مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۸۰-۷۳

شناسایی ترکیب پایدار کننده فازهای روغنی و غیر روغنی ارده و بررسی تأثیر آن بر میزان زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک آزاد و ریزپوشینه‌شده

علیرضا برزگری اردکانی[۱]، صبیحه سلیمانیان‌زاد[۲]، محمدحسین مصدق[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

۲- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران. پست الکترونیکی: Soleiman@iut.ac.ir

۳- دانشیار گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: با وجود خواص سلامتی بخش کنجد و ارده تاکنون پژوهشی جهت تولید محصول زیست فناورانه بر این پایه صورت نگرفته‌است. پژوهش حاضر با هدف تولید ارده فراسودمند از طریق افزودن باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC 1896* طراحی گردیده است.

مواد و روش‌ها: با توجه به دو فاز شدن ارده در چند روز پس از تولید و زنده‌مانی کم پروبیوتیک‌ها در فاز چربی و فعالیت آبی پایین، تلاش شد از بین ترکیبات سوربیتان تری استئارات و گلیسرول، ترکیب مناسب و میزان مؤثر بر کاهش عدم سازگاری فازهای روغنی و غیر روغنی ارده شناسایی گردد. همچنین تلاش شد از طریق فرایند ریزپوشانی با سدیم آلژینات و نشاسته اصلاح شده و به کمک روش امولسیون‌سازی امکان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را طی دوره نگهداری ارده (۱۲۰روز) در محدوده 10^{6}-10^{7} CFU باکتری زنده در گرم ارده حفظ نمود.

یافته‌ها: افزودن ۰/۵ درصد گلیسرول به ارده تفاوت معنی‌دار بر روی میزان روغن جدا شونده از ارده ایجاد نمود در حالی که این میزان از گلیسرول، تفاوت معنی‌داری در ویسکوزیته ارده در مقایسه با سوربیتان تری استئارات ایجاد نکرد. در بین تیمارهای مختلف، بیشترین زنده‌مانی مربوط به گروه تیمارهای دارای گلیسرول و پروبیوتیک ریزپوشینه‌دار شده ($10^{7} \times 1/2$) بود و تفاوت معنی‌دار با تیمار فاقد گلیسرول و دارای پروبیوتیک آزاد داشت ($P< ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: فرایند ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC 1896* به روش امولسیون و افزودن آن به ارده حاوی ۰/۵ درصد گلیسرول سبب تولید ارده پروبیوتیک دارای 10^{6}-10^{7} CFU باکتری زنده در گرم می‌گردد.

واژگان کلیدی: ارده، دوفاز شدن، پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ریزپوشانی

• مقدمه

در برخی کشورهای مدیترانه‌ای مانند ترکیه، از ارده به عنوان مکمل غذایی در تهیه بشقاب‌های غذایی و انواع دسرها استفاده می‌شود. در ایران، ارده به عنوان ترکیبی پایه در ساخت فراورده هایی مانند حلوا ارده، کرم ارده مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارده به عنوان ترکیبی با ارزش غذایی بالا شامل ۶۵-۵۰ ٪ لیپید، ۲۷-۲۳ ٪ پروتئین، ۹-۶/۴ ٪ کربوهیدرات، ۹/۳ ٪ فیبر خوراکی، ۴/۵ میلی‌گرم/۱۰۰گرم نیاسین، ۱/۰۸ میلی‌گرم/۱۰۰گرم تیامین و برخی مواد معدنی مانند ۱۰۰میلی‌گرم/۱۰۰گرم کلسیم، ۹ میلی‌گرم/۱۰۰گرم آهن-۸۴۰-۸۰۷ میلی‌گرم/۱۰۰گرم فسفر شناخته می‌شود (۱). وجود توکوفرول در ارده موجب خودپایداری این ترکیب چرب در برابر اکسیداسیون می‌شود. هم‌چنین این پایداری بالا در برابر اکسیداسیون در برخی موارد به حضور میزان بالای ترکیبات غیرقابل صابونی شدن موجود در ارده نسبت داده می‌شود که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به سزامین و سزامولین، فیتوسترول و به میزان ناچیزی سزامول آزاد اشاره نمود (۳، ۲). از نگاه ساختاری، ارده سوسپانسیونی از ذرات معلق آب دوست جامد در فاز روغنی می باشد و به سبب عدم سازگاری دو فاز روغنی و غیر روغنی آن در طی دوره انبارمانی، فاز روغنی از سایر ترکیبات جدا شده و در سطح ارده قرار می‌گیرد (۶-۴). مسئله

مذکور، از عوامل تأثیرگذاری منفی بر روی مصرف کننده است و تا کنون پژوهش‌های زیادی جهت رفع این مسئله صورت نگرفته است.

