

اثر ریزپوشانی و فیبر بر قابلیت زنده ماندن دانه‌های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC1644 در شرایط شبیه سازی شده معده و یخچال

سمیه سیف زاده¹، محمد علی نجفی²، ناصر سلطانی تهرانی³

1- دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران
2- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران. پست الکترونیکی: Najafi413@yahoo.com
3- مربی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

تاریخ پذیرش: 97/1/25

تاریخ دریافت: 96/10/15

چکیده

سابقه و هدف: پروبیوتیک‌ها در بدن میزبان اثرات سلامت بخش دارند. حساسیت پروبیوتیک‌ها نسبت به شرایط نامناسب محیطی چالش کلیدی کاربرد آنهاست. هدف از این تحقیق بررسی فرآیند تثبیت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 و ریزپوشانی بر قابلیت زنده ماندن در برابر شرایط نگهداری سرد و معده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سوسپانسیون بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 در دو حالت تثبیت شده بر روی فیبر گندم و آزاد تهیه شدند. سپس با استفاده از زیست بسپارهای پکتین، ایزوله پروتئین آب پنیر، و ایزوله پروتئین آب پنیر + پکتین ریزپوشانی و به روش انجمادی خشک شدند. دانه‌های به دست آمده به لحاظ کارایی ریزپوشانی (%، نرخ زنده ماندن (% در برابر شرایط شبیه سازی شده معده و نگهداری سرد، و خصوصیات مورفولوژیکی به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شدند.

یافته‌ها: فرآیند ریزپوشانی باعث افزایش مقاومت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC1644 در مقایسه با نمونه کنترل (سلول آزاد) در برابر شرایط نگهداری سرد و معده گردید. بیشترین کارایی ریزپوشانی و قابلیت زنده ماندن در برابر شرایط نگهداری سرد و معده در تیمار ایزوله پروتئین آب پنیر + پکتین در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد. فرایند تثبیت سلولی باعث کاهش کارایی ریزپوشانی و نرخ زنده ماندن در برابر شرایط محیطی و معده در مقایسه با تیمارها مشابه و بدون فرایند تثبیت شد. داده‌های به دست در قالب طرح کاملاً تصادفی و به کمک آزمون فاکتوریل در سطح 5% تجزیه و تحلیل شدند.

نتیجه‌گیری: ریزپوشانی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم توسط ایزوله پروتئین آب پنیر + پکتین می‌تواند راهکار مناسبی جهت تهیه و نگهداری سلول‌ها باشد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، ریزپوشانی، ایزوله پروتئین آب پنیر، صمغ پکتین

• مقدمه

ترکیبات سرطان‌زا می‌شوند (4). چالش اساسی بکارگیری پروبیوتیک حساسیت نسبت به شرایط محیطی و عبور زنده از شرایط اسیدی دستگاه گوارش است (5). در این خصوص ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها به عنوان راه حل مؤثر مورد توجه قرار گرفته است (6، 1). ایزوله پروتئین آب پنیر از جمله رایج‌ترین زیست بسپارها است که با دارا بودن مقادیر بالای بتا-لاکتوگلوبولین (β -Lactoglobulin) از ویژگی ژل‌دهی و پوشش‌دهی مناسبی در فرآیند ریزپوشانی برخوردار است. خصوصیات فیریکوشیمیایی هیدروژل پروتئین آب پنیر

در سال‌های اخیر تمایل به مصرف غذاهای فراسودمند حاوی پروبیوتیک‌ها گسترش یافته است (1). پروبیوتیک‌ها باعث حفظ میکروفلور طبیعی روده، ارتقاء سیستم ایمنی بدن، بهبود بیماران مبتلا به عدم تحمل لاکتوز، کاهش سطح کلسترول خون و خواص ضد سرطان‌زایی در میزبان می‌شوند (2). سویه‌های بیفیدوباکتریوم از جمله مهم‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک هستند که به طور طبیعی در فلور روده بزرگ انسان دیده می‌شوند (3). محققان حدس می‌زنند بیفیدوباکتریوم‌ها با کاهش pH روده بزرگ میزبان باعث مهار

درجه سانتی گراد، 120 rpm) منتقل شد. سپس مقدار 100 میکرولیتر از سوسپانسیون میکربی به محیط کشت جامد فوق‌الذکر منتقل و پس از گرمخانه گذاری (72 ساعت، 37 درجه سانتی گراد) کلنی خالص به محیط کشت مایع منتقل و مجدداً گرمخانه گذاری (24 ساعت، 37 درجه سانتی گراد، 120 rpm) شد. جهت تثبیت سلولی مقدار 5 میلی لیتر از کشت به دست آمده به همراه فیبر گندم در نسبت 1:1 (بسیار: فیبر) به 45 میلی لیتر محیط کشت استریل اضافه و مجدداً گرمخانه گذاری (24 ساعت، 37 درجه سانتی گراد، 200 rpm) شد (8). در تیمارهای بدون تثبیت سلولی، از کشت میکربی 24 ساعته استفاده شد. برداشت سلولی به کمک دستگاه سانتریفوژ (Eppendorf 5810، آلمان) با سرعت 3500g به مدت 15 دقیقه انجام و سپس دو مرحله شستشو با محلول پیتون (0/1 درصد) استریل انجام گردید (10). منحنی رشد جمعیت به روش رقیق سازی سریالی - پورپلیت و جذب سنجی در طول موج 620 نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر (Cecil، انگلستان) رسم شد.

