امکان سنجی استفاده از میکروکپسولهای آلژینات حاوی ویتامین D و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* جهت تهیه کره پروبیوتیک ویتامینه

Feasibility of vitamin D and *Bifidobacterium Lactis* loaded-alginate microcapsules for producing probiotic / vitaminated butter

سحر سراقی[۱]، پیمان رجایی*[۲]، کاوه زرگری[۳]

دریافت: ۱۴۰۰/۴/۲۶ پذیرش ۱۴۰۰/۵/۲۷

چکیده

یکی از شیوه های نوین در جهت افزایش ماندگاری باکتری های پروبیوتیک در فرآورده های غذایی و همچنین زنده مانی باکتری ها در حین عبور از دستگاه گوارش به منظور انتقال ایمن آن ها به روده بزرگ، ریزپوشانی سلول های پروبیوتیکی می باشد. این مطالعه با هدف تعیین تاثیر ریزپوشانی بر زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در طی دوره نگهداری کره پاستوریزه انجام گرفت. در این بررسی میکروکپسول های آلژینات دارای *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در فرمولاسیون کره با مقادیر ۱، ۲، ۳ و ۴ سی سی استفاده گردید. آزمونهای بررسی مورفولوژی، اندازه ذرات، و زنده مانی در شرایط مشابه روده و معده صورت پذیرفت. آزمون های کره پاستوریزه نیز شامل ارزیابی اسیدیته، عدد پراکسید، اندیس آنیزیدین، مقاومت در برابر اکسیداسیون، نقطه ذوب، میزان بقای *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و همچنین جمعیت کپک و مخمر در سه تکرار صورت پذیرفت. ارزیابی حسی شامل (طعم ومزه ، رنگ ظاهری، عطر و بو، احساس دهانی و پذیرش کلی) توسط ده ارزیاب تعلیم دیده کارخانه کره شکلی با روش ارزیابی هدونیک ۵ نقطه ای صورت گرفت. نتایج آزمون با روش آنالیز واریانس دو طرفه و با نرم افزارSAS ورژن ۹,۴ آنالیز گردید. برای ارزیابی نتایج حسی نیز از روش آزمون غیر پارامتری کروسکال والیس من ویتنی استفاده گردید. نتایج نشان داد که میکروکپسول های آلژینات کروی و با سطح نرم و متوسط اندازه ذرات آن بین ۳۰۰ تا ۴۰۰ میکرون بوده و حداکثر میزان به دام اندازی باکتری ها در آن به میزان $۳/۳\pm ۰/۰۵\times۱۰^{۵}$ میباشد. با استفاده از میکروکپسول های آلژینات نیز شاخص پراکسید، اندیس آنیزیدین به به جهت خصوصیات آنتی اکسیدانی آلژینات و همچنین ویتامین D به طور معنی داری کاهش و شاخص مقاومت در برابر اکسیداسیون و همچنین میزان اسیدیته نیز به طور معنی داری کاهش افزایش یافت. همچنین با افزایش میزان استفاده از میکروکپسول ها میزان نقطه

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا، ایران.
۳- استادیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا، ایران.
* نویسنده مسئول : prajaei@gmail.com

ذوب تیمارهای کره کاهش و میزان جمعیت کپک و مخمر نیز به طور معنی داری کاهش یافت.در مقایسه با تیمارکره پاستوریزه دارای بیفیدوباکتریوم لاکتیس آزاد، میکروکپسولاسیون میزان بقای *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* را به میزان دو و نیم سیکل لگاریتمی در شرایط بهینه بهبود بخشید. نهایتا تیمار کره پاستوریزه دارای ۳ سی سی میکروکپسول آلژینات به عنوان تیمار بهینه انتخاب گردید.

کلمات کلیدی: کره پروبیوتیک ، ویتامین D ، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*، بقای پروبیوتیک

مقدمه

غنی‌سازی مواد غذایی، شیوه‌ای برای جبران کمبود ریز مغذی‌ها در جامعه است که تمام کشورهای دنیا از آن استفاده می‌کنند تا بتوانند کمبود مواد مغذی ضروری در جامعه را به حداقل رسانده یا آن را تحت کنترل درآورند؛ به عبارت بهتر، غنی‌سازی مواد غذایی یکی از ۴ استراتژی مهم در بحث کنترل و پیشگیری از کمبود ریز مغذی‌هاست (راست منش ،۱۳۸۷). ویتامین D یک گروه از استروئیدهای محلول در چربی برای افزایش جذب روده ای کلسیم ، آهن منگنز و روی ، فسفات است . در انسان ، اغلب ترکیبات مهم در این گروه ویتامین D3, وD2 هستند. ویتامین D برای جذب گاستروئیدی کلسیم ضروری است. مقادیر ناکافی ویتامین D اغلب سطح کلسیم سرمی را کاهش می دهد و می تواند جبران آزادی هورمون پاراتیروئید را نماید. این ممکن است هایپرپاراتیرودیسم ثانویه ایجاد نماید. کمبود طولانی مدت ویتامین D به ضعف عضلانی و خطر ابتلا به شکستگیهای، سقوط، نرمی استخوان و نرمی استخوان را افزایش دهد. بر اساس شواهد اپیدمیولوژیک، کمبود ویتامین D ممکن است خطر ابتلا به برخی از بیماری های مزمن، از جمله انواع سرطان ها، بیماری های خود ایمنی و بیماری های قلبی عروقی را افزایش دهد(Wichchukit *et al*, 2012). شیوع بالای کمبود ویتامین D از معضلات بهداشتی جهان امروز است . در سال های گذشته تصور بر این بود که اپیدمی کمبود این ویتامین در جهان مهار شده است اما مطالعات اخیر نشان می دهد که اپیدمی های جدیدی از شیوع ویتامین D در اروپا بوجود آمده است به صورتی که در اروپا شیوعی بین ۳۰ تا ۸۰ درصد گزارش شده است(Scharla *et al*, 1998). در استرالیا این کمبود شیوعی بین ۷۰ تا ۸۰ درصد در سالمندان و زنان باردار و در حدود ۲۳ ٪ در بین بالغین جوان مشاهده شده است (Caryl *et al* ,2002) . همچنین اپیدمی جدیدی در آمریکا گزارش شده است(Tangpricha , 2002). در کشور ما هم مطالعاتی که توسط مرکز تحقیقاتی غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران با همکاری معاونت سلامت وزارت بهداشت ، درمان و اموزش پزشکی که در پنج شهر مختلف انجام گردیده نشان دهنده شیوع کمبود این ویتامین در حدود ۴۰ تا ۸۰ درصد در مناطق مختلف بوده است (لاریجانی و همکاران ، ۱۳۸۲) . مطالعات مختلفی وضعیت ویتامین D را در کشورهای مختلف در سرتاسر جهان نشان می دهد (Ovesen *et al*., 2003a, b) دلیل اصلی این مساله کمبود نورخورشید می باشد. در کشورهای شمالی کمبود تابش آفتاب ۳۱۵-۲۹۵ نانومتر در

زمستان و در سایر فصول نیز در دسترس بودن خورشید به صورت نیمه وقت می باشد . در برخی از کشورها بخصوص کشورهای اسلامی به خاطر نوع پوشش نیز مشکلاتی در دریافت ویتامین دیده می شود. مواردی از کمبود ویتامین D نیز در زنان بنگلادشی گزارش شده است و در فنلاند کمبود ویتامین D در ۲۶٪ زنان و ۲۸ ٪ مردان بزرگسال مشاهده شده است (Lamberg-Allardt *et al* ,2001) .آلودگی هوا نیز مسئله مهم دیگری است که در اغلب شهرهای بزرگ بر میزان کمبود ویتامین D اثر دارد . کمبود ویتامین D در جنوب اروپا ، خاورمیانه و در کشورهای آسیای از همه بیشتر متداول است و به وسیله ی تابش میزان کم اشعه خورشید ، رنگ پوست ، آلودگی هوا ، پوشش پوست و میزان کم مصرف ویتامین D موجب می شود . اثرات به وسیله خوردن میزان پایین کلسیم تشدید می شود وگروه های در معرض خطر شامل کودکان شیرخوار، زنان باردار، زنان محجبه و افراد مسن تر مشاهده می شود. کمبود ویتامین D را می توان با تشویق به قرار گرفتن در معرض نور آفتاب ، بهبود رژیم غذایی، به عنوان مثال بهبود توسط ماهی و روغن کبدcod ، غنی سازی مواد غذایی و مکمل ویتامینD جبران نمود. عوارض کمبود ویتامین D از جمله عواملی است که ضرورت این تحقیق را ایجاد می نماید . نقش و اهمیت ویتامین D نیز در درمان بیماری ها نیز به اثبات رسیده است . متقی و همکارانش ادعا نمودند که ویتامین D می تواند در درمان میگرن نقش داشته باشد اما نقش ان هنوز دقیقا ناشناخته است و نیاز به مطالعات بیشتری دارد (متقی و همکاران ،۱۳۹۲) .ویتامین D ممکن است در غلظت های خاصی نیز اثرات سمی داشته باشد تعیین پایداری ویتامین D در طی نگهداری ، بسته بندی و نگهداری بعدی مهم است. این در انتقال مقدار مطلوب ویتامین D_2 در شیر غنی شده کمک خواهد نمود که برای مصرف کننده و صنعت شیر کمک خواهد نمود (Upreti *et al*., 2002).پروبیوتیک ها ، میکروارگانیسم های زنده و مشخصی هستند که در صورت مصرف در انسان یا حیوان ، با اثربر روی فلورمیکروبی بدن باعث اعمال اثرات مفید بر سلامتی میزبان می شوند .اکثر پروبیوتیک ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری های اصلی فلورمیکروبی روده ی انسان بوده و در آن جا زندگی همسفرگی بی ضرری دارند (Buruleanu *et al*,2009). مصرف دائم پروبیوتیک ها در کاهش میزان بروز بیماری های مختلف موثر است که این تاثیر در جمعیت های دارای خطر بالا (مانند کودکان بستری در بیمارستان ، کودکانی که شیر مادر مصرف نمی کنند یا در شرایط محروم به سر می برند) بارزتر است . فراورده های پروبیوتیکی در بازار تجاری به اشکال قرص ، کپسول ، پودر ، ماست های غنی شده ، شیر و پنیر به فروش می رسند . اغلب پروبیوتیک هایی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته اند یا در بازار موجودند ، ایمن هستند و در هزاران نفر از افرادی که تاکنون مصرف این فراورده ها را گزارش کرده اند ، هیچ گونه عارضه جانبی آشکاری از خود نشان نداده اند (Picard *et al*,2005). مقاومت باکتری های پروبیوتیک در مواد غذایی یک چالش است به این جهت که فاکتورهای بسیاری بر روی زنده ماندن سلول ها در طی فراوری و نگهداری تاثیر دارد .به منظور استفاده از اثرات سلامتی بخش آن ها ، فدراسیون بین المللی لبنیات پیشنهاد داد که حداقل میزان