بنابر تعریف سازمان بهداشت جهانی، پروبیوتیک ها گروهی از میکروارگانیسم‌های GRAS (Generally Recognized As Safe) هستند که در صورت ورود به تعداد کافی (10^7-10^8 (cfu/g) و به صورت زنده به بدن انسان، اثرات سلامتی بخش خود بر سیستم ایمنی را ایفا می‌کنند. عمده میکروارگانیسم‌های شناخته شده به عنوان پروبیوتیک، از خانواده *لاکتوباسیلوس‌ها* (*lactobacillus*) و *بیفیدوباکتریوم‌ها* (*bifidobacteria*) هستند. هرچند برخی باکتری‌های دیگر مانند *اشرشیاکلای* (*Escherichia coli*) و *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) و مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisia*) به منظور سلامتی‌بخشی در مواد غذایی به کار برده می‌شوند (۷).

به سبب بالا بودن میزان چربی ارده، پیش بینی گردید که زنده مانی پروبیوتیک ها در حد قابل قبول نباشد بنابراین جهت افزایش زنده مانی، علاوه بر شناسایی ترکیب مؤثر بر کاهش عدم سازگاری فاز روغنی و غیر روغنی، از تکنیک ریزپوشانی نیز استفاده شد (۸). تکنیک ریزپوشانی، یکی از موثرترین روش ها جهت حفاظت از باکتری‌های مفید پس از ورود به بخش‌های مختلف دستگاه گوارش می باشد. در این روش، سلول توسط غشایی از جنس مشخص ریزپوشانی شده و آسیب کمتری به ساختار آن وارد می شود و در نهایت رهایش میکروارگانیسم سالم پس از ورود به روده بزرگ انجام می شود (۸). متداول ترین مواد پوششی مورد استفاده در فرایند ریزپوشانی، پلی ساکاریدها (نشاسته، سلولز، آلژینات، پکتین، اینولین و کیتوزان)، پروتئین‌ها (سویا، آب پنیر، کازئین و ژلاتین) و لیپیدها (واکس ها) هستند. در میان پلی‌ساکاریدهایی که از آن‌ها برای ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها استفاده شده‌است، آلژینات بیشترین کاربرد را داراست. موفقیت تکنیک ریزپوشانی ژل آلژینات به دلیل ماهیت غیرسمی، قیمت پایین، زیست تخریب پذیری و سهولت به دام انداختن میکروارگانیسم‌ها و خاصیت پریبیوتیکی آن می‌باشد. پایداری آلژینات در محیط اسیدی ضعیف است و به همین دلیل استفاده از آن در غذاهای تخمیری محدود می‌گردد. پیش‌بینی گردید با توجه به این که pH ارده در محدوده اسیدی نزدیک به خنثی می‌باشد، پوشش آلژینات عملکرد مناسبی به عنوان ریزپوشینه پروبیوتیک‌ها داشته باشد (۹، ۸). فرایند ریزپوشانی به دو دسته شیمیایی و مکانیکی تقسیم می‌شود. از روش‌های شیمیایی می‌توان به روش امولسیون (*Emulsification*) و انباشتگی (*Coacervation*) و از روش‌های مکانیکی نیز می‌توان به خشک کردن پاششی (*Spray drying*) و سرد کردن پاششی (*Spray chilling*) اشاره کرد. مهمترین روش ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیکی که در فراورده‌هایی مانند سس مایونز استفاده می‌شوند، روش امولسیون می‌باشد که میزان بقاء باکتری‌های پروبیوتیک را بیش از ۹۵-۸۰ درصد افزایش می‌دهد (۹، ۸). در پژوهش حاضر پیش‌بینی گردید با توجه به شباهت ارده و سس مایونز، روش امولسیون برای ریزپوشانی پروبیوتیک‌های ارده بازدهی مناسب داشته‌باشد (۱۰-۸). در این پژوهش، تولید ارده فراسودمند با حفظ کیفیت طبیعی بافت و طعم ارده که علاوه بر تأمین نیازهای غذایی مصرف کننده می‌تواند نقش سلامتی بخش مانند تأثیر ضدسرطانی و کارکرد بهتر دستگاه گوارش داشته باشد، مورد بررسی قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

مواد: محیط کشت‌های YGC (Yeast Glucose Chloramphenicol Agar)، MRS Broth (Man rogsa sharpe)، VRBA (Violet red bile agar) و Agar-agar (به ترتیب از شرکت‌های Merck، ibresco ، Merck ، ibresco آلمان خریداری شدند)، مواد شیمیایی Ringer ، PBS (از شرکت Merck آلمان) کلسیم کلراید، سدیم آلژینات و نشاسته اصلاح‌شده (از شرکت Dnabiotech ایران)، توئین ۸۰ و سوربیتان تری استئارات (از شرکت Tnj چین) و گلیسرول (از شرکت Msc کره) خریداری گردیدند. در این پژوهش از سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1896 که متعلق به کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان بود، استفاده شد.