تهیه دانک: محلول سازنده دانک ایزوله پروتئین آب پنیر طبق روش Tellioglu Harsa Çabuk (2015) (11) با اندکی تغییرات تهیه شد. بدین منظور ابتدا محلول 9 درصد ایزوله پروتئین آب پنیر تهیه و جهت دناتوراسیون پروتئینی، برای مدت 30 دقیقه در دمای 80 درجه سانتی گراد گرم و پس از آن تا دمای محیط سرد شد. جهت تهیه محلول سازنده جداره پکتین، ابتدا محلول 2 درصد پکتین در آب مقطر استریل تهیه و پس از پاستوریزاسیون (در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه) فوراً در آب یخ سرد گردید (12). برای تهیه محلول جداره حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر + پکتین (WPI + Pec)، ابتدا محلول پکتین (2 درصد) با محلول ایزوله پروتئین آب پنیر (9 درصد) به نسبت 1:1 مخلوط و سپس به کمک همزن (Heidolph، آلمان) در سرعت 2000 rpm برای مدت 30 دقیقه همگن شد. دانک‌ها با تکنیک امولسیفیکاسیون/ژل سازی با کمی تغییر طبق روش Nualkaekul و همکاران تهیه شدند (12). بدین منظور 1 میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده از کشت 24 ساعته بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 حاوی $10^8 \log \text{Cfu/g}$ با $1/5 \times 10^8$ با 9 میلی لیتر از هر کدام از محلول‌های سازنده دانک در شرایط استریل مخلوط (200 rpm، 30 دقیقه) شدند. به سوسپانسیون به دست آمده، امولسیفایر توئین 80 (1 درصد) و روغن آفتاب گردان به نسبت 1:1/15 (سوسپانسیون: روغن) اضافه و مخلوط (2000rpm به مدت 30 دقیقه) شدند تا امولسیون یکنواخت (w/o) تشکیل گردد. سپس به کمک سرنگ استریل به آرامی به محلول

منحصر بفرد بوده و با ایجاد شبکه سه بعدی در اطراف ذرات، نقش مؤثری در رهاسازی کنترل شده دارد (7). امروزه استفاده از روش تثبیت سلولی بر روی فیبرخام همراه با فرآیند ریزپوشانی جهت افزایش کارایی ریزپوشانی و مقاومت سلول در برابر شرایط نامساعد محیطی مورد توجه قرار گرفته است. Shaharuddin و Muhamad (8) تأثیر فیبر باگاس نیشکر بر فرآیند ریزپوشانی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*) را بررسی و گزارش نمودند افزودن فیبر در نسبت 1:1 (فیبر: آلزینات سدیم) باعث افزایش کارایی ریزپوشانی شده است. Chitprasert و همکاران (9) تأثیر فیبر سیوس برنج همراه با ترکیب کریوکسی متیل سلولز آلومینیوم (1:1، فیبر: پلیمر) را بر کارایی ریزپوشانی لاکتوباسیلوس روتری (*Lactobacillus reuteri*) بررسی و گزارش نمودند فرایند تثبیت باعث کاهش راندمان کارایی شده است. بررسی - های انجام شده نشان می‌دهد تاکنون تحقیقاتی در خصوص تأثیر فرآیند تثبیت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (*Bifidobacterium bifidum*) بر روی فیبر انجام نشده است. در این پژوهش هدف تهیه دانک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم برپایه ترکیبات پکتین، ایزوله پروتئین آب پنیر و نیز تثبیت سلولی بر روی فیبر گندم است بطوری که بتواند کارایی ریزپوشانی و قابلیت زنده مانی را در شرایط انبارداری سرد (30 روز، دمای 4 درجه سانتی گراد) و معده را بهبود بخشد.

• مواد و روش‌ها

مواد: پکتین، ایزوله پروتئین آب پنیر 80 درصد، ال سیستئین هیدروکلراید (L-Cysteine hydrochloride monohydrate) و سدیم تیوگلیکولات (Sodium thioglycollate) از شرکت سیگما آلدیج و فیبر رژیمی گندم، صمغ کتیرا و توئین 80 از شرکت تتراکم (Tetrakim) تهیه شدند. کلراید کلسیم دو آبه (Calcium chloride dihydrate)، محیط کشت MRS مایع (De Man, Rogosa and Sharpe)، اسید کلریدریک، کلرید سدیم، پپتون واتر، گلیسرول و هیدروکسید سدیم از شرکت مرک آلمان و روغن آفتاب گردان از سطح شهر و با برند تجاری اویلا تهیه گردیدند.

گونه باکتریایی و تکثیر: باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون کشت میکربی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. برای تکثیر، باکتری به محیط کشت مایع حاوی MRS + ال سیستئین هیدروکلراید (0/5 درصد) + سدیم تیوگلیکولات (0/2 درصد) + کلراید کلسیم دو آبه (0/1 درصد) تلقیح و در شرایط بی‌هوازی به داخل انکوباتور شیکردار (72 ساعت، 37

بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 بر روی چسب دوطرفه سلولزی منتقل و ذرات اضافی دفع شد. سپس دور نمونه را با چسب رسانای نقره ای پوشانده و تحت خلاء با لایه بسیار نازکی از آلیاژ طلا/پالادیوم در محیط پلاسمای آرگونی پوشش دهی و از بخش های مختلف تصویربرداری شد (16).

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: در این تحقیق جنس جداره دانک در 7 سطح شامل ریزپوشانی با محلول پکتین (Pec)، تثبیت سلولی و ریزپوشانی با محلول پکتین (Fib + Pec)، ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر (WPI)، تثبیت سلولی و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر (Fib + WPI)، ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر و پکتین (WPI + Pec)، و تثبیت سلولی و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر و پکتین (Fib + WPI + Pec) انتخاب شد. باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 آزاد خشک شده به روش انجمادی نیز به عنوان تیمار کنترل در نظر گرفته شد. در آزمون ارزیابی نرخ زندهمانی در شرایط سرد و شرایط معده به ترتیب مدت زمان نگهداری در 4 سطح (0، 10، 20 و 30 روز) و 5 سطح (0، 30، 60، 90 و 120 دقیقه) انتخاب شدند. کلیه آزمون ها سه بار تکرار و آنالیز آماری داده ها بر پایه آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و مقایسه میانگین داده ها به کمک آزمون دانکن در سطح اطمینان 95 درصد با استفاده از نرم افزار SAS نسخه 9/1 صورت پذیرفت.

