

مطالعه اثر نانوکپسولاسیون عصاره چای سبز بر زنده مانی لاکتوباسیلوس گاژی و بیفیدوبا کتریوم لاکتیس در بستنی سیمیوتیک

نگین نوری* بهشاد نودوست حسن گندمی نصرآبادی افشین آخوندزاده بستنی

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 کارآمد جهت محافظت این مواد طی فرایند تولید و نگهداری، مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف: در این مطالعه، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانولیپوزوم‌های عصاره چای سبز و فعالیت پری بیوتیکی آن بر روی دو پروبیوتیک لاکتوباسیلوس گاژی و بیفیدوبا کتریوم 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 گاژی و بیفیدوبا کتریوم لاکتیس به محیط کشت و بستنی اضافه شدند. نتایج: میانگین قطر نانولیپوزوم‌های بدست آمده، حدود 119 ± 44 nm با شاخص پراکندگی 0.14 ± 0.203 ، 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 گاژی و بیفیدوبا کتریوم لاکتیس را به طور معنی‌داری افزایش داد. در بین گروه‌های مورد مطالعه، کمترین کاهش در میانگین لگاریتم تعداد لاکتوباسیلوس گاژی در طول مدت زمان نگهداری در بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی معادل $1.09 \log$ و بیشترین کاهش در بستنی‌های گروه کنترل برابر با $1.16 \log$ مشاهده شده است. همچنین کمترین اختلاف در میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوبا کتریوم لاکتیس در بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی معادل $0.84 \log$ و بیشترین اختلاف در بستنی‌های گروه کنترل برابر با $1.04 \log$ 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

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 تا زمان مصرف مواد غذایی مذکور، از بقای مناسبی برخوردار بوده و به تعداد کافی به روده برسند (۲۵). باکتری‌های پروبیوتیک به شرطی قادرند اثرات مفید خود را بر سلامت مصرف کننده بگذارند که به تعداد 10^{10} CFU/g (۱۰) 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 صفرآ در ابتدای روده باریک می‌باشد (۳۰).

نانو کپسولاسیون 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 100 nm یا کمتر) که باعث حفظ خواص آن نیز می‌گردد. نانو کپسولاسیون 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

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف منظم و کافی آن‌ها با بهبود خواص میکروبی روده، اثرات سودمندی بر سلامت مصرف کننده می‌گذارد. برای تحقق این آثار سلامتی بخش مصرف منظم 10^6 الی 10^9 سلول زنده توصیه می‌گردد (۲۸). پری بیوتیک‌ها ترکیبات الیگوساکاریدی غیر قابل هضمی هستند که اثرات فیزیولوژیکی مفید خود را بر میزبان از طریق تحریک رشد انتخابی پروبیوتیک‌ها اعمال می‌کنند (۳۳). یک ماده غذایی حاوی پروبیوتیک و پری بیوتیک را سیمیوتیک یا غذای فرآوری می‌نامند (۱۱). بین پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها در فرآورده‌های سیمیوتیک اثر سینرژیستی وجود دارد. پری بیوتیک‌ها ترکیباتی هستند که 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 و یا ترکیب با فرآورده‌های غذایی در حال افزایش است. بستنی از یک سو به دلیل داشتن قابلیت بالا در بقای پروبیوتیک‌ها و از سوی دیگر بر طرفدار بودن به سبب دارا بودن خواص حسی ویژه، محیط مناسبی برای انتقال پروبیوتیک‌ها به بدن است (۱۶، ۹).



فراصودمند که آزاد سازی کنترل شده هسته را در بر می گیرد، استفاده می شود. 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 می شود. یکی از انواع نانوساختارها، لیپوزومها هستند. لیپوزومها در واقع وزیکولهای ریز و توخالی دارای یک یا چند غشا لیپیدی دولایه هستند که در مرکز آن ها هسته مایعی قرار دارد و می توانند مواد فعال را در فضای درونی خود به دام ببندازند. 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 می شود (۲۷). سازگاری زیستی، سایزهای وزیکولی مختلف و شارژ سطحی، از ویژگی های نانولیپوزومها می باشد (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 از جمله 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 خطرهای بیماری های قلبی عروقی، کاهش بروز بعضی از سرطان ها، 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 می شود (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 می شود (۱۲).

