**مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران**
**سال یازدهم، شماره 4، زمستان 1395، صفحات 106-99**

# ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با روش امولسیون در تولید نان پروبیوتیک

هاجر یوسفی[1]، صبیحه سلیمانیان زاد[2]، محمد شاهدی باغ خندان[3]

1- نویسنده مسئول: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران
پست الکترونیکی: yousefi_shokouh@yahoo.com

2- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

3- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: 95/1/28 تاریخ پذیرش: 95/5/4

## چکیده

**سابقه و هدف:** به دلیل حرارت بالای پخت نان و مرگ پروبیوتیک‌ها در طول پخت، تهیه نان پروبیوتیک حاوی باکتری‌های زنده گسترش چندانی نیافته است. در این تحقیق، برای افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها حین پخت نان، از ریزپوشانی به روش امولسیون استفاده می‌شود.

**مواد و روش‌ها:** باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 با غلظت‌های مختلف آلژینات سدیم و نشاسته ذرت ریزپوشانی شد. ریزپوشینه‌ها با اجزای خمیر، مخلوط و نان تهیه شد. pH نان و تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده پس از پخت نان تعیین شد. اندازه ذرات ریزپوشینه ای که بیشترین تعداد باکتری زنده را در نان حفظ کرده بود؛ تعیین شد. همچنین بافت نان در سه زمان 0، 24 و 48 ساعت پس از پخت، در دمای 25 درجه سانتی‌گراد ارزیابی گردید.

**یافته‌ها:** pH نان در محدوده مناسب برای زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها و پایداری ریزپوشینه‌ها قرار داشت. ریزپوشانی تأثیر معنی‌داری در زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها حین پخت نان، داشت ($p<0/05$) و تعداد باکتری‌های زنده را نسبت به نمونه شاهد، بین 2-1 سیکل لگاریتمی، افزایش داد. بیشترین تعداد باکتری زنده در نان، 5/70 سیکل لگاریتمی بود که تا میزان لازم برای ایجاد خواص پروبیوتیک، اختلاف کمی داشت (6 سیکل لگاریتمی). اندازه ذرات این ریزپوشینه، 29/34 ± 329/85 میکرومتر بود. همچنین وجود ریزپوشینه‌ها، باعث نرم‌تر شدن بافت نان، نسبت به نمونه شاهد گردید ($p<0/05$).

**نتیجه‌گیری:** روش امولسیون ضمن حفظ کیفیت مناسب در نان، می‌تواند به عنوان روشی برای افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در نان، مد نظر قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** پروبیوتیک، نان، ریزپوشانی، امولسیون، آلژینات سدیم

## • مقدمه

بر اساس تعریف ارائه شده از سوی سازمان بهداشت جهانی WHO و سازمان غذا و کشاورزی FAO، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورتی که به میزان کافی وارد بدن شوند؛ تأثیرات مفیدی بر سلامت مصرف‌کنندگان اعمال می‌نمایند که می‌توان به کاهش کلسترول خون، بهبود تحمل لاکتوز، پیشگیری از بروز سرطان، تقویت سیستم ایمنی، بهبود فلور میکروبی و بی نظمی‌های دستگاه گوارش اشاره نمود (3-1). از آنجایی که فرآورده‌های لبنی برای انتقال پروبیوتیک‌ها به بدن، بسیار ایده‌آل هستند؛ پروبیوتیک‌ها عمدتاً در فرآورده‌های لبنی مانند ماست، پنیر، بستنی و دیگر دسرهای لبنی وارد می‌شوند (1). اما فرآورده‌های لبنی، با محدودیت‌هایی از جمله وجود ترکیبات حساسیت زا، نیاز به انبارداری سرد، وجود لاکتوز، وجود کلسترول حیوانی، نیاز به محصولاتی با طعم‌های جدید و نیاز به فرآورده‌های پروبیوتیک غیر لبنی و مخصوصاً محصولات گیاهی مواجه هستند (4). همچنین پروبیوتیک‌ها به دلیل غلظت بالای اسید لاکتیک و استیک، وجود اکسیژن، پراکسید هیدروژن و pH پایین، زنده مانی کمی در محصولات لبنی دارند. این عوامل منجر به تولید محصولاتی با ماتریکس‌های مختلف مانند غلات، گردید (2). غلات، معمولاً