• یافته ها

شکل 1 نتایج حاصل از تأثیر پوشش های مختلف بر کارایی ریزپوشانی باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 را نشان می دهد.

بررسی کارایی ریزپوشانی تیمارهای مختلف نشان دهنده تفاوت معنی دار آنها با یکدیگر است ($p < 0/05$). شکل 1 نشان می دهد استفاده ترکیبی پکتین و ایزوله پروتئین آب پنیر (52/01 - 55/60%) در مقایسه با کاربرد تنهایی ایزوله پروتئین آب پنیر (37/83 - 41/07%) و پکتین (30/51 - 34/96%)، باعث افزایش کارایی ریزپوشانی شده است. طوری که بیشترین کارایی ریزپوشانی در تیمارهای (55/60%) WPI + Pec دیده شد. همچنین نتایج به دست آمده نشان دادند فرآیند تثبیت سلولی باعث کاهش کارایی ریزپوشانی در مقایسه با تیمارهای بدون تثبیت سلولی با فرمول یکسان شد به طوری که کمترین کارایی ریزپوشانی در تیمار (30/51%) Fib+Pec دیده شد ($p < 0/05$).

CaCl₂ (0/1 مولار) افزوده شد. سوسپانسیون به دست آمده توسط همزن مغناطیسی همزده شده (160 rpm، مدت 30 دقیقه) تا دیواره استحکام یابد. سپس مجدداً توسط مخلوط کن (Eppendorf 5810، آلمان) در سرعت 1000 rpm برای مدت 1 در شرایط سرد (حمام یخ) برای مدت 1 ساعت همگن گردید (10). فاز روغنی نیز به کمک سانتریفیوژ با دور 300 g به مدت 5 دقیقه جداسازی گردید (13). دانک های رسوب یافته پس از دو مرتبه شستشو با آب مقطر استریل (14) به روش انجمادی (Armfield، انگلستان) خشک و تا زمان انجام آزمایشات درون کیسه های پلاستیکی استریل جداگانه، در دمای 4 درجه سانتی گراد (حداکثر 24 ساعت) نگهداری شدند.

کارایی ریزپوشانی: کارایی ریزپوشانی طبق روش Sandoval-Castilla و همکاران محاسبه گردید (15). بدین منظور مقدار 1 گرم دانک در محلول بافر فسفات (مولار 0/1، pH= 7/2) برای مدت 10 دقیقه در دمای محیط مخلوط شد. تعداد سلول ها طبق توضیحات داده شده در مرحله تکثیر، شمارش و کارایی ریزپوشانی به کمک فرمول زیر محاسبه گردید.

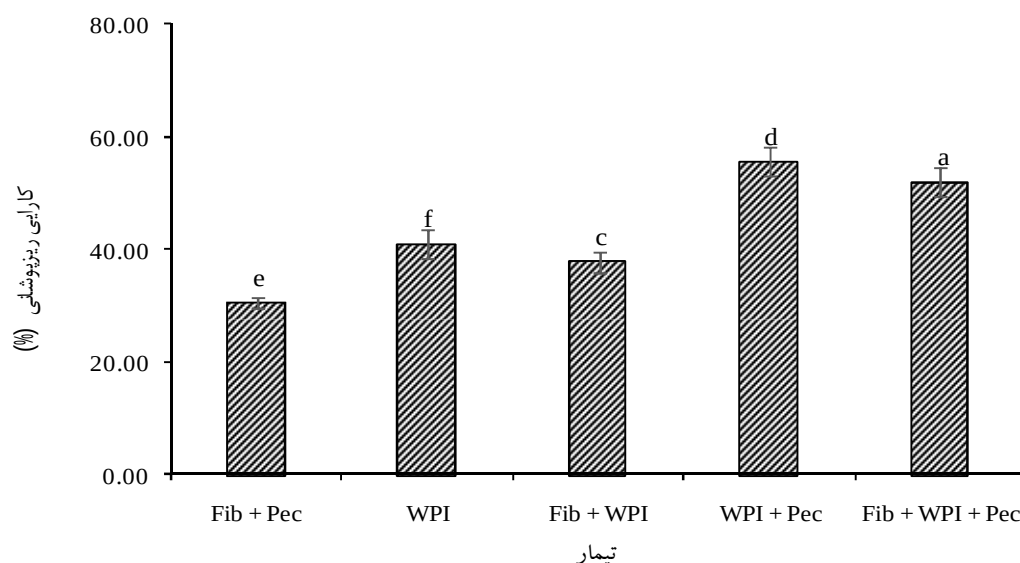
$$N = (N_0/N) \times 100 = \text{درصد زنده مانده}$$

N: تعداد سلول های زنده در دانک (log Cfu/g)، N₀: تعداد سلول های زنده (log Cfu/g) در سوسپانسیون.

نرخ زندهمانی سلول ها در شرایط شبیه سازی شده معده: مقدار 1 گرم از دانک های تهیه شده به 10 میلی لیتر شیریه شبیه سازی شده معده حاوی اسید کلریدریک (0/08 مولار) + کلرید سدیم (0/2 درصد) در pH حدود 1/5 به کمک همزن مغناطیسی (120 دقیقه، 37 درجه سانتی گراد) مخلوط شد. در زمان های 0، 30، 60، 90 و 120 دقیقه، سلول های موجود در 1 میلی لیتر از سوسپانسیون به کمک فیلتر (0/45 میکرومتر) جدا و پس از دو مرحله شستشو با محلول پیتون 0/1 مطابق توضیحات بخش تکثیر، شمارش گردیدند (10).

