14(1) 345-354, Spring 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Prebiotic effects of *Spirulina platensis* on the survival of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in the encapsulation process in sour cherry juice

Samira Belyani [1], Mozhgan Emtyazjoo [2*], Leila Mirmoghtadaie [1,3], Seyede Marzieh Hosseini [1,3]

[1] *Department of Food and science technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *Department of Marine science and technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[3] *National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Key Words

Encapsulation
Probiotics
Synbiotic capsule
Calcium alginate
Spirulina platensis

Abstract

Introduction: The aim of this study was to investigate the prebiotic effects of *Spirulina platensis* on the survival of two species of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in the process of encapsulation in sour cherry juice.

Materials & Methods: For this purpose, two types of probiotics were prepared in stock. The encapsulation process was performed using spray drying method and production of calcium-linked cross-linked alginate capsules. The viability of the probiotics was measured in encapsulated with and without *Spirulina* at 28-day storage at 4 °C. Survival rates were also measured at 60, 70 and 80 °C at 0, 1, 2.5, 5 and 10 minutes. In addition, simulations of gastric and intestinal juice environment were performed for two bacterial species in different states of encapsulation.

Results: The results showed that bacteria encapsulated with *Spirulina* had the highest survival and temperature resistance. Also, the highest efficiency of encapsulated probiotics in the presence of *Spirulina* was 81.9 and 83% for *L. acidophilus* and *L. casei*, respectively. In addition, *Spirulina*-encapsulated probiotic bacteria showed greater resistance than other bacterial forms in gastric and intestinal juice conditions. In summary, the results of this study showed that capsules containing *Spirulina* and *Lactobacillus casei* had higher survival and heat resistance than capsules containing *Lactobacillus acidophilus* and *Spirulina*.

Conclusion: Also, the results of bacterial resistance test in the conditions of simulating gastric and intestinal juice showed that encapsulated bacteria showed more resistance in the presence of *Spirulina* compared to the free form, which ultimately increases the efficiency and health of food products and humans.

* Corresponding Author's email: moz_emtyazjoo@yahoo.com; m_emtyazjoo@iau-tnb.ac.ir
Received: 23 August 2021; Reviewed: 25 September 2021; Revised: 25 November 2021; Accepted: 27 December 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.320538.2710

مقاله پژوهشی

اثرات پری بیوتیکی ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس (*Spirulina platensis*) بر روی زنده مانی باکتریهای پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobasilus acidophilus*) و لاکتوباسیلوس کازیی (*Lactobacilus casei*) در فرایند کپسوله کردن در آب آلبالو

سمیرا بلیانی[۱]، مژگان امتیازجو[۲]، لیلا میرمقتدایی[۱و۳]، سیده‌مرضیه حسینی[۱و۳]*

[۱] گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] گروه علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۳] انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

کپسوله‌سازی
پروبیوتیک‌ها
کپسول سین بیوتیک
آلژینات کلسیم
Spirulina platensis

چکیده

مقدمه: یکی از راه‌های ارتقاء کیفیت مواد غذایی و افزایش بهره‌وری دستگاه گوارش در بین جانوران استفاده از میکروارگانیسم‌های زیست‌یار می‌باشد. این موجودات سودمند برای داشتن عملکرد بهتر و موثرتر در غذا و سیستم گوارش نیازمند شرایط بهینه و ترکیبات دیگری موسوم به پری‌بیوتیک‌ها هستند. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی اثرات پری‌بیوتیکی جلبک اسپیرولینا بر روی زنده‌مانی دو گونه باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در فرایند کپسوله کردن در آب آلبالو انجام شد.

مواد و روش‌ها: به‌همین منظور استوک دو گونه پروبیوتیک و پودر اسپیرولینا تهیه گردید. فرایندکپسوله کردن با استفاده از روش اسپری خشک و تولید کپسول آلژیناتی کراس لینک‌شده با کلسیم انجام‌گردید. تصاویرSEM از کپسول‌های تولیدی‌گرفته و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در حالت‌های کپسوله شده با و بدون اسپیرولینا در نگه‌داری ۲۸ روزه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سنجش شدند. هم‌چنین میزان زنده‌مانی در دماهای ٦۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۰، ۱، ۲,۵، ۵ و ۱۰ دقیقه سنجش شد. علاوه بر این شرایط شبیه‌سازی محیط شیره روده و معده برای دو گونه باکتریایی در حالت‌های مختلف کپسوله شدن انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد‌که باکتری‌های کپسوله‌شده با اسپیرولینا بیش‌ترین زنده‌مانی و مقاومت در مقابل دما را داشتند (۸/۱۲±۰/۹). هم‌چنین بیش‌ترین میزان بازدهی پروبیوتیک‌های کپسوله شده درحضور اسپیرولینا به‌میزان ۸۱/۹٪ و ۸۳ ٪ برای اسیدوفیلوس‌و کازئی به‌ترتیب ارزیابی گردید. علاوه بر این باکتری‌های پروبیوتیکی کپسوله‌شده با اسپیرولینا مقاومت بیش‌تری را نسبت به سایر فرم‌های باکتریایی در شرایط شیره روده و معده نشان دادند ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری و بحث: به‌طورخلاصه نتایج این تحقیق نشان داد که کپسول حاوی اسپیرولینا و باکتری لاکتوباسیلوس کازئی دارای زنده‌مانی و مقاومت‌بالاتردربرابر تغییرات‌دمایی در شرایط شبیه‌سازی شده محیط شیره روده و معده نسبت به کپسول حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و اسپیرولینا بوده است که نهایتاً باعث افزایش کارایی و سلامت بیش‌تر محصولات غذایی و انسان می‌گردد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: moz_emtyazjoo@yahoo.com; m_emtyazjoo@iau-tnb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ شهریور ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۳ مهر ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ٤ آذر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ٦ دی ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.320538.2710