شناسایی ترکیب مؤثر بر کاهش روغن اندازی ارده: بر اساس تحقیقات انجام شده، ترکیبات دوگانه دوستی مانند سوربیتان تری استئارات (STS) و گلیسرول خوراکی می توانند سبب کاهش ناسازگاری دو فاز روغنی و غیر روغنی ارده (پروتئین‌ها،کربوهیدرات‌ها و سایر ترکیبات) شوند. بدین ترتیب، هر کدام از ترکیبات مذکور به صورت جداگانه در سه سطح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد به ارده اضافه شدند و اثر آن مقدار از ترکیب شیمیایی افزوده شده بر پارامترهای روغن اندازی و ویسکوزیته ارده بررسی گردید. میزان روغن جدا شونده با کمک سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰rpm و زمان ۲۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. همچنین ویسکوزیته هر کدام از تیمارها (ارده حاوی درصدهای مختلف گلیسرول و سوربیتان تری استئارات) در نرخ‌های برشی (s^{-1}) ۲/۹۲۳، ۳/۷۵۳ و ۴/۸۳۳ اندازه‌گیری گردید (۶).

آماده‌سازی پروبیوتیک‌های مورد استفاده: در این پژوهش از کشت‌های منجمد شده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه

PTCC 1896 موجود در بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه صنعتی اصفهان استفاده شد. جهت فعال‌سازی باکتری‌ها، ابتدا محتویات اپندورف به آرامی و در یخچال ذوب شدند. سپس محتویات هر کدام از اپندورف‌ها در لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور با شرایط تزریق ۱۰ درصد CO_2 به منظور ایجاد شرایط بی‌هوازی، گرمخانه گذاری گردیدند. جهت اطمینان از فعال‌سازی کامل باکتری‌ها، فعال‌سازی دوم نیز انجام شد. بدین منظور، مقدار ۱ میلی لیتر از فعال‌سازی اول به لوله دیگری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع تلقیح و در شرایط مشابه گرمخانه‌گذاری گردید. جهت به دست آوردن کلنی‌های قابل مشاهده، پس از هر مرحله فعال‌سازی از باکتری فعال‌شده بر روی محیط کشت MRS جامد کشت خطی داده و در شرایط مشابه مرحله قبل گرمخانه‌گذاری شد (۱۱).

آماده‌سازی سوسپانسیون سلولی فعال: بعد از فعال‌سازی باکتری‌ها و رسیدن به انتهای فاز لگاریتمی، از میکروب‌های فعال‌شده، مقدار ۱ درصد به محیط کشت MRS مایع تلقیح و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط بی‌هوازی (با ۱۰درصد CO_2) گرمخانه‌گذاری شد. پس از این مدت، محیط کشت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با سرعت g۱۰۰۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس رسوب میکروبی حاصل به منظور شست و شو با سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ درصد استریل، با سرعت، دما و زمان مذکور دوبار سانتریفوژ شد. در نهایت به رسوب میکروبی حاصل، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه و جهت تشکیل سوسپانسیون بر روی شیکر قرار داده‌شد (۱۱).

آماده‌سازی محلول پوشش و ریزپوشانی باکتری: فرایند ریزپوشانی بر اساس روش امولسیون آب در روغن انجام شد. بدین منظور ابتدا سوسپانسیونی از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تهیه گردید. تیمار آلژینات شامل محلول ۴٪ سدیم آلژینات در آب مقطر و ٪۲ نشاسته اصلاح شده تهیه و سپس در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس و مدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو استریل و سپس تا دمای ۴۰ - ۳۸ درجه سلسیوس خنک شد. ۲۰ میلی لیتر از محلول تهیه شده و ۴ میلی لیتر از سوسپانسیون سلول‌ها به یک لوله ی سانتریفوژ ۴۰ میلی‌لیتر انتقال داده و به منظور یکنواختی، همزده شدند. ۱۰۰ میلی‌لیتر روغن کنجد، شامل ۰٪/۲ توئین۸۰ (امولسیفایر) به ظرفی با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر انتقال داده و در حین همزده شدن مغناطیسی، مخلوط آلژینات و سوسپانسون سلولی به ظرف مذکور افزوده شدند. پس از ۵ دقیقه، امولسیون کدر یکنواخت به دست آمد که به منظور مقاوم‌سازی ریزپوشینه‌ها و شکستن امولسیون، میزان ۱۰۰ میلی لیتر کلسیم کلرید ۰/۱ مولار فوراً به آن اضافه گردید. باکتری‌ها که در فاز آبی ریزپوشینه شده بودند، پس از سانتریفوژ شدن در شرایط ۳۵۰ دور در ۱۰ دقیقه، دمای ۴۱ درجه سلسیوس و دو مرتبه شستشو با آب مقطر، برداشت نهایی شدند (۱۱، ۸).

راندمان ریزپوشانی و تعیین میزان زنده‌مانی باکتری ریزپوشینه‌شده: جهت رهایش سلول‌ها از درون ریزپوشینه، ۱ گرم از ارده به ۹ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات استریل ۰/۹ نرمال با pH=۷ اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۲ دقیقه با شیکر همزده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از یکنواخت شدن مخلوط حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر از آن به اپندورف حاوی ۹۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد و پس از تهیه رقت تا 10^{-9} کشت به روش مایلزمیزرا (Miles and Misra method) انجام گرفت. پلیت‌ها پس از خشک شدن در کنار شعله در انکوباتور با شرایط ۱۰ درصد CO_2 در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در ضمن از محلول اولیه قبل از ریزپوشانی، نمونه برداری انجام شد و بعد از رقت سازی، کشت مایلز میزرا و گرمخانه‌گذاری با شرایط مذکور انجام گردید (۱۱). در نهایت، درصد زنده‌مانی از رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{بازده فرایند ریز پوشانی} = \frac{\text{جمعیت میکروب ریزهای پوشینه شده}}{\text{جمعیت میکروبی سوسپانسیون اولیه}} \times ۱۰۰$$

