مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 4، زمستان 1392، صفحات 134-125

تأثیر ریزپوشانی با پوشش کیتوزان بر روی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در بستنی

محمد علی خسروی زنجانی[1]، نیما محمدی[2]، حامد اهری[3]، بابک غیاثی طرزی[4]، حسین باخدا[5]

1- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
2- نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران پست الکترونیکی: Nima.Mohammadi@Yahoo.com
3- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
4- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
5- استادیار گروه مکانیزاسیون کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/3/21 تاریخ پذیرش: 92/7/7

چکیده

سابقه و هدف: به منظور بهبود قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در محصولات لبنی، امروزه از تکنیک ریزپوشانی با پوشش‌های مختلف هیدروکلوئیدی استفاده می‌شود. از آنجا که بستنی به عنوان یک محصول لبنی در دمای بسیار پایین نگهداری می‌شود، از روش ریزپوشانی با پوشش کیتوزان در این پژوهش استفاده شد.

مواد و روش‌ها: ریزپوشانی پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* (Lactobacillus casei PTCC 1608) و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (Bifidibacterium bifidum PTCC 1644) به وسیله آلژینات کلسیم، نشاسته مقاوم ذرت و کیتوزان انجام شد و تأثیر ناشی از ریزپوشانی بر روی زنده‌مانی و ویژگی‌های حسی بستنی، در طول 100 روز نگهداری در دمای ^{o}C 21- مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه و شکل و ساختار کپسول‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها به دلیل حفاظت سلول‌ها به وسیله ریزپوشانی، افزایش یافت. پوشش دادن کپسول‌ها با کیتوزان نیز منجر به ارتقا زنده‌مانی و افزایش اندازه کپسول‌ها شد. هم چنین افزودن پروبیوتیک‌ها در حالت آزاد و ریزپوشانی شده، تأثیر معنی‌داری بر روی بافت، رنگ و طعم محصول نهایی در طول نگهداری نداشت ($P>0/05$).

نتیجه گیری: ریزپوشانی با نشاسته مقاوم ذرت و پوشش کیتوزان به طور معنی‌داری منجر به افزایش بقای پروبیوتیک‌ها در بستنی نسبت به حالت آزاد در طول مدت نگهداری شد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، ریزپوشانی، بستنی، نشاسته مقاوم ذرت، کیتوزان

• مقدمه

پروبیوتیک‌ها (Probiotics) میکروارگانیسم‌هایی هستند که اگر به تعداد کافی و به صورت زنده به مصرف کننده برسند، اثرات سلامتی بخش در میزبان بر جای می‌گذارند (1). از اثرات سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها می‌توان به حفظ میکروفلور طبیعی روده، ارتقاء سیستم ایمنی بدن، کاهش عدم تحمل لاکتوز در افرادی که نمی‌توانند لاکتوز را هضم کنند، کاهش سطح کلسترول خون و خواص ضد جهش زایی و ضد سرطانی آن‌ها اشاره کرد (3، 2). در یک طبقه بندی کلی اکثر پروبیوتیک‌های به کار رفته در فراورده‌های غذایی را لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها تشکیل می‌دهند (4). پری بیوتیک‌ها (Prebiotics) نیز ترکیباتی غیر قابل هضمی هستند که رشد و فعالیت پروبیوتیک‌ها را تشدید می کنند و به طور اختصاصی می توانند توسط پروبیوتیک‌ها مورد استفاده قرار گیرند. از این ترکیبات می‌توان به نشاسته مقاوم ذرت (Resistant maize starch)، فروکتوالیگوساکاریدها، گالاکتوالیگوساکاریدها، پکتین،

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-10]