پروبیوتیک ها باید در حدود 10^{7}CFU/mL -10^{6} در محصول نهایی باشد (Ding & Shah, 2008).لازم به ذکر است که در بین میکروارگانیسم های پروبیوتیک شناخته شده تا امروز ، لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکتریوم ها معمول ترین گونه های باکتریایی مورد استفاده در تولید محصولات پروبیوتیک هستند. با این حال یکی از مهم ترین چالش های موجود در زمینه تولید و فرآوری محصولات پروبیوتیک پایین بودن قابلیت پروبیوتیک به دلیل حساسیت به شرایط سخت و دشوار درون محصول غذایی و همچنین شرایط نامساعد دستگاه گوارشی است(Buruleanu *et al*,2009).

میکروانکپسولاسیون[1] فرایند به کارگیری یک حامل برای میکروارگانیسم حساس بمنظور حفاظت از شرایط محیط خارجی است، بنابراین صدمات سلولی را کاهش می دهد. پلیمرهای طبیعی بر اساس مواد موجود به جهت خواص زیست تخریب پذیری، سازگاری با مواد غذایی و قابلیت زنده بودن سیستم های انتقال کنترل شده محسوب می شود(Doherty *et al*., 2011). به جهت حساسیت باکتری ها ، میکروکپسولاسیون تکنیکی است که برای حفاظت باکتری های از شرایط اسیدی محیطی در محصولات لبنی تخمیری و یا آبمیوه ها مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین در بین مواد مختلف کپسولاسیون ، آلژینات ، یک کوپلیمر آنیونی ۱-۴ متصل به بتا – د – مانورونیک اسید و آلفا – ال – گلوکورونیک اسید که از گیاهان دریایی استخراج می شود، بخاطر سادگی، غیرسمی بودن و قیمت پایین و همچنین زیست تخریب پذیری اهمیت زیادی پیدا کرده است، با این وجود کاربرد آن در برخی مواد غذایی اسیدی به جهت پایداری نسبی آن به مواد شلاته کننده درشرایط pH پایین مشکل ایجاد می کند(Krasaekoopt *et al*., 2003). در این تحقیق از میکروکپسولاسیون به عنوان فرآیندی جهت حفظ باکتری های پروبیوتیک و ویتامین D در کره پاستوریزه استفاده شد.

مواد و روش ها

آلژینات از شرکت سیگما آلدریچ تهیه گردید. *بیفیدوباکتریوم لاکتیس۱۶۴۳* PTCC[2] از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی بخش کلکسیون میکروبی خریداری شد.

میکروکپسولاسیون *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*

میکروانکپسولاسیون *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* با استفاده از روش ژلاتیناسیون خارجی[3] که قبلا رضایی مکرم و همکاران (۱۳۸۷) نیز گزارش شده است ، اجرا شد. مراحل روش را می توان بطور خلاصه چنین بیان کرد، ابتدا ۱۰ گرم آلژینات

[1] Microencapsulation
[2] Persian type collection center
[3] External gelation

(سیگما ،آلمان A 2033;High mannuro) ایجاد کننده ویسکوزیته متوسط در یک لیتر آب مقطر فاقد یون، حل شد. سپس ۱۸ گرم از محلول فوق با یک گرم سوسپانسیون باکتریایی و همچنین IU ۱۰۰۰ ویتامین D مخلوط و ترکیب حاصل در ۱۰۰ گرم روغن نباتی مایع ، حاوی مقدار ۵ گرم در لیتر توئین ۸۰ (P 8074 Sigma) با استفاده از همزن مغناطیسی در rpm ۹۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه پراکنده گردید.در مرحله بعد با افزودن ۳۲ میلی لیتر امولسیون حاوی یون کلسیم (تهیه شده از انحلال ۶۰ گرم روغن نباتی مایع ، ۵ گرم در لیتر توئین و ۶۲/۵ میلی مولار کلرور سدیم) عمل ژلاتیناسیون کامل شود. در نهایت کپسول ها با محلول ۰/۱ درصد پپتون بر روی کاغذ صافی شسته و با استفاده از همین محلول در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد(Pedroso *et al*., 2013).

تهیه و فرمولاسیون نمونه های کره

برای تهیه کره از خط تولید بسته بندی کره کارخانه میهن استفاده شد. میکروکپسول ها قبل از انجماد و بسته بندی و انتقال به سردخانه در ترکیب اضافه شد. نمونه های کره در روزهای اول ، هفتم ، چهاردهم ،بیست و یکم نگهداری ارزیابی شد. نسبت های مختلف از میکروکپسول ها در فرمولاسیون کره به شرح جدول ۱و کد بندی تیمارها استفاده شد.

جدول ۱- کدبندی تیمارهای تحقیق

Table 1- Coding of research treatments

کد تیمار Treatment code	T	T1	T2	T3	T4
مشخصات تیمار Treatment specifications	باکتری های پروبیوتیک فاقد پوشش دهی Uncoated probiotic bacteria	یک سی سی میکروکپسول ها در ۱۰۰ گرم One cc of microcapsules per 100 g	دو سی سی میکروکپسول ها در ۱۰۰ گرم Two cc of microcapsules in 100 g	سه سی سی میکروکپسول ها در ۱۰۰ گرم Three cc of microcapsules in 100 g	چهار سی سی میکروکپسول ها در ۱۰۰ گرم Four cc microcapsules per 100 g

۲-۱ آزمون های میکروکپسول ها

۲-۱-۱ شمارش تعداد باکتری ها به دام افتاده در میکروکپسول

۱ گرم از نمونه میکروکپسول تهیه شده در ۹۹ میلی لیتر محلول ۱ درصد وزنی / حجمی سدیم سیترات استریل در pH حدود ۶ پراکنده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق همزده شد تا کپسول ها بطور کامل حل و باکتری ها آزاد شوند، آنگاه با استفاده از محیط جامد MRS[1] در شرایط هوازی ، دمای ۳۷ درجه و به مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و تعداد باکتری ها شمارش گردید، این شمارش در سه تکرار صورت پذیرفت(Eratte *et al.*,2015).

۲-۱-۲ تعیین اندازه ذرات و نحوه پراکنش آن ها

اندازه کپسول های حاصل از هریک از تیمارها و فراوانی هر یک از آنها با استفاده از دستگاه اندازه گیری قطر ذرات مدل (SALD-2101 SHIMADZU japan) تعیین گردید. برای این منظور میکروکپسول آلژینات حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در آب یون زدایی شده (Milli Q Millipore USA) با ضریب هدایت µs ۰/۰۵۴ پراکنده و نتایج حاصل بر اساس قطر حجم میانگین ذرات ± استاندارد خطا گزارش شد (وثوق وهمکاران،۱۳۸۸).

۲-۱-۳ بررسی مورفولوژی ذرات

برای بررسی مورفولوژی ذرات و مشاهده شکل ظاهری آن ها از میکروسکوپ الکترونی و تکنیک SEM[2] استفاده شد. بدین جهت کپسول ها به وسیله چسب دو طرفه بر روی کوتر (SC 7620 England) تثبیت و به مدت ۲ دقیقه بوسیله طلا و پالادیم پوشش داده شدند. مشاهده کپسول ها بوسیله میکروسکوپ الکترونی مدل (LEO 1450 VP Germany) با تابش الکترونی ۱۰kv انجام پذیرفت (Rao *et al.*,1989).

