بررسی زنده مانی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ریزپوشانی شده در کرم مغزی کیک بر پایه آب

محمد علی خسروی زنجانی[a*]، بابک غیاثی طرزی[b]، انوشه شریفان[b]، نیما محمدی[c]، حسین باخدا[d]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران
[b] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، تهران، ایران
[c] دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران
[d] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مکانیزاسیون کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۲/۱۷

چکیده

مقدمه: از آنجایی که کیک‌های دارای مغزی توسط قشر وسیعی از مردم مصرف می‌شوند، تبدیل این محصول به یک فرآورده غذایی عملگرا می‌تواند نقش بسزایی در ارتقا سطح سلامتی انسان داشته باشد. هدف از این تحقیق بررسی زنده مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به صورت آزاد و ریزپوشانی شده در کرم مغزی بر پایه آب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (ATCC 29521) به روش امولسیون با آلژینات کلسیم و کیتوزان، ریزپوشانی شد و به طور جداگانه، در ۳ حالت مختلف: آزاد، ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و پوشش کیتوزان، به داخل کرم مغزی تلقیح شد و تاثیر ناشی از ریزپوشانی بر روی زنده مانی، pH و ویژگی‌های حسی کیک، در طول ۳۰ روز نگهداری در دماهای $4^{o}C$ و $25^{o}C$ مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل و اندازه کپسول‌ها بوسیله میکروسکوپ الکترونی و دستگاه اندازه‌گیری قطر ذرات مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بقای پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و پوشش کیتوزان، در مقایسه با نوع آزاد، افزایش یافت ($P <$ ۰/۰۵). تغییری در pH محصول حاوی پروبیوتیک های ریزپوشانی شده، صورت نگرفت، هم چنین پروبیوتیک‌ها در دمای $4^{o}C$ زنده مانی بهتری نشان دادند ($P <$ ۰/۰۵). افزودن پروبیوتیک‌ها در حالت آزاد و ریزپوشانی شده، تاثیر معنی داری بر روی بافت، رنگ و طعم محصول در طول نگهداری نداشت ($P>$ ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: ریزپوشانی با آلژینات کلسیم و پوشش کیتوزان به زنده مانی بیشتر پروبیوتیک‌ها در محصول، طی مدت ۳۰ روز نگهداری کمک می‌کند.

واژه های کلیدی: *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، ریزپوشانی، زنده مانی، کرم مغزی، کیتوزان*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: mohammadali_khosravi66@yahoo.com

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با استقرار در بخش‌های مختلف بدن، با عمل زیستی خود، عمدتاً از طریق حفظ و بهبود توازن فلور میکروبی روده سبب ایجاد خواص سلامتی بخش در میزبان می‌شوند (Adams, 1999). اکثر محصولات و فرآورده‌های غذایی پروبیوتیکی، حاوی لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها می‌باشند (Dave and Shah, 1996). بر اساس استانداردها، برای بروز ویژگی‌های سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها، باید به تعداد 10^6 تا 10^7 CFU از این باکتری‌ها در هر گرم از محصول پروبیوتیک وجود داشته باشند (Aragon-Alegro *et al*., 2007). فرآورده‌های حاصل از غلات، نظیر نان و کیک، منبع بسیار خوبی از پروتئین‌ها و مواد معدنی هستند و قشر وسیعی از مردم از مصرف کنندگان اصلی انواع مختلف این نوع محصولات به شمار می‌روند، بنابراین تبدیل این محصولات به مواد غذایی عملگرا، می‌تواند نقش بسزایی در بهبود سطح سلامت جامعه داشته باشد (Weinbreck *et al*., 2010; Zanjani *et al*., 2012). پروبیوتیک‌ها در بیشتر فرآورده‌های حاصل از غلات و قنادی، به علت مغذی نبودن محیط پایه این فرآورده‌ها و فعالیت آبی پایین این محصولات رشد و تکثیر محسوس ندارند، در این رابطه، فرآیند ریزپوشانی می‌تواند به منظور حفاظت پروبیوتیک‌ها و یا برخی ترکیبات مغذی، از محیط احاطه کننده، مورد استفاده قرار گیرد (Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010). ریزپوشانی، عبارت است از پوشش دادن سلول‌های میکروارگانیسم توسط لایه‌ای از هیدروکلوئید در مقیاس میکروسکوپی، به منظور محصور کردن و تفکیک کردن آن‌ها از محیط، که در نتیجه آن، زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط مختلف محیطی افزایش می‌یابد (Allan-Wojtas *et al*., 2008). پروبیوتیک‌ها تاکنون به صورت ریزپوشانی شده به محصولات غیر لبنی نظیر سوسیس تخمیری (Muthukumarasamy and Holley, 2006)، شکلات (Possemiers *et al*., 2010)، غذای کودک (Weinbreck *et al*., 2010)، نان (Altamirano-Fortoul *et al*., 2012) و سس مایونز (Khalil and Mansour, 1998; Mohammadi *et al*., 2012) تلقیح گشته‌اند. در این میان آلژینات، به میزان گسترده در فرآیند ریزپوشانی استفاده شده است. این ماده از جلبک های دریایی استخراج شده و با کلسیم کلرید ساختار مستحکمی را بوجود می‌آورد (Krasaekoopt *et al*., 2004). از مزایای آلژینات کلسیم می‌توان به غیر سمی بودن، آسان بودن تشکیل کپسول و هزینه پایین آن اشاره کرد (Possemiers *et al*., 2010). از آن جایی که ژل آلژینات کلیسم در حضور یون‌های کلسیم شکل می‌گیرد، وجود یون‌های تک ظرفیتی (به دلیل رقابت یونی) و عوامل درگیر کننده یون کلسیم، نظیر فسفات‌ها، لاکتات‌ها و سیترات‌ها منجر به از هم پاشی کپسول آلژینات می‌گردد (Allan-Wojtas *et al*., 2008)، پوشش کیتوزان (به عنوان ترکیب چند کاتیونی) پیرامون کپسول‌های آلژینات که بار منفی دارند، کپسول‌های پوشش داری ایجاد می‌کند، که باعث پایداری بیشتر کپسول‌ها و کاهش اثر تخریبی عوامل ضد ژل و درگیرکننده یون کلسیم در ساختار کپسول می‌شود (Chavarri *et al*., 2010). تاکنون تحقیقی مبنی بر تلقیح *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده با پوشش کیتوزان در کرم مغزی کیک بر پایه آب گزارش نشده است. مهمترین عاملی که مانع رشد پروبیوتیک‌ها در کرم مغزی می‌شود، فعالیت آبی پایین کرم مغزی می‌باشد. از این رو در این پژوهش به منظور افزایش زنده مانی پروبیوتیک‌ها در کرم مغزی، از فرآیند ریزپوشانی با پوشش کیتوزان استفاده شد. در این پژوهش *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به صورت ریزپوشانی شده و آزاد، به داخل کرم مغزی کیک تلقیح شد. سپس کرم مغزی کیک حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، به داخل کیک‌هایی که از قبل پخته شده و به دمای محیط رسیده‌اند، تزریق شدند و زنده مانی آن‌ها در طول ۳۰ روز نگهداری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

