Archive of SID

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، سال چهارم، شماره ۱۴، صفحه ۱۶۰-۱۵۱، زمستان ۱۳۹۵

ارزیابی اثر ریزپوشانی دو لایه با آلژینات کلسیم بر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی دوره نگه‌داری آب گوجه‌فرنگی

مریم قبادی دانا[1*] ، طاهره رشنوادی[2]

1. استادیار، گروه پژوهشی میکروبیولوژی، پژوهشکده صنایع غذایی کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد
2. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی تهران

(تاریخ دریافت: 95/5/29، تاریخ پذیرش: 95/9/20)

چکیده

یکی از شیوه‌های نوین در جهت افزایش ماندگاری باکتری‌های پروبیوتیک در فراورده‌های غذایی و هم‌چنین زنده‌مانی این باکتری‌ها در حین عبور از دستگاه گوارش به‌منظور انتقال ایمن آن‌ها به روده بزرگ، ریزپوشانی سلول‌های پروبیوتیکی می‌باشد. این مطالعه با هدف تعیین تاثیر ریزپوشانی با آلژینات کلسیم بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (La-5)در طی دوره نگه‌داری آب گوجه‌فرنگی انجام گرفت. ریزپوشانی تک لایه و دو لایه با استفاده از آلژینات کلسیم انجام گرفت و دانک‌هایی با قطر کم‌تر از 100 میکرومتر تولید گردید. برای تعیین اندازه دانک‌ها از روش پراکنش لیزر و برای مطالعه شکل ظاهری آن‌ها از تکنیک SEM استفاده شد. سپس *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به سه روش آزاد، ریزپوشانی تک لایه و ریزپوشانی دو لایه به آب گوجه‌فرنگی (pH~3/9) تلقیح گردید و نمونه‌های حاصل در دمای 4درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس تعداد باکتری‌های پروبیوتیک و ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی نمونه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌صورت آزاد در حد استاندارد (حداقل 10^6 $cfuml^{-1}$) سه هفته بوده و این میزان در حالت ریز پوشانی به‌صورت دو لایه به شش هفته افزایش یافته است. اختلاف معنی‌داری میان pH و اسیدیته فراورده پروبیوتیک و نمونه شاهد مشاهده نشد. گروه ارزیابان حسی، طعم و بوی آب میوه پروبیوتیک را تایید نمودند. ریزپوشانی موجب افزایش زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در طول دوره نگه‌داری شده و این زمان را نسبت به حالت آزاد سه هفته افزایش داده است.

واژه‌های کلیدی: گوجه‌فرنگی، آلژینات کلسیم، ریزپوشانی دو لایه، زنده‌مانی، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*.

* نویسنده مسئول: Dana.m@standard.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

1- مقدمه

مصرف غذا در کنار رفع گرسنگی اهداف دیگری مانند فراهم کردن مواد مغذی ضروری برای بدن، ترویج احساس تندرستی فیزیکی و ذهنی، بهبود سلامتی، پیشگیری و یا کاهش بیماری‌های مرتبط با تغذیه را دنبال می‌کند در سال‌های اخیر، آگاهی مصرف کنندگان نسبت به ارتباط بین غذا و سلامتی، منجر به افزایش چشمگیر تولید غذاهای سلامت بخش شده است[1]. غذاهای سلامت بخش تحت عنوان غذای عملگرا شناخته می‌شوند. اطلاق برچسب غذای عملگرا به مفهوم این است که غذا، علاوه‌بر اثرات تغذیه‌ایی معمول موجود در ماده غذایی، عملکرد مثبتی در افزایش سلامت مصرف‌کننده دارد [1، 2].

شناخته شده‌ترین غذاهای عملگرا، غذاهای پروبیوتیک هستند. برای بهره‌مندی از مزایای سلامت‌بخشی پروبیوتیک‌ها، مصرف منظم تعداد مشخصی از این باکتری‌ها لازم است [3]. بنابراین زنده‌مانی این میکروارگانیسم‌ها در حد استاندارد (حداقل 10^6 $cfuml^{-1}$) در مواد غذایی از فاکتورهای مهم در تولید مواد غذایی پروبیوتیک است[4، 5]. در بین پروبیوتیک‌ها گونه‌های *لاکتوباسیلوس* به‌دلیل حضور در میکروفلور طبیعی بدن انسان و مقاومت به شرایط اسیدی مانند شیره معده و هم‌چنین نمک‌های صفراوی بیش‌تر مورد توجه قرار دارند[6]. با این وجود، تحقیقات انجام شده، نشان داده است که زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در مواد غذایی عملگرا پایین است[7]. حفاظت پروبیوتیک‌ها به‌وسیله ریزپوشانی با آلژینات یکی از روش‌های افزایش زنده‌مانی آن‌ها در مواد غذایی عملگرا است [8، 9].

اغلب افزودن پروبیوتیک‌ها در فراورده‌های لبنی مانند ماست صورت می‌گیرد[10، 11]، اما مشکلاتی نظیر بالا بودن میزان کلسترول فراورده‌های شیری و هم‌چنین عدم تحمل لاکتوز در برخی افراد باعث محدودیت مصرف این فراورده‌ها شده است [12، 13]. تحقیقات نشان می‌دهد که استفاده از پروبیوتیک‌ها در آب میوه و سبزی می‌تواند جایگزین مناسبی برای گروهی از مردم با نیازهای خاص، مانند گیاه‌خواران و افراد حساس نسبت به پروتئین‌های شیر، باشد[14، 15].