نرخ زندهمانی سلول ها در شرایط انبارداری: به منظور تعیین نرخ زندهمانی دانک های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 در طی 30 روز نگهداری (4 درجه سانتی گراد)، تعداد سلول های زنده طبق روش ذکر شده در مرحله تکثیر شمارش و درصد زندهمانی سلول ها بر پایه تعداد سلول زنده اولیه در دانک (زمان صفر) محاسبه شد.

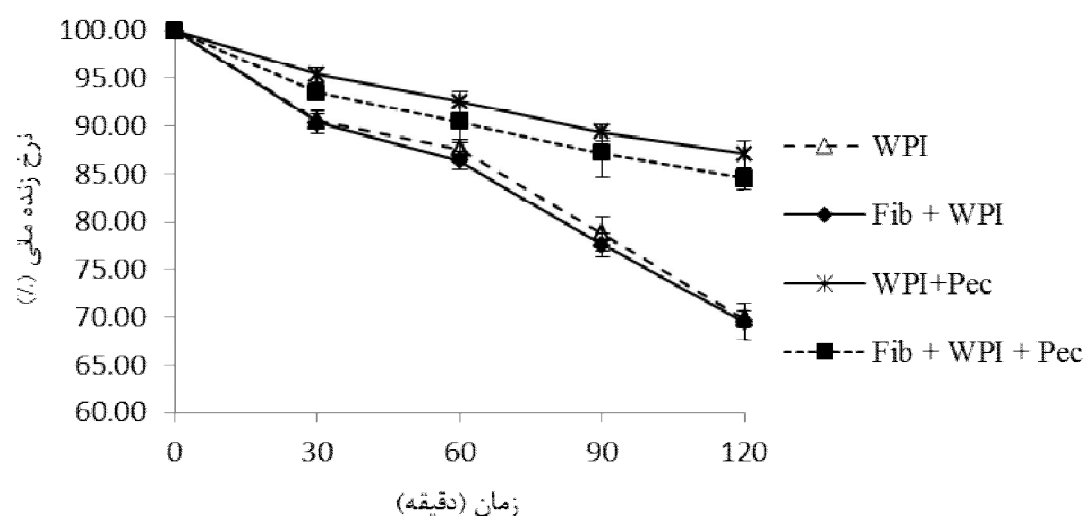
تعیین خصوصیات مورفولوژی دانک: خصوصیات مورفولوژی دانک ها به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (LEO1430VP، آلمان - انگلستان) در دانشگاه محقق اردبیلی تصویربرداری گردید. بدین منظور مقداری از دانک های



شکل 1. کارایی ریزپوشانی (%) بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC1644: Pec: ریزپوشانی با محلول پکتین، Fib + Pec: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پکتین، WPI: ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر، Fib + WPI: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر، WPI + Pec: ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر + پکتین، Fib + WPI + Pec: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر + پکتین. حروف متفاوت در بالای هر ستون بیانگر اختلاف معنادار در سطح 5% است.

مانی پس از 120 دقیقه به ترتیب در تیمارهای (87/09) WPI + Pec، (84/53) Fib + WPI + Pec، (69/79) WPI و (69/52) Fib + WPI مشاهده شد. همچنین نتایج به دست آمده نشان دادند، دانک‌هایی که در تهیه آنها از فرآیند تثبیت استفاده شده در مقایسه با ترکیبات مشابه بدون فیبر، نرخ زنده مانی پایین تری دارند.

نتایج داده‌های مربوط به نرخ زنده مانی دانک‌های باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC1644 در شرایط شبیه‌سازی شده معده در شکل 2 آورده شده است. ارزیابی انجام شده نشان داد در تمامی تیمارها باگذشت زمان نرخ زنده مانی کاهش یافته است. بیشترین کاهش در تیمارهای Fib + Pec و Pec و کنترل دیده شد به طوری که پس از 30 ثانیه تعداد سلول زنده صفر بود (نتایج آورده نشدند). بالاترین نرخ زنده

