Archive of SID

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، سال چهارم، شماره ۱۳، صفحه۴۳-۳۱، پاییز ۱۳۹۵

اثر ریزپوشانی بر قابلیت زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده وتیمار حرارتی

جواد محمدی[1]، سعید میردامادی[2*]، مجید جوانمرد[3]، ملیحه صفوی[4]، علیرضا بصیری[5]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد، علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
2. دانشیار، پژوهشکده زیست فناوری، گروه زیست فناوری پزشکی و دارویی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
3. دانشیار، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، گروه صنایع غذایی و تبدیلی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
4. استادیار، پژوهشکده زیست فناوری، گروه زیست فناوری تبدیلی و زیست انرژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
5. استادیار، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، گروه صنایع غذایی و تبدیلی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

(تاریخ دریافت: **94/12/9**، تاریخ پذیرش: **95/6/14**)

چکیده

اثر مثبت ریزپوشانی بر قابلیت تحمل شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده توسط پروبیوتیک‌ها ثابت شده است. یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها هنگام عبور از دستگاه گوارش، pH پایین معده و وجود پروتئازها و املاح صفراوی است. به‌منظور افزایش زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی PTCC 1608 در شرایط معده و روده انسان این باکتری به‌وسیله آلژینات کلسیم ریزپوشانی و با کیتوزان پوشش داده شد. برای تعیین اندازه ریزپوشینه‌ها، میانگین اندازه با استفادهاز نرم افزار آنالیز تصویر محاسبه گردید. ریزپوشینه‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده در بازه‌های زمانی صفر، 15 ،30، 60 و120 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند ومیزان زنده‌مانی باکتری محاسبه گردید. نتایج نشان داد که ریزپوشانی با آلژینات کلسیم سبب کاهش میزان آسیب به باکتری‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده درحضور پپسین (pH =2) و در ادامه شرایط شبیه‌سازی شده روده درحضور پانکراتین و نمک صفراوی (pH =7/5) می‌شود به نحوی که ریزپوشانی با آلژینات کلسیم و پوشش‌دهی آن با کیتوزان باعث شد جمعیت باکتری‌های فعال ریزپوشانی شده پس از طی کردن شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده به 10^8 cfu/g برسد درحالی‌که در باکتری‌های آزاد این تعداد به 10^4 cfu/g رسید ($P< 0/05$). هم‌چنین مقاومت حرارتی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در دمای 50 درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری نداشته ولی در دمای 55 و60 درجه سانتی‌گراد حداکثر در مدت زمان کم‌تر از 15 دقیقه، ریزپوشانی می‌تواند اثر محافظتی بر باکتری داشته باشد. از نظر تورم ذرات ریزپوشینه، ذرات خشک شده به روش انجمادی سرعت تورم بالاتری نسبت به ذرات خشک شده در معرض جریان هوا دارند و ذرات آلژینات نیز نسبت به ذرات آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان به‌نسبت سرعت جذب آب و تورم بالاتری دارند.

واژه‌های کلیدی: آلژینات کلسیم، پروبیوتیک، ریزپوشانی، کیتوزان، لاکتوباسیلوس کازئی.

* نویسنده مسئول: mirdamadi@irost.ir

www.SID.ir

Archive of SID

1- مقدمه

کلمه پروبیوتیک[1] از واژه یونانی پروبیوس[2] به معنی حیات بخش[3] مشتق شده است. پروبیوتیک به ترکیبی گفته می‌شود که توسط یک میکروارگانیسم تولید شده و موجب تقویت رشد میکروارگانیسم‌های دیگر شود. براساس تعریف سازمان بهداشت جهانی به میکرارگانیسم‌های زنده‌ای که بتوانند پس از خورده شدن به تعداد کافی برابر با 10^7 cfu/g به روده کوچک رسیده و درآن‌جا مستقر شوند و خصوصیات سلامت افزای خود را بروز دهند، باکتری پروبیوتیک اطلاق می‌شود[1]. اثرات مثبت و سلامت بخش پروبیوتیک‌ها بر سلامتی انسان در اثر حفظ فلور طبیعی روده، کاهش کلسترول خون، خواص ضدسرطانی و تقویت سیستم ایمنی است[2، 3]. علاوه‌بر محصولات غذایی لبنی، پروبیوتیک‌ها در سایر غذاها مانند غذاهای پودری و غذای کودک به‌کار گرفته می‌شوند[4، 5]. در مواد غذایی پودری که به‌طور عمده بر پایه غلات‌اند، به دلیل مغذی نبودن محیط و هم‌چنین عدم فعالیت تخمیری و فعالیت آبی پایین، ریزپوشانی[4] تا حد زیادی می‌تواند باعث افزایش ماندگاری پروبیوتیک‌ها در برابر عوامل نامساعد گردد[5، 6]. عوامل متعددی بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک تاثیر گذارند که مهم‌ترین آن‌ها، دمای فرایند و انبارداری محصول، غلظت اسیدهای آلی محیط و pH ماده غذایی است [7-9].

میزان حساسیت باکتری‌های گرم مثبت به صفرا بسیار بیش‌تر از باکتری‌های گرم منفی است. طبق تحقیقات مارتئو و همکاران مقاومت باکتری‌های مواجه شده با صفرا در محیط آزمایشگاه، محیط شبیه‌سازی شده گوارش و در بدن موجود زنده متفاوت است[10]. تنش‌هایی مثل سرما یا pH کم می‌تواند میزان زنده‌مانی باکتری در مواجه با صفرا در روده کوچک را به طرز معنی‌داری کاهش دهد[11]. البته ماتریکس شبکه غذا در برخورد ناگهانی و مستقیم باکتری با صفرا و اثر ممانعتی آن از این برخورد نیز بر میزان اثر صفرا بر باکتری موثر است[12]. در اصل ریزپوشانی به معنای ایجاد یک مانع فیزیکی در اطراف ماده مورد نظر به منظور اجتناب از انجام واکنش‌های شیمیایی و یا رهاسازی کنترل شده ماده تحت شرایط خاص می‌باشد که از این طریق ذراتی با قطر چند نانومتر تا یک میلی‌متر تولید می‌شود [13-15].

به‌طور کلی برای افزایش پایداری در برابر حـرارت از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. روش‌هایی مانند اضافه کردن ترکیبات محافظ به کشت، اعمال حرارت‌های پایین‌تر از دز کشندگی قبل از تیمار حرارتی، اعمال تنش‌های اسمزی در دز پایین‌تر از کشندگی مانند در معرض قراردادن کشت با نمک‌های صفراوی، نمک طعام و آب اکسیژنه و ریزپوشانی بیش‌ترین کاربرد را دارند[16، 17]. ریزپوشانی با استفاده از ترکیبات عایق نسبت به حرارت و ترکیباتی مانند لیپیدها و پلیمرهای زیستی با قابلیت انتقال حرارت کم و نقطه ذوب بالا نیز می‌تواند با ایجاد محیطی با رطوبت پایین و بی هوازی برای پروبیوتیک‌ها، پایداری آن‌ها در برابر حرارت را افزایش دهد[18].