تهیه تیمارها: میزان ۱۲ کیلوگرم ارده از شرکت برسام شیرینی سلامت واقع در شهرک صنعتی اردکان، استان یزد تهیه گردید. ۵ گروه تیمارها شامل گروه ۱ (شاهد)، گروه ۲ (ارده بدون گلیسرول افزودنی و با پروبیوتیک آزاد)، گروه ۳ (ارده بدون گلیسرول افزودنی و با پروبیوتیک ریزپوشینه‌دار شده)، گروه ۴ (ارده با گلیسرول افزودنی و پروبیوتیک آزاد)، گروه ۵ (ارده با گلیسرول افزودنی و پروبیوتیک ریزپوشینه‌دار شده) آماده‌سازی گردیدند. هر گروه شامل ۹ تیمار یکسان بود. آزمون‌های شیمیایی و میکروبی به فاصله ۱۴ روز یکبار و در طی ۹ هفته بر روی تیمارها صورت گرفتند.

شمارش باکتری‌های لاکتیکی: جهت کشت و شمارش باکتری‌های لاکتیکی از روش مایلزمیزرا استفاده شد. بدین صورت که ابتدا هرکدام از پلیت‌های حاوی *MRS* آگار به سه بخش تقسیم شدند که هر قسمت مربوط به یک رقت بود. سپس از هر رقت مد نظر سه نمونه ۱۰ میکرولیتری توسط سمپلر برداشته و در قسمت مربوطه در پلیت ریخته شد. پلیت‌ها تا

زمان خشک شدن قطرات در کنار شعله ماندند و سپس در انکوباتور بی هوازی (با تزریق ۱۰٪ CO_2) به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. لازم به ذکر است از رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-9} جهت کشت و شمارش استفاده گردید (۱۱، ۸).

جدول ۱. تجزیه واریانس میزان روغن جداشده از ارده

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
تیمار	۱	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹^{ns}
درصد مورد استفاده	۲	۰/۴۱۳	۰/۲۰۷*
خطا	۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲
کل	۶	۵/۶۶۲	

ns = غیر معنی دار، * = معنی دار در سطح ۹۵ درصد، ** = معنی دار در سطح ۹۹ درصد

جدول ۲. مقایسه میانگین حجم روغن جداشده از ارده (میلی‌لیتر)

تیمار	درصد مورد استفاده		
	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵
گلیسرول	۱/۳۷ ^{a}	۰/۸۹^{b}	۰/۷۱ ^{c}
سوربیتان تری استئارات	۱/۲^{a}	۰/۸۳ ^{b}	۰/۶ ^{c}

حروف کوچک مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

جدول ۳. مقایسه میانگین ویسکوزیته (pa.s) در نرخ‌های برشی ۲/۹۲۳، ۳/۷۵۳ و ۴/۸۳۳

	زمان(هفته)	
تیمار	۱	۹
شاهد	۲/۰۰۱^{b}، ۱/۸۷۸^{b} و ۱/۶۷۱^{b}	۲/۱۲^{b}، ۱/۹۸^{b} و ۱/۷۱^{b}
گلیسرول(۰/۵ درصد)	۲/۳۲۱^{b}، ۲/۰۷۸^{b} و ۱/۹۱۱^{b}	۲/۶۹^{b}، ۲/۵۹^{b} و ۲/۱۹^{b}
سوربیتان تری استئارات (۰/۵ درصد)	۲/۹۹۲^{a}، ۲/۸۲۸^{a} و ۲/۷^{a}	۳/۴۵^{a}، ۳/۳۹^{a} و ۲/۹۸^{a}

حروف کوچک مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

آنالیز آماری: آنالیز آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS 2023 انجام گرفت و جهت مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون دانکن استفاده شد. هم‌چنین برای رسم منحنی از نرم افزار Excel 2016 استفاده شد. همه آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت.

• یافته‌ها

میزان روغن اندازی ارده: طی پژوهش حاضر، میزان روغن جدا شونده اندازه‌گیری شد. همچنین ویسکوزیته در حالت‌های مختلف نیز به کمک دستگاه رئومتر و در سه نرخ برشی اندازه گیری گردید. همان گونه که در جداول ۱ و ۲ مشخص است، میزان گلیسرول و STS افزوده شده به ارده در سطح اطمینان ۹۵ درصد، تفاوت معنی‌دار بر میزان روغن جداشده از ارده نشان داد. هم‌چنین در مقادیر برابر استفاده از این ترکیبات، STS(سوربیتان تری استئارات) سبب افزایش معنی‌دار ویسکوزیته در مقایسه با گلیسرول گردید. با توجه به جدول ۴، ویسکوزیته تیمار دارای ۰/۵ درصد گلیسرول تفاوت معنی‌داری با ارده شاهد نشان نداد.