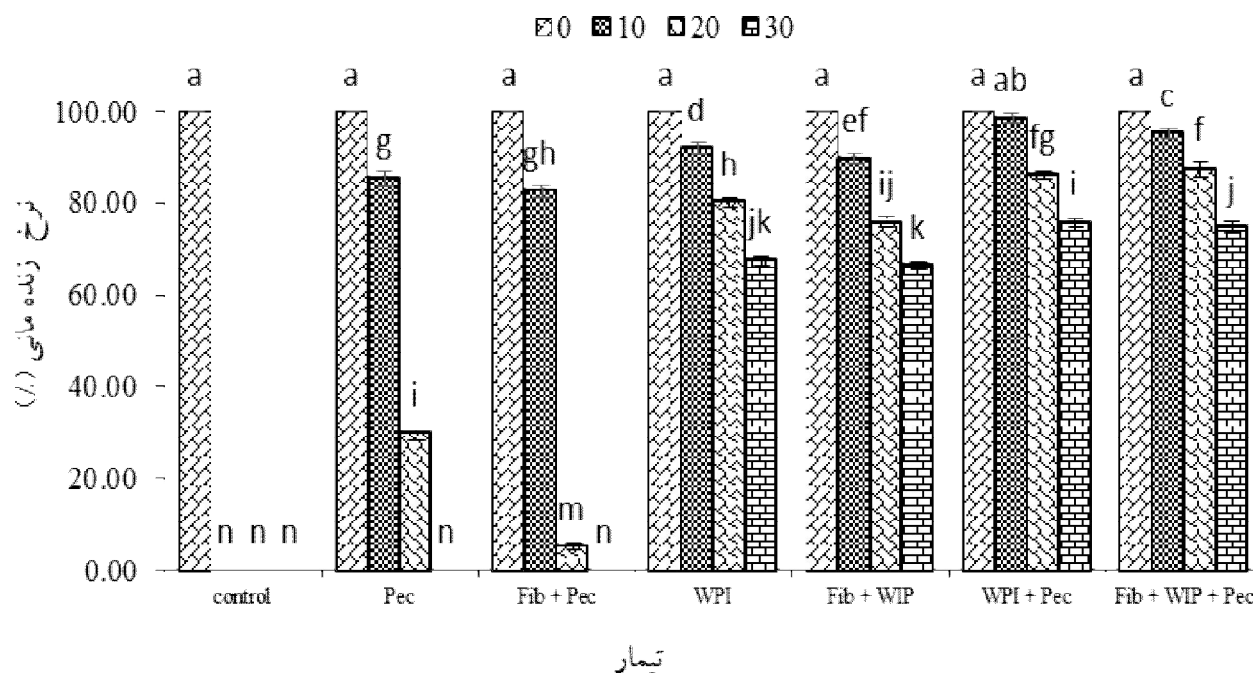


شکل 2. نرخ زنده مانی دانک های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 در شرایط شبیه‌سازی شده معده با pH=1/5: Pec: ریزپوشانی با محلول پکتین، Fib + Pec: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پکتین، WPI: ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر، Fib + WPI: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر، WPI + Pec: ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر + پکتین، Fib + WPI + Pec: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر + پکتین. حروف متفاوت در بالای هر ستون بیانگر اختلاف معنادار در سطح 5% است.

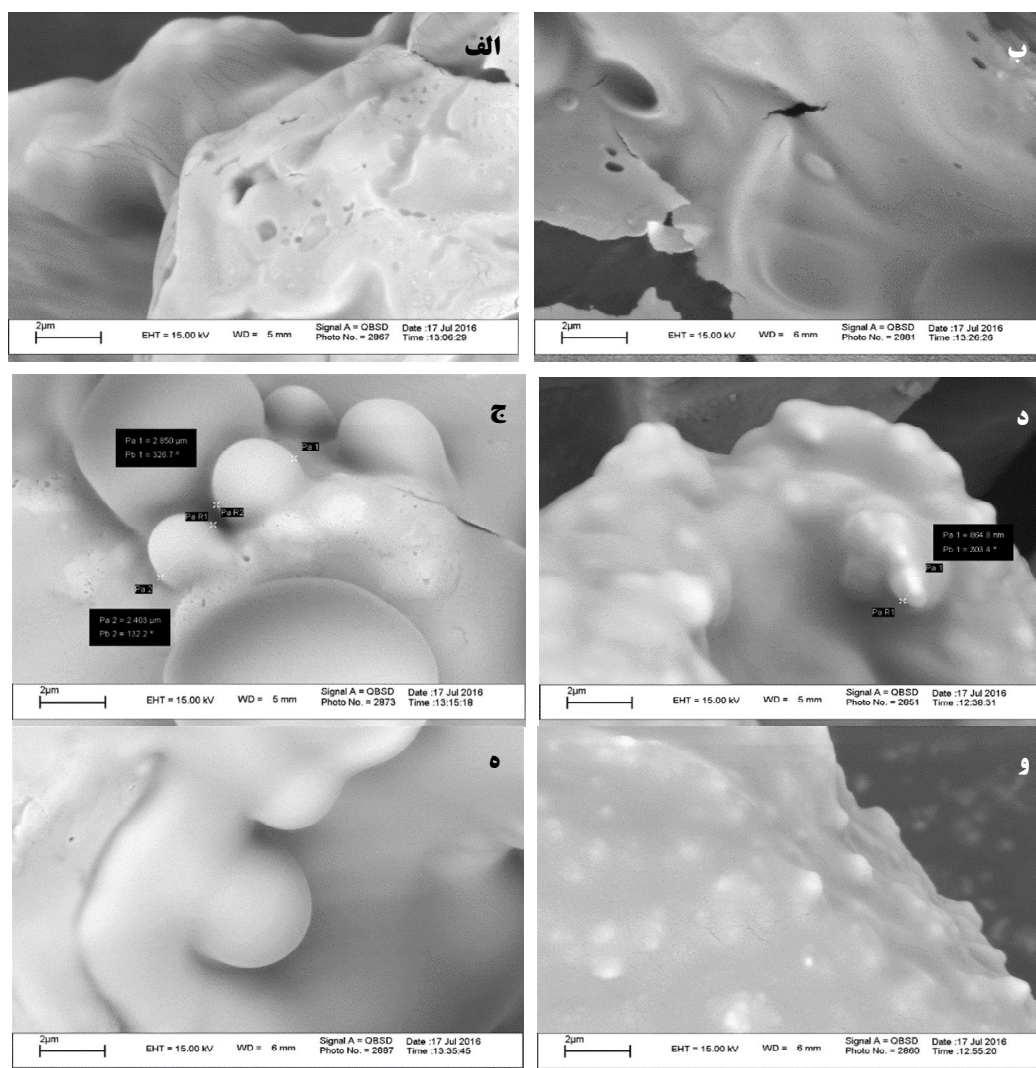
پوشش قرار گرفته و اجزاء کروی شکلی را تشکیل داده اند. ریخت شناسی دانک های تهیه شده از بسپار پکتین (شکل 4- الف) ترک ها و حفراتی را نشان می دهد که در مقایسه با دانک تیمار Pec + Fib (شکل 4- ب) مقدار آن کمتر است. همچنین در دانک تهیه شده با ایزوله پروتئین آب پنیر (شکل 4- ج) تراکم بیشتری از سلول های منفرد را به همراه ترک خوردگی ها و حفرات کوچک دیده می شود که در مقایسه با تیمارهای Pec و Pec + Fib کمتر می باشد.