گوجه‌فرنگی یکی از پر مصرف‌ترین سبزی‌ها در سطح جهان بوده که در بسیاری از کشورها به‌عنوان یک نوشیدنی مصرف می‌شود[16، 17]. این ماده غذایی حاوی مقادیر فراوانی ترکیبات محرک سلامتی مانند لیکوپن، پرو ویتامین A، اسید آسکوربیک، ویتامین E، فولات، فلاونوئیدها و پتاسیم است[18]. مصرف منظم گوجه‌فرنگی کاهش خطرات مرتبط با انواع مختلفی از سرطان‌ها و بیمارهای قلبی را به‌دنبال دارد و به‌دلیل غنی بودن از کانی، ویتامین‌ها و آنتی اکسیدان‌ها می‌تواند سوبسترای مناسبی برای پروبیوتیک‌ها بوده و به‌دلیل کوتاه بودن زمان حمل و نقل در دستگاه گوارش به‌عنوان منبع سودمند و مغذی مورد توجه قرار گیرد [9، 17]. بنابراین تولید آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک می‌تواند به‌عنوان یک نوشیدنی سالم مطرح گردد که در مطالعه حاضر تولید این نوشیدنی با استفاده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[1]، مبتنی بر فرایند ریزپوشانی مورد بررسی قرار گرفته است.

2-مواد و روش‌ها

2-1-آماده سازی میکروارگانیسم پروبیوتیک

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 که به شکل خشک شده انجمادی خالص از شرکت کریس هانسن تهیه و به محیط کشت مایع MRS[2] تلقیح گردید و در دمای 37°C به مدت 48 ساعت در شرایط میکروآئروفیل گرمخانه‌گذاری شد. سپس 5 ml از نمونه حاصل دوباره در 30 ml محیط کشت مایع MRS در شرایط میکروآئروفیل گرمخانه‌گذاری گردید. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، با توجه به میزان رشد و کدورت ایجاد شده و رسیدن میزان رشد به تعداد 10^9 $cfuml^{-1}$، پاساژ مرحله بعد انجام شد، این تکثیر و افزایش حجم به‌صورت متوالی تا رسیدن به حجم یک لیتر ادامه پیدا کرد پس از رسیدن به کدورت مناسب محیط کشت به فرمانتور منتقل گردید و تکثیرهای متوالی و افزایش تعداد باکتری‌ها با استفاده از فرمانتور Biomed SDT 5litr انجام گرفت. در نهایت، در هر مرحله از انجام آزمایشات بر حسب نیاز، زیست توده حاصل را با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای 4°C در 10000 x g به مدت 15 min استحصال کرده و دو بار به‌وسیله محلول پپتون استریل 0/1 درصد شسته و مورد استفاده قرار گرفت[5، 19]. انجام آزمون کدورت سنجی توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 620 nm نانومتر انجام شد[19].

1. Lactobacillus acidophilus
2. MRS broth

www.SID.ir

Archive of SID

2-2-ریزپوشانی باکتری‌ها

ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با استفاده از روش ژلاتیناسیون خارجی انجام شد[5، 19]. ابتدا 10 گرم آلژینات در یک لیتر آب مقطر حل شد. سپس یک گرم سوسپانسیون باکتریایی به 18 گرم محلول آلژینات اضافه شده و توسط همزن مغناطیسی به‌طور کامل مخلوط گردید. قطره قطره مخلوط آلژینات و سوسپانسیون باکتریایی به 100 گرم روغن گیاهی مایع حاوی 10 گرم بر لیتر توویین 80 اضافه و با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت 20 دقیقه و با سرعت 900rpm مخلوط گردید. پس از مخلوط شدن یکنواخت، با اضافه کردن 32 میلی‌لیتر از یک امولسیون حاوی یون کلسیم (حاصل از مخلوط شصت گرم روغن گیاهی مایع حاوی 10 گرم بر لیتر توویین 80 و 17 گرم [20، 21] محلول کلرید کلسیم 62/5 میلی مولار) فرایند ژله‌ای شدن آغاز گردید. پس از گذشت 20 دقیقه همزدن، امولسیون فوق به قیف جدا کننده منتقل گردید سپس 100 ml محلول کلسیم کلرید 0/1 مولار استریل اضافه گردید. به مدت 30 دقیقه اجازه داده شد تا در شرایط فوق باقی بماند تا با شکستن امولسیون فرایند ژله‌ای شدن کامل شود و دانک‌های آلژینات ته نشین شوند. این دانک‌ها در شرایط استریل با استفاده از کاغذ صافی جداسازی گردید و پس از دو بار شستشو با محلول 0/1 درصد پپتون استریل در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. تمامی مراحل فوق در شرایط استریل انجام گرفت [19، 21].