مهم‌ترین جنس‌های پروبیوتیک مربوط به دو جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم است. لاکتوباسیلوس کازئی یک باکتری پروبیوتیک، گرم مثبت، هتروفرمنتاتیو، میله‌ای، غیراسپورزا، غیرمتحرک و تولیدکننده اسید لاکتیک L(+) بوده[19] و از دیگر ویژگی‌های آن بهبود سیستم ایمنی بدن [20] و فعالیت ضدباکتریایی علیه اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم و استافیلو کوکوس اورئوس است [21].

مزایای ریزپوشانی شامل محافظت از سلول در برابر اثر کشنده اکسیژن، محافظت از سلول در برابر میزان بالای اگزوپلی ساکاریدها، افزایش بقا در برابر انجماد و گرما، افزایش بقا در برابر باکتریوفاژها و بهبود بقا در طول دوره انبارمانی است [22، 23].

ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها و استفاده از آن‌ها در مواد غذایی مختلفی مانند ماست، شیر، بستنی و محصولات بر پایه غلات صورت گرفته است[24-27]. پر کاربردترین ماده برای ریزپوشانی آلژینات کلسیم است که از جلبک‌های قهوه‌ای استخراج شده و دارای دو واحد D مانورونیک اسید و L گلوکورونیک اسید است که با پیوندهای گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند. مزایای آلژینات شامل قیمت پایین، سمی نبودن و سهولت کار با آن است [28].کیتوزان پلی ساکاریدی خطی است که از واحدهای گلوکز آمین تشکیل شده ولی به

1. probiotic
2. probios
3. for life
4. Microencapsulation

www.SID.ir

Archive of SID

تنهایی برای ریزپوشانی کارایی ندارد و به‌طور معمول به عنوان پوشش برای ریزپوشینه‌ها به‌کار می‌رود. ریزپوشانی آلژینات و کیتوزان باعث افزایش مقاومت ریزپوشینه‌ها در برابر اسید معده می‌شود[29، 30].

ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با استفاده از آلژینات و کیتوزان باعث افزایش مقاومت ریزپوشینه‌ها در مقابل اسید معده می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که کیتوزان با وزن مولکولی کم‌تر نسبت به نوع با وزن مولکولی بیش‌تر، در هنگام آزادسازی پروبیوتیک‌ها از ریزپوشینه‌ها کارآمدتر هستند[29، 30]. آلژینات در محیط اسیدی به صورت پوسته متخلخل نامحلول پلی آلژینیک اسید در می‌آید که با افزایش pH این پوسته به یک لایه محلول تبدیل و این لایه در محیط خنثی و قلیایی خیلی سریع حل می‌شود. مهم‌ترین خاصیت آلژینات توانایی تشکیل ژل در محیط معتدل با عواملی نظیر یون‌های دو ظرفیتی مانند کلسیم است. آلژینات در تماس با یون کلسیم یک شبکه سه بعدی تشکیل می‌دهد[31].

در دهه اخیر بارها از روش کمپلکس کردن پلی الکترولیت، هیدروژل‌های آلژینات-کیتوزان برای رهایش دارو استفاده شده است. پوشش‌دهی ذرات آلژینات با کیتوزان موجب افزایش بازدهی، چسبندگی زیستی ذرات و هم‌چنین توسعه رفتار تورم و رهایش ذرات حامل می‌گردد[32].

پرکاربردترین روش‌ها برای ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها روش امولسیون و روش اکستروژن است. در روش امولسیون به‌دلیل استفاده از روغن خوراکی هزینه عملیات بالا است و روش اکستروژن نیز به‌دلیل ایجاد ریزپوشینه‌های درشت و تاثیر آن بر احساس دهانی کارایی بالایی ندارد[33].

در این تحقیق گونه لاکتوباسیلوس کازیی 1608PTCC برای ریزپوشانی و تدوین شرایط به‌کارگیری آن به‌منظور استفاده در غذاهای پودری و خشک مانند غذای کودک انتخاب گردید و برای ریزپوشانی نیز از پیستوله[1] با ایجاد تغییراتی در ساختار آن استفاده شد که پیش از این، استفاده از آن برای ریزپوشانی گزارش نشده است. در ادامه تاثیر ریزپوشانی بر میزان قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده و مقایسه مقاومت حرارتی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده و هم‌چنین اندازه و شکل ریزپوشینه‌های ایجاد شده با استفاده از پیستوله بررسی شد. میزان تورم و جذب آب ریزپوشینه‌های خشک شده به روش خشک کردن انجمادی و خشک کردن در معرض جریان هوای محیط نیز مورد مقایسه قرار گرفت.

1. Spray gun

2- مواد و روش‌ها

2-1- تعیین اندازه، مورفولوژی و پوشش ذرات

اندازه ریزپوشینه‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olampious-T-25Y 2- Japan تعیین شد. میانگین قطر ذرات ریزپوشینه نیز با استفاده از نرم افزار آنالیز تصویری Leica Qwin 550 برای 120 ذره محاسبه گردید[34]. به‌منظور تعیین مورفولوژی و پوشش کیتوزان از میکروسکوپ الکترونی SEM استفاده شد. ذرات ریزپوشینه به‌وسیله چسب دو طرفه ثابت شده و به مدت 2 دقیقه با طلا و پالادیوم پوشش داده وسپس با میکروسکوپ (LEO 1450 VP Germany) مشاهده صورت گرفت[35].

2-2- آماده‌سازی کشت میکروبی

در این تحقیق ازسویه لاکتوباسیلوس کازئی Lctobacillus casei PTCC 1608 استفاده شد که از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های ایران-PTCC، واقع در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. نمونه تهیه شده در 50 میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع تلقیح و در مدت زمان 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و در شرایط هوازی تکثیر یافت. بیومس حاصل به‌منظور تهیه استوک‌های قابل نگهداری در فریزر با سانتریفیوژ کردن در 3000 g جداسازی شده و پس از دو بار شستشو با محلول 85/ درصد سدیم کلرید با 50 میلی‌لیتر محلول حاوی گلیسرول و شیر پس‌چرخ[1] به نسبت وزنی 30 به 20 مخلوط و در ویال‌های اپندورف تقسیم و به‌طور سریع به فریزر 80- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

2-3- محلول آلژینات

برای تهیه محلول آلژینات سدیم 2٪ w/v ابتدا مقداری آب مقطر را در ارلن ریخته سپس آلژینات سدیم (Merck) را به

1. Skim milk

www.SID.ir

Archive of SID

آن اضافه کرده و محلول را به حجم مورد نظر می‌رسانیم. سپس ارلن را بر روی همزن مغناطیسی قرار داده تا در اثر حرارت آلژینات به‌خوبی حل شود، بعد از این مرحله ارلن را به اتوکلاو 121/1 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه انتقال داده تا استریل گردد[33].