- آماده‌سازی میکروارگانیسم‌ها

بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (ATCC 29521 *Bifidobacterium bifidum*) به صورت خالص و لیوفیلیزه از کلکسیون سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری و در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع (Merck Germany) در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت فعال شد. سپس نمونه حاصل در

jftn.srbiau.ac.ir

۹۵ میلی لیتر محیط کشت MRS مایع تلقیح شد و تحت شرایط فوق تکثیر گردید. بیومس حاصله بوسیله سانتریفیوژ ۱۵۰۰g برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ ^{o}C جداسازی شده و در دو مرحله با محلول استریل ۰/۱ درصد آب پپتونه شسته شد. .شرایط بی‌هوازی برای *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، با استفاده از جار بی‌هوازی و سیستم گاز پک فراهم شد. (Brinques and Ayub, 2011).

- ریزپوشانی پروبیوتیک ها

ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با استفاده از روش امولسیون، انجام پذیرفت (Sultana *et al*., 2000). بدین صورت که ابتدا ۳ گرم آلژینات سدیم (Sigma- Aldrich 71238) به آرامی به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گشت تا کاملا حل شد و سپس دراتوکلاو استریل گشت، پس از آن که محلول با محیط هم دما شد، محلول آلژینات با سوسپانسیون میکروبی به مدت ۵ دقیقه مخلوط شد. برای تشکیل امولسیون، مخلوط حاصله به ۵۰۰ میلی‌لیتر روغن ذرت حاوی ۰/۲٪ امولسیفایر توئین ۸۰ (Merck Germany) ریخته شد و با استفاده از همزن مغناطیسی با سرعت (۳۵۰ rpm) به مدت ۲۰ دقیقه پراکنده گشت تا اینکه امولسیون یکنواختی تشکیل شد، به منظور تشکیل کپسول ها، به محلول مورد نظر، کلرید کلسیم ۰/۱ مولار اضافه گشت، پس از ۳۰ دقیقه که کپسول‌ها ته‌نشین شدند، به منظور جداسازی کپسول‌ها، از دکانتور و سانتریفیوژ با دور ۳۵۰ g استفاده شد، سپس کپسول‌های جدا شده با محلول آب مقطر شسته شده و در دمای ۴ ^{o}C نگهداری شدند.

- پوشش دادن کپسول ها با کیتوزان

۰/۴ گرم کیتوزان با وزن مولکولی پایین (Sigma-Aldrich 448869) در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و با گلیسیال استیک اسید به غلظت نهایی ۰/۴٪ w/v رسید. سپس pH محلول بوسیله افزودن سدیم هیدروکسید به ۶ رسانده شد. مخلوط حاصله بوسیله کاغذ واتمن صاف شده، و در اتوکلاو (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه) استریل گشت. کپسول‌های آلژینات کلسیم ساخته شده در مرحله قبل (۱۵ گرم) در این محلول پراکنده شده و با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱ ساعت هم زده شد تا عملیات پوشش دهی به طور کامل صورت گیرد، سپس کپسول‌های پوشش داده شده با کیتوزان توسط سانتریفیوژ با دور ۳۵۰ g جدا شدند، و نهایتاً با سرم فیزیولوژی شسته شده و در محلول ۰/۱ درصد پپتون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Krasaekoopt *et al*., 2006).