سوبستراهای مناسبی برای رشد پروبیوتیک‌هایی با منشا انسانی هستند و در مقایسه با شیر، میزان بیشتری ویتامین‌های ضروری، فیبر رژیمی، مواد معدنی مانند فسفر دارند. از پروبیوتیک‌ها در تولید پاستای فراسودمند استفاده شده است (5). رشد خوب پروبیوتیک‌ها در غلات نشان می‌دهد تلفیق سویه‌های پروبیوتیک با منشا انسانی در غلات تحت شرایط کنترل شده، غذاهای تخمیری با ویژگی‌های مطلوب فراهم می‌کند (3). از آنجایی که نان منبع کربوهیدرات پروتئین، مواد معدنی و ویتامین‌ها است؛ در بسیاری از کشورها غذای اصلی محسوب می‌شود. برای بهبود کیفیت و ارزش تغذیه‌ای نان، از روش‌های مختلفی استفاده شده، اما نان فراسودمند حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، به دلیل اثرات کشندگی حرارت بر آنها، گسترش چندانی نیافته است (6). از آنجایی که نان در اقصی نقاط دنیا مصرف‌کنندگان بسیاری دارد؛ وجود باکتری‌های پروبیوتیک در آن می‌تواند بر بهره‌مندی افراد مختلف جامعه از اثرات سلامت بخش این باکتری‌ها بیفزاید. از جمله تلاش‌های انجام گرفته در رابطه با تلفیق پروبیوتیک‌ها به نان، توسط Penhasi و همکاران (2010) انجام گرفت. آنها باکتری‌های پروبیوتیک را با استفاده از دستگاه پوشش دهنده با بستر سیال (Fluid bed coater) ، با چندین لایه پوشش دهی کردند و از ریزپوشینه‌های تولید شده، در فرآیند تهیه خمیر و پخت نان استفاده نمودند (7). Altamirano-Fortoul و همکاران (2012)، پروبیوتیک‌ها را در قالب فیلم خوراکی روی سطح نان نیم‌پز اسپری نمودند. آنها با استفاده از تکنیک ریزپوشانی با دستگاه خشک‌کن پاششی، باکتری‌های پروبیوتیک را با ترکیبات مختلفی مانند اینولین، پکتین، کربوکسی متیل سلولز، ایزوله پروتئین آب پنیر و شیره گیاه آگاو (Agave sap) ، ریزپوشانی کردند. سپس ریزپوشینه‌ها را در ترکیب با محلول حاوی نشاسته ذرت مقاوم قبل از پخت به صورت پوشش، در چند لایه روی سطح نان نیم پز منجمد اسپری کردند و نان فراسودمند حاوی باکتری پروبیوتیک تولید کردند (8). همچنین، گنجوری و همکاران (1391) با استفاده از باکتری اسپوردار *باسیلوس کواگولانس*، بدون ریزپوشانی نان پروبیوتیک تولید کردند (9). در تحقیق حاضر نیز، از نان به عنوان بستر انتقال دهنده پروبیوتیک‌ها به بدن استفاده شده و سعی بر آن است با استفاده از تکنیک ریزپوشانی با روش امولسیون، تعداد باکتری‌های زنده پس از فرآیند پخت، به تعداد لازم برای ایجاد خواص پروبیوتیک در نان، حفظ شوند. روش امولسیون، یکی از رایج‌ترین روش‌های ریزپوشانی است. مزیت این روش، سهولت انجام در مقیاس صنعتی و حفظ بقای بالا برای پروبیوتیک‌هاست. از آنجایی که نان قوت غالب مردم جامعه را تشکیل می‌دهد؛ سعی بر آن است که فرآیند تولید نان فراسودمند حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، به روش تولید نان‌های معمول در صنعت شبیه باشد و تا حد امکان با فرآیندها و ترکیبات در دسترس انجام گیرد. همچنین، علاوه بر زنده‌مانی، pH و بافت نان حاوی باکتری‌های پروبیوتیک نیز، ارزیابی می‌شود.

از آنجایی که نان در اقصی نقاط دنیا، مصرف کنندگان بسیاری دارد؛ وجود باکتری های پروبیوتیک در آن می تواند بر بهره مندی افراد مختلف جامعه، از اثرات سلامت بخش این باکتری‌ها بیفزاید. در تحقیق حاضر، از نان به عنوان بستر انتقال دهنده پروبیوتیک ها به بدن استفاده شده و سعی بر آن است با استفاده از تکنیک ریزپوشانی با روش امولسیون، تعداد باکتری های زنده پس از فرآیند پخت، به تعداد لازم برای ایجاد خواص پروبیوتیک در نان، حفظ شوند.

## • مواد و روش‌ها

**فعال‌سازی و آماده‌سازی کشت میکروبی:** میکروارگانیسم به کار رفته در این پژوهش، باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 بود که در سال 1388، توسط میرلوحی، از دستگاه گوارش یک کودک نوزده ماهه ایرانی، جداسازی و خواص پروبیوتیکی آن اثبات گردیده بود (10). پس از فعال‌سازی کشت میکروبی، از لوله‌های حاوی میکروب فعال، مقدار 2 درصد به 250 میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع استریل (Himedia، هندوستان) تلقیح شد و 18 ساعت (تا رسیدن به انتهای فاز لگاریتمی و شروع فاز سکون) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی (5 درصد $CO_2$) گرمخانه گذاری گردید. پس از گذشت 18 ساعت، رسوب میکروبی (Pellet) با استفاده از سانتریفیوژ (سیگما، آمریکا) با سرعت 4500 rpm و دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه، جدا و دو بار با سرم فیزیولوژی 0/9 درصد استریل با دما، سرعت و زمان ذکر شده در قبل شستشو داده شد و در پایان با 10 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی، رقیق گردید تا به صورت سوسپانسیون در آید.