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

مواد و روش کار

تهیه و آماده سازی پروبیوتیکها: در این مطالعه از باکتری های پروبیوتیک لیوفلیزه (*Lactobacillus casei* (۰۱-Ic) و (*Lactobacillus casei* (۱۲-Bb) و *Bifidobacterium lactis* 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. سلول های 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 باکتری ها: 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 بر روی عدد ۱ تنظیم گردید. سپس سوسپانسیون باکتریایی با غلظت ۱۰ برابر جذب نوری ۱ تهیه شد. پس از تهیه سری رقت، در پلیت های حاوی محیط MRS Agar به صورت سطحی و دوگانه کشت داده شدند و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، پرگنه ها شمارش شد. تعداد باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس به ترتیب 1×10^6 و $1/2 \times 10^6$ CFU/ml محاسبه گردید.

تهیه عصاره آبی چای سبز: برگ های چای سبز از مزارعی در شمال ایران جمع آوری شد. عصاره آبی چای سبز با مخلوط کردن برگ های 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 لسیترین، کلسترول DSP-mPEG ۲۰۰۰ (۱ و ۲ دی استرول فسفاتیدیل اتانول آمین - متیل - پلی اتیلن گلیکول کوئزوگه - ۲۰۰۰ (سدیم + نمک)) (Nanocs, USA) در ۵ ml 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 ۱۰ ml آب دیونیزه به همراه عصاره چای سبز می باشد، 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 فیزیکی و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی:

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



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 $^{\circ}\text{C}$ ۱۸- تا ۱۸۰ روز نگهداری شدند.

اثر عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر بقای لاکتوباسیلوس کلزئی و بیفیدوبا کتریوم لاکتیس در بستنی: پس از ذوب شدن بستنی در دمای محیط، ۵ml از آن را به لوله حاوی ۴/۵ml آب پپتونه ۰/۱٪ منتقل نمودیم. پس از تهیه رقت‌های متوالی، از هر رقت ۱۰۰ μl برداشته و در پلیت‌های حاوی MRS Agar، به صورت سطحی کشت داده شد. جهت شمارش لاکتوباسیلوس کلزئی و بیفیدوبا کتریوم لاکتیس، پلیت‌های کشت داده شده، در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۳۷ به مدت ۴۸ ساعت به ترتیب به صورت هوازی و بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت کلونی باکتری‌ها شمارش گردید. **آنالیز شیمیایی:** کلیه آنالیزهای شیمیایی بر طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۴۵۰ انجام شد (۱۴). برای اندازه‌گیری pH از دستگاه pH متر دیجیتالی (Laboratory benchtopmeter.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 $^{\circ}\text{C}$ ۱۰۵ به مدت ۵h اندازه‌گیری 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 کلزئی و بیفیدوبا کتریوم 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 و تحلیل آماری: نتایج حاصل از اثر عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر رشد و بقای لاکتوباسیلوس کلزئی و بیفیدوبا کتریوم لاکتیس در محیط کشت و بستنی به روش آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی و برای مقایسه بین میانگین‌ها از تست Tukey استفاده شد. همچنین تفاوت

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

$$\text{میزان محصورسازی} (\%) = \frac{\text{عصاره کل مقدار} - \text{عصاره آزاد}}{\text{عصاره کل مقدار}} \times ۱۰۰$$

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

ارزیابی اثر عصاره چای سبز نانولیپوزومی بر رشد لاکتوباسیلوس کلزئی و بیفیدوبا کتریوم لاکتیس در محیط کشت: به منظور بررسی فعالیت پری بیوتیکی عصاره چای سبز به دو فرم آزاد و نانولیپوزومی بر روی دو باکتری لاکتوباسیلوس کلزئی (L-۰۱) و بیفیدوبا کتریوم لاکتیس (Bb-۱۲)، میزان CFU/ml 10^3 از سوسپانسیون باکتری به MRS ۲۰ ml broth حاوی ۱٪ عصاره آزاد و نانولیپوزومی تلقیح و در $^{\circ}\text{C}$ ۳۷ 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 $^{\circ}\text{C}$ ۳۷ در شرایط هوازی برای لاکتوباسیلوس کلزئی و بی‌هوازی برای بیفیدوبا کتریوم لاکتیس نگهداری شدند. میزان رشد باکتری با شمارش کلونی‌های رشد کرده، محاسبه گردید.

