Food Hygiene, Vol. 12, No. 47, Autumn 2022

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2022.1967947.1376**

Encapsulation of wheat germ and probiotic bacteria *Bacillus licheniformis* using guar gum and maltodextrin by freeze drying method to increase the shelf life of wheat germ

Sharifi, M. [1], Goli, M. [2*], Ramezani, M. [3]

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Associat professor of Food Science and Technology & Laser and Biophotonic in Biotechnologies Research Center, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
3. Assistance professor of Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Centre (IBRC), ACECR, Tehran, Iran.

[*]Coresponding author Email: mgolifood@yahoo.com
(Received: 2022/9/17 Accepted: 2022/11/30)

Abstract

As a byproduct of the milling process, wheat germ provides a rich source of minerals, vitamins, tocopherols, phytosterols, amino acids, and important fatty acids. However, the high levels of unsaturated oil and high levels of enzymes lead to a reduction in wheat germ's nutritional value during storage, which severely reduces the product's shelf life. The purpose of this study was to use guar gum and maltodextrin together with the freeze-drying encapsulation technique to extend the shelf life of probiotic wheat germ containing *Bacillus licheniformis*. In this regard, the durability of the encapsulated probiotic wheat germ was assessed for 360 days of storage using three different ratios of maltodextrin to guar gum, including 1 to 0.3, 0.1, and 0.03. The tests were carried out using a completely random design, and the averages were assessed using Duncan's test with a significance level of 5%. The effect of time on the changes in oxidation indices of the encapsulated wheat germ was evaluated positively. During 360 days of storage, the encapsulated sample with maltodextrin and guar gum in all examined ratios significantly reduced the total acid value ($P< 0.05$). In comparison to samples without probiotics, the inclusion of *B. licheniformis* probiotic considerably reduced the values of the total acid number and TBA index ($P< 0.05$). In the probiotic treatment, the levels of peroxide, anisidine, totox, mold, and yeast significantly increased with longer storage times ($P< 0.05$).

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Probiotic wheat germ, Oxidation indices, Microorganism counting, Guar gum to maltodextrin ratio

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2022.1967947.1376

درون‌پوشانی جوانه گندم و باکتری پروبیوتیک *باسیلوس لیکنیفورمیس* توسط صمغ گوار و مالتودکسترین به روش خشک کردن انجمادی جهت افزایش عمر نگهداری جوانه گندم

مریم شریفی[۱]، محمد گلی[۲*]، محدثه رمضانی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی و مرکز تحقیقات لیزر و بیوفوتونیک در فناوری‌های زیستی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۳- استادیار بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.

نویسنده مسئول مکاتبات: mgolifood@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۲۶ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۹/۹)

چکیده

جوانه گندم منبع غنی از اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب ضروری، مواد معدنی، ویتأمین‌ها، توکوفرول‌ها و فیتواسترول‌ها است که به‌عنوان محصول فرعی از صنعت آسیاب به‌دست می‌آید. وجود فعالیت‌های آنزیمی بالا همراه با محتوای بالای روغن غیراشباع، باعث کاهش ارزش غذایی جوانه گندم در طول ذخیره‌سازی شده و در نتیجه ماندگاری محصول را به‌شدت محدود می‌کند. هدف از این پژوهش، درون‌پوشانی جوانه گندم و باکتری پروبیوتیک *باسیلوس لیکنیفورمیس* توسط صمغ گوار و مالتودکسترین به روش خشک کردن انجمادی جهت افزایش عمر نگهداری جوانه گندم است. در این راستا از سه نسبت مختلف مالتودکسترین به صمغ گوار شامل ۱ به ۰/۳، ۱ به ۰/۱ و ۱ به ۰/۰۳ استفاده شد و ماندگاری جوانه‌گندم پروبیوتیک درون‌پوشانی شده طی ۳۶۰ روز نگهداری مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد و میانگین‌ها با روش دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد مقایسه گردید. اثر زمان بر تغییرات شاخص‌های اکسایشی جوانه گندم درون‌پوشانی شده مثبت ارزیابی شد و تیمار درون‌پوشانی شده با مالتودکسترین و گوار در همه نسبت‌های مورد بررسی در طی زمان ۳۶۰ روز نگه‌داری، به‌طور معنی‌داری سبب کاهش مقادیر عدد اسیدی کل شد ($P<0/05$). افزودن *باسیلوس لیکنیفورمیس* به‌صورت معنی‌داری سبب کاهش مقادیر عدد اسیدی کل و شاخص تیوباربیتوریک اسید در مقایسه با تیمارهای بدون پروبیوتیک شد ($P<0/05$). با افزایش زمان نگهداری، مقادیر پراکسید، آنیزیدین، توتوکس، کپک و مخمر در تیمار پروبیوتیک بصورت معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$).

واژه‌های کلیدی: جوانه‌گندم پروبیوتیک، شاخص‌های اکسایش، شمارش میکروارگانیسم، نسبت صمغ گوار به مالتودگسترین.

مقدمه

جوانه، جنین گیاه گندم است که نهایتاً گیاه گندم جدیدی را ایجاد می‌کند (Rizzello *et al*. 2010). جوانه گندم دارای ۸ تا ۱۴ درصد روغن می‌باشد که حدود ۵۶ درصد آن اسید چرب ضروری لینولئیک است (Megahed *et al*., 2011). به‌دلیل وجود مقادیر زیاد ویتأمین‌های تیامین، ریبوفلاوین و نیاسین و دارا بودن مواد معدنی و آمینواسیدهای ضروری، جوانه گندم به‌عنوان یک منبع غذایی، پتانسیل بالایی داشته و می‌تواند پس از طی فرایندهایی، به‌منظور افزایش ارزش تغذیه‌ای بسیاری از فراورده‌های غذایی به کار رود (Sramkova *et al*., 2009). سلنیم و منیزیم موجود در جوانه گندم، در پیشگیری از ابتلا به انواع سرطان مؤثر شناخته شده است. جوانه گندم منبع غنی از لیزین است ولی به‌دلیل فعالیت آنزیمی و محتوای چربی چند غیراشباعی، در طی نگهداری طعم تلخ و بوی تند پیدا می‌کند. در نتیجه ماندگاری کم جوانه، استفاده از آن را محدود کرده است. علت جداسازی جوانه در هنگام آسیاب کردن گندم و تهیه آرد، محتوی بالای چربی به‌خصوص اسیدهای چرب غیراشباع و آنزیم‌هایی چون لیپاز و لیپوکسی‌ژناز است که موجب تغییر رنگ سریع آرد می‌شود (Rizzello *et al*., 2010).