3-2-دو لایه کردن دانک‌های آلژینات

15 گرم از دانک‌های مرحله قبل به محلول آلژینات 0/5 درصد اضافه و به مدت 20 دقیقه با همزن مغناطیسی 500 دور در دقیقه، همزده تا دانک‌ها به‌طور کامل در محلول پراکنده شوند، سپس مخلوط با استفاده از فیلتر صاف شده و دانک‌ها به مخلوط روغن و توویین 80 و کلرید سدیم اضافه شدند. زمان مورد نیاز برای این مرحله به‌منظور ایجاد اتصالات عرضی کلسیم 20 دقیقه بود. سپس دانک‌ها با استفاده از قیف جدا کننده، جداسازی شده و در محلول پپتون استریل 0/1 درصد در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد[19].

4-2- شمارش سلول‌های به دام افتاده در دانک‌ها

1 گرم از دانک‌های تهیه شده در محلول سدیم سیترات استریل یک درصد در pH حدود 6 حل شده و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق همزده تا دانک‌ها به‌طور کامل حل و باکتری‌ها آزاد شوند، سپس با استفاده از محیط MRS جامد تحت شرایط بی‌هوازی، در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و به مدت 72 ساعت گرمخانه‌گذاری و سپس تعداد باکتری‌ها شمارش شد. این شمارش در 3 تکرار انجام شد و تعداد باکتری‌های زنده به‌صورت واحدهای تشکیل دهنده کلنی (cfu) بیان گردید [19]. تمام مراحل فوق در شرایط استریل و در کنار شعله انجام گرفت.

5-2-تعیین کارایی ریزپوشانی باکتری‌ها در دانک

برای تعیین کارایی ریزپوشانی از رابطه زیر استفاده شد [11] که در آن Y بازده ریزپوشانی، N تعداد سلول‌های به دام افتاده زنده در دانک بر حسب $cfug^{-1}$ و N_0 داد اولیه سلول‌های آزاد اضافه شده به مخلوط آلژینات در موقع تولید دانک‌ها بر حسب $cfug^{-1}$ است[23].

$$Y = N/N_0 \quad (1)$$

6-2-آزمون دانک‌ها

1-6-2-تعیین مرفولوژی ذرات

برای تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده شکل ظاهری آن‌ها از میکروسکوپ الکترونی (Philips XL30 کشور هلند) و تکنیک SEM استفاده شد.

2-6-2-تعیین اندازه ذرات

اندازه دانک‌ها و فراوانی آن‌ها با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری قطر ذرات[1] انجام گرفت و نتایج بر اساس قطر حجم میانگین ذرات گزارش شد.

7-2-تلقیح *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به آب گوجه‌فرنگی (بدون ریزپوشانی)

در این مرحله 100 میلی‌لیتر کشت تازه باکتری با تراکم

1. Particle size analyzer

www.SID.ir

Archive of SID

$8/1 \times 10^8$ cfuml^{-1} باکتری آزاد به بطری‌های شیشه‌ای استریل محتوی 250 ml آب گوجه‌فرنگی تهیه شده از شرکت سن ایچ اضافه و در دمای 4°C نگه‌داری گردید. تیمارها در سه تکرار و در شرایط استریل تهیه شد.

2-8-تلقیح دانک‌ها به آب میوه و تهیه تیمارها

برای تیمار در حالت تک لایه میزان 100 میلی لیتر دانک‌های آلژینات تک لایه با تراکم $7/9 \times 10^8$ cfuml^{-1} از باکتری ریزپوشانی شده به بطری‌های شیشه‌ای استریل محتوی 250 ml آب گوجه‌فرنگی اضافه گردید، برای تیمار حالت دو لایه میزان 100 میلی‌لیتر دانک‌های آلژینات دو لایه با تراکم $7/8 \times 10^8$ cfuml^{-1} از باکتری ریزپوشانی شده به بطری‌های شیشه‌ای استریل محتوی 250 ml آب گوجه‌فرنگی تلقیح و سپس شیشه‌ها در دمای 4°C نگه‌داری شد. تیمارها در 3 تکرار و در شرایط استریل تهیه شدند.

2-9-روش شمارش باکتری

به‌منظور بررسی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در آب گوجه‌فرنگی در پایان هرهفته، شمارش باکتری‌ها با رقیق‌سازی با استفاده از رینگر و کشت در محیط MRS آگار[1] به روش پورپلیت و گرمخانه‌گذاری تحت شرایط بی‌هوازی، در دمای 37°C و به مدت 48 ساعت انجام شد. هر شمارش در سه تکرار انجام پذیرفت [22].

2-10-بررسی‌های فیزیکوشیمیایی

2-10-1- اندازه‌گیری محتوی قند کل

محتوی قند کل بر اساس روش انجام آزمون قند کل مطابق استاندارد ملی ایران به شماره 2685 به روش فهلینگ انجام شد. در این روش با استفاده از اسید کلریدریک ساکاروز به قندهای احیاء کننده آبکافت شده، سپس یون مس دو ظرفیتی محلول‌های فهلینگ در یک محیط قلیایی در اثر احیاء توسط قندهای احیاء کننده تبدیل به مس یک ظرفیتی شده و سپس بر اساس میزان آب میوه مصرفی جهت احیاء مس و تغییر رنگ محلول، مقدار کل قند احیاء کننده از فرمول زیر محاسبه گردید که در آن F فاکتور فهلینگ، V حجم مصرفی محلول خنثی شده بر حسب میلی‌لیتر و N قندکل برحسب گرم در 100 گرم نمونه است[23].

