# مطالعه ی اثر نانولیپوزوم اسانس بیدمشک بر زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در بستنی پروبیوتیک

**فاطمه امینی[1]، حمدالله مشتاقی[2*] ، مریم عباس والی[3]**

[1] دانش آموخته ی دکتری بهداشت مواد غذایی ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه شهرکرد ، شهرکرد ، ایران.

[2*] گروه بهداشت مواد غذایی ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

[3] گروه بهداشت مواد غذایی و کنترل کیفی ، دانشکده تغذیه و علوم غذایی ، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

*نویسنده مسئول: moshtaghi@sku.ac.ir

**چکیده**

*Salix aegyptiaca*گیاهی گل‌داراست که با نام بیدمشک شناخته می‌شود. بیدمشک از دیرباز در طب سنتی برای بهبود کم خونی و سرگیجه، همچنین یک تقویت کننده قلب و عروق مورد استفاده قرار می‌گیرد و در صنعت غذا به عنوان یک افزودنی معطر در تهیه آب نبات‌های محلی استفاده می‌شود. کپسولاسیون مواد در نانولیپوزوم‌ها می‌تواند به‌عنوان یک سیستم محافظتی از ترکیبات طبیعی در طی فرآوری و نگهداری آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. امروزه استفاده از پروبیوتیک ها به صورت مکمل های خوراکی و یا فراورده های غذایی در حال افزایش است. در میان محصولات پروبیوتیک، بستنی پروبیوتیک محبوبیت زیادی به دست آورده است. در این مطالعه علاوه بر تهیه نانولیپوزوم‌های اسانس بیدمشک به روش Ethanol Injection ، به بررسی و مطالعه‌ی اثرآن بر باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در بستنی پروبیوتیک پرداخته شد. دراین مطالعه به بستنی حاوی $10^9$ cfu/ml باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* میزان ۱درصد و۲ درصد اسانس آزاد و نانولیپوزوم بیدمشک افزوده شد و در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری شد و در نهایت اثر آن در روزهای صفر، ۷ ، ۱۴، ۲۱، ۲۸ ، ۶۰و ۹۰ مورد مطالعه قرارگرفت. *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در گروه های حاوی ۱و ۲درصد اسانس آزاد و لیپوزومی بیدمشک زنده مانی قابل توجهی را طی نگهداری در ۹۰ روز نشان داد. درصورتی که این باکتری در نمونه بستنی شاهد بدون اسانس کاهش محسوسی داشت. طبق نتایج بدست آمده استفاده از اسانس آزاد و نانولیپوزومی بیدمشک به جهت تاثیر مثبت بر افزایش زنده مانی باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در تولید بستنی پروبیوتیک توصیه می‌شود.

**کلمات کلیدی:** اسانس بیدمشک، نانولیپوزوم، کپسولاسیون، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*، *Salix aegyptiaca*.

**مقدمه**

امروزه، ترکیبات طبیعی به‌دلیل داشتن خواص مفید و نداشتن عوارض جانبی مواد شیمیایی مشابه، مورد توجه مصرف کنندگان قرار گرفته و به همان میزان کاربرد این ترکیبات طبیعی در صنایع غذایی به‌عنوان مواد ضدمیکروب و نگهدارنده روبه افزایش است. اما با این وجود چالش‌هایی در زمینه استفاده مستقیم از اسانس‌های دارای ترکیبات شیمیایی فعال مانند ترکیبات فنولیک در سیستم‌های غذایی پیچیده وجود دارد که شامل تاثیرات منفی بر پایداری فیزیکی و شیمیایی غذا و از سویی از بین رفتن فعالیت زیستی (biological activity) ترکیبات موجود در اسانس می‌باشد(Sawale et al., 2017). افزایش تقاضا برای ترکیبات آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی ویا ترکیبات پری‌بیوتیکی طبیعی، همراه با آگاهی مصرف کنندگان از مضرات ترکیبات شیمیایی، باعث شکل‌گیری گرایش جدیدی به نام مصرف‌گرایی سبز در صنایع غذایی شده است که مبنای توسعه رویکردهای جایگزین برای نگهداری مواد غذایی است (Imran et al., 2012).

*Salix aegyptiaca L* گیاهی گل‌دار است که با نام بیدمشک[1]شناخته می شود. بیدمشک یک درختچه‌ی برگریز از خانواده سالیانسه[2]از راسته مالفیجیالس[3]است. گونه های بیدمشک احتمالا از خاورمیانه خصوصا مصر، ترکیه، ایران، عراق، ارمنستان، ترکمنستان و افغانستان سرچشمه می‌گیرند ( Asgarpanah, 2012; Karimi et al, 2011). ازاسانس و عرق گل آذین نر گیاه مدت هاست که در طب سنتی ایران به عنوان تقویت کننده قلب، درمان کم خونی و سرگیجه و همچنین افزودنی معطر در نوشیدنی ها استفاده می‌شود (Akin et al, 2007; Sonboli et al, 2010). از جوشانده برگ یا پوست آن نیزبرای دردهای روماتیسمی و به عنوان ماده‌ی ضدعفونی کننده و داروی ضدکرم (کرم روده) استفاده می‌شود. علاوه بر این، از بیدمشک به عنوان ملین، آرامبخش، تب بر، ضدفشارخون، خواب‌آور، مسکن و محافظ معده و بادشکن و تقویت قوای جنسی استفاده می‌گردد. خواص ضدالتهابی و ضددردی عصاره‌های خانواده سالیکس ممکن است به مواد شیمیایی آن از جمله سالیسین[4] میریستین[5] کامفرول[6] کوئرستین[7] روتین[8] ، لوتئولین[9] و کاتچین[10] مربوط باشد( Zandi et al, 2023; Asgarpanah, 2012; Karimi et al, 2011; Sayyari, 2017&Frahmandfar). چندین ترکیب شیمیایی مانند فلاونوئیدها و مواد فرار از قسمت‌های مختلف گیاه بیدمشک شناسایی شده است.گل‌های نر بیدمشک غنی از اجزای فرار مانند*p*- متوکسی بنزن، اوژنول، کارون و ژرانیول هستند (Enayat and Banerjee,2009; Karimi et al, 2011).