بتاگلوکان‌ها و اینولین اشاره کرد (6، 5). ریزپوشانی (Microencapsulation) به عنوان یکی از نوین ترین شیوه‌ها، 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، زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در محیط مواد غذایی و شرایط دستگاه گوارش افزایش می‌یابد (8، 7). آلژینات به طور گسترده در ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، و واحدهای سازنده آن را D- مانورونیک اسید و L- گلوکورونیک اسید تشکیل داده اند که با پیوندهای گلیکوزیدی به هم متصل شده اند (9) اندازه میکروکپسول‌ها بسته به مواد و تکنولوژی سازگار با تولید آنها، می‌تواند از میکرومتر تا چند میلی متر متغیر باشد (11، 10). دیواره میکروکپسول‌ها نیمه تراوا می‌باشد، بنابراین به متابولیت‌ها اجازه عبور می‌دهد اما از خروج سلول‌های باکتریایی جلوگیری می‌کند. معمولاً قطر منافذ در میکروکپسول‌ها در حد نانومتر بوده که فقط متابولیت‌ها می‌توانند از این منافذ عبور کنند. بسته به نوع تکنولوژی و مواد به کار رفته در تشکیل کپسول ها، دیواره کپسول‌ها می‌تواند یک لایه و یا چند لایه باشد که این امر می‌تواند بر سرعت انتقال جرم و سطح تبادلات کپسول با محیط پیرامون تأثیر گذار باشد (13، 12). کپسول‌های آلژینات را می‌توان به روش‌های امولسیون و اکستروژن (Extrusion) تهیه کرد (14). مخلوط کردن آلژینات کلسیم با نشاسته مقاوم ذرت از یک سو ساختاری منسجم و یکنواخت پدید می‌آورد و از سوی دیگر بقای سلول‌ها را به دلیل خاصیت پری بیوتیکی آن افزایش می‌دهد (15، 8). 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 (Chealating agents) یون کلسیم، نظیر فسفات ها، لاکتات‌ها و سیترات‌ها منجر به از هم پاشی کپسول آلژینات می‌گردد (16). پوشش کیتوزان (به عنوان ترکیب چند کاتیونی) حول کپسول‌های آلژینات که بار منفی دارند، کپسول‌های پوشش داری ایجاد می‌کند، که باعث پایداری فیزیکی و شیمیایی بیشتر کپسول‌ها و کاهش اثر تخریبی عوامل ضد ژل و درگیرکننده یون کلسیم در ساختار کپسول می‌شود (13، 12). به منظور بهبود قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در محصولات لبنی، امروزه از تکنیک ریزپوشانی با پوشش‌های مختلف هیدروکلوئیدی نظیر کاراگینان (17)، زانتان (18)، ژلاتین (19) استفاده می‌شود. در این میان آلژینات سدیم به طور گسترده تری در ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. از آنجایی که بستنی به عنوان یک محصول لبنی در دمای بسیار پایین نگهداری می‌شود، در این پژوهش به منظور بهبود زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در بستنی، از تکنیک ریزپوشانی با پوشش کیتوزان استفاده شد. تاکنون تحقیقی مبنی بر تلقیح پروبیوتیک‌ها در بستنی با پوشش کیتوزان گزارش نشده است. در این تحقیق پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به بستنی تلقیح و زنده‌مانی آن‌ها در طول 100 روز نگهداری در دمای $-21^{o}C$ مورد ارزیابی قرار گرفته است. حضور اکسیژن در بافت محصول و هم چنین شرایط نگهداری در دمای پایین می‌تواند منجر به کاهش پروبیوتیک‌ها در طول نگهداری شود. در این روش، ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها به وسیله پوشش کیتوزان بهبود یافته و تأثیر ریزپوشانی بر روی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در طول مدت نگهداری بررسی شده است.

• مواد و روش‌ها

آماده سازی میکروارگانیسم‌ها: باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus casei* PTCC 1608) و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (*Bifidibacterium bifidum* PTCC 1644) به صورت خالص و لیوفیلیزه از کلکسیون سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری و در 20 میلی‌لیتر محیط کشت MRS براث (Merck Germany) در دمای $37\ ^{o}C$ به مدت 24 ساعت به ترتیب در شرایط هوازی و بی هوازی فعال گردیدند. سپس نمونه حاصل در 95 میلی‌لیتر محیط کشت MRS براث تلقیح شد و تحت شرایط فوق تکثیر گردید. بیومس حاصله به وسیله سانتریفیوژ 1500g برای مدت 15 دقیقه در دمای $4\ ^{o}C$ جدا سازی شده و در دو مرحله با محلول استریل 0/1 درصد آب پپتونه شسته شد (7).

فرآیند ریزپوشانی: تمامی مواد و وسایل آزمایشگاهی در دمای $121^{o}C$ به مدت 15 دقیقه استریل گشت. برای انجام فرآیند ریزپوشانی، 30 گرم آلژینات سدیم (شرکت Sigma- Aldrich، آمریکا) به 1000 میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و سپس استریل شد. پس از آن محلول آلژینات با محیط هم دما شد، با 20 گرم نشاسته مقاوم ذرت (Hi- maize 260 National starch UK) و 1 درصد

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-10]

سوسپانسیون میکروبی مخلوط شده و جهت همگن شدن به مدت 5 دقیقه هم زده شد. برای تشکیل امولسیون، 500 میلی‌لیتر از مخلوط حاصله به 2 لیتر روغن کانولا حاوی 0/2 درصد امولسیفایر توئین80 اضافه شده و با سرعت (300 rpm) به مدت 20 دقیقه هم زده می‌شود تا امولسیون یکنواختی تشکیل شود. به منظور تشکیل کپسول‌ها به محلول مورد نظر کلرید کلسیم 0/1 مولار اضافه کرده، پس از 30 دقیقه کپسول‌ها ته نشین شده که به منظور جداسازی کپسول‌ها از سانتریفیوژ 350g به مدت 10 دقیقه استفاده شد. در نهایت کپسول‌های جدا شده با محلول آب پپتونه 0/1 درصد شسته شده و در دمای $4\ ^{o}C$ نگهداری شدند (9).

پوشش دادن کپسول‌ها با کیتوزان: کیتوزان (شرکت Sigma- Aldrich، آمریکا) با وزن مولکولی پایین (محلول0/4 گرم، 1 w/v %) در 90 میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و با گلاسیال استیک اسید به غلظت نهایی 0/4% w/v رسید. سپس pH محلول به وسیله افزودن سدیم هیدروکسید (NaOH) 1 مولار به 6 رسانده شد. مخلوط حاصله در اتوکلاو ($121\ ^{o}C$، 15 دقیقه) استریل گشت. کپسول‌های آلژینات کلسیم و نشاسته ساخته شده، در این محلول پراکنده شده تا عملیات پوشش دهی به طور کامل صورت گیرد. سپس کپسول‌های پوشش داده شده با کیتوزان توسط سانتریفیوژ با نیرو g 350 جدا شدند و نهایتا با سرم فیزیولوژی شسته شده و در محلول 0/1 درصد پپتون در دمای $4\ ^{o}C$ نگهداری شدند (12).

شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها: برای شمارش باکتری‌های به دام افتاده در کپسول ها، 1 گرم از کپسول‌های تهیه شده را با 9 میلی‌لیتر محلول استریل بافر فسفات (0/1M و pH:7) پراکنده کرده و به مدت 10 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، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به ترتیب در شرایط هوازی و بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. شمارش باکتری‌ها در 3 تکرار انجام پذیرفت (12). برای کپسول هایی که با کیتوزان پوشش داده شدند، از محلول بافر سیترات سدیم و دستگاه استومکر (شرکت Funk Gerber، آلمان) استفاده شد. برای شمارش تعداد باکتری‌ها در بستنی، 10 گرم از بستنی را با 90 میلی‌لیتر محلول استریل بافر فسفات (0/1M و pH:7) و برای نمونه‌های حاوی کپسول‌های با پوشش کیتوزان 10 گرم از بستنی را با 90 میلی‌لیتر محلول استریل بافر سیترات سدیم (0/1M و pH:6/3) پراکنده کرده و به مدت 15 دقیقه با استفاده از دستگاه استومکر هم زده شد تا باکتری‌ها به طور کامل در محلول بافر آزاد شوند. سپس مطابق روش ذکر شده شمارش باکتری‌ها در 3 تکرار صورت گرفت (13، 12).

تهیه بستنی: فرمولاسیون بستنی به صورت 10 درصد چربی، 12 درصد ماده جامد بدون چربی، 18 درصد شکر، 0/4 درصد آلژینات سدیم 0/1 درصد وانیل به عنوان طعم دهنده و 0/1 درصد نشاسته مقاوم ذرت در نظر گرفته شد. به این ترتیب ماده جامد کل در همه نمونه‌ها برابر 40/6 درصد بود. شیر و چربی شیر مخلوط شدند و دما تا $47^{o}C$ افزایش داده شد در این دما پودر شیر خشک، شکر و آلژینات سدیم به همراه نشاسته مقاوم ذرت اضافه شد. پس از مخلوط کردن کامل نمونه ها، فرایند پاستوریزه کردن به صورت غیر مستقیم به مدت 10 دقیقه در آب جوش $72\ ^{o}C$ انجام شد و نمونه‌های بستنی بلافاصله با استفاده از مخلوط یخ تا دمای $4\ ^{o}C$ سرد شدند در این مرحله وانیل به مخلوط اضافه شد و نمونه‌های بستنی به منظور گذراندن مرحله رساندن در یخچال در دمای $4\ ^{o}C$ به مدت 24 ساعت قرار داده شدند. پس از طی زمان فوق، نمونه بستنی را به 5 قسمت (A، B، C، D، E، F و G) تقسیم کرده و برای بررسی زنده‌مانی پروبیوتیک ها، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* آزاد (1 درصد سوسپانسیون میکربی) به ترتیب به ظرف A و B، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته به ترتیب به ظرف C و D، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته به همراه کیتوزان به ترتیب به ظرف E و F افزوده شدند. ظرف G بدون افزودن سوسپانسیون میکربی و به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس این نمونه‌ها در دستگاه انجماد به مدت 20 دقیقه تحت عمل انجماد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از خروج از دستگاه انجماد در ظرف‌های شیشه ایی درب دار 250 میلی‌لیتر بسته بندی شدند و جهت گذراندن دوره سخت شدن در دمای $-21\ ^{o}C$ فریز شدند.

$$\text{تورم بستنی} = \frac{\text{وزن حجم آمیخته بستنی-وزن حجم معینی از آمیخته}}{\text{وزن هم حجم آمیخته بستنی}} \times 100$$

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-10]

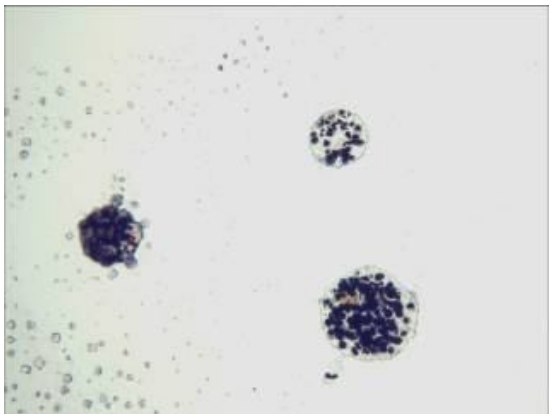
بررسی شکل و اندازه ی ذرات: قطر کپسول‌ها به وسیله نرم افزار آنالیز تصویری میکروسکوپ نوری (Leica Qwin 550) برای 100 نمونه تصادفی ریزپوشانی شده محاسبه شده است. برای مشاهده شکل ظاهری کپسول‌ها از میکروسکوپ نوری مدل (Motic BA300) با بزرگ نمایی ×40 و محلول لوگل به منظور مشاهده گرانول‌های نشاسته، استفاده شد. هم چنین برای شناسایی دقیق سطح کپسول‌ها از میکروسکوپ الکترونی (,XL30 Royal Philips, The Netherlands) استفاده شد. بدین منظور کپسول ها، به وسیله چسب دو طرفه بر روی لام دستگاه، تثبیت و به مدت 1 ساعت، به وسیله طلا و پالادیم پوشش داده شدند. مشاهده کپسول‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی با تابش الکترونی 15 کیلو وات انجام گرفت (8، 5).

