Archive of SID

مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۲، ۲۰۵-۱۹۵
Original Article
Journal of Veterinary Research. 72,2:195-205, 2017

مطالعه اثر نانوکپسولاسیون عصاره چای سبز بر زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی سیمبیوتیک

نگین نوری* بهشاد نوعدوست حسن گندمی نصرآبادی افشین آخوندزاده بستی
گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۳۱ مهر ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۱۵ دی ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: علیرغم فواید بسیار ترکیبات طبیعی از جمله عصاره چای سبز، استفاده از آن‌ها در تولید مواد غذایی و دارویی کاربرد محدودی دارد. امروزه کپسولاسیون ترکیبات طبیعی در نانولیپوزوم‌ها به عنوان یک روش مناسب و کارامد جهت محافظت این مواد طی فرایند تولید و نگهداری، مورد استفاده قرار می‌گیرد. **هدف:** در این مطالعه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم‌های عصاره چای سبز و فعالیت پری بیوتیکی آن بر روی دو پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در محیط کشت و بستنی بررسی شد. **روش کار:** ابتدا عصاره آبی چای سبز به روش فیلم نازک کپسوله شده و توسط امواج مافوق صوت به اندازه‌های نانو در آمدند. به منظور بررسی خواص پری بیوتیکی نانولیپوزوم‌های عصاره چای سبز، ۱٪ از این عصاره در حضور دو پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس به محیط کشت و بستنی اضافه شدند. **نتایج:** میانگین قطر نانولیپوزوم‌های بدست آمده، حدود ۱/۹ nm ±۴۴/۷ با شاخص پراکندگی ۰/۰۱۴ ± ۰/۲۰۳، و میزان محصور سازی عصاره چای سبز نانولیپوزومی تحت شرایط بهینه ۹۷٪ بود. علاوه بر این، افزودن ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی در محیط کشت، رشد لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس را به طور معنی‌داری افزایش داد. در بین گروه‌های مورد مطالعه، کمترین کاهش در میانگین لگاریتم تعداد لاکتوباسیلوس کازئی در طول مدت زمان نگهداری در بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی معادل log ۱/۵۹ و بیشترین کاهش در بستنی‌های گروه کنترل برابر با log ۴/۱۶ مشاهده شده است. همچنین کمترین اختلاف در میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی معادل log ۰/۸۴ و بیشترین اختلاف در بستنی‌های گروه کنترل برابر با log ۴/۴ بدست آمده است. **نتیجه گیری نهایی:** نانو کپسولاسیون عصاره چای سبز اثر معنی‌داری در رشد و زنده مانی پروبیوتیک‌ها در محیط کشت و بستنی دارد و می‌توان از این روش به منظور افزایش بقای پروبیوتیک‌ها طی فرایند تولید و نگهداری مواد غذایی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: عصاره چای سبز، کپسولاسیون نانولیپوزومی، خواص پری بیوتیکی ، بستنی

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستندکه مصرف منظم وکافی آن‌ها با بهبود خواص میکروبی روده، اثرات سودمندی برسلامت مصرف کننده می‌گذارد. برای تحقق این آثارسلامتی بخش مصرف منظم ۱۰۶الی ۱۰۹سلول زنده توصیه می‌گردد (۲۸). پری بیوتیک‌ها ترکیبات الیگوساکاریدی غیر قابل هضمی هستند که اثرات فیزیولوژیکی مفید خودرا بر میزبان از طریق تحریک رشد انتخابی پروبیوتیک‌ها اعمال می‌کنند (۳۳). یک ماده غذایی حاوی پروبیوتیک و پری بیوتیک را سیمبیوتیک یا غذای فراویژه می‌نامند (۱۱). بین پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها در فراورده‌های سیمبیوتیک اثر سینرژیستی وجود دارد. پری بیوتیک‌ها ترکیباتی هستندکه به عنوان منبع کربن یا انرژی در کولون توسط پروبیوتیک‌ها مصرف می‌شوند و در نتیجه باعث افزایش تعداد پروبیوتیک‌ها و کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماریزا در روده می‌شوند (۳۰). امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها بصورت مکمل‌های خوراکی ویا ترکیب با فرآورده‌های غذایی درحال افزایش است. بستنی از یک سو به دلیل داشتن قابلیت بالا در بقای پروبیوتیک‌ها و از سوی دیگر پر طرفدار بودن به سبب دارا بودن خواص حسی ویژه، محیط مناسبی برای انتقال پروبیوتیک‌ها به بدن است (۹،۱۶).

البته، احتمال ناشی از شوک سرمایی و کاهش درجه فعال بودن باکتری‌ها پس از ورود به بدن را، نباید نادیده گرفت. جهت اثربخشی غذاهای پروبیوتیک لازم است که میکروارگانیسم‌ها تازمان مصرف موادغذایی مذکور، ازبقای مناسبی برخوردار بوده و به تعدادکافی به روده برسند (۲۵). باکتری‌های پروبیوتیک به شرطی قادرند اثرات مفید خود را بر سلامت مصرف کننده بگذارند که به تعداد ($۱۰^۷$ CFU/g) و زنده به روده بزرگ برسند. به همین دلیل از دغدغه‌های اصلی تولید کنندگان این محصولات زنده مانی این باکتری‌ها طی زمان نگهداری محصول و همچنین بقای این پروبیوتیک‌ها در مواجهه با اسید معده و املاح قلیایی صفرا در ابتدای روده باریک می‌باشد (۳۰).

نانوکپسولاسیون یکی از روشهای نوین جهت افزایش پایداری فیزیکی ترکیبات فعال زیستی، محافظت آن‌ها در مقابل عوامل نامساعد محیطی و همچنین اثرات تداخلی ترکیبات غذایی می‌باشد. این روش شامل دستکاری اتم‌ها و مولکولها بوده که منجر به ایجاد ساختارهایی در اندازه نانو شده (اغلب ۱۰۰nm یا کمتر) که باعث حفظ خواص آن نیز می‌گردد. نانوکپسولاسیون به عنوان یک تکنولوژی نوین در بسته بندی مواد فعال به اندازه‌های کوچک با استفاده از تکنیک‌هایی مانند نانو کمپوزیت، نانو امولسیفیکاسیون، نانوساختارها و در نهایت فراهم کردن محصول نهایی

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۶۷-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: nnoori@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

فراسودمند که آزاد سازی کنترل شده هسته را در بر می‌گیرد، استفاده می‌شود. ترکیبات نانوکپسوله به دلیل اندازه کمتر از سلولشان، از فعالیت زیستی بالاتری برخوردار هستند. همچنین از این روش جهت حفاظت از ترکیبات فعال در مقابل عوامل محیطی مانند اکسیژن، نور، رطوبت و pH نیز استفاده می‌شود. یکی از انواع نانوساختارها، لیپوزوم‌ها هستند. لیپوزوم‌ها در واقع وزیکول‌های ریز و توخالی دارای یک یا چند غشا لیپیدی دولایه هستند که در مرکز آن‌ها هسته مایعی قرار دارد و می‌توانند مواد فعال را در فضای درونی خود به دام بیندازند. کپسولاسیون توسط لیپوزوم‌ها از مواد فعال زیستی در مقابل هضم در دستگاه گوارش محافظت کرده، میزان جذب گوارشی را افزایش داده که در نهایت باعث افزایش فراهمی زیستی و فعالیت زیستی آن‌ها می‌شود (۲۷). سازگاری زیستی، سایزهای وزیکولی مختلف و شارژ سطحی، از ویژگی‌های نانولیپوزوم‌ها می‌باشد (۱۷).