4-2- محلول کیتوزان

به‌منظور تهیه محلول کیتوزان w/v 1٪ ابتدا محلول 1% اسید استیک را تهیه و مقداری از آن را در ارلن ریخته و بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد سپس کیتوزان (Merck-low Molecular) را به آرامی به آن اضافه کرده تا در اثر حرارت به‌خوبی حل شود و با استفاده ازمحلول سود 1/. نرمال pH آن بر روی 6 تنظیم شد. سپس محلول حاصل به مدت 15 دقیقه در دمای 121/1 درجه سانتی‌گراد استریل گردید. [33، 36]

5-2- محلول شبیه‌سازی معده و روده

برای تهیه محلول شبیه‌سازی معده، محلول0/5 گرم برلیتر پپسین (SigmaAldrich P7000) در سالین w/v 0/5درصد را تهیه و pH آن با اسید کلریدریک بر روی2 تنظیم شد. برای تهیه محلول شبیه‌سازی شرایط روده نیز محلول 0/1 درصد پانکراتین (Sigma Aldrich P1500) و 0/8 درصد نمک صفراوی (Oxoid , Basingstoke , UK) را در سالین w/v 0/5 تهیه و pH آن برروی 7/5 تنظیم شد[37].

6-2- محیط کشت

محیط کشت MRS مصرفی به صورت ترکیبی و شامل پپتون (10 g/L)، عصاره مخمر(4 g/L)، گلوکوز (20 g/L)، دی پتاسیم هیدروژن فسفات(2 g/L)، سدیم استات (5 g/L)، تری آمونیوم سیترات (2 g/L)، سولفات منگنز (0/05 g/L)، منیزیم سولفات (0/2 g/L) و توئین80 (1 g/L) که با آب مقطر به حجم رسیده و سپس در اتوکلاو 121/1درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه استریل شد. لازم به ذکر است که تمامی مواد مصرفی از برند Merck تهیه گردید. برای تهیه محیط کشت جامد به میزان 1/5درصد آگار به محیط کشت اضافه و پس از حل شدن آن بر روی شعله عملیات استریلزاسیون انجام گرفت.

7-2- ریزپوشانی

به‌منظور ریزپوشانی از پیستوله استفاده شد. ابتدا 100 میلی‌لیتر از محلول 2 درصد آلژینات سدیم را با میکروارگانیسم حاصل از کشت باکتری در 50 میلی‌لیتر محیط کشت MRS محلول بر روی همزن مغناطیسی مخلوط و به میزان 1 درصد از حجم نهایی به آن شیر پس‌چرخ به عنوان ماده محافظت کننده از سرما[1] افزوده شد. سوسپانسیون حاصل به مخزن پیستوله منتقل و پس از عبور از نازل پیستوله وکاهش اندازه در اثر فشار جریان هوا، وارد مخزن حاوی محلول کلرید کلسیم 2 درصد مستقر بر روی همزن مغناطیسی شده و پس از 20 دقیقه تماس با محلول کلرید کلسیم با فیلتر کاغذی واتمن از محلول جداسازی انجام گرفت. فاصله نازل از محلول کلریدکلسیم 10 سانتی‌متر و سرعت همزن به گونه‌ای تنظیم شد که جریان آرامی از کلرید کلسیم ایجاد گردید. سپس ریزپوشینه‌ها با محلول 0/85 درصد کلرید سدیم شستشو داده شد تا محلول کلرید کلسیم حذف شود. شکل شماره (1) مسیر جریان سیال و هوارا نشان می‌دهد.

8-2- پوشش‌دهی

به‌منظور پوشش‌دهی ریزپوشینه‌های آلژینات کلسیم، ریزپوشینه‌های آلژینات کلسیم را به نسبت وزنی 1 به 5 با محلول کیتوزان یک درصد مخلوط کرده و پس از گذشت 30 دقیقه مجاورت با یکدیگر بر روی همزن مغناطیسی، فرایند جداسازی و شستشو با محلول 85/. درصد کلرید سدیم انجام گرفت [38، 39].

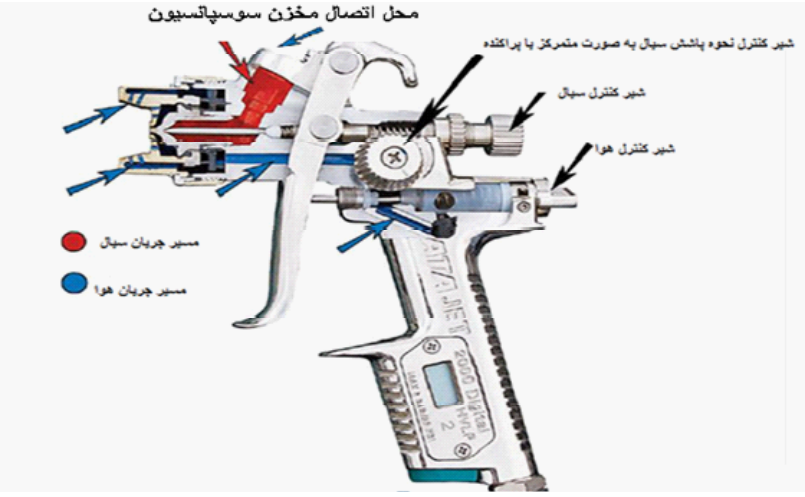
9-2-خشک کردن ریزپوشینه‌ها

نمونه‌های ریزپوشانی شده آلژینات و آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان پس از تهیه وارد خشک کن انجمادی[2] (Leybold-Heraeus/Gt3) شده و بعد از 24 ساعت از خشک‌کن خارج و آزمون‌های مورد نظر بر روی آن‌ها انجام گرفت. یک نمونه از ریزپوشینه‌های شکل گرفته نیز در معرض جریان

1. Cryprotectant
2. Freeze drying

www.SID.ir

Archive of SID



شکل (1) دیاگرام spray gun، مسیر عبور جریان هوا (آبی) و مسیر جریان سیال (قرمز) به همراه شیرهای کنترل کننده

ملایمی از هوای محیط (25درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و بعد از 24 ساعت آزمون تورم بر روی آن انجام شد.

2-10- شمارش باکتری‌های فعال

یک گرم از ریزپوشینه‌های حاصل از خشک‌کردن انجمادی با 9 میلی‌لیتر از محلول بافرفسفات سدیم (pH =7) مخلوط و برروی انکوباتور شیکردار قرار گرفت تا به‌طور کامل ریزپوشینه حل شده و باکتری‌های به دام افتاده آزاد شوند. بعد از این مرحله سریال رقت مناسب از محلول تهیه و بر روی محیط کشت جامد MRS در شرایط هوازی و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده و شمارش در 3 تکرار صورت پذیرفت.

2-11- آزمون شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده

به‌منظور مقایسه میزان مقاومت باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده با آلژینات و آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده انسان، 1گرم کپسول خشک را با آب مقطر مخلوط و به مدت 15 دقیقه به آن زمان داده تا آب به خود جذب کند. ریز پوشینه‌هایی که آب جذب کرده و متورم شدند به 5 میلی‌لیتر محلول شبیه‌سازی شده معده افزوده و محلول برروی انکوباتور شیکردار به مدت 2 ساعت قرار گرفت و بعد از 2 ساعت تماس باکتری و ریزپوشینه‌ها با محلول معده، 1 میلی‌لیتر از آن‌ها را با 9 میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات به‌منظور فرایند آزادسازی از ریزپوشینه، مخلوط و بر روی شیکر قرار داده وبرای بررسی میزان آسیب به باکتری‌ها پس از رقت سازی، نمونه‌ها را بر روی محیط MRS جامد کشت و مدت 24 تا 48 ساعت در انکوباتور قرار داده شد[37].