دانک های حاصل از تیمار Pec + WPI (شکل 4- ه) پوشش کاملاً یکنواخت و صافی، و با کمترین حفرات کوچک را نشان می دهد که در آن سلول ها بصورت منفرد در کنار یکدیگر قرار دارند. حال آنکه در تیمارهای Pec + WPI (شکل 4- د) و Pec + WPI + Fib (شکل 4- و) پوشش کامل و یکنواختی بر روی سلول های تراکم یافته ایجاد شده است.

نرخ زنده ماندن دانک های حاوی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 در مدت 30 روز نگهداری (دمای 4 درجه سانتی گراد) در شکل 3 نشان داده شده است. در تمامی تیمارها (به استثناء تیمار WPI + Pec در روزهای صفر و 10) مدت زمان نگهداری تأثیر معنی داری بر کاهش نرخ زنده ماندن داشت ($p < 0/05$). بیشترین کاهش نرخ زنده ماندن در نمونه کنترل (باکتری بدون پوشش) دیده شد به طوری که در روز 10 ام ارزیابی، مقدار آن صفر بود که بیانگر حساسیت سلول نسبت به شرایط محیطی است. بیشترین نرخ زنده ماندن در روز سی ام به ترتیب در تیمارهای Pec + WPI (75/77%)، Pec + Fib + WPI (74/66%) و WPI (67/61%)، و (66/53%) دیده شد ($p < 0/05$). حال آنکه این مقدار برای تیمارهای Pec و Pec + Fib صفر درصد بود. شکل 4 تصاویر میکروسکوپ روبشی دانک های تهیه شده را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود سلول ها بطور کامل درون



شکل 3. نرخ زنده ماندن (%) باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 در طی زمان های مختلف نگهداری (دمای 4 درجه سانتی گراد). Pec: ریزپوشانی با محلول پکتین، Fib + Pec: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پکتین، WPI: ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر، Fib + WPI: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر، WPI + Pec: ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر + پکتین، Fib + WPI + Pec: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر + پکتین. حروف متفاوت در بالای هر ستون بیانگر اختلاف معنادار در سطح 5% است.



شکل 4. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی دانک‌های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644. الف: ریزپوشانی با محلول پکتین (Pec) ب: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پکتین (Fib + Pec)، ج: ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر (WPI)، د: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر (Fib + WPI)، ه: ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر + پکتین (WPI + Pec)، و: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر + پکتین (Fib + WPI + Pec).

• بحث

استفاده تأثیر معنی‌داری بر کارایی ریزپوشانی دارد. Chavarri و همکاران (2010) باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم را درون دانک‌هایی از پوشش کیتوزان قرار داده و کارایی ریزپوشانی را 40/2% گزارش نمودند (17). Zou و همکاران، باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم F-35 را با استفاده از پوشش آلژینات ریزپوشانی و کارایی 70/1% را بیان داشتند (18). در پژوهش حاضر کارایی ریزپوشانی در محدوده 30/51 تا 52/01% متغیر بود. تفاوت گزارشات می‌تواند به دلیل تفاوت در استرین، سن باکتری، نوع بسپار و همینطور روش تهیه باشد. همچنین نتایج

در این مطالعه تأثیر فرآیند تثبیت بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 بر روی فیبر گندم به همراه ریزپوشانی بر کارایی ریزپوشانی و قابلیت زنده‌مانی در برابر شرایط نگهداری سرد و شبیه سازی شده معده بررسی گردید. کارایی ریزپوشانی نشان دهنده تأثیر روش ریزپوشانی و ترکیبات بر زنده‌مانی سلول -هایی تلقیح شده می‌باشد (11). Muhamad و Shaharuddin بیان داشتند مرحله اکستروژن در فرآیند ریزپوشانی باعث آسیب به باکتری و در نتیجه کاهش زنده مانی سلول‌ها می‌گردد (8). نتایج این پژوهش نشان داد نوع پلیمر مورد

در سطح جامد می‌باشد (24). این خصوصیت به جنس دیواره دانک بستگی دارد طوری که در تیمار $Fib + Pec$ (شکل 4 - ب) کمترین مقدار تراکم دیده شد. پایین تر بودن نرخ زنده مانی تیمارهای دارای فرایند تثبیت در مقایسه با تیمارهای بدون تثبیت و با جداره یکسان، در برابر شرایط نگهداری سرد و معده، احتمالاً به غیرفعال شدن سلول و ایجاد ساختار متراکم سلول‌ها باز می‌گردد. Kourkoutas و همکاران گزارش نمودند، فرآیند تثبیت سلولی می‌تواند نفوذپذیری غشاء، مورفولوژی سلولی، قابلیت دسترسی سلول به مواد غذایی، کشش سطحی و تعادل اسمتیک اطراف سلول را تغییر داده و در نتیجه باعث حساسیت سلول در برابر عوامل نامساعد محیطی شود (25). بیشترین نرخ زنده‌مانی در برابر شرایط محیطی و گوارشی در دانک‌های تهیه شده با پوشش حاوی پروتئین آب پنیر و پکتین دیده شد. وجود ساختمان یکنواخت و صاف در دانک‌هایی با جنس دیواره پکتین + ایزوله پروتئین آب پنیر به دلیل کمپلکس الکترواستاتیک میان گروه‌های NH_3^+ پروتئین آب پنیر و $-COOH$ پکتین می‌باشد (26). Gerez و همکاران گزارش نمودند دانک لاکتوباسیلوس / منوسوس پوشش داده شده با ایزوله پروتئین آب پنیر + پکتین، بعد از 120 دقیقه قرارگیری در شیرابه شبیه سازی شده معده ($pH=2/1$) نرخ زنده مانی حدود 95 درصدی را نشان داد (27) که در مقایسه با تیمار $WPI + Pec$ (87/09%) پژهش حاضر، نرخ زنده مانی بالاتری است که احتمالاً به دلیل تفاوت در سویه باکتریایی و pH شیرابه شبیه‌سازی شده باشد.