تهیه و آماده‌سازی 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 $^{\circ}\text{C}$ ۴۰ برسد، سپس در این درجه حرارت مواد خشک شامل ۱۰۰g پودر شیر خشک، ۲۷۰g شکر، ۰/۹g وانیل و ۱۰g پایدارکننده (پودر ثلث) را با هم زن برقی مخلوط و درجه حرارت را به $^{\circ}\text{C}$ ۸۰ 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 کلزئی به گروه A، B، E و F و ۱٪ (w/v) از باکتری بیفیدوبا کتریوم لاکتیس به گروه C، D، F تلقیح کردیم. در شمارش، تعداد اولیه این باکتری‌ها به طور تقریبی معادل 10^7 CFU/g $\times 10^2$ و 10^7 $\times 10^5$ 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



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) | ۱ | ۳۰ | ۶۰ | ۹۰ | ۱۲۰ | ۱۵۰ | ۱۸۰ |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| نمونه‌های بستنی | | | | | | | |
| لاکتوباسیلوس کازئی فاقد چای سبز | ۹۵/۸۵ | ۸۵/۵۵ | ۸۲/۱۶ | ۷۳/۶۱ | ۷۷/۲۳ | ۶۰/۸۰ | ۴۷/۷۳ |
| لاکتوباسیلوس کازئی همراه با چای سبز آزاد | ۹۷/۲۳ | ۹۳/۷۱ | ۸۲/۵۳ | ۸۰/۹۰ | ۷۷/۹۸ | ۶۹/۷۲ | ۷۰/۶۰ |
| لاکتوباسیلوس کازئی همراه با چای سبز نانولیپوزوم | ۹۸/۱۱ | ۹۴/۵۹ | ۸۵/۰۵ | ۸۷/۳ | ۸۳/۷۹ | ۸۷/۹۰ | ۸۰/۰۲ |

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

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

جدول ۳. ویژگی‌های شیمیایی نمونه‌های بستنی حاوی پروبیوتیک‌های همراه با عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزوم. * میانگین \pm انحراف معیار.

| ویژگی‌ها | pH | اسیدیته (g/l) | چربی (%) | ماده خشک بدون چربی (%) |
|---|------------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| نمونه‌های بستنی حاوی | | | | |
| لاکتوباسیلوس کازئی بدون عصاره چای سبز | ۶/۴۶ \pm ۰/۰۱* | ۲/۶۱ \pm ۰/۰ | ۶/۱۵ \pm ۰/۰۲ | ۰/۰۲ \pm ۳/۷۵ |
| لاکتوباسیلوس کازئی همراه با عصاره چای سبز آزاد | ۶/۴۳ \pm ۰/۰۱ | ۲/۶۱ \pm ۰/۰۱ | ۶/۱۵ \pm ۰/۰۲ | ۰/۰۴ \pm ۳/۸۳ |
| لاکتوباسیلوس کازئی همراه با عصاره چای سبز نانولیپوزوم | ۶/۴۳ \pm ۰/۰۱ | ۲/۶۱ \pm ۰/۰۱ | ۶/۱۲ \pm ۰/۰۱ | ۳/۸۵ \pm ۰/۰۲ |
| بیفیدوبا کتریوم لاکتیس بدون عصاره چای سبز | ۶/۴۶ \pm ۰/۰۲ | ۲/۶۰ \pm ۰/۰ | ۶/۱۴ \pm ۰/۰۱ | ۳/۸۶ \pm ۰/۰۱ |
| بیفیدوبا کتریوم لاکتیس همراه با عصاره چای سبز آزاد | ۶/۴۴ \pm ۰/۰۱ | ۲/۶۲ \pm ۰/۰۲ | ۶/۱۳ \pm ۰/۰۲ | ۳/۷۵ \pm ۰/۰۴ |
| بیفیدوبا کتریوم لاکتیس همراه با عصاره چای سبز نانولیپوزوم | ۶/۴۳ \pm ۰/۰۲ | ۲/۶۳ \pm ۰/۰۴ | ۶/۱۶ \pm ۰/۰۵ | ۳/۷۶ \pm ۰/۰۲ |