**ریزپوشانی:** ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7، بر اساس روش امولسیون ارائه شده توسط Sheu و Marshall (1993) و همچنین Sultana و همکاران (2000) انجام شد (12 و 11) . به این منظور10 میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده در مرحله قبل (با شمارش میکروبی 10 سیکل لگارتیمی)، به 50 میلی‌لیتر محلول استریل، حاوی غلظت‌های مختلف آلژینات سدیم (فلوکابیوکمیک، آلمان) و نشاسته ذرت

(پارس استا، ایران) اضافه شد. فرمول به کار رفته در ساختار ریزپوشینه ها، در جدول 1 نشان داده شده است. این مخلوط، با استفاده از یک سرنگ استریل (لیفن، چین) در شرایط استریل، به صورت قطره قطره به 250 میلی‌لیتر روغن آفتابگردان (فامیلا، ایران) حاوی 0/02 درصد توئین 80 (مرک، آلمان)، اضافه گردید. به منظور تشکیل امولسیونی از نوع آب در روغن با بافت یکنواخت، مخلوط حاصل به مدت 20 دقیقه روی همزن مغناطیسی دیجیتال (فن آزما گستر، ایران) با سرعت 200 rpm قرار گرفت تا دو فاز آلی و آبی آن کاملاً با یکدیگر مخلوط شوند. برای شکل‌گیری ریزپوشینه‌ها و شکستن امولسیون، 250 میلی‌لیتر محلول کلرید کلسیم (مرک، آلمان) 0/1 مولار با دمای 4 درجه سانتی‌گراد، به آرامی از یک طرف ظرف به امولسیون اضافه و امولسیون به مدت 5 دقیقه با سرعت 100 rpm روی همزن مغناطیسی دیجیتال، با محلول کلرید کلسیم مخلوط شد. پس از اتمام زمان مخلوط شدن، 30 دقیقه زمان داده شد تا ریزپوشینه‌ها در کف ظرف ته نشین شوند. پس از ته نشین شدن کامل ریزپوشینه ها، لایه روغنی جدا و ریزپوشینه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با شتاب g × 350 در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه، از فاز آبی جمع‌آوری شدند. ریزپوشینه‌های تهیه شده، دو بار با سرم فیزیولوژی 0/9 درصد با استفاده از سانتریفیوژ، شسته شد تا روغن باقیمانده بین ذرات خارج شود. در انتها، به منظور خارج کردن سرم اضافی، ریزپوشینه‌ها با کاغذ صافی استریل، صاف و تا زمان استفاده در مراحل بعدی آزمایش در ظروف شیشه‌ای استریل، در یخچال نگهداری شدند.

**جدول1.** فرمول به کار رفته در تهیه ریزپوشینه ها

| تیمار | فرمولاسیون ریزپوشینه |
|---|---|
| T1 | CS %1+NaAL%0/5 |
| T2 | CS %1 +NaAL%1 |
| T3 | CS %1+NaAL%2 |
| T4 | CS %2+NaAL%0/5 |
| T5 | CS %2+NaAL%1 |
| T6 | CS %2+NaAL%2 |

Na-AL : آلژینات سدیم، CS: نشاسته ذرت

**تهیه نان**: بر اساس فرمولاسیون تهیه نان‌های حجیم صنعتی، 1/5 درصد مخمر (رضوی، ایران)، 1/5 درصد نمک و شکر (نقش جهان، ایران) و 0/7 درصد پودر بهبود دهنده (نان افزا، ایران) در حجم 50 گرم آرد مخصوص نان حجیم (حاصل از گندم اهواز)، تهیه و با هم مخلوط شدند. با استفاده از فارینوگراف، میزان جذب آب آرد به ازای هر 100 گرم، 58 سی سی محاسبه شد. پس از مخلوط کردن مواد خشک، 20 گرم ریزپوشینه با آب لازم برای تهیه خمیر، مخلوط و به مواد خشک اضافه گردید. به منظور تهیه نمونه شاهد، از سوسپانسیون فعال میکروبی بدون ریزپوشانی (با شمارش میکروبی برابر با ریزپوشینه ها)، در تهیه خمیر و نان استفاده شد. پس از مخلوط کردن مواد و ورز دادن، خمیر حاصل به مدت 40 دقیقه در گرمخانه با دمای 37 درجه سانتی‌گراد در حضور بخار آب داغ، قرار داده شد. دمای پخت نان حجیم در صنعت، بالاتر از 200 درجه سانتی‌گراد است (250-230 درجه). با توجه به تأثیر دمای پایین و زمان طولانی حرارت دهی در کاهش مرگ میکروارگانیسم‌ها در برابر حرارت، در این تحقیق سعی شد تا حد امکان از دمای پایین در پخت نان استفاده شود. پس از بررسی چندین دما و زمان پخت با حفظ کیفیت نان و نیز بررسی مطالعات انجام گرفته، در نهایت دمای 180 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه برای پخت انتخاب شد. از این رو پس از ور آمدن، خمیر در فری که از نیم ساعت قبل در دمای 180 درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود؛ به مدت 20 دقیقه پخت گردید.

**تعیین pH نان:** پس از پخت نان و سرد شدن،10 گرم از نان خرد شده و 100 میلی‌لیتر آب مقطر جوشیده سرد به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت 10دقیقه در Stomacher (سوآرد، انگلستان) با سرعت 230 rpm، قرار گرفت. پس از ته نشین شدن مواد، pH نان با استفاده از pH متر (اینولب، آلمان) اندازه گیری شد (13).

