حالت قبل از پاستوریزاسیون) که آن را می‌توان به نقش حفاظتی پوشش آلژینات در بقای باکتری پروبیوتیک نسبت داد.

نتایج ارزیابی حسی آب پرتقال تولیدی در شکل 2 ارائه شده است. نتایج نشان داد که تأثیر نوع باکتری کپسوله شده بر روی رایحهٔ آب میوه غیرمعنی‌دار ($p>0/05$) در حالی که روی سایر خصوصیات حسی معنی‌دار بود ($p<0/05$). در مورد خصوصیات حسی طعم و مزه و پذیرش کلی، نمونه کنترل بیشترین امتیاز را کسب نمود. در مورد شاخص حسی بافت بین نمونه‌های کنترل و نمونهٔ حاوی باکتری آزاد هیچ اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین بین رنگ آب پرتقال‌های کنترل، حاوی باکتری آزاد، بدون پوشش و پوشش دولایه هیچ اختلاف آماری معنی‌داری توسط ارزیاب‌ها کسب نگردید. به طور کلی بین فرمولاسیون آب پرتقال کنترل، حاوی باکتری آزاد، بدون پوشش و تک لایه اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ پذیرش کلی مشاهده نشده و می‌توان از هر یک از این نمونه‌های کپسوله شده با توجه به سایر فاکتورها (میزان زنده‌مانی باکتری، اسیدیته و غیره)، جهت تولید این محصول اقدام نمود.

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:06 IRST on Sunday October 30th 2016

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2. مقایسه میانگین خصوصیات حسی آب‌میوهٔ کپسوله شده (در روز اول تولید) با نمونه کنترل (بدون کپسول و باکتری پروبیوتیک) (نتایج ارائه شده مربوط به ارزیابی حسی آب‌میوهٔ پاستوریزه شده نهایی می‌باشد).

• بحث

در این مطالعه تأثیر فرآیند پاستوریزاسیون حرارتی بر بقاء باکتری پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*) در آب پرتقال مورد بررسی قرار گرفت. دلیل گزینش این باکتری به دلیل مقاومت بالای باکتری نسبت به شرایط اسیدی بود. در پژوهشی، زنده‌مانی هشت گونه مختلف پروبیوتیک با نام‌های *لاکتوباسیلوس رامنوس* (*L. rhamnosus*)، *بیفیدوباکتریوم لانگوم* (*B. longum*)، *لاکتوباسیلوس سالیواروس* (*L. salivarius*)، *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* (*L. plantarum*)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*L. acidophilus*)، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (*L. paracasei*)، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* Bi-04 (*B. lactis*) و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* Bi-07 به صورت آزاد و پوشش یافته با آلژینات کلسیم، در تولید آب پرتقال و سیب پروبیوتیک مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد سلول‌های زندهٔ *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (در درجهٔ اول اهمیت) و *بیفیدوباکتریوم لانگوم* (در درجهٔ دوم اهمیت) نسبت به سایر گونه‌ها بیشتر شمارش گردید که این حالت به دلیل قابلیت تحمل اسید (Tolerance to acids) بالای این ریزسازواره‌ها بوده است.

شاخص pH آب پرتقال پروبیوتیک تولیدی تحت تأثیر فرآیند پاستوریزاسیون و ریزپوشانی قرار گرفت. این نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌های پروبیوتیک تثبیت شده (Immobilized) در ریزکپسول نسبت به حالت فاقد کپسول، نسبت به شرایط محیطی پایدارتر می‌باشند. Ding and Shah بیان نمودند که باکتری‌های پروبیوتیک تثبیت نشده در ریزکپسول (آزاد یا فاقد کپسول) به دلیل استفاده از کربوهیدرات‌ها (به دلیل خصوصیت ساکارولیتیکی، این باکتری پروبیوتیک قادر به متابولیسم قندها هستند) و تولید مقادیر اندک از اسیدهای آلی، سبب کاهش pH فرآوردهٔ تولیدی می‌گردند. به علاوه، آنها بیان نمودند که مقادیری از باکتری‌های پروبیوتیک فاقد کپسول که در طی نگهداری از بین می‌روند، سلول‌های پروبیوتیک مردهٔ آنها می‌توانند آنزیم‌هایی جهت هیدرولیز قندها در آب‌میوه رها کنند که، این امر نیز در کاهش pH مؤثر است (6). همچنین لازم به ذکر است که مقادیر بالاتر pH فرآوردهٔ تولیدی بعد از فرآیند پاستوریزاسیون را می‌توان به کاهش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک طی فرآیند پاستوریزاسیون نسبت داد. King و همکاران تخمیر آب گوجه فرنگی توسط سلول تثبیت شدهٔ *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را بررسی نمودند. تغییرات pH نمونه طی تخمیر کاهشی گزارش گردید. همچنین این محققین دلیل کاهش pH را مصرف قند توسط میکروارگانیسم‌ها عنوان نمودند (11). Pakbin و همکاران تولید آب هلو پروبیوتیک را توسط سه باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (*L. delbruckii*)، *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* (*L. plantarum*) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (*L. casei*) مطالعه