چهار میلی‌لیتر باقی‌مانده از مرحله آزمون معده با محلول شبیه‌سازی شده روده مخلوط و pH آن با محلول سود 0/1 نرمال به 7/5 افزایش یافت و حجم نهایی به 10 میلی‌لیتر رسانده شد. سپس نمونه‌ها را داخل انکوباتور شیکردار مانند مرحله شبیه‌سازی معده قرار داده، پس از گذشت 2و 4 ساعت، 1میلی‌لیتر از نمونه را وارد 9 میلی‌لیتر محلول بافر فسفات کرده تا ریز پوشینه آزاد گردد. بعد از این مرحله، نمونه‌ها برای بررسی میزان فعال ماندن برروی MRS جامد کشت داده شد و بعد از 24 تا 48 ساعت شمارش صورت گرفت[37].

2-12-آزمون مقاومت به حرارت

یک گرم ریزپوشینه خشک شده به روش خشک‌کن انجمادی را با آب مقطر مخلوط و اجازه داده تا کاملا متورم گردد.سپس حجم موردنظر را با آب مقطر به 10میلی‌لیتر رسانده و تیمار حرارتی در دماهای ۵۵، ۵۰ و60 درجه سانتی‌گراد و در زمان‌های صفر، 5، ۱۰،۲۰،۳۰،۶۰ و 120 دقیقه بررسی شد. پس از تیمار حرارتی 1 میلی‌لیتر از نمونه‌ها را وارد 9 میلی‌لیتر بافر فسفات کرده تا باکتری‌ها از ریزپوشینه رها شوند و بعد از رقیق سازی نمونه‌ها را بر روی MRS جامد کشت داده وبه مدت 24 تا 48 ساعت در انکوباتورقرار گرفت[40].

www.SID.ir

Archive of SID

2-13-آزمون مقایسه میزان تورم ذرات خشک شده

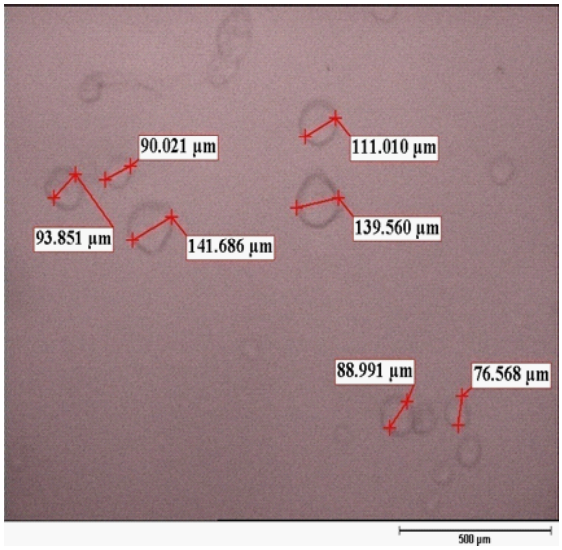
نمونه‌های خشک شده ریزپوشینه آلژینات و آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان را بر روی یک پلیت شیشه‌ای ریخته و در زیر میکروسکوپ نوری قرار گرفت و اندازه آن‌ها ثبت شد. سپس به این ریزپوشینه‌ها آب اضافه کرده و در مدت زمان صفر، 1، 5، 10 و 15 دقیقه میزان تورم آن‌ها ثبت گردید.

تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده ازآزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با 3 تکرار و با استفاده از نرم افزار DESIGN-EXPERT7 و مقایسه میانگین تیمارها به روش آزمون‌های چند دامنه‌ای دانکن صورت پذیرفت.

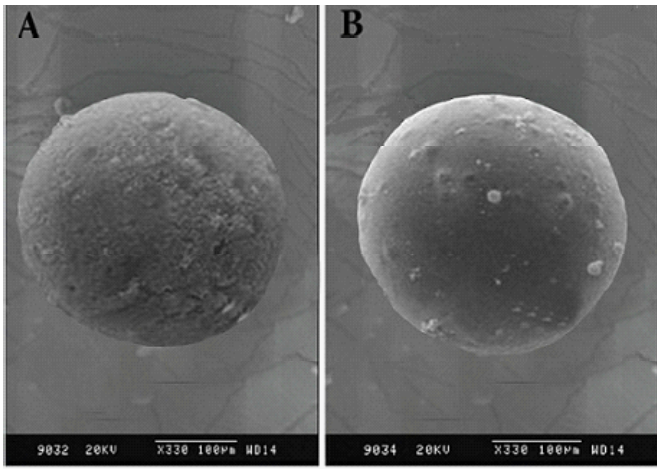
3- نتایج و بحث

3-1- بررسی اندازه و شکل ریزپوشینه‌ها

تصویر ریزپوشینه‌های شکل گرفته و اندازه آن‌ها در شکل (2) آمده است که اندازه آن‌ها بین 80 تا 150 میکرومتر است. شکل (3) نیز تصویر میکروسکوپ الکترونی است که پوشش کیتوزان بر روی ریزپوشینه آلژینات خشک شده در معرض جریان هوا را نشان می‌دهد. ریزپوشانی با استفاده از پیستوله موجب تشکیل ذراتی با قطر میانگین 98 میکرومتر شده که این عدد میانگین اندازه 120 ریزپوشینه بوده و مشاهده با میکروسکوپ الکترونی ایجاد کپسول‌های کروی را نشان می‌دهد. قطر ذرات شکل گرفته در این روش در مقایسه با روش‌های دیگر مانند روش



شکل (2) تصویرمیکروسکوپ نوری از کپسول‌های آلژینات کلسیم با بزرگنمایی×100



شکل (3) تصویر میکروسکوپ الکترونی A (آلژینات) B (آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان)

