تحقیقات مهندسی صنایع غذایی/جلد ۱۷/ شماره ٦٥/پاییز و زمستان ۱۳۹۷/ص ۹۰-۷۹

افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به فیلم خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز و اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی در دو دمای یخچالی و محیط

بهزاد ابراهیمی[۱]، رضا محمدی[۲]، سید امیر محمد مرتضویان[۳]* و سعیده شجاعی علی آبادی[۳]*

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۳- گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۹

چکیده

امروزه بالا بردن زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها از طریق افزودن مستقیم آنها به فیلم‌های خوراکی و پوشش‌ها برای جلوگیری از مرگ و میر آنها، بسیار مورد توجه است. در این پژوهش، قابلیت زیستی چند سویه پروبیوتیک شامل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در فیلم تولیدی خوراکی بر پای کربوکسی متیل سلولز در دو دمای یخچالی (٤ درجه سلسیوس) و محیط (۲۵ درجه سلسیوس) طی دوره چهل و دو روزه نگهداری، بررسی شد. نتایج تحقیق نشان می‌دهد میزان قابلیت زیستی در هر دو دما به صورت معنی داری کاهش می‌یابد اما زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در تمام دوره نگهداری در نمونه‌های نگهداری شده در دمای ٤ درجه سلسیوس در میزان پیشنهاد شده ($۱۰^{۷}$-$۱۰^{٦}$ سی‌اف‌یو بر گرم) باقی مانده است. فیلم خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز می‌تواند حامل خوبی برای انتقال پروبیوتیک ها در بسته بندی مواد غذایی به‌هنگام نگهداری در دمای یخچالی باشد.

واژه‌های کلیدی

***بیفیدوباکتریوم*، پوشش خوراکی، قابلیت زیستی، لاکتوباسیلوس**

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی زنده هستند که مصرف آنها در مقادیر کافی، سبب ایجاد خواص سلامت‌بخش برای میزبان می‌شود (Soukoulis *et al.*, 2014a). ایجاد خواص سلامت‌بخش پروبیوتیک‌ها اساساً مدیون اثرهای سرکوب‌کننده آنها بر فلور زیان‌آور روده و حفظ و بهبود توازن این فلور به نفع خود (به عنوان ریززنده‌های سودمند)، تقویت سیستم ایمنی، کاهش سطح کلسترول سرم، کاهش فشار خون، و ... است (Soukoulis *et al.*, 2014b). غذاهای حاوی پروبیوتیک باید ایمن و در زمان مصرف حاوی مقادیر کافی از این میکروارگانیسم‌ها باشند. حداقل مقدار پروبیوتیک در غذاهای حاوی پروبیوتیک باید $۱۰^{۷}$ سی‌اف‌یو بر میلی‌لیتر باشد. مهم‌ترین و مرسوم‌ترین پروبیوتیک‌ها به جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* تعلق دارند. سویه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازیی*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* بیشترین کاربرد تجاری را یافته‌اند که در این تحقیق بررسی می‌شوند.

لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های غیراسپورزا، میله‌ای گرم مثبت، کاتالاز منفی و معمولاً نامتحرک هستند.

نگارنده مسئول: mortazvn@sbmu.ac.ir
http://doi:10.22092/fooder.2018.121354.1134
© 2018,The Author(s). Published by Agricultural Engineering Research Institute. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

