بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

بررسی اثر ریزپوشانی بر پایداری و سرعت رها شدن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بومی و مقایسهٔ آن با *لاکتوباسیلوس کازئی* تحت تنش های مختلف

پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی

صفورا اکبری

اساتید راهنما

دکتر صبیحه سلیمانیان زاد
دکتر محمود شیخ زین الدین

1389

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نو آوریهای ناشی از تحقیق موضوع این
پایان نامه (رساله) متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم و صنایع غذایی خانم صفورا اکبری

تحت عنوان

بررسی اثر ریزپوشانی بر پایداری و سرعت رها شدن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بومی و مقایسهٔ آن با *لاکتوباسیلوس کازئی* تحت تنش های مختلف

در تاریخ 1389/12/24 توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

1- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر صبیحه سلیمانیان زاد
2- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر محمود شیخ زین الدین
3- استاد مشاور پایان نامه	دکتر علی نصیر پور
4- استاد داور	دکتر مهدی کدیور
5- استاد داور	دکتر حمیدرضا رحمانی
سرپرست تحصیلات تکمیلی	دکتر احمد ریاسی

تقدیم به همسر عزیزم

و

پدر و مادر مهربانم

تشکر و قدردانی

سپاس و ستایش کردگار یکتایی را که این توفیق را به من عطا فرمود تا وجود خویش را به زینت علم بیارایم؛ باشد که شاکر باشم، بیاموزم، برگزینم و عمل نمایم. اکنون که به یاری عنایت پروردگار، پایان نامه خود را به پایان رسانده ام، تشکر و قدردانی از عزیزانی که همواره همراهم بودند و یاریم نمودند را بر خود لازم می دانم.

از همسرم که در تمامی سختی ها، همواره برایم تکیه گاهی استوار بود و در حریم امنش احساس آرامش می کردم؛ و از پدر و مادرم، گوهرهای بی همتای زندگیم، بی نهایت سپاسگزارم.

از اساتید راهنمای گرانقدرم سر کار خانم دکتر سلیمانیان زاد و جناب آقای دکتر شیخ زین الدین که همواره با رویی گشاده مرا از راهنمایی های ارزشمند خویش بهره مند ساختند و دشواری های راه پژوهش را بر من هموار نمودند، کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر نصیرپور که سمت مشاورهٔ این پایان نامه را پذیرفتند، سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر کدیور و جناب آقای دکتر رحمانی که زحمت داوری این پایان نامه را تقبل نمودند، بی اندازه قدردانم.

مراتب سپاس خود را ازکارشناسان محترم آزمایشگاه جناب آقای مهندس بهرامی و سر کار خانم مهندس ستاری برای راهنمایی های بی دریغشان اعلام می دارم. از پرسنل زحمت کش آزمایشگاه آقایان کریمی، دهقان و مولایی متشکرم.

در آخر از دوستان خوبم بهناز، سارا و فروغ عزیزم، به خاطر تمام محبت های بی دریغشان صمیمانه سپاسگزارم.