درون‌پوشانی شامل قرار گرفتن ترکیبات غذایی، آنزیمی یا مواد حساس در بسته‌های کوچک با ابعاد یک تا هزار میکرون است که می‌توانند محتویات خود را به‌صورت کنترل شده و تحت شرایط خاصی آزاد کنند. مواد فعال هسته می‌توانند در برابر شرایط نامطلوب محیطی مانند نور، حرارت و اکسیژن حفظ شوند. به مواد پوششی عناوینی از قبیل مواد دیواره‌ای، کپسول، غشاء، حامل و پوسته نسبت می‌دهند. کارآیی و بازدهی فرآیند درون‌پوشانی در زمان آزادسازی مواد هسته‌ای ب میزان قابل‌توجهی به جنس دیواره پوشش بستگی دارد .بنابراین انتخاب ماده مناسب به‌عنوان دیواره کپسول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Devi *et al*., 2016). در ابتدا مواد مورد استفاده در دیواره پوشش‌ها از پلیمرهای زیست‌تخریب ناپذیری مانند پلی‌استایرن، پلی‌اتیلن گلیکول و پلی‌وینیل پیرولیدین بودند ولی به‌دلیل مضر بودن این ترکیبات برای بدن انسان، پلیمرهای زیست-تخریب‌پذیر جایگزین این مواد سنتزی شدند. انواع مواد دیواره‌ای برای درون‌پوشانی مواد غذایی، مورد استفاده قرار می‌گیرد که شامل کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، صمغ-ها و لیپیدها می‌باشند (Akhavan *et al*., 2016). صمغ گوار از دانه‌های گیاه گوار یا لوبیای خوشه‌ای که از خانواده بقولات است، به‌دست می‌آید. این ماده، یک گالاکتومانان است که از واحدهای دی‌گالاکتوز و دی-مانوز با پیوند بتا ۱ به ۶ تشکیل شده است. از نظر ساختمانی، صمغ گوار خنثی بوده و ویسکوزیته ایجاد شده توسط آن به میزان کمی تحت تأثیر تغییرات pH محیط قرار می‌گیرد و حتی در مقادیر کم، قادر به افزایش زیاد ویسکوزیته است (Long *et al*. 2012). مشتقات هیدرولیز شده صمغ گوار (Kuck and Norena, 2016) یا در ترکیب با بیوپلیمرهای دیگر (Kuck *et al*., 2017) برای درون‌پوشانی استفاده شده-اند. در صنعت غذا، صمغ گوار یکی از ارزان‌ترین هیدروکلوئیدها با کمترین میزان خطر برای سلامتی است. به‌عنوان یک ماده افزودنی، صمغ گوار با آب پیوند برقرار می‌کند، از تشکیل کریستال یخ در محصولات منجمد جلوگیری می‌کند، قابلیت امولسیون

سازی، غلیظ کنندگی و پایدارسازی دارد و بسیاری از سیستم‌های جامد- مایع را به‌حالت تعلیق در می‌آورد (Thombare *et al*., 2016).

در سال ۲۰۰۱ سازمان جهانی غذا و کشاورزی و سازمان جهانی بهداشت به یک تعریف مشترک رسیدند که پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که تجویز مقادیر کافی آن موجب بروز اثرات مفید بر سلامت میزبان خواهد بود. بر سیستم ایمنی روده مؤثر واقع شوند و همچنین ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد جهش‌زایی تولید کنند (Anal and singh, 2007). در این تحقیق از باکتری پروبیوتیک به این جهت استفاده شد که علاوه بر تأمین جنبه تغذیه‌ای-درمانی، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تولیدی توسط باکتری پروبیوتیک، جوانه گندم بسیار حساس در برابر اکسایش را از شرایط محیطی هم‌چون نور و اکسیژن را محافظت نماید. *باسیلوس لیکنیفورمیس* گرم مثبت و اندوسپورساز است که به‌راحتی از نمونه‌های خاک و گیاه جدا می‌شود. علاوه بر این، در دهه گذشته، چندین گونه *باسیلوس لیکنیفورمیس* از محیط‌های دریایی جدا شده‌اند (Vinoj *et al*., 2014). باکتری‌های این خانواده، اکثراً کاتالاز مثبت و مزوفیل هستند و شرایط بهینه رشد آن‌ها معمولاً در حدود ۵۰ درجه سلسیوس و دمای بهینه برای تولید و ترشح آنزیم‌های خارج‌سلولی آن در حدود ۳۷ درجه سلسیوس است (Wiegand *et al*., 2013). در سال‌های گذشته، ژنوم سویه‌های مختلف این میکروارگانیسم به‌دلیل افزایش علاقه بیوتکنولوژیکی به این گونه باکتریایی، تعیین توالی شده است (He *et al*., 2018). *باسیلوس لیکنیفورمیس* در ترکیب با *ساکارومایسس سرویزیه* برای غذاهای سنتی تخمیر شده کشور کره استفاده می‌شود (Kim *et al*., 2004). سویه‌های *لیکنیفورمیس* نتایج امیدوارکننده‌ای را در ویژگی‌های تنظیم‌کننده ایمنی، ضدمیکروبی، ضددیابت و حتی پتانسیل ساخت داروهای ضدسرطان نشان داده‌اند. سویه‌های این باکتری در محصولات تجاری پروبیوتیک انسانی، دامپزشکی و آبزی‌پروری گنجانده شده‌اند (Muras *et al*., 2021). مهم‌ترین ملاک برای تعیین موفقیت محصول پروبیوتیک، بقای آن در طول نگهداری محصول است (Anal *et al*., 2007).

راه‌های افزایش ثبات در جوانه گندم شامل رویکردهای فیزیکی (حرارتی، اشعه‌دهی و حرارتی-مکانیکی)، شیمیایی (استفاده از اسید، قلیا و دی اکسید کربن فوق بحرانی) و بیولوژی (مانند تخمیر) تاکنون گزارش شده است (Boukid *et al*., 2018). در حالی که تاکنون از روش درون‌پوشانی توأم با باکتری پروبیوتیک استفاده نشده است. هدف از این تحقیق بررسی تغییرات اکسایشی جوانه گندم پروبیوتیک حاوی *باسیلوس لیکنیفورمیس* درون‌پوشانی شده به روش خشک کن انجمادی در بهترین نسبت گوار و مالتودکسترین به‌عنوان دیواره کپسول در طول زمان یک‌ساله است.

مواد و روش‌ها

- مواد

جوانه گندم از شرکت کلیل جوانه در استان اصفهان خریداری شد. *باسیلوس لیکنیفورمیس* از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران در کرج تهیه شد. صمغ گوار و مالتودکسترین از شرکت سیگمای کشور آمریکا خریداری شدند.

- فرآیند درون‌پوشانی

برای هر تیمار، ۲۵ میلی‌لیتر محلول حاوی ۱×۱۰^{۱۰} واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر *باسیلوس لیکنیفورمیس* به مقدار مشخصی از آب مقطر و ۱۲۵ گرم جوانه گندم در کنار شعله اضافه شد. در بخش دیگر، ۳۰۰ گرم آب مقطر با ۱۲۵ گرم از نسبت‌های مختلف صمغ گوار: مالتودکسترین (نسبت‌های ذکر شده در جدول ۱) به طور کامل، با استفاده از دستگاه همزن (GT1108، تفال، فرانسه) مخلوط شد. سپس این مخلوط به ظرف حاوی آب مقطر، جوانه گندم و باکتری اضافه گردید و با میله شیشه‌ایی هم‌زده شد. در آخر، مخلوط حاصل، در تعدادی پلیت استریل تقسیم بندی گردید. قبل از انتقال نمونه‌ها به خشک‌کن انجمادی، مخلوط تهیه شده، به مدت ۲۴ ساعت در فریزر (نوبنیاد سامان گستر، ایران) با دمای ۴۰- درجه سلسیوس نگهداری و سپس در خشک کن انجمادی (دناوکیوم، ایران) خشک شد. توده‌های اسفنجی حاصله از خشک کن انجمادی حاوی ۱×۱۰^{۹} واحد لگاریتمی در هر گرم *باسیلوس لیکنیفورمیس*، با استفاده از یک هم‌زن برقی به پودر یکنواختی تبدیل شد و درون پاکت‌های زیپ‌دار غیرقابل نفوذ در دمای اتاق نگهداری گردیدند تا آزمایشات فیزیکوشیمیایی لازم بر روی آن‌ها انجام شود. سه گروه به‌عنوان نمونه شاهد، یعنی بدون باکتری پروبیوتیک درون‌پوشانی شده که نسبت‌های صمغ و مالتودکسترین مورد استفاده در آن‌ها مشابه با تیمارهای آزمایشی این پژوهش بود، مورد آزمون قرار گرفت.

جدول (۱)- نسبت مخلوط صمغ‌های مورد استفاده برای ساخت ۱۲۵ گرم دیواره پوششی

نام تیمار	صمغ گوار	مالتودکسترین
۱ : ۰/۳	۰/۳	۱
۱ : ۰/۱	۰/۱	۱
۱ : ۰/۰۳	۰/۰۳	۱

آزمون‌های انجام گرفته شامل ارزیابی عدد پراکسید، آنیزیدین، توتوکس، اسیدیته، تیوباربیتوریک اسید، شمارش کلی باکتری پروبیوتیک و کپک و مخمر به‌صورت دوره‌ای در روز صفر، ۱۸۰ و ۳۶۰ نگه‌داری در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. برای مقایسات بهتر و بررسی اثر تیمارهای اعمال شده، یک نمونه جوانه گندم خالص همراه با نمونه‌های درون‌پوشانی شده، مورد بررسی و آزمون قرار گرفت.