اسانس‌ها، مایعات فرار معطر طبیعی هستند که از قسمت‌های مختلف گیاهان مانند گل‌ها، جوانه‌ها، دانه‌ها، برگ‌ها، ساقه‌ها و پوست استخراج می‌شوند. ترکیب و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی اسانس‌ها تحت تأثیر نوع

[1] Musk willow
[2] *Salicaceae*
[3] *Malpighiales*
[4] Salicin
[5] Myricetin
[6] Kaempferol
[7] Quercetin
[8] Rutin
[9] Luteolin
[10] Catechin

گیاه، بخشی از گیاه که اسانس‌گیری انجام می‌شود، منشا جغرافیایی، زمان برداشت، مرحله رشد، سن گیاهان و روش استخراج قرار دارد (Bastos et al, 2020). این اجزاء فرار به راحتی در معرض نور و تحت تأثیر گرما تجزیه می‌شوند و درون پوشانی آن‌ها با هدف محافظت از خصوصیات عملکردی و همچنین تعدیل انتشار صورت می‌گیرد (Faidi et al, 2019). از سوی دیگر، به‌رغم اثرات سودمند، ترکیبات اسانس‌ها فراهم زیستی پایینی دارند و همچنین ناپایدار بودن در طی فرآیند تولید و نگهداری و عدم تحمل شرایط نامساعد محیطی باعث محدودیت استفاده از آن می‌شود. بنابراین استفاده از روش‌های جدید جهت محافظت انتخابی ترکیبات طبیعی در پروسه تولید و نگهداری، ضروری به‌نظر می‌رسد. روش‌های متفاوتی مانند کپسوله کردن ترکیبات اصلی، نظیر نانو ذرات، میکرو ذرات، لیپوزوم‌ها (Elabbadi et al, 2011; Gulseren, 2013 & Corredig; Liang et al, 2011; Lu et al, 2011). درون پوشانی فرآیندی است که در آن ماده زیست فعال (جامد، مایع یا گاز) در داخل ماده دیگر (ماده دیواری) محصور می‌شود تا از آن در برابر شرایط نامساعد محیطی محافظت شود؛ در نتیجه ماندگاری و انتشار کنترل شده ماده زیست فعال در ریزپوشش افزایش می‌یابد( Hernandez et al, 2020; Zandi et al, 2017; Bastos et al, 2020). این روش جدید (نانوکپسولاسیون) از طریق بهبود پایداری اکسیداتیو عناصر یک راه بالقوه برای غلبه بر چنین چالش‌هایی است که از ترکیبات زیست فعال در برابر واکنش‌های ناخواسته و عوامل محیطی محافظت می‌کند و واکنش احتمالی آن‌ها را با مواد مغذی محدود می‌کند، بنابراین ثبات غذا را در طول پردازش و ذخیره‌سازی حفظ می‌نماید و باعث اثربخشی کنترل‌شده یا هدفمند می‌شود ( Mozafari et al, 2007; Noori et al, 2017). درواقع کپسوله شدن از مواد فعال زیستی در مقابل هضم در دستگاه گوارش محافظت کرده میزان جذب گوارشی را افزایش داده که در نهایت باعث افزایش فراهمی زیستی و فعالیت زیستی آن‌ها می‌شود (Takahashi et al, 2009; Wu et al, 2015). در این متد با دستکاری اتم‌ها و مولکول‌ها ساختارهایی در اندازه نانو ایجاد شده (اغلب ۹۶۶ نانومتر یا کمتر) که باعث حفظ ویژگی‌های آن نیز می‌شود (Noori et al, 2017). ترکیبات نانوکپسوله به دلیل اندازه کوچکتر از سلولشان، فعالیت زیستی بالاتری دارند همچنین از این فناوری به منظور پوشاندن طعم و بوی نامطلوب نیز استفاده می‌شود (Gortzi et al, 2007; Noori et al, 2017). یکی از روش های کپسوله نمودن نانوساختارهایی تحت عنوان نانو لیپوزوم‌ها است. نانولیپوزوم ها، ذرات کروی متشکل از چربی‌های قطبی (فسفاتیدیل کولین یا فسفاتیدیل اتانول آمین) یا ترکیبی چربی‌های قطبی با کلسترول یا ارگسترول می‌باشند که به فراوانی در طبیعت یافت می‌شوند. در حلال های قطبی مانند آب عموماً تمایل دارند که به فرم غشاهای دو لایه‌ای دربیایند. اندازه این ذرات کروی شکل بستگی به روش ساخت آن‌ها داشته و می‌تواند از چند ده نانومتر تا چند ده میکرومتر متفاوت باشد. ساختار لیپوزوم‌ها از مولکول‌هایی آمفیفیلیک[1]تشکیل‌شده است که دارای یک-سر آب‌دوست و یک‌سر آب‌گریز می‌باشند. متاسفانه امروزه به دلیل تفاوت در عادات غذایی،کمبود تحرک و افزایش استرس انسان درگیر بیماری های گوناگونی نظیر بیماری های قلبی، انواع سرطان از قبیل سرطان سینه، پروستات و کولون و همچنین بیماری های استخوانی می

[1] amphiphilic [1]

شود(Vahidmoghaddam et al.,2018) ازین روی مواد غذایی تولید شده که دارای ترکیباتی هستند که علاوه بر ارزش تغذیه ای نتایج مثبتی بر سلامتی انسان دارند. از این محصولات غذایی تحت عنوان محصولات فراسودمند، عمل گرا و یا کاربردی یاد می شود. در واقع غذا های عمل گرا بخشی از رژیم غذایی انسان هستند که دارای فوایدی برای سلامتی و پیشگیری از ابتلا به بیماری های مزمن (فراتر از آنچه توسط تغذیه مناسب فراهم می شود) هستند( Al-Sheraji et al.,2013). این نوع مواد غذایی امروزه با توجه به آگاهی مردم از اهمیت مواد غذایی در سلامت انسان توجه روزافزونی را به خود جلب کرده است(Siró et al.,2008). این مسئله منجر به افزایش تولید مصرف مواد غذایی غنی شده با اجزای بیولوژیکی فعال مانند پروبیوتیک ها و پری بیوتیک ها شده است (Rouhzadeh and Bahramian.,2020).