صفورا اکبری

زمستان 89

چکیده

امروزه با افزایش سطح آگاهی مردم در رابطه با اثر بخشی غذاهای فراسودمند، بخش عظیمی از بازار غذا به این گروه اختصاص یافته است و در این بین غذاهای فراسودمند حاوی میکروب های پروبیوتیک، سهم عمده ای دارند. تحقق آثار سودمند میکروب های پروبیوتیک موجود در این محصولات غذایی، مستلزم جایگزینی حداقل 6 سیکل لگاریتمی از این میکروب ها بر روی سلول های اپیتلیال روده می باشد. تکنولوژی ریزپوشانی، از روش های پیشنهاد شده جهت حفظ این تعداد از میکروب های پروبیوتیک، در مقابل شرایط تولید و نگهداری محصولات غذایی، و مایع معدی- روده ای موجود در لوله گوارش بدن مصرف کننده است. شبیه سازی اثر تنش های موجود در حین فرآوری محصولات در صنعت غذا، بر ریزپوشینه های حاوی میکروب های پروبیوتیک، ضروری به نظر می رسد، تا بتوان تخمین زد که این ریزپوشینه ها در چه محصولاتی و تا چه مدت زمان نگهداری قابل استفاده اند. برای این منظور، انتخاب بستری با ویژگی های شبیه به غذا گزینه قابل توجهی است. همچنین بررسی توانایی گونه های بومی، در مقابل تنش های فرآوری محصولات، به منظور ارتقای اثر میکروب های پروبیوتیک، بر سلامت مردم هر منطقه الزامی است. در این تحقیق پس از بهینه سازی فرآیند ریزپوشانی به روش امولسیون، با تصویربرداری از ریزپوشینه ها توسط میکروسکوپ نوری بازتابی و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، خصوصیات مورفولوژیکی آنها مشخص شد و شرایط بهینه معرفی گردید. سپس میکروب بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 و *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392 تجاری به صورت همزمان به روش بهینه ریزپوشانی شده، و پس از تلقیح به میزان 10% به درون بستر های آب مقطر و شیر بدون چربی، تنش های مختلف بر آنها اعمال شد، و میزان پایداری و رها شدن سلول های ریزپوشینه به درون بستر ارزیابی گردید. به طور همزمان سلول های ریزپوشینه نشده، با نسبت مساوی درون بسترهای مورد مطالعه تحت تأثیر تنش ها قرار گرفتند. در مورد تنش های دمای بالا (72، 85 و 90 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه) و هموژنیزاسیون (5000 rpm، 2 دقیقه) قبل و بعد از اعمال تیمار، و در رابطه با تنش های دمای پایین (4، صفر و 18- درجه سانتیگراد)، فشار اسمزی (1%،3% و5% NaCl و 5%، 15% و 25% سوکروز) و تغییرات pH (pH های 3، 4 و 5) طی 8 هفته انبارمانی در 4 درجه سانتیگراد، با فواصل زمانی دو هفته نمونه گیری و شمارش به عمل آمد. در بخش بهینه سازی فرآیند ریزپوشانی، از بین فاکتور های مورد بررسی، دور 200 rpm به همراه 20 دقیقه زمان همزدن در بخش تشکیل امولسیون، و 5 دقیقه زمان همزدن جهت تشکیل ریزپوشینه ها، برای تولید ریزپوشینه هایی با اندازه کمتر از 100 میکرون انتخاب شد. ریزپوشینه های تولید شده به این روش، دارای شکل کروی با سطحی کاملاً صاف بودند. نتایج به دست آمده در بخش اعمال تنش های مختلف بر سلول های میکروبی ریزپوشینه شده و نشده نشان داد، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بومی نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی* که یک پروبیوتیک تجاری رایج در صنعت محصولات غذایی می باشد، از پایداری بسیار خوبی در مقابل شرایط مختلف تولید و نگهداری برخوردار بود.در این مطالعه همچنین مشخص شد، بستر شیر بدون چربی در مقایسه با بستر آب مقطر، با توجه به حضور ترکیبات پروتئینی و قندی، در مقابل کلیه تنش های اعمال شده، به استثناء هموژنیزاسیون دارای اثر حفاظتی بر روی ریزپوشینه های حاوی میکروب های پروبیوتیک بود. از آنجا که این بستر ترکیب پایه کلیه محصولات لبنی است، می توان گفت که محصولات لبنی بستری مناسب برای سلول های پروبیوتیک ریزپوشینه شده می باشند، و در حفظ ساختار ریزپوشینه ها تحت تأثیر تنش های مختلف مؤثرند. در بین تنش های اعمال شده، دمای 90 درجه سانتیگراد و pH برابر با 3 کشنده ترین تنش های اعمال شده بودند. در تیمارهای 72 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه، دماهای صفر و 4 درجه سانتیگراد، 1% و 3% NaCl، 5%، 15% و 25% سوکروز و pH 5 *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشینه شده درون بستر شیر بدون چربی، به تعداد لازم برای تحقق خواص پروبیوتیکی تا پایان دوره انبارمانی زنده ماند. در تمامی تیمار های مذکور تعداد سلول های ریزپوشینه نشده با اختلافی معنی دار ($p<0/05$)، کمتر شمارش گردیدند. تیمار هموژنیزاسیون بر جمعیت سلول های ریزپوشینه شده و نشده اثر قابل توجهی نداشت. بررسی رهاشدن سلول های ریزپوشینه شده به درون بستر نشان داد، اگرچه جمعیت سلول های درون ریزپوشینه ها در برخی تیمارها کمتر از تعداد مورد نظر بود، اما با در نظر گرفتن سلول های رها شده درون بستر، در مجموع می توان خصوصیت پروبیوتیکی را برای محصول حاوی آن ها در نظر گرفت. از مجموع اطلاعات به دست آمده اینطور استنباط می شود که توسط تکنیک ریزپوشانی می توان، میکروب های پروبیوتیک را تحت تأثیر تنش هایی که در فرآوری محصولات غذایی با آنها مواجهند، به تعداد لازم جهت تحقق خواص سودمندشان حفظ نمود. همچنین میکروب *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7، با توجه به توانایی بالایی که در مقابل تنش های اعمال شده نشان داد، گزینه مناسبی جهت استفاده در محصولات لبنی پروبیوتیک به شمار می رود.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، ریزپوشانی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7، *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC 39392، میکروسکوپ نوری بازتابی، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... هشت
فهرست جداول ..... یازده
فهرست اشکال ..... دوازده
فهرست نمودارها ..... سیزده
فهرست پیوست ..... چهارده