لاکتوباسیلوس 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 $\log 9/3 \pm 0/16$ باکتری در میلی لیتر رسید 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 کشت دارای عصاره چای سبز آزاد در مقایسه با گروه کنترل، افزایش یافت، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$).

افزودن ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی، رشد لاکتوباسیلوس کازئی را به طور معنی‌داری در ساعت ۶ و ۱۲ افزایش داد ($p < 0/05$)، در حالیکه تعداد باکتری، به ترتیب ۰/۵ و ۰/۶ لوگ بالاتر از گروه کنترل بود.

نتایج رشد بیفیدوبا کتریوم لاکتیس در محیط کشت حاوی ۱٪ چای سبز آزاد و نانوکپسوله نیز در نمودار ۳ نشان داده شده است. روند رشد بیفیدوبا کتریوم لاکتیس در محیط کشت دارای ۱٪ عصاره چای سبز آزاد در مقایسه با گروه کنترل در ساعات مورد مطالعه افزایش معنی‌داری داشت

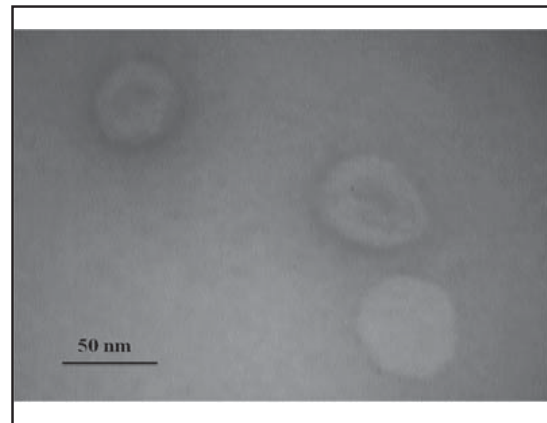
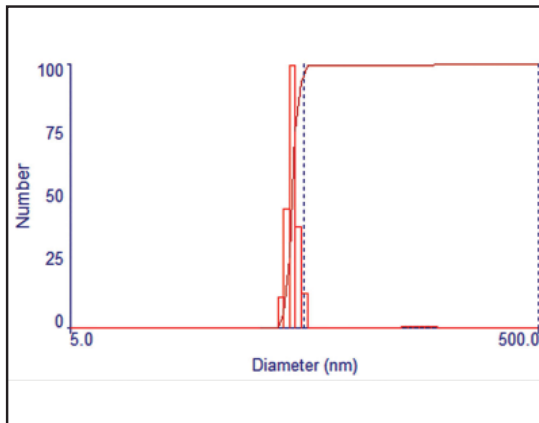
در ویژگی‌های ارگانولیتیک با استفاده از آنالیز واریانس و روش Least Significant differences Fisher's ارزیابی شد. لازم به ذکر است تمام تحلیل‌های آماری با نرم افزار SPSS، ۱۹/۰۰ انجام و نتایج معنی‌دار به صورت $p < 0/05$ گزارش گردید.