۲-۱-۴ بررسی قابلیت زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* PTCC ۱۶۴۳ در شرایط شبیه سازی شده

این مشاهده بر اساس روش توصیفی بوسیله (Rao *et al.*,1989) انجام گردید. یک گرم از کپسول حاوی باکتری بطور کامل در ۱۰ میلی لیتر شیره شبیه سازی شده معدی (۰/۰۸ M HCL و ۰/۲ درصد NaCl و pH حدود ۱/۵) بدون حضور پپسین پراکنده و برای مدت های ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ دقیقه گرمخانه گذاری شد. پس از گذشت زمان لازم، کپسول ها جداسازی و بوسیله محلول ۰/۱ درصد پپتون شسته و تعداد باکتری ها با روش گفته شده در قسمت ۲-۳ با سه تکرار شمارش شد (وثوق و همکاران ،۱۳۸۸).

[1] DE MAN, ROGOSA and SHARPE

[2] Scan electron microscope

۲-۱-۵ آزمون های کره پاستوریزه

عدد پراکسید ، اسیدیته و اندیس آنیزیدین تیمارهای کره پاستوریزه مطابق با استاندارد ملی ایران شماره۴۱۷۹ صورت پذیرفت (بی نام،۱۳۷۳).

۲-۱-۶ زمان پایداری در برابر اکسیداسیون

زمان پایداری با استفاده از رنسیمت مدل Metrohm برای ۲/۵ گرم کره و دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد برای تمامی تیمارها محاسبه گردید (Erkaya *et al*.,2015).

۲-۱-۷ تعیین نقطه ذوب

اندازه گیری نقطه ذوب باید مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۴۸۸۷ ، سال ۱۳۷۸ : روغن ها و چربی های خوراکی اندازه گیری به روش موئینه باز انجام شد (بی نام ،۱۳۷۳). ۲-۱-۸

۳- نتایج و بحث

۳-۱ نتایج شمارش تعداد باکتری ها به دام افتاده در کپسول ها

با توجه به جدول ۲ میزان تعداد باکتری های به دام افتاده در میکروکپسول ها را نشان می دهد. بالاترین میزان باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در تیمار T4 و کمترین آن در تیمار T1 مشاهده شد. میزان باکتری های پروبیوتیک به دام افتاده در میکروکپسول های آلژینات با افزایش میزان غلظت پوشش دهی توسط آلژینات به طور معنی داری افزایش می یابد. در تیمار دارای ۴ سی سی میکروکپسول های آلژینات میزان باکتری های به دام افتاده به طور معنی داری افزایش می یابد. قبادی دانا و رشنوادی (۱۳۹۵) نیز در بررسی ارزیابی اثر ریزپوشانی دولایه با آلژینات کلسیم بر زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی دوره نگه داری آب گوجه فرنگی به نتایج مشابهی دست یافتند که با نتایج تحقیق حاضر نیز در توافق بود. نعیمی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی تاثیر افزودن اینولین و فرآیند ریزپوشانی بر میزان زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در طول دوره نگهداری ماست بستنی سین بیوتیک نیز به نتایج مشابهی دست یافتند.آن ها دریافتند که افزایش میزان استفاده از باکتری های پروبیوتیک در فرمولاسیون بستنی سین بیوتیک به طور معنی داری باعث افزایش میزان ریزپوشانی و باکتری های به دام افتاده می شود که با با نتایج تحقیق حاضر نیز در توافق می باشد.

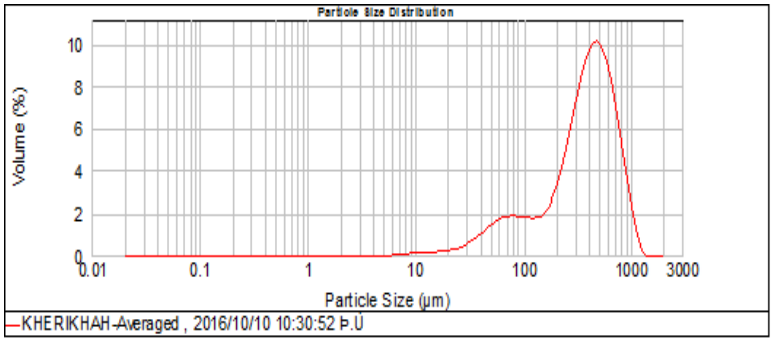
جدول ۲- تعداد باکتری های به دام افتاده در میکروکپسول ها

Table 2 - Number of bacteria trapped in microcapsules

T4	T3	T2	T1	کد تیمار / Treatment code / میزان جمعیت باکتری / Bacterial population
۳/۳± ۰/۰۵×۱۰۵	۲/۸± ۰/۰۵×۱۰۵	۲/۳± ۰/۰۵×۱۰۵	۱/۱± ۰/۰۵×۱۰۵	۱/۱± ۰/۰۵×۱۰۵
3.3± 0.05*105	2.8± 0.05*105	2.3± 0.05*105	1.1± 0.05*105	1.1± 0.05*105

۳-۲ نتایج تعیین اندازه میکروکپسول های آلژینات و نحوه پراکنش آن ها

شکل ۱ میانگین اندازه ذرات میکروکپسول های آلژینات سدیم را نشان می دهد که اغلب میکروکپسول ها در محدوده ۵۹۵ میکرومتر بوده و بخشی از میکروکپسول ها نیز در محدوده ۳۰۰ تا ۴۰۰ میکرومتر قرار دارند.

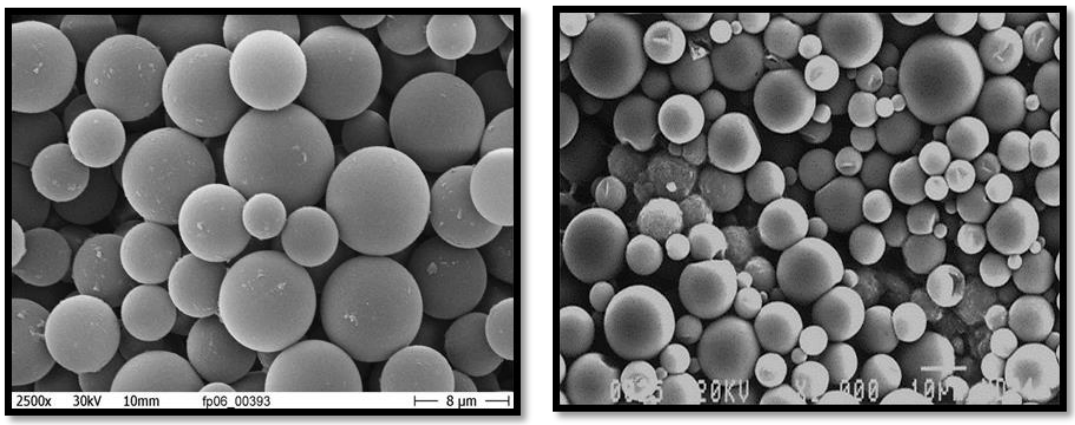


شکل ۱- میانگین اندازه ذرات میکروکپسول های حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* PTCC۱۶۴۳

Figure 1- Average particle size of microcapsules containing Bifidobacterium lactis 1643PTCC

۳-۳ نتایج ارزیابی مورفولوژی میکروکپسول های آلژینات

شکل ۲ تصویر میکروسکوپی نانوذرات آلژینات حاوی بیفیدوباکتریوم لاکتیس را نشان می دهد با توجه به شکل ملاحظه گردید که میکروکپسول های آلژینات دارای اشکال کروی با ابعاد ۲۰ تا ۲۰۰ میکرومتر بوده و سطح هموار و کروی برخوردار بودند. نشان داد که میانگین اندازه میکروکپسول ها بین ۲۰ تا ۲۰۰ میکرومتر می باشد. ادعا شده است که اندازه کپسول ها بر روی ظاهر ماده غذایی و قابلیت زنده مانی باکتری ها تاثیر دارد. به عبارت دیگر کپسولهای بزرگتر از یک میلی متر موجب خشن شدن بافت ماده غذایی می شوند و کپسول های با قطر کمتر از ۰/۱۱ میکرون تاثیری در زنده مانی باکتریها ندارند و اثر حفاظتی خود را از دست می دهند بر اساس این مطالعه، باکتری ها باید در دامنه مشخصی از اندازه کپسول ها حفاظت شوند تا مهمترین راندمان در pH معده و غلظت صفرای روده به دست آید. علاوه بر قطر کپسول ها، نوع میکروارگانیزم حفاظت شده نیز بر قابلیت زنده مانی باکتری موثراست (تراستراپ و همکاران ۲۰۱۱). همچنین کروی بودن شکل ظاهری کپسول های تهیه شده در بستر آلژینات کلسیم توسط همایونی و همکاران (۲۰۱۳) و مکرم و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش شده است. کوچک بودن قطر کپسول‌ها بافت نرم تری را در بستنی ایجاد می کند. هم چنین کوچک تر بودن و کروی بودن کپسول‌ها باعث تغییرات کمتری در محصول و مانع از بروز پدیده شنی شدن در ارزیابی حسی محصول نهایی می‌شود. کاظمی گورجی و همکاران (۱۳۹۳) نیز در بررسی اثر میکروانکپسولاسیون بر زنده مانی باکتری پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط شبیه سازی شده معده و روده نیز دریافتند که میکروکپسول های تهیه شده کروی بوده که با نتایج تحقیق حاضر در توافق بود.