محاسبه بازده فرایند ریزپوشانی: بر اساس نتایج پژوهش اکبری و همکاران (۱۳۸۹)، با استفاده از دور ۲۰۰rpm و زمان ۲۰ دقیقه در بخش امولسیون سازی بهترین تعادل بین دور و زمان جهت تشکیل ریزپوشینه‌ها ایجاد می‌گردد. بنابراین بازده فرایند ریزپوشانی در این تحقیق با استفاده از شرایط مذکور ۱/۳۲ ± ۷۴/۸ درصد محاسبه شد (۱۲).

شمارش باکتری‌های لاکتیکی: نتایج تجزیه آماری داده‌های مربوط به قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده نشان داد که تأثیر تیمار و زمان نگهداری بر میزان زنده‌مانی این باکتری‌ها، معنی‌دار است ($P< ۰/۰۵$). تعداد باکتری‌های لاکتیکی تیمارهای گروه ۴-۱ (گروه ۱ (شاهد)، گروه ۲ (ارده بدون گلیسرول افزودنی و با پروبیوتیک آزاد)، گروه ۳ (ارده بدون گلیسرول افزودنی و با پروبیوتیک ریزپوشینه‌دار شده)، گروه ۴ (ارده با گلیسرول افزودنی و پروبیوتیک آزاد) در شروع دوره انبارمانی در بیشترین میزان قرار داشت. همان طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، با گذشت زمان مقدار این باکتری‌ها کاهش یافت. در شروع دوره انبارمانی، تعداد باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای تیمارهای هر چهار گروه مذکور، ۹ سیکل لگاریتمی بود. با شروع دوره نگهداری، روند کاهش زنده‌مانی باکتری‌ها آغاز گردید به گونه‌ای که در هفته پایانی انبارمانی، تعداد باکتری‌ها به 10^{5}-10^{7} در تیمارهای مختلف رسید. در بین تیمارهای مختلف، بیشترین زنده‌مانی به ترتیب مربوط به گروه تیمارهای گروه ۵ (دارای گلیسرول و پروبیوتیک ریزپوشینه‌دار شده، $10^{7} \times 1/2$)، گروه۴ (دارای گلیسرول و پروبیوتیک فاقد ریزپوشینه، $10^{6} \times 8/39$) ، گروه۳ (فاقد گلیسرول و دارای پروبیوتیک ریزپوشینه‌دار شده، $10^{6} \times 3/92$) و گروه۲ (تیمار فاقد گلیسرول و پروبیوتیک فاقد ریزپوشینه، $10^{5} \times 1/7$) بود.

با توجه به نمودار ۱، شدت روند کاهش تعداد باکتری‌ها به ترتیب مربوط به تیمارهای ۲، ۳، ۴ و ۵ بوده است. همچنین با توجه به جدول ۴ و نمودار ۱ مشخص است که بیشترین شدت میزان مرگ و میر نیز مربوط به سه هفته ابتدایی از شروع دوره انبارمانی بوده است.

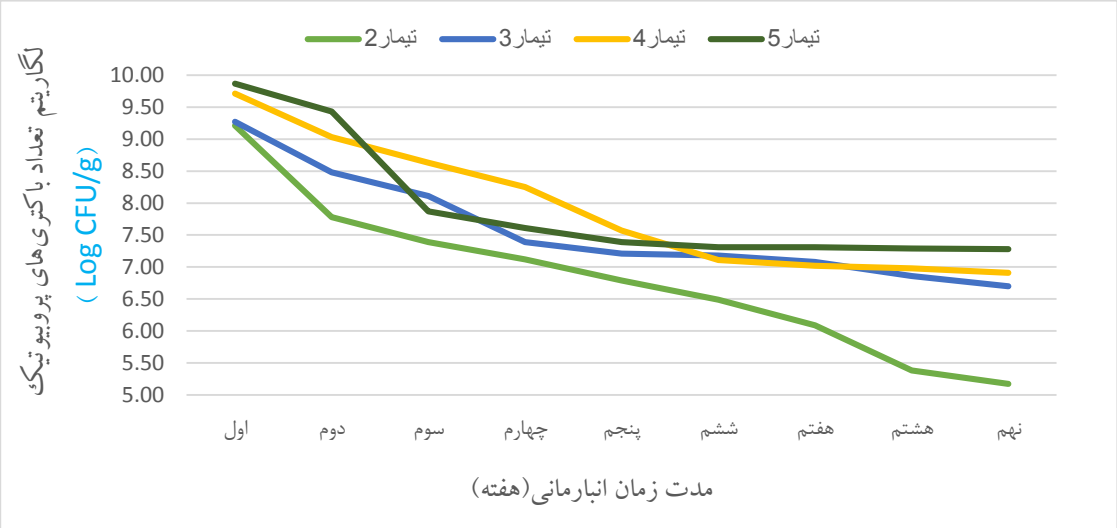
جدول۴. مقایسه میانگین زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها (*LOG* CFU/g)