بیفیدوباکتری‌ها هم گرم مثبت‌اند که در pH بین ۴/۵ تا ۸/۵ می‌توانند رشد کنند اما مهمترین نکته در مورد آنها این است که بی‌هوازی اجباری هستند (Saad *et al.*, 2013). باکتری‌های اسید لاکتیک نماینده گروهی از میکروارگانیسم های هتروژن هستند که به طور طبیعی در حفره دهانی، دستگاه گوارش انسان و حیوان، و در محصولات غذایی تخمیری وجود دارند. غذاهای حاوی این باکتری‌ها در گروه غذاهای هدفمند قرار می‌گیرند (Tapia *et al.*, 2007). تقاضا برای غذاهای هدفمند به دلیل افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان در زمینه تأثیر این غذاها بر سلامتی به سرعت در حال افزایش است. مطابق گزارش‌های ارائه شده از بازارهای جهانی، مصرف غذاهای هدفمند از ۳۳ میلیارد دلار در سال ۲۰۰۰ به ۱۷۶/۶ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۳ رسیده، که این مقدار در حدود ۵ درصد کل بازار غذاست که سهم پروبیوتیک‌ها در غذاهای هدفمند در حدود ۷۰-۶۰ درصد کل بازار غذاهای هدفمند است (Capela *et al.*, 2006). بیش از ۵۰۰ نوع محصولات غذایی حاوی پروبیوتیک در چند دهه اخیر در بازارهای جهانی معرفی شده است که شامل محصولات گوشتی (سوسیس‌ها)، غلات، نوشیدنی‌ها، میوه‌ها و سبزی‌ها، محصولات لبنی و جز اینهاست. میزان سودمندی غذاهای حاوی پروبیوتیک وابسته به تعداد سلول‌های زنده و فعال در هر گرم یا میلی‌لیتر محصول در زمان مصرف است (Altamirano-Fortoul *et al.*, 2012). بنابراین، تضمین میزان قابلیت زیستی[1] پروبیوتیک‌ها در فرایند تولید و در مدت زمان نگهداری برای حفظ اطمینان مصرف کننده ضروری است. در غذاهای حاوی پروبیوتیک، فاکتورهای زیادی بر میزان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها تا لحظه مصرف تاثیرگذار و مشتمل‌اند بر شاخص‌های غذایی (pH، اکسیژن مولکولی، فعالیت آبی، حضور نمک، شکر و مواد شیمیایی مانند هیدروژن پراکسید، باکتریوسین‌ها و مواد طعم دهنده و رنگ دهنده مصنوعی) و شاخص‌های فرایند (دمای گرمخانه‌گذاری، فراوری دمایی، مواد بسته‌بندی، روش‌های نگهداری و مقیاس تولید). توسعه غذاهای با دز کافی از پروبیوتیک‌ها در زمان مصرف با چالش‌هایی روبه‌رو است زیرا چندین عامل در زمان فراوری و نگهداری بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک اثر می‌گذارد. در چند دهه اخیر برای افزایش میزان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها تا زمان مصرف تلاش‌های زیادی شده است (Soccol *et al.*, 2010). یکی از راه‌های رساندن پروبیوتیک‌ها با تعداد کافی به بدن، افزودن آنها به فیلم است که پایداری خوبی را برای آنها فراهم می‌کند (Anal & Singh, 2007). فیلم‌های خوراکی ترکیبات بیوپلیمری با ساختار لایه نازک هستند که می‌توانند مصرف شوند و معمولاً با روش‌های غوطه‌وری، اسپری کردن و یا پاشیدن بر سطح مواد غذایی اعمال می‌شوند (Burgain *et al.*, 2011). به کاربردن فیلم‌های خوراکی در غذا از طریق کاهش واکنش‌های مخرب آنزیمی، فیزیکی و شیمیایی با ایجاد کردن مانع فیزیکی با به تأخیر انداختن بخار شدن آب، اکسیژن و حرکت مواد حل‌شده سبب افزایش ماندگاری مواد غذایی می‌شوند. اخیراً از فیلم‌های خوراکی به عنوان حامل‌های مؤثر برای انتقال چندین ترکیب زیست فعال شامل ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و پروبیوتیک‌ها در سیستم‌های غذایی استفاده می‌شود (Kanmani & Lim, 2013). انواعی از پلیمرها با خواص کاری مختلف به عنوان فیلم خوراکی به کار گرفته می‌شوند. در این تحقیق از کربوکسی متیل سلولز به عنوان فیلم خوراکی استفاده شده است. کربوکسی متیل سلولز از مشتقات سلولز است که از استخلاف شدن گروه‌های کربوکسی متیل (-CH_2-COOH) به جای برخی از گروه‌های هیدروکسیل (–OH) به دست می‌آید (Dadfar & Kavoosi, 2015). کربوکسی متیل سلولز پلی‌ساکارید خطی، بلند زنجیر، انحلال‌پذیر در آب و یونی است که محلول تشکیل دهنده فیلم آن، دارای ویسکوزیته بالا بدون اثر سمی است (Dashipour *et al.*,

1- Viability proportion index

(2015. کربوکسی متیل سلولز به سرعت در آب سرد و گرم حل می‌شود که از نظر اقتصادی با صرفه است و همچنین باعث حفظ طعم اصلی غذا می‌شود. به همین دلیل در تولید انواع بستنی، شیرینی و بیسکوئیت، آبمیوه، محصولات لبنی و گوشتی از آن استفاده می‌شود (Yadollahi *et al.*, 2014). در زمینه افزودن پروبیوتیک‌ها به صورت مستقیم به فیلم خوراکی پژوهش‌ها تا به حال اندک است. افزودن باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به فیلم خوراکی بر پایه ژلاتین و افزودن چندین سویه از پروبیوتیک‌ها به فیلم خوراکی بر پایه پولولان/ نشاسته تنها پژوهش‌های در دسترس در این زمینه هستند (Soukoulis *et al.*, 2014a; Kanmani & Lim 2013). این مطالعه شامل تولید فیلم خوراکی نو و بدیع بر پایه کربوکسی متیل سلولز، با افزودن انواع سویه‌های پروبیوتیک در مقیاس آزمایشگاهی است. سویه‌های مختلف پروبیوتیک‌ها با کربوکسی متیل سلولز مخلوط و قابلیت زیستی آنها در فیلم خوراکی تهیه شده بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مشخصات مواد اولیه

سویه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدو باکتریوم بیفیدوم* به صورت خشک شده انجمادی از شرکت تک ژن (تهران، ایران) خریداری و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد. کربوکسی متیل سلولز از شرکت پارسیان (تهران، ایران) و گلیسرول، محیط کشت نوترینت براث، محیط کشت MRS آگار و محیط کشت MRS براس از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