- شمارش باکتری‌های به دام افتاده در کپسول ها

برای شمارش باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها، ۱ گرم از کپسول‌های تهیه شده را با ۹ میلی‌لیتر محلول استریل بافر سیترات سدیم (۰/۱M و pH=۶/۳) پراکنده کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد تا کپسول‌ها به طور کامل حل و باکتری‌ها در محلول استریل بافر، آزاد شوند. سپس با استفاده از محیط جامد MRS آگار، باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، گرم خانه‌گذاری شد (Sultana *et al*., 2000). برای شمارش تعداد باکتری‌ها در کرم مغزی کیک، ۱۰ گرم از کرم کیک را با ۹۰ میلی لیتر محلول استریل بافر سیترات سدیم (۰/۱M و pH=۶/۳) پراکنده کرده و به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از دستگاه استومکر (Funk Gerber Germany) هم زده شد، سپس مطابق روش ذکر شده شمارش باکتری‌ها صورت گرفت (Krasaekoopt *et al*., 2006).

- تعیین اندازه و شکل ظاهری کپسول‌ها

اندازه کپسول‌های تشکیل شده، بوسیله دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر صورت گرفت (MASTER SIZER, UK). بدین منظور کپسول‌ها در آب یون‌زدایی شده پراکنده شدند و بعد از کالیبره کردن دستگاه با آب یون زدایی شده، ۲ میلی‌لیتر از محلول حاوی میکروکپسول‌ها به دستگاه اضافه گشت و نتایج بر اساس قطر حجم میانگین کپسول‌ها گزارش شد. شکل ظاهری کپسول‌ها با میکروسکوپ الکترونی (XL30, Royal Philips Netherlands) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور کپسول‌ها، بوسیله چسب دو طرفه بر روی لام دستگاه، تثبیت و به مدت ۱ ساعت، بوسیله طلا و پالادیم پوشش داده شدند. مشاهده کپسول‌ها بوسیله میکروسکوپ الکترونی با تابش الکترونی ۱۵ کیلووات انجام گرفت (Mokarram *et al*., 2009).

jfn.srbiau.ac.ir

- تهیه کرم مغزی کیک بر پایه آب

کرم مغزی کیک بر پایه آب با استفاده از این مواد تهیه شد: شکر (۳۳ ٪)، نشاسته ذرت (۶ ٪)، شیر خشک بدون چربی (۵٪)، شربت گلوکز (۹/۴ ٪)، سوربیتول (۶ ٪)، گلیسرین (۷ ٪)، شربت اینورت (۱۶ ٪)، آب (۱۷٪)، نمک (۰/۳٪) و اسانس وانیل(۰/۳٪). سپس در دمای ^{o}C ۲۵ پروبیوتیک‌ها به طور جداگانه، در ۳ حالت مختلف: آزاد، ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و پوشش کیتوزان، به داخل کرم مغزی کیک بر پایه آب تلقیح شدند به طوری که در هر گرم از کرم مغزی 5×10^{11} cfu باکتری وجود داشت. سپس کرم مغزی به وسیله سرنگ استریل به داخل کیک‌های اسفنجی که از قبل پخته شده و با محیط هم دما شده‌اند، تزریق شد. در نهایت کیک‌ها بسته‌بندی و در دو دمای مختلف ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. لازم به ذکر است، بررسی ماندگاری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به منظور بررسی متغیر دمای نگهداری و ارزیابی اثر دما بر روی زنده مانی پروبیوتیک‌ها است. تغییرات pH کرم مغزی در زمان های صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز نگهداری کرم مغزی کیک مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۴۷۰۱ بوسیله دستگاه pH متر(pH meter Weilheim Germany) اندازه‌گیری شد. a_w کرم مغزی نیز بوسیله دستگاه (Novasina Axair AG Switzerland) اندازه‌گیری شد (Aragon-Alegro *et al*., 2007).

- ارزیابی حسی

برای ارزیابی حسی یک پانل شامل ۱۰ نفر از افراد آموزش دیده، نمونه کیک‌های حاوی کرم مغزی را به صورت مجزا در دمای اتاق ارزیابی کردند. ارزیابی حسی با استفاده از یک سری خصوصیات مهم کرم مغزی از قبیل طعم، رنگ، بافت و پذیرش کلی سنجیده شد و امتیازها از ۱ تا ۹ براساس نمره دهی هدونیک صورت پذیرفت، به طوری که امتیاز ۹ برای بهترین حالت و امتیاز ۱ برای بدترین آن در نظر گرفته شد (Kailasapathy, 2006).

- تجزیه و تحلیل آماری

طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام پذیرفت. مقایسه بین نتایج بدست آمده بوسیله آزمون‌های آماری چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت. ارزیابی حسی نیز با استفاده از آزمون ناپارامتری فریدمن توسط نرم افزار ذکر شده انجام شد.