زمان(هفته)									
۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۵/۱۷ Bcd	۵/۳۸ Bd	۶/۰۹ Bcd	۶/۴۹ Bbc	۶/۷۹ Bbc	۷/۱۲ Bbc	۷/۳۹ Babc	۷/۷۸ Bab	۹/۲۱ Ba	تیمار ۲
۶/۷۰ Acd	۶/۸۶ Ad	۷/۰۸ Acd	۷/۱۸ Abc	۷/۲۱ Abc	۷/۳۹ Abc	۸/۱۱ Aabc	۸/۴۸ Aab	۹/۲۷ Aa	تیمار ۳
۶/۹۱ Acd	۶/۹۸ Ad	۷/۰۲ Acd	۷/۱۱ Abc	۷/۵۷ Abc	۸/۲۵ Abc	۸/۶۳ Aabc	۹/۰۳ Aab	۹/۷۱ Aa	تیمار ۴
۷/۲۸ Acd	۷/۲۹ Ad	۷/۳۱ Acd	۷/۳۱ Abc	۷/۳۹ Abc	۷/۶۱ Abc	۷/۸۷ Aabc	۹/۴۳ Aab	۹/۸۷ Aa	تیمار ۵

حروف کوچک مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

حروف بزرگ مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.

(تیمار ۲: ارده بدون گلیسرول و دارای باکتری آزاد، تیمار ۳: ارده بدو گلیسرول و دارای باکتری ریزپوشینه‌شده، تیمار ۴: ارده حاوی گلیسرول و دارای باکتری آزاد، تیمار ۵: ارده حاوی گلیسرول و دارای باکتری ریزپوشینه‌شده)



نمودار۱. روند کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها طی دوره انبارمانی

(تیمار ۲: ارده بدون گلیسرول و دارای باکتری آزاد، تیمار ۳: ارده بدو گلیسرول و دارای باکتری ریزپوشینه‌شده، تیمار ۴: ارده حاوی گلیسرول و دارای باکتری آزاد، تیمار ۵: ارده حاوی گلسرول و دارای باکتری ریزپوشینه‌شده)

• بحث

بر اساس پژوهش Ogutcu و همکاران (۲۰۱۷)، با استفاده از ترکیبات ویسکوز کننده‌ای مانند گلیسرول و سوربیتان تری استئارات (STS) می‌توان میزان جداسازی فازهای روغنی و غیر روغنی ارده را کاهش داد (۶). از دلایل انتخاب ترکیبات مذکور می‌توان عدم تأثیرگذاری بر رنگ و طعم ارده، قیمت مناسب و در دسترس بودن را برشمرد. هم‌چنین مهم‌ترین عوامل مؤثر بر انتخاب یکی از ترکیبات به عنوان ترکیب کاربردی جهت کاهش روغن اندازی ارده، حجم روغن جدا شده در دوره یکسان و تأثیر آن بر خواص رئولوژی ارده می‌باشد. طی پژوهش حاضر، میزان روغن جدا شونده با کمک سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰rpm و زمان ۲۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. همچنین ویسکوزیته در حالت‌های مختلف نیز به کمک دستگاه رئومتر و در چهار نرخ برشی اندازه گیری گردید. همان گونه که از جدول ۲ مشخص است، با افزایش درصد استفاده از یکی از ترکیبات گلیسرول یا STS میزان روغن جداشده کاهش یافت. همچنین در درصدهای برابر استفاده از هرکدام از این ترکیبات، STS سبب کاهش میزان بیشتری از روغن جدا شده گردید که ناشی از قدرت بالاتر این ترکیب در تأثیر بر روی فاز روغنی ارده و باندهای غیر اشباع آن در مقایسه با تأثیر گلیسرول بر روی فاز غیر روغنی شامل پروتئین و کربوهیدرات به عنوان اجزای اصلی بخش غیر روغنی بود. نتایج این آزمون با نتایج پژوهش Ogutcu و همکاران (۲۰۱۷) تطابق داشت. با توجه به جداول ۳ تا ۵ ، استفاده از ۰/۵ درصد گلیسرول علاوه بر کاهش معنی‌دار میزان روغن جدا شونده ارده، کمترین تأثیر را بر روی افزایش ویسکوزیته ارده نشان داد که با نتایج پژوهش ساعتچی و همکاران (۲۰۱۹) تطابق داشت و به عنوان درصد ایده‌آل جهت افزودن به ارده برای برخی از تیمارها انتخاب شد (۱۶).

بر اساس نتایج اکبری (۱۳۸۹) با بهینه‌کردن فرایند ریزپوشانی، بهترین دور و زمان هم زدن استفاده از دور rpm ۲۰۰ در بخش تشکیل امولسیون (به مدت ۲۰ دقیقه) منجر به

تشکیل ریزپوشینه‌هایی با بازده فرایند خوب (۶۳/۷۱ درصد) می‌گردد. بنابراین بازده فرایند ریزپوشانی در این تحقیق با استفاده از شرایط مذکور به ۱/۳۲ ± ۷۴/۸ درصد محاسبه شد (۱۲).