آزمایش‌های اولیه به منظور دستیابی به فیلم مناسب بر پایه کربوکسی متیل سلولز

پس از مطالعات اولیه برای تعیین مقادیر مناسب کربوکسی متیل سلولز و نرم کننده در ساخت فیلم‌ها، ابتدا فیلم‌های خوراکی با غلظت‌های ۱ و ۲ درصد کربوکسی متیل سلولز با مقدار ثابت گلیسرول (۵۰ درصد وزن کربوکسی متیل سلولز) تهیه شدند. غلظت ۱ درصد به عنوان غلظت مناسب کربوکسی متیل سلولز در تهیه سایر فیلم‌های مورد بررسی در این پژوهش انتخاب گردید. زیرا ویسکوزیته محلول ۲ درصد بیشتر از ویسکوزیته محلول ۱ درصد بود که سبب گردید قالب ریزی محلول آن به علت ویسکوزیته بالاتر دشوار شود. پس از مشخص شدن غلظت مورد نیاز کربوکسی متیل سلولز، فیلم‌هایی با غلظت ثابت ۱ درصد کربوکسی متیل سلولز و غلظت ۵۰ درصد گلیسرول تهیه شد. مقادیر مساوی از هر یک از باکتری‌های پروبیوتیک (۱۰۱۲ سی‌اف‌یو بر گرم) به صورت مستقیم به فیلم‌ها اضافه شد.

تولید فیلم کربوکسی متیل سلولز

برای تهیه فیلم کربوکسی متیل سلولز، محلول فیلم با مخلوط کردن کربوکسی متیل سلولز در آب مقطر با دمای ۶۰ درجه سلسیوس تحت شرایط هم زدن به مدت زمانی ۱ ساعت، برای هیدراته شدن کامل، تهیه شد. بعد از افزودن گلیسرول در سطح ۵۰ درصد کل ماده جامد پلی‌ساکارید، محلول بیوپلیمر-گلیسرول در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت نیم ساعت برای انحلال کامل و نابودی هر گونه پاتوژن حرارت داده شد. پس از سرد شدن محلول فیلم تا دمای ۳۵ درجه سلسیوس، باکتری‌ها به فیلم اضافه شدند. محلول‌ها به دقت درون قالب‌های شیشه‌ای ریخته شدند. برای پخش در قالب[1] ۵۰ میلی‌لیتر از محلول به آرامی در مرکز قالب های شیشه ای ریخته شد. سپس قالب ها در یک سطح کاملاً تراز قرار داده شدند تا در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ ساعت خشک و فیلم‌ها تشکیل شوند. فیلم‌ها پس از تشکیل‌شدن، از پلیت شیشه‌ای جدا شدند. سپس این فیلم‌ها درون زیپ کیپ در ۲ دمای یخچالی (۴ درجه سلسیوس) و محیط (۲۵ درجه سلسیوس) نگهداری شدند (Dashipour *et al.*, 2015).

1- Casting

بررسی قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در فیلم‌ها

در بازه‌های زمانی ۲ هفته‌ای، فیلم‌ها در شرایط اسپتیک از زیپ کیپ به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات انتقال داده و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیک‌دار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند تا باکتری‌ها فرصت آزاد شدن از فیلم را داشته باشند. رقت‌های مختلف از کل نمونه محلول ساخته و پس از کشت دادن به صورت پور پلیت در محیط کشت MRS آگار، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (Soukoulis *et al.*, 2014b). سلول‌های زنده باکتری‌ها مطابق با روش Subtractive enumeration method (SEM) به صورت انتخابی شمارش شدند.

شاخص نسبت قابلیت زیستی (VPI) و درصد افت پروبیوتیک ها از رابطه‌های (۱) و (۲) محاسبه گردید (Ferdousi *et al.*, 2013):

(۱) VPI= (جمعیت اولیه باکتری‌ها (سی‌اف‌یو بر گرم) / جمعیت نهایی باکتری‌ها(سی‌اف‌یو بر گرم)

(۲) درصد افت=(جمعیت اولیه باکتری- جمعیت ثانویه باکتری)/جمعیت ثانویه باکتری

تجزیه و تحلیل آماری

برای توصیف ویژگی‌های کمی از آمار توصیفی به کمک میانگین و انحراف معیار استفاده می‌شود. برای مقایسه میانگین‌های پاسخ‌های مربوط به متغیرهای نوع باکتری و دما، آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) و در صورت لزوم آزمون تعاقبی دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری (α=۰/۰۵) به‌کارگرفته‌شد. در بررسی قابلیت زیستی باکتری‌های پروبیوتیک در بازه زمان، برای مقایسه میانگین پاسخ‌ها در روزهای متفاوت از General Linear Model (GLM) روش Repeated Measures استفاده شد. برای مقایسه میانگین پاسخ‌ها برای یک باکتری در دو دمای مختلف از آزمون t-test و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS vs.17 استفاده شد.