طبق تعریف FAO پروبیوتیک ها باکتری هایی هستند که پس از مصرف و رسیدن به روده از طریق بهبود فلور میکروبی طبیعی روده باعث ایجاد اثرات مثبتی در سلامتی انسان می شود(Aghajani et al.,2010). ازجمله این اثرات می توان به موارد زیر اشاره کرد: کمک به هضم لاکتوز، جذب کلسیم، مقاومت در برابر پاتوژن های روده ای، بهبود و جلوگیری از اسهال ویروسی و باکتریایی، کاهش وقوع یبوست، اثر مهاری بر سرطان مثانه و کولون، تقویت سیستم ایمنی، رشد باکتری های روده باریک، کاهش لیپیدهای خون و بیماری های قلبی عروقی، بهبود بیماری های مجاری ادراری تناسلی، درمان عفونت های ایجاد شده توسط هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) و پیشگیری از انسفالوپاتی هپاتیک. بنابراین تولید و عرضه محصولات دارای پروبیوتیک ها به بازار مصرف از نظر ارزش غذایی مفید است ( Javaheri et al.,2018; Coconnier et al.,1998; Sanchez et al.,2009). فدراسیون بین المللی وجود حداقل ۱۰۶ باکتری پروبیوتیک زنده در هرگرم از محصولات لبنی را در هنگام مصرف لازم دانسته است(Di Criscio et al.,2010). امروزه استفاده از پروبیوتیک ها به صورت مکمل های خوراکی و یا فراورده های غذایی در حال افزایش است. در میان محصولات پروبیوتیک، بستنی پروبیوتیک محبوبیت زیادی به دست آورده است. بستنی را می توان مدت زیادی بدون تغییر در ویژگی های آن ذخیره کرد( Akin et al.,2007). بستنی به دلیل pHخنثی و مقدار زیاد مواد جامد کل قابلیت بالایی در زنده مانی پروبیوتیک ها دارد و همچنین به سبب دارا بودن خواص حسی ویژه و طرفداران زیاد این محصول لبنی، فراورده غذایی مناسبی برای انتقال پروبیوتیک ها به بدن است (Hekmat and Mcmahon.,1992; Kailasapathy and Chin.,2000; Akin et al.,2007; Golestani et al.,2016; Noori et al.,2017 ). بازدهی پروبیوتیک ها در محصول غذایی به تعداد اولیه پروبیوتیک های زنده، مدت زمان نگهداری محصول و نوع ماده غذایی بستگی دارد. با مصرف میزان مشخص و استاندارد بستنی (۸۰گرم در روز) کسب حداقلCFU/ml ۱۰۷ از باکتری پروبیوتیک در روز ممکن می شود (Golestani et al.,2016). ازجمله باکتری‌های پروبیوتیک می‌توان به بیفیدوباکتریوم لاکتیس *Bifidobacterium lactis*اشاره کرد.

**مواد و روش کار:**

- تهیه نانولیپوزوم اسانس بیدمشک

اسانس بیدمشک مورد استفاده تولید شرکت البریشت آلمان می‌باشد که از طریق شرکت نیکوشیمی در ایران تهیه شد. برای تولید نانولیپوزوم های حاوی اسانس بیدمشک از روش Ethanol injection استفاده گردید. ابتدا ۱۰میلی گرم بر

میلی لیتر فسفولیپید، ۵ میلی گرم بر میلی لیتر کلسترول و مقادیر مورد نظر از غلظت اسانس بیدمشک در ۱۰میلی لیتر اتانول حل و توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس به داخل ۲۰میلی لیتر فاز آبی که روی همزن مغناطیسی با دورrpm ۴۰۰قرار دارد، تزریق شد. پس از تشکیل لیپوزوم ها، محلول به مدت ۱۵دقیقه دیگر روی هم زن قرار گرفته و در نهایت با استفاده از روتاری در دمای ۴۰درجه سانتی گراد، فاز آبی و اتانول جدا گردید. سوسپانسیون حاوی اسانس نانولیپوزومی در دمای یخچال نگهداری شد ( Sebaaly et al, 2015).

- تهیه و آماده سازی پروبیوتیک ها

باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* از شرکت کریستین هانسن دانمارک به صورت لیوفیلیزه، خریداری شد. سپس باکتری مذکور در شرایط استریل در محیط کشت MRS broth در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ساعت فعال شدند. سلول‌های پروبیوتیکی در انتهای فاز لگاریتمی رشد به وسیله سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴درجه سانتی گراد جدا گردید .پس از دو بار شستشو به وسیله سرم فیزیولوژی استریل رسوب باکتری پروبیوتیک جدا شد و در بستنی استفاده گردید(Homayouni Rad et al.,2012).

- تهیه میزان تلقیح باکتری ها

جهت آماده کردن میزان تلقیح باکتری از روش جذب نوری استفاده شد. پس برای این منظور از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده مقدار مناسبی به داخل کووت منتقل کردیم و جذب نوری باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر nm روی عدد۱تنظیم شد. سپس سوسپانسیون باکتری با غلظت ۱۰برابر جذب نوری تهیه شد. پس از تهیه سری رقت در پلیت های حاوی محیط MRS Agar به صورت سطحی و پورپلیت کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباتور گذاری کلنی ها شمارش شدند. تعداد باکتری ها در درCFU/ml ۱۰۹ استفاده شد(Noori et al.,2017).