چای سبز با نام علمی (Camellia sinensis) یکی از رایج ترین گیاهان دارویی پر مصرف در جهان است که در انواع محصولات آرایشی، دارویی و غذایی ازجمله بستنی کاربرد دارد. چای سبز ترکیبات پلی فنولی (کاتچین) بیشتری از چای سیاه (چای سبز اکسید شده) دارد. اثرات سلامت بخش چای سبز عبارتند از: کاهش خطرات بیماری‌های قلبی عروقی، کاهش بروز بعضی از سرطان‌ها، ضد فشار خون، کنترل وزن بدن به علت کاهش اشتها، خاصیت ضد باکتریایی و ضد ویروسی، محافظت در برابر اشعه ماورا بنفش خورشید، افزایش تراکم استخوان و تأثیر مثبت بر عملکرد سیستم عصبی. یکی دیگر از خواص چای سبز، پری بیوتیک بودن آن است که باعث افزایش رشد پروبیوتیک‌ها می‌شود (۲). ترکیبات چای سبز فراهمی زیستی پایینی دارند و همچنین ناپایدار بودن در طی فرایند تولید و نگهداری و عدم تحمل شرایط نامساعد محیطی علی رغم اثرات سودمند باعث محدودیت استفاده از اثرات مفید آن می‌شود (۱۲).

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر نانوکپسولاسیون عصاره چای سبز بر بقای باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی سیمبیوتیک و بررسی خواص حسی آن می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه و آماده سازی پروبیوتیک‌ها: در این مطالعه از باکتری‌های پروبیوتیک لیوفلیزه (*Lactobacillus casei*-۰۱Lc) و (*Bifidobacterium lactis*-۱۲Bb) که از شرکت (Horsholm, Denmark) CHR Hansen تهیه شده، استفاده شد و در محیط کشت MRS-broth در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت فعال گردیدند. سلول‌های پروبیوتیکی در انتهای فاز رشد لگاریتمی به وسیله سانتریفوژ (Kobuta model ۵۵۰۰ Tokyo, Japan) ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C جدا سازی شده و پس از دو بار شستشو با سرم فیزیولوژی استریل، رسوب باکتریایی را جدا کرده و از آن در تهیه بستنی سیمبیوتیک استفاده گردید.

تهیه میزان تلقیح باکتری‌ها: برای تهیه دز تلقیح باکتری، به روش جذب نوری، از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده، مقدار مناسبی به داخل کووت منتقل شد و جذب نوری باکتری در طول موج ۶۰۰ nm روی عدد ۱ تنظیم گردید. سپس سوسپانسیون باکتریایی با غلظت ۱۰ برابرجذب نوری ۱ تهیه شد. پس از تهیه سری رقت، در پلیت‌های حاوی محیط MRS Agar به صورت سطحی و دوگانه کشت داده شدند و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، پرگنه‌ها شمارش شد. تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس به ترتیب $۱/۲\times۱۰^{۹}$ CFU/ml و ۱×۱۰^{۹} محاسبه گردید.

تهیه عصاره آبی چای سبز: برگ‌های چای سبز از مزارعی درشمال ایران جمع آوری شد. عصاره آبی چای سبز با مخلوط کردن برگ‌های چای خرد شده در آب مقطر (۱ به ۱۰ w/v، ۱۰۰°C) تهیه شد. به مدت ۱۰ دقیقه همراه با همزدن به جوش آمده و به وسیله فیلتراسیون ذرات جامد آن گرفته شد. عصاره حاصله در ۶۰°C خشک گردید و در ۴°C تا هنگام استفاده ذخیره شد (۲۳).

تهیه نانولیپوزوم حاوی عصاره آبی چای سبز: مقادیر مناسبی از لسیتین، کلسترول DSP-mPEG ۲۰۰۰ (۱و ۲ دی استرول فسفاتیدیل اتانول آمین - متیل- پلی اتیلن گلیکول کونژوگه - ۲۰۰۰ (سدیم + نمک)) (Nanocs, USA) در ml ۵ اتانول حل شده و پس از انتقال به بالن ته گرد به دستگاه روتاری تحت خلا (IKA, Germany) با دمای ۵۰°C متصل گردید . بعد از تبخیر حلال، لایه نازک فاز لیپیدی در سطح داخلی بالن ته گرد دیده شد. سپس فاز آبی که حاوی ۱۰ml آب دیونیزه به همراه عصاره چای سبز می‌باشد، به بالن اضافه و مجدداً به دستگاه روتاری بدون خلا، در دمای ۳۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه به منظور حل شدن کامل فاز لیپیدی در فاز آبی متصل شد، و در نهایت سوسپانسیون لیپوزومی تشکیل گردید (۴،۶).

سپس به منظور کاهش اندازه و تولید نانولیپوزوم‌ها در سایز مناسب از دستگاه سونیکاسیون (mesonix sonicator, Melville, New York, USA) یا امواج مافوق صوت استفاده شد.

خواص فیزیکوشیمیایی ومورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی: در این مطالعه خصوصیات فیزیکوشیمیایی عصاره چای سبز نانولیپوزومی، ازجمله میزان محصورسازی، اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا، مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی میزان محصورسازی عصاره چای سبز در نانولیپوزوم‌ها و همچنین جدا کردن عصاره آزاد از نانولیپوزوم‌ها از روش دیالیز به شرح زیر استفاده شد (۷،۲۹). ابتدا ml ۳ محلول لیپوزومی حاوی عصاره را در یک کیسه دیالیز استات سلولز (۱۲۰۰۰ وزن مولکولی، کانادا) ریخته (Spectrum, ,۱۲,۰۰۰ Spectra/ Por, MW cut-off Canada) و در ml ۸۰۰ آب دیونیزه غوطه‌ور نمودیم و سپس با سرعت ۳۰ دور در دقیقه با استفاده از همزن (Kartell Italy ,Model TK۲۲) همزده شد. نمونه‌های گرفته شده ازمحلول اصلی درفواصل زمانی مشخص، با

www.SID.ir

Archive of SID

حجم مساوی ازحلال تازه جایگزین و در نهایت میزان عصاره چای سبز آزاد در ۲۷۰nm خوانده شد. (Shimadzu, Markham, ۱۶۰۱-UV Ontario, Canada). این آزمایش هنگامی که میزان غلظت عصاره در برداشت‌های متوالی از محلول ثابت گردید، متوقف و سپس درصدکپسولاسیون و بازده باتوجه به معادله زیرتعیین گردید:

میزان محصورسازی٪ = ((عصاره کل مقدار)-(شده آزاد عصاره))/((عصاره کل مقدار)) × ۱۰۰

ذرات نانولیپوزوم توسط دستگاه (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA) DLS اندازه گیری شد و پتانسیل زتا نیز با دستگاه اندازه گیری زتا (Malvern Instruments, England, UK) تعیین شد. آزمایشات با سه تکرار برای هر نمونه انجام شد. همچنین ریخت شناسی نانولیپوزوم‌های چای سبز توسط میکروسکوپ الکترونی (KV, Germany ۸۰ – Zeiss – EM۱۰C) مشاهده گردید.

ارزیابی اثر عصاره چای سبز نانولیپوزومی بر رشد لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در محیط کشت: به منظور بررسی فعالیت پری بیوتیکی عصاره چای سبز به دو فرم آزاد و نانولیپوزومی بر روی دو باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (Lc-۰۱) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (Bb-۱۲)، میزان 10^3 CFU/ml از سوسپانسیون باکتری به MRS ۲۰ ml broth حاوی ۱٪ عصاره آزاد و نانولیپوزومی تلقیح و در ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. میزان رشد باکتری در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت، بوسیله تهیه سری رقت و کشت ۱۰۰ µl از آن در MRS agar مورد بررسی قرار گرفت. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C در شرایط هوازی برای لاکتوباسیلوس کازئی و بی هوازی برای بیفیدوباکتریوم لاکتیس نگهداری شدند. میزان رشد باکتری با شمارش کلونی‌های رشد کرده، محاسبه گردید.