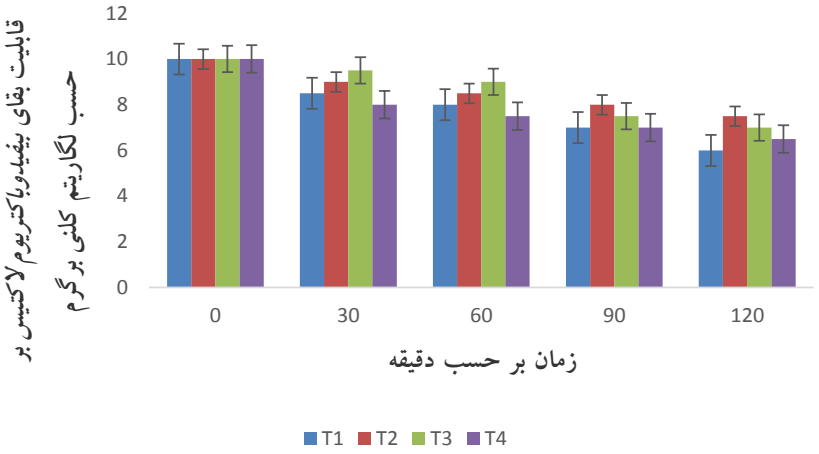


شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی از میکروکپسول های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* PTCC۱۶۴۳

Figure 2- Electron microscope image of Bifidobacterium lactis microcapsules 1643PTCC

۴-۳ نتایج ارزیابی قابلیت زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* PTCC ۱۶۴۳ در شرایط شبیه سازی شده

با توجه به نمودار ۱ اختلافات معنی داری بین میزان زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* PTCC ۱۶۴۳ در شرایط شبیه سازی شده ترکیبی معده (pH=۱/۵) و روده (pH =۷/۲۵) بمدت ۶۰ دقیقه در زمانهای مختلف بررسی شدند. بررسی نتایج نشان داد که از میزان جمعیت باکتری های پروبیوتیک در شرایط شبیه سازی شده روده و معده به طورمعنی داری کاسته شد. میزان کاهش جمعیت پروبیوتیک در تیمارهای دارای مقادیر جمعیت بالاتری از پروبیوتیک با شدت کمتری از تیمارهای دارای جمعیت پروبیوتیک کمتر صورت می گیرد. بالاترین میزان مقاومت جمعیت پروبیوتیک به تیمار T۴ و کمترین آن نیز به تیمار پروبیوتیک دارای تیمار T۱ تعلق داشت. عوامل متعددی بر زنده مانی باکتری های پروبیوتیک تاثیر گذارند که مهم ترین آن ها، دمای فرآیند و انبارداری محصول، غلظت اسیدهای آلی محیط و pH ماده غذایی است. میزان حساسیت باکتری های گرم مثبت به صفرا بسیار بیشتر از باکتری های گرم منفی است. طبق تحقیقات مارتئو و همکاران مقاومت باکتری های مواجه شده با صفرا در محیط آزمایشگاه، محیط شبیه سازی شده گوارش و در بدن موجود زنده متفاوت است. نتایج حاصل از آزمون شبیه سازی شرایط معده و روده در شکل ۴-۲ نشان دهنده کاهش شدید تعداد سلول های فعال در باکتری های بدون پوشش (*بیفیدوباکتریوم لاکتیس* آزاد) می باشد. اثر ریزپوشانی بر فعال باقی ماندن باکتری ها در مقایسه با *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* آزاد قابل توجه می باشد. به عبارتی ریزپوشانی می تواند در شرایط شبیه سازی شده معده و روده باعث افزایش فعال ماندن باکتری ها گردد و در حالی که سلول های آزاد پس از عبور از شرایط شبیه سازی معده و روده ۸ سیکل لگاریتمی کاهش یافتند، سلول های ریزپوشانی شده حدود ۲ سیکل لگاریتمی کاهش یافتند. با قرار گرفتن میکروکپسول ها در شرایط شبیه سازی شده روده مشخص گردید که قابلیت زیستی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در شرایط شبیه سازی شده معده و روده به صورت متوالی، پایین تر از شرایط شبیه سازی معده است که عواملی مانند pH روده، حضور سورفاکتانت ها و املاح صفراوی باعث این کاهش می گردد. با مقایسه بین باکتری های آزاد و میکروکپسوله شده مشاهده شد ریزپوشانی می تواند تا حد زیادی از باکتری ها در برابر عوامل نامساعد مانند شرایط شبیه سازی شده معده وروده و حضور آنزیم ها محافظت کند. این نتایج با یافته های محمدی و همکاران (۱۳۹۵) در بررسی اثر ریزپوشانی بر قابلیت زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در شرایط شبیه سازی شده معده و روده و تیمار حرارتی نیز مطابقت داشت.



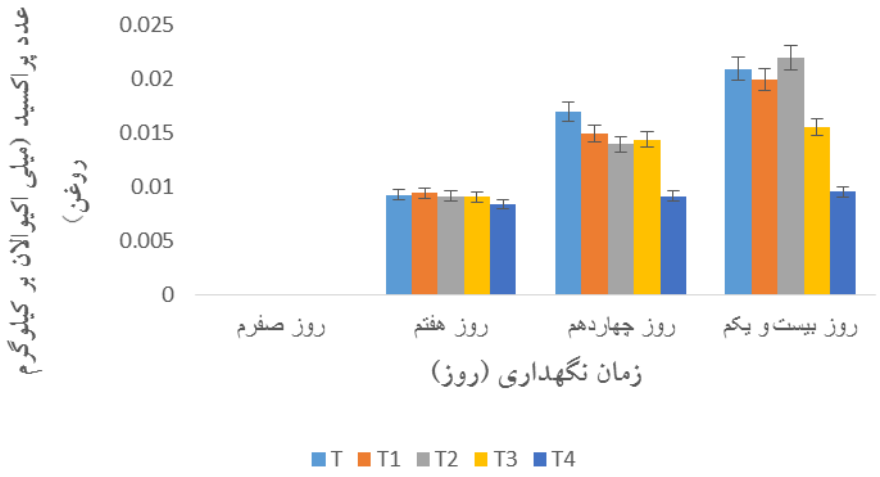
نمودار ۱- نحوه تاثیر گذاری میکروانکپسولاسیون بر قابلیت زنده مانی پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در شرایط ترکیبی معده (pH=1/ 5) و روده (pH =7/ 25)بمدت ۶۰ دقیقه در زمانهای مختلف

Figure 1: the effecting of microencapsulation in survival rate of *bifidobacterium lactis* in mix condition of stomach (pH=1.5) and intestine (pH=7.25) at 60 min. in different time

۳-۵ نتایج ارزیابی عدد پراکسید

تاثیر زمان نگهداری در میزان عدد پراکسید در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار بود ($p\leq$ ۰/۰۵). اما تاثیر تیمار و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری بر میزان عدد پراکسید تیمارهای کره پاستوریزه معنی دار نبود($p\leq$ ۰/۰۵). با توجه به نمودار ۲ میزان عدد پراکسید تیمارهای کره پاستوریزه به طور معنی داری در طی زمان نگهداری با یکدیگر اختلاف داشتند. بالاترین میزان عدد اکسید به روز بیست و یکم نگهداری و کمترین آن به روز صفرم (روز تولید) تعلق داشت($p\leq$ ۰/۰۵). اندیس پراکسید بصورت میلی اکی والان پراکسید در ۱۰۰۰ گرم نمونه که یدید پتاسیم را تحت شرایط آزمون اکسید می کند بیان می شود و شاخصی برای اندازه گیری میزان اکسیداسیون چربی است. عوامل مختلفی مانند نور، یونهای فلزی و اکسیژن قادر به بالا بردن اندیس پراکسید می باشند. هیدرو پراکسید، محصول اولیه اکسیداسیون چربیها و اسید های چرب چند غیر اشباعی (PUFA) است و به همین دلیل برای ارزیابی اکسیداسیون اولیه چربی میزان پراکسید را می سنجند.. از آنجا که پراکسیدها ترکیبات بدون طعم و بو می باشند، نمی توانند به وسیله مصرف کنندگان تشخیص داده شوند. ولی این ترکیبات سبب به وجود آمدن ترکیبات ثانویه مثل آلدئیدها و کتونها می شوند که سبب تشخیص تند شدن اکسیداسیونی می شوند. به نظر میرسد حضور آلژینات بر روی میزان عدد پراکسید تاثیرات معنی داری داشته و به نظر می رسد که میزان عدد پراکسید و تشکیل ترکیبات

ثانویه و همچنین اکسیداسیون را کاهش می دهد و بنابراین با افزایش میزان غلظت میکروکپسول ها، میزان عدد پراکسید به طور معنی داری کاهش می یابد. در واقع گروه‌های کربوکسیلی آلژینات بـه صـورت کاتالیزور عمل کرده و منجر به تشکیل رادیکـال هـای آزاد از طریـق تجزیـه هیدروپراکسـید هـــا مـی شـوند.نامی خسمخی و همکاران (۱۳۹۵) در اثرات ضد اکسیداسیونی پوشش خوراکی آلژینات سدیم به همراه ویتامین C برکیفیت فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان در خلال نگهداری در یخچال نیز به اثرات آنتی اکسیداسیونی پوشش آلژینات سدیم در ممانعت از افزایش عدد پراکسید اشاره نمودند که با نتایج تحقیق حاضر در توافق بود.