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:06 IRST on Sunday October 30th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:06 IRST on Sunday October 30th 2016

نمودند. روند تغییرات pH نمونه‌ها برای هر سه باکتری طی دورهٔ تخمیر کاهشی بود (13). همچنین نتایج مشابه در مورد آب چغندر توسط باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مشاهده شد (14).

در مورد اسیدیته آب پرتقال پروبیوتیک تولیدی، این فاکتور نیز تحت تأثیر فرآیند پاستوریزاسیون و ریزپوشانی قرار گرفت. Ding and Shah میزان اسید مالیک (Malic acid) تولید شده در آب پرتقال و آب سیب را توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری نمودند. نتایج نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده، کمترین میزان اسید مالیک را نسبت به باکتری‌های فاقد کپسول تولید نمودند (6). همچنین نتایج مشابه توسط .Pakbin و همکاران در مورد تولید آب هلو پروبیوتیک توسط سه باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* و *لاکتوباسیلوس* مشاهده شد. نتایج حاکی از آن بود که میزان اسیدیته آب هلو بر حسب اسید لاکتیک طی تخمیر افزایشی بود (13). Yoon و همکاران تخمیر آب چغندر را توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مطالعه نمودند و بیان نمودند که اسیدیته آب چغندر طی دورهٔ تخمیر افزایش یافت (14).

تغییرات بریکس آب پرتقال پروبیوتیک تولیدی طی فرآیند پاستوریزاسیون حرارتی و ریزپوشانی قبلاً به تفصیل آورده شد. نتایج این پژوهش با یافته‌های Ding and Shah در مورد آب‌میوه سیب و پرتقال همخوانی دارد. آنها گزارش نمودند که میزان مواد جامد محلول (بریکس) آب‌میوه پروبیوتیک فاقد کپسول (به صورت آزاد) بالاتر از نمونه آب‌میوه ریزپوشانی شده است. اختلاف در میزان مواد جامد محلول نشان می‌دهد که باکتری‌های پروبیوتیک فاقد کپسول نسبت به انواع ریزپوشانی شده آسان‌تر قندها را می‌توانند در آب‌میوه استفاده نمایند. آنها گزارش نمودند که کمترین میزان تغییرات مواد جامد محلول در آب سیب فاقد باکتری پروبیوتیک بود (میزان تغییر از 12% تا 11/9%) (6).

به طور کلی در این تحقیق مشخص شد که فرآیند پوشش‌دار کردن باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می‌تواند به عنوان یک عامل مؤثر در افزایش زنده‌مانی سلول باکتریایی باشد. همچنین استفاده از آلژینات سدیم به عنوان یک پوشش‌دهنده مناسب برای این منظور دارای کارایی بالایی بوده است. از یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که آب پرتقال ماده خام مناسبی جهت تأمین رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (محیط اسیدی) بوده و می‌تواند به عنوان یک حامل، برای انتقال ریزسازواره‌های پروبیوتیک به بدن انسان در نظر گرفته شود. از این رو می‌تواند به صورت یک نوشیدنی سالم برای بهبودی اختلالات گوارشی به خصوص در افرادی که نسبت به فرآورده‌های پروبیوتیک لبنی آلرژی دارند مورد استفاده قرار گیرد.