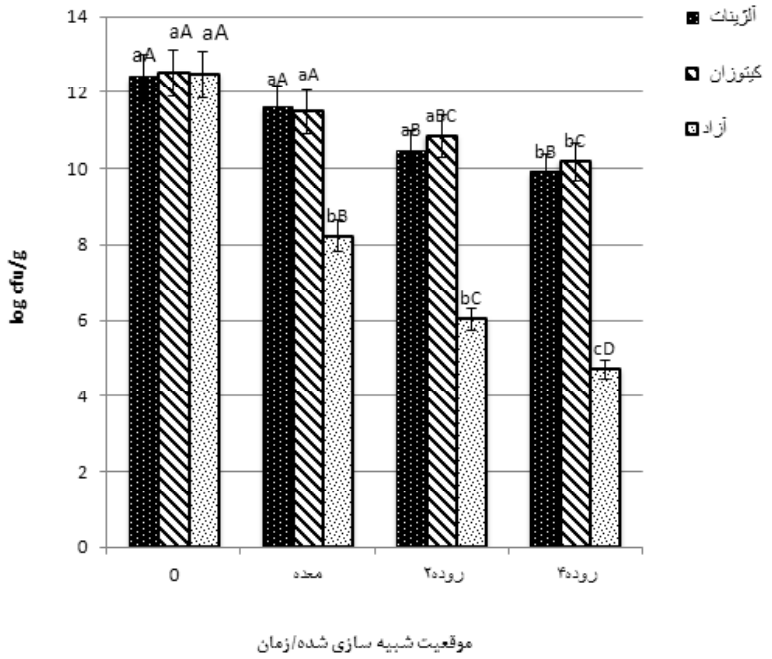
www.SID.ir

Archive of SID

اکستروژن که ذراتی در حد میلی‌متر ایجاد می‌کنند بسیار کم‌تر است[41]. در حالی‌که در مطالعه زنجانی و همکاران، میانگین اندازه ریزپوشینه‌های شکل گرفته با آلژینات-نشاسته و پوشش کیتوزان به روش امولسیون 123میکرومتر بوده است[42]. در بیان اهمیت اندازه ریزپوشینه‌ها باید گفت که اندازه ریزپوشینه بر بافت و احساس دهانی مصرف‌کننده محصول حاوی باکتری ریزپوشانی شده موثر است. ریزپوشینه‌های با اندازه خیلی بزرگ باعث نامناسب شدن بافت فراورده‌های غذایی می‌شود و به‌طور کل برای استفاده در فراورده‌های غذایی ریز پوشینه‌های با اندازه کم‌تر از 100 میکرومتر مناسب است [43، 44].

2-3- آزمون شبیه‌سازی شرایط روده ومعده

نتایج حاصل از آزمون شبیه‌سازی شرایط معده و روده در شکل(4) آمده و نشان دهنده کاهش شدید تعداد سلول‌های فعال در باکتری‌های بدون ریزپوشینه است. اثر ریزپوشانی بر فعال باقی ماندن باکتری‌ها در هر دو نوع ریز پوشینه آلژینات و آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان قابل توجه بوده و معنی‌دار است. تعداد اولیه سلول‌های لاکتوباسیلوس کازئی آزاد در حدود 10^{12} cfu/g بوده در حالی‌که پس از عبور از شرایط شبیه‌سازی شده معده به10^{8}، بعد از 2 ساعت اول شرایط شبیه‌سازی شده روده به 10^{6} cfu/gو بعد از 2 ساعت دوم روده این تعداد به 10^{4} cfu/g رسید که در سطح $p< 0/05$ تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد. در سلول‌های ریزپوشانی شده با آلژینات، سلول‌های فعال از 10^{12} cfu/g در ابتدا به 10^{11} cfu/g در شرایط شبیه‌سازی شده معده، 10^{10}cfu/g در 2 ساعت اول روده و 10^{9} cfu/g در 2 ساعت دوم روده رسید. در سلول‌های ریزپوشانی شده با آلژینات- پوشش داده شده با کیتوزان نیز جمعیت باکتری فعال از تعداد اولیه10^{12} به 10^{11} cfu/gدر شرایط شبیه‌سازی شده معده، 10^{10} cfu/g در2 ساعت اول روده و 10^{10} cfu/g در2 ساعت دوم روده رسید. به عبارتی ریزپوشانی می‌تواند در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده باعث افزایش فعال ماندن باکتری‌ها گردد و در حالی‌که سلول‌های آزاد پس از عبور از شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده 8 سیکل لگاریتمی کاهش یافتند، سلول‌های ریزپوشانی شده حدود 2 سیکل لگاریتمی کاهش را نشان می‌دهند. با قرار گرفتن ریزپوشینه‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده روده



شکل (4) log زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی به‌صورت آزاد، ریزپوشانی شده با آلژینات و ریزپوشانی شده با آلژینات-پوشش داده شده با کیتوزان در شرایط مشابه معده 2 ساعت، روده 2 ساعت و روده4 ساعت (حروف کوچک تفاوت معنی‌دار برای تاثیر نوع ریزپوشینه و حروف بزرگ اثر شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده، حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح $p<0/05$)

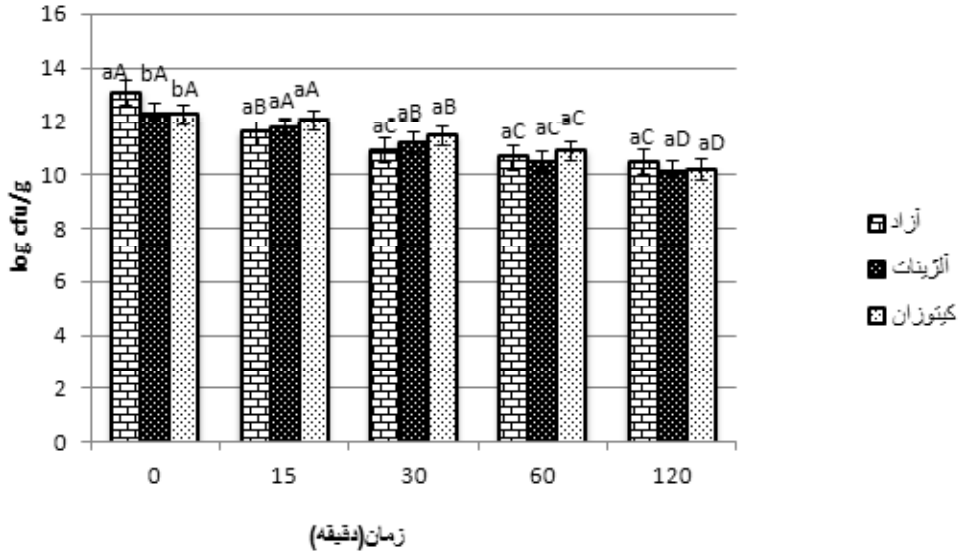
www.SID.ir

Archive of SID

مشخص گردید که قابلیت زیستی لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده به‌صورت متوالی، پایین‌تر از شرایط شبیه‌سازی شده معده است که عواملی مانند pH روده، حضور سورفاکتانت‌ها و املاح صفراوی باعث این کاهش می‌گردد[45]. با مقایسه بین باکتری‌های آزاد و ریزپوشینه شده مشاهده شد ریزپوشانی می‌تواند تا حد زیادی از باکتری‌ها در برابر عوامل نامساعد مانند شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده و حضور آنزیم‌ها محافظت کند. این نتایج با یافته‌های حاصل از تحقیقات منگژو مطابقت دارد[46]. مطالعات زنجانی و همکاران نیز اختلاف 5 سیکل لگاریتمی بین سلول‌های آزاد و ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس کازئی به‌وسیله آلژینات، اینولین و نشاسته مقاوم ذرت در برابر شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده در مدت زمان دو ساعت را نشان می‌دهد [47].