$$N = \frac{F \times 100 \times 100 \times 100}{V \times 25 \times 25} \quad (2)$$

2-10-2-اندازه گیری اسیدیته

تعیین اسیدیته با استفاده از روش پتانسیومتری مطابق با استاندارد ملی ایران شماره 2685 انجام گرفت. در این روش 20 گرم آب میوه به 50 ml آب مقطر اضافه و سپس با سود 0/1 نرمال تا pH برابر با 8/1 تیتر گردید. پس از آن با استفاده از فرمول زیر مقدار عددی اسیدیته محاسبه گردید که در آن V حجم مصرفی هیدروکسید سدیم 0/1 نرمال بر حسب میلی‌لیتر، m وزن نمونه برحسب گرم و A اسیدیته کل برحسب گرم درهر100گرم نمونه است [23].

$$A = \frac{V \times 0.0064 \times 100}{m} \quad (3)$$

2-10-3-اندازه گیری pH

تعیین pH با استفاده از pH متر کالیبره انجام شد.

2-10-4-اندازه‌گیری بریکس

اندازه‌گیری بریکس با استفاده از رفراکتومتر رو میزی و در دمای 20°C انجام شد. ابتدا دستگاه با آب مقطر کالیبره و سپس بریکس نمونه اندازه‌گیری شد.

2-11-ارزیابی حسی

برای ارزیابی حسی یک نمونه آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده به‌صورت دو لایه و یک نمونه آب گوجه‌فرنگی غیرپروبیوتیک کد گذاری شده و در شرایط کنترل شده و یکسان در اختیار 20 نفر ارزیاب حسی ویژگی‌های عطر و طعم، احساس دهانی و مطلوبیت آن مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون رنگ هم با استفاده از دستگاه هانترلب و در شرکت سن ایچ انجام گرفت. نتایج حاصل با استفاده از آزمون Mcnemar مورد تحلیل قرار گرفت.

1. MRS agar

www.SID.ir

Archive of SID

12-2-آنالیز آماری

طرح آماری مورد استفاده در تحقیق حاضر، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی است. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 22 تجزیه و تحلیل شده و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و بررسی تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD انجام گرفت. برای رسم منحنی‌ها از نرم افزار Excel استفاده شد.

3-نتایج و بحث

1-3-تعیین درصد کارائی ریزپوشانی باکتری‌ها در دانک آلژینات

تعداد اولیه سلول‌های زنده قبل از ریزپوشانی $8/23\times10^{8}$ $cfuml^{-1}$ و تعداد سلول‌های به دام افتاده در دانک‌ها در حدود $7/9\times10^{8}$ $cfuml^{-1}$ گزارش گردید. با استفاده از رابطه (1) کارائی این روش 96 درصد تعیین شد. کارایی ریزپوشانی در تحقیق مکرم و همکاران، 92 درصد تعیین شده بود[19] که تعداد اندک سلول‌های باکتریایی از دست رفته در مرحله تولید دانک و انجام ریزپوشانی، بیانگر دقت مناسب به‌کار گرفته شده در این مرحله است؛ به‌عبارت دیگر بر اساس نتایج روش به‌کار گرفته شده در این تحقیق گزینه مناسبی برای ریزپوشانی باکتری‌ها است.

2-3-نتایج تعیین مرفولوژی ذرات

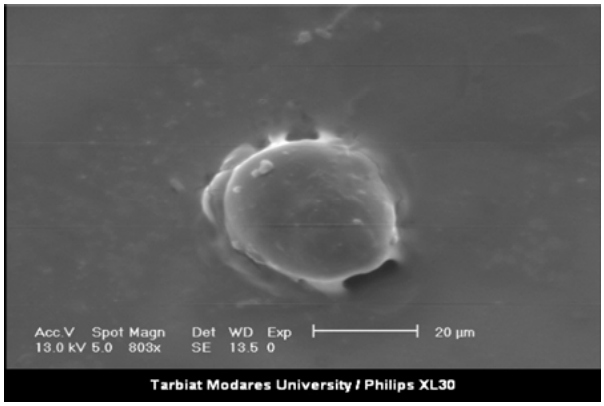
هرچند ارزش اساسی یک فراورده پروبیوتیک، زنده‌مانی سویه پروتیک در آن است، اما ویژگی‌های حسی نیز جایگاه پر اهمیتی دارند؛ زیرا بر میل و رغبت مصرف‌کننده تاثیرگذار می‌باشند. در ارتباط با ویژگی‌های فیزیکی و حسی، محققان بیان داشتند که میانگین ضخامت دانک‌های حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده کم‌تر از 100 میکرومتر برای استفاده در فراورده‌ها مناسب است و دانک‌های بزرگ‌تر می‌تواند منجر به ایجاد حس شنی در دهان و زبری فراورده شود [20، 21]. قطر میانگین دانک‌های تولیدی در این تحقیق 70 میکرومتر بود که سایز مطلوبی در تولید دانک‌ها بوده و مانع از ایجاد حس شنی می‌شود. مشاهده دانک‌ها با میکروسکوپ الکترونی و روش SEM (شکل 1) هم نشان داد کپسول‌ها از نظر شکل ظاهری کاملاً کروی و یکنواخت بوده و هیچ‌گونه ترک یا منفذی در ساختار آن‌ها وجود ندارد، هم‌چنین اندازه ثبت شده دانک‌ها در این تصاویر شاهدی دیگر بر تایید اندازه میانگین قطر کم‌تر از 100 میکرومتری ذرات است که این دستاورد با یافته‌های سایر محققان هم‌خوانی دارد[20، 21].