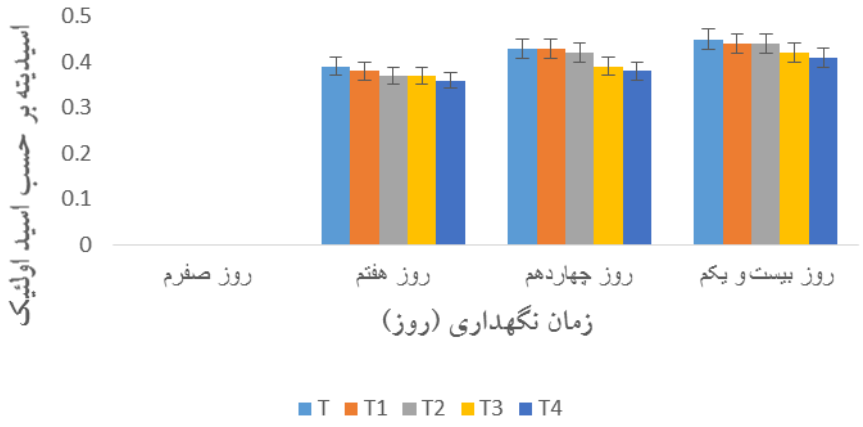
نمودار ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار * زمان نگهداری بر میزان پراکسید تیمارهای کره پاستوریزه پروبیوتیک

Figure 2- Comparison of average treatment interaction * Storage time on peroxide content of probiotic pasteurized butter treatments

۳-۶ نتایج ارزیابی اسیدیته

تاثیر تیمار در میزان اسیدیته در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار بود ($p\leq$ ۰/۰۵). اما تاثیر زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری برمیزان اسیدیته تیمارهای کره پاستوریزه معنی دار نبود($p\leq$ ۰/۰۵). با توجه به نمودار ۳ نیز مشاهده شد که اختلافات معنی داری بین میانگین امتیازات اسیدیته بر اساس نوع تیمار در طی زمان نگهداری تیمارهای کره پاستوریزه وجود داشت ($p\leq$ ۰/۰۵). میزان اسیدیته تیمار کره پاستوریزه شاهد به طور معنی داری افزایش یافت اما تیمار کره پاستوریزه دارای میکروکپسول های آلژینات دارای میزان تغییرات اسیدیته کمتری میباشد. از دلایل

مهم افزایش اسیدیته کره می توان به هیدرولیز ساکارز موجود در محیط توسط باکتری های پروبیوتیک و همچنین باکتری های میکروبی کلی می باشد ، چرا که این باکتری ها از ساکارز به عنوان منبع تغذیه استفاده کرده و با تخمیر آن در محیط تولید اسید سیتریک ، اسید لاکتیک و اسید گلوکورونیک می نمایند. با توجه به نمودار ۳ مشخص گردید که رابطه مثبت و معنی داری بین جمعیت پروبیوتیک وجود دارد و با افزایش میزان جمعیت پروبیوتیک میزان pH نیز به طور معنی داری افزایش می یابد که به دلیل مقاومت باکتری های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس ها و *بیفیدوباکتریوم* *بیفیدیوم* به ترکیبات اسیدی میباشد. اما باکتری های فلور میکروبی در ابتدای تخمیر مقاومت بالایی به اسیدیته نشان داده است. میزان ویتامین D موجود در محیط در مقادیر ۴ سی سی میکروکپسول ها نیز اثرات نامطلوبی بر روی رشد باکتری های پروبیوتیک داشته و نهایتا با تقلیل جمعیت پروبیوتیک در طی زمان نگهداری ترکیبات اسیدی تخمیر شده جهت مصارف باکتری ها در محیط تجمع یافته و اسیدیته افزایش یافته و pH به طور معنی داری کاهش می یابد.زمان نگهداری نیز تأثیر مشخصی بر میزان اسیدیته داشت. مقدار اسیدیته با گذشت زمان افزایش یافت. گولر اکین و اکین نیز به نتایج مشابهی دست یافتند . در طی نگهداری ب ه‌دلیل فعالیت *لاکتوباسیلوس لاکتیس* در دما یخچال و تولید مقدار کم لاکتیک اسید، pH هم‌چنان کاهش می‌یابد که با نتایج تحقیق حاضر نیز در توافق بود. همچنین لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم ها با تولید اسیدهای لاکتیک و استیک، باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی استیل، استالدئید و آمونیاک قادرند اثرات بازدارندگی روی بسیاری از میکروارگانیسم ها داشته باشند که هم اسیدیته را افزایش می دهند و هم جمعیت میکروبی را کاهش میدهند. کاظمی درسنکی و همکاران (۱۳۸۹) نیز در بررسی خود تحت عنوان بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از محصولات پروبیوتیکی (لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم) دریافتند که باکتری های پروبیوتیک با تولید متابولیت های اسیدهای لاکتیک و استیک، باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی استیل، استالدئید و آمونیاک باعث تغییرات اسیدیته محیط شده و مانند آنتی بیوتیک ها قادر به ایجاد اثرات ضد میکروبی بر علیه باکتری ها می باشند که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت نشان داد.



نمودار ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار * زمان نگهداری بر میزان اسیدیته تیمارهای کره پاستوریزه پروبیوتیک

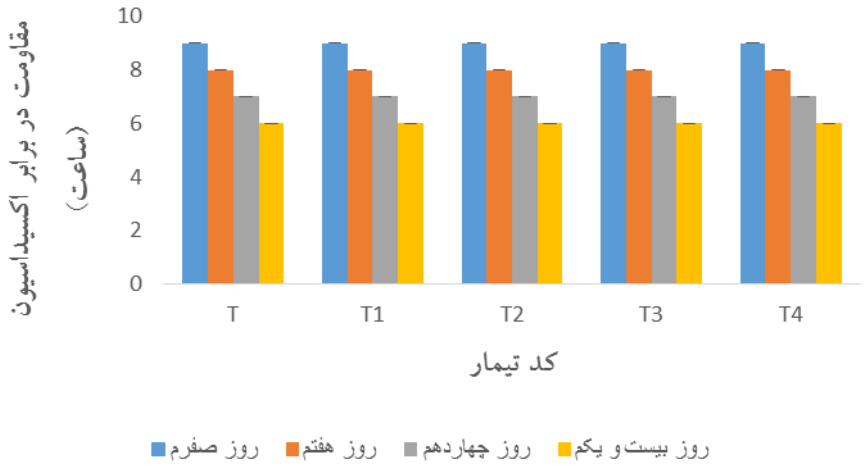
Figure 3- Comparison of average treatment interaction * Storage time on acidity of probiotic pasteurized butter treatments

۳-۷ نتایج ارزیابی مقاومت در برابر اکسیداسیون

تاثیر زمان نگهداری در مقاومت در برابر اکسیداسیون در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار بود ($p\leq$ ۰/۰۵). اما تاثیر تیمار و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری برمیزان مقاومت در برابر اکسیداسیون تیمارهای کره پاستوریزه معنی دار نبود($p\leq$ ۰/۰۵). با توجه به نمودار ۴ ملاحظه شد که اختلافات معنی داری بین میزان مقاومت در برابر اکسیداسیون در زمان های مختلف نگهداری وجود داشت و با افزایش مدت زمان نگهداری میزان مقاومت در برابر اکسیداسیون به طور معنی داری افزایش یافت($p\leq$ ۰/۰۵). بالاترین میزان مقاومت در برابر اکسیداسیون کره پاستوریزه به روز صفرم و کمترین میزان مقاومت در برابر اکسیداسیون به روز بیست و یکم نگهداری تعلق داشت($p\leq$ ۰/۰۵). توانایی روغن در مقابل اکسیداسیون تحت عنوان پایداری اکسیداتیو روغن بیان می شود. وضعیت اکسیداسیون در ۱۱۰ درجه سانتیگراد بررسی گردید پایان زمان مقاومت به اکسید شدن زمانی است که به علت تجزیه اسید های کربوکسیلیک حاصل از اکسیدشدن لیپید و جذب شدن آن در آب دیونیزه هدایت ویژه یک افزایش سریع را نشان می دهد. قابل ذکر است که تمام نتایج حاصل از آزمون رنسیمت، نتایج حاصل از آزمون پراکسید را تایید کردند. نتایج این آزمون با نتایج تیموری و همکاران در سال ۱۳۹۰، مطابقت داشت. همچنین با نتایج بوآزیز[۱] و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز مطابقت داشت. شاخص پایداری اکسایشی روغن به میزان گسترده ای جهت ارزیابی و پیش بینی پایداری اکسیداتیو روغن ها توسط دستگاه رنسیمت مورد استفاده قرار می گیرد. این آزمون بر اساس اندازه گیری ضریب هدایت الکتریکی آب ضمن تجمع ترکیبات فرار

[۱] Bouaziz et al

حاصل از اکسایش روغن به ویژه اسیدهای کربوکسیلیک تحت شرایط اکسایش تسریع یافته انجام می شود و زمان پایداری روغن در یک دمای معین گزارش می شود. با افزایش میزان استفاده از میکروکپسول های آلژینات میزان عددپراکسید و همچنین میزان مقاومت در برابر اکسیداسیون با افزایش میزان درصد آلژینات به طور معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد کره پاستوریزه کاهش یافت.