یکی از شاخص‌های بسیار مهم در تولید محصولات پروبیوتیک، اطمینان از زنده‌مانی باکتری است تا تأثیرگذاری مطلوب خود را تا پایان دوره زندگی حفظ کند (۱۴). هدف از پژوهش حاضر، تعیین باکتری‌های زنده پروبیوتیک مورد استفاده در گروه ارده‌های فاقد و دارای گلیسرول بود. آنالیز آماری تعداد باکتری‌های شمارش شده در تیمار شاهد با سایر تیمارها نشان داد که افزودن گلیسرول و فرایند ریزپوشانی تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها دارد. بررسی اثر همزمان متغیرهای این آزمون شامل نوع تیمار و زمان بر زنده‌مانی نشان داد که اثر همزمان این فاکتورها در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، گروه تیمارهای دارای گلیسرول به سبب کاهش میزان دوفازی ارده محیط بهتری برای زنده‌مانی باکتری هستند. به عبارت از آنجائیکه زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در هر کدام از فازهای پیوسته و غیر پیوسته ارده کمتر از محدوده زنده‌مانی استاندارد می‌باشد، گلیسرول با به تأخیر انداختن جدایی فاز غیرپیوسته ارده (با فعالیت آبی پایین) و فاز پیوسته (با چربی زیاد) سبب افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها می‌شود (۱۴). همچنین باکتری‌های ریزپوشینه‌دار شده زنده‌مانی بیشتری در مقایسه با باکتری‌های فاقد ریزپوشینه نشان دادند که با نتایج پژوهش‌های مشابه ریزپوشانی توسط بیگدلیان و همکاران (۲۰۱۴)، Qi و همکاران (۲۰۱۹) و Timilsena و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت داشت و ثابت نمود پوشش آلژینات و نشاسته اصلاح شده به عنوان پوششی مناسب در محصولات با فعالیت آبی پایین و لیپید بالا توانایی حفظ باکتری‌ها را در شرایط مذکور دارد (۱۷، ۱۵، ۸).

همان گونه که در جدول ۴ آمده است، تیمارهای گروه ۳، ۴ و۵ در هفته پایانی انبارمانی از نظر شمارش پروبیوتیک‌ها تفاوت معنی‌داری با تیمار شماره ۲ داشتند (P< ۰/۰۵). این نتیجه نشان می‌دهد، گلیسرول از طریق کاهش میزان دوفاز شدن ارده و همچنین ریزپوشانی نمودن باکتری‌ها پیش از تلقیح به ارده سبب افزایش زنده‌مانی باکتری‌ها می‌شوند. این زنده‌مانی در تیمار شماره ۵ بیش از سایر تیمارها بود و با تعریف سازمان بهداشت جهانی مبنی بر حضور 10^{6}-10^{7} CFU/g باکتری پروبیوتیک در ارده تطابق نشان داد. همچنین با توجه به نمودار ۱ شدت روند کاهش تعداد باکتری‌ها به ترتیب مربوط به تیمارهای شماره ۲، ۳، ۴ و ۵ بوده است. همچنین جدول ۴ و نمودار ۱ نشان می‌دهد که بیشترین شدت میزان مرگ و میر مربوط به سه هفته ابتدایی از شروع دوره انبارمانی بوده است (۱۶، ۱۷).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر ثابت گردید استفاده از درصد معین گلیسرول در ارده سبب کاهش معنی‌دار (P< ۰/۰۵) میزان دو فاز شدن بدون ایجاد تغییر معنی‌دار در ویسکوزیته در مقایسه با ارده بدون گلیسرول می‌شود که در نتیجه آن، امکان زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در ارده افزایش می‌یابد. همچنین ثابت شد می‌توان با استفاده از فرایند ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1896 به روش امولسیون در پوشش سدیم آلژینات و نشاسته اصلاح شده، ارده پروبیوتیک تولید نمود که هر گرم ارده شامل 10^{6}-10^{7} CFU/g از باکتری مذکور باشد. ارده پروبیوتیک به سبب خواص سلامتی‌بخش ارده و همچنین تأثیرات بسیار ارزشمند باکتری‌های پروبیوتیک بر بدن میزبان، می‌تواند جایگاه ویژه‌ای در رژیم غذایی افراد مختلف جامعه به خصوص افراد در معرض بیماری‌های قلبی و انواع سرطان داشته باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله، نهایت قدردانی خود را از دانشگاه صنعتی اصفهان، پارک علم و فناوری یزد و شرکت فراورده‌های کنجدی برسام شیرینی سلامت، جهت حمایت مالی از پژوهش حاضر اعلام می‌دارند.