- استخراج روغن از نمونه‌های درون‌پوشانی شده و انجام آزمایشات اکسیداسیون

مقدار ۴۵۰ گرم نمونه توزین شد و ۸۵۰ سی‌سی پترولیوم اتر به آن اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت زمان‌دهی، روغن‌های استخراج شده از صافی عبور داده شد. جهت جداسازی پترولیوم اتر مخلوط صاف شده، از دستگاه روتاری با دمای ۴ درجه سلسیوس استفاده شد و در نهایت روغن حاصله جهت انجام آزمایشات بعدی به‌دست آمد (Agregan *et al*., 2017).

- آزمون پراکسید

عدد پراکسید به روش یدومتری به‌دست آمد. برای این کار ۲ گرم روغن استخراجی به‌همراه ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک-کلروفرم (۱:۱) و ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم یدید اشباع درون ارلن ریخته شد و به‌مدت ۲ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر چسب نشاسته اضافه گردید. مخلوط حاصل با استفاده از تیوسولفات سدیم ۰/۱ نرمال تا از بی‌رنگ شدن تیتر شد و حجم مصرفی تیوسولفات ثبت شد. برای نمونه شاهد تمامی مراحل بدون روغن اولیه انجام شد (Agregan *et al.*, 2017). در این رابطه S، میزان تیوسولفات سدیم مصرفی برای تیتراسیون نمونه روغن، B، میزان تیوسولفات سدیم مصرفی برای تیتراسیون شاهد، N، نرمالیته سولفات سدیم و W مقدار وزن روغن بر حسب گرم است.

$$\text{عدد پراکسید} = 1000 \times N \times (S-B) / W \quad \text{رابطه ۱}$$

- عدد آنیزیدین

مقدار ۳ گرم روغن استخراج شده را درون بالن توزین و با هگزان به حجم ۲۵ سی‌سی رسانده شد و میزان جذب آن در طول موج ۳۵۰ نانومتر خوانده شد (A_b). مقدار ۵ سی‌سی از محلول A_b را برداشته و ۱ سی‌سی معرف آنیزیدین (۰/۲۵ گرم پارا آنیزیدین که با اسیداستیک به حجم ۱۰۰ رسیده است) به آن اضافه گردید. پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در تاریکی، جذب آن در ۳۵۰ نانومتر خوانده شد (A_S). A_S میزان جذب چربی بعد از واکنش با آنیزیدین، A_b جذب محلول چربی، W وزن نمونه، V حجمی که نمونه در آن حل شد بر حسب سی‌سی و ۱/۲ ضریب تصحیح برای رقیق‌سازی محلول نمونه با یک سی‌سی واکنشگر آنیزیدین است (INSO, 4093).

$$\text{آنیزیدین} = 1/2 \times V \times (A_s-A_b) / W \quad \text{رابطه ۲}$$

- عدد توتوکس

محاسبه عدد توتوکس از مجموع دو برابر عدد پراکسید به اضافه عدد آنیزیدین حاصل شد (Agregan *et al.*, 2017).

- عدد اسیدیته

مقدار ۱ گرم روغن نمونه به‌همراه ۳۰ سی‌سی اتانول و ۱ سی‌سی فنل فتالئین ۰/۰۱ درون ارلن ریخته شد و تیتراسیون با استفاده از سود ۰/۱ نرمال تا رسیدن به رنگ ارغوانی انجام شد (INSO, 4178).

$$\text{اسیدیته} = 2/82 \times \text{مصرفی نرمال ۰/۱ سود} / \text{وزن نمونه} \quad \text{رابطه ۳}$$

- عدد تیوباربیتوریک اسید

مقدار ۰/۲ گرم از روغن استخراج شده به بالن ۲۵ میلی‌لیتری منتقل و با بوتانول به حجم رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از آن را برداشته و به لوله آزمایشگاهی خشک انتقال داده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید به آن اضافه گردید و لوله آزمایشگاهی در حمام آبی ۹۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از ۲ ساعت، لوله از حمام خارج و سرد شد. میزان جذب آن در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. تمامی مراحل برای نمونه شاهد نیز انجام شد (INSO, 10496).

وزن نمونه / ۵۰ × (جذب نمونه شاهد – جذب نمونه) = تیوباربیتوریک اسید رابطه ۴

شمارش کلی

جهت جداسازی و شمارش *باسیلوس لیکنیفورمیس* و کپک و مخمر به‌ترتیب از محیط‌های TSA و YPG agar استفاده شد (INSO, 10899-3). مقدار ۱ گرم از هر یک از نمونه‌ها به ۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی افزوده شد. این لوله که حاوی نمونه اولیه بود، به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا باکتری‌ها از سطوح نمونه وارد سرم شوند. طی این مدت چندین بار ورتکس انجام شد. سپس ۱ سی‌سی از لوله حاوی نمونه اصلی به لوله دیگری که حاوی ۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی بود، انتقال یافته و ورتکس انجام شد. این روند تا تهیه رقت 10^{-5} ادامه یافت. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} جهت شمارش کپک‌ها و مخمرها به صورت پورپلیت پخش شد و در ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت یک هفته گرمخانه‌گذاری شد. مشابه این حالت برای شمارش *باسیلوس لیکنیفورمیس* عمل شد و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به‌مدت یک هفته گرمخانه‌گذاری شد. از هر یک از نمونه‌های فوق سه تکرار سه تایی، طی سه هفته متوالی تهیه شد و جهت تأیید نتایج مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت شمارش میکروارگانیسم در هر پلیت از رابطه زیر استفاده شد:

۱۰ × عکس رقت × تعداد کلونی شمارش شده = جمعیت میکروبی رابطه ۵

- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل گردید. آنالیز آماری کلی به روش ANOVA و توسط نرم افزار SPSS انجام شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل رسم شد.

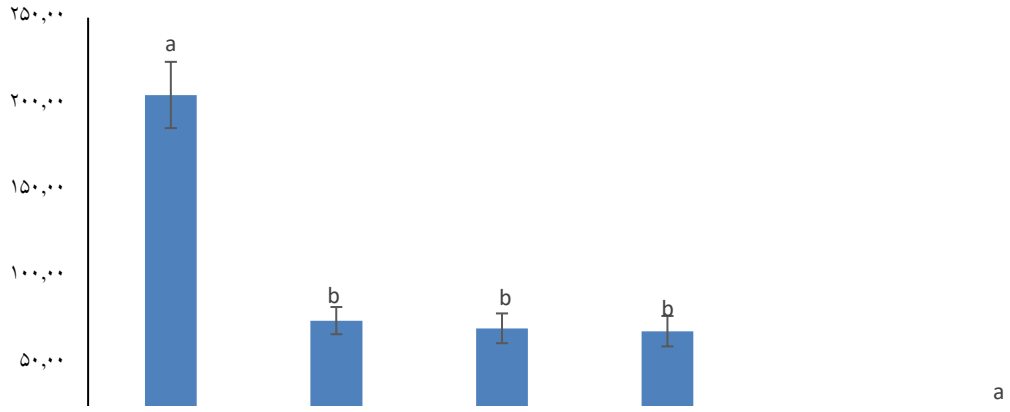
یافته‌ها

- تأثیر صمغ گوار، پروبیوتیک و زمان نگهداری بر تغییرات عدد اسیدیته کل و شاخص تیوباربیتوریک اسید