یافته‌ها

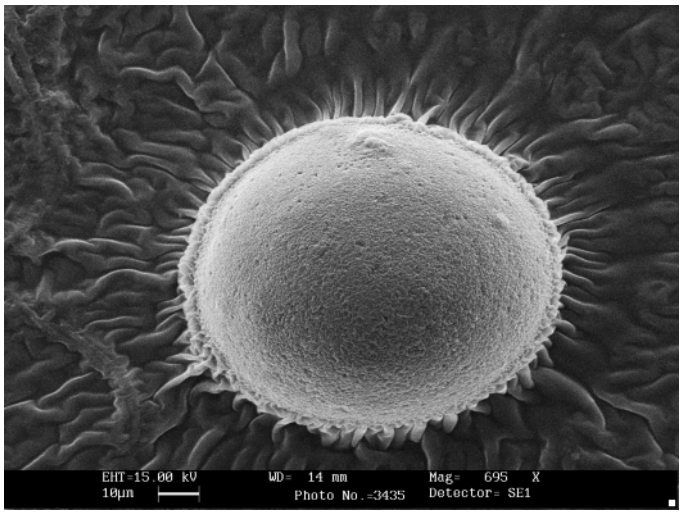
- شکل و اندازه کپسول ها

مشاهدات حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان داد (شکل‌های ۱ و ۲) که کپسول‌های تشکیل شده، همگی کروی و یکنواخت هستند. کپسول‌های آلژینات کلسیم دارای سطحی صاف و یکنواختند، هم چنین حضور لایه کیتوزان را می‌توان در سطح کپسول‌ها در شکل ۲ مشاهده کرد که منجر به افزایش قطر کپسول‌ها و تغییر در سطح آن‌ها شده است. در تصاویر میکروسکوپ الکترونی، لایه کیتوزان، سطحی یکدست و یکنواخت را در کپسول‌ها ایجاد کرده است (شکل ۲). اندازه و نحوه پراکنش ذرات مختلف، با استفاده از دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر محاسبه شد. نتایج حاکی از آن بود که پوشش کیتوزان منجر به افزایش قطر کپسول‌ها شده است. در این روش قطرحجم میانگین کپسول‌ها برای آلژینات کلسیم ۱/۱۹±۱۲۱ میکرومتر بود. در حالی قطرحجم میانگین محاسبه شده برای کپسول‌های دارای پوشش کیتوزان، ۲/۱۳± ۲۲۳ میکرومتر بود.

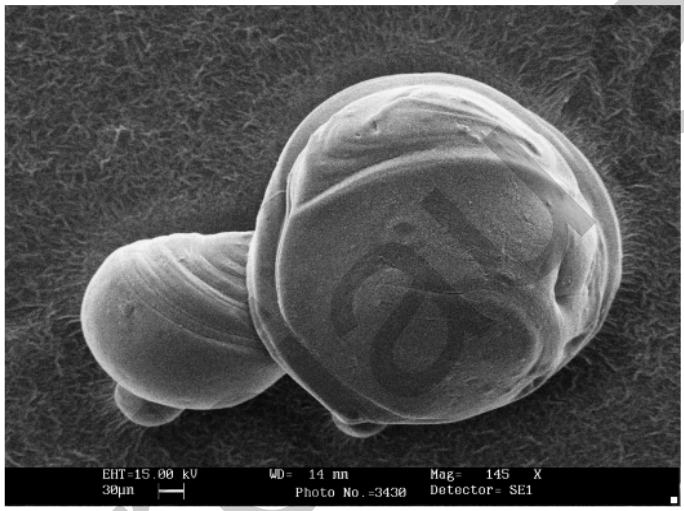
- تغییرات pH کرم مغزی برپایه آب در طول نگهداری

در جدول ۱، تغییرات pH نمونه‌های شاهد و باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده، در طول مدت ۳۰ روز نگهداری نشان داده شده است. pH نمونه‌های شاهد کرم مغزی، بدون تغییر در طول نگهداری ملاحظه شده است. اما برای *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* آزاد، پس از ۳۰ روز نگهداری pH به ۵/۷ رسید، در حالی که در تمامی نمونه‌های حاوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده تغییر pH به طور معنی‌داری رخ نداد ($P > ۰/۰۵$). هم چنین تغییری در pH نمونه‌های که در آن‌ها از کیتوزان برای تشکیل کپسول استفاده شده است، صورت نگرفت. هم چنین نتایج حاکی از آن بود که دمای نگهداری نیز تاثیر معنی‌داری بر تغییرات pH کرم مغزی نداشت ($P > ۰/۰۵$).

jftn.srbiau.ac.ir



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی کپسول آلژینات کلسیم



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی کپسول‌های آلژینات کلسیم با پوشش کیتوزان

جدول ۱- تغییرات pH کرم مغزی بر پایه آب در طول ۳۰ روز نگهداری

جنس کپسول	زمان (روز)			
	۰	۱۰	۲۰	۳۰
شاهد[*(a)]	۶±۰/۱	۶±۰/۱	۶±۰/۱	۶±۰/۱
آزاد[*(b)]	۶±۰/۱	۵/۸±۰/۱	۵/۷۴±۰/۱	۵/۷±۰/۱
آلژینات کلسیم[*(a)]	۶±۰/۱	۶±۰/۱	۶±۰/۱	۶±۰/۱
آلژینات کلسیم با پوشش کیتوزان[*(a)]	۶±۰/۱	۶±۰/۱	۶±۰/۱	۶±۰/۱

اعداد جدول میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند.

