**مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران**
**سال سیزدهم، شماره 2، تابستان 1397، صفحات 70-61**

# اثر ریزپوشانی و فیبر بر قابلیت زنده مانی دانک‌های *بیفیدو باکتریوم بیفیدوم* PTCC1644 در شرایط شبیه سازی شده معده و یخچال

سمیه سیف زاده[1]، محمد علی نجفی[2]، ناصر سلطانی تهرانی[3]

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 دریافت: 96/10/15 تاریخ پذیرش: 97/1/25

## 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 مانی 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. دانک‌های به دست آمده به لحاظ کارایی ریزپوشانی (%)، نرخ زنده مانی (%) 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 مانی 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 مانی در برابر شرایط محیطی و معده در مقایسه با تیمارها مشابه و بدون فرایند تثبیت شد. داده‌های به دست در قالب طرح کاملا 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

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 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 موردتوجه قرار گرفته است (6، 1). ایزوله پروتئین آب پنیر از جمله رایج‌ترین زیست بسپارها است که با دارا بودن مقادیر بالای بتا-لاکتوگلوبولین (ß-Lactoglobulin) از ویژگی ژل‌دهی و پوشش‌دهی مناسبی در فرآیند ریزپوشانی برخوردار است. خصوصیات فیریکوشیمیایی هیدروژل پروتئین آب پنیر

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03 ]

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 : آلژینات سدیم) باعث افزایش کارایی ریزپوشانی شده است. Chitprasert و همکاران (9) تأثیر فیبر سبوس برنج همراه با ترکیب کربوکسی‌متیل‌سلولزآلومینیوم (1:1، فیبر : پلیمر) را بر کارایی ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس روتری* (*Lactobacillus reuteri*) بررسی و گزارش نمودند فرایند تثبیت باعث کاهش راندمان کارایی شده است. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد تاکنون تحقیقاتی در خصوص تأثیر فرآیند تثبیت *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* (*Bifidobacterium bifidum*) بر روی فیبر انجام نشده است. در این پژوهش هدف تهیه دانک *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* برپایه ترکیبات پکتین، ایزوله پروتئین آب‌پنیر و نیز تثبیت سلولی بر روی فیبر گندم است بطوری که که بتواند کارایی ریزپوشانی و قابلیت زنده مانی را در شرایط انبارداری سرد (30 روز، دمای 4 درجه سانتی‌گراد) 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 آلدریچ 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 agar)، اسید کلریدریک، کلرید سدیم، پپتون واتر، گلیسرول و هیدروکسید سدیم از شرکت مرک آلمان و روغن آفتاب‌گردان 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 MRS + *ال سیستئین هیدروکلراید* (0/5 درصد) + *سدیم تیوگلیکولات* (0/2 درصد) + *کلراید کلسیم دو آبه* (0/1 درصد) تلقیح و در شرایط بی هوازی به داخل انکوباتور شیکردار (72 ساعت، 37 درجه سانتی‌گراد، 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 سانتی‌گراد) کلنی خالص به محیط کشت مایع منتقل و مجددا گرمخانه گذاری (24 ساعت، 37 درجه سانتی‌گراد، 120 rpm) شد. جهت تثبیت سلولی مقدار 5 میلی‌لیتر از کشت به دست آمده به همراه فیبر گندم در نسبت 1:1 (بسپار : فیبر) به 45 میلی‌لیتر محیط کشت استریل اضافه و مجدداً گرمخانه گذاری (24 ساعت، 37 درجه سانتی‌گراد، 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 پپتون (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 آب‌پنیر طبق روش Çabuk و Harsa Tellioglu (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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه) فورا 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/ ژل‌سازی با کمی تغییر طبق روش Nualkaekul و همکاران تهیه شدند (12). بدین منظور 1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده از کشت 24 ساعته *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* PTCC 1644 حاوی $1/5\times10^{8}$ log Cfu/g با 9 میلی‌لیتر از هرکدام 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 آفتاب‌گردان 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

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03 ]