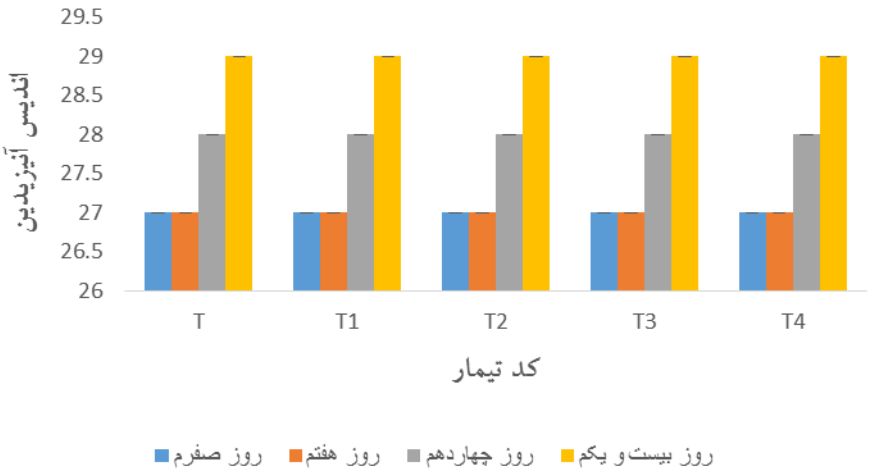
نمودار ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار * زمان نگهداری بر میزان پایداری در برابر اکسیداسیون تیمارهای کره پاستوریزه پروبیوتیک

Figure 4 - Comparison of the mean interaction of treatment - storage time on the degree of stability against oxidation of probiotic pasteurized butter treatments

۳-۸ نتایج ارزیابی اندیس آنیزیدین

تاثیر زمان نگهداری در میزان اندیس آنیزیدین در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار بود ($p\leq$ ۰/۰۵). اما تاثیر تیمار و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری برمیزان اندیس آنیزیدین تیمارهای کره پاستوریزه معنی دار نبود($p\leq$ ۰/۰۵). با توجه به نمودار ۵ ملاحظه شد که اختلافات معنی داری بین میزان میانگین اندیس آنیزیدین تیمارهای کره پاستوریزه در طی زمان نگهداری بیست و یک روز وجود داشت به طوری که کمترین میزان اندیس آنیزیدین به روز صفرم نگهداری و بالاترین آن نیز به روز بیست و یکم نگهداری تعلق داشت($p\leq$ ۰/۰۵). با توجه به نمودار ۵ نیز ملاحظه شد که اختلافات معنی داری بین میزان اندیس آنیزیدین تیمارهای کره پاستوریزه با افزایش مدت زمان نگهداری وجود داشت($p\leq$ ۰/۰۵). عدد پراکسید به تنهایی مشخص کننده اکسیداسیون روغن نمی باشد زیرا این عدد شاخصی از وجود محصولات اولیه اکسیداسیون است و تولید محصولات ثانویه را مشخص نمی کند . به دلیل تجزیه هیدروپراکسیدها در

دمای بالا و تشکیل ترکیبات ثانویه مثل آلدهیدها وجود آزمونی نظیر تعیین اندیس آنیزیدین که شاخصی از توسعه اکسیداسیون می باشد ضروری به نظر می‌رسد. این اندیس برای اندازه گیری مقدار ترکیبات ثانویه اکسیداسیون کربونیلی اشباع و غیر اشباع با وزن مولکولی بالا شامل آلفا و بتا – آلکنال‌ها (به طور کلی ۲ آلکنال‌ها و ۲و ۴ آلکا دی ان‌ها) در چربی‌های حیوانی و روغن‌های نباتی به کار می‌رود؛ به طوری که این ترکیبات کربونیلی در روغن با معرف p آنیزیدین تحت شرایط اسیدی واکنش می‌دهند.افزایش اندیس آنیزیدین نشان دهنده توسعه واکنشهای خود به خودی و افزایش محصولات ثانویه حاصل از تجزیه هیدروپراکسیدها و ترکیبات کربونیل دار در طول زمان نگهداری میباشد. همچنین احتمال انجام واکنشهای میلارد و مشابه میلارد در دماهای بالا و در زمان طولانی و غلظت های بالای عصاره وجود دارد و ترکیبات فوق میتوانند معرف آنیزیدین را مهار کرده و باعث ایجاد خطا در شدت جذب طول موج شده و در نتیجه ممکن است اندیس آنیزیدین را بیشتر نشان دهد. با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی آلژینات در کاهش میزان عدد پراکسید تیمارهای کره پاستوریزه، میزان اندیس آنیزیدین تیمارهای کره پاستوریزه نیز به طور معنی داری با افزایش میزان غلظت استفاده از میکروکپسول های آلژینات به طور معنی داری کاهش یافت.ویتامین D نیز با دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی باعث کاهش میزان اندیس آنیزیدین می شود. در این راستا نیز تحقیقات مشابهی نیز وجود داشت. نامی خسمخی و همکاران (۱۳۹۵) در اثرات ضد اکسیداسیونی پوشش خوراکی آلژینات سدیم به همراه ویتامین C برکیفیت فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان در خلال نگهداری در یخچال نیز به اثرات آنتی اکسیداسیونی پوشش آلژینات سدیم در ممانعت از افزایش عدد آنیزیدین اشاره نمودند که با نتایج تحقیق حاضر در توافق بود.



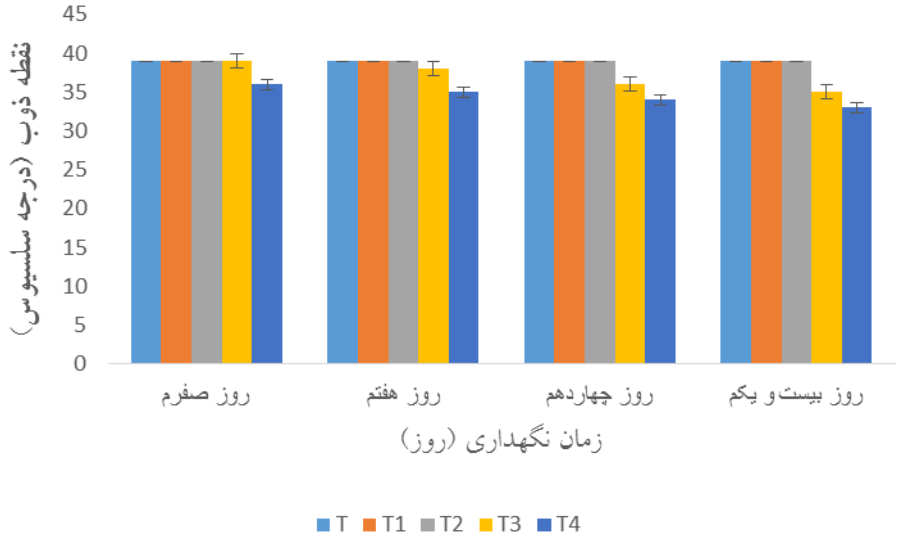
نمودار ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار * زمان نگهداری بر اندیس آنیزیدین تیمارهای کره پاستوریزه پروبیوتیک

Figure 5 - Comparison of the mean interaction of treatment- storage time on anisidine index of probiotic pasteurized butter treatments