فصل اول: مقدمه و بررسی منابع

1-1- غذاهای فراسودمند 2
1-2- فرآورده های غذایی فراسودمند حاوی میکروب های پروبیوتیک 3
1-3- پروبیوتیک ها 4
1-3-1- معیارهای انتخاب میکروارگانیسم ها به عنوان پروبیوتیک 5
1-3-2- آثار سودمند پروبیوتیک ها در بدن انسان 5
1-3-3- ضرورت کار بر گونه های بومی پروبیوتیک 6
1-3-4- گونه های شناخته شده به عنوان پروبیوتیک 7
1-4- باکتری های اسید لاکتیک 9
1-4-1- جنس *لاکتوباسیلوس* 10
1-4-2- گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 11
1-4-3- گونه *لاکتوباسیلوس کازئی* 11
1-5- عوامل مؤثر بر بقای پروبیوتیک ها 12
1-6- روش های ارتقاء رشد و بقای پروبیوتیک ها 12
1-7- ریزپوشانی 16
1-7-1- ساختار و خصوصیات ریزپوشینه ها 17
1-7-2- انواع پوشش مورد استفاده در ریزپوشانی 19
1-7-2-1- هیدروکلوئیدها 20
1-7-2-2- آلژینات ها 21
1-7-3- روش های ریزپوشانی 23
1-7-4- روش امولسیون 27
1-7-5- مورفولوژی ریزپوشینه ها در روش امولسیون 30
1-8- افزودن ریزپوشینه های حاوی پروبیوتیک ها به فرآورده های غذایی 31
1-9- رهاشدن باکتری های پروبیوتیک از ریزپوشینه ها 34
1-10- انواع تنش ها در فرآوری محصولات غذایی 35

1-10-1- دمای بالا 38
1-10-2- دمای پایین 40
1-10-3- فشار اسمزی 42
1-10-4- pH اسیدی 43
1-10-5- هموژنیزاسیون 44
1-11- تأثیر ریزپوشانی در حفاظت از پروبیوتیک ها مقابل تنش های فرآوری محصول 46
1-12- هدف از انجام این پژوهش 50

فصل دوم: مواد و روش ها

2-1- معرفی مواد، تجهیزات و میکروارگانیسم ها 53
2-1-1- مواد شیمیایی مورد استفاده 53
2-1-2- تجهیزات مورد نیاز 53
2-1-3- میکروارگانیسم های مورد آزمایش 54
2-2- عملیات میکروبی 55
2-2-1- فعال سازی، نگهداری و آماده سازی کشت های میکروبی 55
2-2-2- آزمون های بیوشیمیایی جهت شناسایی میکروارگانیسم های مورد استفاده 57
2-3- آزمون های شیمیایی شیرخشک 59
2-3-1- اندازه گیری رطوبت و ماده خشک 59
2-3-2- اندازه گیری خاکستر 60
2-3-3- اندازه گیری پروتئین و ازت کل 60
2-3-4- اندازه گیری لاکتوز 61
2-3-5- اندازه گیری چربی به روش سوکسله 62
2-4- تهیه و خالص سازی سوسپانسیون میکروبی فعال 62
2-5- فرآیند ریزپوشانی به روش امولسیون و بهینه کردن دور و زمان همزدن 62
2-6- بررسی مورفولوژی ریزپوشینه ها و معرفی شرایط بهینه 63
2-7- رهاسازی میکروب ها از درون ریزپوشینه هاو ارزیابی بازده فرآیند 64
2-8- اعمال تیمار بر سلول های آزاد و ریزپوشینه شده 65
2-8-1- دمای بالا 65
2-8-2- دمای پایین 65
2-8-3- pH اسیدی 65
2-8-4- فشار اسمزی 66
2-8-5- هموژنیزاسیون 66
2-9- ارزیابی پایداری میکروارگانیسم ها تحت شرایط تیمار 67
2-10- ارزیابی رهاشدن میکروارگانیسم ها تحت شرایط تیمار 67

2-11-روش تحلیل آماری داده ها 67

فصل سوم: **نتایج و بحث**

3-1- نتایج آزمون های بیوشیمیایی جهت شناسایی باکتری ها 69
3-2- نتایج آزمون های شیمیایی شیر خشک بدون چربی 71
3-3- نتایج بهینه سازی فرآیند ریزپوشانی 71
3-3-1- نتایج اندازه گیری قطر ریزپوشینه ها، محاسبه بازده فرآیند و معرفی شرایط بهینه ریزپوشانی 71
3-3-2- ارزیابی خصوصیات ظاهری ریزپوشینه ها 76
3-4- نتایج به دست آمده از اعمال تنش های مختلف بر میکروب های مورد مطالعه در حالت ریزپوشینه شده و نشده 77
3-4-1- اثر دماهای بالا بر پایداری و رهاشدن میکروب ها در بستر مورد آزمایش 77
3-4-2- اثر دماهای پایین بر پایداری و رهاشدن میکروب ها در بستر مورد آزمایش 85
3-4-3- تنش فشار اسمزی 96
3-4-3-1- اثر تنش اسمزی ناشی از غلظت های مختلف قند بر پایداری و رهاشدن میکروب ها در بسترهای مورد آزمایش 96
3-4-3-2- اثر تنش اسمزی ناشی از غلظت های مختلف نمک بر پایداری و رهاشدن میکروب ها در بسترهای مورد آزمایش 103
3-4-4- اثر تغییرات pH بر پایداری و رهاشدن میکروب ها در بستر مورد آزمایش 112
3-4-5- اثر هموژنیزاسیون بر پایداری و رهاشدن میکروب ها در بستر مورد آزمایش 119

فصل چهارم: **نتیجه گیری کلی و پیشنهادات**

4-1- نتیجه گیری کلی 126
4-2- پیشنهادات 129

پیوست 130
فهرست منابع .....150.