$CaCl_2$ (0/1 مولار) افزوده شد. سوسپانسیون به دست آمده توسط همزن مغناطیسی همزده شده (160 rpm، مدت 30 دقیقه) تا دیواره استحکام یابد. سپس مجددا 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). دانک‌های رسوب یافته پس از دو مرتبه شستشو با آب مقطر استریل (14) به روش انجمادی ( Armfield، انگلستان) خشک و تا زمان انجام آزمایشات درون کیسه‌های پلاستیکی استریل جداگانه، در دمای 4 درجه سانتی‌گراد (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 10دقیقه در دمای محیط مخلوط شد. تعداد سلول‌ها طبق توضیحات داده شده در مرحله تکثیر، شمارش و کارایی ریزپوشانی به کمک فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد زنده مانی = $(N/N0)\times100$

N : تعداد سلول‌های زنده در دانک (log Cfu/g) ، $N_0$ : تعداد سلول‌های زنده (log Cfu/g) در سوسپانسیون.

**نرخ زنده‌مانی سلول‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده معده:** مقدار 1 گرم از دانک‌های تهیه شده به 10 میلی‌لیتر شیره شبیه‌سازی 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 سانتی‌گراد) 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 پپتون 0/1 مطابق توضیحات بخش تکثیر، شمارش گردیدند (10).

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

**تعیین خصوصیات مورفولوژی دانک:** خصوصیات مورفولوژی دانک‌ها به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (LEO1430VP ، آلمان- انگلستان) در دانشگاه محقق اردبیلی تصویربرداری گردید. بدین منظور مقداری از دانک‌های *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 پوشش‌دهی و از بخش‌های مختلف تصویربرداری شد (16).

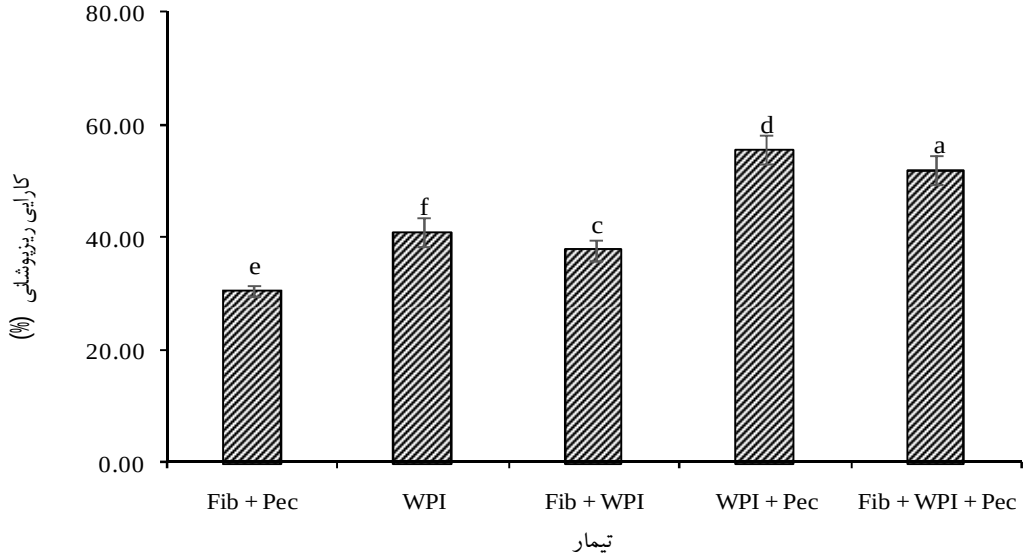
**روش تجزیه و تحلیل اطلاعات:** در این تحقیق جنس جداره دانک در 7 سطح شامل ریزپوشانی با محلول پکتین (Pec)، تثبیت سلولی و ریزپوشانی با محلول پکتین (Fib + Pec)، ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر (WPI)، تثبیت سلولی و ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر (Fib + WPI)، ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر و پکتین (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 آزمون‌ها سه بار تکرار و آنالیز آماری داده ها بر پایه آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و مقایسه میانگین داده‌ها به کمک آزمون دانکن در سطح اطمینان 95 درصد با استفاده از نرم افزار SAS نسخه 9/1 صورت پذیرفت.