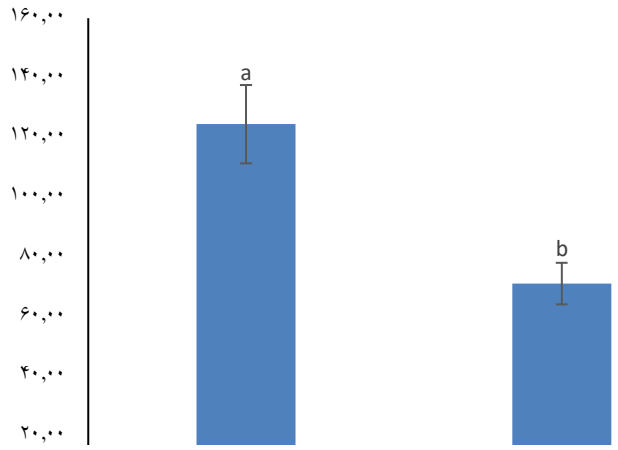
طبق آنالیز واریانس جدول (۲)، اثر مستقل تیمار صمغ گوار، باکتری پروبیوتیک و اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر تغییرات عدد اسیدیته کل و همچنین اثر مستقل تیمار صمغ گوار، باکتری پروبیوتیک، زمان نگهداری و اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر شاخص تیوباربیتوریک اسید معنی‌دار (P<۰/۰۱) بوده است. با توجه به نمودار (۱) اثر مستقل تیمار صمغ گوار بر مقادیر اسیدیته کل و شاخص تیوباربیتوریک اسید در نمونه شاهد بصورت معنی داری در مقایسه با نمونه های حاوی ۰/۰۳، ۰/۱ و ۰/۳ گوار، بالاتر می باشد. همچنین پایین‌ترین میزان شاخص تیوباربیتوریک اسید در تیمار حاوی ۰/۱ گوار مشاهده شد. با توجه به نمودار (۲) افزودن باکتری پروبیوتیک بصورت معنی-داری سبب کاهش مقادیر شاخص‌های اسیدیته کل و تیوباربیتوریک اسید در مقایسه با نمونه شاهد می‌شود. نمودار (۳) تأثیر مستقل زمان نگهداری بر شاخص تیوباربیتوریک اسید را نشان می‌دهد. بالاترین مقدار این شاخص مربوط به زمان ۳۶۰ روز و پایین‌ترین مربوط به زمان ۱۸۰ روز بود.

جدول (۲) - آنالیز واریانس تغییرات اسیدیته کل، عدد تیوباربیتوریک اسید، عدد پراکسید، عدد آنیزیدین و عدد توتوکس

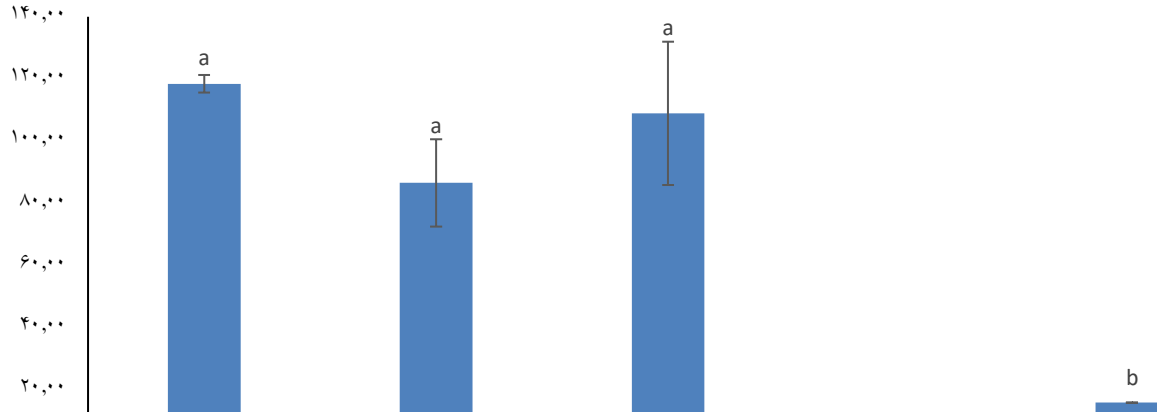
منبع	میانگین مربعات				
	اسیدیته کل	عدد تیوباربیتوریک	عدد پراکسید	عدد آنیزیدین	عدد توتوکس
مدل اصلاح شده	20242.017***	30.698***	8.007***	7.931***	69.847***
عرض از مبدا	641363.896***	16646.972***	69.237***	317.207***	1186.948***
تیمار	65226.721***	78.001***	1.682***	3.045***	18.535***
پروبیوتیک	1.852ns	.015ns	.001ns	.003ns	.015ns
زمان	9829.607***	87.559***	69.237***	63.955***	594.338***
تیمار*پروبیوتیک	12.963ns	.220ns	.008ns	.051ns	.033ns
تیمار*زمان	19381.065***	23.691***	1.682***	2.581***	16.356***
پروبیوتیک*زمان	29.630ns	.087ns	.001ns	.023ns	.047ns
تیمار*پروبیوتیک*زمان	7.407ns	.138ns	.008ns	.030ns	.017ns
خطا	340.778	.105	.025	.053	.121
ضریب همبستگی	.943	.991	.989	.977	.940
ضریب همبستگی تعدیل شده	.959	.998	.992	.983	.975



نمودار (۱)- تأثیر تیمار صمغ گوار بر مقادیر اسیدیته کل و شاخص تیوباربیتوریک اسید. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها برای هر صفت مورد آزمون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

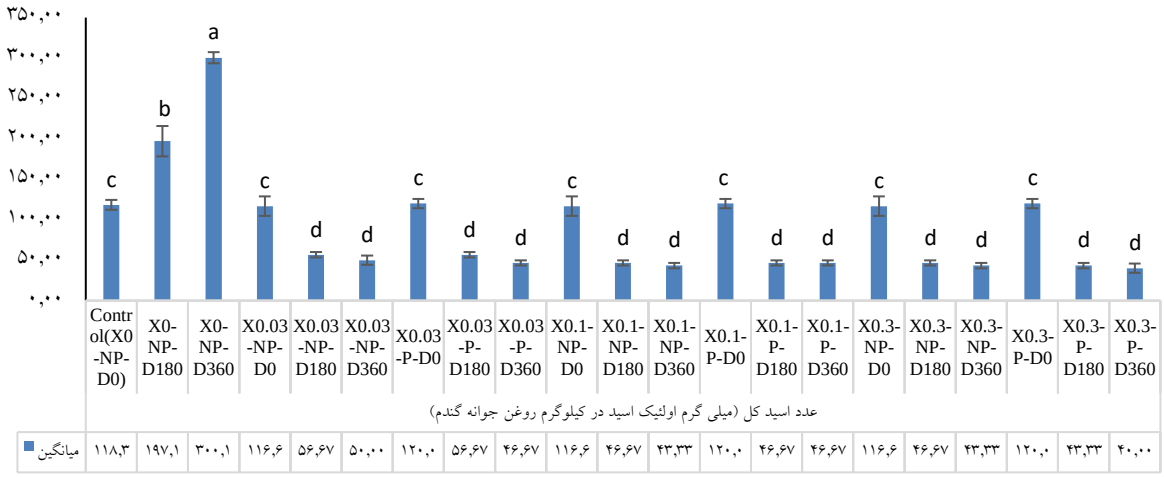


نمودار (۲)- تأثیر پروبیوتیک بر مقادیر اسیدیته کل و شاخص تیوباربیتوریک اسید. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.