تهیه و آماده سازی بستنی سیمبیوتیک: ابتدا یک لیتر شیر استریل و هموژنیزه را با ۴۰۰g خامه ۳۰ ٪ مخلوط کرده و روی شعله قرار می‌دهیم تا درجه حرارت مخلوط به ۴۰°C برسد، سپس در این درجه حرارت مواد خشک شامل ۱۰۰g گرم پودر شیرخشک، ۲۷۰g شکر، ۰/۹g وانیل و ۱۰g پایدار کننده (پودر ثعلب) را با هم زن برقی مخلوط و درجه حرارت را به ۸۰°C می‌رسانیم. سپس مخلوط را به مدت ۲۰ دقیقه در این درجه حرارت هم می‌زنیم. سپس مخلوط بستنی به شش گروه (A، B، C، D، E و F) تقسیم شد. ۱٪ (w/v) از باکتری لاکتوباسیلوس کازئی به گروه A,B,E و ۱٪ (w/v) از باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس به گروه C ,D ,F تلقیح کردیم. در شمارش، تعداد اولیه این باکتری‌ها به طور تقریبی معادل 10^7 CFU/g × ۹/۱۵ و 10^7 × ۸/۰۵ بدست آمد. همچنین به گروه A, C ۱٪ عصاره چای سبز آزاد و به گروه B, D ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی اضافه گردید. لازم به ذکر است گروه E و F فاقد هر نوع عصاره بودند. در نهایت مخلوط بستنی به دستگاه بستنی ساز خانگی (Elegant, Italy) منتقل شد و به مدت ۱۵ دقیقه در بستنی ساز مخلوط شده تا قوام و بافت مورد نظر حاصل گردد. در پایان، نمونه‌ها به صورت ۵۰g در ظروف درب‌دار مخصوص توزین و در فریزر ۱۸- °C تا ۱۸۰ روز نگهداری شدند.

اثر عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر بقای لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی: پس از ذوب شدن بستنی در دمای محیط، ۰/۵ml از آن را به لوله حاوی ۴/۵ml آب پپتونه ۰/۱ ٪ منتقل نمودیم . پس از تهیه رقت‌های متوالی، از هر رقت ۱۰۰µl برداشته و در پلیت‌های حاوی MRS Agar، به صورت سطحی کشت داده شد. جهت شمارش لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس، پلیت‌های کشت داده شده، در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت به ترتیب به صورت هوازی و بی هوازی گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت کلونی باکتری‌ها شمارش گردید.

آنالیز شیمیایی: کلیه آنالیزهای شیمیایی برطبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۴۵۰ انجام شد (۱۴). برای اندازه گیری pH از دستگاه pH متر دیجیتالی (Laboratory benchtopmmeter.modle ۸۶۵۰۲ph/ mv/orp meter) استفاده گردید. اسیدیته محصول براساس روش دورنیک، میزان چربی بستنی با استفاده از روش ژربر و ماده خشک با استفاده از خشک کردن در آون با دمای ۱۰۵°C به مدت ۵h اندازه گیری شد. کلیه آزمایشات شیمیایی با دو تکرار انجام شد.

بررسی خواص حسی بستنی: ارزیابی حسی نمونه‌های بستنی سیمبیوتیک توسط ۵ نفر از دانشجویان و اعضای هیئت علمی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بر طبق استاندارد ۴۹۳۷ انجام شد (۱۳).

نمونه‌های بستنی شامل ۴ گروه حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی و دو گروه کنترل (فاقد هر گونه عصاره) بود. نمونه‌ها از نظر ظاهر، بو و عطر، طعم و مزه، بافت و در نهایت پذیرش کلی مورد ارزیابی قرار گرفتند و به آن‌ها نمره ۰ تا ۵ داده شد. ویژگی‌های ارزیابی شده شامل درجات زیر می‌باشد:

مطابقت کامل ویژگی‌های حسی بستنی با ویژگی‌های تعیین شده در استاندارد مربوطه= نمره ۵، حداقل انحراف از ویژگی‌های حسی تعیین شده در استاندارد مربوطه = نمره ۴، انحراف محسوس از ویژگی‌های حسی تعیین شده در استاندارد مربوطه = نمره ۳، انحراف زیاد از ویژگی‌های حسی تعیین شده در استاندارد مربوطه = نمره ۲، انحراف بسیار زیاد از ویژگی‌های حسی تعیین شده در استاندارد مربوطه = نمره ۱، نامناسب برای مصرف انسان = ۰

تجزیه وتحلیل آماری: نتایج حاصل از اثر عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر رشد و بقای لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در محیط کشت و بستنی به روش آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی و برای مقایسه بین میانگین‌ها از تست Tukey استفاده شد. همچنین تفاوت

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی همراه با عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزوم شده در بستنی سیمبیوتیک طی ۱۸۰ روز نگهداری در شرایط انجماد (درصد).

زمان (روز) / نمونه‌های بستنی	۱	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
لاکتوباسیلوس کازئی فاقد چای سبز	۹۵/۸۵	۸۵/۵۵	۸۲/۱۶	۷۳/۶۱	۷۱/۲۳	۶۰/۸۰	۴۷/۷۳
لاکتوباسیلوس کازئی همراه با چای سبز آزاد	۹۷/۲۳	۹۳/۷۱	۸۲/۵۳	۸۰/۹۰	۷۱/۹۸	۶۹/۷۲	۷۰/۶۰
لاکتوباسیلوس کازئی همراه با چای سبز نانولیپوزوم	۹۸/۱۱	۹۴/۵۹	۸۵/۰۵	۸۷/۳	۸۳/۷۹	۸۱/۹۰	۸۰/۰۲

جدول ۲. زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزوم شده در بستنی سیمبیوتیک طی ۱۸۰ روز نگهداری در شرایط انجماد (درصد).

زمان (روز) / نمونه‌های بستنی	۱	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
بیفیدوباکتریوم لاکتیس فاقد چای سبز	۹۵/۸۲	۸۴/۸۱	۸۱/۸۹	۷۳/۹۲	۵۸/۱۰	۴۶/۵۸	۴۴/۳۰
بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با چای سبز آزاد	۹۶/۵۸	۹۴/۹۳	۸۶/۹۲	۸۴/۶۸	۸۴/۱۷	۶۹/۸۷	۶۴/۶۸
بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با چای سبز نانولیپوزومی	۹۷/۵۶	۹۶/۴۵	۹۵/۰۶	۹۳/۱۶	۹۱/۶۴	۹۰/۸۶	۸۹/۳۶

جدول۳. ویژگی‌های شیمیایی نمونه‌های بستنی حاوی پروبیوتیک‌های همراه با عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزوم. *میانگین ± انحراف معیار.