* سطوحی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون دانکن در سطح ($P < ۰/۰۵$) با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند.

- زنده مانی پروبیوتیک‌های آزاد و ریزپوشانی شده در کرم مغزی برپایه آب

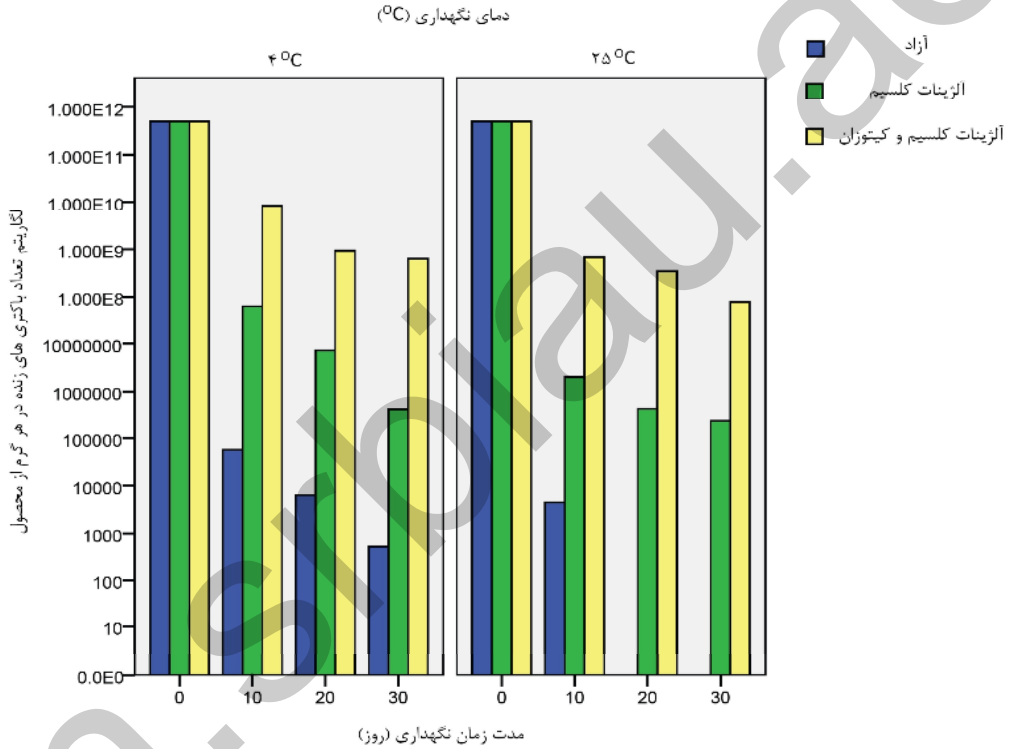
با مقایسه نتایج حاصل از زنده مانی باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در طول ۳۰ روز نگهداری در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در کرم مغزی کیک برپایه آب (نمودار۱)، باکتری‌های آزاد در طول مدت نگهداری کاهش بیشتری نسبت به نمونه‌های ریزپوشانی شده داشتند ($P < ۰/۰۵$) به طوری که بیفیدوباکتریوم‌های آزاد در دمای

jftn.srbiau.ac.ir

۲۵ درجه سانتی‌گراد در روزهای ۲۰ و ۳۰ کاملا نابود شدند. اما در نمونه‌های ریزپوشانی شده، بیشترین زنده مانی مربوط به کپسول‌های دارای پوشش کیتوزان بود، که تعداد بیفیدوباکتریوم‌ها تنها ۳ سیکل لگاریتمی کاهش در طول ۳۰ روز نگهداری داشت. نمونه‌های حاوی پوشش کیتوزان در مقایسه با سایر نمونه‌ها زنده مانی را چندین سیکل لگاریتمی بهبود بخشید. با مقایسه دماهای مختلف در طول نگهداری، نتایج نشان داد که دمای نگهداری $4^{o}C$ تاثیر معنی‌داری بر افزایش زنده مانی در بیفیدوباکتریوم‌ها مورد آزمایش داشت ($P<0/05$). بررسی ماندگاری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت بررسی متغیر دمای نگهداری و ارزیابی اثر دما بر روی زنده مانی پروبیوتیک‌ها است. به علاوه، نتایج نشان داد که پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده، دردمای نگهداری $4^{o}C$، به زمان طولانی‌تری برای کاهش یک سیکل لگاریتمی نیاز دارند (نمودار ۱).

- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی کیک‌های حاوی کرم مغزی در طول نگهداری در جدول ۲ نمایش داده شده است، نتایج نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در طعم، رنگ و بافت کرم مغزی حاصل نشده است ($P>0/05$).