ارزیابی حسی بستنی: برای ارزیابی حسی یک پانل شامل 10 نفر از افراد آموزش دیده، نمونه بستنی‌ها را به صورت مجزا در دمای اتاق ارزیابی کردند. فرایند با استفاده از یک سری خصوصیات مهم بستنی از قبیل طعم، رنگ، بافت و پذیرش کلی سنجیده شده و امتیازها براساس نمره دهی هدونیک از 1 تا 8 که امتیاز 8 برای بهترین حالت و امتیاز 1 برای بدترین آن در نظر گرفته شده (20).

تجزیه و تحلیل آماری: طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با 3 تکرار توسط نرم‌افزار Statistics 20 SPSS انجام پذیرفت. مقایسه بین نتایج به دست آمده به وسیله آزمون‌های آماری چند دامنه ای دانکن انجام گرفت، برای ارزیابی حسی نیز، آزمون ناپارامتری فریدمن به کار رفت. تمامی نمودارها با استفاده از نرم افزار Statistics 20 SPSS رسم شد.

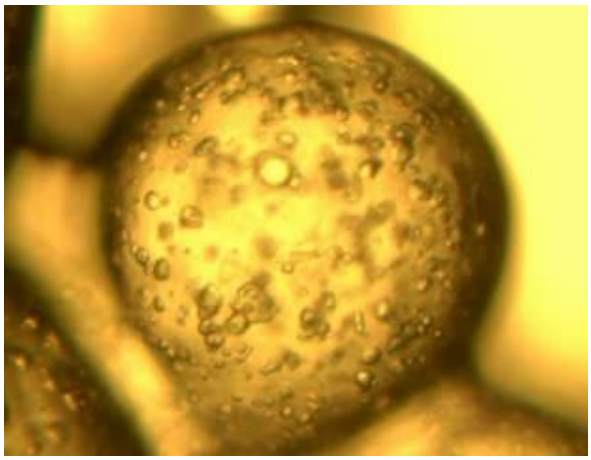
• یافته‌ها

اندازه و شکل ظاهری کپسول‌ها: در این پژوهش، برای مشاهده شکل و ساختار کپسول‌ها از میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. مشاهدات حاصل از میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی نشان داد که کپسول‌های تشکیل شده، همگی کروی و یکنواخت هستند. جنس و نوع ترکیب به کار رفته در ساخت هر کپسول در فرآیند ریزپوشانی، بر شکل ظاهری کپسول‌های تشکیل شده کاملاً مشخص و تأثیرگذار بود. در شکل 1 گرانول‌های نشاسته به وسیله محلول لوگول به رنگ بنفش در آمدند. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، سطح و مورفولوژی کپسول‌های مختلف به کار رفته در این پژوهش نیز مورد بررسی قرار گرفت.



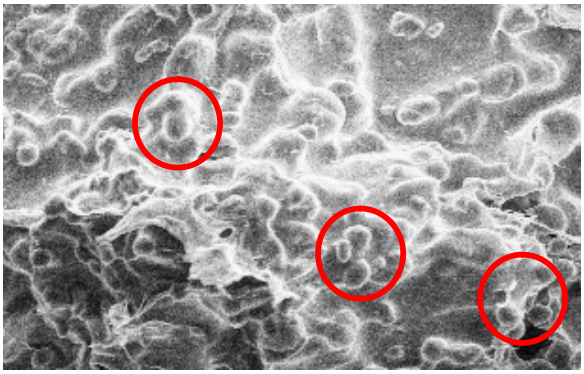
شکل 1. تصویر میکروسکوپ نوری از کپسول‌های آلژینات کلسیم و نشاسته، بعد از اضافه کردن محلول لوگل × 40

در سطح کپسول‌های حاوی نشاسته مقاوم ذرت، حضور گرانول‌های نشاسته مشخص است (شکل 4-2). هم چنین حضور لایه کیتوزان را می‌توان در سطح کپسول‌ها در شکل 5 مشاهده کرد که منجر به افزایش قطر کپسول‌ها و تغییر در سطح آن‌ها شده است. در تصاویر میکروسکوپ الکترونی، لایه کیتوزان، سطحی یکنواخت را در کپسول‌ها ایجاد کرده است . قطرحجم میانگین کپسول‌ها نیز توسط نرم افزار آنالیز تصویری میکروسکوپ نوری اندازه گیری شد که برای آلژینات کلسیم حاوی نشاسته، قطرحجم میانگین کپسول‌ها 1/67 ±110 میکرومتر بود. در حالی قطرحجم میانگین محاسبه شده برای کپسول‌های دارای پوشش کیتوزان، حدود 2/33 ±181 میکرومتر بود. با مقایسه قطر کپسول ها، نتایج حاکی از آن بود که پوشش کیتوزان منجر به افزایش قطر کپسول‌ها شده است. تورم بستنی 6 ± 94 بود.