3-3- آزمون حرارت

شکل‌های 7-5 نتایج حاصل از آزمون مقاومت به حرارت را نشان می‌دهد که دمای 50 درجه سانتی‌گراد اثر تخریبی به مراتب کم‌تری نسبت به دماهای 55 و 60 درجه سانتی‌گراد دارد به این صورت که پس از 120 دقیقه حرارت دهی در دمای 50 درجه سانتی‌گراد تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده از 10^{12} به 10^{9} cfu/g رسیده و این میزان در دمای 55 درجه سانتی‌گراد برای باکتری های آزاد از 10^{13}به 10^{8} cfu/g و برای باکتری‌های ریزپوشانی شده از10^{12} به حدود 10^{8} cfu/g می‌باشد. در دمای 60 درجه سانتی‌گراد نیز باکتری های آزاد از 10^{13} cfu/g و ریزپوشینه‌ها ازحدود 10^{12} به 10^{5} cfu/g رسیدند. اثر تخریبی دمای 55 تا زمان 15 دقیقه کم است در حالی‌که در زمان‌های بالاتر این اثر تشدید شده و در دمای 60 درجه سانتی‌گراد در مدت زمان‌های کم‌تر از 15 دقیقه نیز اثر تخریبی زیادی ایجاد می‌شود. در بین دو نوع ریزپوشینه در مقاومت به حرارت تفاوتی وجود ندارد. داشتن پوشش چه از نوع آلژینات و چه از نوع آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان حداکثر در زمان‌های زیر 15 دقیقه می‌تواند تا حدودی اثر محافظتی در برابر حرارت داشته باشد. در ادامه حرارت دهی به دلیل نفوذ حرارت به لایه‌های عمقی ریزپوشینه، اثر محافظتی آن از بین می‌رود[48]. در مطالعه گووینند بابو با حرارت دهی لاکتوباسیلوس کازیی ریزپوشانی شده با آلژینات، اینولین و نشاسته مقاوم ذرت در دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 ساعت، 5 سیکل لگاریتمی از سلول های فعال کاهش یافته[40] و در مطالعه مندل و همکاران، ریزپوشانی لاکتوباسیلوس کازئی به‌وسیله آلژینات، مقاومت باکتری به



شکل(5) log زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی به‌صورت آزاد، ریزپوشانی شده با آلژینات و ریزپوشانی شده با آلژینات- پوشش داده شده با کیتوزان در دمای 50 درجه سانتی‌گراد و بازه زمانی 0 تا 120 دقیقه (حروف کوچک تفاوت معنی‌دار برای تاثیر نوع ریزپوشینه و حروف بزرگ اثر زمان حرارت دهی را نشان می‌دهد، حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح $p<0/05$)

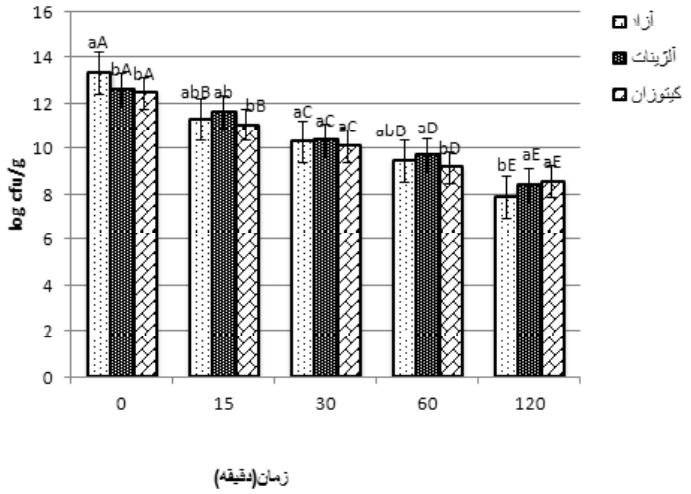
www.SID.ir

Archive of SID

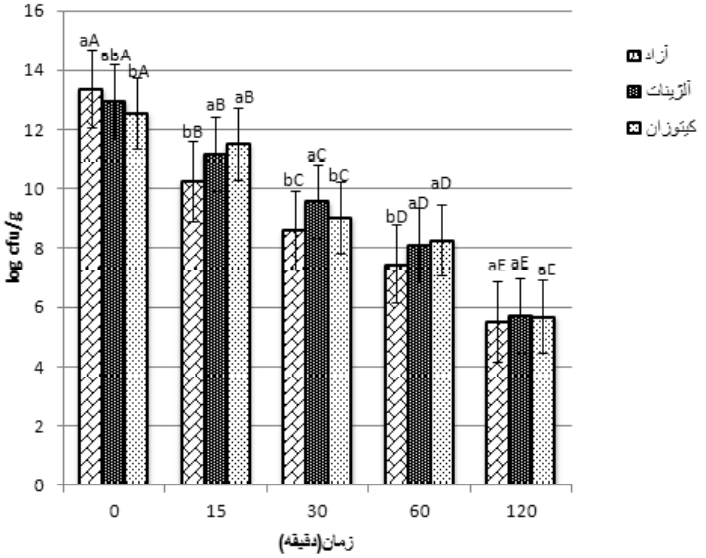
حرارت در دمای 55 درجه سانتی‌گراد را به مدت 20 دقیقه افزایش داده است[49]. لذا از آن‌جایی که به‌طور معمول تهیه غذاهای نیمه آماده و پودری و مرحله مخلوط کردن آن‌ها با آب در مدت زمان های کوتاه (کم‌تر از 15 دقیقه) انجام می‌گیرد، می‌توان نتیجه گرفت استفاده از آب با دمای حداکثر 55 درجه سانتی‌گراد در ماده غذایی، اثر تخریبی کمی بر میزان فعال باقی ماندن باکتری‌ها دارد و حداکثر یک سیکل لگاریتمی کاهش در جمعیت باکتری‌های فعال ایجاد می‌گردد.

4-3- آزمون تورم ذرات

شکل (8) نتایج آزمون تورم ذرات ریز پوشینه را در مدت زمان 15 دقیقه تماس با رطوبت در زیر میکروسکوپ نشان می‌دهد. که ذرات ریزپوشینه خشک شده به روش انجمادی به مراتب سرعت تورم بالاتری نسبت به ذرات خشک شده به



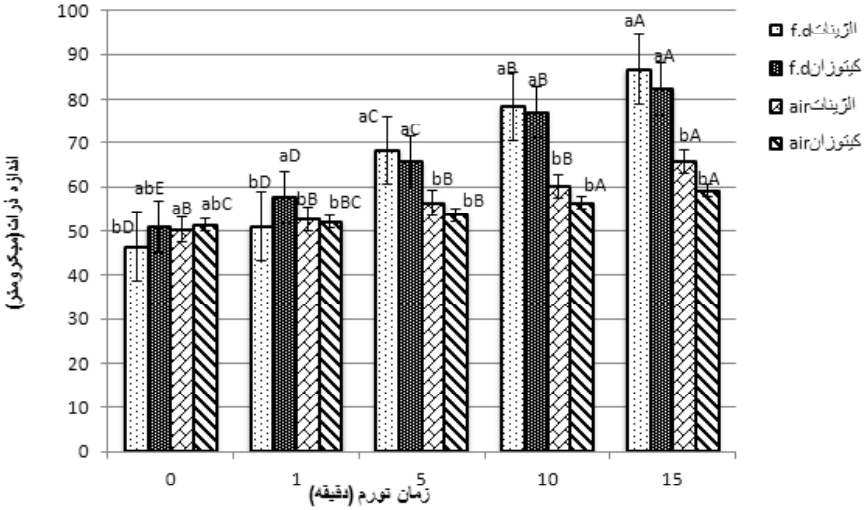
شکل(6) زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی به‌صورت آزاد، ریزپوشانی شده با آلژینات و ریزپوشانی شده با آلژینات-پوشش داده شده با کیتوزان در دمای 55 درجه سانتی‌گراد و بازه زمانی 0 تا 120 دقیقه (حروف کوچک تفاوت معنی‌دار برای تاثیر نوع ریزپوشینه و حروف بزرگ اثر زمان حرارت دهی را نشان می‌دهد، حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح $p< 0/05$)