نتایج و بحث

قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها

در جدول (۱) ، قابلیت زیستی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ، *لاکتوباسیلوس کازئی* ، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در دو دمای یخچالی و محیط نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که در هر دو دما زنده‌مانی باکتری‌ها در دوره نگهداری کاهش می‌یابد. قابلیت زیستی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در دمای یخچالی تا روز بیست و هشتم تغییر معنی‌داری ($p<0/05$) ندارد و اوج قابلیت زیستی مربوط به این روز با مقدار ۷/۳۵ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم است. در پایان دوره نگهداری در این دما، تعداد باکتری به ۶/۶۸ لگاریتم سی‌اف یو بر گرم می‌رسد. زنده‌مانی در دمای محیط در تمام روزها معنی‌دار است ($p<0/05$) و اوج قابلیت زیستی در روز چهاردهم با مقدار ۶/۸۷ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم دیده می‌شود. در پایان دوره نگهداری، تعداد باکتری به ۴/۲۱ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم می‌رسد. اوج قابلیت زیستی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در دمای یخچالی و در دمای محیط در روز چهاردهم است. تعداد باکتری در دمای یخچالی در این روز ۷/۸۴ و در دمای محیط ۶/۷۲ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم است. جمعیت نهایی در پایان دوره نگهداری در دمای یخچالی ۵/۶۸ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم است و در دمای محیط به ۴/۲۵ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم می‌رسد. باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* نگهداری شده در دمای یخچالی در تمامی روزها کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد ($p<0/05$).

جدول شماره ۱- قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در فیلم در دوره نگهداری (٤ و ۲۵ درجه سلسیوس)

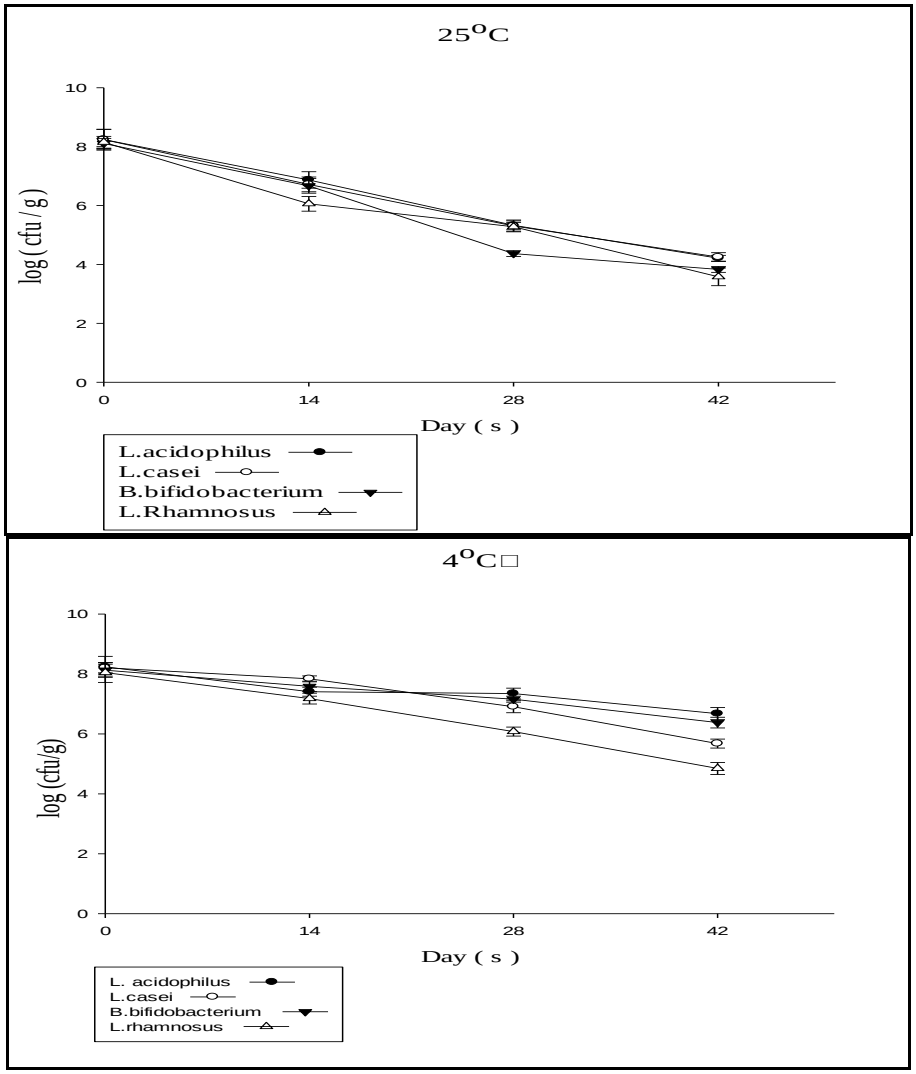
	دمای نگهداری ۴ درجه سلسیوس				دمای نگهداری ۲۵ درجه سلسیوس			
مدت زمان نگهداری (روز) / نام باکتری	۰	۱۴	۲۸	۴۲	۰	۱۴	۲۸	۴۲
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۸/۲۴[a]	۷/۴۱[a]	۷/۳۵[a]	۶/۶۸[a]	۸/۲۴[a]	۶/۸۷[b]	۵/۳۳[b]	۴/۲۱[b]
لاکتوباسیلوس کازئی	۸/۲۱[a]	۷/۸۴[a]	۶/۹۱[a]	۵/۶۸[a]	۸/۲۴[a]	۶/۷۲[b]	۵/۳۱[b]	۴/۲۵[b]
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۸/۰۵[a]	۷/۱۸[a]	۶/۰۸[a]	۴/۸۵[a]	۸/۱۱[a]	۶/۰۶[b]	۵/۲۸[b]	۳/۵۸[b]
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۸/۱۳[a]	۷/۵۹[a]	۷/۱۶[a]	۶/۳۸[a]	۸/۱۵[a]	۶/۶۷[b]	۴/۳۷[b]	۳/۳۸[b]