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول1-1- نام برخی سویه های میکروبی که به صورت تجاری در صنعت به عنوان پروبیوتیک استفاده می شوند 8
جدول 1-2- مروری بر انواع روش های ریزپوشانی رایج در صنعت 24
جدول 2-1- اجزای محیط کشت مایع 56
جدول 2-2- اجزای محیط کشت MRS-fermentation broth 58
جدول 3- 1- نتایج آزمون های بیو شیمیایی مربوط به باکتری های مورد مطالعه 69
جدول 3- 2 – خصوصیات باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پلانتاروم 70
جدول 3- 3- خصوصیات ظاهری پرگنه و سلول باکتری های مورد مطالعه 71
جدول 3-4- نتایج آزمون های شیمیایی شیرخشک بدون چربی 71
جدول 3-5- میانگین اندازه ریزپوشینه ها و بازده فرآیند در انواع حالات دور و زمان همزدن 72

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل 1-1- ساختار شماتیک ریزپوشینه های مخزنی، شبکه ای و شبکه ای پوشش دار شده 17
شکل 1-2- تصویر شماتیک اصول ریزپوشانی و ساختار کلی یک ریزپوشینه 18
شکل 1-3- تصویر ساختار شیمیایی آلژینات 21
شکل 1-4- نحوه انجام ریزپوشانی به دو روش اکستروژن و امولسیون 29
شکل 3-1: تصویر میکروکپسول تولید شده با دور همزدن 100 rpm (a)، دور همزدن 200 rpm (b)، دور همـزدن 400rpm (c)، تصویربرداری شده با میکروسکوپ نوری بازتابی 76
شکل 3-2: تصاویر عکسبرداری شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از ریزپوشینه ها 77

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار 3-1- اثر دماهای بالا بر پایداری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (a) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (b) به دو شکل ریزپوشینه شده و نشده در دو بستر آب مقطر و شیر بدون چربی 76

نمودار 3-2- اثر دماهای بالا بر رهاشدن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشینه شده در بستر آب مقطر (a) و شیر بدون چربی (b) و *لاکتوباسیلوس کازئی* ریزپوشینه شده در بستر آب مقطر (c) و شیر بدون چربی (d) 83

نمودار 3-3- اثر دماهای پایین بر پایداری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به دو شکل ریزپوشینه شده و نشده در بستر آب مقطر (a) و شیر بدون چربی (b) طی 8 هفته انبارمانی 86

نمودار 3-4- اثر دماهای پایین بر پایداری *لاکتوباسیلوس کازئی* به دو شکل ریزپوشینه شده و نشده در بستر آب مقطر (a) و شیر بدون چربی (b) طی 8 هفته دوره انبارمانی 91

نمودار 3-5- اثر دماهای پایین بر رهاشدن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشینه شده در بستر آب مقطر (a) و شیر بدون چربی (b) *لاکتوباسیلوس کازئی* ریزپوشینه شده در بستر آب مقطر (c) و شیر بدون چربی (d)طی 8 هفته انبارمانی 94

نمودار 3-6- اثر تنش اسمزی ناشی از غلظت های قند بر پایداری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به دو شکل ریزپوشینه شده و نشده در بستر آب مقطر (a) و شیر بدون چربی (b) طی 8 هفته انبارمانی در دمای 4 درجه سانتیگراد 98

نمودار 3-7- اثر تنش اسمزی ناشی از غلظت های قند بر پایداری *لاکتوباسیلوس کازئی* به دو شکل ریزپوشینه شده و نشده در بستر آب مقطر (a) و شیر بدون چربی (b) طی 8 هفته انبارمانی در دمای 4 درجه سانتیگراد 100

نمودار 3-8- اثر تنش اسمزی ناشی از غلظت های قند بر رهاشدن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشینه شده در بستر آب مقطر (a) و شیر بدون چربی (b) و *لاکتوباسیلوس کازئی* ریزپوشینه شده در بستر آب مقطر (c) و شیر بدون چربی (d) طی 8 هفته انبارمانی در دمای 4 درجه سانتیگراد 102

نمودار 3-9- اثر تنش اسمزی ناشی از غلظت های نمک بر پایداری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به دو شکل ریزپوشینه شده و نشده در بستر آب مقطر (a) و شیر بدون چربی (b) طی 8 هفته انبارمانی در دمای 4 درجه سانتیگراد 104

نمودار 3-10- اثر تنش اسمزی ناشی از غلظت های نمک بر پایداری *لاکتوباسیلوس کازئی* به دو شکل ریزپوشینه شده و نشده در بستر آب مقطر (a) و شیر بدون چربی (b) طی 8 هفته انبارمانی در دمای 4 درجه سانتیگراد 107