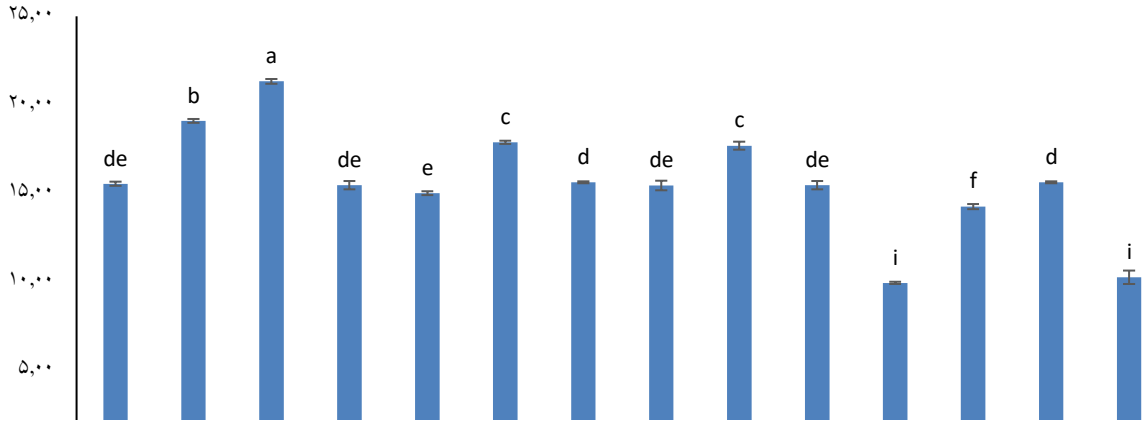
نمودار (۳)- تأثیر زمان نگهداری بر مقادیر اسیدیته کل و شاخص تیوباربیتوریک اسید. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

نمودار (۴) اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر تغییرات عدد اسیدیته کل است. در نمونه شاهد اثر متقابل به‌صورت معنی‌دار سبب افزایش اسیدیته کل در روزهای ۳۶۰ و ۱۸۰ گردید. این شاخص در تیمارهای ۰/۰۳، ۰/۳ و ۰/۱ گوار، با یا بدون پروبیوتیک در روز ۰ به‌طور معنی‌دار در قیاس با روزه ۱۸۰ و ۳۶۰ بالاتر بود.



نمودار (۴)- اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر تغییرات عدد اسیدی کل نمونه‌ها. X (نماد صمغ گوار)، P (نماد پروبیوتیک)، NP (نماد غیر پروبیوتیک)، D (نماد روز). حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

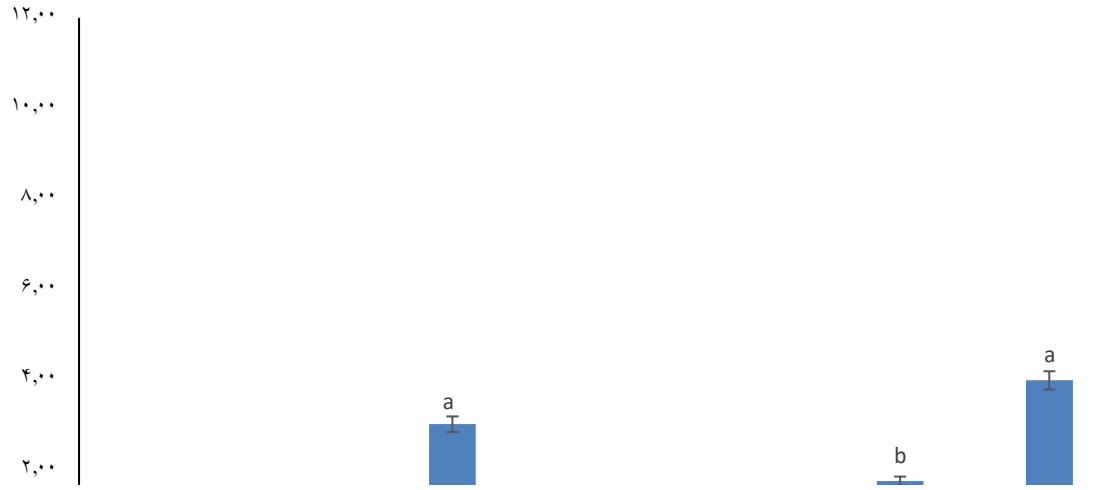
نمودار (۵) نتایج اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر تیوباربیتوریک اسید است. بالاترین و پایین‌ترین مقادیر به‌ترتیب در تیمار بدون گوار و پروبیوتیک در زمان ۳۶۰ روز و تیمارهای ۰/۱ گوار، با و بدون پروبیوتیک و زمان ۱۸۰ روز مشاهده شد. در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۳ گوار، با و بدون پروبیوتیک مقادیر در زمان ۱۸۰ روز در مقایسه با زمان صفر و ۳۶۰ روز بصورت معنی‌دار کاهش یافت. بالاترین مقادیر مربوط به زمان صفر می‌باشد. در نمونه شاهد مقادیر این شاخص با افزایش زمان نگهداری در بصورت معنی‌داری افزایش میابد.



نمودار (۵)- اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر تیوباربیتوریک اسید – X (نماد صمغ گوار)، P (نماد پروبیوتیک)، NP (نماد غیرپروبیوتیک)، D (نماد روز). حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

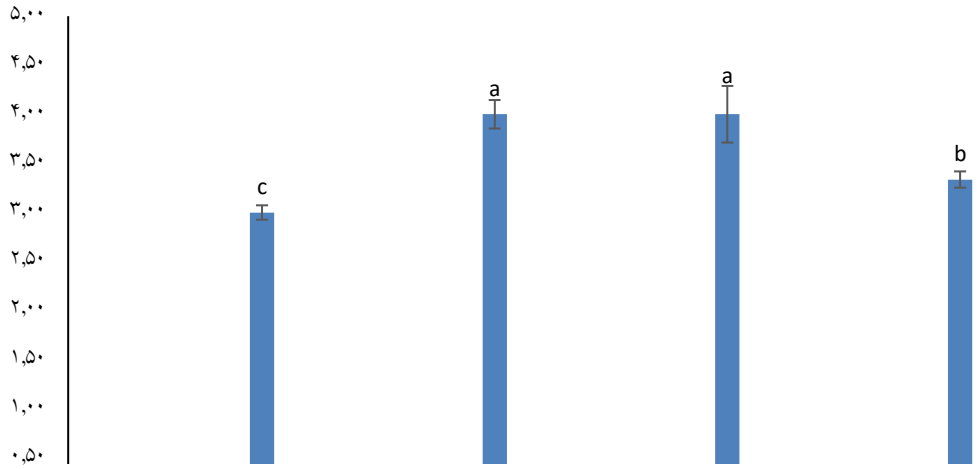
- تأثیر تیمار صمغ گوار، پروبیوتیک و زمان نگهداری بر تغییرات عدد پراکسید، آنیزیدین و شاخص توتوکس

طبق آنالیز واریانس جدول (۲) اثر مستقل زمان نگهداری و اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر تغییرات عدد پراکسید، آنیزیدین و شاخص توتوکس معنی‌دار (P<۰/۰۱) بوده است. نمودار (۶) اثر مستقل زمان نگهداری بر شاخص‌های عدد پراکسید، آنیزیدین و شاخص توتوکس را نشان می‌دهد. در زمان ۳۶۰ روز مقادیر پراکسید به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با زمان ۱۸۰ و صفر، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین مقادیر شاخص آنیزیدین و توتوکس، با افزایش زمان نگهداری به‌صورت معنی‌داری افزایش میابد.