**ارزیابی بافت نان:** به منظور حفظ شرایط نگهداری نان حجیم، نان‌ها پس از پخت در پلاستیک و در دمای محیط (25 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد و بافت نان تهیه شده، با استفاده از دستگاه اینسترون (1140، انگلستان) آزمون نفوذ سنجی (penetration test) در سه زمان بلافاصله پس از پخت، 24 و 48 ساعت پس از پخت، ارزیابی گردید (14). برای انجام این آزمون، از پروب استوانه ای شکل به قطر 3 میلی‌متر استفاده شد. حداکثر نیروی اعمال شده، در فرمول زیر قرار گرفت و مقاومت بافت نان در برابر نیروی اعمال شده بر حسب $N/mm^2$ محاسبه گردید.

$$P = \frac{f}{\pi r2}$$

در این فرمول، P بیانگر مقاومت بافت نان در برابر نفوذ پروب، f حداکثر نیروی وارد شده بر حسب نیوتن، r شعاع پروب بر حسب میلی‌متر و π برابر 3/14 می‌باشد.

**تعیین تعداد باکتری پروبیوتیک زنده در نان**: پس از نمونه‌برداری برای تعیین pH و ارزیابی بافت، مابقی نان خرد شده و در کیسه استوماکر، با 9 برابر حجم خود با بافر فسفات

سدیم (pH=7) رقیق شد. کیسه‌ها به مدت 20 دقیقه در استوماکر با سرعت 230 rpm قرار گرفتند و پس از ته نشین شدن مواد، 1 سی‌سی از مایع رویی بر روی سطح آگار جامد کشت داده شد (7). پلیت‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی (5 درصد $CO_2$)، گرمخانه گذاری (نیوایر، آمریکا) گردید. پس از شمارش تعداد باکتری زنده در هر نمونه، ریزپوشینه ای که بیشترین تعداد باکتری پروبیوتیک را پس از پخت نان حفظ کرده بود؛ به عنوان نمونه بهینه انتخاب شد.

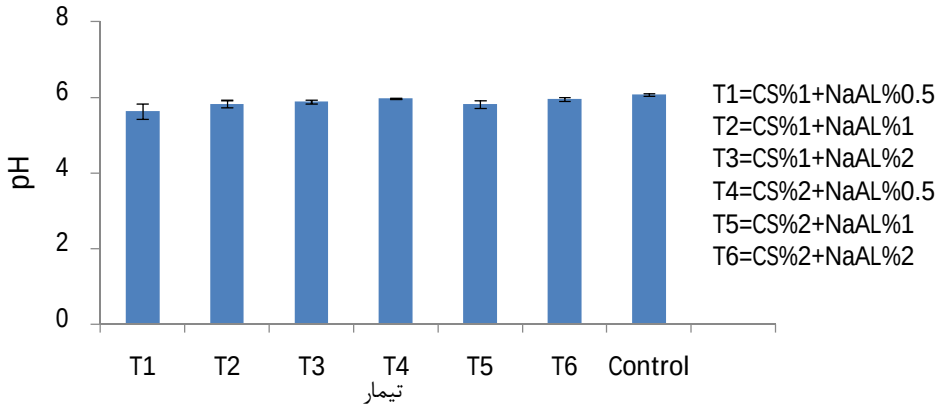
**بررسی اندازه ریزپوشینه ها:** پس از انتخاب نمونه بهینه، 0/5 گرم از ریزپوشینه در 10 سی‌سی محلول 0/1 درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS)، غوطه‌ور و به مدت 15 دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. به منظور جدا شدن کامل ریزپوشینه‌ها از یکدیگر، محلولSDS حاوی ریزپوشینه‌ها به مدت 24 ساعت در یخچال قرار گرفت. سپس با تزریق محلول حاوی ریزپوشینه به دستگاه اندازه گیری توزیع اندازه ذرات (هوریبا، ژاپن)، میانگین اندازه ریزپوشینه تعیین شد (15).

**آنالیز آماری داده‌های حاصل:** کلیه آزمون‌های انجام شده در مراحل تهیه خمیر و نان، در سه تکرار انجام و از داده‌های به دست آمده، میانگین‌گیری شد. داده‌های حاصل، با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 به صورت طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل، آنالیز شد و مقایسه میانگین‌ها در سطح 5 درصد با استفاده از آزمون LSD انجام گرفت.