[a] میانگین± انحراف استاندارد

[b] در هر ستون، مقادیر با حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن در سطح (p<۰/۰۵) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند

اوج قابلیت زیستی این باکتری در دمای یخچالی و محیط روز چهاردهم به‌ترتیب ۷/۱۸ و ۶/۰۶ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم است. تعداد نهایی باکتری‌های نگهداری شده در دمای یخچالی ۴/۸۵ و در دمای محیط ۳/۵۸ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم است. تغییرات قابلیت زیستی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نیز در هر دو دما در تمامی روزها به طور معنی‌داری کاهش نشان می‌دهد (p<۰/۰۵). قابلیت زیستی در دمای یخچالی تا روز بیست و هشتم با ۷/۱۶ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم در حد استاندارد باقی می‌ماند و در پایان دوره نگهداری به ۶/۳۸ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم می‌رسد. در دمای محیط، اوج قابلیت زیستی روز چهاردهم است و مقدار آن ۶/۶۷ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم است. جمعیت نهایی این باکتری در پایان دوره نگهداری به ۳/۳۸ لگاریتم سی‌اف‌یو بر گرم می‌رسد. شکل (۱) میزان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را در مقایسه با هم و در دو دمای یخچالی و محیط نشان می‌دهد. در دمای یخچالی در روز چهاردهم دوره نگهداری، بیشترین میزان قابلیت زیستی در *لاکتوباسیلوس کازئی* و کمترین آن در *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* دیده‌می‌شود. اما در روز بیست و هشتم، روند قابلیت زیستی تغییر می‌کند به‌طوری که بیشترین میزان قابلیت زیستی متعلق به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است ولی کمترین میزان قابلیت زیستی همچنان همانند روز چهاردهم متعلق به *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* است. قابلیت زیستی در روز چهل و دوم بدون تغییر و مشابه روز بیست و هشتم است. روند تغییرات قابلیت زیستی در دمای محیط به این صورت است که در روز چهاردهم، میزان قابلیت زیستی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به طور معنی‌داری بیشتر از میزان قابلیت زیستی پروبیوتیک‌های دیگر است (p<۰/۰۵)؛ کمترین میزان قابلیت زیستی در همین روز در *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* دیده‌می‌شود. در این روز میزان قابلیت زیستی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* مشابه است و این دو از این نظر تفاوت معنی‌دار ندارند. پروبیوتیک‌های *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در روز بیست و هشتم از نظر قابلیت زیستی تفاوت معنی‌داری با هم ندارند و بیشترین مقدار را دارند اما باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در این روز کمترین میزان قابلیت زیستی را نشان داده است. نتایج قابلیت زیستی در روز چهل و دوم بدین صورت است که پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* تفاوت معنی‌داری با هم ندارند و بیشترین مقدار قابلیت زیستی را هم نشان

داده‌انـد، از سـوی دیگـر، پروبیوتیـک‌هـای *لاکتوباسـیلوس رامنوسوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیـدوم* نیـز بـا هـم تفـاوت معنی‌داری ندارند و کمتـرین میـزان قابلیـت زیسـتی را در این روز نشان داده‌اند. در مقایسـه بـاکتری‌هـا در یـک روز مشخص در دو دمای مختلف، بیشترین میزان زنده‌مانی در روز چهاردهم در دمای یخچالی متعلق بـه *لاکتوباسـیلوس کـازئی* و در دمـای محـیط متعلـق بـه *لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس* اسـت. در روز بیسـت و هشـتم در دمـای یخچـالی، بیشـترین زنـده‌مـانی در *لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس* و در دمـای محـیط در *لاکتوباسـیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسـیلوس کازئی* دیده می‌شود که از نظر آمـاری تفـاوت معنـی داری نیز ندارند. بیشـترین قابلیـت زیسـتی روز چهـل و دوم در دمای یخچالی متعلق به *لاکتوباسیلوس اسـیدوفیلوس* و در دمـای محـیط متعلـق بـه *لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس* و *لاکتوباسـیلوس کـازئی* اسـت کـه از نظـر آمـاری تفـاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهند. کمترین میـزان زنـده‌مـانی در پایان دوره نگهداری در دمای یخچـالی بـه *بیفیـدوباکتریوم بیفیدوم* و در دمای محـیط بـه *بیفیـدوباکتریوم بیفیـدوم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* تعلق دارد.



