

(مقاله پژوهشی)

بررسی تاثیر نانو لیپوزوم ها و باکتری های میکروپوششی در سطوح متفاوت میکروانکپسوله برزنده مانی باکتری ها طی ذخیره سازی

نعیمه کارآموز^۱، علی محمدی ثانی^{۱*}، الهام مهدیان^۱، اکرم آریان فر^۱

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۲

DOI: [10.30495/jfst.2021.1934534.1730](https://doi.org/10.30495/jfst.2021.1934534.1730)

چکیده

با توجه به این که در فرآیند تولید پنیر، آب خارج شده از آن در قالب نام آب پنیر دارای ارزش بیولوژیکی بالا، مقادیر قابل توجهی ویتامین و مواد معدنی از دست می دهد و همچنین با ورود آب پنیر به فاضلاب مشکلات زیادی در آلودگی محیط زیست ایجاد خواهد شد و سیستم تصفیه فاضلاب برای تصفیه آب پنیر هزینه های زیادی را به بار می آورد. بنابراین در یک طرح جدید و نو تولید نوشیدنی پروبیوتیک انکپسوله بر پایه آب پنیر به همراه نانولیپوزوم های^۱ اسانس های بومی را در این پژوهش فرمولاسیون و بهینه سازی می نماید، علاوه بر این مزایای تولید این نوشیدنی می تواند در سطح کشور مطرح و اجرا گردد. پس از تعیین ویژگی های آب پنیر مورد استفاده، آماده سازی، فعال سازی و پوشش دهی میکروبی باکتری های پروبیوتیک، تولید و تعیین ویژگی های نانولیپوزوم های اسانس نعنا و آماده سازی نوشیدنی پروبیوتیک بر اساس آب پنیر و ویژگی های آن مورد مطالعه قرار گرفت. اثر نانولیپوزوم ها و باکتری های میکروپوششی در سطوح متفاوت بازدهی میکروانکپسوله شدن، تعیین اندازه ذره، مورفولوژی میکروکپسول ها، پتانسیل زتا^۲ و قابلیت بقا (تعداد باکتری های پروبیوتیک و بقا در شرایط روده و معده ای- روده ای در طول ذخیره سازی یخچالی (۲۴ ساعت، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۶۰ روز) با استفاده از روش طراحی آزمایشی و روش سطح پاسخ ارزش یابی شد. بازدهی انکپسوله کردن برای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس^۳ La-5 و بیفیدوباکتریوم انیمالیس^۴ BB-12، به ترتیب برابر ۸۲/۵ و ۸۳/۳۳ درصد بود. اندازه ذره ۹۹/۷ درصد میکروکپسول های پر شده با B. انیمالیس- BB-12 و ۹۸/۱ درصد میکروکپسول های پر شده با L. اسیدوفیلوس La-5 کمتر از ۱۰ میکرومتر بود. تصاویر SEM میکروکپسول ها نشان داد همه کپسول های تولید شده شکل نامنظمی داشتند. میانگین اندازه ذره نانولیپوزوم های اسانس نعنا ۱۹۴ نانومتر بود. بقای باکتری های پروبیوتیک در طول نگهداری و ذخیره سازی پایداری خوبی نشان دادند.

واژه های کلیدی: نانولیپوزوم های اسانس نعنا، میکروانکپسوله لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5، میکروانکپسوله بیفیدوباکتریو

انیمالیس- BB-12، نوشیدنی آب پنیر، تکنیک امولسیون سازی/ژلاسیون داخلی^۵

۱- مقدمه

طول فراوری و نگهداری محصولات غذایی و عبور از سیستم هاضمه تا انتقال ایمن به روده بزرگ است (۲۹). انتخاب جنس کپسول به شرایط اسیدی معده، آنزیم‌های هیدرولیتیک، نمک‌های صفرا در روده ک و چک پیش از رسیدن به روده بزرگ و نوع محصول بستگی دارد (۲۸). پلی‌ساکاریدهای تجاری متنوعی از جمله سلولز، آلژینیک اسید، صمغ عربی، دکستران، پکتین و کاراگینان^۳ به منظور میکروانکپسوله کردن باکتری‌های پروبیوتیک به کار رفته‌اند. کلسیم آلژینات به صورت گسترده، بویژه با باکتری‌های اسید لاکتیک، به این منظور به کار رفته و دارای مزیت‌های فراوان از جمله عدم سمیت و بی‌ضرر بودن برای بدن انسان، قیمت مناسب آن و سهولت در استفاده است (۳۱ و ۳۰). امولسیون، اکستروژن، خشک کردن پاششی^۴، خشک کردن انجمادی، هم‌رسوبی^۵، پوشش‌دهی به روش بستر سیال و جداسازی فاز از جمله روش‌هایی هستند که به منظور انکپسوله کردن به کار می‌روند. برخی از این روش‌ها می‌توانند اثر مستقیم بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک انکپسوله داشته باشند (۳۲). طعم نامناسب به دلیل محتوای بالای مواد معدنی در آب پنیر از جمله مشکلات اصلی است که در تولید نوشیدنی‌های مبتنی بر آب پنیر با آن‌ها روبه‌رو هستیم (۱۱). برخی اجزای گیاهی علاوه بر ویژگی‌های نگهدارنده گی خود، ویژگی‌های طعم‌دهی نیز دارند. نعنا گیاهی چندساله با رایحه معطر قوی است. نعنا به عنوان محرک هاضمه و معده شناخته شده و در درمان سرماخوردگی و التهاب برونشیت در پزشکی سنتی نیز کاربرد دارد و اساس آن نیز امروزه کاربرد گسترده‌ای به عنوان طعم‌دهنده در انواع غذاها، لوازم آرایشی، شیرینی‌پزی، آدامس جویدنی، خمیر دندان و صنایع دارویی دارد (۱۰). با این حال، از آنجایی که دارای زنجیره کربن غیراشباع است، به سادگی با نور و گرما اکسید می‌شود (۸). همچنین حلالیت پایین آن در آب، کاربرد آن را در سیالات بیولوژیکی محدود می‌کند. از آنجایی که این شرایط از جذب آن جلوگیری می‌کند، دسترسی فیزیکی آن کاهش می‌یابد (۳۶). روش