ویژگی‌ها / نمونه‌های بستنی حاوی	pH	اسیدیته (g/l)	چربی (٪)	ماده خشک بدون چربی (٪)
لاکتوباسیلوس کازئی بدون عصاره چای سبز	۶/۴۶ ± ۰/۰۱*	۲/۶۱ ± ۰۰/۰	۶/۱۵ ± ۰/۰۲	۳۰/۷۵ ±۰/۰۲
لاکتوباسیلوس کازئی همراه با عصاره چای سبز آزاد	۶/۴۳ ± ۰/۰۱	۲/۶۱ ± ۰/۰۱	۶/۱۵ ± ۰/۰۲	۳۰/۸۳ ±۰/۰۴
لاکتوباسیلوس کازئی همراه با عصاره چای سبز نانولیپوزوم	۶/۴۳ ± ۰/۰۱	۲/۶۱ ± ۰/۰۱	۶/۱۲ ± ۰/۰۱	۳۰/۸۵± ۰/۰۲
بیفیدوباکتریوم لاکتیس بدون عصاره چای سبز	۶/۴۶ ± ۰/۰۲	۲/۶۰ ± ۰۰/۰	۶/۱۴ ± ۰/۰۱	۳۰/۸۶ ± ۰/۰۱
بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با عصاره چای سبز آزاد	۶/۴۴ ± ۰/۰۱	۲/۶۲ ± ۰/۰۲	۶/۱۳ ± ۰/۰۲	۳۰/۷۵ ± ۰/۰۴
بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با عصاره چای سبز نانولیپوزوم	۶/۴۳ ± ۰/۰۲	۲/۶۳ ± ۰/۰۴	۶/۱۶ ± ۰/۰۵	۳۰/۷۶ ± ۰/۰۲

در ویژگی‌هـای ارگانولپتیک با اسـتفاده از آنالیز واریانـس و روشLeast Significant differences Fisher,s ارزیابی شـد. لازم به ذکر اسـت تمام تحلیل‌های آماری با نرم افزار SPSS ,۱۹/۰۰ انجام و نتایج معنی‌دار به صورت $p<۰/۰۵$ گزارش گردید.

نتایج

خواص فیزیکوشیمیایی و مورفولوژی: در نمودار ۱، مورفولوژی و اندازه نانولیپوزوم عصاره چای سبز، توسط میکروسکوپ الکترونی و DLS نشان داده شـده است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میانگین قطر ذرات ۴۴/۷nm ، پتانسیل زتا ۱۲mv- میلی ولت و بازده نانوکپسولاسیون ۹۷٪ می‌باشد.

اثر عصاره چای سـبز نانولیپوزومی بر رشـد لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در محیط کشت: نتایج رشد لاکتوباسیلوس کازئی در محیط کشـت حاوی ۱٪ چای سـبز آزاد و نانوکپسـوله طـی ۴۸h در نمودار ۲ آمده اسـت. در گروه کنترل طی ۶h اول تغییر معنی‌داری در رشد لاکتوباسـیلوس کازئی دیده نشد. اما بعد از آن افزایش معنی‌داری در رشد این پروبیوتیک مشاهده گردید، بطوریکه در ساعت ۲۴ به رشد کامل خود برابر با log ۰/۱۶ ± ۹/۳ باکتری در میلی لیتر رسـید و در طی ۴۸ ساعت ثابت باقی ماند.

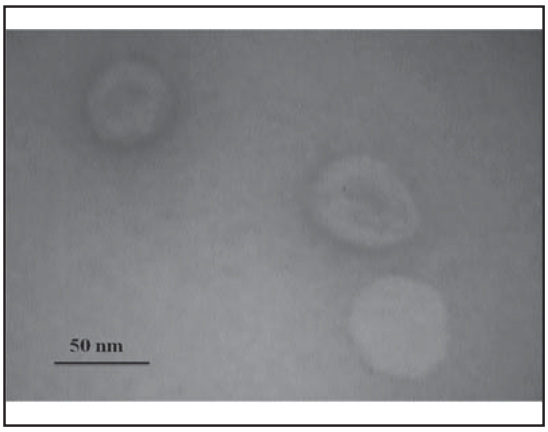
رشد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در محیط کشت حاوی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد، روندی مشابه با گروه کنترل داشت. اگرچه تعداد باکتری‌ها در محیط کشـت دارای عصاره چای سـبز آزاد در مقایسه با گروه کنترل، افزایش یافت، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$).

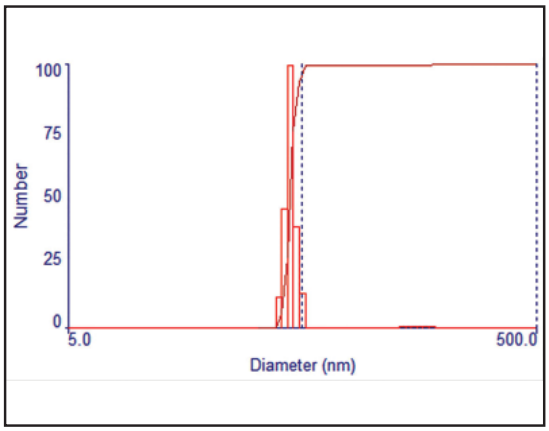
افزودن ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی، رشد لاکتوباسیلوس کازئی را به طور معنی‌داری در سـاعت ۶ و ۱۲ افزایش داد ($p<۰/۰۵$)، در حالیکه تعداد باکتری ، به ترتیب ۰/۵ و ۰/۶ لوگ بالاتر از گروه کنترل بود.

نتایج رشـد بیفیدوباکتریوم لاکتیس در محیط کشت حاوی ۱٪ چای سـبز آزاد و نانوکپسـوله نیز در نمودار ۳ نشـان داده شـده است. روند رشد بیفیدوباکتریوم لاکتیس در محیط کشـت دارای ۱٪ عصاره چای سبز آزاد در مقایسه با گروه کنترل در ساعات مورد مطالعه افزایش معنی‌داری داشت

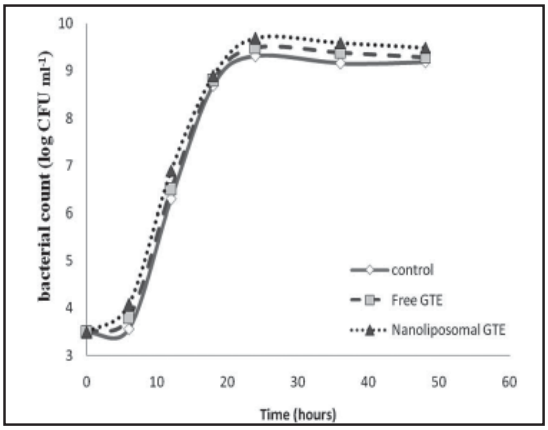
www.SID.ir

Archive of SID

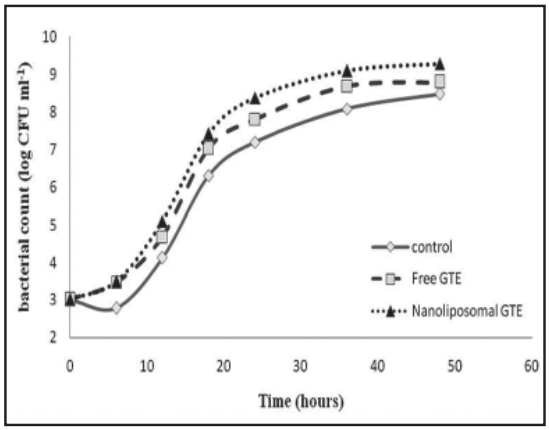




نمودار ۱ (الف) اندازه ذرات بدست آمده بر اساس غلظت (ب) عکس میکروسکوپ الکترونی نانولیپوزوم چای سبز.



نمودار ۲. اثر عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر روی رشد لاکتوباسیلوس کازیی در طی ۴۸ ساعت.



نمودار ۳. اثر عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر روی رشد بیفیدوبا کتریوم لاکتیس در طی ۴۸ ساعت.