-تهیه بستنی

برای تهیه بستنی یک لیتر شیر استریل و هموژنیزه را با ۴۰۰گرم خامه ٪ ۳۰مخلوط کرده و روی شعله قرار دادیم تا درجه حرارت مخلوط به ۴۰درجه سانتی‌گراد برسد، سپس مواد خشک شامل۱۰۰گرم پودر شیرخشک، ۲۷۰گرم شکر، ۰/۹گرم وانیل و۱۰گرم پایدارکننده (کربوکسی متیل سلولز) را با همزن برقی مخلوط و درجه حرارت را به ۸۰ درجه سانتی‌گراد رساندیم(Noori et al.,2017). سپس مخلوط دراین دما به مدت ۲۰دقیقه هم زده شد. مخلوط بستنی را به پنج گروه A,B,C,D,E تقسیم گردید. به هر کدام از گروه-های A,B,C به میزان ٪۱ w/v باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* اضافه شد. شمارش اولیه باکتری ها را به دست - آوردیم. به گروه A ا٪۱ اسانس آزاد بیدمشک و به گروه B ٪۱ اسانس لیپوزومی بیدمشک اضافه شد و به گروه C هیچ اسانسی اضافه نگردید. مخلوط در دستگاه بستنی ساز در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه منجمد شد و سپس در ظروف ۵۰گرمی بسته بندی و برای تکمیل فرآیند سخت شدن در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد ذخیره گردید( Noori et al.,2017; Mahdian and Karazhian.,2020).

- ارزیابی اثر اسانس آزاد و نانولیپوزومی بیدمشک بر رشد *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در بستنی

تعداد باکتری های زنده بلافاصله پس از انجماد و نیز پس از گذشت ۹۰ ،۶۰ ،۲۸ ،۲۱ ،۱۴ ،۷روز نگهداری در دمای۱۸-

درجه سانتی‌گراد شمارش شدند. برای این منظور از یک گرم نمونه سری رقت تهیه کرده و در محیط کشتMRS agar به روش پورپلیت کشت داده شد. آزمایش ها در ۳تکرار انجام گردید ( ۱۳و۲۷). سپس در دمای ۳۷درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ساعت در شرایط بی هوازی برای *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* گرمخانه گذاری شد. در نهایت کلنی های رشد کرده شمارش شدند(Noori et al.,2017).

- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با روش آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی Tukey با استفاده از نرم افزار Sigma Stat2 انجام شد.

**- نتایج**

جدول ونمودارشماره ۱زنده مانی باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* را در نمونه های حاوی۱ درصد اسانس آزاد و نانولیپوزومی بیدمشک طی۹۰ روز نگهداری در شرایط انجماد نشان می‌دهد. همانطور که داده ها نشان می دهند در گروه های AوB حاوی ۱درصد اسانس آزاد و لیپوزومی بیدمشک کاهش قابل توجهی طی۹۰ روز نگهداری در تعداد بیفیدوباکتریوم ها انجام نشد. باتوجه به نمودار شماره ۱گروه های AوB روند کاهشی با شیب بسیار کمی داشته است و تغییرمحسوسی در لگاریتم باکتری ها صورت نگرفته است به طوری که در طی نگهداری در مدت زمان ۹۰ روز این کاهش کمتراز یک لگاریتم بوده است. در صورتی که در نمونه ی شاهد که فاقد اسانس بود کاهشی در حدود ۲ لگاریتم در تعدادباکتری ها صورت گرفت. جدول ونمودار شماره ۲ شمارش تعداد باکتری های *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* را در نمونه های بستنی حاوی ۲درصد اسانس بیدمشک آزاد ولیپوزومی(گروه EوD) طی ۹۰ روز نگهداری در حالت انجماد نشان می دهد. داده ها نشان می دهد که کاهش قابل توجهی در نمونه های گروه EوD که حاوی ۲درصد اسانس آزاد و لیپوزومی بیدمشک هستند صورت نگرفت. همان گونه که از نمودارشماره ۲ قابل دریافت است گروهEوDروند کاهشی با شیب بسیار کم داشته به طوری که این کاهش کمتراز یک لگاریتم طی۹۰ روز نگهداری بوده است و تقریبا از هفته ی سوم تعداد باکتری ها بصورت ثابت باقی ماند ولی در مورد گروه Cکه نمونه شاهد فاقد اسانس است روند کاهشی با سرعت زیاد و بصورت محسوس قابل مشاهده می باشد. با توجه به این نکته که فدراسیون بین المللی وجود حداقل ۱۰۶ باکتری پروبیوتیک زنده در هرگرم از محصولات لبنی را در هنگام مصرف لازم دانسته است می‌توان بیان کرد که افزودن اسانس بیدمشک به صورت آزاد و یا لیپوزومی به بستنی حاوی باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* برای حفظ و زنده مانی پروبیوتیک ها در طی نگهداری و تا زمان مصرف مفید و حتی ضروری می باشد.

جدول۱. زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* همراه با۱درصد اسانس بیدمشک آزاد و نانولیپوزوم شده در بستنی طی ۹۰روز نگهداری در شرایط انجماد ( Log 10 CFU/g