مقدمه

امروزه اهمیت غذا و تغذیه در حوزه انسانی و سایر جانوران پرورشی که در تولید غذا برای انسان نقش دارند به یک مسئله مهم و حیاتی از نظر تامین سلامت و صرفه اقتصادی تبدیل شده است. استفاده از روش‌های نوین و جایگزین روش‌های قدیمی که همواره از بازدهی پایینی برخوردار هستند و باعث صرف هزینه‌های بسیار می‌شوند نیز ازجمله راهکارهای مناسبی در جهت ارتقاء کیفیت محصولات تولیدی و سلامت انسان می‌باشند (۱). روش‌های زیستی مبتنی بر استفاده از ارگانیسم‌های سودمند که می‌توانند باعث افزایش کارایی مواد غذایی در حوزه انسانی و جیره دام و طیور و آبزیان گردد (۲). یکی از راه‌های افزایش کارایی مواد غذایی در بدن انسان و جانوران استفاده از باکتری‌های زیست‌یاری است که می‌توانند در بدن جانوران باعث افزایش راندمان جذب مواد غذایی، گوارش بهتر، رشد بیش‌تر، مبارزه با بیماری‌ها، مقاومت در برابر گونه‌های میکروبی و افزایش ایمنی بدن گردند (۳). باکتری‌های پروبیوتیکی ازجمله باکتری‌های مفید و سودمندی می‌باشند که در فرایندهای زیستی بسیاری ازجمله تولید غذاهای فراسودمند کاربرد دارند. استفاده از این گونه‌های باکتریایی در مواد غذایی مورد مصرف انسان و جانوران به‌طرز قابل توجهی می‌تواند نیاز به پروتئین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها، مکمل‌ها و داروها را کاهش دهد (۴). این گونه‌های باکتریایی برای انسان و سایر جانوران از نظر سلامتی مفید هستند. بااین‌حال این گونه‌های باکتریایی به‌منظور رشد بهتر و داشتن بیش‌ترین کارایی و اثرگذاری نیازمند شرایط محیطی و زیستی مناسبی می‌باشند (۵). ازجمله مهم‌ترین باکتری‌های زیست‌یار که در بحث ارتقاء سلامت و کیفیت موارد غذایی و زندگی انسان و دام و طیور استفاده می‌شوند می‌توان به باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی اشاره نمود (۶). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ازجمله باکتری‌های مفیدی است که خواص ضدمیکروبی این گونه در مطالعات مختلف گزارش شده است. در مطالعه‌ای که پارسایی‌مهر و همکاران بر روی اثرات ضدمیکروبی باکتری‌های لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و کازئی علیه انتروتوکسین استافیلوکوکوس ارئوس انجام دادند، مشخص گردید که دو باکتری لاکتوباسیلوس دارای خواص معنی‌داری در کنترل عوامل سمی و مضر استافیلوکوکوس هستند (۷). هم‌چنین اثرات باکتری‌های پروبیوتیکی اسیدوفیلوس و کازئی بر کاهش جمعیت‌های میکروبی و مضر در محصولات غذایی نظیر ماست، شیر، آب میوه و غذاهای کنسروی تاکنون اثبات شده است (۸). به‌منظور حفاظت از این باکتری‌های زیست‌یار در محیط‌های غذایی و دستگاه گوارش انسان و سایر جانوران پرورشی باید روش‌های زیستی مناسب ارائه گردد (۹). این باکتری‌ها به تغییرات محیطی از جمله دما، اسیدیته، داروها و کاهش مواد غذایی و ریزمغذی‌های مورد نیاز برای رشد و تکثیر بسیار حساس می‌باشند و برای افزایش ماندگاری و مقاومت باید راهکارهایی ارائه گردد (۴). پری‌بیوتیک‌ها مواد ریزمغذی و مفید هستند. باکتری‌های پروبیوتیکی با انجام فرایندهای مختلف زیستی اقدام به تجزیه و قابلیت دسترسی این مواد برای خود و بدن میزبان ایجاد می‌کنند (۱۰). در این‌خصوص از مواد پری‌بیوتیکی که دارای کم‌ترین مضرات و بیش‌ترین خواص و فواید باشند جهت غنی‌سازی محیط زندگی باکتری‌های پروبیوتیکی استفاده می‌گردد. در این حالت پری‌بیوتیک‌ها به‌علت دارا بودن اجزای غذایی، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و مواد ضروری باعث افزایش مقاومت و کارایی این گونه‌ها می‌گردد (۱۱). در این زمینه موجودات و مواد پری‌بیوتیکی متعددی ازجمله مخمرها، موجودات ریزآبزی و ریزجلبک‌ها استفاده شده است. در این بین ریزجلبک‌های آبزی به‌دلیل دارا بود خواص و اجزای غذایی بسیار سودمند و ضروری مثل اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب، آنتی‌اکسیدان‌ها نقش موثری در حمایت از باکتری‌های پروبیوتیکی دارند (۱۲). جلبک ریزآبزی اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) ازجمله موجودات ریزآبزی می‌باشد که در آب‌های شیرین با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد و نمو می‌کند. استفاده از این جلبک در طی سال‌های اخیر به‌عنوان مکمل غذایی سرشار از مواد مغذی ضروری و کمیاب در صنایع غذایی و جیره سایر جانداران مورد توجه قرار گرفته است. اسپیرولینا به شکل خمیر جلبکی، پودر خشک، عصاره و افشانه به‌منظور غنی‌سازی مواد غذایی استفاده می‌گردد (۱۳). این جلبک دارای ترکیبات ارزشمندی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و نقش نگه‌دارنده برای سایر ارگانیسم‌ها ایفا می‌کند. بنابراین هدف از این مطالعه اثرات پری‌بیوتیکی جلبک اسپیرولینا بر زنده‌مانی دو گونه از باکتری‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در فرایند کپسوله کردن در آب آلبالو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد و تجهیزات آزمایشگاهی: پودر جلبک اسپیرولینا از شرکت آرین گستر ایران تهیه شد. لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس La-5 و لاکتوباسیلوس کازئی ۴۳۱ به شکل خشک شده انجمادی از شرکت Chr Hansen (دانمارک) خریداری شد. تمامی مواد شیمیایی نظیر NaCl، پپسین، نمک‌های صفراوی، پانکراتین، HCl (0.1N)، NaOH (0.1N)، MRS آگار، هیدروکسیدآمونیوم، اسیدسوکسینیک، سیترات سدیم، سدیم آلژینات، مالتودکسترین، CaHPO4، پپتون واتر، MRS براث) از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. برای تهیه آبمیوه آلبالو، میوه آلبالو تازه را تهیه کرده و بعد از شستشو و جدا کردن زوائد و

هسته‌ها، آبگیری و از صافی عبور داده شد. سپس آبمیوه به‌صورت مجزا به‌درون شیشه‌های درب‌دار به‌میزان ۲۴۰ سی‌سی انتقال داده شد. سپس در بن ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده بعد از این‌که نمونه‌ها به دمای مورد نظر رسید و مدت زمان لازم را سپری کردند، بلافاصله نمونه‌ها با آب سرد خنک شده تا عمل پاستوریزاسیون کامل گردد (۱۴).

تهیه استوک باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باکتری لاکتوباسیلوس کازئی: برای تهیه استوک باکتری، هر باکتری را به صورت جداگانه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط MRS broth در دمای اتاق به‌مدت ۱۰ دقیقه آب‌دهی مجدد شدند. سپس به‌صورت بی‌هوازی در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. با مخلوط کردن ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS broth رشد کرده و انکوباسیون شده با ۰/۲۵ میلی‌لیتر از گلیسرول استریل در ویال‌های فوق انجمادی استریل، تا زمان مصرف در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. یک ویال از هر کشت ذخیره در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه یخزدایی و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS broth تلقیح و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی به‌منظور احیاء سلول‌ها گرمخانه‌گذاری گردید. متعاقباً ۱۰ میلی‌لیتر از کشت احیاء شده به ۱ لیتر محیط کشت MRS broth تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی، ۲۰ ساعت برای (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5) و ۱۶ ساعت برای (لاکتوباسیلوس کازئی ۴۳۱) برای رسیدن به حداکثر رشد ثابت گرمخانه‌گذاری شد. باکتری‌های کشت داده شده با استفاده از سانتریفیوژ g ×۲۵۰۰ به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق استحصال و دو بار به‌وسیله آب پپتونه استریل ۰/۱٪ شسته و رسوب حاصل با آب پپتون استریل رقیق شدند تا غلظت باکتری 10^{11} CFU mL^{-1} به‌دست آید (۱۵).