($p<۰/۰۵$). نمودار رشد در گروه حاوی عصاره نانولیپوزومی چای سبز، با گروه دارای عصاره چای سبز آزاد شباهت داشت البته تعداد بیشتری باکتری شمارش شد. بیشترین اختلاف در تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس بین گروه کنترل و گروه حاوی نانولیپوزوم عصاره چای سبز در ساعت ۱۸ و معادل log ۱/۱ گزارش گردید.

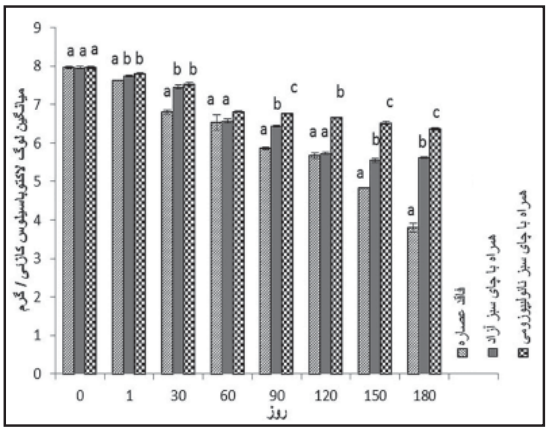
اثر عصاره چای سبز نانولیپوزومی بر بقا و زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی: اثر عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر بقای لاکتوباسیلوس کازیی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی، طی ۱۸۰ روز نگهداری در انجماد در نمودارهای ۴ و ۵ نشان داده شده است.

همانطور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود، در نمونه‌های بستنی فاقد عصاره، سیر نزولی در تعداد لاکتوباسیلوس کازئی، شیب تندی داشته و از log ۷/۹۶ در روز صفر به log ۳/۸۰ در روز ۱۸۰ نگهداری در انجماد رسید که این کاهش معادل log ۴/۱۶ می‌باشد. در نمونه‌های بستنی حاوی ۱٪عصاره چای سبز آزاد، کاهش ملایم‌تری نسبت به گروه کنترل دیده شد، بطوریکه لگاریتم تعداد باکتری به ۴/۶۲ (معادل log ۳/۳۴ کاهش) در انتهای دوره نگهداری رسید. در نمونه‌های بستنی حاوی ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی، کاهش تعداد باکتری نسبت به دو گروه دیگر بسیار کمتر و تنها معادل log ۱/۵۹ بود. در جدول ۱، درصد زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی همراه با عصاره چای سبز آزاد، نانولیپوزومی و فاقد عصاره در بستنی طی نگهداری در انجماد نشان داده شده است. میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی همراه با عصاره چای سبز آزاد طی ۱۸۰ روز نگهداری در انجماد کاهش یافته، به طوریکه میزان زنده‌مانی در روز ۱، از ۹۷/۲۳٪ به ۷۰/۶۰ درصد در روز ۱۸۰ کاهش یافته است. در صورتیکه میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی در بستنی‌های حاوی ۱٪عصاره چای سبز نانولیپوزومی به ترتیب ۱/۱۳ و ۱/۷ برابر، بیشتر از نمونه‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد و نمونه‌های فاقد عصاره می‌باشد.

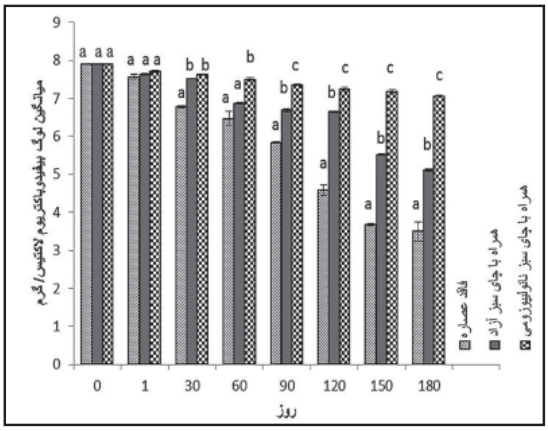
بر طبق نمودار ۵، در تیمارهای مختلف بستنی، روند کاهشی در تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس مانند لاکتوباسیلوس کازئی می‌باشد. در گروه کنترل و بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد، میانگین لگاریتم شمارش این باکتری از ۷/۹۰ در روز صفر به ترتیب به log ۳/۵۰ و ۵/۱۱ در روز ۱۸۰ نگهداری در انجماد رسید، به طوریکه این اختلاف در تعداد (معادل

www.SID.ir

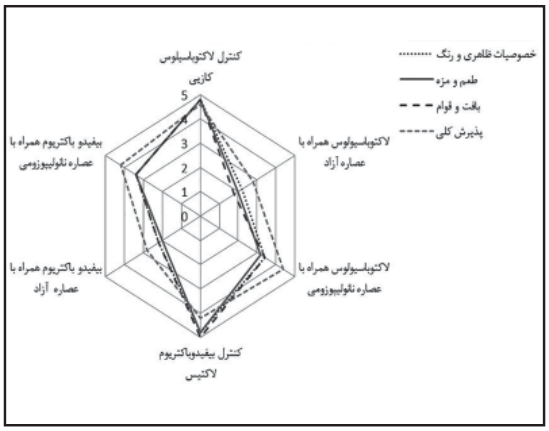
Archive of SID



نمودار ۴. میانگین لگاریتم تعداد لاکتوباسیلوس کازئی همراه با عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزوم شده در بستنی سیمبیوتیک طی ۱۸۰ روز نگهداری در انجماد (CFU/g).



نمودار ۵. میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوبا کتریوم لاکتیس همراه با عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزوم شده در بستنی سیمبیوتیک طی ۱۸۰ روز نگهداری در انجماد (CFU/g).



نمودار ۶. ارزیابی حسی نمونه‌های بستنی حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوبا کتریوم لاکتیس همراه با عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی.

log ۴/۴) در گروه کنترل نسبت به بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد (معادل log ۲/۷۹) بیشتر بوده است. در نمونه‌های بستنی حاوی ۱ ٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی، کاهش تعداد باکتری نسبت به دو گروه دیگر بسیار کمتر و تنها معادل log/۸۴ ۰ بوده و تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس در انتهای دوره نگهداری به log ۷/۰۶ رسید.

درصد زنده مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با عصاره چای سبز آزاد، نانولیپوزومی و فاقد عصاره در بستنی طی نگهداری در انجماد در جدول ۲ مشاهده می‌شود. میزان زنده مانی در روز ۱ در بستنی‌های گروه کنترل، حاوی عصاره چای سبز آزاد و نانو لیپوزومی به ترتیب ۹۵/۸۲، ۹۶/۵۸ و ۹۷/۵۶٪ می‌باشد و این زنده مانی در روز ۱۸۰ام نگهداری به ۴۴/۳، ۶۴/۶۸ و ۸۹/۳۶ کاهش پیدا کرد، به طوریکه در اثر نانوکپسولاسیون عصاره چای سبز، درصد زنده مانی ۱/۴ برابر افزایش یافت که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد.

نتایج آنالیز شیمیایی: نتایج اندازه‌گیری پارامترهای شیمیایی در جدول۳ آمده است. آنالیز شیمیایی شامل اندازه‌گیری pH، اسیدیته، درصد چربی و درصد ماده خشک بود. در هیچ یک از پارامترهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد ($p>0/05$).