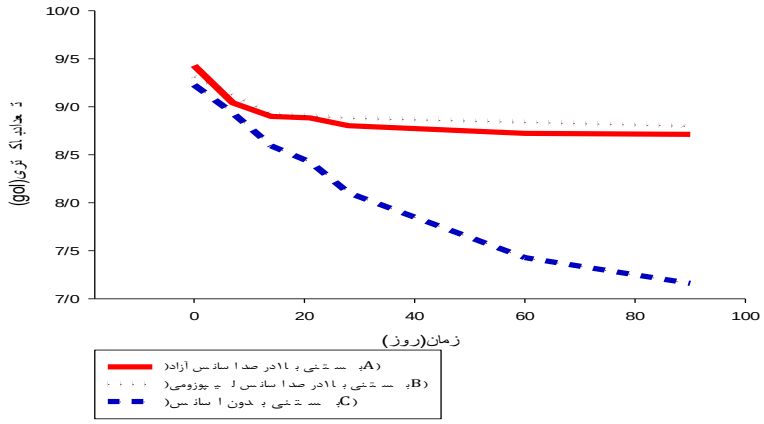
| زمان(روز) | صفر | ۷ | ۱۴ | ۲۱ | ۲۸ | ۶۰ | ۹۰ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| نمونه بستنی | | | | | | | |
| بستنی پروبیوتیک+۱درصد اسانس آزاد(A) | ۹/۴۳۰$^{Ac}$ | ۹/۰۴۱$^{Ac}$ | ۸/۹۰$^{Ac}$ | ۸/۸۸۴$^{Ac}$ | ۸/۸۰۳$^{Ac}$ | ۸/۷۲۳$^{Ac}$ | ۸/۷۱۳$^{Ac}$ |
| بستنی+ ۱درصد نانواسانس لیپوزومی(B) | ۹/۳۱۴$^{Bc}$ | ۹/۱۲۱$^{Bc}$ | ۸/۹۲۴$^{Bc}$ | ۸/۹۱۱$^{Bc}$ | ۸/۸۸۴$^{Bc}$ | ۸/۸۴۲$^{Bc}$ | ۸/۸۰۱$^{Bc}$ |
| بستنی بدون اسانس(C) | ۹/۲۲۸$^{Cab}$ | ۸/۹۳۵$^{Cab}$ | ۸/۵۹۳$^{Cab}$ | ۸/۴۲۷$^{Cab}$ | ۸/۱۰۳$^{Cab}$ | ۷/۴۲۸$^{Cab}$ | ۷/۱۶۰$^{Cab}$ |

*حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنادار با آن گروه می‌باشد($p>0.05$).

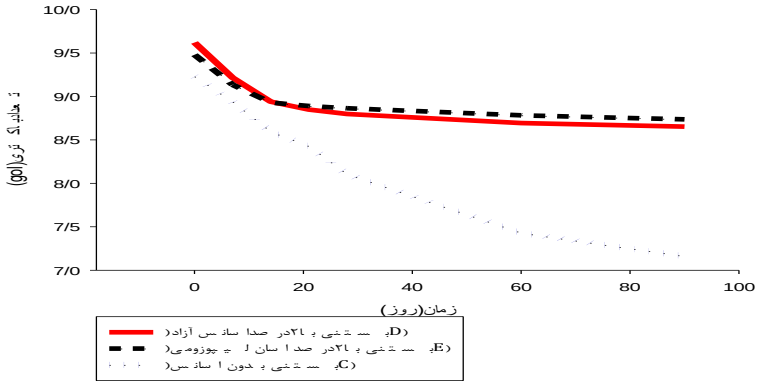
جدول۲. زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* همراه با۲درصد اسانس بیدمشک آزاد و نانولیپوزوم شده در بستنی طی ۹۰روز نگهداری در شرایط انجماد ( Log 10 CFU/g

| زمان(روز) | صفر | ۷ | ۱۴ | ۲۱ | ۲۸ | ۶۰ | ۹۰ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| نمونه بستنی | | | | | | | |
| بستنی پروبیوتیک+ ۲درصد اسانس آزاد(D) | ۹/۶۲۱$^{Dc}$ | ۹/۲۱۵$^{Dc}$ | ۸/۹۴۰$^{Dc}$ | ۸/۸۴۹$^{Dc}$ | ۸/۷۹۹$^{Dc}$ | ۸/۶۹۴$^{Dc}$ | ۸/۶۵۳$^{Dc}$ |
| بستنی+ ۲درصد نانواسانس لیپوزومی(E) | ۹/۴۸۰$^{Ec}$ | ۹/۱۳۵$^{Ec}$ | ۸/۹۳۱$^{Ec}$ | ۸/۸۹۰$^{Ec}$ | ۸/۸۶۵$^{Ec}$ | ۸/۷۸۳$^{Ec}$ | ۸/۷۳۷$^{Ec}$ |
| بستنی بدون اسانس(C) | ۹/۲۲۸$^{Cde}$ | ۸/۹۳۵$^{Cde}$ | ۸/۵۹۳$^{Cde}$ | ۸/۴۲۷$^{Cde}$ | ۸/۱۰۳$^{Cde}$ | ۷/۴۲۸$^{Cde}$ | ۷/۱۶۰$^{Cde}$ |

*حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنادار با آن گروه می‌باشد($p>0.05$).

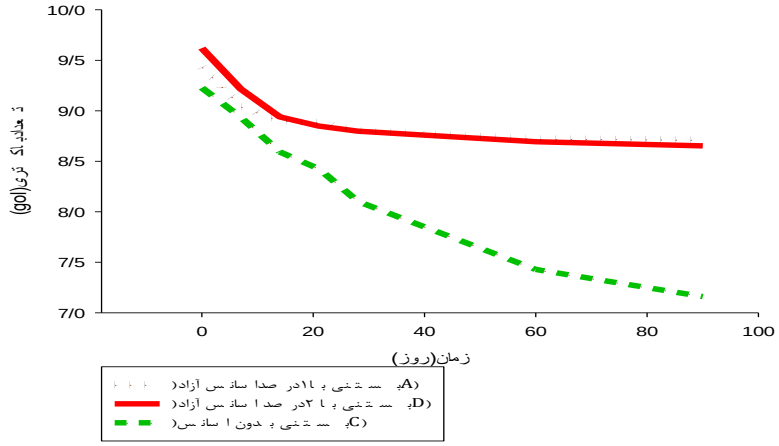



نمودار۱: میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با ۱ درصد اسانس بیدمشک آزاد و نانولیپوزومی در بستنی طی نگهداری در ۹۰ روز در حالت انجماد