نمودار 3-11- اثر تنش اسمزی ناشی از غلظت های نمک بر رهاشدن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشینه شده در بستر آب مقطر (a) و شیر بدون چربی (b) و *لاکتوباسیلوس کازئی* ریزپوشینه شده در بستر آب مقطر (c) و شیر بدون چربی (d) طی 8 هفته انبارمانی در دمای 4 درجه سانتیگراد 110

نمودار 3-12- اثر تغییرات pH بر پایداری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به دو شکل ریزپوشینه شده و نشده در بستر آب دیونیزه (a) و شیر بدون چربی (b) طی 8 هفته انبارمانی در دمای 4 درجه سانتیگراد 113

نمودار 3-13- اثر تغییرات pH بر پایداری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به دو شکل ریزپوشینه شده و نشده در بستر آب دیونیزه (a) و شیر بدون چربی (b) طی 8 هفته انبارمانی در دمای 4 درجه سانتیگراد 116

نمودار 3-14- اثر تغییرات pH بر رهاشدن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشینه شده در بستر آب دیونیزه (a) و شیر بدون چربی (b) و *لاکتوباسیلوس کازئی* ریزپوشینه شده در بستر آب دیونیزه (c) و شیر بدون چربی (d) طی 8 هفته انبارمانی در دمای 4 درجه سانتیگراد 119

نمودار 3-15- اثر هموژنیزاسیون (5000rpm، به مدت 2 دقیقه) بر پایداری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (a) و *لاکتوباسیلوس کازئی*

(b) ریزپوشینه شده و نشده در دو بستر آب مقطر و شیر بدون چربی 121
نمودار 3-16- اثر هموژنیزاسیون (5000rpm، به مدت 2 دقیقه) و تیمار حرارتی بر پایداری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (a) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (b) ریزپوشینه شده در دو بستر آب مقطر و شیر بدون چربی 123
نمودار 3-17 اثر هموژنیزاسیون (5000rpm، به مدت 2 دقیقه) بر رهاشدن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (a) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (b) ریزپوشینه شده در دو بستر آب مقطر و شیر بدون چربی 124

فهرست پیوست ها

جدول (1): تجزیه واریانس اثر دماهای بالا بر پایداری سلول های میکروبی 130
جدول (2): تجزیه واریانس اثر دماهای بالا بر رهاشدن سلول های میکروبی از ریزپوشینه ها 130
جدول (3): مقایسه میانگین اثر دماهای بالا و نوع بستر بر کاهش جمعیت میکروبی 131
جدول (4): مقایسه میانگین اثر دماهای بالا و ریزپوشانی بر کاهش جمعیت میکروبی 131
جدول (5): مقایسه میانگین اثر دماهای بالا و نوع بستر بر رهاشدن سلول های میکروبی از ریزپوشینه ها 131
جدول (6): تجزیه واریانس اثر دماهای پایین بر پایداری سلول های میکروبی 132
جدول (7): تجزیه واریانس اثر دماهای پایین بر رهاشدن سلول های میکروبی از ریزپوشینه ها 133
جدول (8): مقایسه میانگین اثر دماهای پایین و نوع بستر بر پایداری میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 134
جدول (9): مقایسه میانگین اثر دماهای پایین و ریزپوشانی بر پایداری میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 135
جدول (10): مقایسه میانگین اثر دماهای پایین و نوع بستر بر رهاشدن میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 136
جدول (11): تجزیه واریانس اثر تغییرات pH و فشار اسمزی بر پایداری سلول های میکروبی 137
جدول (12): تجزیه واریانس اثر تغییرات pH و فشار اسمزی بر رهاشدن سلول های میکروبی از ریزپوشینه ها 138
جدول (13): مقایسه میانگین اثر تنش اسمزی غلظت های قند و نوع بستر بر پایداری میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 139
جدول (14): مقایسه میانگین اثر تنش اسمزی غلظت های قند و ریزپوشانی بر پایداری میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 140
جدول (15): مقایسه میانگین اثر تنش اسمزی غلظت های قند و نوع بستر بر رهاشدن میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 141
جدول (16): مقایسه میانگین اثر تنش اسمزی غلظت های نمک و نوع بستر بر پایداری میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 142
جدول (17): مقایسه میانگین اثر تنش اسمزی غلظت های نمک و ریزپوشانی بر پایداری میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 143
جدول (18): مقایسه میانگین اثر تنش اسمزی غلظت های نمک و نوع بستر بر رهاشدن میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 144
جدول (19): مقایسه میانگین اثر تغییرات pH و نوع بستر بر پایداری میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 145
جدول (20): مقایسه میانگین اثر تغییرات pH و ریزپوشانی بر پایداری میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 146
جدول (21): مقایسه میانگین اثر تغییرات pH و نوع بستر بر رهاشدن میکروب ها طی 8 هفته انبارمانی 147
جدول (22): تجزیه واریانس اثر هموژنیزاسیون بر پایداری سلول های میکروبی 148
جدول (23): تجزیه واریانس اثر هموژنیزاسیون بر رهاشدن سلول های میکروبی از ریزپوشینه ها 148
جدول (24): مقایسه میانگین اثر هموژنیزاسیون و نوع بستر بر کاهش جمعیت میکروبی 149
جدول (25): مقایسه میانگین اثر هموژنیزاسیون و ریزپوشانی بر کاهش جمعیت میکروبی 149
جدول (26): مقایسه میانگین کاهش جمعیت میکروبی در دو بستر طی حرارت دهی پس از تیمار هموژنیزاسیون 149