تحقیقات درباره ضایعات غذایی با توجه به افزایش رشد جمعیت و نیاز بیشتر به غذای سالم، افزایش حجم تولید، مشکلات زیست‌محیطی و محتوای مغذی بالای محصولات جانبی، امری ضروری است تا به شیوه مفید از آن‌ها استفاده شود (۷). آب پنیر مایعی زردرنگ است که طی تولید پنیر یا کازئین^۱ دورریخته می‌شود. از آنجایی که این مایع حاوی مواد مغذی سودمند از جمله نمک‌ها، ویتامین‌ها، لکتوز، آنزیم‌ها و پروتئین‌های غنی از آمینواسیدهای ضروری است (β-لاکتوگلوبین، α-لاکتالبومین، آلبومین سرم گاو، ایمونوگلوبین‌ها، لاکتوفرین، سیستین و متیونین^۲) (۹)، محیط مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌ها محسوب می‌شود. مشکل اساسی ایجاد آلودگی آن است. چندین مطالعه درباره استفاده مجدد از آب پنیر به عنوان غذایی مناسب و تولید نوشیدنی مغذی انجام شده است. چهار نوع اصلی نوشیدنی آب پنیر شامل مخلوط آب پنیر (فراوری شده یا فراوری نشده) با میوه یا آب سبزی، نوشیدنی‌های کنسانتره (تخمیر شده یا تخمیر نشده)، نوشیدنی‌های کربناتی و نوشیدنی‌های الکلی است (۱۱ و ۳۰). استفاده از پروبیوتیک‌ها در محصولات مبتنی بر آب پنیر ممکن است عملکرد آن را افزایش دهد. توسعه محصولات لبنی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک تمرکز اصلی بخش صنعتی است و تولید مواد غذایی حاوی سویه‌های پروبیوتیک خاص که غلظت کافی از سلول‌های زنده را در طول عمر مفید حفظ می‌کند، به طور کلی یک چالش تکنولوژیکی است (۲۳). باکتری‌های مثل لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریم از رایج‌ترین گونه‌های باکتریایی هستند که به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شوند. یکی از مشکلات اصلی تولید و فراوری محصولات پروبیوتیک، زنده‌مانی (بقای) کم باکتری‌های پروبیوتیک به دلیل حساسیت به شرایط دشوار در محصولات غذایی و شرایط نامناسب معده‌ای روده‌ای است (۳۵). تکنولوژی میکروانکپسوله کردن یکی از روش‌های جدید افزایش بقای باکتری‌های پروبیوتیک در

3. Carrageenan
4. Spray Drying
5. Coacervation

1. Casein
2. β-lactoglobulin, α-lactalbumin, Bovine Serum Albumin, Immunoglobulins, Lactoferrin, Cysteine, and Methionine

میکروانکپسوله کردن مواد آروماتیک با حفاظت از آن ها در برابر نور، گرما، اکسیژن، فراریت آن ها را کاهش می دهد (۲۴). امروزه لیپوزوم ها کاربردهای متنوعی دارند. زیست سازگاری و قابلیت انتقال ترکیبات آبدوست و چربی دوست، آن ها را به یکی از مطلوب ترین حاملین در سیستم های مدرن تبدیل کرده است. کارایی به دام انداختن ترکیبات فعال در آن ها یا به اصطلاح بارگیری داخل لیپوزوم ها در سنتز آن ها اهمیت زیادی دارد. اندازه ذره و توزیع اندازه ذره، پایداری و توانایی محصورسازی از جمله مهم ترین مشخصه های نانولیپوزوم ها است (۱۲ و ۲۱). مهمترین هدف تحقیق استفاده کاربردی از آب پنیر تولید شده در صنایع لبنی به شکلی سودمند می باشد. بنابراین تحقیق به بررسی خواص میکروبیولوژیکی و فیزیکی- شیمیایی نوشیدنی فراسودمند پروبیوتیک بر پایه آب پنیر که با نانولیپوزوم های اسانس نعنا فلفلی معطر شده، پس از تولید و در طی نگهداری یخچالی می پردازد. با توجه به تحقیقات فراوان در استفاده از آلژینات و کیتوسان برای پوشش باکتری ها و بدست آمدن نتایج مطلوب در این زمینه انتظار می رود بازدهی انکپسوله کردن برای باکتری های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 ب و بیفیدوباکتریوم انیمالیس BB-12) بکار رفته در این نوشیدنی میزان بالایی داشته باشد (۲۵). انتظار می رود توزیع اندازه ذره با روش امولسیون سازی کم تراز ۵ میکرومتر برای کپسول های تولیدی باشد (۲۸). بقای باکترهای پروبیوتیک انکپسوله نشده و انکپسوله در نوشیدنی ها طی دوره نگهداری یخچالی مورد مطالعه قرار می گیرد و آن چه مسلم است میزان بقای باکتری های دارای پوشش در شرایط شبیه سازی شده معده و نمک های صفراوی بالاتر از باکتری های انکپسوله نشده می باشد (۱۹).

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

سویه های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 و

بیفیدوباکتریوم انیمالیس BB-12) و آغازگر ماست (مقادیر برابر استرپتوکوکوس ترموفیلوس (حرارت دوست) و لاکتوباسیلوس دلبروکی از جنس *Bulgarius*) از شرکت دانماکی کریستن هانسن^۱ خریداری شد؛ آب پنیر (کارخانه لبنیات قوچان، ایران)، روغن دانه انگور (روغن سی گل، ایران)، اسانس نعنا (گل قطره، ایران)، کیتوسان (سولاریو^۲، ایران)، لیستن، پپسین و محلول نمکی ۰/۲ درصد وزنی (کارگیل^۳، فرانسه)، توئین^۴ ۸۰ (توئین ۸۰ سم چرن، کره جنوبی)، آگار M.R.S. (لیوفیلچم^۵، ایتالیا)، پانکراتین (سیگما-آلدریج)، محلول های بافر ۴، ۷، ۸ و اکنش دهنده فنول فتالین سدیم هیدروکسید، سولفوریک اسید، آمیل الکل، نقره نترات، ردیاب پتاسیم کرومات، سیستین هیدروکلرید، نمک صفرا، بافر فسفات (pH = ۸)، آلژینات، اسپن ۸۵، استیک اسید و پودر کلسیم کربنات (مرک آلمان) تهیه شدند.