نتایج ارزیابی حسی: میانگین رتبه‌های پارامترهای حسی درنمونه‌های بستنی حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس فاقد عصاره و یا همراه با عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی در نمودار ۶ آمده است. بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی حسی از نظر پذیرش کلی دو گروه کنترل (فاقد عصاره) و بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی علاوه بر نداشتن اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ($p<0/05$)، رتبه بالاتری نسبت به نمونه‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد کسب نمودند. از نظر طعم و مزه، بافت و قوام، و خصوصیات ظاهری بین هر سه گروه اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<0/05$) و بیشترین امتیاز را به ترتیب گروه کنترل، گروه دارای ۱ ٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی و گروه دارای ۱٪ عصاره چای سبز آزاد به خود اختصاص دادند.

بحث

خواص فیزیکوشیمیایی و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی: در مطالعه حاضر، خواص فیزیکوشیمیایی و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی مانند سایز ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و میزان محصور سازی ارزیابی شد. بر طبق نتایج بدست آمده از DLS، وزیکول‌ها پراکندگی قابل قبولی داشتند و شاخص پراکندگی، پایین می‌باشد. در مطالعات پیشین که پلی فنول‌های چای سبز را با روش های مختلفی مانند هموژنیزه کردن با فشار بالا، روش فیلم نازک و ترکیب تزریق اتانل و فشار بالا نانوکپسوله کرده اند میانگن اندازه ذرات بدست آمده به ترتیب ۱۰۰> (۸) ، ۱۶۰/۴ (۱۸) و۶۶/ nm۸ (۳۶) بود. در حالیکه در مطالعه حاضر قطر بدست آمده ۴۴/۷nm و ۴/۵ برابر کمتر از اندازه استاندارد ذرات نانو (۲۰۰nm) می‌باشد. احتمالاً این تفاوت در اندازه ذرات به میزان نیروی

www.SID.ir

Archive of SID

مکانیکی بکار رفته بستگی دارد که در صورت استفاده از نیروی بیشتر، ذرات کوچکتری حاصل می‌شود. همچنین استفاده از اتانل می‌تواند باعث تغییر بار سیستم شده و درجه پایداری استری را تغییر دهد که منجر به کاهش سایز ذرات می‌شود (۱۰). بار سطحی و در نتیجه پایداری نانوذرات توسط پتانسیل زتا سنجیده می‌شود که یک پارامتر مهم در انعکاس خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پایداری بیولوژیکی نانوذرات تولید شده در سوسپانسیون می‌باشد. پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های چای سبز mv ۱۲/۶ و به ترتیب بیشتر و کمتر از نتایج بدست آمده از مطالعات Zou و همکاران در سال ۲۰۱۴و Lu و همکاران در سال ۲۰۱۱ بوده که به ترتیب برابر با mv ۶/۱۶ و ۶۷/۲ گزارش شده است (۱۸،۳۶). علت تفاوت در پتانسیل زتا به نوع فسفولیپید و کلسترول به‌کار رفته در تولید نانولیپوزوم بستگی دارد، به این علت که این دو ماده از ترکیبات اصلی نانولیپوزوم‌ها هستند. ثابت شده است که سوسپانسیون‌ها با پتانسیل زتای بیشتر، به دلیل دافعه بین ذرات باردار، پایدارتر بوده و بنابراین در برابر تمایلشان به تجمع مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند (۱۰). همچنین در مطالعه‌ای Manosroi و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که لیپوزومها با بار منفی نسبت به بار مثبت قابلیت بهتری جهت حفظ مواد درونی خود دارند (۲۱).

میزان محصور سازی یکی از فاکتورهای تعیین کننده در استفاده نانولیپوزوم‌ها در صنعت می‌باشد و عواملی مانند مواد دیواره، ساختمان کپسول و واکنش بین مواد موجود در دیواره و درون هسته تأثیر گذار می‌باشند. در این مطالعه میزان محصور سازی عصاره چای سبز نانولیپوزومی تولید شده در شرایط بهینه، ۹۷ ٪ بوده که بالاتر از بازده ۷۸/۵ درصدی گزارش شده توسط Zou و همکاران در سال ۲۰۱۴ می‌باشد (۳۶). Fan و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که فاکتورهای مختلفی مانند استفاده از مقادیر مناسب کلسترول و لیپید باعث افزایش میزان محصورسازی و نیز پایداری نانو ذره‌ها می‌شود (۳). به همین دلیل استفاده از روش Fang و همکاران در سال ۲۰۰۶ به دلیل داشتن بازده محصور سازی بالا یکی از بهترین روش‌ها جهت تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی می‌باشد (۵). همچنین تحقیقات مختلف بیانگر این است که ترکیبات فنلی که از عوامل مؤثر در چای سبز می‌باشند با بازده بیشتری در لیپوزوم‌های دارای بار سطحی منفی محصور می‌گردند، زیرا در این حالت تراوایی غشاء نانولیپوزوم‌ها نسبت به حالتی که بار سطحی نانولیپوزوم‌ها مثبت یا خنثی باشد، حداقل است (۵).

اثر عصاره چای سبز نانولیپوزومی بر رشد لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در محیط کشت: در این مطالعه، رشد پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس تحت تأثیر ۱ ٪ عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی، افزایش یافتند. در مطالعات پیشین خواص پری بیوتیکی عصاره چای سبز و اثر افزاینده آن بر رشد بیفیدوباکتریا و لاکتوباسیل‌ها ثابت شده است (۳۲،۳۵). Vodnar و Socaciu در سال ۲۰۱۲ مشخص کردند که چای سبز به دلیل دارا بودن خاصیت بیفیدوژنیک، اثر تحریک کننده بر رشد بیفیدوباکتریوم اینفانتیس و بیفیدو باکتریوم بروی را دارد (۳۱). ثابت شده است که اثر پری بیوتیکی چای سبز به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی رادیکالی پلی فنول‌های آن می‌باشد، که در نتیجه محیط بهتری را برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک فراهم می‌سازد (۲۳،۳۴). همچنین Macdonald و همکاران در سال ۱۹۸۳ بیان کرده اند که پروبیوتیک‌ها دارای آنزیم‌های هیدرولیتیکی هستند که قادرند گلیکوزیدهای فلاونوییدی عصاره چای سبز را به آگلیکون‌های مربوطه تبدیل نمایند (۱۹). در این مطالعه نشان داده شده است که کپسولاسیون عصاره چای سبز در نانولیپوزوم‌ها باعث بهبود رشد باکتری‌های مورد آزمایش می‌شود که ناشی از افزایش حلالیت و پایداری، بهبود فراهم زیستی مواد مؤثره و همچنین افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در اثر نانو کپسولاسیون عصاره چای سبز است.

اثر عصاره چای سبز نانولیپوزومی بر بقا و زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی: در مطالعات مختلف از روش‌های متعددی جهت افزایش بقای پروبیوتیک‌ها مانند میکروکپسولاسیون در مواد غذایی استفاده شده است. یافته‌های مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که می‌توان از نانوکپسولاسیون پری بیوتیک‌ها به منظور افزایش بقای پروبیوتیک‌ها استفاده نمود. در این مطالعه برای نخستین بار، اثر عصاره چای سبز نانولیپوزومی در بقای لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی طی ۱۸۰ روز نگهداری در انجماد مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس متاثر از ۱ ٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی نسبت به عصاره چای سبز آزاد در بستنی می‌باشد ($p<0/05$). Molan و همکاران در سال ۲۰۰۹ اظهار نمودند که این باکتری‌ها قادرند از پلی فنول‌های چای سبز به عنوان منبع کربن استفاده کرده و همچنین این ترکیبات به عنوان آنتی اکسیدان و ضد رادیکال باعث کاهش استرس‌های ناشی از اکسیداسیون و به دنبال آن فراهم کردن محیط مناسب تری برای پروبیوتک‌ها می‌شوند و درنهایت قادرند امکان زنده مانی با درصد بالاتر را برای پرویوتیک‌ها مهیا سازند (۲۳). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که طی فرایند نانوکپسولاسیون، قابلیت فراهمی زیستی عصاره چای سبز افزایش می‌یابد و تأثیر فزاینده‌ای در بقای پروبیوتیک‌ها در بستنی دارد. همچنین خاصیت پری بیوتیکی چای سبز به دلیل حساسیت پلی فنل‌های آن به شرایط انجماد در پروسه تولید، فشار و اکسیداسیون کاهش می‌یابد اما فرایند نانوکپسولاسیون به دلیل داشتن نقش حفاظتی تأثیر بسزایی بر بهبود عملکرد چای سبز در نقش پری بیوتیک ایفا می‌کند و از آنجا که چای سبز دارای خاصیت بیفیدوژنیک است، تأثیر بیشتری بر بقای بیفیدوباکتروریم لاکتیس نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی دارد (۳۱).