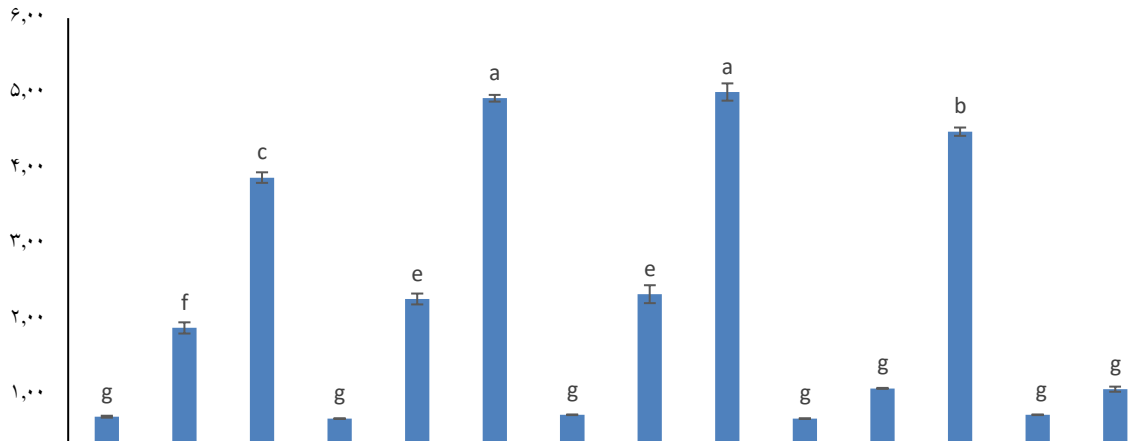
نمودار (۶)- تأثیر زمان نگهداری بر مقادیر ارزش پراکسید، شاخص آنیزیدین و شاخص توتوکس. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها برای هر صفت مورد آزمون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

نمودار (۷) اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر تغییرات عدد پراکسید (میلی اکی والان/کیلوگرم) را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار بالاترین و پایین‌ترین مقادیر به ترتیب مربوط به تیمارهای ۰/۰۳ گوار، با و بدون پروبیوتیک در زمان ۳۶۰ روز و تیمارهای ۰/۳ گوار، با و بدون پروبیوتیک و در زمان ۳۶۰ روز می‌باشد. مقادیر شاخص پراکسید در تیمارهای ۰، ۰/۰۳، ۰/۱ و ۰/۳ گوار، با و بدون پروبیوتیک و در زمان ۳۶۰ روز در مقایسه با سایر تیمارهای به‌صورت معنی‌داری افزایش یافته است.

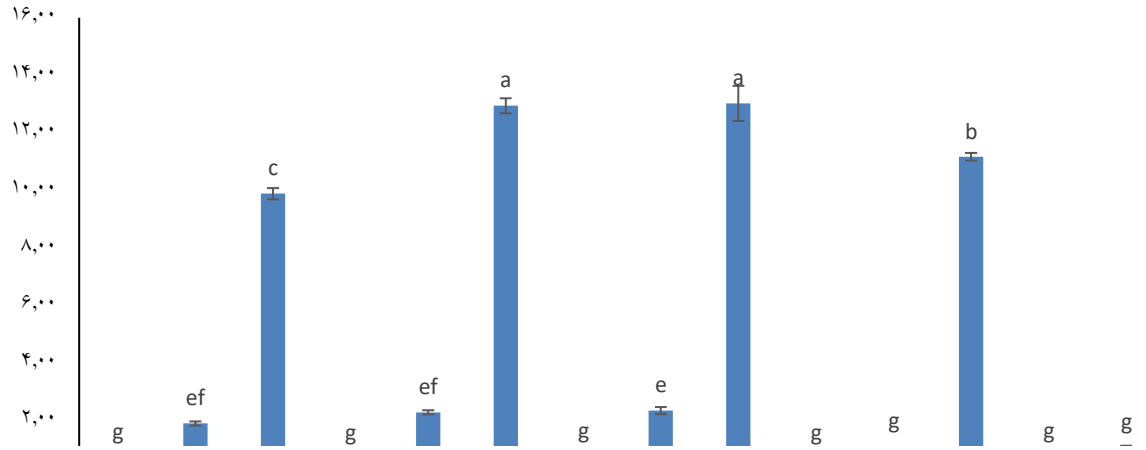


نمودار (۷)- اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر مقادیر شاخص پراکسید- X (نماد صمغ گوار)، P (نماد پروبیوتیک)، NP(نماد غیرپروبیوتیک)، D (نماد روز). حروف غیرمشترک بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

نمودار (۸) و نمودار (۹) به ترتیب اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر شاخص آنیزیدین و شاخص توتوکس (میلی اکی والان/کیلوگرم) را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار بالاترین مقادیر آن مربوط به تیمارهای ۰/۰۳ گوار، با و بدون پروبیوتیک و در زمان ۳۶۰ روز بود. در نمونه شاهد، تیمار ۰/۰۳ و ۰/۳ گوار، با و بدون پروبیوتیک و در زمان ۳۶۰ روز، مقادیر آنیزیدین با افزایش زمان نگهداری به‌صورت معنی‌داری افزایش میابد.



نمودار (۸)- اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر شاخص آنیزیدین در روغن جوانه‌گندم پروبیوتیک- X (نماد صمغ گوار)، P (نماد پروبیوتیک)، NP (نماد غیرپروبیوتیک)، D (نماد روز). حروف غیرمشترک بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.



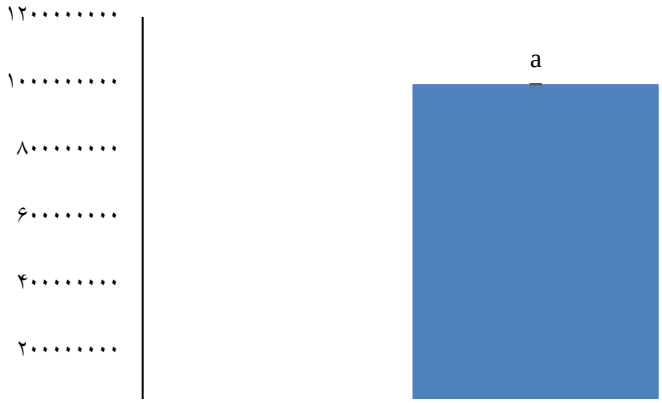
نمودار (۹)- اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان بر شاخص توتوکس- X (نماد صمغ گوار)، P (نماد پروبیوتیک)، NP(نماد غیرپروبیوتیک)، D (نماد روز). حروف غیرمشترک بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

- تأثیر تیمار صمغ گوار، پروبیوتیک و زمان نگهداری بر شمارش پروبیوتیک

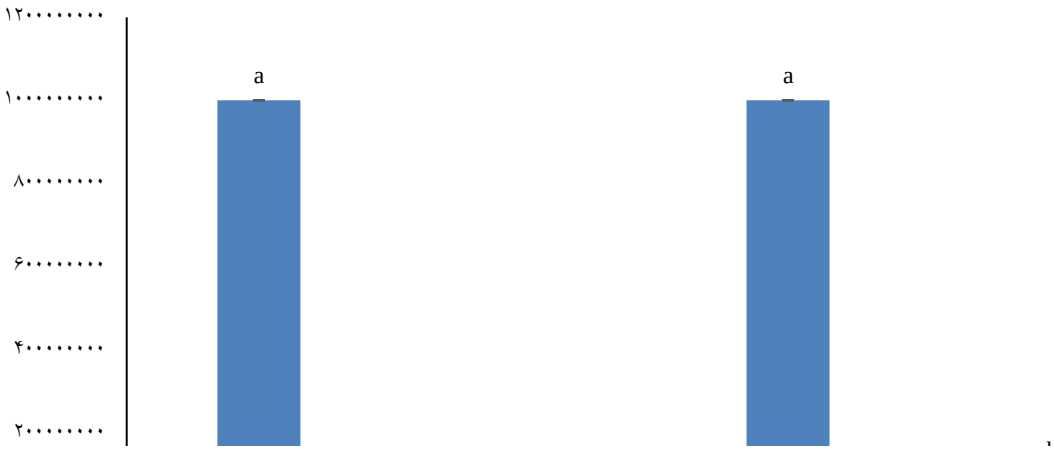
با توجه به جدول (۳) و نمودار (۱۰) مقادیر شمارش پروبیوتیک در زمان ۳۶۰ روز در مقایسه با زمان صفر بصورت معنی‌داری کاهش یافته است. همچنین با توجه به نمودار (۱۱) مقادیر این شاخص در تیمارهای ۰/۰۳، ۰/۱ و ۰/۳ گوار در زمان ۳۶۰ روز در مقایسه با زمان صفر بصورت معنی‌داری کاهش یافته است.