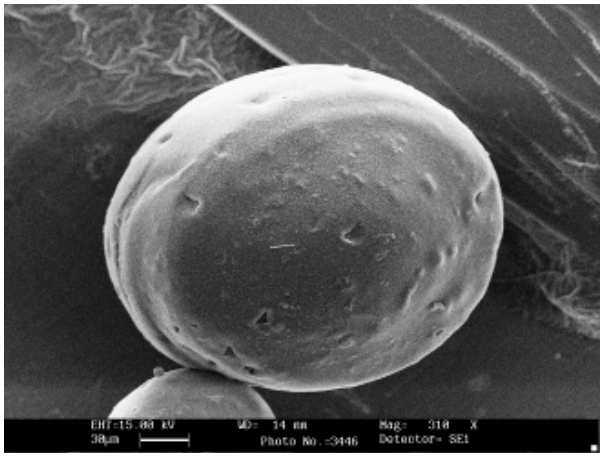


شکل 2. تصویر میکروسکوپ نوری از کپسول آلژینات کلسیم و نشاسته با بزرگ نمایی × 40

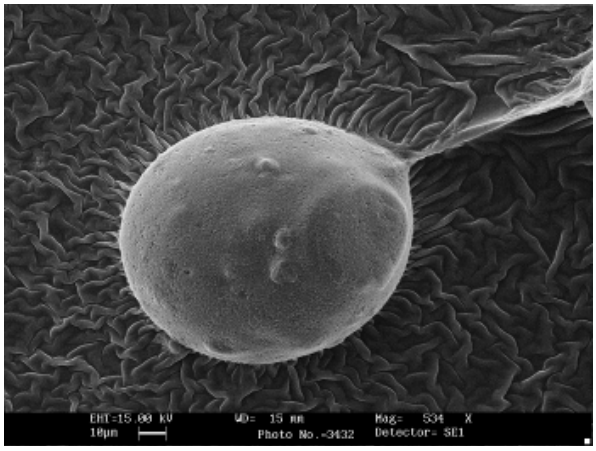
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-10]



شکل3. تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح کپسول آلژینات کلسیم و نشاسته، که گرانول‌های نشاسته را در سطح کپسول‌ها نشان می‌دهد × 250



شکل5. تصویر میکروسکوپ الکترونی از کپسول حاوی پوشش کیتوزان



شکل4. تصویر میکروسکوپ الکترونی از کپسول آلژینات کلسیم و نشاسته

زنده‌مانی پروبیوتیک‌های آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی: شکل 6 تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم* آزاد و ریزپوشانی شده را در بستنی نشان می‌دهد. با مقایسه زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم* آزاد و ریزپوشانی شده نقش و تأثیر ریزپوشانی در طی 100 روز نگهداری قابل ملاحظه است. با توجه به یافته‌های حاصله، پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده، زنده‌مانی بیشتری را در مقایسه با حالت آزاد نشان داده است.

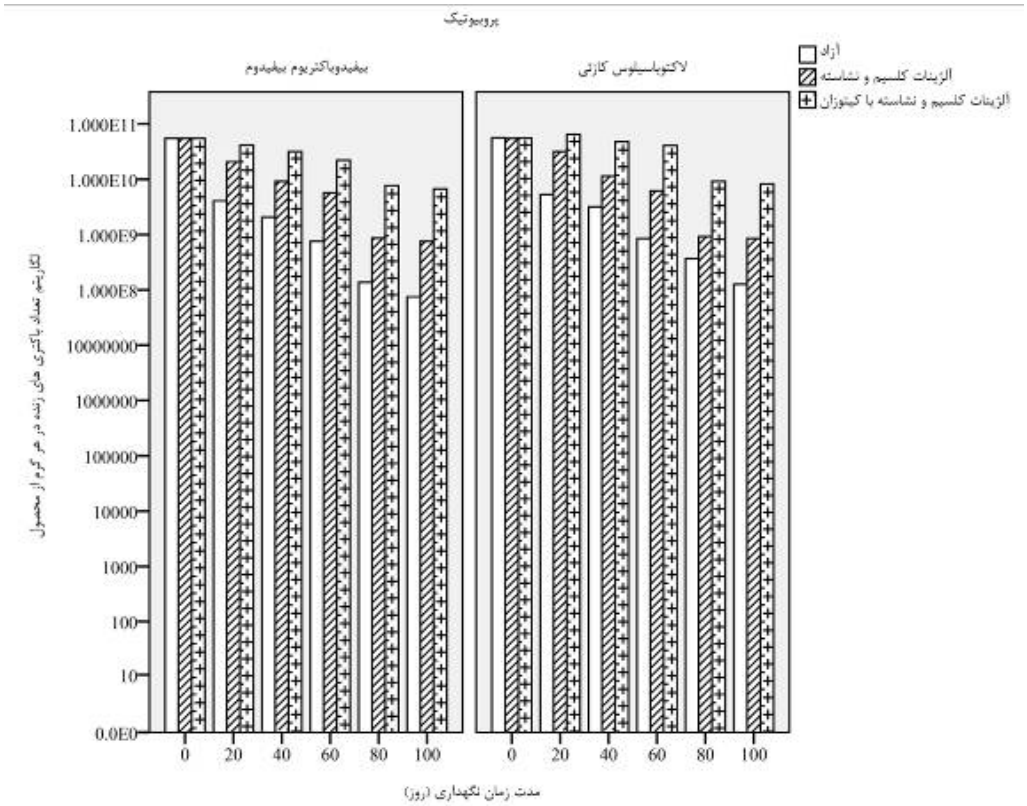
ارزیابی حسی: ارزیابی حسی بستنی در طول نگهداری در جدول 1 نمایش داده شده است، نتایج نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در طعم ، رنگ و بافت بستنی حاصل نشده است($P>0/05$).