## • یافته‌ها

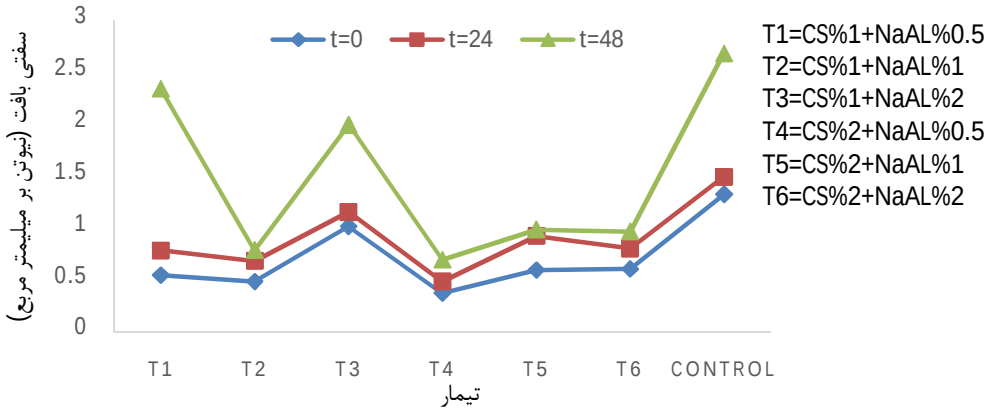
**pH:** نتایج به دست آمده از اندازه گیری pH نان، در شکل1 ارائه شده است. با توجه به pH به دست آمده برای نان‌های حاصل در این تحقیق، می‌توان انتظار داشت این نان به لحاظ pH، می‌تواند حامل مناسبی برای انتقال باکتری‌های پروبیوتیک، (اعم از ریزپوشانی شده و نشده)، به بدن باشد.

**ارزیابی بافت نان:** همان‌طور که از شکل 2 مشاهده می‌شود، در طول 48 ساعت انبارداری در دمای محیط، بافت تمام نان‌ها سفت شده، اما در هر سه زمان، بافت نمونه شاهد نسبت به نان‌های حاوی باکتری ریزپوشانی شده، سفت‌تر بوده است ($p<0/05$).




Na-AL: آلژینات سدیم، CS: نشاسته ذرت

**شکل 1.** نتایج حاصل از اندازه گیری pH نان. نتایج، میانگین سه تکرار به صورت میانگین± انحراف معیار می‌باشد.

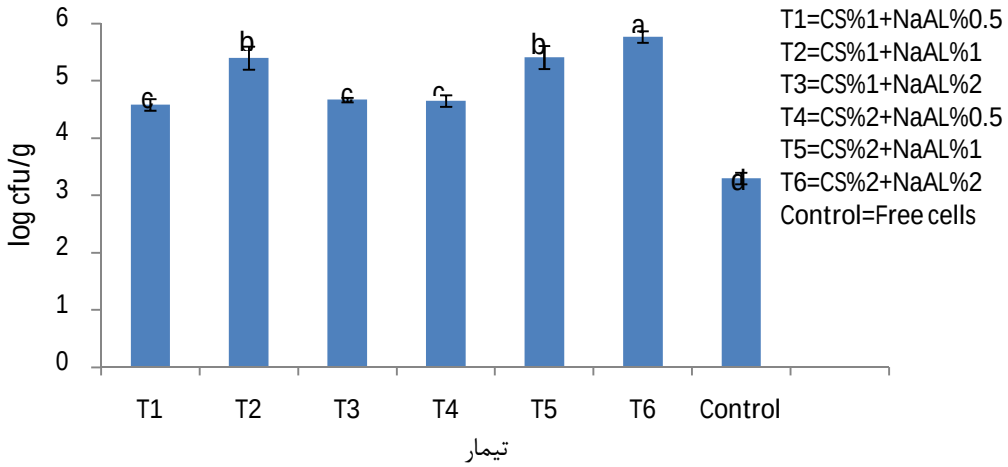



Na-AL: آلژینات سدیم، CS: نشاسته ذرت

**شکل2.** سفتی بافت نان در طول 48 ساعت انبارداری در دمای 25°C، در مقایسه با نمونه شاهد

**تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده در نان:** شکل 3، نتایج حاصل از شمارش سلول‌های زنده را پس از پخت نان، نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ریزپوشانی با روش امولسیون، تعداد باکتری‌ها را نسبت به نمونه فاقد ریزپوشینه (شاهد)، بین 2-1 سیکل لگاریتمی افزایش داده است ($p<0/05$). کمترین تعداد باکتری زنده در نمونه شاهد (3/3 سیکل لگاریتمی) و بیشترین تعداد، در نمونه 6 (5/7 سیکل لگاریتمی) مشاهده شد. ریزپوشینه های تهیه شده با غلظت پایین آلژینات سدیم (0/5) و ریزپوشینه هایی که در آن، غلظت نشاسته ذرت کمتر از میزان آلژینات سدیم بود؛ تأثیر کمی در زنده‌مانی باکتری‌ها حین پخت نان داشتند.

**اندازه ذرات ریزپوشینه:** همان‌طور که ذکر شد؛ ریزپوشینه‌های تهیه شده با غلظت 2 درصد نشاسته ذرت و آلژینات سدیم، حین پخت نان بیشترین باکتری پروبیوتیک را حفظ کرد. اندازه ذرات این ریزپوشینه، با استفاده از دستگاه اندازه گیری توزیع اندازه ذرات، 29/34 ± 329/85 میکرومتر تعیین شد.




نتایج، میانگین سه تکرار به صورت میانگین± انحراف معیارمی باشد. حروف انگلیسی متفاوت، نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می‌باشد ($p<0/05$).