نتیجه گیری کلی این که فرآیند ریزپوشانی نقش مؤثری در حفظ زنده‌مانی باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 در برابر شرایط گوارشی و نگهداری سرد (4 درجه سانتی‌گراد) دارد. این خصوصیت تابع نوع پوشش بکار رفته است. نتایج به دست آمده نشان دادند دانک‌های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 تهیه شده با پوشش ایزوله پروتئین آب پنیر + پکتین بالاترین نرخ زنده مانی در شرایط نگهداری سرد و شبیه سازی شده معده را نشان داد که می‌تواند به عنوان روش مؤثری در نگهداری و انتقال باکتری پروبیوتیک به سیستم گوارش میزبان مورد استفاده قرار گیرد.

تحقیق حاضر نشان داد فرآیند تثبیت سلولی باعث کاهش کارایی ریزپوشانی در مقایسه با تیمار بدون فرایند تثبیت و با دانک یکسان گردید. گزارش شده فیبر با ایجاد سطح گسترده در داخل محلول سازنده دانک، انبوه پروبیوتیک‌های تثبیت شده را به تله انداخته و باعث خروج مولکول‌های آب از ماتریکس ریزپوشانی شده و نهایتاً کاهش کارایی ریزپوشانی را بدنبال دارد (9).

بررسی نتایج حاصل از تیمارهای Pec و $Fib + Pec$ نشان می‌دهد این تیمارها نمی‌توانند روش مناسبی برای افزایش زنده مانی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 در شرایط نگهداری سرد (20 روز) و معده باشند. Jung و همکاران گزارش کردند خشک کردن دانک‌های تهیه شده از صمغ پکتین به روش انجمادی باعث کاهش مقاومت سلول در برابر شرایط محیطی شده است (19). گزارش شده خشک‌کن انجمادی می‌تواند موجب فروپاشی دیواره دانک‌های پکتینات کلسیم شده و بدنبال آن شکستگی‌هایی در دیواره دانک ایجاد نماید (20)، که با نتایج به دست آمده در این تحقیق تطبیق دارد. وجود روزنه و شکاف در سطح دانک‌ها از جمله دلایلی است که احتمالاً می‌تواند تفاوت قابلیت زنده مانی دانک‌های تیمارهای مختلف را در برابر شرایط محیطی و معده را توجیه نماید. گزارش شده وجود تخلخل و شکاف در دیواره باعث نفوذ اسید به بخش درونی دانک شده و احتمالاً مرگ سلولی را به دنبال دارد (21). تصاویر دانک‌های حاصل از تیمار WPI در مقایسه با Pec و $Fib + Pec$ ساختار یکنواخت تر با حفرات کوچکی را نشان می‌دهد. وجود حفرات کوچک احتمالاً به دلیل تصعید ذرات یخ از ماتریکس است که پس از تبخیر حفراتی را ایجاد می‌کند (22). De Castro-Cislaghi و همکاران گزارش نمودند پروتئین‌های آب پنیر تحت دمای بالا ژل داده و از قابلیت مناسبی جهت تهیه دانک برخوردار است (23). نتایج پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد بسپار ایزوله پروتئین آب پنیر در مقایسه با پکتین، دانک‌های مقاوم‌تری را در برابر شرایط نگهداری سرد و معده فراهم نموده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی بخوبی نشان دادند فرآیند تثبیت سلولی تراکم بالایی از سلول‌ها را در تیمارهای $Fib + WPI$ و $Fib + WPI + Pec$ ایجاد نموده که احتمالاً به دلیل نقش فیبر در تثبیت سلولی و تمایل دانک‌ها به تثبیت