جدول 1. ارزیابی حسی بستنی

نمونه ها	رنگ 1-8	طعم 1-8	بافت 1-8	میانگین پذیرش کلی 1-8
A	7/36	7/12	7/55	7/36
B	7/37	7/11	7/59	7/34
C	7/33	7/15	7/53	7/37
D	7/33	7/10	7/54	7/35
E	7/35	7/14	7/54	7/36
F	7/33	7/10	7/54	7/34
G	7/34	7/13	7/55	7/35

A: بستنی با *لاکتوباسیلوس کازئی* آزاد ، B: بستنی با *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* آزاد C: بستنی با *لاکتوباسیلوس کازئی* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته، D: بستنی با *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته ، E: بستنی با *لاکتوباسیلوس کازئی* ریزپوشانی شده به همراه پوشش کیتوزان F: بستنی با *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده به همراه پوشش کیتوزان G: تمونه بستنی بدون باکتری (شاهد).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-10]



شکل 6. زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی طی 100 روز نگهداری

• بحث

شکل و ساختار کپسول‌ها: مشاهدات با میکروسکوپ نوری نشان داد که ذرات آلژینات کلسیم با نشاسته مقاوم ذرت کروی هستند. نوع مواد به کار رفته در تشکیل کپسول‌ها روی خصوصیات ظاهری و شکل کپسول‌ها تأثیرگذار بودند. مخلوط کردن آلژینات کلسیم با نشاسته مقاوم از یک سو پوششی یکدست و یکنواخت پدید می‌آورد و منافذ موجود در ساختار آلژینات کلسیم را پر می‌کند و از سوی دیگر بقای سلول‌ها را به دلیل خاصیت پری بیوتیکی افزایش می‌دهد (20). علاوه بر این گزارش شده است که حضور نشاسته مقاوم ذرت در ساختار کپسول ها، مقاومت کپسول‌های آلژینات کلسیم را در شرایط اسیدی معده افزایش می‌دهد و مانع از هم پاشیدن سریع آنها می‌شود (21، 14، 11). پوشش دادن کیتوزان (به عنوان ترکیب چند کاتیونی) حول کپسول‌های آلژینات کلسیم که بار منفی دارند، کپسول‌های پوشش داری ایجاد می‌کند که این پوشش ایجاد شده در اطراف کپسول ها، باعث پایداری فیزیکی و شیمیایی بیشتر کپسول‌ها و کاهش اثر تخریبی عوامل ضد ژل و درگیرکننده‌های یون کلسیم در ساختار کپسول می‌شود (13).

اندازه کپسول‌ها به منظور بررسی اندازه قطر کپسول‌های تشکیل شده به روش امولسیون از نرم افزار آنالیز تصویری میکروسکوپ نوری استفاده شد. میانگین قطر کپسول‌های اندازه گیری شده با پوشش کیتوزان نشان می‌دهد که کیتوزان علاوه بر خاصیت پوشش دهندگی کپسول‌ها و استحکام بخشیدن ساختار کپسول ها، 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 (22). در این پژوهش، قطر کپسول‌های بدون پوشش و همچنین کپسول‌های دارای پوشش کیتوزان در حد میکرون بوده در حالی که این قطر در برخی مطالعات در حد میلی متر بوده است (24، 23، 19، 12). کوچک بودن قطر کپسول‌ها بافت نرم تری را در بستنی ایجاد می‌کند. هم چنین کوچک تر

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-10]

بودن و کروی بودن کپسول‌ها باعث تغییرات کمتری در محصول و مانع از بروز پدیده شنی شدن در ارزیابی حسی محصول نهایی می‌شود (25، 20).