۲-۲- آماده سازی و فعال سازی باکتری های پروبیوتیک

فعال سازی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با استفاده از محیط کشت براث MRS و فعال سازی بیفیدوباکتریوم انیمالیس در محیط کشت براث MRS (تحت شرایط هوایی) + ۰/۵ درصد سیستین هیدروکلرید (تحت شرایط بی هوایی) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد طی ۴۸ ساعت انجام شد. سلول های باکتریایی پس از سانتریفیوژ شدن در سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد برداشت شدند و نمونه ها در دو گام با آب پیتون ۰/۱ درصد استریل شسته شدند (۲۷ و ۳۳). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم پس از فعال سازی، به ترتیب در براث MRS (تحت شرایط هوایی) و براث MRS + ۰/۵ درصد سیستین هیدروکلرید (تحت شرایط بی هوایی) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. نمونه ها با محلول نمک فیزیولوژیک استریل شسته شده و به مدت ۱۵ دقیقه در سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب

1- Christian Hansen
2- Solarbio
3- Cargill
4- Tween
5- Liofilchem

۲-۴- بازدهی میکروانکپسوله شدن

یک گرم نمونه میکروانکپسوله در ۹۹ میلی لیتر محلول سدیم سیترات یک درصد وزنی (W/V) در pH ۷/۲ خشک شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. میکروانکپسوله ها به صورت کامل حل شدند و باکتری های به دام افتاده آزاد شدند (۱۰). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با استفاده از محیط کشت آگار MRS به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (۳۳) و بیفیدوباکتریوم در محیط کشت برات MRS + ۰/۵ درصد سیستین هیدروکلرید به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (برای شرایط بی هوازی) (۲۷) انکوبه شد و سپس تعداد باکتری ها شمرده شد. بازدهی میکروانکپسوله کردن (MY) برابرست با (تعداد باکتری های آزاد شده از میکروکپسول ها) / (تعداد باکتری های اضافه شده به فرمول میکروانکپسوله کردن) $\times 100$.

۲-۵- تعیین اندازه ذره

تحلیل توزیع اندازه ذره پراکنش لیزری (FRITSCH، آلمان) به منظور تعیین اندازه و توزیع ذرات تولیدی به کار رفت. میکروورشته های حاصله در آب دی یونیزه مقطر پخش شدند و قطر میانگین ذره با استفاده از نرم افزار تعیین شد (۲۲).

۲-۶- مورفولوژی میکروکپسول ها

میکروسکوپ اسکن الکترونی (SEM) برای مشاهده مورفولوژی ذرات به کار رفت. به این منظور، میکروکپسول ها با چسب دوطرفه بر روی قسمت برجسته ثابت شدند و به مدت ۲ دقیقه با Au-Pd پوشانده شدند. مشاهدات در ولتاژ شتاب دهنده ۱۷/۱۳ کیلوولت بررسی شدند (JSM 6400-Jeol، ژاپن).

۲-۷- تولید نانولیپوزوم های اسانس نعنا

۲ گرم سستین و ۲ گرم توئین ۸۰ در ۳۸ گرم آب مقطر مخلوط شد و با شیکر^۱ به مدت ۵ ساعت لرزانده شد (HA30- میکلاتز، ایتالیا) (محلول الف). در مرحله بعدی ۴ گرم اسانس نعنا به محلول الف اضافه شد و کل مخلوط به مدت ۳۰۰ ثانیه در ۴۰ کیلوهرتز (شرکت تکنولوژی تحقیقات ایرانیان

حاصله در محلول نمکی استریل به صورت سوسپانسیون در آمد و با استفاده از لوله های استاندارد مک فارلند در غلظت $2/1 \times 10^9$ CFU/گرم تعدیل شده و برای انکپسوله کردن به کار رفتند (۱۸).

۲-۳- میکروانکپسوله کردن با روش امولسیون سازی

در ابتدا همه مواد و تجهیزات به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد استریل شدند. ۵ گرم پودر کلسیم کربنات به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه، ۳/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون کلسیم کربنات به تدریج به ۵۵ میلی لیتر محلول آلژینات ۲ درصد (W/V) در حال هم زدن (۲۰۰ دور بر دقیقه، ۳۰ دقیقه) اضافه شد. ۱۰ میلی لیتر محلول همگن حاصله با ۵ گرم سوسپانسیون میکروبی ترکیب شد (۳۵۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه) (محلول الف). ۳۵ میلی لیتر روغن دانه انگور با ۰/۵ گرم اسپین ۸۵ ترکیب شد (۱۰۰ دور در دقیقه، ۵ دقیقه) محلول حاصله به تدریج به محلول الف اضافه شد (۱۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه) (محلول ب). ۱۰ میلی گرم روغن دانه انگور و ۰/۵ میلی لیتر استیک اسید مخلوط شد و به صورت قطره ای به محلول B اضافه شد تا زمانی که pH محلول حاصله به ۳/۵ رسید (۲۰۰ دور در دقیقه، ۳۰ دقیقه). محلول حاصله با استفاده از محلول نمکی بافر فسفات (PBS)، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا روغن آزاد از محصول جدا شود. در نهایت، ۱۵ میلی لیتر محلول کیتوسان ۰/۴ درصد (W/V) به صورت قطره ای حین هم زدن ۳۰ دقیقه ای با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه، به محلول اضافه شد. همزدن به مدت یک ساعت ادامه یافت تا میکروانکپسوله شدن انجام شود. باکتری های میکروانکپسوله با سانتریفیوژ به سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری شدند، سپس با محلول نمک فیزیولوژی شسته شده و به منظور تخمیر آب پنیر در محلول پپتون ۰/۱ درصد (W/V) در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۳۴).

نصیر، ایران) آوادهی شد (۱ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش). نانولیپوزوم‌های تولیدی تا زمان استفاده در بطری‌های استریل در تاریکی نگهداری شدند (۲۰).

۲-۸- توزیع اندازه ذره نانولیپوزوم‌ها

پراش لیزر دینامیک (FRITSCH، آلمان) به منظور تعیین توزیع اندازه ذره نانولیپوزوم‌های تولیدی به کار رفت. محلول حاوی لیپوزوم‌ها برای این کار با نسبت ۱ به ۱۰۰ (V/V) در آب مقطر پراکنده شد. سپس اندازه میانگین ذره براساس قطر حجمی میانگین، تعیین گردید (۲۰ و ۱۶).

۲-۹- تهیه ماست

میزان ماده خشک شیر با افزودن پودر شیر فاقد چربی به شیر دردمای ۵۰ درجه سانتیگراد تعیین شد، که این میزان براساس استاندارد ملی شماره ۱۷۵۳ ایران برابر با ۹ درصد بود. شیر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد پاستوریزه شد و تا ۴۵ درجه سانتیگراد سرد گردید. به مدت ۳ تا ۳/۵ ساعت در دمای ۴۴ درجه سانتیگراد با آغاز گر ۲/۵ درصد (W/V) انکوبه گردید تا به pH ۴/۶ رسید. نمونه‌ها به مدت ۲۸ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۷).