## • یافته‌ها

شکل 1 نتایج حاصل از تأثیر پوشش‌های مختلف بر کارآیی ریزپوشانی باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* PTCC 1644 را نشان می‌دهد.

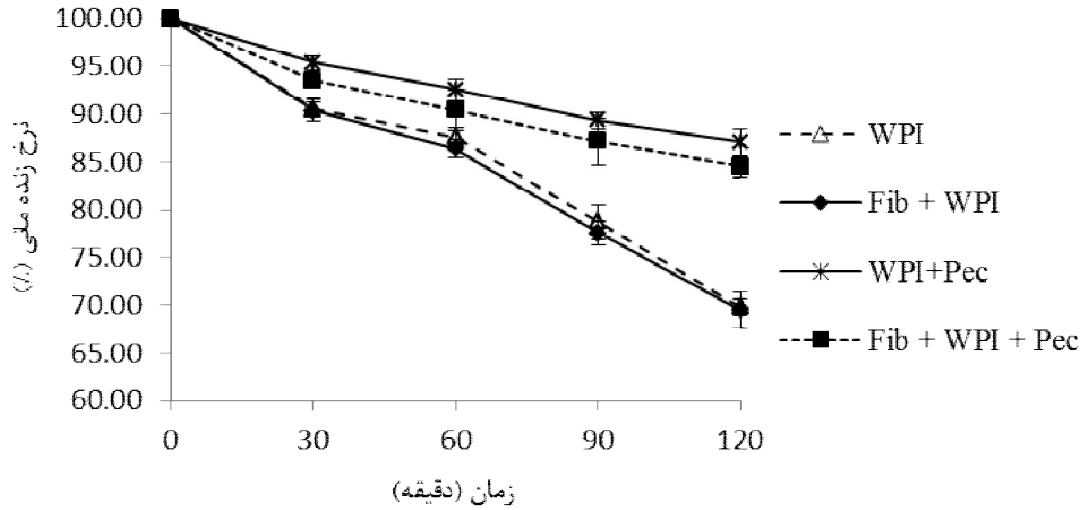
بررسی کارآیی ریزپوشانی تیمارهای مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آنها با یکدیگر است ($p<0/05$). شکل 1 نشان می‌دهد استفاده ترکیبی پکتین و ایزوله پروتئین آب پنیر (52/01- 55/60%) در مقایسه با کاربرد تنهایی ایزوله پروتئین آب پنیر (37/83 - 41/07%) و پکتین (30/51 - 34/96%)، باعث افزایش کارآیی ریزپوشانی شده 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 کارآیی 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 ($p<0/05$).

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03 ]




**شکل1.** 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.

نتایج داده‌های مربوط به نرخ زنده مانی دانک‌های باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC1644* در شرایط شبیه‌سازی شده معده در شکل2 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 مانی پس از 120 دقیقه به ترتیب در تیمارهای (87/09%) WPI + Pec، (84.53%) Fib + WPI + Pec ، (69/79%) WPIو (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.