زنده‌مانی پروبیوتیک‌های آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی شکل 6 زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را در بستنی در طی 100 روز نگهداری در دمای ^{o}C 21- نشان می‌دهد (شکل6). نتایج نشان می‌دهد که جمعیت اولیه پروبیوتیک‌ها در حالت آزاد، ریزپوشانی شده با نشاسته و ریزپوشانی شده با نشاسته و کیتوزان به ترتیب 3/2 و 2/12 و 1/24 سیکل لگاریتمی کاهش داشته اند. علت زنده‌مانی بیشتر تعداد سلول‌های ریزپوشانی شده (نشاسته و کیتوزان) *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در مقایسه با حالت آزاد را می‌توان به دلیل نقش ساختاری نشاسته مقاوم در کپسول‌های تشکیل شده و همچنین لایه ی پوششی ایجاد شده توسط کیتوزان اشاره کرد (13). نتایج نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری ($P<0/05$) بین *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ریزپوشانی شده با آزاد در بستنی در پایان 100 روز نگهداری وجود دارد. نتایج بدست آمده از این مطالعه بیانگر تأثیر مثبت کپسول‌های ایجاد شده با نشاسته مقاوم ذرت و کیتوزان در طی نگهداری بر روی زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها است. مطالعات متعددی نشان داده اند که افزودن نشاسته مقاوم باعث بهبود ساختار کپسول‌های تشکیل شده با آلژینات کلسیم می‌شود و منافذ موجود در ساختار کپسول‌ها توسط نشاسته پر می‌شود و ساختاری یکپارچه و یکنواخت ایجاد می‌کند (27-25). همایونی و همکاران نیز گزارش کردند که حضور نشاسته مقاوم ذرت در ساختار کپسول‌های آلژینات کلسیم، علاوه بر داشتن خاصیت پری بیوتیکی، زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را در طی 180 روز نگهداری در بستنی در دمای ^{o}C 20- ارتقا می‌بخشد (14). همچنین لایه ی پوششی ایجاد شده توسط کیتوزان، با داشتن ساختاری فیزیکی و چند کاتیونی نقش محافظتی برای کپسول‌های آلژینات کلسیم دارد (12). نتایج نشان داده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با کیتوزان و نشاسته مقاوم ذرت، دارای بیشترین زنده‌مانی در ماست است، زیرا حضور توام نشاسته مقاوم ذرت و کیتوزان علاوه بر استحکام ساختار کپسول ها، زنده‌مانی و مقاومت باکتری‌های پروبیوتیک‌ها را در برابر شرایط اسیدی ماست افزایش می‌دهند (۲۸). همچنین برخی محققان نیز 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 (30، 29). در این پژوهش، زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* بیشتر از *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بود که دلیل آن را می‌توان بی هوازی بودن بیفیدوباکتریوم‌ها در مقایسه با میکروایروفیل (Microaerophil) بودن *لاکتوباسیلوس کازئی* دانست همچنین هم زدن و وارد شدن اکسیژن به بستنی شرایط را برای زنده‌مانی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* نامساعد تر می‌کند (32، 31، 14).

ارزیابی حسی مطابق ارزیابی حسی بستنی طعم در هیچ یک از نمونه‌ها تغییری نکرده است. پذیرش کلی در طعم، رنگ و بافت همه نمونه‌ها خوب بود و بد طعمی در طول نگهداری ملاحظه نشده است و در هیچ یک از نمونه‌های بستنی شنی شدن مشاهده نشده است.

در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای زنده‌مانی آن‌ها را در بستنی بهبود ببخشد، به طوری که زنده‌مانی تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده پس از 100 روز نگهداری در حد استانداردهای جهانی بود. حضور پوشش کیتوزان علاوه بر افزایش اندازه کپسول‌ها، زنده‌مانی پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده را، به دلیل اصلاح ساختار فیزیکی، به طور قابل ملاحظه‌ای بهبود می‌بخشد. ارزیابی حسی بستنی نیز حاکی از آن بود که افزودن پروبیوتیک‌های مورد استفاده در این تحقیق تأثیر معنی‌داری بر رنگ، طعم و بافت محصول ندارد.

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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-10]

References

1. Adams M. Safety of industrial lactic acid bacteria. J Biotechnol 1999; 68(2–3):171-8.

2. Dave RI, Shah NP. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. INT DAIRY J 1997; 7(1):31-41.

3. Allan-Wojtas P, Truelstrup Hansen L, Paulson AT. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. LWT-Food Sci Technol 2008; 41(1):101-8.

4. Ahmadi A, Milani E, Madadlou A, Mortazavi S, Mokarram R, Salarbashi D. Synbiotic yogurt-ice cream produced via incorporation of microencapsulated lactobacillus acidophilus (la-5) and fructooligosaccharide. J Food Sci Technol 2012; 1-7.

5. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int J Food Microbiol 2000; 62(1–2): 47-55.

6. Aragon-Alegro LC, Alarcon Alegro JH, Roberta Cardarelli H, Chih Chiu M, Isay Saad SM. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. LWT-Food Sci Technol 2007; 40(4):669-75.

7. Mokarram RR, Mortazavi SA, Najafi MBH, 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(8):1040-5.

8. Khosravi Zanjani MA, Ghiassi Tarzi BG, Sharifan A, Bakhoda H, Mohammadi N. Effect of microencapsulation with calcium alginate and resistant maize starch on survival of *Lactobacillus casei* and sensory properties of cream-filled cake. Iranian J Nutr Sci Food Tech. 1392; 8(1): 39-48 [In persian].

9. Homayouni A, Ehsani MR, Azizi A, Yarmand MS, Razavi SH. Effect of Lecithin and Calcium Chloride Solution on the Microencapsulation Process Yield of Calcium Alginate Beads. IRAN POLYM J 2007;16(9):597-606.

10. Hansen LT, Allan-Wojtas PM, Jin YL, Paulson AT. Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiol 2002; 19(1): 35-45.

11. Fahimdanesh M, Mohammadi N, Ahari H, Zanjani MAK, Hargalani FZ, Behrouznasab K. Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of Lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum in mayonnaise sauce. Afr J Microbiol Res 2012; 6(40): 6853-8.

12. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. Int Dairy J 2004; 14(8): 737-43.

13. Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, Villarán MdC. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. Int J Food Microbiol 2010; 142(1–2): 185-9.

14. Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS, Razavi SH. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chem 2008; 111(1): 50-5.

15. Kailasapathy K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT-Food Sci Technol 2006; 39(10): 1221-7.

16. Prabaharan M, Mano JF. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. Drug Deliv. 2005; 12(1): 41-57.

17. Tsen J-H, Chen H-H, King VA-E. Survival of freeze-dried Lactobacillus acidophilus immobilized in kappa-carrageenan gel. J GEN APPL MICROBIOL 2002; 48(4): 237-41.

18. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Sada A, Orlando P. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated Lactobacillus acidophilus and survival under simulated gastrointestinal conditions. J FUNCT FOODS 2009; 1(3): 319-23.

19. Hyndman CL, Groboillot AF, Poncelet D, Champagne CP, Neufeld RJ. Microencapsulation of Lactococcus lactis within cross-linked gelatin membranes. J Chem Technol Biotechnol 1993; 56(3): 259-63.

20. Mirzaei H, Pourjafar H, Homayouni A. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of Lactobacillus acidophilus La5 and sensory

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-10]

properties in Iranian white brined cheese. Food Chem 2012; 132(4): 1966-70.

21. Khosravi Zanjani MA, Mohammadi N, Behrooznasab K, Solati AA. The effect of microencapsulation on Lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum survival under simulated gastro-intestinal condition. J Vet Clin Res 1392; 4(1): 29-39 [In persian].

22. Zhou Y, Martins E, Groboillot A, Champagne CP, Neufeld RJ. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. J APPL MICROBIOL 1998; 84(3): 342-8.

23. Muthukumarasamy P, Holley RA. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated Lactobacillus reuteri. Int J Food Microbiol 2006; 111(2): 164-9.

24. Arnaud J, Lacroix C, Choplin L. Effect of agitation rate on cell release rate and metabolism during continuous fermentation with entrapped growing. BIOTECHNOL TECH 1992; 6(3): 265-70.

25. Mohammadi N, Ahari H, Fahimdanesh M, Zanjani MAK, Anvar A, Shokri E. Survival of alginate-prebiotic microencapsulated Lactobacillus acidophilus in mayonnaise sauce. Iranian J Vet Med 2012; 6(4): 259-64.

26. Sabikhi L, Babu R, Thompkinson D, Kapila S. Resistance of Microencapsulated Lactobacillus acidophilus; LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. Food Bioprocess Technol 2010; 3(4): 586-93.

27. Brown I, Warhurst M, Arcot J, Playne M, Illman RJ, Topping DL. Fecal numbers of bifidobacteria are higher in pigs fed Bifidobacterium longum with a high amylose cornstarch than with a low amylose cornstarch. J Nutr. 1997; 127(9): 1822-7

28. Iyer A, Kailasapathy K. Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under In Vitro Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt. Journal of Food Science. 2005; 70(1); M18-M23.

29. Simonoska Crcarevska M, Glavas Dodov M, Goracinova K. Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2008; 68(3): 565-578.

30. Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. TRENDS FOOD SCI TECH 2007; 18(5): 240-51.

31. Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. Curr Issues Intest Microbiol. 2002; 3(2): 39-48.

32. Zomorodi S, Asl AK, Rohani SMR, Miraghaei S. Survival of Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium bifidum in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. Int J Dairy Technol 2011; 64(1): 84-91.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-10]

Effect of microencapsulation with chitosan coating on survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream

*Khosravi Zanjani MA[1], Mohammadi N[*2], Ahari H[3], Ghiassi Tarzi B[4], Bakhoda H[5]*

1- PhD Student in Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*2-*Corresponding Author: Young Researchers and Elites club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Email: Nima.Mohammadi@Yahoo.com*

3- Assistance prof, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Assistance prof, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

5- Assistance prof, Department of Agricultural Mechanization, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received 11 Jun, 2013 **Accepted 29 Sept, 2013**

Background and Objective: Microencapsulation with different hydrocolloids is currently used to promote the survival of probiotic bacteria in dairy products. This study encapsulated probiotics with chitosan coatings for ice cream, a dairy product stored at very low temperatures.

Materials and Methods: *Lactobacillus casei* PTCC 1608 and *Bifidibacterium bifidum* PTCC 1644 were encapsulated using calcium alginate, resistant maize starch, and chitosan and then used to inoculate ice cream. The survival and effect of free and encapsulated bacteria on the sensory attributes of ice cream were monitored over 100 d of storage at -21°C. The morphology and size of the microcapsules were measured using optical microscopy and SEM.

Results: An increase in the number of surviving cells was observed because of the protection of cells by microencapsulation. The survival of microencapsulated probiotic bacteria coated with chitosan increased over uncoated cells ($p < 0.05$). The incorporation of free and encapsulated probiotic bacteria do not substantially alter the overall sensory characteristics of the product.

Conclusion: Microencapsulation with resistant maize starch and chitosan coating enhanced the survival of probiotic bacteria significantly in ice cream during storage compared to free cells.

Keywords: Probiotic, Microencapsulation, Ice-cream, Resistant maize starch, Chitosan

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-05-10]