۲-۱۰- تخمیر آب پنیر

ابتدا آب پنیر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد پاستوریزه شد و تا دمای ۲۵ درجه سانتیگراد خنک گردید تا تخمیر شود. به مدت ۲۴ ساعت با باکتری‌های پروبیوتیک

پوششی ۲درصد (V/V) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس آب پنیر تخمیر شده تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد تا عملیات تخمیر متوقف شود (۱۳).

۲-۱۱- تحلیل آماری

شرایط بهینه تولید نوشیدنی‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) تعیین شد. نرم‌افزار Design-Expert (نسخه ۱۱) به منظور طراحی و محاسبات آماری به کار رفت. ترتیب آزمون‌ها در این نرم‌افزار به صورت تصادفی در نظر گرفته شد. تولید کننده عدد تصادفی (Random number generator) ترتیب تصادفی آزمون‌ها را تعیین می‌کند. تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) بر روی داده‌ها انجام شد و معناداری آماری در $p > 0.05$ تعیین شد. متغیرهای مستقل و ویژگی‌های مطالعه شده (پاسخ‌ها)، در جدول ۱ آمده است.

۲-۱۱-۱- تهیه نوشیدنی پروبیوتیک براساس آب پنیر

به منظور تهیه نوشیدنی، ابتدا ماست تخمیر شده و آب پنیر (حاوی هریک از باکتری‌های پروبیوتیک) با نانولیپوزوم‌های اسانس نعنا با نسبت‌هایی که در جدول ۱ آمده ترکیب و تحت فشار ۵۰ بار توسط همگن ساز یک دست شد. سپس محصولات نهایی در بطری‌های شیشه‌ای استریل قرار گرفته و تا انجام آزمون‌ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جدول ۱- متغیرهای مستقل ارزیابی شده در این مطالعه

متغیرهای مستقل	نوع متغیرها	سطح بالا	سطح متوسط	سطح پایین
ماست	عددی	۴۰	۳۰	۲۰
آب پنیر	عددی	۶۰	۵۰	۴۰
باکتری‌های پروبیوتیک	کیفی	<i>L. acidophilus La-5</i>	<i>B. animalis-BB-12</i>	

۲-۱۱-۲- سنجش پتانسیل زتا

یک میلی لیتر از نمونه های تهیه شده در ۵۰ میلی لیتر آب پراکنده شده و سپس به سلول نمونه پتانسیل سنج زتا اضافه شد (زتاسیز نانو ZAP، مالورن، بریتانیا). پتانسیل زتا در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و ۱۴۹ وات اندازه گیری شد.

۲-۱۱-۳- ارزشیابی بقای باکتری های میکروانکپسوله

یک گرم نمونه میکروانکپسوله به طور کامل در ۹ میلی لیتر محلول سدیم سیترات استریل با غلظت ۱ درصد (W/V) و pH ۷/۲، حل شد. سپس محلول حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. نمونه های نوشیدنی به صورت متناوب در آب پیتون رقیق شدند تا بقای باکتری های پروبیوتیک در طول نگهداری یخچالی بررسی شود. باکتری های زیست پذیر با استفاده از روش پور پلیت^۱ در محیط کشت آگار MRS شمرده شدند. پلیت ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 در محیط بی هوازی و بیفیدوباکتریوم انیمالیس-BB-۱۲ در محیط بی هوازی انکوبه شدند (۳۳). همه آزمایش های سلولی در نمونه های سه تایی انجام شدند.

۲-۱۱-۴- بقای باکتری های پروبیوتیک آزاد و انکپسوله در روده و مجرای معده- روده شبیه سازی شده

شیره معده شبیه سازی شده^۲ با انحلال پپسین در NaCl ۰/۲ درصد (w/v) آماده شد تا غلظت نهایی آن به ۰/۳ گرم/لیتر برسد و pH با هیدروکلریک اسید غلیظ برابر با ۲ تنظیم شد. سپس محلول حاصله استریل گردید (۴). شیره روده و معده به منظور استفاده در همان روز به صورت تازه آماده شد. هم چنین، ۱۰ میلی لیتر باکتری پروبیوتیک محبوس شده به ۱۰ میلی لیتر شیره معده شبیه سازی شده ملایم شده (۳۷) درجه سانتیگراد) اضافه شد تا بقای باکتری های پروبیوتیک انکپسوله ارزیابی شود. سپس به مدت ۶۰ دقیق ه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با هم زدن ملایم انکوبه گردید. سپس محلول حاصله به ۱۰ میلی لیتر شیره روده شبیه سازی شده اضافه شد و به مدت

۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با هم زدن ملایم انکوبه گردید. همان طور که قبل تر توصیف شد، باکتری های زنده مانده پس از هر فاصله زمانی معین با شمارش پور پلیت در آگار MRS به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد شمارش شدند (۱۴).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بازدهی انکپسوله شدن میکروکپسول ها

بازدهی انکپسوله کردن بهترین راه برای ارزشیابی تعداد مجموعه کل باکتری ها در میکروکپسول ها است. تعداد باکتری ها در ۱ گرم از هر نمونه پس از انحلال کامل کپسول و آزادسازی باکتری ها شمارش شد. بازدهی روش انکپسوله با توجه به غلظت اولیه باکتری های انکپسوله محاسبه شد. نتایج نشان داد انکپسوله کردن باکتری های هدف با روش امولسیون سازی / ژلاسیون داخلی به شیوه موثری فعالیت بالای پروبیوتیک ها را حفظ کرد. این نتایج نشان می دهد آماده سازی میکروکپسول های B. انیمالیس-BB-۱۲ و L. اسیدوفیلوس La-5 (با بازدهی ۸۲/۵ و ۸۳/۳۳ درصد) با روش امولسیون سازی به طور موثری فعالیت بالای پروبیوتیک را حفظ می کند. نتایج مشابهی توسط مونا محمود و همکاران در سال ۲۰۲۰ بدست آمد، بازدهی انکپسوله کردن لاکتوباسیلوس پلانتروم میکروانکپسوله با آلژینات را بین ۹۴-۹۸ درصد به دست آوردند (۱۵ و ۲۵).