فصل اول
مقدمه و بررسی منابع

1-1- غذاهای فراسودمند

امروزه مصرف کنندگان، غذا را فراتر از طعم و ارزش تغذیه ای، به عنوان عاملی دارای فواید مشخص برای سلامتی شان در نظر می گیرند و مبحث غذاهای فراسودمند[1] مطرح شده است. برای اولین بار در اوایل دهه 1980 میلادی، واژه غذاهای فراسودمند در ژاپن استفاده شد و در سال 1991 میلادی قوانین مربوط به برچسب گذاری آنها، در این کشور تصویب گردید. این فرآورده های غذایی حاوی اجزائی بودند که عملکرد بخش مشخصی از بدن انسان، با مصرف آنها بهبود می یافت [9و 27].

به طور کلی غذاهای فراسودمند می بایست حاوی دو دسته مواد، شامل مواد مغذی پایه[2] و مواد فعال از نظر فیزیولوژیکی باشند. دسته دوم جزئی است که به منظور فراسودمند کردن غذا به آن افزوده می شود، و می تواند به اشکال مختلفی از قبیل درشت مغذی (نشاسته)، ریزمغذی (ویتامین ها)، غیرمغذی (میکروب های زنده) یا فاقد ارزش غذایی ضروری (الیگوساکاریدها) باشد [93و 102]. اخیراً با افزایش سطح آگاهی مردم در رابطه با اثربخشی غذاهای فراسودمند، بخش عظیمی از بازار غذا به این گروه

1- Functional foods
2- Basic nutritients

اختصاص یافته است.

در کل، غذاهای فراسودمند به دو شکل تولید می شود [102]:

1- اجزاء فراسودمند از منابع طبیعی جداسازی و تغلیظ شده، سپس به منظور تولید فرآورده های غذایی فراسودمند جدید، به آنها افزوده می شود.

2- سطح ترکیبات فراسودمند موجود در یک ماده غذایی را، تا حد تأثیرگذار افزایش می دهند.

1- 2- فرآورده های غذایی فراسودمند حاوی میکروب های پروبیوتیک

برخی غذاهای فراسودمند با هدف بهبود تعادل و فعالیت فلور میکروبی روده تولید می شوند که غذاهای حاوی میکروب های پروبیوتیک[1] نام دارند. این گروه در حدود 70 درصد از فروش غذاهای فراسودمند را به خود اختصاص داده است [84].

معمولاً میکروب های پروبیوتیک به صورت طبیعی در غذا وجود ندارند و مدتهاست که این میکروب ها به شکل مکمل های خوراکی، برای پیشگیری یا درمان بیماری ها مورد مصرف قرار می گیرند، در سالهای اخیر ایده افزودن میکروب های پروبیوتیک به مواد غذایی مطرح شده است. در کل مواد غذایی نسبت به داروهای مکمل، گزینه مناسب تری جهت رساندن باکتری های پروبیوتیک به بدن انسان به شمار می روند. دلایل این امر به شرح زیر است [113]:

الف- مردم به خرید و مصرف مواد غذایی حاوی میکروب های پروبیوتیک، در مقایسه با داروهای مکمل، تمایل بیشتری نشان می دهند.

ب- کیفیت تغذیه ای و عملکردی غذاهای حاوی میکروب پروبیوتیک به مراتب بیشتر از قرص های حاوی میکروب پروبیوتیک است.

ج- باکتری های پروبیوتیک ساکن در دستگاه گوارش انسان، از نظر خصوصیات مورفولوژیکی به باکتری های پروبیوتیک موجود در ماده غذایی شباهت بیشتری دارد.

د- ترکیبات سازنده یک ماده غذایی، پایداری میکروب های پروبیوتیک را در دستگاه گوارش بالا می برد.

فرآورده های حاوی میکروب های پروبیوتیک دو دسته اند [9]:

1- فرآورده های لبنی : ماست، انواع پنیر ها، شیرخشک، دسرهای لبنی منجمد و ...

1- Probiotic

2- فرآورده های غیرلبنی: غذای کودک، شیرینی جات، نوشابه ها، سس مایونز، سوسیس های تخمیری و ...

فرآورده های لبنی به عنوان حامل میکروب های پروبیوتیک بیشتر توصیه می شوند، زیرا پروتئین و چربی موجود در شیر، در طول دوره انبارمانی از این میکروب ها محافظت می کند، به علاوه پروتئین های شیر، به دلیل خاصیت بافری، پایداری میکروب های پروبیوتیک را در pH اسیدی معده افزایش می دهد [98].