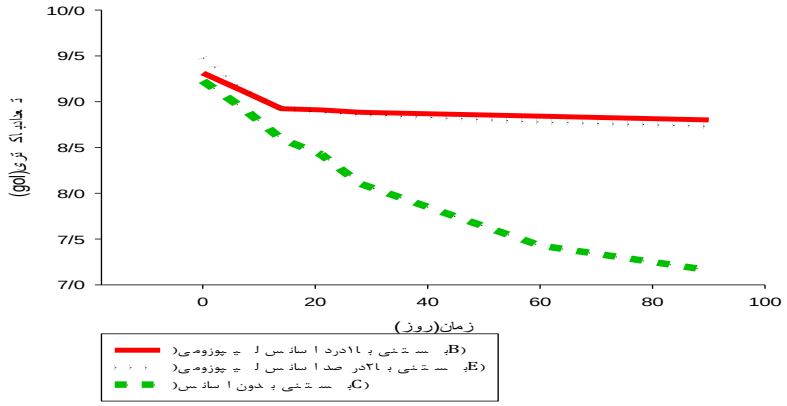



نمودار۲: میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با ۲در صد ا سانس بیدمشک آزاد و نانولیپوزومی در بستنی طی نگهداری در ۹۰ روز در حالت انجماد

در نمودار شماره ۳ مقایسه ای بین نمونه های حاوی اسانس بیدمشک آزاد در غلظت های ۱و۲ درصد انجام گرفت. باتوجه به این نمودار وآنالیز داده ها می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت معنی داری بین گروه DوA یعنی نمونه های حاوی غلظت ۱و۲درصد اسانس آزاد وجود ندارد ($p>0.05$). ولی بین گروهCوA و همچنین بین گروه های CوD از لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود داشت ($p<0.05$). همین مقایسه بین گروه های EوB در نمودار شماره ۴ انجام گرفت. آنالیز داده ها نشان داد که تفاوت معنی داری بین این گروه ها وجود ندارد($p>0.05$). ولی بین گروه هایBوC و همچنین گروه های E وC از لحاظ آماری تفاوت معناداری وجود داشت($p<0.05$).




نمودار۳: مقایسه ی میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با ۱درصدو۲درصد اسانس بیدمشک آزاد در بستنی طی نگهداری در ۹۰ روز در حالت انجماد




نمودار۴: مقایسه ی میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با ۱درصدو۲درصد اسانس بیدمشک نانولیپوزومی در بستنی طی نگهداری در ۹۰ روز در حالت انجماد

**بحث:**

در مطالعه‌ی حاضر که برای اولین بار به تاثیر اسانس آزاد و نانولیپوزوم شده‌ی بیدمشک در بستنی و روی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* انجام گرفت نتایج نشان داد که اسانس بیدمشک در هر دو حالت آزاد و کپسوله در زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در بستنی طی مدت زمان ۹۰روز نگهداری اثر مثبتی داشت در صورتی که این باکتری در نمونه های فاقد اسانس در طی نگهداری دچار کاهش محسوسی شد. در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۵توسط نوری و همکاران روی بستنی سین بیوتیک انجام شد به بررسی اثر عصاره‌ی نانوکپسوله شده‌ی عصاره چای سبز بر زنده مانی باکتری های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* پرداخته شد. نتایج نشان داد که کمترین کاهش در میانگین لگاریتم تعداد *لاکتوباسیلوس کازئی* درطول مدت زمان نگهداری در بستنی های حاوی ۱درصد عصاره چای سبز نانولیپوزومی معادل ۱/۵۹لگاریتم و بیشترین کاهش در بستنی های گروه کنترل برابر با ۴/۱۶ لگاریتم مشاهده شد همچنین کمترین اختلاف در میانگین لگاریتم تعداد *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در بستنی های حاوی۱درصد عصاره چای سبز نانولیپوزومی معادل ۰/۸۴لگاریتم و بیشترین اختلاف در بستنی های گروه شاهد برابر با ۴/۴لگاریتم به دست آمد. این تحقیق نشان داد که نانو کپسولاسیون عصاره چای سبز اثر معنی داری در رشد و زنده مانی پروبیوتیک ها در محیط کشت و بستنی دارد و می توان از این ترکیب به منظور افزایش زنده مانی پروبیوتیک ها طی فرایند تولید و نگهداری مواد غذایی استفاده کرد (Noori et al.,2017).

همچنین در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۰توسط عزیز همایونی انجام گرفت به بررسی انتخاب گونه باکتری پروبیوتیک مناسب در تولید بستنی فراسودمند پرداخته شد. نتایج نشان داد که در غلظت های مختلف ساکارز، بیشترین رشد مربوط به *لاکتوباسیلوس کازئی* در غلظت های ۱۰درصد و ۲۰درصد است. در بین باکتری های مورد آزمایش، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* درمقایسه با بقیه از مقاومت خوبی در برابر سرما و pH شبیه سازی شده دستگاه گوارشی و شرایط شبیه سازی شده بستنی برخوردار بودند و همچنین سرعت رشد بالایی داشتند (Homayouni.,2011). این

نتیجه در این مطالعه که روی باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و در بستنی انجام گرفت نیز تایید شد و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در حضور اسانس بیدمشک زنده مانی قابل توجهی نشان داد.

علاوه بر این مطالعه ای در سال ۹۱توسط ابراهیم زادگان و همکاران روی پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و در محصول دوغ انجام گرفت. دراین مطالعه باکتری پروبیوتیک را به دو صورت آزاد و کپسوله به محصول اضافه کردند. نتایج نشان داد که در طول نگهداری تعداد *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در حالت آزاد ۰/۲۶سیکل کاهش و در حالت کپسوله شده ۰/۳۶سیکل لگاریتمی افزایش یافت. با اینکه تعداد باکتری های پروبیوتیک زنده در هردو حالت کپسوله شده و آزاد، در دوغ بالاتر از حداقل مقدار توصیه شده از طرف کمیته بین المللی لبنیات بود( $10^7$واحد کلنی در گرم) اما شکل کپسوله در حفظ تعداد پروبیوتیک ها بیشتر از نوع آزاد مؤثر بود (Ebrahimzadegan et al., 2015).