۳-۲- تحلیل توزیع اندازه ذره میکروکپسول ها

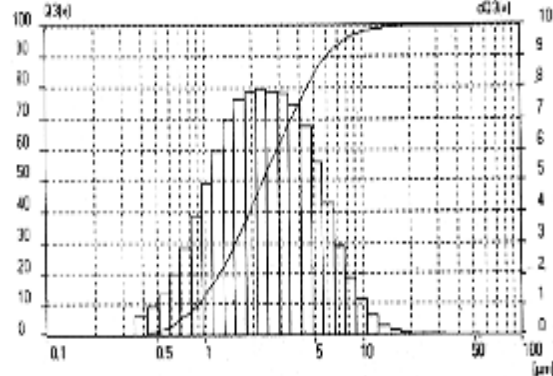
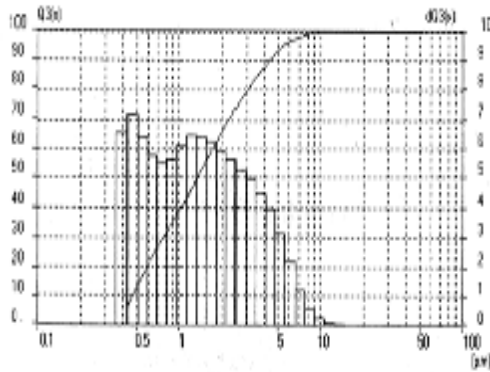
نتایج سنجش توزیع اندازه ذره میکروکپسول های پر شده با B. انیمالیس-BB-۱۲ و L. اسیدوفیلوس La-5 به ترتیب در تصویر ۱ ارائه شده است. مقایسه نمودارهای ارائه شده نشان می دهد میکروکپسول های پر شده با L. اسیدوفیلوس La-5 در مقایسه با میکروکپسول های پر شده با B. انیمالیس-BB-۱۲ دارای توزیع اندازه ذره ای میانگین بودند. در حالی که اندازه ذره میکروکپسول های پر شده با B. انیمالیس-BB-۱۲ (۹۹/۷ درصد با قطر کمتر از ۱۰ میکرومتر) کوچک تر از L. اسیدوفیلوس (۹۸/۱ درصد با قطر کمتر از ۱۰ میکرومتر) بود، همچنین تصاویر میکروسکوپی ارائه شده، اندازه ذره کمتر از ۵ میکرومتر را برای کپسول های تولیدی تایید کردند، پراسانا

1 -Pour plate

2 -Stimulated Gastric juice (SGJ)

یکنواخت شدن نوشیدنی حاصله می گردد (۲۸).

و چرالامپوپولوس در سال ۲۰۱۸ به نتایج مشابهی در این زمینه دست یافتند. توزیع اندازه ذرات کوچک منجر به

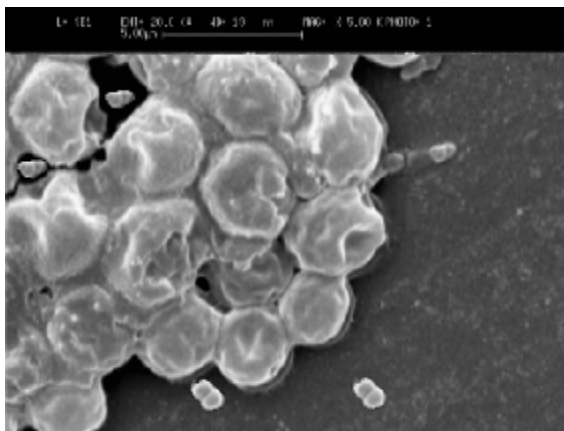


تصویر ۱- توزیع اندازه ذره میکروکپسول‌های پر شده با *L. acidophilus* La-5 و *B. animalis*-BB-12

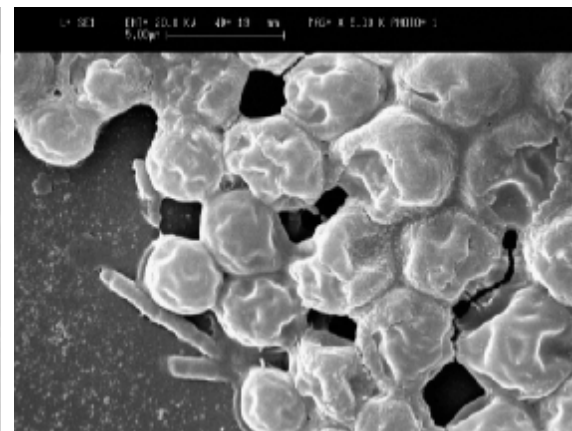
را برای کپسول‌های تولیدی تایید کردند. همچنین، میکروکپسول‌های تهیه شده به خوبی توانستند باکتری‌ها را در محیط به دام بیندازند. مشابه این گزارش توسط پیشین پراساناوچارالامپوپولوس در سال ۲۰۱۸ نیز بدست آمد (۲۸).

۳-۳- ویژگی‌های مورفولوژی میکروکپسول‌ها

تصاویر SEM میکروکپسول‌های پر شده با *B. animalis*-BB-12 و *L. acidophilus* La-5 در تصاویر الف و ب نشان داد همه کپسول‌های تولیدی دارای سطوح ناهموار بودند و تصاویر میکروسکوپی ارائه شده، اندازه کمتر از ۵ میکرومتر



a



b

تصویر ۲- میکروگراف اسکن الکترونی (الف) *B. animalis*-BB-12 و (ب) *L. acidophilus* La-5

۳۱/۵ درصد: ۲۵۵، و ۸/۲ درصد: ۲۹۵ نانومتر). نانو لیپوزومها با اندازه کوچکتر دارای پایداری بیشتری میباشند که به دلیل مقاومت بالاتر نسبت به نیروی ثقل به واسطه حرکت برآونی است. محمد حسین نشاسته گیر و همکاران در سال ۱۳۹۷ به

۳-۴- تحلیل توزیع اندازه ذره نانو لیپوزوم‌ها

توزیع اندازه ذره لیپوزوم‌های اسانس نعنا با استفاده از پراش اشعه لیزر دینامیک انجام شد. براساس این نتایج، ۹/۰ درصد ذرات لیپوزومی دارای اندازه ذره میانگین ۱۹۴ نانومتر بودند (همچنین، ۱۷/۷ درصد: ۲۰۰ نانومتر، ۴۱/۸ درصد: ۲۲۰،