**شکل3.** تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده در نان. Na-AL : آلژینات سدیم، CS: نشاسته ذرت

## • بحث

pH به دست آمده در نان های حاصل از این تحقیق، در دامنه مناسب برای زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک و ریزپوشینه‌ها می‌باشد (شکل 1). pH محصول نهایی در فرآورده‌های تخمیر شده غلات، از عوامل مؤثر بر زنده مانی پروبیوتیک‌ها است که باید مد نظر قرار گیرد (3). فرمول‌های غذایی با دامنه pH مناسب، pH دستگاه گوارش را افزایش داده و از این طریق باعث افزایش بقای پروبیوتیک‌ها می‌شوند (16). تحقیقات انجام گرفته، زنده‌مانی کم پروبیوتیک‌ها را در فرآورده‌های لبنی، به دلیل pH پایین نشان داده‌اند (2). همچنین، در pH های اسیدی و پایین، زنجیره جانبی ماتریکس آلژینات تجزیه شده و کاهش وزن مولکولی منجر به آزادسازی سریع‌تر مولکول فعال درونی می‌شود (17). pH به دست آمده در نان‌های حاصل از این تحقیق، در دامنه مناسب برای زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک و ریزپوشینه‌ها می‌باشد (شکل 1).

هیدروکلوئیدها پلی ساکاریدهای محلول در آبی هستند که با تأثیر بر ساختار نشاسته، باعث توزیع و حفظ بهتر آب و متعاقباً کاهش سفتی مغز نان می‌شوند (18). نتایج حاصل از ارزیابی بافت نان، نشان داد ماهیت هیدروکلوئیدی ترکیبات به کار رفته در ریزپوشانی (آلژینات سدیم و نشاسته ذرت)، باعث نرم‌تر شدن بافت نان‌های حاوی باکتری ریزپوشانی شده نسبت به نمونه شاهد شده است (شکل 2).

باکتری‌ها در فاز سکون، در مقایسه با فاز لگاریتمی به تنش‌های اعمال شده حین فرآوری مقاومت بیشتری دارند (19). از این رو در این مطالعه، سوسپانسیون سلولی در آغاز فاز سکون مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از

بررسی میرلوحی و همکاران (2009)، باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*A7 در برابر تیمارهای حرارتی، از پایداری مناسبی برخوردار است. آنان اعلام کردند پایداری به دمای بالا، یک خصوصیت وابسته به سویه بوده و مختص این سویه بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌باشد (10). Zhang و همکاران (2014) در بررسی انجام گرفته در ارتباط با تلفیق بیفیدوباکترها به نان، اعلام کردند پس از یک کاهش اولیه در زنده‌مانی باکتری‌ها، با تداوم زمان حرارت دهی میزان مرگ باکتری‌ها کاهش می‌یابد (6). زیرا در پاسخ به افزایش ناگهانی دمای محیط، "پروتئین‌های شوک حرارتی" در سلول تولید می‌شود که باعث مقاومت نسبی باکتری‌ها در برابر حرارت می‌شوند (20، 6). به طوری که اعمال حرارت‌های پایین‌تر از دز کشندگی در فاز سکون، یکی از راه‌های افزایش مقاومت باکتری‌ها به حرارت می‌باشد (19). یکی دیگر از راه‌های افزایش مقاومت حرارتی باکتری‌ها، ریزپوشانی است. در ریزپوشانی با آلژینات سدیم و نشاسته ذرت، آلژینات سدیم تشکیل دهنده دیواره ریزپوشینه بوده و نشاسته ذرت نقش پرکننده را دارد که با پر کردن منافذ ریزپوشینه، باعث افزایش پایداری ریزپوشینه در شرایط تنش‌زا می‌شود (21، 12). ریزپوشینه های تهیه شده با غلظت 0/5 درصد آلژینات سدیم، تأثیر کمی در زنده‌مانی باکتری‌ها داشتند (شکل 3) . زیرا ریزپوشینه‌های حاصل از محلول آلژینات سدیم با ویسکوزیته پایین، پایداری مکانیکی و فیزیکی کمی دارند و با افزایش غلظت آلژینات سدیم و متعاقباً افزایش اندازه ریزپوشینه، زنده مانی باکتری افزایش می‌یابد (22). بیشترین تعداد باکتری زنده در ریزپوشینه ای مشاهده شد که غلظت آلژینات سدیم و نشاسته ذرت در آن، حداکثر بود (شکل 3). چون با افزایش غلظت محلول تشکیل دهنده ریزپوشینه، اندازه ریزپوشینه بزرگ شده و اثر حفاظتی آن بیشتر می‌شود (2). همان‌طور که در مقدمه مقاله ذکر شد، Penhasi و همکاران (2010) برای ریزپوشانی از دستگاه پوشش دهنده با بستر سیال و Altamirano-Fortoul و همکاران (2012)، از دستگاه خشک‌کن پاششی استفاده کردند (8، 7). ریزپوشینه‌های حاصل از دو روش ذکر شده، حالت خشک و فشرده دارند که حفاظت بیشتری برای باکتری فراهم می‌کند. آنها همچنین از چندین ترکیب برای ریزپوشانی استفاده کردند. در تحقیق حاضر، از روش امولسیون برای ریزپوشانی استفاده شد که ریزپوشینه‌های ژله‌ای با بافت نرم تولید می‌کند. همچنین ریزپوشینه تولید شده در این تحقیق، از نوع تک لایه بودند. بر اساس استاندارد سازمان بهداشت جهانی و سازمان غذا و داروی آمریکا، تعداد پروبیوتیک‌ها در ماده غذایی حامل آن، در لحظه مصرف باید حداقل $10^7$-$10^6$ cfu/g باشد (23). حداکثر تعداد باکتری زنده در نان در این تحقیق، 5/70 سیکل لگاریتمی بود که با میزان لازم برای استاندارد، اختلاف ناچیزی دارد. ریزپوشینه های تولید شده با روش امولسیون، از نوع شبکه‌ای هستند که در برابر فشار و عبور از دستگاه گوارش، مقاومت خوبی دارند (24). بنابراین، این احتمال وجود دارد که بتوان با پوشش دهی ریزپوشینه های حاصل از روش امولسیون و یا استفاده از ترکیبات دیگر (علاوه بر آلژینات سدیم و نشاسته ذرت) در ساختار ریزپوشینه ها، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده در نان را به 7-6 سیکل لگاریتمی رساند.