فرایند کپسوله کردن: به‌منظور انجام فرایند کپسوله کردن باکتری‌های پروبیوتیکی با جلبک اسپیرولینا مقدار ۵ میلی‌لیتر از باکتری فعال شده تهیه در مرحله قبل را برداشته و سانتریفیوژ گردید. مواد ته‌نشین شده به محلول دیواره سلولی باکتری اضافه شد. اسپری خشک‌کن برای ریزپوشانی باکتری‌ها با استفاده از دستگاه Buchi B290 (ساخت سوئیس) با دمای خروجی کم‌تر از ۷۰ درجه سانتی‌گراد، آسپیراتور ۳۵ مترمکعب در ساعت و دمای هوای ورودی ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد (۱۶). در این مرحله یک سوسپانسیون حاوی ۶/۶ گرم مالتودکسترین، ۱ گرم آلژینات سدیم، ۰/۴ گرم $CaHPO_4$ و ۲ گرم سوکسینیک اسید (pH۵/۶) برای کپسول‌های متشکل از باکتری‌های بدون اسپیرولینا و ۲/۴ گرم پودر اسپیرولینا، ۴/۵ گرم مالتودکسترین، ۰/۷ گرم آلژینات سدیم با ۰/۴ گرم $CaHPO_4$ و ۲ گرم سوکسینیک اسید (pH۵/۶) برای کپسول‌های حاوی اسپیرولینا و باکتری مخلوط شد. در نهایت، مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر برای تولید باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده خشک بارگذاری شد (۴).

تلقیح باکتری‌ها به آب‌میوه: ۱ گرم از کپسول‌های به‌دست آمده در مرحله قبل را به‌صورت جداگانه به ظروف حاوی ۲۴۰ سی‌سی آبمیوه استریل شده اضافه می‌کنیم. برای نمونه‌های بدون کپسول نیز از محلول باکتری فعال شده، ۰/۴ سی‌سی سوسپانسیون باکتریایی سانتریفوژ و رسوب حاصله به‌صورت جداگانه به ۲۴۰ سی‌سی آبمیوه پاستوریزه شده اضافه گردید (۱۷).

شکستن کپسول و شمارش باکتری‌های پروبیوتیکی: به منظور شمارش کلنی‌های باکتریایی مقدار ۱ گرم از نمونه‌های کپسوله شده به ۹ میلی‌لیتر سیترات سدیم استریل ۲% (وزنی/حجمی) با pH حدود ۶ اضافه گردید. سوسپانسیون ایجاد شده در دمای اتاق به‌مدت ۱۰ دقیقه توسط هم‌زن مغناطیسی به‌هم‌زده شد تا باکتری‌های کپسوله شده رها شوند. سپس باکتری‌های استخراج شده به محیط کشت MRS آگار اضافه و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. تعداد باکتری‌ها در ۳ تکرار شمارش شد (۱۸).

بررسی میزان زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در برابر تغییرات دمایی: به‌منظور بررسی فاکتور زنده‌مانی در مقابل دماهای مختلف میزان بقای هر دو باکتری محصور شده و آزاد در پاسخ به تغییرات دمایی در دمای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. تعداد باکتری‌های زنده مانده پس از اعمال تیمار دمایی با روش پورپلیت شمارش گردید (۱۹). علاوه بر این، D-value با رسم نمودار تعداد باکتری‌های باقی‌مانده در دماها و زمان‌های مختلف محاسبه شد (۲۰).

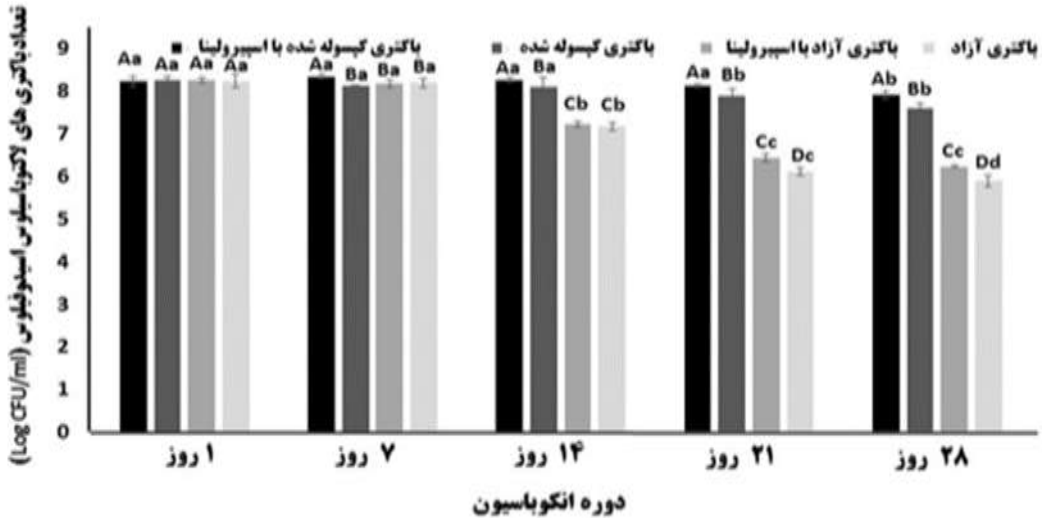
بررسی مقاومت باکتری‌ها نسبت به شرایط شیره معده و روده: برای بررسی میزان بقای باکتری‌های کپسوله شده (اسیدوفیلوس و کازئی) در سیستم گوارش، شرایط معده و روده شبیه‌سازی شد. برای وضعیت معده، پپسین با محلول ۰/۵٪ نمک طعام مخلوط شد تا به غلظت ۳ گرم در لیتر برسد و از HCl استریل (۰/۱ مولار) برای کاهش pH به ۱/۵ استفاده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از آب میوه حاوی پروبیوتیک‌های کپسوله شده و ۱ میلی‌لیتر آب میوه حاوی باکتری‌های آزاد به‌طور جداگانه در ویال حاوی ۹ میلی‌لیتر شیره معده منتقل و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بقای باکتری در فواصل زمانی ۳۰ دقیقه (۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، و ۱۲۰ دقیقه) در طول دوره کمون در شیره معده مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱، ۲۲). برای شبیه‌سازی وضعیت روده،

پانکراتین با سدیم کلرید ۰/۵٪، تا رسیدن به غلظت نهایی ۱ گرم بر لیتر با ۴/۵٪ محلول نمک‌های صفراوی مخلوط گردید، سپس pH آن با محلول سود ۰/۱ مولار استریل به حدود ۸ رسانده شد. هر دو محلول با استفاده از میکروفیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند. برای ارزیابی قابلیت زنده ماندن باکتری در روده، محلول تهیه شده ابتدا به‌مدت ۲ ساعت در شیره معده مخلوط شد، سپس در ویال حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط شبیه‌سازی شده روده منتقل گردید و به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. میزان بقا در فواصل ۳۰ دقیقه ای در مدت زمان ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در شیره روده تعیین شد (۲۱، ۲۲).