اولیه حاوی ترکیبی از ۶۰ درصد آب پنیر، ۲۰ درصد ماست و ۳ درصد نانولیوزوم های اسانس نعنا و آب بود. شمارش باکتریایی نمونه های پر شده با B. animalis-BB-۱۲ انکپسوله نشده به اندازه ۱/۴۰، ۲/۱۸، ۴/۷۰ و ۶/۵۸ لگاریتم CFU کاهش یافت. این کاهش برای نمونه های پر شده با L. اسیدوفیلوس La-5 انکپسوله نشده به اندازه ۱/۴۴، ۲/۲۰، ۴/۷۱ و ۶/۶۳ لگاریتم CFU، برای نمونه های پر شده با B. animalis-BB-۱۲ انکپسوله برابر با ۰/۲۲، ۰/۴۰، ۱/۱۸ و ۴/۶۵ لگاریتم CFU و برای نمونه های پر شده با L. اسیدوفیلوس La-5 انکپسوله به اندازه ۰/۲۲، ۰/۴۰، ۱/۲۰ و ۴/۶۶ لگاریتم CFU به ترتیب در طول نگهداری یخچالی ۷، ۱۴، ۲۱ و ۶۰ روزه کاهش یافت. این نتایج نشان داد میزان بقای باکتری ها طی زمان کاهش می یابد و مقاومت باکتری های انکپسوله تا حد زیادی نسبت به باکتری های انکپسوله نشده، بهبود یافت (تصویر ۳). شیخ قاسمی و زمردی سال ۱۳۹۳ در تحقیقی تاثیر کپسوله کردن بر زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را مورد بررسی قرار داده و به نتایج مشابهی دست یافتند (۱). تحقیقات در این زمینه با روش های جدیدتر در حال گسترش است، و آنچه که از مجموعه این گزارشات حاصل گردیده است، ماندگاری بیشتر باکتری ها در محلول در اثر میکرو انکپسوله کردن و محصور کردن آنها می باشد (۹۶).

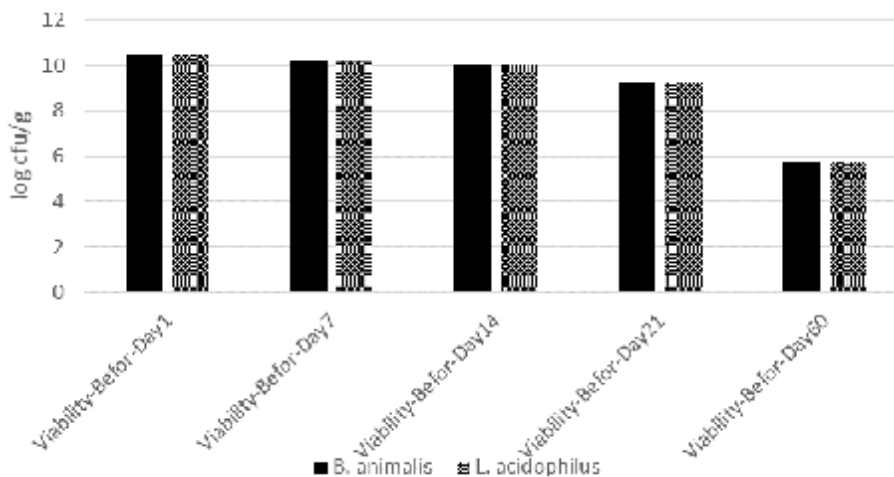
نتایج مشابهی دست یافتند و بیان کردند که با افزایش غلظت لیپید در ساختار نانولیوزوم ها سایز آنها نیز افزایش یافت (۲).

۳-۵- تحلیل ویژگی های الکتریکی

پتانسیل زتای باکتری های پروبیوتیک انکپسوله منفی بود که طی زمان کاهش یافت و نشانگر افت پایداری ذره است. پتانسیل زتای یکی از فاکتورهای مهم در تعیین پایداری نانو ذرات است. هرچه پتانسیل زتای ذرات بیشتر باشد، بار سطحی نانوذرات بیشتر و در نتیجه دافعه الکترواستاتیک بالاتر و ذرات کمتر به یکدیگر چسبیده و محلول حاصل یکنواخت تر خواهد بود و بالعکس پتانسیل زتای پایین نانو ذرات سبب کاهش پایداری و به هم چسبیدگی ذرات طی نگهداری می شود دلیل اصلی منفی بودن بار سطحی در نانولیوزومها، وجود لستین به عنوان یک امولسیفایر آنیونی می باشد. اما گروه هیدروکسیل در آسپین ۸۵ امولسیفایر غیر یونی نیز میتواند تا حدودی باعث ایجاد بار منفی در آنها شود.

۳-۶- بقای باکتری های پروبیوتیک انکپسوله در نوشیدنی

طی نگهداری یخچالی (۲۴ ساعت، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۶۰ روز) چهار گروه نوشیدنی انتخاب شدند. دو گروه شامل باکتری های انکپسوله نشده و دو گروه حاوی باکتری های انکپسوله. نوشیدنی

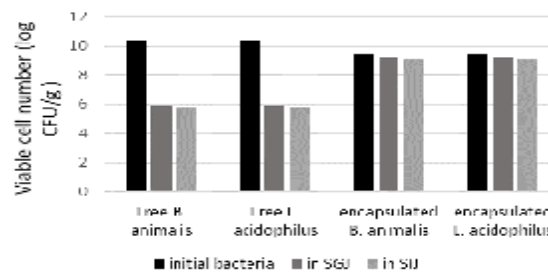


تصویر ۳- شمارش باکتری زیست پذیر B. animalis-BB-12 و L. acidophilus La-5 پس از ۷، ۱۴، ۲۱ و ۶۰ روز

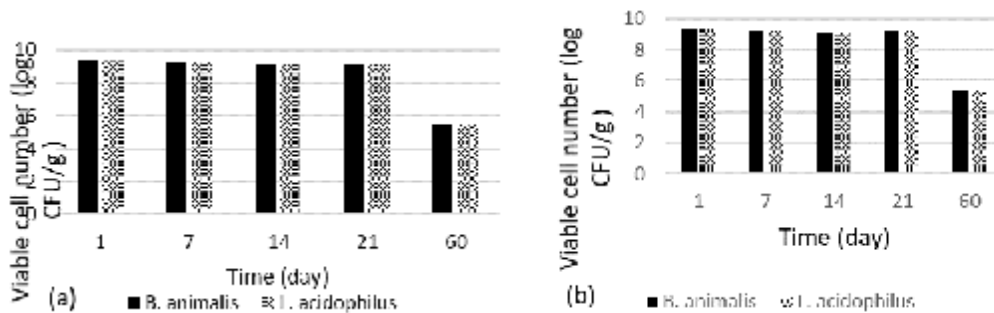
۳-۷- بقای باکتری های پروبیوتیک انکپسوله در شرایط روده و معده- روده شبیه سازی شده