اندازه ذرات ریزپوشینه های بهینه، 329/85 ± 29/34 میکرومتر بود. Sultana و همکاران (2000) در ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* با استفاده از 2 درصد آلژینات سدیم و نشاسته ذرت، ریزپوشینه هایی با اندازه‌ای بین 1-0/5 میلی‌متر تولید کردند که تنها بخش کوچکی از ذرات، در اندازه بین 500 - 150 میکرومتر قرار داشت (12). از آنجایی که در مطالعه آنها به سرعت و زمان هم زدن اشاره نشده؛ کوچک‌تر بودن اندازه ریزپوشینه‌های حاصل در این تحقیق نسبت به انواع به دست آمده در روش Sultana و همکاران (2000) را، می‌توان به سرعت هم زدن امولسیون در این تحقیق مرتبط دانست. زیرا سرعت هم زدن با اندازه ریزپوشینه، نسبت عکس دارد و استفاده از سرعت بالا در هم زدن امولسیون، اندازه ریزپوشینه را کاهش می‌دهد (26، 25). Homayouni و همکاران (2007) اعلام کردند ریزپوشینه هایی با اندازه خیلی بزرگ، باعث نامناسب شدن بافت فرآورده‌های غذایی و مکمل‌های خوراکی میکروبی می‌شود و برای استفاده در فرآورده‌های غذایی، ریزپوشینه‌های با اندازه کمتر از 100 میکرومتر مناسب هستند (25). Penhasi و همکاران (2010) اندازه ریزپوشینه به کار رفته برای تولید نان پروبیوتیک را، حداکثر تا 1 میلی‌متر ذکر کردند (7). همان‌طور که ذکر شد، اندازه ریزپوشینه روی اثر حفاظتی ریزپوشینه در شرایط تنش‌زا مؤثر است و اندازه بزرگ ریزپوشینه، بقای پروبیوتیک را افزایش می‌دهد (2). از آنجایی که حین پخت نان، پروبیوتیک‌ها در معرض تنش حرارتی قرار می‌گیرند؛ اندازه بزرگ ریزپوشینه می‌تواند عامل مؤثری در افزایش پایداری ریزپوشینه‌ها و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک حین پخت نان باشد.

بر اساس استاندارد سازمان بهداشت جهانی و سازمان غذا و داروی آمریکا، تعداد پروبیوتیک ها در ماده غذایی حامل آن، در لحظه مصرف حداقل باید 107-106cfu/g باشد (23).

ریزپوشینه های تولید شده با روش امولسیون، از نوع شبکه ای هستند که در برابر فشار و عبور از دستگاه گوارش، مقاومت خوبی دارند (24). بنابراین، این احتمال وجود دارد که بتوان با پوشش دهی ریزپوشینه های حاصل از روش امولسیون و یا استفاده از ترکیبات دیگر (علاوه بر آلژینات سدیم و نشاسته ذرت) در ساختار ریزپوشینه ها، تعداد باکتری های پروبیوتیک زنده در نان را به 7-6 سیکل لگاریتمی رساند.