نمودار ۱- زنده مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* آزاد و ریزپوشانی شده، در مدت ۳۰ روز نگهداری در دماهای ۲۵ و ٤ درجه سانتی‌گراد، در کرم مغزی بر پایه آب

جدول ۲- ارزیابی حسی کیک‌های حاوی کرم مغزی برپایه آب

نوع نمونه	نوع کپسول	طعم	رنگ	بافت	پذیرش کلی
شاهد (بدون باکتری)	شاهد (بدون باکتری)	۸/۵۳	۸/۴۷	۸/۱۵	۸/۳۸
حاوی باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*	آزاد	۸/۵۷	۸/۶	۸/۲۱	۸/۱
	آلژینات کلسیم	۸/۴۹	۸/۴۳	۸/۱۱	۸/۳۲
	آلژینات کلسیم و کیتوزان	۸/۵۹	۸/۴۲	۸/۱۲	۸/۱

jftn.srbiau.ac.ir

بحث

شکل و اندازه کپسول‌ها: مطابق تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی (شکل‌های ۱ و ۲)، نوع مواد به کار رفته در تشکیل کپسول‌ها روی خصوصیات ظاهری و شکل کپسول‌ها تاثیرگذار بودند. کپسول‌های آلژینات کلسیم دارای سطحی صاف، و از لحاظ شکل، کروی هستند. هم چنین حضور پوشش کیتوزان در سطح کپسول‌ها در شکل ۲ منجر به تغییر در سطح و شکل ظاهری کپسول‌ها شده است. به منظور بررسی اندازه کپسول‌های تشکیل شده به روش امولسیون از دستگاه پارتیکل سایز آنالایز استفاده شد. میانگین قطر کپسول‌های اندازه‌گیری شده با پوشش کیتوزان ۲۲۳ میکرون محاسبه شد. این امر نشان می‌دهد که کیتوزان علاوه بر خاصیت پوشش دهندگی و استحکام بخشیدن ساختار کپسول‌ها، منجر به افزایش قطر کپسول‌ها نیز می‌شود. کیتوزان با ساختار چند کاتیونی خود، به کپسول‌های آلژینات کلسیم که بار منفی دارند متصل شده و لایه محافظی در برابر عوامل نامساعد محیطی ایجاد می‌کند و باعث افزایش قطر کپسول‌ها نیز می‌شود (Krasaekoopt *et al*., 2006). قطر کپسول‌های بدست آمده در این پژوهش، هم برای کپسول‌های بدون پوشش و هم برای کپسول‌های دارای پوشش کیتوزان در حد میکرون بود. در ریزپوشانی به روش امولسیون می‌توان به کپسول‌هایی در حد میکرون دست یافت، در حالی که اندازه کپسول‌ها در روش‌های متعارف ریزپوشانی نظیر اکستروژن و خشک کردن پاششی، بزرگتر و در برخی موارد در حد میلی‌متر هستند (Larisch *et al*., 1994). گزارش شده است که کپسول‌های بزرگتر از ۱ میلی‌متر نیز موجب خشن شدن بافت مواد غذایی می‌شود (Truelstrup *et al*., 2002).

تغییرات pH کرم مغزی کیک در طول نگهداری: روند تغییرات pH نشان داد (مطابق جدول۱)، در تمامی نمونه‌های حاوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده تغییر pH رخ نداده است ($P > ۰/۰۵$). اما در نمونه‌های حاوی *بیفیدو باکتریوم بیفیدوم* آزاد پس از ۳۰ روز نگهداری pH به ۵/۷ رسید، این امر ممکن است به دلیل کندی در جذب مواد مغذی و هم چنین کاهش آزاد سازی متابولیت‌ها از طریق پوشش کپسول‌ها باشد (Homayouni *et al*., 2009; Sultana *et al*., 2000). زیرا در اثر فرآیند ریزپوشانی، کپسول‌ها، سرعت انتقال و فعالیت‌های متابولیکی پروبیوتیک‌ها را کاهش می‌دهند، در نتیجه کاهش pH محیط، توسط باکتری‌ها، در مدت زمان طولانی‌تری نسبت به نوع آزاد صورت می‌گیرد (Sultana *et al*., 2000). حضور لایه کیتوزان در اطراف کپسول‌ها باعث شده است که تغییرات pH در طول مدت نگهداری به حداقل برسد و به دلیل کندی در جذب مواد مغذی و هم چنین آزادسازی متابولیت‌ها از طریق پوشش ایجاد شده، تاثیری موثری بر کاهش سرعت انتقال و فعالیت‌های متابولیکی پروبیوتیک‌ها داشته باشد (Krasaekoopt *et al*., 2006). از آنجایی که بیفیدوباکتریوم‌ها در مقایسه با سایر لاکتوباسیلوس‌ها توانایی کمتری در تولید اسید و کاهش pH دارند. هم چنین گزارش شده است که یکی از عوامل موثر در فعالیت متابولیکی باکتری‌های ریزپوشانی شده در محصولات، اندازه لایه آلژینات است، هر چه لایه‌های به کار رفته در تشکیل کپسول‌ها بیشتر باشد روند اسیدی شدن کاهش می یابد (Larisch *et al*., 1994).