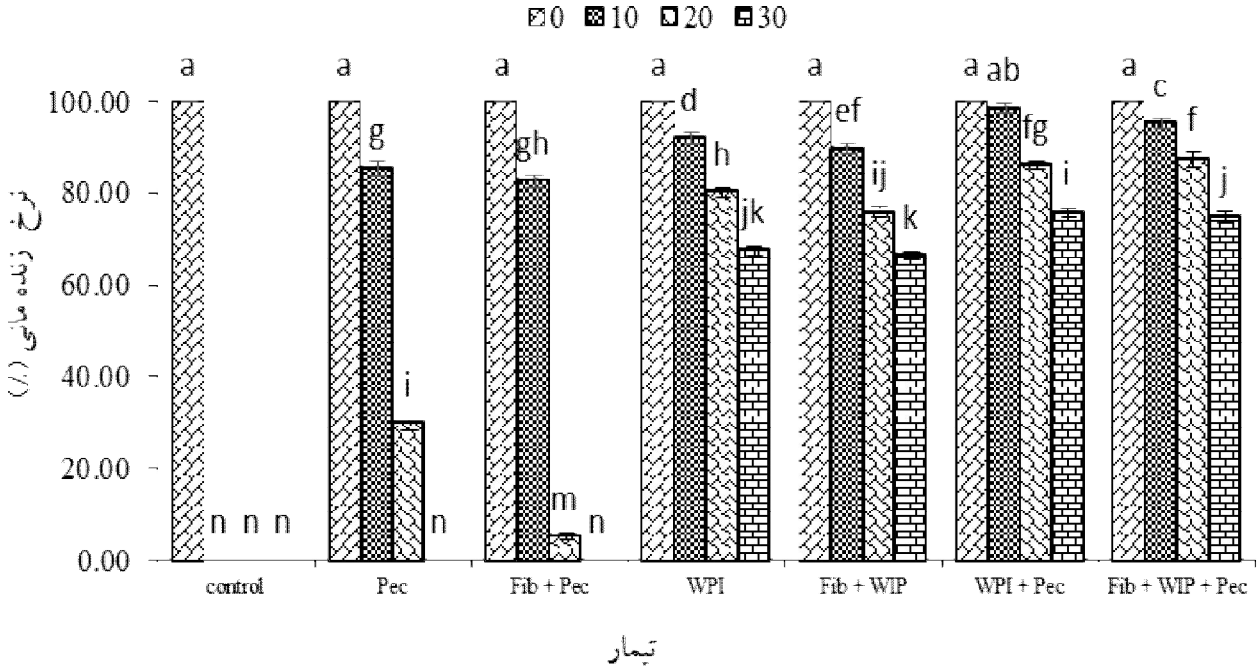



**شکل 2.** نرخ زنده‌مانی دانک های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC 1644 در شرایط شبیه‌سازی شده معده با pH=1/5. Pec : ریزپوشانی با محلول پکتین، Fib + Pec: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پکتین، WPI: ریزپوشانی با محلول پروتئین آب پنیر، Fib + WPI: فرآیند تثبیت بر روی فیبر و ریزپوشانی با محلول پروتئین 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.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03 ]