۳-۹ نتایج ارزیابی نقطه ذوب

تاثیر تیمار، زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری در میزان نقطه ذوب در سطح ۰/۰۵ درصد معنی دار بود ($p\leq$ ۰/۰۵) با توجه به نمودار ۶ ملاحظه شد که اختلافات معنی داری بین میزان میانگین نقطه ذوب تیمارهای کره پاستوریزه با افزایش میزان استفاده از میکروکپسول های آلژینات وجود داشت ($p\leq$ ۰/۰۵). همچنین در طی زمان نگهداری بیست و یک روز بین میزان نقطه ذوب تیمارهای کره پاستوریزه اختلافات معنی داری وجود داشت به طوری که بالاترین میزان نقطه ذوب به روز صفرم نگهداری و کمترین آن نیز به روز بیست و یکم نگهداری تعلق داشت($p\leq$ ۰/۰۵). با توجه به نمودار ۶ نیز ملاحظه شد که اختلافات معنی داری بین میزان نقطه ذوب تیمارهای کره پاستوریزه با افزایش مدت زمان نگهداری وجود داشت($p\leq$ ۰/۰۵). نقطه ذوب درجه حرارتی است که در آن فاز جامد و فاز مایع با یکدیگر در حال تعادل هستند. بین نقطه ذوب و ساختمان مولکول یک ماده ارتباط وجود دارد. به طور تقریب می شود پیش بینی کرد که اجسام با مولکولهای متقارن در دمای بالاتر ذوب می شوند تا آنهایی که ساختمان با تراکم کمتری دارند. از آن جایی که دارای استفاده از میکروکپسول ها تقارن ساختاری کره پاستوریزه را به هم می زند، لذا استفاده از آن در فرمولاسیون می تواند به طور معنی داری بر روی میزان نقطه ذوب تاثیر گذاشته و آن را کاهش دهد. از این رو با افزایش میزان استفاده از میکروکپسول های آلژینات به طور معنی داری نقطه ذوب کاهش یافت. ناخالصیهای جزئی نقطه ذوب را به طور قابل ملاحظه ای پایین می آورند، هرچه مقدار ناخالصی بیشتر باشد نقطه ذوب کمتر می شود. از نزول نقطه ذوب که در اثر ورود ناخالصی در ترکیب خالص به وجود می آید می توان در شناسایی ترکیب استفاده کرد. از آن جا که میکروکپسول های آلژینات و همچنین ویتامین D در فرمولاسیون کره پاستوریزه به جهت نداشتن ماهیت اسید چرب عموما یک ناخالصی محسوب می شود بنابراین به طور معنی داری می تواند باعث کاهش نقطه ذوب در کره پاستوریزه شود به طوری که بالاترین میزان نقظه ذوب متعلق به سطوح صفر و شاهد و بالاترین آن نیز به سطوح ۴ درصد میکروکپسول های آلژینات موجود در کره پاستوریزه می باشد. زمان نگهداری نیز به طور معنی داری بر روی میزان نقطه ذوب تیمارهای کره پاستوریزه تاثیر داشته است. از آن جایی که دارا بودن نقطه ذوب بالا مستلزم دارا بودن ساختار مولکولی منسجم و منظم می باشد با گذشت زمان نگهداری تغییراتی در نظم و پایداری ساختار ماده به جهت تغییرات محیطی اعم از هیدراسیون ، اکسیداسیون و یا توزیع هر چه بیشتر ناخالصی های موجود در ساختار ماده به وجود می آید که بر روی نقطه ذوب تاثیر گذار است. از این رو اثرات متقابل این دو فاکتور نیز بر روی نقطه ذوب کره تاثیر داشته و در سطوح ۴ درصد میکروکپسول های آلژینات و زمان نگهداری ۲۱ روز شاهد کمترین میزان نقطه ذوب را در بین سطوح مورد بررسی نشان داد. همچنین تحقیقات ترکاشوند و موسوی پور (۱۳۹۱) نیز در بررسی تولید امولسیون مضاعف برای

افزایش پایداری کره ی کم چرب نیز دریافتند که استفاده از ترکیبات پلی ساکارید با عملکرد مشابه چربی در درصدهای بالای جایگزینی نقطه ذوب کره را به طور معنی داری کاهش می دهند که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت نشان داد.



نمودار ۶ مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار * زمان نگهداری بر میزان نقطه ذوب تیمارهای کره پاستوریزه پروبیوتیک

Figure 6 Comparison of the mean interaction of treatment - storage time on the melting point of probiotic pasteurized butter treatments

۳-۱۰ نتایج ارزیابی جمعیت کپک و مخمر

تاثیر تیمار، زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری در میزان جمعیت کپک و مخمر تیمارهای کره پاستوریزه به طور معنی داری تاثیر گذار است ($p\leq$ ۰/۰۵). با توجه به نمودار ۷ مشاهده شد میزان جمعیت کپک و مخمر در تیمارهای دارای میکروکپسول های آلژینات اختلافات معنی داری با تیمار شاهد نشان داد اما بین تیمارهای دارای میکروکپسول های آلژینات اختلافات معنی داری در میزان جمعیت کپک و مخمر مشاهده نشد($p>$۰/۰۵). با توجه به نمودار ۷نیز اختلافات معنی داری در میزان جمعیت کپک و مخمر در طی زمان نگهداری وجود داشت و با افزایش مدت زمان نگهداری تیمارهای کره پاستوریزه میزان جمعیت کپک و مخمر با افزایش معنی داری مواجه بود($p\leq$ ۰/۰۵). با توجه به نمودار ۷ اختلافات معنی داری بین میزان جمعیت کپک و مخمر در طی زمان های مختلف نگهداری در تیمارهای دارای میکروکپسول های آلژینات وجود داشت($p\leq$ ۰/۰۵). رشد و بقاء باکتری ها در مواد غذایی به عوامل غذایی به عوامل متعدد بیرونی مانند فلور باکتریایی ،درجه حرارت ، افزودنی هایی که در پروسه تهیه مواد غذایی استفاده می شود و نیز عوامل داخلی ترکیبات ماده غذایی، بستگی دارد. آلژینات سدیم ترکیب غیر سمی و از نظر بیولوژیکی ایمن

است و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی میباشد و از طرفی اثر ضد میکروبی بر انواع میکروارگانیسم ها دارد. مخمرها و کپک ها حساسیت زیادی به این ماده دارند و پس از آنها باکتری های گرم مثبت و گرم منفی حساسیت زیادی به این ماده دارند. در طی زمان نگهداری با تکثیر باکتری های پروبیوتیکی و ایجاد اسیدیته بالا این ترکیبات در محیط زمینه برای فعالیت میکروبی نامساعد شده و باعث کاهش جمعیت آن در رقابت باکتری های پروبیوتیک می شوند . از طرفی با افزایش جمعیت باکتری های میکروبی کلی مقاومت آن ها در برابر اسید لاکتیک واسید استیک و ترکیبات اسیدی حاصل از تخمیر کره پاستوریزه توسط باکتری ها و افزایش رنسیدیتی اسیدهای چرب، اسیدیته افزایش یافته و نهایتا به طور معنی داری در طی زمان نگهداری افزایش می یابند. اما در روزهای ابتدایی (صفرم و پانزدهم) باکتری های پروبیوتیک ترکیبات ضد میکروبی مانند باکتریوسین ها نیز ترشح می کنند که باعث کاهش جمعیت فلور میکروبی کلی نیز می شود.نتایج تحقیقات رضا زاده و همکاران (۱۳۸۹) نیز در بررسی رشد میکروب های پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در شیر نیز نشان داد که ترکیبات ضد میکروبی ناشی از فعالیت باکتری های پروبیوتیک دارای اثرات مهار کنندگی بر روی فلور میکروبی شیر سویا می باشد که با نتایج تحقیق حاضر نیز در توافق بود.

نتیجه گیری کلی

آلژینات محافظ خوبی برای پروبیوتیک های ریزپوشانی شده در شرایط روده ای است. اما در pH پایین پایداری نسبتا اندکی دارد و در شرایط اسیدی نیز حل می شود. هم چنین در حالت تک لایه پوشش آلژینات میکروکپسول ها متخلخل است. این نقص ها را می توان با مخلوط کردن آلژینات با دیگر ترکیبات پلیمر و پوشش دادن با دیگر ترکیبات برطرف کرد.در مجموع، این مطالعه نشان داد که ریز پوشانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بر روی با آلژینات کلسیم باعث افزایش زنده مانی پروبیوتیک مذکور در طی نگهداری کره پاستوریزه میگردد و با توجه به بی هوازی بودن بیفیدوباکتریوم بروی یک محافظ خوب برای سلول های باکتری در مقابل اکسیژن میباشد، چرا که در قسمت های مختلف تولید کره در اثر همزدن حباب های هوا وارد بافت کره پاستوریزه میشوند و همچنین شکل و مورفولوژی کپسول های تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد تایید قرار گرفت و ذرات نشاسته روی سطوح کپسول ها مشاهده شدند و پذیرش حسی محصول با وجود این پوشش مثبت گزارش شد. همچنین پیشنهاد می شود تا از سایر روش های انکپسولاسیون و یا سوش های دیگر باکتری پروبیوتیک، همچنین پوشش ها و راه های رهایش دیگر جهت پروبیوتیک کردن کره پاستوریزه استفاده شود.

منابع **References**

بی نام،۱۳۷۳. استاندارد ملی ایران شماره۴۱۷۹. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ، کره پاستوریزه: ویژگیها و روشهای آزمون ها

بی نام،۱۳۷۷. استاندارد ملی ایران شماره۴۱۷۹. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.اندازه گیری عدد پراکسید در روغن وچربی های خوراکی

بی نام،۱۳۸۳. استاندارد ملی ایران شماره۴۱۷۸. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.چربی ها وروغن های خوراکی اندازه گیری اسیدیته

بی نام،۲۰۱۱. استاندارد فدراسیون بین المللی لبنیات شماره۷۴. فدراسیون بین المللی لبنیات(IDF). اندازه گیری عدد پراکسید .

برزگر ح ، کرباسی ا ، جمالیان ج ، امین لاری م. ۱۳۸۷. بررسی امکان استفاده از کیتوزان به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در سس مایونز، علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ، سال دوازدهم ، شماره ۴۳ (ب) ،۳۷۰-۳۶۱.