شکل ۱- قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها در فیلم خوراکی طی دوره نگهداری (٤ و ۲۵ درجه سلسیوس)

شاخص نسبت قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها طی دور، نگهداری (VPI)

جدول (۲) شاخص نسبت قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها را در فاصله‌های زمانی نشان می‌دهد. بیشترین میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در دمای یخچالی در فاصله زمانی روز چهاردهم تا بیست و هشتم و برابر با ۰/۹۹ است؛ کمترین میزان زنده‌مانی در این دما در روز صفر تا چهل ودوم است، در حالی که بیشترین مقدار نسبت زنده‌مانی در دمای محیط (۰/۸۳) مربوط است به فاصله زمانی روز صفر تا روز چهاردهم و کمترین آن (۰/۵۱) مربوط به روز صفر تا چهل و دوم است. بیشترین میزان نسبت قابلیت زیستی در باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در دمای یخچالی (۰/۹۷) و در دمای محیط (۰/۸۲) در فاصله زمانی روز صفر تا روز چهاردهم است. بیشترین افت نیز در دمای یخچالی و محیط هم در فاصله زمانی صفر تا چهل و دوم دیده‌می‌شود.

در باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، بیشترین میزان نسبت قابلیت زیستی در دمای یخچالی (۰/۹۴) مربوط به روز چهاردهم تا بیست و هشتم و بیشترین مقدار نسبت قابلیت زیستی در دمای محیط (۰/۸۱) مربوط به روز صفر تا چهاردهم است. بیشترین افت نیز در دمای یخچالی و محیط هم در فاصله زمانی صفر تا چهل و دوم دیده‌می‌شود.

نسبت قابلیت زیستی در باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در دمای یخچالی در فاصله زمانی روز صفر تا روز چهاردهم بیشترین مقدار و برابر با ۰/۸۷ و در دمای محیط در روز چهاردهم تا بیست وهشتم برابر ۰/۸۷ است. بیشترین افت نیز در دمای یخچالی و محیط هم در فاصله زمانی صفر تا چهل و دوم دیده‌می‌شود. بیشترین میزان نسبت قابلیت زیستی در کل دوره نگهداری در دمای یخچالی (۰/۸۱) در *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و کمترین مقدار آن در این دما (۰/۶)در باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* است.

جدول ۲- شاخص نسبت قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها طی دوره نگهداری

		دوره نگهداری (بازه‌های ۱۴ روزه)					
		۲۸			۴۲		
تیمار	دمای نگهداری (درجه سلسیوس)	۱۴-۰	۰	۱۴	۰	۱۴	۲۸
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۴	۰/۹	۰/۹	۰/۹۹	۰/۸۱	۰/۹	۰/۹
	۲۵	۰/۸۳	۰/۶۴	۰/۷۷	۰/۵۱	۰/۶۱	۰/۷۸
لاکتوباسیلوس کازئی	۴	۰/۹۷	۰/۸۳	۰/۸۸	۰/۶۹	۰/۷۲	۰/۸۲
	۲۵	۰/۸۲	۰/۶۴	۰/۷۹	۰/۵۲	۰/۶۳	۰/۸
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۴	۰/۹۳	۰/۸۸	۰/۹۴	۰/۷۸	۰/۸۴	۰/۸۹
	۲۵	۰/۸۱	۰/۵۳	۰/۶۵	۰/۴۱	۰/۵۰	۰/۷۷
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۴	۰/۸۷	۰/۷۵	۰/۸۴	۰/۶	۰/۶۷	۰/۷۹
	۲۵	۰/۷۳	۰/۶۵	۰/۸۷	۰/۴۴	۰/۵۹	۰/۶۷

این مقادیر برای نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط به این صورت است: بیشترین نسبت (۰/۵۲) در *لاکتوباسیلوس کازئی* و کمترین نسبت (۰/۴۱) در *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*.

درصد افت در دوره نگهداری

در جدول (۳)، درصد افت باکتری‌ها در دو دمای یخچالی و محیط نشان داده شده است. بیشترین میزان افت در دمای یخچالی در پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و کمترین میزان افت در این دما در پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* دیده می‌شود. مقادیر افت در دمای محیط برای پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بیشترین و برای *لاکتوباسیلوس کازئی* کمترین مقدار به‌دست آمده‌است. شرایط محیطی مانند دمای نگهداری نمونه‌ها بیشترین اهمیت را در زنده‌مانی سلول‌ها دارد.