باکتری های پروبیوتیک آزاد و محبوس به صورت جداگانه در SGJ و SIJ غوطه ور شدند. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شده و بقای سلولی آن ها ارزیابی شد. همان طور که تصویر ۴ مشاهده می شود، میکروانکپسوله کردن منجر به تقویت بقای باکتری های پروبیوتیک شد. شمارش سلول های زیست پذیر برای همه نمونه های B. انیمالیس-BB-۱۲ و L. اسیدوفیلوس La-5 انکپسوله نسبت به شمارش اولیه کاهش یافت. بقای B. انیمالیس-BB-۱۲ و L. اسیدوفیلوس La-5 آزاد در روز اول به اندازه ۴۹/۴ و ۵۷/۴ لگاریتم CFU در SGJ و L. اسیدوفیلوس

La-5 به اندازه ۲۸/۰ و ۲۶/۰ لگاریتم CFU در SIJ کاهش یافت. همچنین بقای نمونه های پر شده با باکتری های پروبیوتیک انکپسوله پس از دوره نگهداری یخچالی (۷، ۱۴، ۲۱ و ۶۰ روز) به صورت جداگانه در SGJ و SIJ ارزیابی شد (تصویر ۵ الف). این نتایج نشان داد انکپسوله کردن، بقای باکتری های پروبیوتیک را پس از آسیب اسید معده و نمک صفر تقویت می کند که همراستا با نتایج تحقیق روی جی و همکاران در سال ۲۰۱۹ است اما با نتایج تحقیق یئونگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ که از روش اکستروژن و پوشش کیتوسان برای انکپسوله کردن B. لونگوم^۱ استفاده کردند تفاوت داشت. نتایج آن ها مقاومت زیادی در شرایط اسیدی معده و نمک های صفر نشان نداد (۵، ۱۹ و ۲۶).



تصویر ۴- بقای باکتری های پروبیوتیک انکپسوله آزاد در SIJ و SGJ



تصویر ۵- بقای باکتری های پروبیوتیک انکپسوله در SGJ (الف) و SIJ (ب) در گذر زمان

۴- نتیجه گیری

میکروانکپسوله کردن باکتری های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 و بیفیدوباکتریوم انیمالیس-BB-12) در این تحقیق با تکنیک امولسیون سازی/ژلاسیون داخلی تهیه شد. آلژینات و کیتوسان برای پوشش باکتری ها به کار رفتند. بازدهی انکپسوله کردن برای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 برابر با ۸۲/۵ درصد و برای بیفیدوباکتریوم انیمالیس-BB-12 برابر با ۸۳/۳۳ درصد بود که میزان خوبی محسوب می شود. کپسول های تولیدی بر اساس تصاویر SEM، سطح ناهمواری داشتند و تصاویر میکروسکوپی ارائه شده، اندازه ذره کمتر از ۵ میکرومتر را برای کپسول های تولیدی تایید کردند. بقای باکتری های پروبیوتیک انکپسوله نشده و انکپسوله در نوشیدنی ها طی دوره نگهداری یخچالی مطالعه گردید. نتایج نشان داد بقای باکتری های دارای پوشش در شرایط شبیه سازی شده معده و نمک های صفر تا بالاتر از باکتری های انکپسوله نشده بود. پوشش تهیه شده اثر حفاظتی بر عوامل مخرب داشت بر اساس نتایج مشاهده شده در بخش قبلی، بقا در روز ۶۰ کمتر از روز اول بود چرا که با گذر زمان تخمیر بیش از حد در نوشیدنی رخ می دهد و در نتیجه pH نوشیدنی کاهش می یابد. بنابراین مقاومت پوشش باکتری های پروبیوتیک نیز کم تر شده و زمانی که در معرض SGJ و SIJ قرار می گیرند، بقای آن ها کاهش می یابد. روش امولسیون سازی و ژلاسیون داخلی مزیت هایی دارد، از جمله این که آماده سازی آن ساده بوده، می توان ویژگی های آن را اندازه گیری کرد، می توان آن را به سادگی به غذا اضافه کرد و نیازی به نگهداری یخچالی ندارد بنابراین مصرف کنندگان به راحتی از آن استفاده می کنند. هر چند این روش معایبی نیز دارد. روغن گیاهی مورد استفاده برای تهیه امولسیون به سادگی استریل نمی شود و به فاسد شدن حساس است.

۵- سپاسگزاری

نویسنده ها از حمایت مالی و معنوی کارخانه لبنیات کانیا واقع در قوچان، ایران، تشکر می کنند.

۶- منابع

۱. شیخ قاسمی، ش. و زمردی، ش. ۱۳۹۳. تاثیر کپسوله کردن بر زنده ماندن لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و خواص کیفی آب سیب در طول نگهداری در دمای محیط. علوم غذایی و تغذیه، دوره ۱۱، شماره ۳. ۹۰-۸۱.
۲. نشاسته گیر، م.، محبی، م.، حداد خداپرست. و وریدی، م. ۱۳۹۷. تهیه نانو لیپوزوم های حاوی اسانس روغنی پرتقال با استفاده از روش حرارتی. نوآوری در علوم و فناوری غذایی، دوره ۱۰، شماره ۲، ۱۲۲-۱۱۵.
3. Anal, A. K., Tobiassen, A., Flanagan, J. and Singh, H. 2008. Preparation and characterization of nanoparticles formed by chitosan-caseinate interactions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfases* 64(1): 104-110.
4. Annan, N., Borza, A. and Hansen, L. T. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 41(2):184-193.
5. Arranz, E., Corrochano, A., Shanahan, V., Jaime, C.M., Santoyo, L., Callanan, S. M., Murphy, E. and Giblin, L. 2019. Antioxidant activity and characterization of whey protein-based beverages: Effect of shelf life and gastrointestinal transit on bioactivity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 57: 102209.
6. Atraki, R. and Azizkhani, M. 2021. Survival of probiotic bacteria nanoencapsulated within biopolymers in a simulated gastrointestinal model. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 72: 102750.
7. Banaszewska, A., Cruijssen, F., Claassen, G. and VanderVorst, J. 2014. Effect and key factors of byproducts valorization: The case of the dairy industry. *Journal of dairy science*, 97(4): 1893-1908.

16. Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S. and Hadavi, R. 2017. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216: 146-152.
17. Hermansson, A. M. and Lucisano, M. 1982. Gel characteristics water-binding properties of blood plasma gels and methodological aspects on the water-binding of gel systems. *Journal of Food Science*, 47(6): 1955-1959.
18. Javanmarddakhelia, M. and Akbarib, A. 2020. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*.
19. Ji, R., J. Wu., Zhang, J., Wang, T., Zhang, X., Shao, L., Chen, D. and Wang, J. 2019. Extending the viability of *Bifidobacterium longum* in chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1389.
20. Jiménez, A., Sánchez-González, L., Desobry, S., Chiralt, A. and Tehrani, E. A. 2014. Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35: 159-169.
21. Kia, E. M., Ghasempour, Z., Ghanbari, S., Pirmohammadi, R. and Ehsani, A. 2018. Development of probiotic yogurt by incorporation of milk protein concentrate (MPC) and microencapsulated *Lactobacillus paracasei* in the gellan-caseinate mixture. *British Food Journal*.
22. Klemmer, K. J., Korber, D. R., Low, N. H. and Nickerson, M. T. 2011. Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery. *International journal of food science & technology*, 46(11): 2248-2256.
23. Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E., Kanellaki, M. 2005. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochem*, 40: 411-416
8. Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F. and Bergonzi, M. C. 2014. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
9. Ceylan, Z., Meral, R., Karakaş, C. Y., Dertli, E. and Yilmaz, M. T. 2018. A novel strategy for probiotic bacteria: Ensuring microbial stability of fish fillets using characterized probiotic bacteria-loaded nanofibers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 212-218.
10. Chauhan, R., Kaul, M., Shahi, A., Kumar, A., Ram, G. and Tawa, A. 2009. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM (J) 26] from North-West Himalayan region, India. *Industrial crops and products*, 29(2-3): 654-656.
11. Chavan, R., Shraddha, R., Kumar, A. and Nalawade, T. 2015. Whey-based beverage: its functionality, formulations, health benefits and applications. *Journal of Food Processing & Technology*, 6(10): 1.
12. Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petrucci, L., Casanova, F. P. and Sinigaglia, M. 2014. Functional beverages: the emerging side of functional foods: commercial trends, research, and health implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6): 1192-1206.
13. Corrochano, A. R., Buckin, V., Kelly, P. M. and Giblin, L. 2018. Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. *Journal of dairy science*, 101(6): 4747-4761.
14. Ealves, A. T. S., Spadoti, L. M., Zacarchenco, P. B. and Trento, F. K. 2018. Probiotic Functional Carbonated Whey Beverages: Development and Quality Evaluation.
15. Gbassi, G. K. and Vandamme, T. 2012. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4(1): 149-163

- cheese whey beverages by incorporation of probiotic cells immobilized on pistacia terebinthus resin. *Foods*, 9(1): 13.
31. Shah, N. P. 2007. Functional cultures and health benefits. *International dairy journal*, 17(11): 1262-1277.
 32. Shi, L.-E., H, Z., Li, D. T., Li, M., Xu, H., Chen, Y., Zhang, Z.-L. and Tang, Z.-X. 2013. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, 117(1): 99-104.
 33. Skryplonek, K. and Jasińska, M. 2015. Fermented probiotic beverages based on acid whey. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(4): 397-405.
 34. Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X. and Ma, X. 2013. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate polymers*, 96(1): 181-189.
 35. Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A. and Kopsahelis, N. 2019. Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, 11(7): 1591.
 36. Zhang, Y., Gong, J., Yu, H., Guo, Q., Defelice, C., Hernandez, M., Yin, Y. and Wang, Q. 2014. Alginate-whey protein dry powder optimized for target delivery of essential oils to the intestine of chickens. *Poultry Science*, 93(10): 2514-2525.
 24. Madene, A., M., Jacquot, J. and Desobry, S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release—a review. *International journal of food science & technology*, 41(1): 1-21.
 25. Mahmoud, M., Abdallah, N. A., El-Shafei, K., Tawfik, N. F. and El-Sayed, H. S.. 2020. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing, and gastrointestinal conditions. *Heliyon*, 6(3): 3541.
 26. Nahr, F. K., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Kafil, H. S., Hoseini, M. and Moghadam, B. E. 2019. Investigation of physicochemical properties of essential oil loaded nanoliposome for enrichment purposes. *LWT*, 105: 282-289.
 27. Prasad, L. B., Sherkat, F. and Shah, N. 2013. Extraction and characterisation of β -galactosidase produced by *Bifidobacterium animalis*, 487-494.
 28. Prasanna, P. and Charalampopoulos, D. 2018. Encapsulation of *Bifidobacterium longum* in alginate-dairy matrices and survival in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, cow milk and goat milk. *Food bioscience*, 21: 72-79.
 29. Rokka, S. and Rantamäki, P. 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231(1): -12.
 30. Schoina, V., Terpou, A., Papadaki, A., Bosnea, L., Kopsahelis, N. and Kanellaki, M. 2020. Enhanced aromatic profile and functionality of

(Original Research Paper)

The Effect of Nano-liposomes and Microcoating Bacteria at Different Levels of Microencapsulation on Bacterial Viability During Storage

Naeimeh Karamooz ¹, Ali Mohammadi Sani^{1*}, Elham Mahdian¹, Akram Arianfar¹

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

Received:03/07/2021

Accepted:28/09/2021

Abstract

Given that in cheese production, the water extracted from it in the form of a whey name with high biological value loses significant amounts of vitamins and minerals. With the entry of whey into the wastewater, many problems will be created in environmental pollution. The wastewater treatment system for whey treatment costs a lot. Therefore, in a new and innovative design, the encapsulated probiotic beverage based on whey with native essential oils nanoliposome formulates and optimizes in this research. Moreover, the benefits of producing this beverage can be discussed and implemented in the country. Dairy beverages, especially whey, have a high nutritional value, and since adding proper nutrients and flavors can be turned into a worthwhile beverage. After determining the properties of used whey, preparation, activation, and micro coating of probiotic bacteria, production and determination of properties of mint essential oil nanoliposomes, preparation of probiotic beverage based on whey and its quality characteristics have been studied. Using experimental design method and response surface method, the effect of nanoliposomes and micro coated bacteria at different levels on microencapsulation yield, particle size determination, the morphology of microcapsules, zeta potential, and survivability (number of probiotic bacteria and that survival in intestinal and gastro-intestinal conditions during refrigerated storage (24 hours, 7, 14, 21 and 60 days) was evaluated. Encapsulation yield (%) for *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animals-BB-12* were 82.5 and 83.33, respectively. The particle size of 99.7% of microcapsules loaded with *B. animals-BB-12* and 98.1% of microcapsules loaded with *L. acidophilus* La-5 were less than 10 μm . The microcapsules' SEM images indicated that all the produced capsules were irregular in shape. The particle size distribution of mint essential oil nanoliposomes has an average particle size of 194 nm. The viability probiotic showed good stability during storage.

Keywords: Mint Essential Oil Nanoliposomes, Microencapsulated *Lactobacillus Acidophilus* La-5, Microencapsulated *Bifidobacterium Animals-BB-12*, whey Beverage, Emulsification/internal Gelation Technique.

*Corresponding Author: msani@iauu.ac.ir