آنالیزهای آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقادیر میانگین به‌دست آمده از آزمایشات میکروبی با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه مقایسه شد. برای نشان دادن تفاوت معنی‌دار بین و درون گروه‌های مورد مطالعه از آزمون دانکن استفاده شد. P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار درنظر گرفته شد. زنده ماندن باکتری‌ها در طول زمان با استفاده از آزمون مدل خطی عمومی ارزیابی شد.

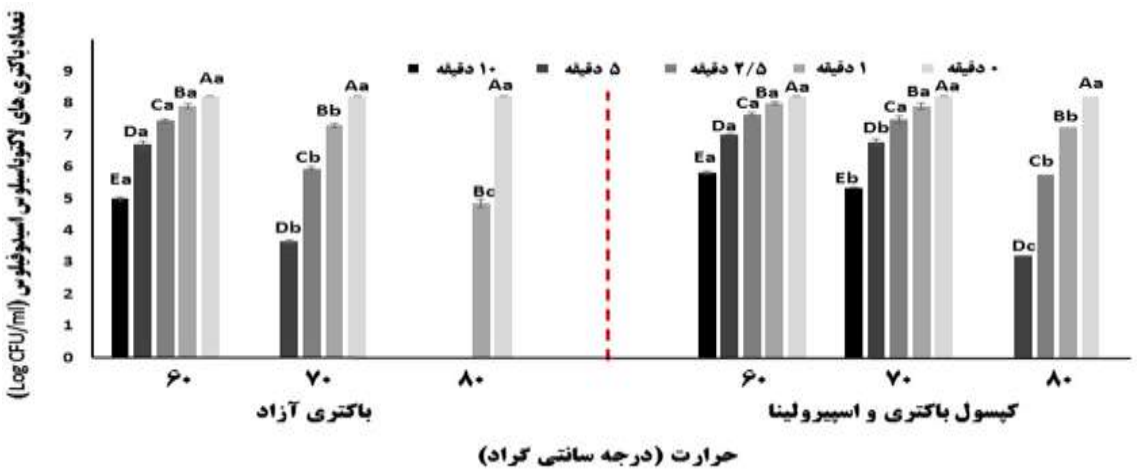
نتایج

زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس: نتایج حاصل از تغییرات تعداد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در حضور و عدم حضور جلبک اسپیرولینا در شکل ۱ آورده شده است. براساس نتایج مشخص گردید که در گروه باکتری‌های پروبیوتیک اسیدوفیلوس که با جلبک اسپیرولینا کپسوله شدند مقدار زنده‌مانی باکتریایی در طی زمان نگه‌داری ۴ هفته‌ای یخچالی بیش‌تر بود. این مقادیر در مقایسه با گروه‌های فاقد جلبک اسپیرولینا تفاوت معنی‌داری داشت (p< ۰/۰۵). میزان زنده‌مانی باکتری اسیدوفیلوس در پاسخ به تغییرات دمایی ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان‌های ۰، ۱، ۲،۵، ۵ و ۱۰ دقیقه در حالات مختلف کپسوله شده با اسپیرولینا و حالت آزاد در شکل ۲ ارائه شده است. براساس یافته‌ها مشخص گردید که تفاوت معنی‌داری در مقاومت به دما برای فرم آزاد باکتری با فرم کپسوله شده باکتری به‌همراه اسپیرولینا در دمای ۶۰،۷۰،۸۰ وجود دارد و مقاومت دمایی بیش‌تر در فرم کپسوله کاملاً مشهود می‌باشد (p<۰/۰۵).



شکل ۱: تغییرات تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(Log CFU/ml) در آبمیوه آلبالو طی دوره نگه‌داری در دمای یخچال

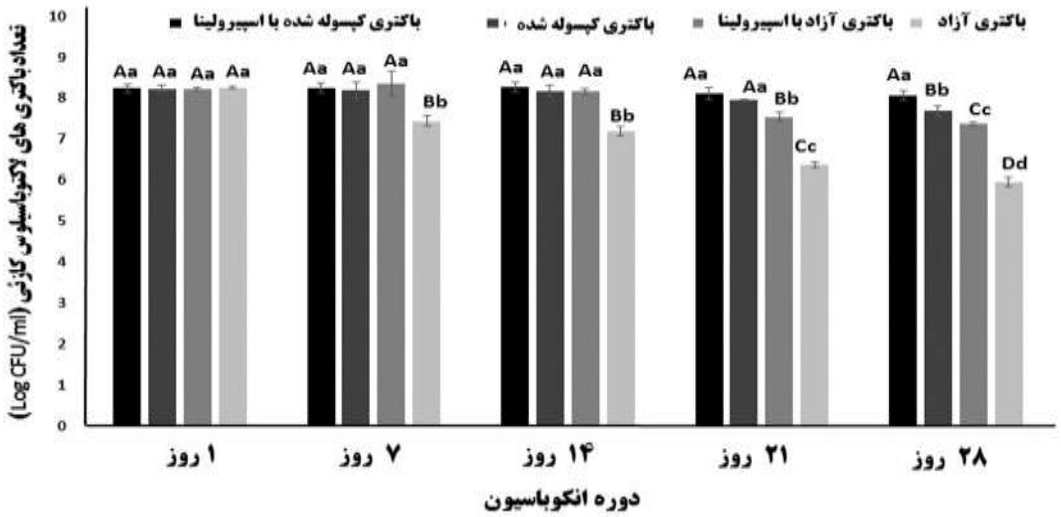
(اعداد نمودار میانگین ۳ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشد. حروف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در احتمال p<۰/۰۵ می‌باشد)



شکل ۲: تاثیر دما بر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (Log CFU/ml)

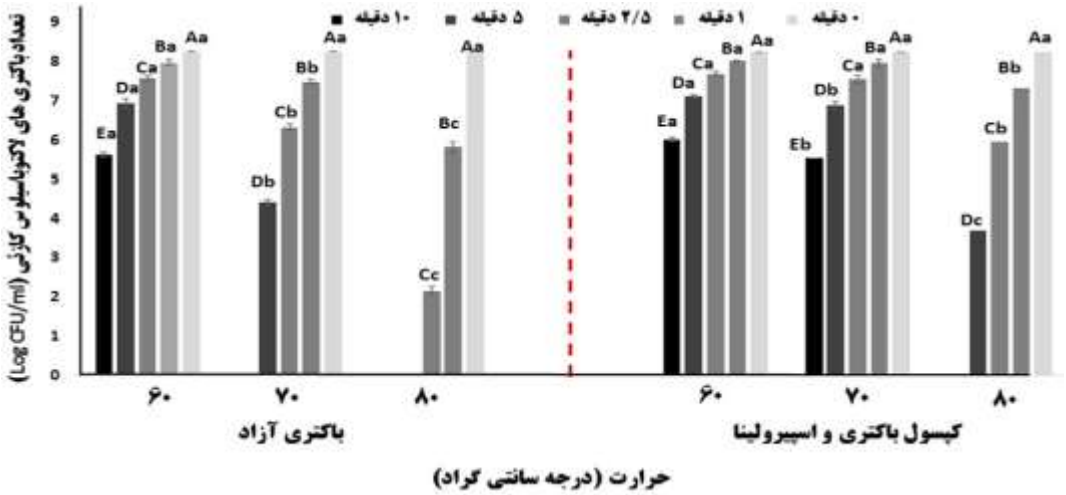
(اعداد نمودار میانگین ۳ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشد. حروف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در احتمال p<۰/۰۵ می‌باشد)

زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی: نتایج حاصل از تغییرات تعداد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در حضور و عدم حضور جلبک اسپیرولینا در شکل ۳ آورده شده‌است.براساس نتایج مشخص گردید که در گروه باکتری‌های پروبیوتیک کازئی که با جلبک اسپیرولینا کپسوله شدند مقدار زنده‌مانی باکتریایی در طی زمان نگه‌داری ۴ هفته‌ای یخچالی بیش‌تر بوده که این مقادیر در مقایسه با گروه‌های فاقد جلبک اسپیرولینا تفاوت معنی‌داری داشته است (p<۰/۰۵). هم‌چنین میزان زنده‌مانی باکتری کازئی در پاسخ به تغییرات دمایی ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان‌های ۰، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ دقیقه در حالات مختلف کپسولاسیون در شکل ۴ ارائه شده است. براساس یافته‌ها مشخص گردید که فرم آزاد باکتری با فرم کپسوله باکتری به‌همراه اسپیرولینا در دمای ۶۰،۷۰،۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری در مقاومت دمایی تفاوت دارد و مقاومت دمایی بیش‌تر فرم کپسوله کاملاً مشهود می‌باشد (p<۰/۰۵). با بررسی شکل‌های فوق می‌توان نتیجه را گرفت که کپسول حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و اسپیرولینا در آبمیوه آلبالو در مقایسه با کپسول حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و اسپیرولینا، از لحاظ زنده‌مانی و مقاومت به تغییرات دمایی، بالاتر است.



شکل ۳: تغییرات تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی (Log CFU/ml) در آبمیوه آلبالو طی دوره نگه‌داری در دمای یخچال

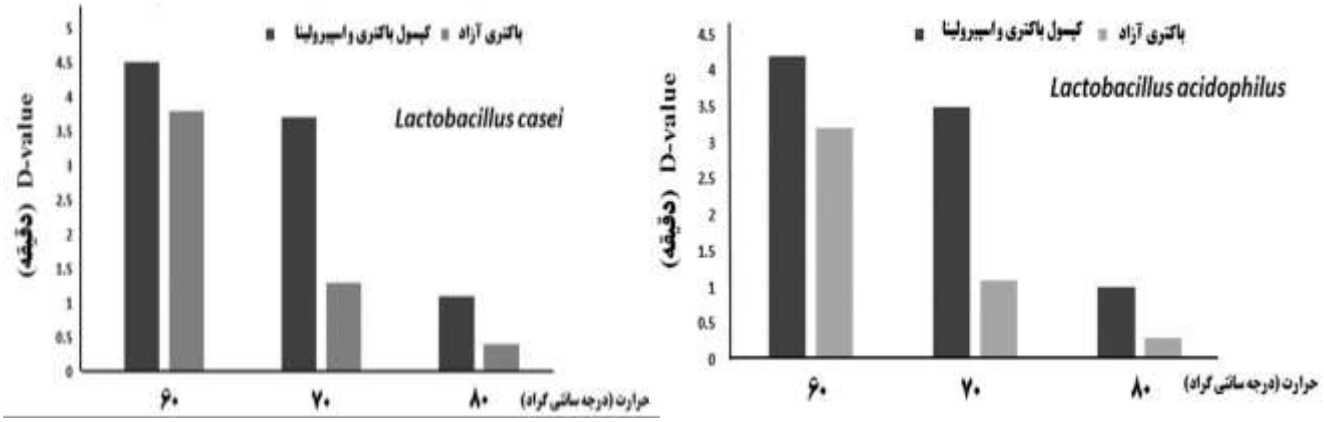
(اعداد نمودار میانگین ۳ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشد. حروف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در احتمال p<۰/۰۵ می‌باشد)



شکل ۴: تاثیر دماهای مختلف بر لاکتوباسیلوس کازئی (Log CFU/ml)

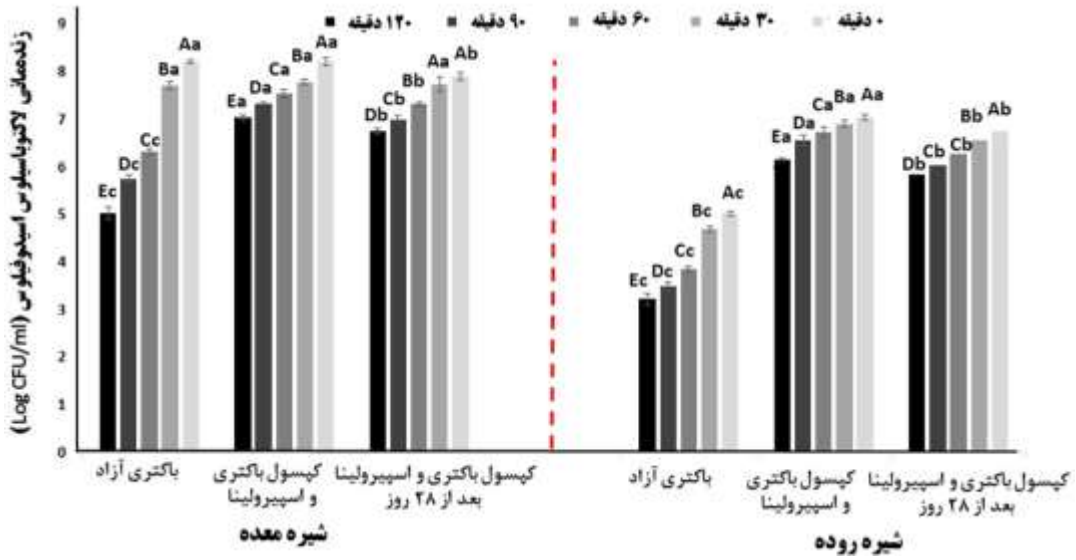
(اعداد نمودار میانگین ۳ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشد. حروف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در احتمال p<۰/۰۵ می‌باشد)

مقادیر D-value دو باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کازئی: مقادیر D-value ناشی از انجام آزمایش مقاومت به تغییرات دمایی برای هر دو باکتری پریبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در شکل ۵ آورده شده است. براساس نتایج مشخص گردید میزان مقاومت باکتریایی به تغییرات دمایی در حالت کپسول شده با اسپیرولینا نسبت به حالت باکتری آزاد بالاتر بود.