3-3-نتایج تعیین اندازه قطر میانگین ذرات با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری قطر ذرات

با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری قطر ذرات، قطر میانگین دانک‌های تولیدی 70 میکرومتر اندازه‌گیری شد. شکل (1) نیز این یافته‌ها را تایید می‌کند.

4-3-بررسی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌صورت آزاد و ریز پوشانی شده در آب گوجه‌فرنگی

زنده‌مانی سلول‌های آزاد و ریز پوشانی شده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و آنالیز آماری آن در تیمارهای تحت بررسی آب گوجه‌فرنگی در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در جدول (2) آورده



شکل (1) تصویر میکروسکوپ الکترونی به روش SEM از دانک آلژینات حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول(2) آنالیز نتایج زنده‌مانی (انحراف معیار SE± میانگین سه تکرار Log cfuml^{-1}) و pH (انحراف معیار SE± میانگین سه تکرار pH) در هر سه حالت سلول آزاد، ریزپوشانی تک لایه و دو لایه

		روز صفر	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم
آزاد	زنده‌مانی	8/80±0/08^{a}	8/82±0/07^{a}	7/79±0/08^{b}	6/66±0/11^{b}	5/77±0/12^{c}	---	---	---
	pH	3/9±0/01^{c}	3/6±0/01^{b}	3/6±0/01^{b}	3/6±0/01^{b}	3/6±0/01^{b}	---	---	---
تک لایه	زنده‌مانی	8/81 ±0/05^{a}	8/70±0/06^{a}	8/26±0/11^{a}	7/42±0/21^{a}	6/78±0/09^{b}	6/40±0/14^{b}	5/58±0/17^{b}	---
	pH	3/9±0/01^{b}	3/9±0/01^{a}	3/9±0/01^{a}	3/9±0/01^{a}	3/9±0/01^{a}	3/8±0/01^{b}	3/8±0/01^{b}	---
دو لایه	زنده‌مانی	8/81±0/06^{a}	8/70±0/07^{a}	8/51±0/11^{a}	7/79±0/11^{a}	7/28±0/10^{a}	6/93±0/10^{a}	6/38±0/10^{a}	5/98±0/12^{a}
	pH	3/9±0/01^{a}	3/9±0/01^{a}	3/9±0/01^{a}	3/9±0/01^{a}	3/9±0/01^{a}	3/9±0/01^{a}	3/9±0/01^{a}	3/9±0/ 01^{a}

اعداد با حروف مشابه از لحاظ آماری معنی‌دار نیستند (آزمون دانکن در سطح آماری با احتمال 95 درصد).

شده است. نتایج به‌دست آمده از شمارش باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نشان می‌دهد که ریزپوشانی سلول باکتریایی توانسته تا در هفته هفتم باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را به تعداد 5/98±0/12 Log cfuml^{-1} نگه‌داری نماید و زنده‌مانی باکتری را سه هفته افزایش داده است و تاثیر قابل توجهی در قابلیت زنده‌مانی باکتری در آب گوجه‌فرنگی داشته باشد.

با توجه به جدول (2)، اثر متقابل تیمارها و زمان نگه‌داری بر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در آب گوجه‌فرنگی معنی‌دار بوده است ($p<0/05$). همان‌گونه که مشخص است در طول زمان نگه‌داری، تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در حالت تلقیح سلول آزاد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

یک هفته پس از ذخیره‌سازی یخچالی آب گوجه‌فرنگی حاوی سلول آزاد تعداد باکتری‌ها تقریبا ثابت مانده است (جدول 2) که به نظر می‌رسد در این شرایط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* قادر به استفاده از قند موجود در آب گوجه‌فرنگی، سنتز توده سلولی و تولید لاکتیک اسید بوده و در نتیجه pH کاهش یافته است. این نتایج با یافته‌های یون و همکاران و حمدی و همکاران مطابقت دارد [14، 17].نیول کاکول و همکارانش گزارش کردند سلول‌های آزاد لاکتوباسیلوس پلانتاروم در آب انار در دمای 4°C بعد از پایان هفته چهارم به‌طور کامل از بین رفتند[26]. دینگ و همکاران، زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها به‌صورت سلول آزاد در آب پرتقال با pH~2/81 مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند باکتری‌های پروبیوتیک از جمله *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تا پایان 4 هفته به‌سرعت از بین می‌روند. آنان همین روند کاهشی را در آب پرتقال با pH اصلاح شده 3/5 هم مشاهده کردند[27]. نتایج حاصل از آزمایشات پریرا وهمکاران روی تخمیر آب سیب با استفاده از لاکتوباسیل و سکازئی نشان داد این باکتری می‌تواند در شرایط نگه‌داری در دمای یخچال به رشد خود ادامه دهد؛ این گروه بیان داشتند با وجود این که میزان زیست توده[1] در انتهای دوره نگه‌داری در حد بالایی بود ولی تعداد سلول‌های زنده دچار افت شدند[28]. سهایل و همکاران در تلقیح *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به آب پرتقال به‌صورت آزاد، تفاوتی در تعداد باکتری‌ها در طی 9 روز ذخیره سازی مشاهده نکردند، اما از روز نهم به بعد برای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و از روز دوازدهم به بعد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* دچار روند کاهشی در تعداد باکتری‌ها شدند به‌صورتی که در روز دوازدهم تعداد سلول‌های آزاد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به کم‌تر از 1 Log cfuml^{-1} رسید [29].