**نتیجه گیری:**

مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اسانس بیدمشک بصورت آزاد و نانولیپوزوم شده بر زنده مانی باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در بستنی پروبیوتیک و برای اولین بار انجام گرفت. اسانس بیدمشک در حالت آزاد و لیپوزومی در هر دو غلظت ۱و ۲ درصد باعث افزایش زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* طی مدت زمان نگهداری ۹۰ روزه در حالت انجماد گردید، در صورتی که بیفیدوباکتریوم در نمونه های بستنی فاقد اسانس به صورت محسوسی کاهش یافتند. باتوجه به نتایج به دست آمده در طی این پژوهش با توجه به محبوبیت زیاد محصول لبنی بستنی و آثار سودمند پروبیوتیک ها برسلامت مردم می-توان این محصول را بصورت پروبیوتیک تولید کرد. همچنین با توجه به مدت ماندگاری زیاد بستنی در حالت انجماد می توان از اسانس بیدمشک جهت افزایش زنده مانی پروبیوتیک ها تا زمان مصرف استفاده نمود.

**منابع:**

Aghajani, A.R.,Pourahmad. R.& Mahdavi Adeli, H.R. (2010). The Effect of Prebiotics on Probiotic Yogurt Containing Lactobacillus casei. *Food Technology & Nutrition*, *8*(4), 73-83.

Akın, M., Akın, M., & Kırmacı, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. Food chemistry, 104(1), 93-99.

Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of functional foods*, *5*(4), 1542-1553.

Asgarpanah, J. (2012). Phytopharmacology and medicinal properties of Salix aegyptiaca L. African Journal of Biotechnology, 11(28), 7145-7150.

Bastos, L. P. H., Vicente, J., dos Santos, C. H. C., de Carvalho, M. G., & Garcia-Rojas, E. E. (2020). Encapsulation of black pepper (Piper nigrum L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. Food Hydrocolloids, 102, 105605.

Coconnier, M. H., Lievin, V., Hemery, E., & Servin, A. L. (1998). Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(11), 4573-4580.

Di Criscio, T., Fratianni, A., Mignogna, R., Cinquanta, L., Coppola, R., Sorrentino, E., & Panfili, G. (2010). Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *Journal of dairy science*, *93*(10), 4555-4564.

Ebrahimzadegan, S., Zomorodi, SH., Hojjatoleslami, M.,& Khosroshahi Asl, A. (2015). The shelf life of free and encapsulated Bifidobacterium lactis and its effect on the physicochemical and sensory properties of Iranian buttermilk. Innovation magazine in food science and technology, *5*(4), 105-114.

Elabbadi, A., Jeckelmann, N., Haefliger, O. P., & Ouali, L. (2011). Complexation/encapsulation of green tea polyphenols in mixed calcium carbonate and phosphate micro-particles. Journal of Microencapsulation, 28(1), 1-9.

Enayat, S., & Banerjee, S. (2009). Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of Salix aegyptiaca sp. Food chemistry, 116(1), 23-28.

Faidi, A., Lassoued, M. A., Becheikh, M. E. H., Touati, M., Stumbé, J.-F., & Farhat, F. (2019). Application of sodium alginate extracted from a Tunisian brown algae Padina pavonica for essential oil

encapsulation: Microspheres preparation, characterization and in vitro release study. International journal of biological macromolecules, 136, 386-394.

Golestani, M.,Pourahmad. R.& Mahdavi Adeli, H.R. (2016). The effect of inulin on the survival of probiotic bacteria, physical, chemical and sensory characteristics of fermented and non-fermented synbiotic ice cream. *Food Technology & Nutrition*, *13*(3), 25-32.

Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., & Tsaknis, J. (2007). Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of Origanum dictamnus extracts before and after encapsulation in liposomes. Molecules, 12(5), 932-945.

Gülseren, I. b., & Corredig, M. (2013). Storage stability and physical characteristics of tea-polyphenol-bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. Journal of agricultural and food chemistry, 61(13), 3242-3251.

Haynes, I. N., & Playne, M. J. (2002). Survival of probiotic cultures in low-fat ice-cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, *57*(1), 10.

Hekmat, S., & Mcmahon, D. J. (1992). Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of dairy science*, *75*(6), 1415-1422.

Hernández-Nava, R., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez-Corona, N., & Jiménez-Munguía, M. T. (2020). Encapsulation of oregano essential oil (Origanum vulgare) by complex coacervation between gelatin and chia mucilage and its properties after spray drying. Food Hydrocolloids, 109, 106077.

Homayouni, A. (2011). Selection of suitable probiotic species for use in the production of ultra-beneficial ice cream. *Scientific-Research Journal of Microbial Biotechnology of Islamic Azad University*, *3*(8), 49-56.

Homayouni, A., Rezaie Mokarram, R., Norouzi, S., Dehnad, A., & Barkhordari, A. (2015). Evaluation of physicochemical, sensory properties and survival of Lactobacillus casei in synbiotic soy-based ice-cream. Iranian Food Science and Technology Research Journal, *11*(1), 56-62.

Homayouni Rad,A., Javadi, M., Ghasemnezhad Tabrizian, V. & Alizadeh, A. (2012). Increasing the probiotic survival in functional ice cream by microencapsulation. *Journal of Food Industry Research*, *22*(1), 97-102.

Imran, M., Revol-Junelles, A.-M., René, N., Jamshidian, M., Akhtar, M. J., Arab-Tehrany, E.... Desobry, S. (2012). Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. Food Hydrocolloids, 29(2), 407-419.

Javaheri, A., Khoshvaghti,A. & Marhamatizadeh, M.H. (2018). Probiotic yogurt production by hydroalcoholic extract of Gundelia tourneforti and probiotical kefir and evaluate its effect on probiotic bacteria (Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum) activity. Journal of Veterinary Microbiology, 14(2), 15-23.

Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. *Immunology and cell biology*, *78*(1), 80-88.