نتایج

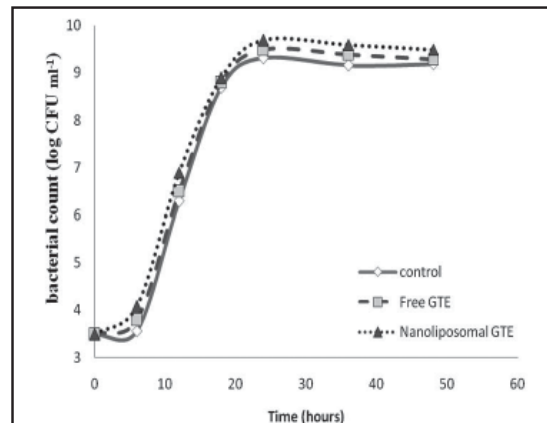
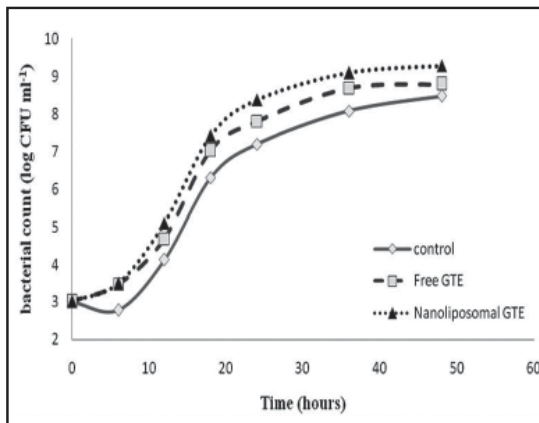
خواص فیزیکی شیمیایی و مورفولوژی: در نمودار ۱، مورفولوژی و اندازه نانولیپوزوم عصاره چای سبز، توسط میکروسکوپ الکترونی و DLS نشان داده شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میانگین قطر ذرات $44/7 \text{ nm}$ ، پتانسیل زتا -12 mV - میلی ولت و بازده نانوکپسولاسیون ۹۷٪ می‌باشد.

اثر عصاره چای سبز نانولیپوزومی بر رشد لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوبا کتریوم لاکتیس در محیط کشت: نتایج رشد لاکتوباسیلوس کازئی در محیط کشت حاوی ۱٪ چای سبز آزاد و نانوکپسوله طی ۴۸h در نمودار ۲ آمده است. در گروه کنترل طی ۶h اول تغییر معنی‌داری در رشد





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



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

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

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 $10^{1.59}$ بود. در جدول ۱، درصد زنده مانی لاکتوباسیلوس کلژنی همراه با عصاره چای سبز آزاد، نانولیپوزومی و فاقد عصاره در بستنی طی نگهداری در انجماد نشان داده شده است. میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کلژنی همراه با عصاره چای سبز آزاد طی ۱۸۰ روز نگهداری در انجماد کاهش یافته، به طوریکه میزان زنده‌مانی در روز ۱، از $9.7/23\%$ به $7.0/60\%$ درصد در روز ۱۸۰ کاهش یافته است. در صورتیکه میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کلژنی در بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی به ترتیب $1/13$ و $1/7$ برابر، بیشتر از نمونه‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد و نمونه‌های فاقد عصاره می‌باشد.

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 $1/1 \log$ گزارش گردید.

بر طبق نمودار ۵، در تیمارهای مختلف بستنی، روند کاهش در تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس مانند لاکتوباسیلوس کلژنی می‌باشد. در گروه کنترل و بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد، میانگین لگاریتم شمارش این باکتری از $7/90$ در روز صفر به ترتیب به $3/50$ و $5/11$ در روز ۱۸۰ نگهداری در انجماد رسید، به طوریکه این اختلاف در تعداد (معادل

اثر عصاره چای سبز نانولیپوزومی بر بقا و زنده مانی لاکتوباسیلوس کلژنی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی: اثر عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر بقای لاکتوباسیلوس کازی 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 کلژنی، شیب تندی داشته و از $7/96 \log$ در روز صفر به $3/80 \log$ در روز ۱۸۰ نگهداری در انجماد رسید که این کاهش معادل $4/16 \log$ می‌باشد. در نمونه‌های بستنی حاوی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد، کاهش ملایم‌تری نسبت به گروه کنترل دیده شد، بطوریکه لگاریتم تعداد باکتری به $4/62$ (معادل $3/34 \log$ کاهش)



عصاره چای سبز نانولیپوزومی، کاهش تعداد باکتری نسبت به دو گروه دیگر بسیار کمتر و تنها معادل $10^4/84$ بوده و تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس در انتهای دوره نگهداری به $10^7/06$ رسید.