زنده مانی پروبیوتیک‌ها در کرم‌مغزی: پروبیوتیک‌ها در بیشتر فرآورده‌های غیر لبنی، رشد و تکثیر محسوس ندارند که این امر می‌تواند به علت مغذی نبودن محیط پایه این فرآورده‌ها و هم چنین عدم وجود فرآیند تخمیر در این نوع محصولات و پایین بودن فعالیت آبی آن‌ها باشد (Weinbreck *et al*., 2010; Fahimdanesh *et al*., 2012). از آنجایی که در این پژوهش از کرم مغزی بر پایه آب به عنوان بستری برای بیفیدوباکتریوم ها استفاده شده است، زنده مانی پروبیوتیک‌ها می‌تواند به علت فعالیت آبی مناسب‌تر نسبت به کرم‌های مغزی روغنی بهبود یابد. فعالیت آبی کرم مغزی بر پایه آب در حدود ۰/۷۸ اندازه‌گیری شد. از آنجایی که *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* یک باکتری بی‌هوازی مطلق است، شرایط نامساعد نگهداری، دمای بالا، فعالیت آبی پایین و حضور اکسیژن در بافت محصول می‌تواند منجر به کاهش بیشتر آن در طول مدت نگهداری شود (Krasaekoopt *et al*., 2004). مطابق نمودار ۱، حضور کیتوزان در ساختار کپسول‌ها منجر به افزایش بقای پروبیوتیک‌ها شد و درنتیجه پوشش کیتوزان به طور معنی‌داری منجر به ارتقای سطح زنده مانی

jfn.srbiau.ac.ir

پروبیوتیک‌ها گردید ($P <$ ۰/۰۵). گزارش شده است که پوشش کیتوزان اطراف کپسول‌های آلژینات کلسیم باعث افزیش بقای پروبیوتیک‌ها در شرایط اسیدی معده و شرایط قلیایی ابتدای روده می‌شود، نتایج این محققان نشان داد که باکتری ریزپوشانی شده با پوشش کیتوزان هیچ کاهشی در شرایط اسیدی معده در مدت ۱ ساعت نداشتند (Chavarri *et al*., 2010). هم چنین برخی محققان گزارش کردند، زنده مانی پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده با پوشش کیتوزان، در حدود یک سیکل لگاریتمی بالاتر از سلول های بدون پوشش کیتوزان است و تعداد باکتری‌ها به جز *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بالاتر از 10^7 CFU/g درطی نگهداری گزارش شد. هم چنین این محققان گزارش کردند که پوشش کیتوزان منجر به افزایش بقای بیفیدوباکتریوم‌ها نسبت به نمونه‌های بدون پوشش کیتوزان می‌شود (Krasaekoopt *et al*., 2006). گزارش شده است هر چه اندازه کپسول‌های تشکیل شده بیشتر باشد، پروبیوتیک‌ها به دلیل استفاده از فعالیت آبی کافی در داخل کپسول‌ها، از زنده مانی بیشتری در شرایط مختلف محیطی برخوردار هستند (Possemiers *et al*., 2010). هم چنین برخی محققان اظهار داشتند، تشکیل لایه‌های محافظ (نظیر کیتوزان) بر روی کپسول‌های آلژینات کلسیم، سبب تاخیر در نفوذ شیره معده به کپسول‌ها و در نتیجه سبب افزایش قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها می‌شود (Anal and Singh, 2007). تاثیر دمای نگهداری بر زنده مانی پروبیوتیک‌ها معنی‌دار بود ($P <$ ۰/۰۵). دمای نگهداری یک فاکتور موثر در مرگ سلولی است. نگهداری در دمای بالا، باعث کاهش تعداد پروبیوتیک‌ها می‌شود (Nebesny *et al*., 2006). به همین دلیل کاهش دمای نگهداری منجر به افزایش بقای پروبیوتیک‌ها در طی مدت نگهداری در کرم مغزی بر پایه آب شده است. به علاوه، این تحقیق نشان داد که سلول‌های ریزپوشانی شده، در دمای نگهداری ۴°C، به زمان طولانی تری برای کاهش یک سیکل لگاریتمی یاز دارند اما سلول‌های آزاد، کاهش ناگهانی شدیدی در سیکل لگاریتمی خود داشته‌اند (نمودار ۱). گزارش شده است که زنده مانی لاکتوباسیلوس پارا کازئی در شکلات سیاه با کاهش دما افزایش یافته است (Nebesny *et al*., 2006).