جدول (۳)- آنالیز واریانس شمارش باکتری پروبیوتیک و تعداد کپک و مخمر در هر گرم جوانه گندم پروبیوتیک

منبع	میانگین مربعات لگاریتمی	
	شمارش باکتری پروبیوتیک	شمارش کپک و مخمر
مدل اصلاح شده	17.92042***	9.230091***
عرض از مبدا	18.68733***	9.376668***
تیمار	15.6072***	9.224047***
زمان	18.61769***	9.225826***
تیمار*زمان	15.6072***	9.23814***
خطا	10.95424	5.825415***
ضریب همبستگی	1.000	0.999
ضریب همبستگی تعدیل شده	1.000	0.999



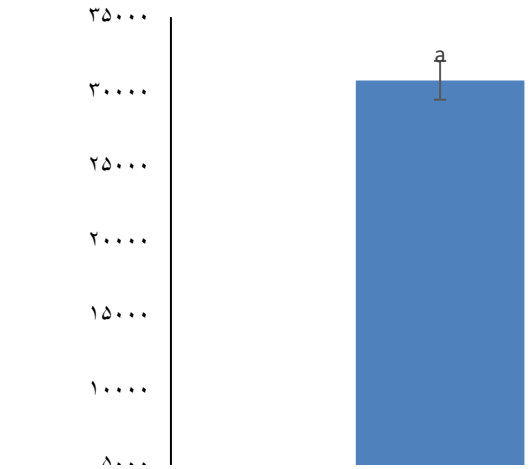
نمودار (۱۰)- اثر مستقل زمان بر شمارش پروبیوتیک در هر گرم جوانه‌گندم پروبیوتیک. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.



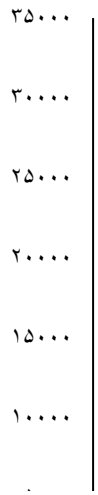
نمودار (۱۱)- اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان، بر شمارش پروبیوتیک در هر گرم جوانه‌گندم پروبیوتیک – X (نماد صمغ گوار)، P (نماد پروبیوتیک)، NP (نماد غیر پروبیوتیک)، D (نماد روز). حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

- تأثیر تیمار صمغ گوار، باکتری پروبیوتیک و زمان نگهداری بر شمارش کپک و مخمر

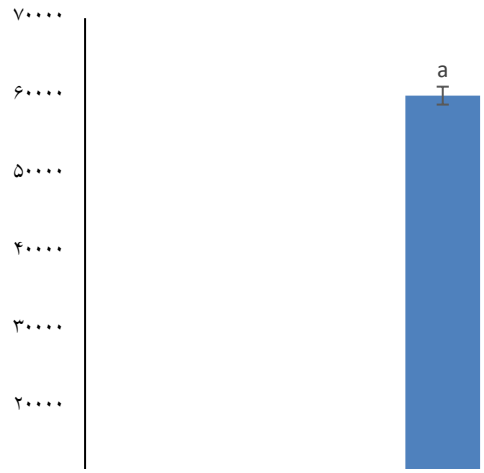
با توجه به جدول (۳) ، نمودار (۱۲) و (۱۳) شمارش کپک و مخمر در تیمار ۰/۱ و ۰/۳ صمغ گوار در مقایسه با تیمار ۰/۰۳ گوار به‌صورت معنی‌دار کاهش یافتت. مقادیر این شاخص در زمان ۳۶۰ روز در مقایسه با ۱۸۰ روز به‌صورت معنی‌دار افزایش یافتت. با توجه به نمودار (۱۴) شمارش کپک و مخمر در تیمار ۰/۰۳ گوار، حاوی پروبیوتیک و زمان ۳۶۰ روز در مقایسه با سایر تیمارها به‌طور معنی‌دار بالاتر بود. تیمار ۰/۱ گوار، حاوی پروبیوتیک و زمان ۱۸۰ روز به‌صورت معنی‌دار از پایین‌ترین مقادیر کپک و مخمر در مقایسه با سایر تیمارها برخوردار بود. در تیمار ۰/۰۳ صمغ گوار، مقادیر این شاخص در زمان ۳۶۰ روز در مقایسه با زمان ۱۸۰ روز به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. اگرچه در تیمار ۰/۳ گوار، مقادیر این شاخص در زمان ۳۶۰ روز در مقایسه با ۱۸۰ روز کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد.



نمودار (۱۲)- اثر مستقل تیمار صمغ گوار بر شمارش کپک و مخمر در هر گرم جوانه‌گندم پروبیوتیک. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.



نمودار (۱۳)- اثر مستقل زمان نگهداری، بر تغییرات شمارش کپک و مخمر در جوانه گندم پروبیوتیک. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.



نمودار (۱۴)- اثر متقابل تیمار-پروبیوتیک-زمان، بر شمارش کپک و مخمر در هر گرم جوانه‌گندم پروبیوتیک- X (نماد صمغ گوار)، P (نماد پروبیوتیک)، NP (نماد غیر پروبیوتیک)، D (نماد روز). حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نمودار، مقادیر پراکسید در طی ۱۸۰ روز در مقایسه با روز صفر تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد. در مقابل در طی ۳۶۰ روز، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در نتیجه تیمار صمغ گوار تا روز ۱۸۰ اثر بازدارندگی مطلوبی در برابر پراکسید نشان می‌دهد. همچنین مقادیر آنیزیدین و توتوکس نیز در طی زمان نگهداری ۱۸۰ و ۳۶۰ روز به‌صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد. در تحقیقی از نسبت های مختلف صمغ گوار به‌منظور بررسی تأثیر آن بر ویژگی‌های شیمیایی آرد های کامپوزیت مختلف در طی زمان نگهداری استفاده شد، نتایج نشان داد که مقادیر رطوبت و پراکسید افزایش معنی‌داری داشته است. در حالی‌که مقادیر پروتئین، چربی و فیتیک اسید در طی زمان نگهداری کاهش معنی‌داری یافت. افزایش ارزش پراکسید در طی ۶۰ روز نگهداری به‌دلیل ایجاد ترشیدگی بود. دمای بالا در طی زمان نگهداری، گرما و نور عوامل کلیدی هستند که باعث تسریع بیشتر واکنش های افزایش اسیدیته می شوند (Shahzadi *et al.*, 2005). مقادیر شاخص تیوباربیتوریک اسید در تیمار ۰/۱ گوار در طی زمان نگهداری ۱۸۰ روز و ۳۶۰ روز در مقایسه با روز صفر کاهش معنی‌داری داشت. همچنین تیمار ۰/۳ گوار نیز سبب کاهش معنی‌دار مقادیر این شاخص در طی ۱۸۰ روز نگهداری شد. در مطالعه‌ای که روی فلفل دلمه‌ای خشک شده انجام شد، نشان داده شد که استفاده از صمغ گوار بطور معنی‌داری بر کنترل مقادیر شاخص تیوباربیتوریک اسید استخراج شده از روغن کتان اثرگذار می‌باشد. همچنین نشان دادند که مقدار این شاخص در طی افزایش زمان و دمای نگهداری ثابت بود (Kaur *et al.*, 2000).