شکل (7) زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی به‌صورت آزاد، ریزپوشانی شده با آلژینات و ریزپوشانی شده با آلژینات-پوشش داده شده با کیتوزان در دمای 60 درجه سانتی‌گراد و بازه زمانی 0 تا 120 دقیقه (حروف کوچک تفاوت معنی‌دار برای تاثیر نوع ریزپوشینه و حروف بزرگ اثر زمان حرارت دهی را نشان می‌دهد، حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح $p< 0/05$)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل (8) میزان تورم ریزپوشینه آلژینات و آلژینات- پوشش داده شده با کیتوزان به دو روش خشک کردن انجمادی (f.d) وخشک کردن در معرض جریان هوا (air) (حروف کوچک تفاوت معنی‌دار برای تاثیر زمان و حروف بزرگ اثر نوع ریزپوشینه و روش خشک کردن را نشان می‌دهد، حروف مشابه

روش تماس با هوا دارند. میزان تورم ذرات خشک شده به روش انجمادی نسبت به ذرات خشک شده در هوا[1] بیش‌تر بوده و پوشش‌دهی با کیتوزان موجب کاهش بسیار اندکی در میزان تورم ذرات شده است. ذرات خشک شده به روش انجمادی سریع تر از ذرات خشک شده در هوا متورم شدند. در مقایسه ذرات خشک شده در معرض هوا، ذرات پوشش‌دار با کیتوزان سرعت و درجه تورم کم‌تری نسبت به ذرات آلژینات دارند و در حالی‌که در ریزپوشینه‌های خشک شده به روش انجمادی حداکثر تورم در 15 دقیقه پس از مرطوب شدن برای آلژینات رخ می‌دهد، در آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان تا زمان 20 دقیقه تورم ادامه داشته و برای ریز پوشینه‌های خشک شده در هوا حتی این زمان به بیش از 40 دقیقه می‌رسد. میانگین بیشینه تورم در ذرات، به‌ترتیب برای ذرات آلژینات خشک شده به روش انجمادی، ذرات آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان و خشک شده به روش انجمادی، ذرات آلژینات خشک شده در هوا و در نهایت ذرات آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان و خشک شده در هوا است. تورم سریع‌تر دانه‌های خشک شده به روش انجمادی به ساختار متخلخل آن‌ها نسبت داده شده که این ساختار به مولکول‌های آب یا سیال زیستی اجازه نفوذ به شبکه ریزپوشینه را می‌دهد. بین ریزپوشینه‌های پوشش‌دار و فاقد پوشش، پیوند یونی بین گروه‌های آمین یونیزه شده کیتوزان و کربوکسیلات در آلژینات موجب شکل گرفتن غشای پلی الکترولیت بر روی سطح ذرات می‌شود. این غشا مانند سدی در برابر نفوذ آب عمل می‌کند. از طرفی پیوندهای هیدروژنی بین آمین کیتوزان و هیدروکسیل آلژینات از تورم ذرات جلوگیری می‌کند [46]. ریزپوشینه‌های خشک شده به روش انجمادی از این نظر که در هنگام تهیه غذا و افزودن آب به پودر غذا، سریع‌تر آب جذب کرده و به حداکثر تورم خود می‌رسند، در ادامه و با قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده به میزان کم‌تری از شیره‌های معده و املاح و ترکیبات صفراوی به خود جذب کرده، در نتیجه این ترکیبات اثر کم‌تری بر فعال باقی ماندن باکتری‌های ریزپوشانی شده می‌گذارند.

1. Air driyng

3-5- اثر پوشش‌دهی ریزپوشینه‌ها

پوشش‌دهی ریزپوشینه‌ها با کیتوزان هرچند باعث افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده می‌گردد، ولی این میزان افزایش معنی‌دار نیست. در آزمون مقاومت به حرارت پوشش‌دهی با کیتوزان هیچ‌گونه اثری بر مقاومت حرارتی باکتری‌ها ندارد و در آزمون سرعت تورم، ریز پوشینه‌های پوشش داده شده سرعت تورم کم‌تری دارند. در مجموع پوشش‌دهی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش اثر مثبتی بر فعالیت باکتری ندارد ولی طبق تحقیقات حاجیی پوشش کیتوزان باعث افزایش قابلیت چسبندگی ریزپوشینه به دیواره روده می‌گردد که می‌تواند باعث بهبود فعالیت باکتری در دستگاه گوارش انسان گردد[32].

www.SID.ir

Archive of SID

4- نتیجه گیری

بین سلول‌های ریزپوشانی شده و آزاد،زنده‌مانی وتحمل شرایط بحرانی در باکتری‌های ریزپوشانی شده به مراتب بالاتر بوده و در بین دو نوع ریزپوشینه آلژینات وآلژینات پوشش داده شده با کیتوزان، آلژینات پوشش داده شده با کیتوزان نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده روده ومعده مقاوم‌تر است، ولی این میزان معنی‌دارنیست. در حالی‌که بین دو نوع ریزپوشینه اختلافی از نظر مقاومت به حرارت وجود ندارد. در مورد میزان تورم ذرات نیز، ریزپوشینه‌های خشک شده به روش خشک کن انجمادی سریع‌تر متورم می‌شوندو در بین دو نوع ریز پوشینه پوشش‌دار و فاقد پوشش کیتوزان، ریزپوشینه‌های فاقد پوشش کیتوزان رشد و جذب آب سریع‌تری دارند. از نظر اندازه ریزپوشینه‌ها نیز، با استفاده از پیستوله ذرات با اندازه بین 150-80 میکرومتر ایجاد می‌شود که در مقایسه با روش‌هایی مانند امولسیون که ایجاد ذراتی در همین رنج می‌کند، به مراتب ساده‌تر وسهل‌تر است. ضمن این‌که این روش قابلیت عملیاتی شدن در حجم بالا و هزینه بسیار کم‌تر از روش‌های معمول مانند امولسیون و اکستروژن را به راحتی دارد. ریزپوشینه‌های شکل گرفته قابلیت کاربرد در صنایع غذایی و به‌خصوص در مواد غذایی پودری وخشک که به‌صورت نیمه آماده به بازار عرضه می‌شوند را دارا هستند و تا حد زیادی می‌تواند از باکتری‌های پروبیوتیک به دام افتاده در آن در برابر عوامل نامساعد محافظت به عمل آورد.

منابع

[1] Kimoto-Nira, H., Suzuki. C., Sasaki. K., Kobayashi. M., Mizumachi, K.(2010). Surval of a Lactococcus lactis strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. *J. Food Microbiol*.,143, 226-229.

[2] Aragon, A., Alegro, J., Cardarelli. H., Chiu. M., Saad. S.(2007). Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. *LWT-Food Sci. Technol*., 40. 669-75.

[3] Adams. M. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol*., 68, 8-171.

[4] Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Motyl, I., Libudzisz, Z. (2006). Dark chocolates supplemented with Lactobacillus strains. *J. Food Technol*., 225, 33-42.

[5] Weinbreck, F., Bodnár, I., Marco . M. (2009). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products. *J. Food Microbiol*., 136, 7-364.