همان‌طوری که در جدول (1) مشاهده می‌شود، تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در طول نگه‌داری در حالت آزاد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، اما کاهش پروبیوتیک‌ها در حالت ریزپوشانی کم‌تر بود. زمانی که سلول‌ها در محیطی با pH پایین قرار می‌گیرند، برای حفظ pH درون سلولی خود نیاز به مصرف انرژی بالایی دارند لذا سایر وظایف اصلی سلولی تحت تاثیر استرس کمبود ATP قرار گرفته و سلول‌ها نمی‌توانند زنده بمانند [24]، به‌نظر می‌رسد کاهش تعداد باکتری‌ها در حالت آزاد نسبت به ریزپوشانی شده به همین

1. Biomass

www.SID.ir

Archive of SID

جدول (1) مقایسه ویژگی‌های شیمیایی آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک در حالت ریزپوشانی شده دو لایه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ابتدا و انتها دوره نگه‌داری

	بریکس	pH	اسیدیته	قند (میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر)
نمونه آب گوجه‌فرنگی غیر پروبیوتیک (شاهد)	3/45	3/9	0/33	40
نمونه آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک در ابتدا دوره نگه‌داری	4/95	3/9	0/33	40
نمونه آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک در انتهای دوره نگه‌داری	4/55	3/9	0/36	35

دلیل است. تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در پایان هفته چهارم نگه‌داری در آب گوجه‌فرنگی در حالت تک لایه یک سیکل لگاریتمی و در حالت دو لایه دو سیکل لگاریتمی بالاتر از نمونه حاوی پروبیوتیک آزاد بود. این نتایج نشان دهنده اثر حفاظتی دانک‌ها بر پروبیوتیک‌ها در برابر شرایط محیط از جمله پایین بودن pH می‌باشد. ریزپوشانی از استرس کمبود ATP در سلول جلوگیری کرده و مانع از کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها در مقایسه با حالت سلول آزاد گردیده است. اما کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها در حالت ریزپوشانی می‌تواند به علت عدم خروج متابولیت‌های تولیدی توسط فعالیت پروبیوتیک‌ها از درون دانک دانست که اثر بازدارنده بر روی رشد باکتری‌ها داشته و سبب کاهش تعداد آن‌ها شده است، هم‌چنین در حالت ریزپوشانی تغییرات pH بسیار اندک است که می‌تواند ناشی از همین مورد باشد [24]. در جدول (2) قابل مشاهده است که روند کاهشی تعداد باکتری‌ها در حالت ریزپوشانی یک لایه در مقایسه با حالت آزاد اختلاف معنی‌داری دارد. هم‌چنین با توجه به جدول (2) اثر زمان ماندگاری روی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم به‌صورت یک لایه و دو لایه نیز معنی‌دار است که حکایت از موفقیت فرایند ریزپوشانی در افزایش زنده‌مانی باکتری‌ها دارد و توانسته است زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را نسبت به حالت آزاد به مدت دو هفته در حالت تک لایه و سه هفته در حالت دو لایه افزایش دهد.

آلژینات محافظ خوبی برای پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده در شرایط روده‌ای است. اما در pH پایین پایداری نسبتاً اندکی دارد و در شرایط اسیدی حل می‌شود [31]. هم‌چنین در حالت تک لایه پوشش آلژینات دانک‌ها متخلخل است. این نقص‌ها را می‌توان با مخلوط کردن آلژینات با دیگر ترکیبات پلیمر و پوشش دادن با دیگر ترکیبات برطرف کرد [25]. روند کاهشی باکتری‌ها در سه هفته اول حالت ریزپوشانی تک لایه و دو لایه معنی‌دار بوده، اما در هفته‌های آخر معنی‌دار نیست. به‌نظر می‌رسد دانک‌ها در حالت تک لایه تحت تاثیر شرایط اسیدی قرار گرفته و استقامت دانک‌ها کاهش یافته است و در هفته‌های آخر از اثر حفاظتی آن روی دانک‌ها کاسته شده است.

3-5-بررسی‌های فیزیکوشیمیایی

در جدول (2) ویژگی‌های شیمیایی آب گوجه‌فرنگی در ابتدا و انتهای دوره زنده‌مانی در حالت ریزپوشانی شده دو لایه نشان داده شده است. در طول دوره نگه‌داری آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک میزان اسیدیته افزایش یافته است. دلیل تغییرات اسیدیته در حین نگه‌داری می‌تواند به‌علت تولید یا افزایش یک سری اسیدهای آلی در طی زمان نگه‌داری باشد، مثلاً اسید پیرولیدون کربوکسیلیک در طی زمان نگه‌داری تولید می‌شود. دلیل دیگر آن، شکستن پکتین و تولید اسیدهای مختلف است. میزان پکتین در آب گوجه‌فرنگی که به واریته گوجه‌فرنگی وابسته است می‌تواند روی تغییرات اسیدیته نیز تاثیر گذار باشد. کوشکی و همکاران گزارش کردند که با افزایش زمان نگه‌داری، اسیدیته افزایش و pH کاهش می یابد[30].