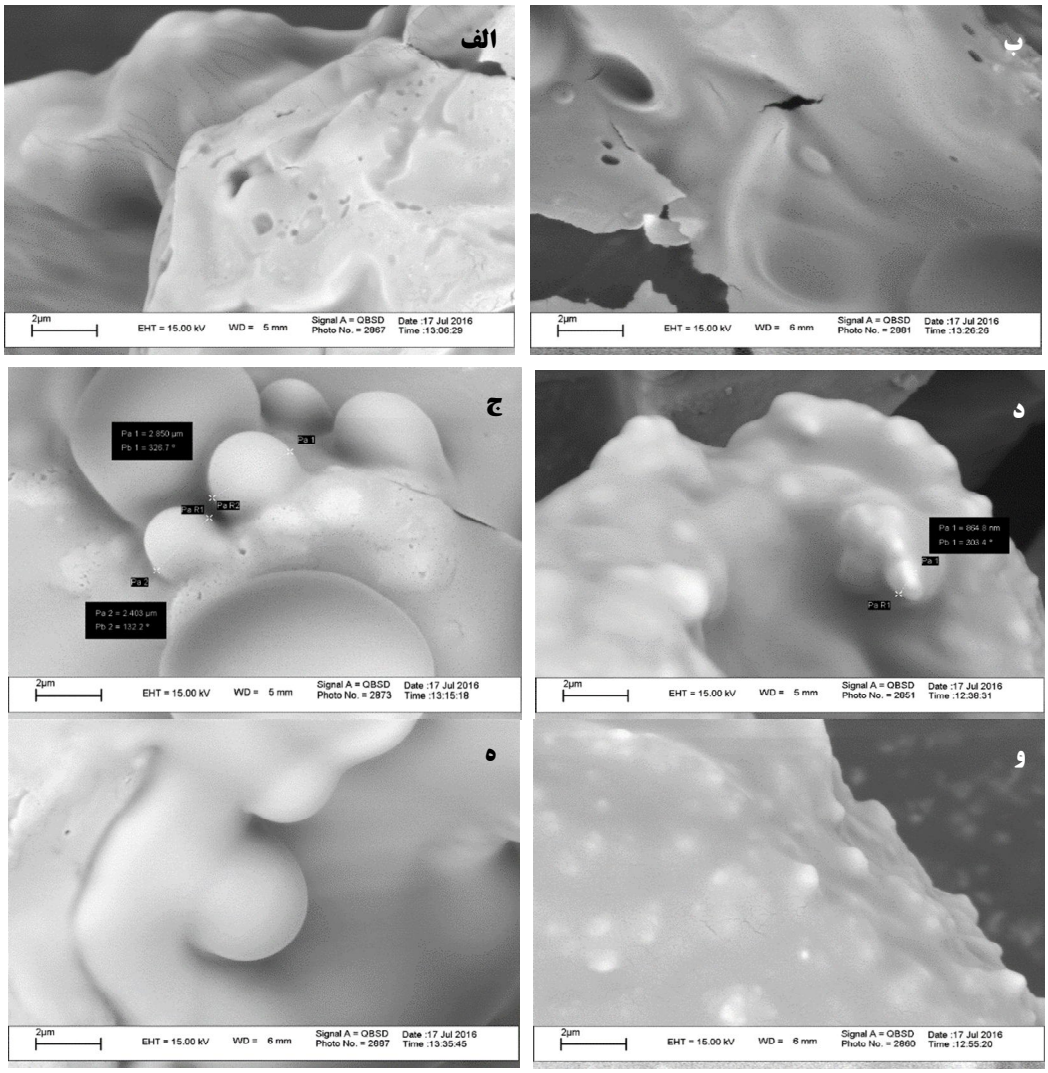
نرخ زنده‌مانی دانک‌های حاوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* PTCC 1644 در مدت 30 روز نگهداری (دمای 4 درجه سانتی‌گراد) در شکل 3 نشان داده شده است. در تمامی تیمارها (به استثناء تیمار WPI + Pec در روزهای صفر و 10 ) مدت زمان نگهداری تأثیر معنی‌داری بر کاهش نرخ زنده مانی داشت ($p<0/05$). بیشترین کاهش نرخ زنده مانی 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 زندمانی در روز سی‌ام به ترتیب در تیمارهای WPI + Pec (75/77%)، Fib + WPI + Pec (74/66%)، WPI (67/61%) و Fib + WPI (66/53%) دیده شد ($p<0/05$)، حال آنکه این مقدار برای تیمارهای Pec و Fib + Pec صفر درصد بود. شکل 4 تصاویر میکروسکوپ روبشی دانک‌های تهیه شده را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود سلول‌ها بطور کامل درون پوشش قرار گرفته و اجزاء کروی شکلی را تشکیل داده اند. ریخت شناسی دانک های تهیه شده از بسپار پکتین (شکل 4- الف) ترک‌ها و حفراتی را نشان می‌دهد که در مقایسه با دانک تیمار Fib + Pec (شکل 4- ب) مقدار آن کمتر است. همچنین در دانک تهیه شده با ایزوله پروتئین آب پنیر (شکل 4- ج) تراکم بیشتری از سلول‌های منفرد را به همراه ترک خوردگی‌ها و حفرات کوچک دیده می‌شود که در مقایسه با تیمارهای Pec و Fib + Pec کمتر می‌باشد.

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




**شکل3.** نرخ زنده‌مانی (%) باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* PTCC 1644 در طی زمان‌های مختلف نگهداری (دمای 4 درجه سانتی‌گراد).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.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03 ]




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

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). Shaharuddin و Muhamad 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 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

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03 ]

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 احتمالا می‌تواند تفاوت قابلیت زنده مانی دانک های 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، دانک های 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 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 ثبیت 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 تغیر 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 رامنوسوس* 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%) پژوهش 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.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03 ]

## • 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, Tellioğlu 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 onsurvivability of potential probiotic bacteria insimulated gastric and intestinal juice. Food Res Int 2009; 42: 1040-1045.
17. Chávarri M, Marañón 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*


[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03 ]

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, Bekatoroua A, Banat IM, Marchant R, Koutinasa AA. Immobilization technologies and support materials suitable inalcohol 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.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03 ]

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

*Saifzadeh S[1], Najafi M.A*[2], Soltani Tehrani N [3]*

*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:** icroencapsulation 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

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-03 ]