جدول ۳- درصد افت پروبیوتیک‌ها طی مدت نگهداری در دو دمای یخچالی و محیط

پروبیوتیک	دما (درجه سلسیوس)	درصد افت
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۴	۱۸/۹۳
	۲۵	۴۸/۹۰
لاکتوباسیلوس کازئی	۴	۳۲/۸۸
	۲۵	۴۸/۴۲
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۴	۲۲/۵۷
	۲۵	۶۲/۸۶
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۴	۴۰/۰۴
	۲۵	۵۵/۵۶

کاهش معنی‌داری در تعداد اولیه باکتری‌ها در فرایند خشک کردن مشاهده نشده است. میزان کاهش باکتری‌های نگهداری شده در دمای محیط به طور معنی‌داری بیشتر ($p<۰/۰۰۱$) از میزان کاهش باکتری‌های نگهداری شده در دمای یخچالی است که می‌تواند به دلیل کاهش متابولیسم باکتری‌ها در دمای یخچالی باشد (Kanmani & Lim, 2013; Gurr, 1987). کانمانی و لیم (Kanmani & Lim, 2013) نیز گزارش دادند که باکتری‌های نگهداری شده در دمای یخچالی در دوره نگهداری ۲۰ روزه پایداری بیشتری داشته‌اند. در دوره‌های نگهداری، قابلیت زیستی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیشتر از سایر پروبیوتیک‌هاست که می‌تواند به دلیل مقاومت نسبتاً بالای این سویه باکتری به فاکتورهای تنش‌زا مانند اکسیژن مولکولی، رطوبت، دمای بالا و ... باشد (Nobakhti *et al.*, 2009). در مقابل، باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در تمام دوره نگهداری در هر دو دما دارای کمترین میزان قابلیت زیستی بوده است که می‌تواند به دلیل حساسیت بالای این باکتری به شرایط محیطی و وجود اکسیژن و فاکتورهای تنش‌زا باشد (Taverniti & Guglielmetti, 2011). گیالماس و همکاران (Gialamas *et al.*, 2010) فیلم‌های ضد میکروبی علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا را با تلقیح کردن *لاکتوباسیلوس ساکئی* به داخل فیلم‌های سدیم کازئینات تهیه کردند. اضافه کردن سوربیتول به داخل فیلم می‌تواند قابلیت زیستی بیشتر سلول‌ها را در دوره نگهداری سی روزه در دمای یخچالی تضمین کند. احتمالاً سوربیتول اضافه شده سبب محافظت دیواره سلولی از تخریب به واسطه از دست دادن آب، می‌شود. نگهداری در دمای محیط سبب کاهش میزان زنده‌مانی به مقدار ۲ لگاریتم در تعداد باکتری‌ها شد که می‌تواند به دلیل افزایش تولید متابولیت‌های باکتریایی

باشد. با افزایش مدت زمان نگهداری (فاصله روز ۲۸ تا ۴۲)، میزان قابلیت زیستی کمتر و درصد افت بیشتر می‌شود که می‌تواند به دلیل تجمع متابولیت باکتریایی و خشک شدن و از دست رفتن رطوبت فیلم‌ها باشد که باعث می‌شود قابلیت زیستی در پایان دوره نگهداری کاهش بیشتری داشته باشد. سوکولیس و همکاران (Soukoulis *et al.*, 2014b) نیز گزارش دادند که میزان ماندگاری فیلم‌های خوراکی در دمای محیط و یخچالی در حدود ۱۷ تا ۳۰ روز است. فاکتورهای بیرونی شامل فعالیت آبی، دما و حضور اکسیژن تاثیرات نامطلوبی بر زنده‌مانی سلول‌های زنده پروبیوتیکی تثبیت شده می‌گذارد (Fu & Chen, 2011). علاوه بر این، تحرک مولکولی املاح رانده شده بر اثر ساختار و حالت فیزیکی ماتریکس تثبیت کننده نیز می‌تواند بر پایداری پروبیوتیک‌ها اثر بگذارد. در سیستم‌های با رطوبت متوسط (شامل فیلم خوراکی)، حضور مقادیر بالایی از املاح با هم با حالت فیزیکی لاستیک مانند، واکنش‌های شیمیایی و آنزیمی را تسهیل می‌کنند که سبب از بین رفتن ساختارهای ضروری مانند غشای دو لایه‌ای فسفولیپیدی سلولی می‌شوند (در خصوص حضور املاح باید گفت که این مواد سبب افزایش تحرک مولکولی می‌شوند) (Altamirano-Fortoul *et al.*, 2012). اگرچه فهم مکانیسم کامل پایداری پروبیوتیک‌ها در ماتریس‌های بیوپلیمری در دوره نگهداری در دسترس نیست، به نظر می‌رسد مانع فضایی املاح و ماتریس انتشار انتقالی اکسیژن (هر دو در ارتباط با تفاوت (T_Tg)، حضور مواد مغذی و مواد مهار کننده رادیکال‌های آزاد به علاوه اثر برهمکنش از طریق پیوند هیدروژنی با سر قطبی گروه‌های فسفولیپیدی غشاها می‌تواند امکان توضیح پایداری پروبیوتیک‌ها را در فیلم‌های خوراکی مهیا کند (Soukoulis *et al.*, 2014a; Kanmani & Lim, 2013; Corcoran *et al.*, 2004).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، معلوم شده باکتری‌های پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*) نگهداری‌شده در دمای ۴ درجه سلسیوس زنده‌مانی بیشتری نسبت به پروبیوتیک‌های نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نشان داده‌اند. در بین سویه‌های پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیشترین میزان زنده‌مانی را در دوره نگهداری داشته است. فیلم خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز می‌تواند حامل خوبی برای انتقال پروبیوتیک‌ها در بسته‌بندی مواد غذایی به‌هنگام نگهداری آنها در دمای یخچالی باشد.