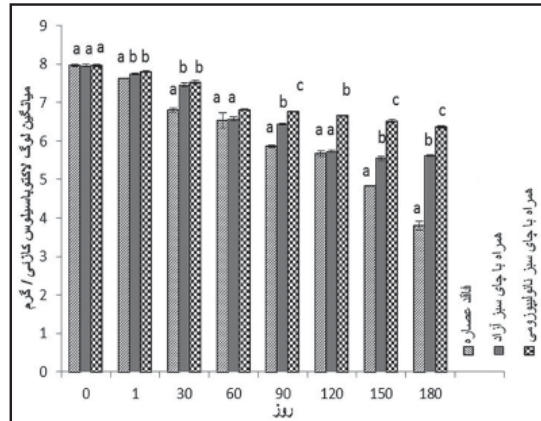
درصد زنده مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با عصاره چای سبز آزاد، نانولیپوزومی و فاقد عصاره در بستنی طی نگهداری در انجماد در جدول ۲ مشاهده می‌شود. میزان زنده مانی در روز ۱ در بستنی‌های گروه کنترل، حاوی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی به ترتیب $95/82$ ، $96/58$ و $97/56$ می‌باشد و این زنده مانی در روز ۱۸۰م نگهداری به $44/3$ ، $64/68$ و $89/36$ کاهش پیدا کرد، به طوریکه در اثر نانوکپسولاسیون عصاره چای سبز، درصد زنده مانی $1/4$ برابر افزایش یافت که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد.

نتایج آنالیز شیمیایی: نتایج اندازه‌گیری پارامترهای شیمیایی در جدول ۳ 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 ($p > 0.05$).

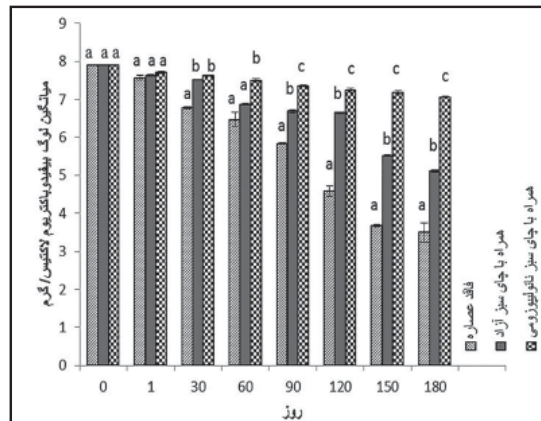
نتایج ارزیابی حسی: میانگین رتبه‌های پارامترهای حسی در نمونه‌های بستنی حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس فاقد عصاره و یا همراه با عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی در نمودار ۶ آمده است. بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی حسی از نظر پذیرش کلی دو گروه کنترل (فاقد عصاره) و بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره 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

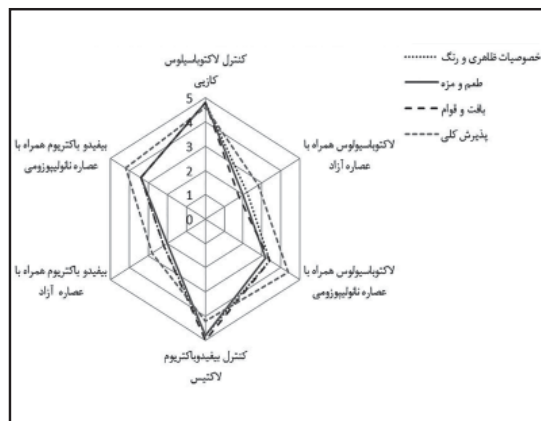
خواص فیزیکی شیمیایی و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی: در مطالعه حاضر، خواص فیزیکی شیمیایی و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی مانند سایز ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و میزان محصور سازی ارزیابی شد. بر طبق نتایج بدست آمده از DLS، وزیکول‌ها پراکندگی قابل قبولی داشتند و شاخص پراکندگی، پایین می‌باشد. در مطالعات پیشین که پلی فنول‌های چای سبز را با روش‌های مختلفی مانند هموژنیزه کردن با فشار بالا، روش فیلم نازک و ترکیب تزریق اتانل و فشار بالا نانوکپسوله کرده اند میانگین اندازه ذرات بدست آمده به ترتیب $100 < (8)$ ، $160/4$ و $166/36$ (۳۶) بود. در حالیکه در مطالعه حاضر قطر بدست آمده $44/7nm$ و $4/5$ برابر کمتر از اندازه استاندارد ذرات نانو ($200nm$) می‌باشد. احتمالاً این تفاوت در اندازه ذرات به میزان نیروی