امروزه در کارخانجات لبنی اروپا، ایالات متحده، ژاپن و کره جنوبی، تولید فرآورده های لبنی زیستی سهم عمده ای دارند [27و 44].

1-3- پروبیوتیک ها

کلمه پروبیوتیک از واژه یونانی پروبیوس[1] به معنی حیات بخش[2] مشتق شده است. در آغاز، پروبیوتیک به ترکیباتی گفته می شد که توسط یک میکروارگانیسم[3] تولید شده و موجب تقویت رشد میکروارگانیسم های دیگر می شود [46]. پروبیوتیک ها بنابر اطلاعات موجود از مکانیسم عمل و آثار آنها بر روی سلامت انسان، به شیوه های مختلفی تعریف شده اند. ساده ترین تعریف توسط فولر[4] در سال 1989 ارائه شد مبنی بر اینکه پروبیوتیک ها مکمل های میکروبی زنده ای هستند که بر میزبان، آثار سودمندی باقی می گذارند، به این صورت که تعادل میکروبی روده را بهبود می بخشند. اخیراً FAO و سازمان بهداشت جهانی[5]، پروبیوتیک ها را اینطور تعریف کرده اند(2001): میکروارگانیسم های زنده ای (باکتری یا مخمر) که وقتی به مقدار کافی یا در محلی خاص مصرف می شوند یک یا چندین فایده مشخص را برای سلامتی میزبان به همراه دارند. این باکتری ها می بایست از نظر متابولیکی در محصول ثابت و فعال باقی بمانند، در طول مسیر قبل از مرحله هضم به تعداد زیادی زنده مانده، خود را به سلول های اپیتلیال[6] روده برسانند و آثاری سودمند را در روده میزبان باقی گذارند [9].

1-3-1- معیارهای انتخاب میکروارگانیسم ها به عنوان پروبیوتیک

سویه های میکروبی که با عنوان پروبیوتیک به مواد غذایی اضافه می شوند لازم است شرایط زیر را داشته باشند [18و 46و 48و 80]:

1- Probios
2- For life
3- Microorganism
4- Fuller
5- World health organization
6- Epitelial cell

الف) بیماریزا نبوده و ایجاد مسمومیت نکنند.

ب) خواستگاه انسانی داشته باشند به این معنا که از میکروب های ساکن دستگاه گوارش انسان سالم ایزوله شوند.

ج) نسبت به اسید معده، ترکیبات صفراوی و آنزیم های گوارشی مقاوم باشند و قابلیت اتصال بالایی به سلول های اپیتلیال روده داشته باشند.

د) در مقابلِ میکروب های بیماریزا، از خود خواص ضدمیکروبی نشان دهند و نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاومت باشند.

ه) از نظر ژنتیکی پایدار باشند.

و) قادر به تحمل شرایط تولید و نگهداری فرآورده های غذایی بوده و خصوصیات فیزیولوژیکی خود را حفظ کند.

ز) امکان تولید آن سویه میکروبی در حجم صنعتی و تغلیظ آن وجود داشته باشد.

هر سویه پروبیوتیک دارای تمامی ویژگی های ذکر شده نمی باشد و کاربرد هر سویه، به میزان بهره مندی آن از این ویژگی ها بستگی دارد.

1-3-2- آثار سودمند پروبیوتیک ها در بدن انسان

استفاده از کشت های پروبیوتیکی رشد میکروارگانیسم های مطلوب روده را تحریک می کند، باکتری های مضر این ناحیه را از بین می برد و مکانیسم های تدافعی طبیعی بدن را تقویت می کند. در کل آثار سودمند پروبیوتیک ها بر فلور میکروبی روده انسان شامل دو نوع اثر می باشد [9]:

الف) آثار هم ستیزانه[1]

آثار هم ستیزانه که در واقع نوعی مکانیسم ضد پاتوژنی است به اشکال زیر توسط پروبیوتیک ها اعمال می شود:

- کاهش pH لوله گوارش توسط تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه مانند اسید استیک، اسید لاکتیک و یا اسید پروپیونیک.
- غیرقابل دسترس ساختن مواد مغذی حیاتی برای پاتوژن ها.

1- Antagonistic effects

- تغییر پتانسیل اکسیداسیون – احیاء محیط.
- تولید پراکسید هیدروژن.
- تولید باکتریوسین ها و یا دیگر موارد بازدارنده.

ب) آثار ایمنی بخش[1].

پروبیوتیک ها باعث افزایش پاسخ های ایمنی بین سلولی شامل فعالسازی سیستم رتیکولو-اندوتلیالی[2]، تقویت مسیرهای سیتوکین[3]، تحریک مواردی همچون فاکتورهای از بین برنده تومورها و تنظیم اینترکولین می شوند. همچنین پروبیوتیک ها می توانند به طور مستقیم ماکروفاژها را فعال کنند .