3-6-ارزیابی حسی

طی آزمون حسی بیست نفر ارزیاب در شرایط کنترل شده و یکسان، ویژگی‌هایی نظیر رنگ، عطر و طعم، احساس دهانی و مطلوبیت را مورد ارزیابی قرار دادند، گروه پذیرش کلی و مقبولیت نمونه پروبیوتیک (ریزپوشانی دو لایه) را تایید کردند و تفاوت معناداری در مورد ویژگی‌های حسی به‌ویژه طعم آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده نکردند. ($p< 0/05$). علت این امر را می‌توان به کوچک بودن اندازه و کارایی بالای کپسول‌های تشکیل شده مربوط دانست. رنگ یکی از معیارهای مهم کیفی گوجه‌فرنگی و فراورده‌های حاصل از آن است . لذا داشتن رنگ قابل قبول و مطابق استاندارد

www.SID.ir

Archive of SID

که مورد درخواست و انتظار مصرف‌کننده نیز باشد؛ اهمیت زیادی دارد. رنگ گوجه‌فرنگی به‌علت وجود کاروتنوئیدها است که تقریباً 83 درصد آن را لیکوپن تشکیل می‌دهد. با تغییر نسبت قندهای احیاءکننده به اسید امکان افزایش قهوه‌ای شدن و تغییر رنگ عصاره وجود دارد. لذا ارزیابی رنگ نمونه‌ها بر اساس مولفه‌های رنگی l (میزان تیرگی و روشنی)، a (میزان قرمزی) و b (میزان زردی) انجام گرفت. همان طورکه در جدول (3) قابل مشاهده است نمونه آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک در مقایسه با نمونه شاهدی که در شرایط مشابه نمونه پروبیوتیک نگه‌داری گردیده شفافیت بیش‌تری دارد. اما درجه قرمزی آن اندکی از نمونه شاهد کم‌تر است که می‌تواند به علت اضافه کردن دانک‌های آلژینات باشد.

4- نتیجه‌گیری

آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک می‌تواند جایگزین مناسبی برای افرادی باشد که تمایلی به مصرف فراورده‌های شیری پروبیوتیک ندارند. اما قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در فراورده‌ها چالش بزرگی برای تولید این دسته از محصولات است. لذا در تحقیق حاضر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌صورت ریزپوشانی شده مورد تحقیق قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که با توجه به زمان زنده‌مانی حداقل چهار هفته‌ای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در حالت آزاد و شش هفته‌ای در حالت ریزپوشانی شده فراورده آب گوجه‌فرنگی می‌تواند حامل مناسبی برای سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* باشد. ریزپوشانی دو لایه با آلژینات کلسیم زنده‌مانی سویه پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را نسبت به حالت سلول آزاد، حداقل به مدت دو هفته افزایش داده و بنابراین می‌تواند روش مناسبی برای داشتن حداقل میزان 10^6 -10^8 $cfuml^{-1}$ سویه پروبیوتیک تا پایان زمان زنده‌مانی فراورده آب گوجه‌فرنگی باشد و عمر قفسه‌ای فراورده آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک را افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه پژوهشی میکروبیولوژی پژوهشکده غذایی کشاورزی پژوهشگاه استاندارد برای در اختیار قرار دادن امکانات جهت اجرای این تحقیق، قدردانی می‌شود.

جدول (3) مقایسه اثر ریزپوشانی و زمان نگه‌داری بر رنگ (مولفه‌های رنگی l(میزان تیرگی و روشنی)، a (میزان قرمزی) و b (میزان زردی)) آب گوجه‌فرنگی

	l (روشنی)	a (قرمزی)	b (زردی)
نمونه آب گوجه‌فرنگی (شاهد تازه)	12/66 [a]	37/93 [a]	21/83 [a]
نمونه آب گوجه‌فرنگی (شاهد در یخچال نگه‌داری شده مشابه شرایط نمونه پروبیوتیک)	12/44 [a]	37/62 [a]	21/45 [a]
نمونه آب گوجه‌فرنگی پروبیوتیک (ریزپوشانی دو لایه)	12/51 [a]	37/32 [a]	21/57 [a]

اعداد با حروف مشابه از لحاظ آماری معنی‌دار نیستند(آزمون دانکن در سطح آماری با احتمال 95 درصد)

منابع

[1] Granato, D., Branco, F.G., Nazzaro, F., Cruz, A.G., Faria, J.A.F. (2010).Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products.*Compr. Rev. Food Sci.*, 9, 292-302.

[2] Jankovic I., Sybesma W., Phothirath P., Ananta E., Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products-challenges and new approaches.*Curr. Opin. Biotechnol.*, 21, 175-181.

[3] Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., Corbo, M.R. (2015). Challenges for the Production of Probiotic Fruit Juices. *Beverages*, 1, 95-103.