• References

1. Homayouni A, Ehsani MR, Razavi SH, Yarmand MS. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. Journal of Food Chemistry 2008; 111: 50-55.
2. Gibbs BF, Kermasha S, Alii I, Mulligan C. Encapsulation in the food industry: a review. Int. J. Food Sci. Nut. 1999; 50 (3): 213-224.
3. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. J. Food Eng. 2011; 104: 467-483.
4. Goraji MK, Abbasi H, Roozbeh Nasiraii L, Milani E. Influence of microencapsulation of indigenous probiotic lactobacillus plantarumon bacterial survival in simulated gastrointestinal conditions. J. Food Res. 2014; 24: 463-472.
5. Nualkaekul S, Cook MT, Khutoryanskiy VV, Charalampopoulos D. Influence of encapsulation and coating materials on the survival of Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium longum in fruit juices. Food Res. Int. 2013; 53: 304-311.
6. Ding WK, Shah NP. Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. Int. Food Res. J. 2008; 15(2): 219-232.
7. Sheehan VM, Ross P, Gerald FF. Assessing the acid tolerance and the technology cal robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. Innov. Food Sci. Emerge. Technol. 2007; 8(2): 279-284.
8. Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria, J. Microb. 2004; 42: 315-318.
9. Magsoodi V, Ghobadi Nejad Z, Soltanzadeh M. Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobials against micro-organisms related to orange juice. J. Food Sci. Technol. 2006; 3(2): 49-56 [in Persian].
10. Mokarram RR, Mortazavi SA, Habibi Najafi MB, Shahidi F. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. Food Res. Int. 2009; 42: 1040-1045.

www.SID.ir

Archive of SID

11. King VAE, Huang HY, Tsen JH. Fermentation of tomato juice by cell immobilized lactobacillus acidophilus. 2006; 1-6.

12. Taheri P, Ehsani M, Khosravi-Darani K. Effects of Lactobacillus acidophilus La-5 on microbiological characteristics, sensory attributes and phase separation of Iranian Doogh drink during refrigerated storage. Iranian J. Nut. Sci. Food Technol. 2009; 4(3): 15-24 [in Persian].

13. Pakbin B, Razavi SH, Mahmoudi R, Gajarbeygi P. Producing probiotic peach juice. Biotech. Health Sci. 2014; 1(3): e24683.

14. Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. LWT 2005; 38: 73-75.

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:06 IRST on Sunday October 30th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation of Multilayer Encapsulation by Method of External Gelation on the Survival of Probiotic Bacteria Undergoing Orange Juice Pasteurization

Dowlatabadi M[1], Mokhtarian M[2], Mortazavi S.A[3], Elhami Rad AH[4]*

1- Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

*2- *Corresponding author: Young Researchers and Elite Club, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran. Email: mokhtarian.mo@gmail.com*

3- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Technology and Engineering, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

Received 10 Jun, 2015 **Accepted 25 Sept, 2015**

Background and Objectives: The non-dairy probiotic products with valuable nutritional and therapeutic properties are novel issues in the field of industry, nutrition and medicine. The aim of this study is investigation of the effects of encapsulation on the survival of probiotic bacteria by emulsification method during heat the pasteurization process of orange juice.

Materials and Methods: In this research, *L. acidophilus* bacterium was used as probiotic genus in the orange juice. The probiotic bacteria were inoculated into orange juice in four forms: free, uncoated, monolayer coating and multilayer coating. Encapsulation of the probiotic bacteria was carried out by emulsification method by calcium alginate. The enumeration of probiotic microorganisms were carried out as pure plate in the culture medium of MRS Agar under the aerobic conditions at 37°C for 48-72h. Statistical analysis was performed by factorial arrangement based on completely randomized design (CRD) in 0.05% confidence level.

Results: The results indicated that the viability loss of *L. acidophilus* bacteria undergoing pasteurization process was about 5 logarithmic cycles in free form whereas in the orange juice contained uncoated, monolayer and multilayer bacteria, this value was much lower (reported as about 3.33, 2.90 and 2.50 logarithmic cycles, respectively).

Conclusion: Orange juice is an appropriate raw material to provide the growth of *L. acidophilus* bacteria, and could be considered as a carrier for transferring the probiotic bacterium to the host body.

Keywords: Orange juice, Pasteurization, Encapsulation

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 10:06 IRST on Sunday October 30th 2016

www.SID.ir