اخیراً پروبیوتیک ها برای درمان مشکلات نقص عملکرد در روده انسان مانند عدم تحمل لاکتوز، التهاب حاد دستگاه گوارش و همین طور آلرژی های غذایی، التهاب های پوستی مربوط به آلرژی، ورم مفاصل روماتیسمی، و سرطان روده بزرگ مصرف می شوند [9]. آثار سودمند این باکتری ها تنها در صورتی بر بدن میزبان آشکار می شود که به میزان کافی و به صورت منظم مصرف شوند.سازمان بهداشت جهانی و فائو میزان متوسط استاندارد برای هر ماده غذایی حاوی پروبیوتیک را 10^6 cfu/g تا 10^7 باکتری زنده اعلام کرده اند [67]. همچنین توانایی زنده ماندن و تکثیر پروبیوتیک ها، یا به عبارتی مقاومت آنها، به شدت بر سودمند بودنشان در بدن میزبان مؤثر است. این باکتری ها می بایست از نظر متابولیکی، قادر به تحمل شرایط فرآوری محصول و همچنین مراحل هضم باشند و به تعداد زیادی ثابت و فعال باقی بمانند تا بتوانند برای بدن میزبان سودمند باشند.

در کل بقای این باکتری ها تحت تأثیر عواملی از قبیل اسیدیته قابل تیتراسیون، pH ماده غذایی، پراکسید هیدروژن، دمای انبارداری، فلور میکروبی موجود در ماده غذایی، پروتئین های آب پنیر در محصولات لبنی و یا فرم عرضه شده محصول به بازار است [84].

3-3-1- ضرورت کار بر گونه های بومی پروبیوتیک

اخیراً یکی از مشکلات عمده صنایع لبنیات مربوط به عملکرد نامناسب سویه های پروبیوتیک تجاری در شیر بومی مناطق جغرافیایی مختلف است. نوع و مقدار آنتی بیوتیک های مورد استفاده در دام، همینطور باقیمانده مواد شیمیایی دفع آفات که از طریق تغذیه دام به شیر بومی هر منطقه وارد می شود

1- Immune effects
2- Reticulo-endothelial system
3- Cytokine pathways

متفاوت است. همچنین میزان برخی ترکیبات بازدارنده که به صورت طبیعی در شیر وجود دارند، از قبیل پراکسیداز[1] یا لاکتوفرین[2] در اثر تنوع ژنتیکی بسیار متغیر می باشد. از سوی دیگر فلور میکروبی بومی هر منطقه، ترکیبات بازدارنده ای از قبیل باکتریوسین ها را ترشح می کنند که از تکثیر، رشد و فعالیت متابولیکی سویه های تجاری جلوگیری می کند. در مجموع سویه های بومی قادر به تولید آنزیم های متنوعی هستند و خواص بیوسنتزی بالایی از خود نشان می دهند که عملکرد آنها در غذاهای فراسودمند را بسیار بهبود می بخشد. موارد مذکور ضرورت جداسازی و شناسایی سویه های بومی و بررسی قابلیت های تکنولوژیکی آنها در مصارف صنعتی را مشخص می سازد [12و 15و 23و 72].

نتایج تعداد قابل توجهی از مطالعات نشان می دهد منشأ و خاستگاه پروبیوتیک ها، بر قدرت اتصالشان به سلول های اپیتلیال روده و ثبات آنها در دستگاه گوارش کاملاً تأثیرگذار است. باکتری های پروبیوتیک پس از ورود به بدن میزبان می بایست با فلور میکروبی طبیعی روده رقابت کنند، در این حالت هر چه با محیط سازگارتر باشند احتمال اینکه بتوانند زنده بمانند و آثار فراسودمند خود را اعمال کنند بیشتر است [115].

تاکنون جنس لاکتوباسیلوس با خواص پروبیوتیک از سه خاستگاه انسانی، حیوانی و غذایی جداسازی شده است. در میان این موارد لاکتوباسیلوس هایی که منشأ انسانی دارند قابلیت های پروبیوتیکی بیشتری از خود نشان داده اند [115]. از طرفی برخی گزارشات در نقض این مسئله نیز وجود دارد، مبنی بر اینکه مصرف باکتری های پروبیوتیک با هر نوع خاستگاه، نمی تواند اثری دائمی و ماندگار در بدن میزبان باقی گذارد و برای این منظور نیاز به مصرف منظم و مکرر محصولات پروبیوتیک وجود دارد. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی این فرضیه نیازمند به تحقیقات بیشتر است [109و 115].

1-3-4- گونه های شناخته شده پروبیوتیکی

پروبیوتیک ها عمدتاً از دو جنس *لاکتوباسیلوس*[3] و*بایفیدوباکتریوم*[4] هستند، که هر دو متعلق به باکتری های اسید لاکتیک می باشند.

جدول 1-1 نام برخی سویه های میکروبی که به صورت تجاری به عنوان پروبیوتیک استفاده می شوند را نشان می دهد [97].

1- Peroxidase
2- Lactoferrin
3- *Lactobacillus*
4- *Bifidobacterium*