Karimi, I., Hayatgheybi, H., Kamalak, A., Pooyanmehr, M., & Marandi, Y. (2011). Chemical composition and effect of an essential oil of Salix aegyptiaca L., Salicaceae,(musk willow) in hypercholesterolemic rabbit model. Revista Brasileira de Farmacognosia, 21, 407-414.

Lu, Q., Li, D.-C., & Jiang, J.-G. (2011). Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. Journal of agricultural and food chemistry, 59(24), 13004-13011.

Liang, J., Li, F., Fang, Y., Yang, W., An, X., Zhao, L., . . . Hu, Q. (2011). Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 82(2), 297-301.

Mahdian, E., & Karazhian, R. (2020). Study on rheological, physicochemical and sensory properties of synbiotic ice cream using fibers from some fruit peels and Lactobacillus casei LC-01. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *15*(6), 103-112.

Mozafari, M. R. (2007). Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications: Springer.

Noori, N., Noudoost, B., Gandomi Nasrabadi, H., & Akhondzadeh Basti, A. (2017). Effects of green tea extract nanoencapsulation on the survival of *Lactobacillus Casei* and *Bifidobacterium* lactis in symbiotic ice cream. Journal of Veterinary Research, 72(2), 195-205.

Rouhzadeh, S., & Bahramian, S. (2020). Effect of Aloe vera gel on chemical, sensorial and viability of probiotic bacteria Lactobacillus plantarum in low fat ice cream. *Journal of Food Hygiene*, 10(38), 109-117.

Sanchez, B., De Los REYES-GAVILÁN, C. G., Margolles, A., & Gueimonde, M. (2009). Probiotic fermented milks: present and future. *International Journal of Dairy Technology*, *62*(4), 472-483.

Sawale, P. D., Patil, G. R., Hussain, S. A., Singh, A. K., & Singh, R. R. B. (2017). Release characteristics of polyphenols from microencapsulated Terminalia arjuna extract: Effects of simulated gastric

fluid. *International journal of food properties*, *20*(12), 3170-3178.

Sayyari, Z., & Farahmandfar, R. (2017). Stabilization of sunflower oil with pussy willow (Salix aegyptiaca) extract and essential oil. Food science & nutrition, 5(2), 266-272.

Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food chemistry*, *178*, 52-62.

Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, *51*(3), 456-467.

Sonboli, A., Mojarrad, M., Ebrahimi, S. N., & Enayat, S. (2010). Free radical scavenging activity and total phenolic content of methanolic extracts from male inflorescence of Salix aegyptiaca grown in Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR, 9(3), 293.

Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y., & Wada, K. (2009). Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. Journal of agricultural and food chemistry, 57(19), 9141-9146.

Wu, J., Liu, H., Ge, S., Wang, S., Qin, Z., Chen, L…, Zhang, Q. (2015). The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. Food Hydrocolloids, 43, 427-435.

Vahidmoghaddam, F.,Mortazavi. S,A., & Ghale mousiani, Z. (2018). Investigating the antioxidant activity of marjoram aqueous extract and its effect on the survival of Lactobacillus plantarum subspecies plantarum in low-fat probiotic yogurt. *Journal of innovation in food science and technology*, *10*(1), 25-32.

Zandi, M., Dardmeh, N., Pirsa, S., & Almasi, H. (2017). Identification of cardamom encapsulated alginate–whey protein concentrates microcapsule release kinetics and mechanism during storage, stew process and oral consumption. Journal of Food Process Engineering, 40(1), e12314.

Zandi, M., Ganjloo, A., & Bimakr, M. (2022). Encapsulation of musk willow (*Salix aegyptiaca L.*) essential oil with sodium alginateand whey protein: Characterization, controlled release and mathematical modeling. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, *19*(125), 121-133.

Zandi, M., Ganjloo, A., & Bimakr, M. (2023). Kinetic modeling and optimization of musk willow (Salix aegyptiaca L.) essential oil extraction process of using ultrasound assisted hydrodistillation. Iranian Journal of Food Science and Technology, 121(18), 93-106.

# The study of the effect of free and nanoliposome *Salix aegyptiaca* essential oil on the survival of *Bifidobacterium lactis* in probiotic ice cream

**Amini, F.[1], Moshtaghi, H.[2*], Abbasvali, M.[3]**

1. Ph.D. Student of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord , Shahrekord, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

3. Department of Food Hygiene and Quality control, Faculty of Nutrition and Food Sciences, University of Shiraz, Shiraz, Iran.

*Corresponding author: moshtaghi@sku.ac.ir

## Abstract:

*Salix aegyptiaca* is a flowering plant known as Musk Willow. For a long time S. aegyptiaca has been used in traditional medicines for the relief of anemia and vertigo, as a cardiotonic agent, as well as a fragrance additive in the preparation of local candies in the food industry. Encapsulation of materials in nanoliposomes can be used as a protective system of natural compounds during their processing and storage. Today, the useing of probiotics in the form of food supplements or food products is increasing. Among probiotic products, ice cream has gained a lot of popularity. In this study, in addition to preparing the nanoliposomes of musk willow essential oil by ethanol injection method, its effect on the *Bifidobacterium lactis* in ice cream was studied. In this study, 1% and 2% free essential oil and it`s nanoliposome were added to ice cream containing $10^9$ cfu/ml *Bifidobacterium lactis* and stored at -18 degrees Celsius, finally its effect was observed on days 0, 7, 14, 21, 28, 60 and 90 were studied. *Bifidobacterium lactis* in the groups containing 1% and 2% of free essential oil and Musk willow essential oil nanoliposomes showed significant survival during storage for 90 days. But, *Bifidobacterium lactis* was significantly reduced in the control group (ice cream without essential oil). According to the obtained results, the use of free and nanoliposome Musk willow essential oil is recommended for the positive effect on increasing the survival of *Bifidobacterium lactis* bacteria in the production of probiotic ice cream.

**Keywords:** Musk willow essential oil, nanoliposome, encapsulation, *bifidobacterium lactis*, *Salix aegyptiaca*