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



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



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

$log 4/4$ در گروه کنترل نسبت به بستنی‌های حاوی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد (معادل $log 2/79$) بیشتر بوده است. در نمونه‌های بستنی حاوی ۱٪



خاصیت بیفیدوژنیک، اثر تحریک کننده بر رشد بیفیدوباکتریوم اینفانتیس و بیفیدوباکتریوم بروی را دارد (۳۱). ثابت شده است که اثر پری بیوتیکی چای سبز به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی رادیکالی پلی فنول های آن می باشد، که در نتیجه محیط بهتری را برای رشد باکتری های پروبیوتیک فراهم می سازد (۲۳، ۳۴). همچنین Macdonald و همکاران در سال ۱۹۸۳ بیان کرده اند که پروبیوتیک ها دارای آنزیم های هیدرولیتیکی هستند که قادرند گلیکوزیدهای فلاونوییدی عصاره چای سبز را به آگلیکون های مربوطه تبدیل نمایند (۱۹). در این مطالعه نشان داده شده است که کپسولاسیون عصاره چای سبز در نانولیپوزوم ها باعث بهبود رشد باکتری های مورد آزمایش می شود 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 ماندن لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم در بستنی: در مطالعات مختلف از روش های متعددی جهت افزایش بقای پروبیوتیک ها مانند میکرو کپسولاسیون در مواد غذایی استفاده شده است. یافته های مطالعه حاضر نیز نشان می دهد که می توان از نانو کپسولاسیون پری بیوتیک ها به منظور افزایش بقای پروبیوتیک ها 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 معنی دار در تعداد باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس متأثر از ۱٪ عصاره چای سبز نانولیپوزومی نسبت به عصاره چای سبز آزاد در بستنی می باشد ($p < 0.05$). Molan و همکاران در سال ۲۰۰۹ اظهار نمودند که این باکتری ها قادرند از پلی فنول های چای سبز به عنوان منبع کربن استفاده کرده و همچنین این ترکیبات به عنوان آنتی اکسیدان و ضد رادیکال باعث کاهش استرس های ناشی از اکسیداسیون و به دنبال آن فراهم کردن محیط مناسب تری برای پروبیوتک ها می شوند و در نهایت قادرند امکان زنده ماندن با درصد بالاتر را برای پروبیوتیک ها مهیا سازند (۲۲). نتایج این تحقیق نشان می دهد که طی فرایند نانو کپسولاسیون، قابلیت فراهمی زیستی عصاره چای سبز افزایش می یابد و تأثیر فزاینده ای در بقای پروبیوتیک ها در بستنی دارد. همچنین خاصیت پری بیوتیکی چای سبز به دلیل حساسیت پلی فنل های آن به شرایط انجماد در پروسه تولید، فشار و اکسیداسیون کاهش می یابد اما فرایند نانو کپسولاسیون به دلیل داشتن نقش حفاظتی تأثیر بسزایی بر بهبود عملکرد چای سبز در نقش پری بیوتیک ایفا می کند و از آنجا که چای سبز دارای خاصیت بیفیدوژنیک است، تأثیر بیشتری بر بقای بیفیدوباکتریوم 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 پروبیوتیک های لاکتوباسیلوس