Lacey و همکاران در سال ۲۰۱۴ ثابت کردند که عصاره چای سبز گونه china white hair باعث بقای پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس

www.SID.ir

Archive of SID

پاراکازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و همچنین بیفیدوباکتریوم انیمالیس در مدل نوشیدنی می‌شود، که بیشترین تعداد باکتری در گروه بیفیدوباکتریوم انیمالیس گزارش شده است. طی ۲۴ ساعت اول نگهداری، log ۰/۵ کاهش در تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مشاهده شده است که در ۴۸ ساعت به کمتر از log ۲ کاهش یافته، اما کاهش لاکتوباسیلوس پاراکازئی در ۲۴ ساعت اول log۰/۳ بوده که در ۴۸ ساعت نسبت به زمان صفر حتی log ۰/۰۸ افزایش نیز یافته است. این سیر صعودی در بیفیدوباکتریوم انیمالیس با شدت بیشتری دیده می‌شود، به طوریکه از log ۶/۱۴ در زمان صفر به log۶/۵۲ در ۲۴ ساعت و log ۶/۵۵ در ۴۸ ساعت رسیده است (۱).

Najgebauer-Lejko نیز در سال ۲۰۱۴ بیان کرد که بیفیدوباکتریا در شیرهای تخمیری غنی شده با چای سبز بیشترین بقا را در مدت زمان طولانی تر نسبت به سایر پروبیوتیک‌ها دارد (۲۴).

اثر عصاره چای سبز بر بقای پروبیوتیک‌ها در شیر و ماست توسط مرحمت زاده و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ مطالعه شده است و به دنبال افزایش غلظت چای سبز، پروبیوتیک‌ها بقای بیشتری داشتند (۲۲). همچنین در این مطالعه ترکیبات فنلی موجود در چای سبز را مسئول خاصیت پری بیوتیکی آن دانستند، اما نتایج مطالعه Jaziri و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان می‌دهد که چای سبز اثر معنی‌داری بر رشد و بقای پروبیوتیک‌ها ندارد (۱۵). البته می‌توان این تفاوت در نتایج را به گونه و ترکیبات مؤثر چای، غلظت مورد استفاده از عصاره، نوع فراورده شیری و روش تولید آن نسبت داد. البته لازم به ذکر است که Shah و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ خاصیت آنتی اکسیدانی چای سبز و به دنبال آن ایجاد محیط مناسب برای بقای پروبیوتیک‌ها را دلیل پری بیوتیک بودن آن دانستند که با نتایج مطالعه حاضر نیز مطابقت دارد (۲۶).

ارزیابی حسی: در مطالعه حاضر علاوه بر مدت زمان ماندگاری پروبیوتیک‌ها، خواص حسی بستنی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و هیچ گونه اثر نامطلوبی در رنگ، بافت و قوام و همچنین طعم و مزه نمونه‌های بستنی حاوی عصاره چای سبز نانولیپوزومی مشاهده نشد. همچنین وجود پروبیوتیک‌ها در این دو حالت منجر به ایجاد طعمی شبیه ماست یا طعم ناشی از وجود پروبویتیک‌ها نگردید. ارزیابی کلی مثبت بود و هیچ احساس نامطلوبی مانند وجود دانه‌های شبیه شن، بافت ضعیف و شکننده و حالت پفکی گزارش نشد. در ضمن خصوصیات ظاهری و بافت و قوام بستنی‌های حاوی عصاره چای سبز نانولیپوزومی مقبولیت بیشتری نسبت به بستنی‌های دارای عصاره چای سبز آزاد داشتند که این ویژگی در پذیرش کلی نیز صدق می‌نماید. در مطالعه‌ای که توسط Marhamatizadeh و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شده نیز چای سبز تفاوت معنی‌داری در طعم و مزه ماست‌های پری‌بیوتیکی طی ۲۱ روز نگهداری در یخچال ایجاد نموده است (۲۲). قابل ذکر است که در فاکتورهای بررسی شده در آنالیز شیمیایی نیز تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مورد مطالعه وجود نداشت ($p>0/05$).

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات سرکار خانم مهندس قدمی کارشناس محترم آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی و همچنین از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران صمیمانه سپاسگذاری می‌نماید.

References

1. De Lacey, A.L., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M., Montero, P. (2014) Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. LWT-Food Sci Technol. 55: 314-322.
2. Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. (2011) Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. Food Sci Technol. 44: 1908-1914.
3. Fan, M., Xu, S., Xia, S., Zhang, X. (2008) Preparation of salidrosidenano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. Eur. Food Res. 227: 167-174.
4. Fang, J.-Y., Hung, C.-F., Hwang, T.-L., Huang, Y.-L. (2005) Physicochemical characteristics and in vivo deposition of liposome-encapsulated tea catechins by topical and intratumor administrations. J Drug Target. 13: 19-27.
5. Fang, J.-Y., Hwang, T.-L., Huang, Y.-L., Fang, C.-L. (2006) Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. Int J Pharm. 310: 131-138.
6. Fang, Y.-P., Tsai, Y.-H., Wu, P.-C., Huang, Y.-B. (2008) Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy. Int J Pharm. 356: 144-152.
7. Fočo, A., Gašperlin, M., Kristl, J. (2005) Investigation of liposomes as carriers of sodium ascorbyl phosphate for cutaneous photo protection. Int J Pharm. 291: 21-29.
8. Gülseren, I.B. Corredig, M. (2013) Storage stability and physical characteristics of tea-poly-

www.SID.ir

Archive of SID

phenol-bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. J Agric. Food Chem. 61: 3242-3251.