[6] Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *J. Food Microbiol.*, 27, 1-11.

[7] Hilde, M., Stile, H., Janneke, T., Judith, A., Narvhus, S. (2005). Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. *J. Dairy Food*. 15, 989-997

[8] Corcoran, B., Stanton, C., Fitzgerald, F., Ross, P. (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *J. Environ. Microbiol.*, 71. 3060–3067.

[9] Jaana, M., Hanna-Leena, A ., Vaari, A ., Virkajärvi, I., Saarela, M. (2006). Influence of processing conditions on Bifidobacterium animalis subsp. lactis functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting. *J. Dairy Food*, 16, 1029-1037

[10] Wouters, J., Frenkiel, A., De Vos, W., Kuipers, O., Abee, T. (2001). Cold shock proteins of Lactococcus lactis MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. *J. Environ Microbiol.*, 67, 5171-5178.

[11] Marteau, P., Mimekus, M., Hawenaar. R., Huis, J., (1997). Survival of lactic acid bactenia in a dynamie model of the stomach and small intestine validation and

www.SID.ir

Archive of SID

ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *J. Food Eng.*, 84 (2), 194-205.

[30] Carr, R.L. (1965). Evaluating flow properties of solids. *Chem. Eng.*, 1965 , 72 (2),163-168.

[31] Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., Parenti, A. (2000). Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chem.*, 71 (4), 553-562.

[32] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol-LEB*, 28 (1), 25-30.

[33] Zheng, C., Sun, D.W., Zheng, L. (2006). Recent developments and applications of image features for food quality evaluation and inspection–a review. Trends Food Sci Tech, 17(12), 642-655.

[34] Beristain, C.I., Mendoza, R.E., Garcia, H.S., Vazquez, A. (1994). Cocrystallization of jamaica (HibiscussabdarifaL.) granules. *Food Sci. Technol-LEB*, 27(4), 347-349.

[35] Zheng, L., Ding, Z., Zhang, M., Sun, J., (2011). Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. *J. Food Eng.*, 104(1), 89-95.

[36] Fennema, O.R., Tannenbaum, S.R. (1996). Introduction to food chemistry. *Food science and technology-New York-Marcel Dekker*, 1-16.

[37] Fu, B., Labuza, T.P. (1993). Shelf-life prediction: theory and application. *Food Control*, 4 (3), 125-133.

[38] Quek, S.Y., Chok, N.K., Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chem. Eng. Process*, 46 (5), 386-392.

[39] Newman, A.W., Reutzel-Edens, S.M., Zografi, G. (2008). Characterization of the “hygroscopic” properties of active pharmaceutical ingredients. *J. Pharm. Sci*., 97 (3), 1047-1059.

the Effects of Bile. *J. Dariy Sel*., 80, 1031-1037.

[12] Tanaka, H., Doesburg, K., lwasaji, T., Mierau, l. (1999). Screening of lactic Acid Bacteria for Bile Sah Hydrolase Activity. *J. Dairy Sci*. 82, 2530-2535.

[13] Cook, T., Taortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. (2012). Mictoencapoulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J. Controlled Release*.162, 56-67.

[14] Wilson, N., Shah, N. (2007). Microencapsulation of Vitamins. *J. Asean Food*, 14 , 1-14

[15] Zuidam , N., and Nedovie . V.,(2010).Encapsulation for active food ingredients and food processing Springer,New York.USA pp221-242.

[16] Rinee . A ., Le Breton . Y.,.Vemeuil . N ., Giard . J., Hartke . A and Auffiray Y.,(2003).physiological and molecular aspeets of bile salt response in Enterococcus Faccalis.J.Food Microbiol.88,207-213.

[17] Mills susan . S., Fitzgeruld . C., paul . R.,(2011). Enhancing the stress respones of probiotice for a lifestyle from gut to product and back again Microb Cell Fact., J.Food Microbiol.10,11-19.

[18] Ruiz-Barba . J ., Cathcart . D ., Warner . P and Jimenez-Diaz . R.,(1994).Use of Lactobaeillus plantarum LPCO10, a Bacterioein produccr,as a starter Culture in Spanish-style Green Olive Fermentations., j.Environ. Microbiol.60,2059-2064.

[19] Iyer . R., Hittinahalli . V., (2008). Modified Pap method to among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates tertiary care hospital., J. Medical Microbiology, 26,176-179.

[20] Oliveira . R ., Perego . P., Converti . A.,(2009). Effect of inulin supplementation of milk to prepare fermented biomilks., J. Food Science, 14, 1-7.

[21] Xanthopoulos . V., Tzanetaki . L and Tzanetakis . N., (2000). Characterization Lactobacillus isolates from infant faces as etary adjuncts., J. Food Microbiol-

www.SID.ir

Archive of SID

[40] Schultheiss, N., Newman, A. (2009). Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. Cryst. *Growth Des*., 9(6), 2950-2967.

[41] Abdullah, E.C., Geldart, D. (1999). The use of bulk density measurements as flowability indicators. *Powder Technol*., 102 (2), 151-165.

[42] Geldart, D., Abdullah, E.C., Hassanpour, A., Nwoke, L.C., Wouters, I. (2006). Characterization of powder flowability using measurement of angle of repose. *China Particuology*, 4, 104-107.

[43] Santomaso, A., Lazzaro, P., Canu, P. (2003). Powder flowability and density ratios: the impact of granules packing. *Chem. Eng. Sci.*, 58 (13), 2857-2874.

[44] Barbosa-Canovas, G.V., Malave-Lopez, J., Peleg, M. (1987). Density and compressibility of selected food powders mixture. *J. Food Process Eng*., 10 (1), 1-19.

[45] Peleg, M. (1977). Flowability of food powders and mthods for its evaluation-a review. *J, Food Process Eng,*, 1 (4), 303-328.

[46] Teunou, E., Vasseur, J., Krawczyk, M. (1995). Measurement and interpretation of bulk solids angle of repose for industrial process design. *Powder Handl Process*, 7 (3), 219-228.

[47] Juliano, P., Barbosa-Cánovas, G.V. (2010). Food powders flowability characterization: theory, methods, and applications. *Annu, Rev, Food Sci, Technol*,, 1, 211-239.

[48] Lumay, G., Boschini, F., Traina, K., Bontempi, S., Remy, J.C., Cloots, R., Vandewalle, N. (2012). Measuring the flowing properties of powders and grains. *Powder Technol*,, 224, 19-27.

[49] USP 30-NF 25, United States Pharmacopeia-National Formulary, Rockville, MD, 2007.

[50] Ersus, S., Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (Daucus carota L.) by spray drier. *J. Food Eng*., 80, 805-812.

[51] Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *J. Agric. Food Chem*., 50 (3), 519-52l5.

[52] Muzaffar, K., Wani, S.A., Dinkarrao, B.V., Kumar, P. (2016). Determination of production efficiency, color, glass transition, and sticky point temperature of spray-dried pomegranate juice powder. *Cogent Food Agric*., 2 (1), 114-120.

[53] Tuyen, C.K., Nguyen, M.H., Roach, P.D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (Momordica cochinchinensis) fruit aril powder. *J. Food Eng*., 98 (3), 385-392.

www.SID.ir