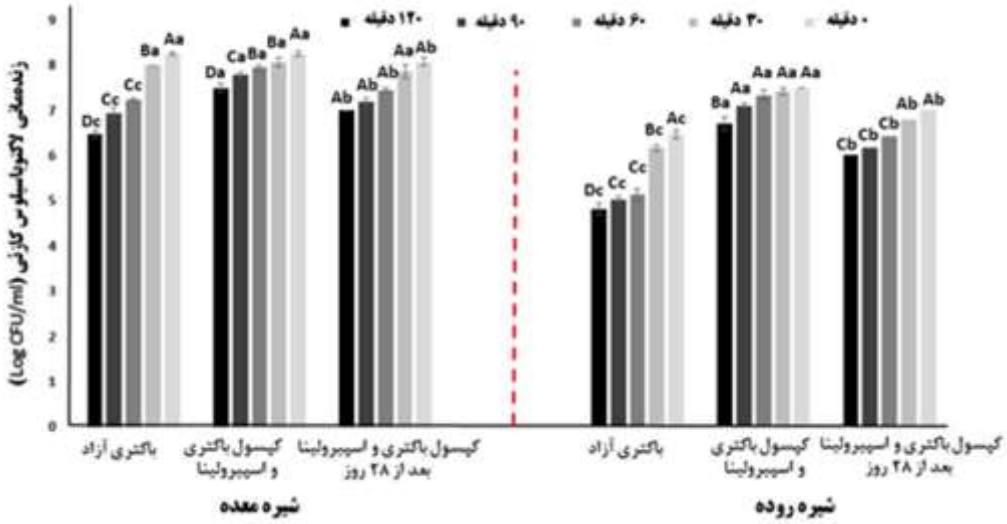
شکل ۵: مقادیر D-value برای دو گونه باکتریایی مورد مطالعه در حالات آزاد و کپسوله شده با جلبک اسپیرولینا

مقاومت باکتری‌ها نسبت به شرایط شیره معده و روده: نتایج حاصل از بررسی زنده‌مانی باکتری‌های کپسوله شده اسیدوفیلوس (شکل ۶) و کازئی (شکل ۷) در شرایط شبیه‌سازی شده شیره معده و روده ارائه شده است. براساس نتایج مشخص گردید که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، کپسول تازه حاوی اسپیرولینا بیش‌ترین مقاومت به شرایط معده و روده را دارا بوده و سپس کپسول ۲۸ روز مانده در آبمیوه و در نهایت فرم آزاد کم‌ترین زنده‌مانی را دارد. فقط تیمار کپسول تازه حاوی اسپیرولینا دارای تعداد لازم جهت خواص سودمند پروبیوتیک بود (شکل ۶). اما نتایج مربوط به انجام شبیه‌سازی شرایط شیره معده و روده در باکتری کازئی در خصوص زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش نشان داد که کپسول تازه حاوی اسپیرولینا بیش‌ترین مقاومت به شرایط معده و روده را دارا بوده و سپس کپسول ۲۸ روز مانده در آبمیوه و در نهایت فرم آزاد کم‌ترین زنده‌مانی را دارد. فقط تیمارهای کپسول تازه حاوی اسپیرولینا و ۲۸ روز مانده در آبمیوه دارای تعداد لازم جهت خواص سودمند پروبیوتیک بودند (شکل ۷).



شکل ۶: زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (Log CFU/ml) در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده

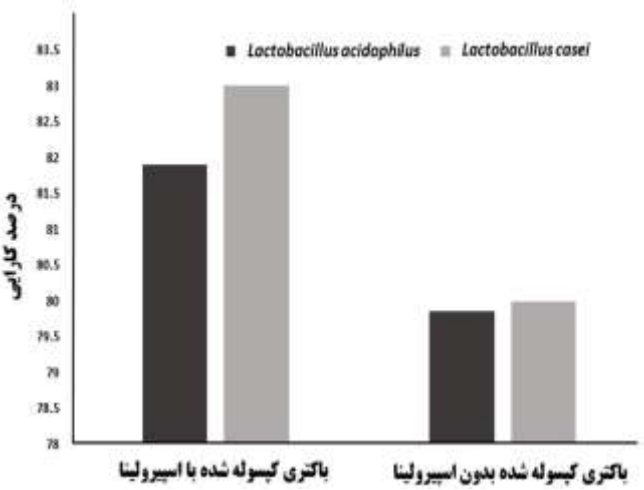
(اعداد نمودار میانگین ۳ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشد. حروف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در احتمال p<۰/۰۵ می‌باشد)



شکل ۷: زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی (Log CFU/ml) در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده

(اعداد نمودار میانگین ۳ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشد. حروف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در احتمال p<۰/۰۵ می‌باشد)

کارایی کپسولاسیون: نتایج حاصل از مقایسه راندمان کپسولاسیون دو گونه باکتریایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در حضور یا عدم حضور جلبک اسپیرولینا در شکل ۸ آورده شده است. براساس نتایج مشخص گردید که میزان کارایی کپسولاسیون هر دو گونه باکتریایی در حضور جلبک اسپیرولینا نسبت به حالت آزاد (بدون اسپیرولینا) افزایش یافته است. درصد کارایی گونه اسیدوفیلوس از مقدار ۷۹/۸۶٪ در حالت بدون اسپیرولینا به‌مقدار ۸۱/۹٪ در حضور اسپیرولینا رسید. هم‌چنین گونه کازئی افزایش کارایی را از مقدار ۸۰ ٪ (بدون اسپیرولینا) به مقدار ۸۳ ٪ در حضور اسپیرولینا نشان داد. هم‌چنین نتایج نشان داد که راندمان کپسولاسیون باکتری کازئی کپسوله شده با اسپیرولینا در مقایسه با باکتری اسیدوفیلوس کپسوله شده در حضور اسپیرولینا بیش‌تر است.



شکل ۸: راندمان کپسولاسیون دو گونه باکتریایی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی

بحث

گونه‌های باکتری زیست‌یار ازجمله گونه‌های مهم و سودمندی می‌باشند که به‌علت دارا بودن خواص زیستی می‌توانند نقش مهمی را در سلامت انسان و موجودات و کیفیت مواد غذایی ایفا کنند. این گونه‌های باکتریایی قادر هستند تا در مواد غذایی و سیستم گوارش جانوران با سایر گونه‌های باکتریایی رقابت کرده و درنتیجه جای خود را به باکتری‌های مضر یا غیرسودمند دهند (۲۳). دو گونه باکتریایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی ازجمله باکتری‌های پروبیوتیکی سودمندی هستند که در صنایع غذایی و تحقیقات مختلف استفاده شده‌اند (۹). در همین راستا کفشدوزان و همکاران گزارش دادند که باکتری‌های پروبیوتیکی نقش اساسی در جایگزینی گونه‌های باکتریایی مضری دارند که باعث بروز بیماری‌های عفونی در انسان و سایر جانوران می‌شود (۲۴). مطالعه پیش رو اثرات پری‌بیوتیکی گونه جلبکی اسپیرولینا پلاتنسیس را روی زنده‌مانی دو گونه باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در فرایند کپسوله کردن مورد بررسی قرار داد. اسپیرولینا یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین گونه‌های جلبکی است که به‌علت دارا بودن ترکیبات ارزشمند و مواد غذایی ضروری و کمیاب نظیر اسیدهای چرب غیر اشباع، اسیدهای آمینه، آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان مکمل غذایی استفاده می‌گردد (۲۵). در همین راستا اسلامی‌مشکنانی و همکاران عنوان کردند که افزودن اسپیرولینا به ماست و شیر می‌تواند پارامترهای رشد و تولید باکتری‌های پروبیوتیکی نظیر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی را ارتقاء دهد (۴). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان رشد و تعداد باکتری‌های پروبیوتیکی در کپسول‌های حاوی اسپیرولینا در مقایسه با کپسول‌های فاقد اسپیرولینا و باکتری‌های آزاد به‌مقدار بیش‌تری بوده است. اسپیرولینا حاوی مقادیر بالایی از آهن است که این عنصر نقش حیاتی در تامین مواد غذایی محیط رشد باکتری‌های پروبیوتیکی دارد (۲۶). از طرفی اسپیرولینا حاوی طیف وسیعی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که می‌تواند نقش موثری در کاهش احتمال اکسیداسیون و مرگ و میر باکتری‌های پروبیوتیکی داشته باشد (۲۷). مطالعه حاضر نشان داد که میزان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در کپسول‌های حاوی اسپیرولینا در مقابل دماهای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان‌های ۰، ۱، ۲،۵، ۵ و ۱۰ دقیقه بیش از باکتری‌های فرم آزاد فاقد اسپیرولینا بوده است. جلبک اسپیرولینا به دلیل داشتن پروتئین‌ها و پپتیدهای منحصر به‌فرد خاصیت بافری داشته و لذا از تغییرات سریع و شدید اسیدیته جلوگیری نموده که باعث افزایش ماندگاری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌گردد (۲۸). تحقیق حاضر، نتایج نشان داد که در یک دوره نگه‌داری ۲۸ روزه یخچالی، کپسول حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی همراه با اسپیرولینا میزان زنده‌مانی بالاتری نسبت به کپسول حاوی باکتری‌های لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس همراه اسپیرولینا به‌دست آمد. هم‌چنین کپسول حاوی کازئی و اسپیرولینا در مواجهه با دماهای بالا، زنده‌مانی بیش‌تری را در مقایسه با باکتری‌های فرم آزاد فاقد اسپیرولینا نشان داد. به منظور شبیه‌سازی شرایط دستگاه گوارش انسان جهت مواجه باکتری‌های کپسوله شده با شرایط مختلف تست مقاومت باکتری‌های اسیدوفیلوس و کازئی در شرایط شیره معده و روده انجام گردید. نتایج نشان داد که در سویه باکتریایی کازئی کپسوله شده همراه با اسپیرولینا تیمارهای کپسول تازه حاوی اسپیرولینا و کپسول ۲۸ روز مانده در آبمیوه دارای تعداد لازم جهت خواص سودمند پروبیوتیک بودند درحالی‌که در سویه باکتریایی اسیدوفیلوس کپسوله شده همراه با اسپیرولینا تیمار کپسول تازه حاوی اسپیرولینا دارای تعداد لازم جهت خواص سودمند پروبیوتیک بود. هم‌چنین میزان مقاومت باکتریایی در مدت زمان‌های پایین‌تر مواجه با شرایط شیره معده و روده نسبت به زمان‌های بیش‌تر، بالاتر بوده است. مطالعات مشابهی درخصوص کپسولاسیون گونه‌های باکتریایی با جلبک اسپیرولینا انجام نشده است و تنها مطالعات درخصوص باکتری‌های ریزپوشانی شده در شرایط معمول می‌باشد. با این‌حال صیادی و تاجیک اقدام به بررسی کارایی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در سم‌زدایی آفلاتوکسین در محیط شبیه‌سازی شده ترشحات دستگاه گوارش پرداختند (۲۹). هم‌چنین میلانی و همکاران اثرات شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده را بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک ریز پوشانی شده لاکتوباسیلوس کازئی در بستنی ماستی سین‌بیوتیک را بررسی کردند (۳۰). نتایج نشان داد که بین میزان باکتری‌های

ریزپوشانی شده در مقایسه با باکتری‌های آزاد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. هم‌چنین نتایج نشان داد که باکتری‌های کپسوله شده در مقایسه با باکتری‌های آزاد میزان مقاومت بیش‌تری را نشان دادند که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت. نتایج حاصل از بررسی میزان کارایی کپسولاسیون باکتری‌های اسیدوفیلوس و کازئی نشان داد که میزان کارایی باکتری اسیدوفیلوس از مقدار ۷۹/۸۶٪ بدون حضور اسپیرولینا به‌میزان ۸۱/۹٪ در حضور اسپیرولینا رسیده است. هم‌چنین میزان کارایی کازئی از مقدار ۸۰٪ در کپسول‌های فاقد اسپیرولینا به‌مقدار ۸۳٪ در حضور اسپیرولینا افزایش یافت. تحقیق حاضر با هدف مقایسه اثرات پری‌بیوتیکی جلبک اسپیرولینا بر خصوصیات زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در فرایند کپسوله کردن انجام گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که جلبک اسپیرولینا به‌علت داشتن خواص تغذیه‌ای و ترکیبات مغذی قادر است در فرایند کپسولاسیون، میزان زنده‌مانی دو گونه باکتری پروبیوتیکی اسیدوفیلوس و کازئی را ارتقاء بخشد. زنده‌مانی باکتری کپسوله شده کازئی در حضور اسپیرولینا در مقایسه با باکتری اسیدوفیلوس کپسوله شده به‌همراه اسپیرولینا بیش‌تر بوده است. هم‌چنین نتایج نشان داد که کپسول حاوی کازئی و اسپیرولینا در مواجهه با دماهای بالا، زنده‌مانی بیش‌تری را در مقایسه با کپسول حاوی اسیدوفیلوس و اسپیرولینا نشان داد. به‌علاوه، بر اساس نتایج تست مقاومت باکتریایی در محیط شبیه‌سازی شده شیره معده و روده مشخص گردید که باکتری کپسوله شده در حضور اسپیرولینا در مقایسه با فرم آزاد مقاومت بیش‌تری را نشان دادند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از جلبک اسپیرولینا می‌تواند نقش موثری در بهبود زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی ایفا نماید. در این صورت خواص و اثرات سودمند دو گونه پروبیوتیکی اسیدوفیلوس و کازئی در محصولات غذایی و سیستم گوارش انسان و سایر جانوران حفظ گردیده و لذا سلامتی بیش‌تری را به ارمغان دارد.