9. Hekmat, S., McMahon, D.J. (1992) Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in ice cream for use as a probiotic food. J Dairy Sci. 75: 1415-1422.
10. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., Benoit, J.-P. (2003) Physico-chemical stability of colloidal lipid particles.Biomaterials. 24: 4283-4300.
11. Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M., Yarmand, M., Razavi, S. (2008) Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chem. 111: 50-55.
12. Huang, Y.-B., Tsai, M.-J., Wu, P.-C., Tsai, Y.-H., Wu, Y.-H., Fang, J.-Y. (2011) Elastic liposomes as carriers for oral delivery and the brain distribution of (+)-catechin. J Drug Target. 19: 709-718.
13. ISIRI. (1998) Method for Sensory Evaluation of Ice Cream. Tehran, Iran: Institute of Standards and Industrial Research of Iran. p. 1-5. 18.
ISIRI number 4937, Institute of Standards and Industrial
14. ISIRI. (2005) In Ice-cream: Specification and Test Method. 1st Revision, Tehran, Iran: ISIRI number 2450, Institute of Standards and Industrial Research of Iran.
15. Jaziri, I.N., Slama, M.B., Mhadhbi, H., Urdaci, M.C.,Hamdi, M. (2009) Effect of green and black teas (Camellia sinensis L.) on the characteristic microflora of yogurt during fermentation and refrigerated storage. Food Chem. 112: 614-620.
16. Kailasapathy, K., Chin, J. (2000) Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. Immunol Cell Biol. 78: 80-88.
17. Lee, C.-M., Lee, H.-C., Lee, K.-Y. (2005) O-palmitoylcurdlan sulfate (OPCurS)-coated liposomes for oral drug delivery. J Biosci Bioeng. 100: 255-259.
18. Lu, Q., Li, D.-C., Jiang, J.-G. (2011) Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. J Agric Food Chem. 59: 13004-13011.
19. Macdonald, I.A., Mader, J.A., Bussard, R.G. (1983) The role of rutin and quercitrin in stimulating flavonol glycosidase activity by cultured cell-free microbial preparations of human feces and saliva. Mutat Res Lett. 122: 95-102.
20. Maestrelli, F., González-Rodríguez, M.L., Rabasco, A.M., Mura, P. (2005) Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. Int J Pharm. 298: 55-67.
21. Manosroi, A., Podjanasoonthon, K., Manosroi, J. (2002) Stability and release of topical tranexamic acid liposome formulations. J Cosmetic Sci. 53: 375-386.
22. Marhamatizadeh, M.H., Ehsandoost, E., Gholami, P. (2013) The influence of Green Tea (Camellia sinensis L.) Extract on characteristic of probiotic bacteria in milk and yoghurt during fermentation and refrigerated storage. Int J Farm Alli Sci. 2: 599-606.
23. Molan, A.L., De, S., Meagher, L. (2008) Antioxidant activity and polyphenol content of green tea flavan-3-ols and oligomeric pro anthocyanidins. Int J Food Sci Nutr. 60: 497-506.
24. Najgebauer-Lejko, D. (2014) Effect of green tea supplementation on the microbiological, antioxidant, and sensory properties of probiotic milks. Dairy Sci Technol. 94: 327-339.
25. Saxelin, M., Grenov, B., Svensson, U., Fonden, R., Reniero, R., Mattila-Sandholm, T. (1999) The technology of probiotics. Trends Food Sci Technol. 10: 387-392.
26. Shah, N.P., Ding, W.K., Fallourd, M.J., Leyer, G. (Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. J Food Sci. 75: M278-M282.
27. Takahashi, M., Inafuku, K.-I., Miyagi, T., Oku, H., Wada, K., Imura, T. (2005) Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. J Oleo Sci. 56: 35-42.
28. Tellez, A. (2008) Probiotics in Food Safety and

www.SID.ir

Archive of SID

Human Health, edited by Ipek Goktepe, Vijay K. Juneja, Mohamed Ahmedna CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton-London-New York, 2006, 493 p. ISBN 1-57444-514-6. Trends Food Sci Technol. 19: 498-499.

29. Trotta, M., Peira, E., Debernardi, F., Gallarate, M.(2002) Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyr rhizinate. Int J Pharm. 241: 319-327.
30. Vernazza, C.L., Rabiu, B.A., Gibson, G.R. (2006) Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: introduction to prebiotic, in Prebiotics: Development and application. Gibson, G.R., Rastall, R. A. (eds.). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. p. 1-28.
31. Vodnar, D.C., Socaciu, C. (2012) Green tea increases the survival yield of Bifidobacteria in simulated gastrointestinal environment and during refrigerated conditions. Chem Cent. J. 6: 61.
32. Weisburger, J.H. (1999) Tea and health: the underlying mechanisms. Exp Biol Med. 220: 271-275.
33. WHO, F. (2001) Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report: 1-34.
34. Xu, J., Yang, F., Chen, L., Hu, Y., Hu, Q. (2003) Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of tea leaves harvested during the early spring tea producing season. J Agric Food Chem. 51: 1081-1084.
35. Yamamoto, T., Juneja, L.R., Kim, M. (1997) Chemistry and applications of green tea. New York. CRC press.
36. Zou, L., Liu, W., Liu, W., Liang, R., Li, T., Liu, C. (2014) Characterization and bioavailability of tea polyphenol nanoliposome prepared by combining an ethanol injection method with dynamic high-pressure microfluidization. J Agric Food Chem. 62: 934-941.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of green tea extract nanoencapsulation on the survival of *Lactobacillus Casei* and *Bifidobacterium* lactis in symbiotic ice cream

Noori, N.*, Noudoost, B., Gandomi Nasrabadi, H., Akhondzadeh Basti, A.

Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.

(Received 22 October 2016, Accepted 4 January 2017)

Abstract:

BACKGROUND: The application of natural compounds including green tea extract (GTE) in food preparation and pharmaceutical industries is limited. Nowadays, encapsulation in nanoliposomes could be used as a delivery system to protect compounds during processing and storage. **OBJECTIVES:** In this study, physicochemical characterization of green tea extract encapsulated in nanoliposomes and its prebiotic activities on two probiotic bacteria *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* were evaluated in media and ice cream. **METHODS:** At first, GTE encapsulated in liposomes by thin film layer method and with sonication liposomes reached to nanoscale. For evaluation of the prebiotic activity of nanoliposomal GTE on probiotics, 1% of nanoliposomal GTE in the presence of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* was added to MRS broth and ice cream. **RESULTS:** The mean diameter of nanoliposomes was about 44/7± 1/9 nm and had 0/203 ±0/014 polydispersity index. Entrapment eficiency of nanoliposomal GTE under the optimum conditions was 97%. Moreover, addition of 1% nanoliposomal GTE significantly increased the growth rate of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* in culture media ($p<0.05$). The lowest reduction of *Lactobacillus casei* count during storage period was recorded in ice cream containing 1% of nanoliposomal GTE, while the control group showed the reduction of 4/16 log in *Lactobacillus casei* count. Similarly, addition of 1% of nanoliposomal GTE was most effective on survival of *Bifidobacterium lactis* in ice cream, since the bacterial count lowered only 0/84 log during the storage compared to 4/4 log reduction in control group. **CONCLUSIONS:** The considerable effect of nanoliposomal GTE on growth and survival rate probiotics in media and ice cream has been presented in this study and the use of nanoliposome encapsulation can be proposed as a new method to increase stability of natural compounds, during different processes.

Keyword: green tea extract; nanoliposome encapsulation; prebiotic properties; ice cream

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Survival of lactobacillus casei with free and nanoliposomal green tea extract in the symbiotic ice cream during 180 day storage in freeze (%).

Table 2. Survival of bifidobacterium lactis with free and nanoliposomal green tea extract in the symbiotic ice cream during 180 day storage in freeze (%).

Table 3. Chemical properties of ice cream samples contain probiotics with free and nanoliposomal green tea extract.

Figure 1. (a) particle size based on volume (b) Microscopic electron of Green tea extract nanoliposome.

Figure 2. Effect of free and nanoliposomal green tea extract on the growth of lactobacillus casei duing 48 h.

Figure 3. Effect of free and nanoliposomal green tea extract on the growth of bifidobacterium lactis duing 48 h.

Figure 4. Number of lactobacillus casei with free and nanoliposomal green tea extract in the symbiotic ice cream during 180 day storage in freeze (Mean Log CFU/g).

Figure 5. Number of bifidobacterium lactis with free and nanoliposomal green tea extract in the symbiotic ice cream during 180 day storage in freeze (Mean log CFU/g).

Figure 6. Sensory analysis of ice cream samples contain lactobacillus casei and bifidobacterium lactis with free and nanoliposomal green tea extract.

***Corresponding author's email:nnoori@ut.ac.ir, Tel: 021-61117067, Fax: 021-66933222**

www.SID.ir