• References

1. Aglave HR. Physiochemical characteristics of sesame seeds. J Med Plants Stud. 2018;6(1):64.
2. Alaouie Z, Hallal N, Alkhatib A, Khachfe HM. Assessing the microbial quality of tahini (sesame paste) in Lebanon. Glob Health. 2017;6(c):20-5.
3. Baxevanis GK, Sakketou EK, Tentolouris NK, Karathanos VT, Fragkiadakis GA, Kanellos PT. Tahini consumption improves metabolic and antioxidant status biomarkers in the postprandial state in healthy males. European Food Research and Technology. 2021 Nov;247(11):2721-8.
4. Khaji F, Razavi H, Ebrahimzadeh Z, Kiani H. Probiotics survivability examination in a tahini besed dairy dessert which is fortified with inuline. Tehran: University of Tehran, Food science department; 2018 [in Persian].
5. Gerstenmeyer E, Reimer S, Berghofer E, Schwartz H, Sontag G. Effect of thermal heating on some lignans in flax seeds, sesame seeds and rye. Food chemistry. 2013 Jun 1;138(2-3):1847-55.
6. Öğütcü M, Arifoğlu N, Yılmaz E. Restriction of oil migration in tahini halva via organogelation. European Journal of Lipid Science and Technology. 2017 Sep;119(9):1600189.
4. Fuller R, editor. Probiotics 2: applications and practical aspects. Springer Science & Business Media; 1997 Jun 30.

7. Shortt C. The probiotic century: historical and current perspectives. Trends in food science & Technology. 1999;12(10):411-7.

8. Bigdelian E, Razavi SH. Evaluation of survival rate and physicochemical properties of encapsulated bacteria in alginate and resistant starch in mayonnaise sauce. Journal of Bioprocessing & Biotechniques. 2014 Jan 1;4(5):1.

9. Zuidam NJ, Nedovic V, editors. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing.

10. Hou RC, Lin MY, Wang MM, Tzen JT. Increase of viability of entrapped cells of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus in artificial sesame oil emulsions. Journal of Dairy Science. 2003 Feb 1;86(2):424-8.

11. Khalil A, Mansour Eh. Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. Journal of Food Science. 1998 Jul;63(4):702-5.

12. Akbari S. Examination the effect of encapsulation on survivability and indigenous lactobacillus plantarum releasing. Isfahan: Isfahan university of technology, Food science department; 2010 [in Persian].

13. Šturm L, Črnivec IG, Istenič K, Ota A, Megušar P, Slukan A, Humar M, Levic S, Nedović V, Deželak M, Gonzales AP. Encapsulation of non-dewaxed propolis by freeze-drying and spray-drying using gum Arabic, maltodextrin and inulin as coating materials. Food and Bioproducts Processing. 2019 Jul 1;116:196-211.

14. Mandal S, Hati S. Microencapsulation of bacterial cells by emulsion technique for probiotic application. InCell Microencapsulation 2017 (pp. 273-279). Humana Press, New York, NY.

15. Qi W, Liang X, Yun T, Guo W. Growth and survival of microencapsulated probiotics prepared by emulsion and internal gelation. Journal of food science and technology. 2019 Mar;56(3):1398-404.

16. Saatchi A, Kiani H, Labbafi M. A new functional protein‐polysaccharide conjugate based on protein concentrate from sesame processing by-products: Functional and physico-chemical properties. International journal of biological macromolecules. 2019 Feb 1;122:659-66.

17. Timilsena YP, Akanbi TO, Khalid N, Adhikari B, Barrow CJ. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. International journal of biological macromolecules. 2019 Jan 1;121:1276-86.

Identifying an Impressive Stabilizer on Oil and Non-oil Phases of Tahini and Investigating Its Effects on the Viability of Free and Encapsulated Probiotics

*Barzegariardakani A[1], Soleimanian-zad S[*2], Mossadegh M[3]*

1- Msc, Dept. of Food Science and Technology, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

*2- * Corresponding author: Prof., Dept. of Food Science and Technology, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. Email: Soleiman@iut.ac.ir*

3- Associate prof, Faculty of Pharmacy, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran

Received 16 Jul, 2022 **Accepted 2 Oct, 2022**

Background and Objectives: Despite unique characteristics of tahini, adequate biotechnical studies have not been carried out on tahini. In recent decades, functional food production such as probiotics has increased because of positive effects on the consumer health. Studies have verified that probiotics do not include appropriate survivability in fat ambiences. Hence, the present study was carried out for the first time with the objective of functional tahini production with appropriate survivability of its probiotics.

Materials & Methods: Probiotic tahini was produced using encapsulated and free *Lactobacillus plantarum* subspecies PTCC 1896. Additionally, effects of sorbitan three stearate and glycerol on the oil migration and rheology of tahini were assessed using rheometer and centrifuge. Water/oil emulsification method with sodium-alginate, modified starch and sesame oil was used for the probiotic encapsulation.

Results: In the equal quantity of sorbitan three stearate and glycerol, sorbitan three stearate has shown further effects on oil migration while increased the viscosity significantly. After comparison of 0.25, 0.5 and 0.75% additions of the highlighted compounds to tahini for their effects on oil migration and viscosity, 0.5% glycerol was selected to increase the bacterial survivability. At the end of storage time, the most probiotic survivability belonged to tahini, which contained glycerol and encapsulated probiotics (1.2×10^7).

Conclusion: *Lactobacillus plantarum* subspecies PTCC 1896 encapsulation via emulsion method and addition of it to tahini containing 0.5% glycerol produced functional tahini with 10^6–10^7 CFU/g alive bacteria.

Keywords: Tahini, Phase separation, Probiotics, *Lactobacillus plantarum*, Encapsulation