مطالعات در آینده می‌تواند به بررسی تأثیر افزودن پروبیوتیک‌ها بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی فیلم خوراکی و همچنین بررسی ریزساختار فیلم‌ها معطوف شود.

مراجع

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

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

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. and Scher, J .2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. Journal of Food Engineering. 104(4):467–483.

Capela, P., Hay, T.K.C. and Shah, N.P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International. 39(2):203–211.

Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray- dried in the presence of prebiotic substances. Journal of Applied Microbiology. 96(5): 1024–1039.

Dadfar, S.M.M. and Kavoosi, G. 2015. Mechanical and water binding properties of carboxymethyl cellulose/multiwalled carbon nanotube nanocomposites. Polymer Composed. 36,145–152. (in persian)

Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J., Ghanati, K., Khakpour, M. and Khaksar, R. 2015. Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing Zataria multiflora essential oil. International Journal of Biological Macromolecules. 72,606–613.

Ferdousi, R., Rouhi, M., Mohammadi, R., Mortazavian, A.M., Khosravi-Darani, K. and Homayouni Rad, A. 2013. Evaluation of probiotic survivability in yogurt exposed to cold chain interruption. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 12(Suppl):139.

Fu, N. and Chen, X.D. 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. Food Research International. 44(5): 1127–1149.

Gialamas, H., Zinoviadou, K.G., Biliaderis, C.G. and Koutsoumanis, K.P. 2010. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of Lactobacillus sakei into sodium-caseinate films for controlling Listeria monocytogenes in foods. Food Research International. 43(10): 2402–2408.

Gurr, M.I. 1987. Nutritional aspects of fermented milk products. FEMS Microbiology Letters. 46(3): 337–342.

Kanmani, P. and Lim, S.T. 2013. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. Food Chemistry. 141(2): 1041–1049.

Nobakhti, A.R., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M. and Mortazavian, A.M. 2009. Influence of lactulose and Hi-maize addition on viability of probiotic microorganisms in freshly made synbiotic fermented milk drink. Milchwissenschaft. 64(2): 191–193.

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitte,r J.M. and Bressollier, P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. LWT-Food Science and Technology. 50(1):1–16.

Soccol, C.R., de Souza Vandenberghe, L.P., Spier, M.R., Pedroni Medeiros, A.B., Yamaguishi, C.T., De Dea Lindner, J., Pandey, A. and Thomaz-Soccol, V. 2010. The potential of probiotics: a review. Food Technology and Biotechnology. 48(4): 413–434.

Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C. and Fisk, I. 2014a. Stability of Lactobacillus rhamnosus GG in prebiotic edible films. Food Chemistry. 159,302–308.

Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H.H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C. and Fisk, I. 2014b. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. Food Hydrocolloids. 39,231–242.

Tapia, M.S., Rojas Graü, M.A., Rodríguez, F.J., Ramírez, J., Carmona, A. and Martin-Belloso, O. 2007. Alginate and Gellan Based Edible Films for Probiotic Coatings on Fresh Cut Fruits. Journal of Food Science. 72(4): E190-E196.

Taverniti, V. and Guglielmetti, S. 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). Genes and Nutrition. 6(3): 261.

Yadollahi, M., Namazi, H., Barkhordari, S. 2014. Preparation and properties of carboxymethyl cellulose/layered double hydroxide bionanocomposite films. Carbohydrate Polymers. 108,83–90.

Food Engineering Research/Vol.17/No.65/Autumn & Winter 2018/P: 79-90

Addition of Probiotic Bacteria to Carboxymethyl Cellulose-Based Edible Film and Survival Assessment of Probiotic Bacteria in Refrigerated and Environment Temperatures

B. Ebrahimi, R. Mohammadi, A. M. Mortazavian* and S. Shojaee-Aliabadi*

* Corresponding Author: Department of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Email: mortazvn@sbmu.ac.ir and s_shojaee@sbmu.ac.ir
Received: 10 April 2018, Accepted: 31 August 2018

Nowadays, a refresh interest is rising to extend the viability of probiotics by direct incorporation of them in edible coats and films to prevent lethal phase transition in food processing and storage. In current study, four probiotic bacterial strains (*Lactobacillus acidophilus, L. casei, L. rhamnosus and Bifidobacterium bifidum*) were used for the immobilisation in edible film based carboxymethyl cellulose (CMC) during 42 days of storage at 25 $^{\circ}$C and 4 $^{\circ}$C respectively. Results showed a clear decrease in bacterial cell viability. But, viability of *L.acidophilus* and *L. rhamnosus* were always in the range of recommended levels at 4 $^{\circ}$C during the storage (10^6–10^7 CFU/g). CMC-based edible films could act as a suitable carrier for some probiotic strains in food packaging during refrigerated temperatures.

Keywords: *Bifidobacterium*, Edible coats, *Lactobacillus*, Viability