منابع

1. **Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D. and Tzia, C., 2021.** A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 61: 1515-1536. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761773.
2. **Vojdani, R. and Zali, M.R., 2003.** Probiotics and their mechanism of action in the prevention and treatment of human diseases. Research in Medicine. 27(4) :313-318. (In persian)
3. **Bodera, P. and Chcialowski, A., 2009.** Immunomodulatory Effect of Probiotic Bacteria. Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov. 3: 58-64. https://doi.org/10.2174/187221309787158461.
4. **Eslami Moshkenani, A., Vajihe, F., Khosravi-Darani, K. and Mazinani, S., 2015.** The effect of powdered Spirulina platensis biomass on some physicochemical and sensory properties of probiotic doogh containing powdered mint. Innovative Food Technologies. 2(2): 59-70. (In persian)
5. **Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J. and Capanoglu, E., 2019.** A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. Food Chem. 272: 494-506. https://doi.org/10.1016/j.foodchem. 2018.07.205.
6. **Oyetayo, V.O., Adetuyi, F.C.** and **Akinyosoye, F.A., 2003.** Safety and protective effect of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei used as probiotic agent in vivo. African J. Biotechnol. 2: 491-498. https://doi.org/10.5897/ajb2003.000-1090.
7. **Parsaeimehr, M., Misaghi, A., Afshin Akhondzade, A., Zahraei Salehi, T., Modaresi, M.H., Gandomi, H., Firuzbakht, F., Karkudi, S. and Assadollah nezhad, R., 2011.** Effect of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. Journal of food science and technology. 1(8): 91-97. (In persian)
8. **Ghorbani, A. and Bazooyar, B., 2010.** Photoclinic. Behçet disease. Arch. Iran. Med. 13: 365-366. https://doi.org/010134/AIM.0020.
9. **Soltan Dallal, M.M., Mojarrad, M., Salehipour, Z., Atapour Mashhad, H., Raoofian, R. and Rajabi, Z., 2012.** Effects of probiotic *lactobacillus acidophilus* and *lactobacillus casei* on the behaviour of colorectal tumor cells**.** Tehran University Medical Journal. 70(4): 220-227. (In persian)
10. **Ghaeni, M., Roomiani, L. and Masomizadeh, Z., 2015.** Comparison of Coliform in Powder and Fresh Spirulina, Arthrospira platensis. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology). 1(1): 85-93. (In persian)
11. **Darjani, P., Hosseini Nezhad, M., Kadkhodaee, R. and Milani, E., 2016.** Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of Lactobacillus casei exposed to simulated gastrointestinal conditions. LWT - Food Sci. Technol. 73: 162-167. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.032.
12. **El-Bahr, S., Shousha, S., Shehab, A., Khattab, W., Ahmed-Farid, O., Sabike, I., El-Garhy, O., Albokhadaim, I. and Albosadah, K., 2020.** Effect of dietary microalgae on growth performance, profiles of amino and fatty acids, antioxidant status, and meat quality of broiler chickens. Animals. 10: 1-14. https://doi.org/10.3390/ani10050761.
13. **Vejdani Nia, M., Emtyazjoo, M. and Chamani,M., 2020.** Algae usage in producing functional food: A case study on *Spirulina platensis* for enrichment quail egg, Research in Marine Sciences. 5(4): 806-814.
14. **Ghazavi, N., Moshtaghi, E. and Boniadian, A., 2016.** Production of probiotic juice by use of two varieties of Red and Yellow apple. Journal of Food Microbiology. 3(2): 1-10. (In persian)
15. **Chaikham, P., 2015.** Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage, Food Bioscience. 2: 1-18.
16. **Zomorodi, Sh., Khosrowshahi Asl, A., Razavi Rohani, S.M. and Miraghaei, S., 2011.** Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. International Journal of Dairy Technology. 64: 84-91.
17. **Koushki, V., Babaei, A., Mehraban Sangatash, M. and**

Safari, O., 2021. The Efficacy of Co-encapsulation with Herbal Extracts on Viability of Probiotic Bacteria During Storage in Fruit Juices. Journal of Innovation in Food Science and Technology. 13(2): 1-13. (In persian)

18. **Homayouni, A., 2008.** Healthy Characteristics of Functional Foods, Probiotic Prebiotic, Synbiotic. Medical Science and curing university of Tabriz publisher. Tabriz Iran. (In persian)
19. **Mandal, S., Puniya, K. and Singh, K., 2006.** Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. International Dairy Journal. 126(2-3): 249-284.
20. **Rajaie Azarkhavarani, P., Ziaee, E. and Hosseini, S.M.H., 2018.** Effect of encapsulation on the stability and survivability of *Enterococcus faecium* in a non-dairy probiotic beverage. Food Science and Technology International. 0(0): 1-10. DOI: 10.1177/1082013218813823.
21. **Kazemi, P., Peydayesh, M., Bandegi, A., Mohammadi, T. and Bakhtiari, O., 214.** Stability and extraction study of phenolic wastewater treatment by supported liquid membrane using tributyl phosphate and sesame oil as liquid membrane Chem. Eng. Res. Des. 92: 375-383.
22. **Khosravi, A.D., Parhizgari, N., Abbasi Montazeri, E., Mozaffari, A. and Abbasi, F., 2013.** The Prevalence of Bacteria Isolated from Endotracheal Tubes of Patients in Golestan Hospital, Ahvaz, Iran, and Determination of Their Antibiotic Susceptibility Patterns. Jundishapur J Microbiol. 6(1): 67-71. DOI: 10.5812/jjm.4583.
23. **Sahebkhani, M., Shahab Lavasani, A. and Movahed, S., 2020.** The production of probiotic fruit yoghurt containing strawberry form sheep milk. Journal of Animal Environmental. 11(4): 419-428. (In persian)
24. **Kafshdouzan, K., Rouzbehan, B. and Moslemy, M., 2013.** Reviewing the role of probiotics used in poultry feeding on health promotion of chicken meet. Iranian J Nutr Sci Food Technol. 7(5): 821-828. (In persian)
25. **Maddaly, R., 2010.** The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. Nutr. Diet. Suppl. 73. https://doi.org/10.2147/nds.s9838.
26. **Ak, B., Avşaroğlu, E., Işık, O., Özyurt, G., Kafkas, E., Etyemez, M. and Uslu, L., 2016.** Nutritional and Physicochemical Characteristics of Bread Enriched with Microalgae Spirulina platensis. Int. J. Eng. Res. Appl. www.ijera.com. 6: 30-38.
27. **Ghaeni, M., Matinfar, M., Roomiani, L. and Choobkar, N., 2010.** Chemical composition of Spirulina powder. Journal of Animal Environmental. 2(1): 55-60. (In persian)
28. **Joya, M., Ashayerizadeh, O. and Dastar, B., 2020.** Effect of microalgae Spirulina and Bacillus subtilis on carcass characteristics, intestinal morphology and blood parameters of broiler chickens. Journal of Animal Environmental. 12(1): 87-94. (In persian)
29. **Sayadi, M. and Tajik, H., 2018.** Assessing the efficiency of probiotic bacteria *Lactobacillus* acidophilus in detoxification of aflatoxin b1 based on a simulated model of digestive system secretions. The Journal of Urmia University of Medical Sciences. 29(4): 270-281. (In persian)
30. **Milani, E., Naeemi, H., Mortazavi, S.A. and Koocheki, A., 2012.** Influence of simulated gastrointestinal conditions on survivability of microencapsulated probiotic *Lactobacillus casei* in symbiotic frozen yogurt. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 8(2): 190-199.