در تحقیقی ویژگی‌های میکروبی و فیزیکوشیمیایی کفیر درون‌پوشانی شده با مالتودکسترین به روش خشک‌کن پاششی در طی زمان نگهداری مورد مطالعه قرار گرفت تعداد میکروارگانیسم‌ها در میکروذرات کفیر طی ۷۷ روز نگهداری در دمای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس، شمارش شد. بلافاصله پس از خشک کن

پاششی (زمان صفر)، تعداد باکتری های اسید لاکتیک به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. اما در شمارش تعداد مخمرها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کاهش قابل‌توجهی در تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسوس پس از ۱ هفته نگهداری مشاهده شد (Favilla *et al*., 2022). باکتری‌ها و مخمرها برای استفاده از سوبسترا با یکدیگر رقابت می‌کنند. با این حال، اگر در شرایط بهینه نگهداری شوند، در همزیستی زندگی می‌کنند. به‌طور کلی، باکتری اسید لاکتیک می‌تواند ترکیبات ضدقارچی و اسید استیک را آزاد کند که رشد مخمر را محدود می‌کند (Cabello-Olmo *et al*., 2020). در کفیر، مخمرها بسترهای ویتأمین و اسیدهای آمینه برای باکتری‌ها تولید می‌کنند، در حالی که باکتری‌ها متابولیت هایی تولید می‌کنند که به‌عنوان منبع انرژی برای مخمر عمل می‌کنند (Rosa *et al*., 2017). بنابراین، مشاهده جریان کلی غذا، فرآیندهای آن و شرایط محیطی مهم است (Cabello-Olmo *et al*., 2020). نوع مواد دیواره بر شمارش میکروارگانیسم تأثیری نداشت (Favilla *et al*., 2022). هنگامی که از تیمار درون‌پوشانی شده استفاده نشد، اثر دما بر پایداری لاکتیک اسید باکتری و مخمر، معنی‌دار بود. استفاده از مالتودکسترین و درون‌پوشانی بر پایداری لاکتیک اسید باکتری، بدون توجه به دمای ذخیره‌سازی در طول ۷۷ روز تأثیر گذاشت و قدرت محافظتی این مواد را روی سلول‌های زنده نشان داد (Favilla *et al*., 2022).

اثر زمان بر تغییرات شاخص‌های اکسایشی جوانه گندم درون‌پوشانی شده مثبت ارزیابی شد. تیمار مالتودکسترین: گوار در همه نسبت‌های مورد بررسی در طی زمان نگهداری ۳۶۰ روزه به‌طور معنی‌داری سبب کاهش مقادیر عدد اسیدی کل شد. تیمار صمغ گوار در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۳ سبب کاهش معنی‌دار مقادیر کپک و مخمر شد. افزودن باکتری *باسیلوس لیکنیفورمیس*، موجب کاهش معنی‌دار شاخص‌های عدد اسیدی کل در طی زمان نگهداری ۳۶۰ روزه و مقادیر پراکسید و شاخص تیوباربیتوریک اسید در طی زمان نگهداری ۱۸۰ روزه شد. از محدودیت‌های درون‌پوشانی به‌روش خشک کن انجمادی هزینه بالای عملیات است که با روشهای دیگر درون‌پوشانی مانند خشک‌کن پاششی و استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک مقاوم به حرارت همانند *باسیلوس لیکنیفورمیس* می‌توان به این هدف رسید.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله، از همکاران در مرکز تحقیقات لیزر و بیوفوتونیک در فناوریهای زیستی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) به‌دلیل همکاری‌های علمی و پژوهشی در راستای محقق شدن این تحقیق کمال تشکر را دارد.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Agregan, R., Munekata, P.E., Domínguez, R., Carballo, J., Franco, D., and Lorenzoa, J.M. (2017). Proximate composition, phenolic contentand *in vitro* antioxidant activity of aqueous extracts of the sea weeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under accelerated storage conditions. Food Research International, 99 (3): 986-994.
- Akhavan, S., Jafari, M., Assadpoor, E., and Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum arabic and gelatin. International Journal of Biological Macromolecules, 85:379-85.
- Anal, K.A., and Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science and Technology, 18: 240-251.
- Boukida, F., Follonib, S., Ranierib, R., and Vittadini, E. (2018). A compendium of wheat germ: Separation, stabilization and food applications. Trends in Food Science & Technology. 78: 120-133.
- Cabello-Olmo, M., Oneca, M., Torre, P., Diaz, J.V., Encio, I.J., Barajas, M., and Arana, M. (2020). Influence of storage temperature and packaging on bacteria and yeast viability in a plant-based fermented food. Foods, 9(3): 302.
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., and Maji, T. (2016). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. Advances in Colloid and Interface Science, 239:136-145.
- Favilla, A.L.C., dos Santos Junior, E.R., Rodrigues, M.C.N.L., dos Santos Baiao, D., Paschoalin, V.M.F., Miguel, M.A.L., and Pierucci, A.P.T.R. (2022). Microbial and physicochemical properties of spray dried kefir microcapsules during storage. LWT-Food Science and Technology, 154: 112710.
- He, S., Feng, K., Ding, T., Huang, K., Yan, H., Liu, X., and Zhang, Z. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* BL-010. Microbial Pathogenesis, 118:199-201.
- Iranian National Standardization Organization, Standard No. 4093. (2007). Measurement of anisidine number. First revision.
- Iranian National Standardization Organization, Standard No. 4178. (1998). Measurement of acidity in edible oils and fats. First Edition.
- Iranian National Standardization Organization, Standard No. 10494. (2016). Vegetable oils and fats - measurement of 2- thiobarbituric acid by direct method. First edition.
- Iranian National Standardization Organization, Standard No. 3-10899. (2013). Microbioligy of food and animal feeding stuffs - enumeration of Yeast and mould-Colony count techni in products with water activity Less than or equal to 0/60. First edition.
- Kaur, A., Singh, G., and Kaur, H. (2000). Studies on use of emulsifiers and hydrocolloids as fat replacers in baked products. Journal of Food Science and Technology (Mysore), 37(3): 250-255.
- Kim, Y., Cho, J.Y., Kuk, J.H., Moon, J.H., Cho, J.I., Kim, Y.C., and Park, K.H. (2004). Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, Chungkook-Jang. Curr Microbiol, 48(4): 312-317.
- Kuck, L.S., and Norena, C.P.Z. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. Food Chemistry, 194: 569-576.
- Kuck, L.S., Wesolowski, J.L., and Norena, C.P.Z. (2017). Effect of temperature and relative humidity on stabilityfollowing simulated gastro-intestinal digestion of microcapsules of Bordograpе skin phenolic extract produced with different carrier agents. Food Chemistry, 230: 257-264.
- Long, Z., Zhao, Q., Liu, T., Kuang, W., Xu, J., and Zhao, M. (2012). Role and properties of guar gum in sodium caseinate solution and sodium caseinate stabilized emulsion. Food Research International, 49: 545-552.

- Megahed, M.G. (2011). Study on stability of wheat germ oil and lipase activity of wheat germ during periodical storage. Agriculture and biology Jouranl of North America, (1):163-168.
- Muras, A., Romero, M., Mayer, C., and Otero, A. (2021). Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. Critical Reviews in Biotechnology, 41(4): 609-627.
- Rizzello, C.G., Nionelli, L., Coda, R., De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2010). Effect of sourdough fermentation on stabilization, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. Food Chemistry, 119: 1079-1089.
- Rosa, D.D., Dias, M.M., Grzeskowiak, L.M., Reis, S.A., Conceicao, L.L., Maria do Carmo, G.P. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. Nutrition Research Reviews, 30(1):82-96.
- Shahzadi, N., Butt, M.S., Rehman, S.U., and Sharif, K. (2005). Chemical characteristics of various composite flours. International Journal of Agriculture and Biology, 7(1): 105-108.
- Thombare, N., Jha, U., Mishra, S. and Siddiqui, M.Z. (2016). Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. International Journal of Biological Macromolecules, 88:361-372.
- Vinoj, G., Vaseeharan, B., Thomas, S., Spiers, A.J., and Shanthi, S. (2014). Quorum- quenching activity of the AHL-lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits vibrio biofilm formation in vitro and reduces shrimp intestinal colonisation and mortality. Mar Biotechnol (NY), 16(6):707–715.
- Wiegand, S., Dietrich, S., Hertel, R., Bongaerts, J., Evers, S., Volland, S., Daniel, R., and Liesegang, H. (2013). RNA-Seq of *Bacillus licheniformis*: active regulatory RNA features expressed within a productive fermentation. BMC Genomics, 14(1): 1.