[4] Williams, E., Stimpson, J., Wang, D., Plummer, S., Garaiova, I., Barker, M., Corfe, B. (2009).Clinical trial: a multistrain probiotic preparation significantly reduces symptoms of irritable bowel syndrome in a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol*

www.SID.ir

Archive of SID

Ther., 29, 104-114.

[5] Wojtas, P.A., Truelstrup, L.H., Paulson, A.T.(2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniqques and anhydrous fixation.LWT, 41: 101-108.

[6] Huang, J.S., Bousvaros, A., Lee, J.W., Diaz, A., Davidson, E.J. (2002).Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children, A meta-analysis, *Dig. Dis. Sci.*, 47, 2625- 2634.

[7] Shah, N.P., Lankaputhra, W.E.V.(1997). Improving viability of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. in yogurt. *Int. Dairy J.*, 7,349-356.

[8] Champagne, C., Roy, D., Gardner, N.(2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit Rev. Food Sci. Nut.*, 45, 61-84.

[9] Naga Sivudu, N., Ramesh, B., Umamahesh, K., VijayaSarathi Reddy, N.(2016).Probiotication of Tomato and Carrot Juices for Shelf-life Enhancement using Microencapsulation. *J.Food Bio. Technol.*, 6,13-22.

[10] قهرمانی‌فر، ا. ؛ قهرمانی‌فر، م.؛ نجفی، م. ؛ محمدی‌ثانی، ف. (1389) تأثیر ویژگی‌های امولسیون بر خصوصیات پودرهای حاصل از فرایند ریزپوشانی، مجله *علمی پژوهشی علوم و فناوری غذایی*، جلد 2، شماره 2، ص54 - 45.

[11] Lourens, A.H., Viljoen, B.C.(2001).Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.*, 11,1-17.

[12] Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K., Adams, M.C.(2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.*, 43,1-7.

[13] Kosin, B., Rakshit, S.K.(2006).Microbial and processing criteria for production of probiotics: A review. *Food Technol.*, 44, 371-379.

[14] Hamdi, K., Shoae Hassani, A., Atyabi, S.M., Tabarayi B.(2009). Application of tomato juice to replace dairy products for preservation of Lactobacillus acidophiluus probiotic, *Food Tech. Nut.*, 6, 40-66.

[15] Buruleanu, L., Nicolescu, C.L., Avram, D., Bratu, G., Manea, I.(2009).Survival of probiotic bacteria during lactic acid fermentation of vegetable juices. *Agroaliment Proc. Technol. J.*, 15, 132-139.

[16] Shi, J., Le Mauger, M. 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing.*Crit Rev Food Sci. Technol.*, 40, 1-42.

[17] Yoon, K.Y., Woodams, E.E., Hang, Y.D.(2004). Probiotication of tomato juice by Lactic Acid Bacterial. *Microbiol. J.*, 42, 315-318.

[18] Rodríguez, M.(2009).The influence of storage time on micronutrients in bottled tomato pulp. *Food Chem.*, 112, 146-149.

[19] Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., HabibiNajafi, M.B., Shahidi, F. (2009).The influence of multi stage alginatecoating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Res. Int.*, 42, 1040-1045.

[20] Mandal, S., Puniya, A.K., Singh, K.(2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated Lactobacillus caseiNCDC-298. *Int. Dairy J.*, 16, 1190-1195.

[21] Truelstrup, L.H.,Wojtas, P.A., Jin, Y.L., Paulson, A.T.(2002). Survival of free and calcium alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. In simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol.*, 19: 35-45.

[22] موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (1386) میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون. استاندارد ملی ایران، شماره 9899، چاپ اول.

[23] موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (1386) آب‌میوه‌ها-روش‌های آزمون. استاندارد ملی ایران، شماره 2685، تجدید نظر اول.

[24] شیخ قاسمی، ش. ؛ زمردی، ش.(1393) تاثیر کپسوله کردن بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و خواص کیفی آب سیب در طول نگه‌داری در دمای محیط. مجله علوم غذایی و تغذیه، شماره11، ص90-81.

www.SID.ir

Archive of SID

[25] Nazzar, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R.(2012).Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 182-186.

[26] Nualkaekul, S., Lenton, D.T., Cook, M.V., Khutoryanskiy V., Charalampopoulos, D.(2012). Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated Lactobacillus plantarum in pomegranate juice. *Carbohyd Polym*., 92, 1281-1287.

[27] Ding, W.K., Shah, N.P.(2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *Int. Food Res. J*., 15, 219-232.

[28] Pereira, A.L.F., Maciel, T.C., Rodrigues S.(2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus casei. *Food Res. Int*., 44, 1276-1283.

[29] Sohail, A., Turner, M.S., Prabawati, E.K., Coombes, A., Bhandari, B.(2012).Evaluation of Lactobacillus rhamnosusGG and Lactobacillus acidophilus NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *Int. J. Food Microbiol*., 157, 162-166.

[30] Koushki, M.R., Khoshgozaran Abras, S., Hejazi M.A.(2009). Effect of storage conditions on the quality of tomato juice. *EJFPP*,1, 133-144.

[31] Ariful, I.M., Yun, C.H., Choi, Y.J. , Cho, C.S.(2010). Microencapsulation of live probiotic bacteria, 2010, *J. Mic. Biotech*., 10, 1367-1377.

www.SID.ir