ارزیابی حسی: مطابق ارزیابی حسی کیک‌های حاوی کرم مغزی در جدول۲، افزوده شدن *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به صورت آزاد و ریزپوشانی شده تاثیری بر روی خصوصیات حسی کرم مغزی در سطح معنی‌داری نداشت ($P>$ ۰/۰۵). علت این امر را می‌توان به کوچک بودن اندازه کپسول‌های تشکیل شده به روش امولسیون مربوط دانست (Larisch *et al*., 1994). در پژوهش‌های مشابه که از روش امولسیون برای تشکیل میکروکپسول‌ها استفاده شده است نیز تاثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های حسی محصولات مختلفی همچون بستنی (Homayouni *et al*., 2009) پنیر (Mirzaei *et al*., 2012) شکلات (Possemiers *et al*., 2010)، شیر (Truelstrup *et al*., 2002) و سوسیس (Muthukumarasamy and Holley, 2006) مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که ریزپوشانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با پوشش کیتوزان می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای زنده مانی آن‌ها را در کرم مغزی کیک بهبود ببخشد، به طوری که زنده مانی تعداد باکتری‌های ریزپوشانی‌شده پس از ۳۰ روز نگهداری درحد استانداردهای جهانی بود. در این مطالعه با تلقیح باکتری‌های پروبیوتیک به کرم‌مغزی و تلقیح کرم مغزی به داخل کیک، پروبیوتیک‌ها تحت هیچ فرآیند دمایی و حرارتی قرار نگرفتند. این پژوهش هم چنین نشان می‌دهد، محصولاتی بر پایه غیرلبنی همانند کرم مغزی، با استفاده از فرآیند ریزپوشانی می‌توانند بستر مناسبی برای پروبیوتیک‌ها باشند.

سپاسگزاری

از مسئولان و کارکنان محترم مجتمع آزمایشگاه رازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، برای همکاری در انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع

بی نام. (۱۳۸۶). موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. کرم‌های کاکائویی، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. چاپ اول. شماره ۴۷۰۱.

jftn.srbiau.ac.ir

Adams, M. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. Journal of Biotechnology, 68(2–3), 171-178.

Allan-Wojtas, P., Truelstrup Hansen, L. & Paulson, A. T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. LWT - Food Science and Technology, 41(1), 101-108.

Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, A. & Rosell, C. M. (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. Food Hydrocolloids, 29(1), 166-174.

Anal, A. K. & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science & Technology, 18(5), 240-251.

Aragon-Alegro, L. C., Alarcon Alegro, J. H., Roberta Cardarelli, H., Chih Chiu, M. & Isay Saad, S. M. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. LWT - Food Science and Technology, 40(4), 669-675.

Brinques, G. B. & Ayub, M. A. Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of Lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. Journal of Food Engineering, 103(2), 123-128.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F. & Villarán, M. d. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. International Journal of Food Microbiology, 142(1–2), 185-189.

Dave, R. I. & Shah, N. P. (1996). Evaluation of media for selective enumeration of Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, and bifidobacteria. Journal of Dairy Science, 79(9), 1529-1536.

Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products, Food Microbiology, 27, 1–11.

Fahimdanesh, M., Mohammadi, N., Ahari, H., Zanjani, M. A. K., Hargalani, F. Z. & Behrouznasab, K. (2012). Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of Lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum in mayonnaise sauce. African Journal of Microbiology Research, *6*(40), 6853-6858.

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S. & Razavi, S. H. (2009). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chemistry, 111(1), 50-55.

Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT - Food Science and Technology, 39(10), 1221-1227.

Khalil, A. H. & Mansour, E. H. (1998). Alginate Encapsulated Bifidobacteria Survival in Mayonnaise. Journal of Food Science, 63(4), 702-705.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. C. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. LWT - Food Science and Technology, 39(2), 177-183.

Larisch, B. C., Poncelet, D., Champagne, C. P. & Neufeld, R. J. (1994). Microencapsulation of Lactococcus lactis subsp. cremoris. Journal of Microencapsulation, 11(2), 189-195.

Mandal, S., Puniya, A. K. & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated Lactobacillus casei NCDC-298. International Dairy Journal, 16(10), 1190-1195.

Mirzaei, H., Pourjafar, H. & Homayouni, A. (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of Lactobacillus acidophilus La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. Food Chemistry, 132(4), 1966-1970.

Mohammadi, N., Ahari, H., Fahimdanesh, M., Zanjani, M. A. K., Anvar, A. & Shokri, E. (2012). Survival of alginate-prebiotic microencapsulated Lactobacillus acidophilus in mayonnaise sauce. Iranian Journal of Veterinary Medicine, *6*(4), 259-264.

Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Najafi, M. B. H. & Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. Food Research International, 42(8), 1040-1045.

itn.srbiau.ac.ir

Muthukumarasamy, P. & Holley, R. A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated Lactobacillus reuteri. International Journal of Food Microbiology, 111(2), 164-169.

Nebesny, E., elewicz, D., Motyl, I. & Libudzisz, Z. (2006). Dark chocolates supplemented with Lactobacillus strains. European Food Research and Technology A, 225(1), 33-42.

Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W. & Van de Wiele, T. (2010). Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. International Journal of Food Microbiology, 141(1–2), 97-103.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Journal of Food Microbiology, 62(1–2), 47-55.

Truelstrup, L. H., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L. & Paulson, A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiology, 19(1), 35-45.

Weinbreck, F., Bodnár, I. & Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products. International Journal of Food Microbiology, 136(3), 364-367.

Zanjani, M. A. K., Tarzi, B. G., Sharifan, A., Mohammadi, N., Bakhoda, H. & Madanipour, M. M. (2012). Microencapsulation of Lactobacillus casei with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. African Journal of Microbiology Research, *6*(26), 5511-5517.

jftn.srbiau.ac.ir