• References

1. Sah BNP, Vasiljevic T, McKechnie S, Donkor ON, Physicochemical, textural and rheological properties of probiotic yogurt fortified with fibre-rich pineapple peel powder during refrigerated storage. *LWT-Food Sci Technol* 2016; 68: 978-986.
2. Shah NP. Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J* 2007; 17: 1262-1277.
3. Picard C. and Floramonti J. *Bifidobacteria* as probiotic agents- physiological effects and clinical benefits. *Aliment pharmacol Ther* 2005; 22: 495-512.
4. Liong MT. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and in-vivo evidence. *Int J Mol Sci* 2008; 9: 854-63.
5. Tamime AY and Robinson RK. *Yoghurt Science and Technology*. 3 edition. Woodheads Publishing Limited 2007; pp: 200-208.
6. Xu M, Gagné-Bourque F, Dumont M J, Jabaji S. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. *J Food Eng* 2016; 168: 52-59.
7. Gunasekaran S, Sanghoon K, Xiao L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *J Food Eng* 2007; 83: 31-40.
8. Shaharuddin S, Muhamad II. Microencapsulation of alginate-immobilized bagasse with *Lactobacillus rhamnosus* NRRL 442: Enhancement of survivability and themotolerance. *Carbohydr Polym* 2015; 119: 173-181.
9. Chitprasert P, Sudsai P and Rodklongtan A. Aluminum carboxy methylcellulose-rice bran microcapsules: Enhancing survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. *Carbohydr Polym* 2012; 90: 78-86.
10. Li D, Kim MJ, Jin Z and Zhou J. Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock. *Food microbiol* 2007; 14: 29-34.
11. Çabuk B, Tellioglu Harsa Ş. Protection of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 under in vitro gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules. *J Biosci Bioeng* 2015; 5: 1-7.
12. Nualkaekul S, Cook M, Khutoryanskiy V and Charalampopoulos D. Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Res Int* 2013; 53: 304-311.
13. Song H, Yu W, Gao M, Liu X and Ma X. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydr Polym*. 2013; 96: 181- 189.
14. Holkem AT, Raddatz GC, Nunes LN, Cichoski AJ, Jacob-Lopes E, Ferreira Grosso CR and Ragagnin de Menezes C. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *Food Sci Technol* 2016; 71: 302-308.
15. Sandoval-Castilla O, Lobato-Calleros C, García-Galindo H S, Alvarez-Ramírez J, Vernon-Carter E J. Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Res Int* 2010; 43: 111-117.
16. Mokarram RR, Mortazavi SA, Najafi MBH and Shahidi F. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Res Int* 2009; 42: 1040-1045.
17. Chávarri M, Marañoñ I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F and Villarán MC. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *Int J Food Microbiol* 2010; 142: 185-189.
18. Zou Q, Zhao J, Liu X, Tian F, Zhang H and Zhang H. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *Int J Food Sci and Technol* 2011; 46: 1672-1678.
19. Jung j, Arnold RD and Wicker L. Pectin and charge modified pectin hydrogel beads as a colon-targeted drug delivery carrier. *Colloids Surf B Bio-interfaces* 2013; 104: 116-121.
20. Pereira CS and Hünenberger PH. Interaction of the sugars trehalose, maltose and glucose with a phospholipid bilayer: A comparative molecular dynamics study. *J Phys Chem B* 2006; 110: 15572-15581.
21. Chotiko A and Sathivel S. Development of a combined low-methoxyl-pectin and rice-bran extract delivery system to improve the viability of *Lactobacillus plantarum* under acid and bile conditions. *Food Sci Technol* 2016; 66: 420-427.
22. Smrdel P, Bogataj M, Zega A, Planinsek O and Mrhar A. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *J Microencapsul* 2008; 25: 90-105.
23. De Castro-Cislaghi FP, Silva CRE, Fritzen-Freire CB, Lorenz JG and Sant'Anna ES. *Bifidobacterium*

- Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *J Food Eng* 2012; 1: 186–193.
24. Salvim MO, Thomazini M, Pelaquim FP, Urbano A, Moraes ICF and Favaro- Trindade CS. Production and structural characterization of solid lipid microparticles loaded with soybean protein hydrolysate. *Food Res Int* 2015; 76: 689-696.
25. Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 2004; 21: 377–397.
26. Gerez CL, Font de Valdez G, Gigante ML, Grosso CRF. Stabilization of whey protein isolate-pectin complexes by heat. *Agric Food Chem* 2010; 9: 7051-7058.
27. Gerez CL, Font De Valdez G, Gigante ML and Grosso CRF. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhammnous* CRL 1505 to low pH. *Lett Appl Microbiol* 2012; 54: 552–556.

Effect of Microencapsulation and Fiber on Survival Rate of *Bifidobacterium Bifidum* PTCC1644 in Simulated Gastrointestinal and Refrigerated Conditions

Saifzadeh S¹, Najafi M.A.*², Soltani Tehrani N³

1- Graduated MSc Student, Dept. of Food Science and Technology, Zabol University, Zabol, Iran

2-*Corresponding author: Assistant Professor, Dept. of Food Science and Technology, Zabol University, Zabol, Iran.
Email: Najafi413@yahoo.com

3- Instructor, Dept. of Food Science and Technology, Zabol University, Zabol, Iran.

Received 5 Jan, 2018

Accepted 14 Apr, 2018

Background and Objectives: Probiotics have beneficial effects on the health of consumers. The susceptibility of probiotics to refrigerated conditions is a key challenge for their application. The purpose of this study was to examine the process of stabilizing *Bifidobacterium bifidum* PTCC 1644 and its microencapsulation on the viability of this bacterium under refrigerated and simulated gastrointestinal conditions.

Materials & Methods: Suspensions of *bifidobacterium bifidum* PTCC 1644 were prepared and stabilized on wheat fiber and in free form. Then, using pectin, isolated whey protein and isolated whey protein + pectin biopolymers the cells were microencapsulated and dried by freeze-drier. The microcapsules were evaluated in terms of microencapsulation efficiency (%), viability versus simulated gastrointestinal conditions (%), survival rate during storage (30 days at 4 °C), and morphological characteristics by scanning electron microscopy. Statistical analysis was performed by factorial arrangement based on a completely randomized design (CRD) (P<0.05).

Results: The microencapsulation process increased the resistance of *Bifidobacterium bifidum* PTCC1644 compared to the control sample (free *Bifidobacterium bifidum* PTCC1644 without microencapsulation) against chilled and gastrointestinal conditions. The highest yield of microencapsulation and viability versus cold and simulated gastrointestinal conditions were observed by treating the samples with isolated whey protein + pectin. The process of cell immobilization on the fiber reduced microencapsulation efficiency (%) and viability versus refrigerated and gastrointestinal conditions were compared to similar treatments without stabilization.

Conclusion: Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* by “isolating whey protein + pectin” can be a good solution for maximizing the production and maintenance of probiotics.

Keywords: Probiotic, Microcapsulation, Whey protein isolated, Pectin Gum