پاک ترمنی م، احسانی ع، قجربیگی پ. ۱۳۹۵. بررسی تاثیر بکارگیری پوشش غذایی آلژینات سدیم حاوی آلفا توکوفرول در افزایش ماندگاری گوشت ماهی، فصلنامه علوم و صنایع غذایی شماره ۶۱،دوره ۱۳، ص ۲۴-۱۷.

سهراب وندی س، مال گنجی ش، ایوانی م.ج ، خسروی دارانی ک. ۱۳۹۱. بررسی قابلیت‌زیستی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* طی نگهداری یخچالی در ماءالشعیر،جلد ۷ شماره ۵، ص ۸۷-۹۵.

شهبازیان ح و شهبازیان ح.ا . ۱۳۸۴. مسمومیت با ویتامین D3۲۰۲۱/۱۰/۲۰، تظاهر با نارسایی شدید کلیه . مجله غدد درون ریز و متابولیسم ایران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید بهشتی، دوره هفتم، شماره ۳، ص۲۶۸-۲۶۳.

راست منش ر، ۱۳۸۷، غنی سازی مواد غذایی با ریز مغذی ها ، نشر علوم کشاورزی،۱۳-۲۷.

رضایی مکرم ر، مرتضوی س.ع، حبیبی نجفی م.ب، شهیدی ف، خمیری م.۱۳۸۷. اثر میکروانکپسولاسیون آلژینات کلسیم برقابلیت زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC 1643 در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره ۷ ، شماره ۲، ص ۶۰-۵۱.

وثوق ا .ص ، خُمیری م ، کاشانی نژاد م ، جعفری س.م. ۱۳۸۸. ماندگاری بیفیدوباکتریوم لاکتیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در دوغ حاوی عصاره کاکوتی، فصلنامه علوم و صنایع غذایی دوره ۶، شماره ۴،ص ۸۵-۷۷.

طلوعی ه، عارف حسینی س.ر، هاشمی تولون س.ح، سادات اجتهد ه. ۱۳۹۲. تاثیر رشد باکتری های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در سطوح ویتامین ب ۲ و ب ۳ موجود در ماست به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا طی دوره یخچال گذاری، علوم غذایی و تغذیه ، سال یازدهم، شماره ۱، ص ۲۰-۱۵.

کاظمی گورجی م، عباسی ح.ا، روزبه نصیرایی ا، میلانی ا. ۱۳۹۳.اثر میکروانکپسولاسیون بر زنده مانی باکتری پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط شبیه سازی شده معده و روده، نشریه پژوهشهای صنایع غذایی/ جلد ۴۲ شماره ۳/ سال ۳۳۳۳، ص ۴۷۲-۴۶۳.

قبادی دانا م و رشنوادی ط.۱۳۹۵. ارزیابی اثر ریزپوشانی دولایه با آلژینات کلسیم بر زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طی دوره نگه داری آب گوجه فرنگی، فصلنامه فناوری های نوین غذایی، سال چهارم، شماره ۱۴، ص ۱۶۰-۱۵۱.

مرحمتی زاده م.ح، رفعت جو ر، فرخی ع، کارمند م، رضا زاده س. ۱۳۸۸. مطالعه تاثیر عصاره سویا بر افزایش رشد باکتری های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و بیفیدوباکتریوم در شیر و ماست پروبیوتیک، پاتوبیولوژی دامپزشکی، سال اول، شماره ۱، ص ۲۸-۲۳.

محمدی ج، میردامادی س، جوانمرد م، صفوی م، بصیری ع.ر.۱۳۹۵. اثر ریزپوشانی بر قابلیت زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط شبیه سازی شده معده و روده و تیمار حرارتی. فصلنامه فناوری های توین غذایی، سال چهارم، شماره ۱۳، ص ۴۳-۳۱.

عزیزانباری، چ.، قنبرزاده، ب.، همیشه کار، ح . و حسینی، م.ی.، ۱۳۹۲. نانو کمپلکسهای ژلان-کازئینات به عنوان حامل اسیدهای چرب امگا-۳: بررسی اندازه ذرات، رئولوژی و کارایی انکپسوالسیون. نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ۲(۵): ۴۲-۱۹.

همایونی راد ع، نوروزی ش، اصغری جعفرآبادی م.ا. ۱۳۹۳. اثر پودر شیر سویا بر ویژگی های فیزیکی ، شیمیایی ، میکروبی و حسی بستنی سویای پروبیوتیک تخمیری، نشریه پژوهش های صنایع غذایی ، جلد ۲۴، شماره یک، ص ۲۸-۱۹.

یگانه زاد س، مظاهری طهرانی م , شهیدی ف، زایرزاده ا .۱۳۸۷. بررسی اثر شیر سویا بر زنده ماندن باکتری های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ویژگی های فیزیکوشیمیایی و ارگانولپتیکی ماست پروبیوتیک ، علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۶(۱) : ص۱۷۴-۱۶۵.

Buruleanu, L.. C. L. Nicolescu. D. Avram. M. G. Bratu and Manea l.2009. Survival of probiotic bacteria during lactic acid fermentation of vegetable juices. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 15(1):132-139.

Ding, W. K. and N. P. Shah.2008. Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. *International Food Research Journal*: 15(2): 219-232.

Egan, H., Kirk, R. S., & Sawyer, R. 1981. Oils and fats. In H. Egan (Ed.), Pearson's chemical analysis of foods. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone.

Eratte D, McKnight S, Gengenbach T.R., Dowling K, Barrow C. J, Adhikari B. P.2015. Co-encapsulation and characterization of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates, *journal of functional foods*: 35(3):1-11.

Erkaya T, Ürkek B, Dogru Ü, Çetin B, Mustafa S¸ engül .2015.Probiotic butter: Stability, free fatty acid composition and some quality parameters during refrigerated storage, *International Dairy Journal*: 49: 102-110.

Ilyasoglu H.N.Sedef. 2014. Nano encapsulation of EPA/DHA with sodium caseinate gum Arabic, *LWT - Food Science and Technology*. 56: 461-468.

Pedroso D.L., Dogenski M., Thomazini M., Heinemann R.J.B., Favaro-Trindade C.S.2013. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis subsp*. Lactis and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology, *Brazilian Journal of Microbiology:* 44, 3, 777-783.

Nadeem, M., M. Abdullah, A. Khalique, I. Hussai, A. Mahmud, and S. Inayat. 2013. The Effect of Moringa oleifera Leaf Extract as Antioxidant on Stabilization of Butter Oil with Modified Fatty Acid Profile.*Journal of Agriculture and Sciences Technology*.15: 919-928.

Rao, A. V., Shiwnarain, N., & Maharaj, I., 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. Canadian Institute ofconditions and in yoghurt, *International Dairy Journal*, 14, (6), 505-515

Wichchukit.S.. M.H. Oztop. K.L. McCarthy and McCarthy M.J. 2013.Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. *Food Hydrocolloids* 33:66-73.

Feasibility of vitamin D and *Bifidobacterium Lactis* loaded-alginate microcapsules for producing probiotic / vitaminated butter

Sahar Saraghi[1], Peyman Rajaei [2]*, Kaveh Zargar[3]

Received: 17 July, 2021 Accepted: 18 Aug, 2021

Abstract

One of the new ways to improve probiotic bacteria persistence in food products, as well as the survival of bacteria while passing the digestive tract, is to microbialize the probiotic cells in order to safely transport them to the large intestine. The aim of this study was to determine the effect of microsphere on the survival of *Bifidobacterium lactis* during pasteurized butter storage period. In this study, alginate microcapsules containing *Bifidobacterium lactis* were used in butter formulation with values of 1, 2, 3 and 4 cc. Morphological, particle size, and survival tests were performed in similar conditions in the intestine and stomach. Pasteurized butter tests also included acidity assessment, peroxide value, anisidine index, oxidation resistance, melting point, survival rate of *Bifidobacterium lactis*, as well as mold and yeast populations in three replications. Sensory evaluation including (flavor, flavor, flavor, perfume, oral sensation and general acceptance) was performed by ten evaluated trained butterfly factory using a 5-point Hedonic method. The results were analyzed by two-way ANOVA and SAS software version 9.4. Non-parametric Kruskal-Wallis Mann-Whitney test was used to assess sensory results. The results showed that alginic microcapsules with a soft and average surface area had a particle size of 300 to 400 microns, and the maximum amount of bacteria in which the bacteria had fallen was 3/3 ± 0.05. Using alginate microcapsules, the index of peroxide, anisidine index decreased significantly as antioxidant properties of alginate as well as vitamin D, and the index of oxidation resistance as well as acidity significantly decreased. Also, by increasing the amount of micro-capsule application, the melting point of butter treatments decreased and the amount of mold and yeast was significantly decreased. Compared to the pasteurized trifoliate with free *Bifidobacterium lactis*, micro capsulation improved the *Bifidobacterium lactis* survival rate by two and a half cycles improved logarithmic conditions. Finally, Pasteurized butter treatment with 3 cc of alginate microcapsules was selected as the optimum treatment.

Keywords: Probiotic butter, Vitamin D, *Bifidobacterium lactis*, Probiotic survival

1 Msc., Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2 Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

3 Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

* **Corresponding author: prajaei@gmail.com**