## • References


1. Cebeci A, Gurakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiol 2003; 20: 511–518.
2. Rokka S, Rantamäki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. Eur Food Res Technol 2010; 231:1–12.
3. Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella SS, Webb C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. Int. J. Food Microbiol 2002; 79: 131– 141.
4. Pereira FAL, Maciel TC, Rodrigues S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. Food Res. Int 2011; 44: 1276-1288.
5. Afshin pajouh R, Vakili Nezami A, Yahyavi M. Using the Microencapsulation in strengthening of Probiotic bacteria in Pasta Production. The 2 nd National Congress of Probiotic and Functional Foods; 2012 Nov 20-22; Tehran, Iran [in Persian].
6. Zhang L, Huang S, Kristina Ananingsih V, Zhou W, Dong Chen X. A study on *Bifidobacterium lactis* Bb12 viability in bread during baking. J. Food Eng 2014; 122: 33-37.
7. Penhasi A, Zorea Y, Zorea C. Process for preparing bakeable probiotic food. US 2010/0303962 A1 2010.
8. Altamirano-Fortoul R, Moreno-Terrazas R, Quezada-Gallo A, Rosell CM. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. Food Hydrocolloids 2012; 29: 166-174.
9. Ganjoori M, Mehrabian S, Akhavansepahi A. Enrichment breads, using of potential probiotic bacillus (Bacillus coagolans). Biotecnology Tarbiat Modares University 2012; 3(1): 37-46 [in Persian].
10. Mirlohi, M. Characterization *Lactobacillus plantarum* A7 as a probiotic native strain and its application as an adjunct culture in probiotic yoghurt. Isfahan: University of technology. College of Agriculture, Department of Food Science and Technology; 2009 [in Persian].
11. Sheu TY, Marshall RT. Micro-entrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. J. Food Sci 1993; 54: 557-561.
12. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int. J. Food Microbiol 2000; 62: 47–55.
13. Fik M, Surowka K, Maciejaszek I, Macura M, Michalczyk M. Quality and shelf life of calcium-enriched wholemeal bread stored in a modified atmosphere. J. Cereal Sci 2012; 56: 418-424.
14. Mikus L, Kovacova M, Dodok L, Medveďova A, Mikusova L, Sturdik E. Effects of enzymes and hydrocolloids on physical, sensory, and shelf-life properties of wheat bread.Chemical Papers 2013; 67: 292-299.
15. Yan Li X, Chen XG, Sun ZW, Park HJ, Cha DS. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. Carbohydrate Polym 2011; 83: 1479–1485.
16. Ranadheera RDCS, Baines SK, Adams MC. Importance of food in probiotic efficacy. Food Res. Int 2010; 43: 1-7.
17. Smidsrod o, Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. Trends Biotech 1990; 3: 71-78.
18. Guarda A, Rosell CM, Benedito C, Galotto MJ. Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. Food Hydrocolloids 2004; 18: 241–247 .
19. Kosin B, Rakshit SK. Induction of heat tolerance in autochthonous and allochthonous thermotolerant probiotics for application to white shrimp feed. Aqua 2010; 306: 302–309.
20. Fu N, Chen XD. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. Food Res. Int 2011; 44:1127-1149.
21. Wu Z, He Y, Chen L, Han Y, Li C. Characterization of *Raoultella planticola* Rs-2 microcapsule prepared with a blend of alginate and starch and its release behavior. Carbohydrate Polym 2014; 110: 259-267 .
22. Mandal S, Puniya AK, Singh K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. Int. Dairy J 2006; 16: 1190–1195.
23. Sidira M, Kandylis P, Kanellaki M, Kourkoutas Y. Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on volatile compounds of heat treated probiotic dry-fermented sausages. Food Chem 2015; 178: 201- 207.
24. Nazzaro F, Orlando P, Fratianni F, Coppola R. Microencapsulation in food science and biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 2011; 23:1–5.
25. Homayouni A, Ehsani MR, Azizi A, Yarmand MS, Razavi SH. Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads. Iran. Polym. J 2007; 16: 597-606.
26. José Martín M, Lara-Villoslada F, Adolfina Ruiz M, Encarnación Morales M. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. Innovative Food Sci. Emerg. Technol. 2015; 27: 15-25.

# Microencapsulation of Probiotics by Emulsion Method for Production of Probiotic Bread

*Yousefi H[1], Soleimanian-Zad S[2], Shahedi Bagh Khandan M[3]*

*1- *Corresponding author: M.Sc in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. E-mail: yousefi_shokouh@yahoo.com*

*2- Associate Professor, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran*

*3- Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran*

**Received 16 Apr, 2016** **Accepted 25 Jul, 2016**

**Background and Objectives**: Due to the high temperature and destruction of probiotics during baking, production of probiotic breads containing the viable bacteria has not been fully developed. In this study, to increase the viability of probiotics during bread baking, microencapsulation by emulsion method was used.

**Materials and Methods**: *L. plantarum* A7 was encapsulated by different concentrations of sodium alginate and corn starch. The microcapsules were mixed with dough ingredients, and the bread was prepared. The breads' pH and viable counts of probiotic bacteria were determined after baking. The particle size of microcapsule that kept the highest number of live bacteria in the bread was measured. Also the breads' texture at 0, 24 and 48 h storage (25°C) was evaluated.

**Results**: The obtained pH of breads was in the proper range to viability of probiotics and stability of microcapsules. The microencapsulation had significant effect on the viability of probiotics during bread baking ($p<0.05$), and microencapsulation could increase the number of alive bacteria in the bread (1-2 log in comparison to the free cells bacteria). The highest number of live bacteria after baking was 5.70 log cfu/g that had little difference with the standard range (6 log cfu/g). The particle size of this microcapsule was 329±29 µm. Furthermore, the encapsulated bacteria resulted into soft breads in comparison to the control sample ($p<0.05$).

**Conclusion**: The microencapsulation by emulsion method can be considered as an alternative to increase the viability of probiotic in bread with appropriate characteristics during storage.

**Keywords**: Probiotic, Bread, Microencapsulation, Emulsion, Sodium alginate