مکانیکی بکار رفته بستگی دارد که در صورت استفاده از نیروی بیشتر، ذرات کوچکتری حاصل می شود. همچنین استفاده از اتانل می تواند باعث تغییر بار سیستم شده و درجه پایداری استری را تغییر دهد که منجر به کاهش سایز ذرات می شود (۱۰). بار سطحی و در نتیجه پایداری نانوذرات توسط پتانسیل زتا سنجیده می شود که یک پارامتر مهم در انعکاس خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پایداری بیولوژیکی نانوذرات تولید شده در سوسپانسیون می باشد. پتانسیل زتا نانولیپوزوم های چای سبز mv ۱۲/۶ و به ترتیب بیشتر و کمتر از نتایج بدست آمده از مطالعات Zou و همکاران در سال ۲۰۱۴ و Liu و همکاران در سال ۲۰۱۱ بوده که به ترتیب برابر با mv ۶/۱۶ و mv ۶/۷۲ گزارش شده است (۱۸، ۳۶). علت تفاوت در پتانسیل زتا به نوع فسفولیپید و کلسترول به کار رفته در تولید نانولیپوزوم بستگی دارد، به این علت که این دو ماده از ترکیبات اصلی نانولیپوزوم ها هستند. ثابت شده است که سوسپانسیون ها با پتانسیل زتای بیشتر، به دلیل دافعه بین ذرات باردار، پایدارتر بوده و بنابراین در برابر تمایلمان به تجمع مقاومت بیشتری از خود نشان می دهند (۱۰). همچنین در مطالعه ای Manosroi و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که لیپوزوم ها 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 نانولیپوزوم ها در صنعت می باشد و عواملی مانند مواد دیواره، ساختمان کپسول و واکنش بین مواد موجود در دیواره و درون هسته تأثیر گذار می باشند. در این مطالعه میزان محصور سازی عصاره چای سبز نانولیپوزومی تولید شده شرایط بهینه، ۹۷٪ بوده که بالاتر از بازده ۷۸/۵ درصدی گزارش شده توسط Zou و همکاران در سال ۲۰۱۴ می باشد (۳۶). Fan و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که فاکتورهای مختلفی مانند استفاده از مقادیر مناسب کلسترول و لیپید باعث افزایش میزان محصور سازی و نیز پایداری نانو ذره ها می شود (۳). به همین دلیل استفاده از روش Fang و همکاران در سال ۲۰۰۶ به دلیل داشتن بازده محصور سازی بالا یکی از بهترین روش ها جهت تهیه نانولیپوزوم های حاوی ترکیبات فنلی می باشد (۵). همچنین تحقیقات مختلف بیانگر این است که ترکیبات فنلی که از عوامل مؤثر در چای سبز می باشند با بازده بیشتری در لیپوزوم های دارای بار سطحی منفی محصور می گردند، زیرا در این حالت تراوایی غشاء نانولیپوزوم ها نسبت به حالتی که بار سطحی نانولیپوزوم ها 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 پروبیوتیک های 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 فزاینده آن بر رشد بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیل ها ثابت شده است (۳۲، ۳۵). Vodnar و Socaciu در سال ۲۰۱۲ مشخص کردند که چای سبز به دلیل دارا بودن



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

- 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.
- Donsi, 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.
- Fan, M., Xu, S., Xia, S., Zhang, X. (2008) Preparation of solid lipid nanoparticles by ethanol injection method and in vitro release study. *Eur. Food Res.* 227: 167-174.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gülseren, I.B. Corredig, M. (2013) Storage stability and physical characteristics of tea-poly-

پارااکازئی 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، $5 \log$ کاهش در تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مشاهده شده است که در ۴۸ ساعت به کمتر از $2 \log$ کاهش یافته، اما کاهش لاکتوباسیلوس پاراکازئی در ۲۴ ساعت اول $3 \log$ بوده که در ۴۸ ساعت نسبت به زمان صفر حتی $0.8 \log$ افزایش نیز یافته است. این سیر صعودی در بیفیدوباکتریوم انیمالیس با شدت بیشتری دیده می‌شود، به طوری که از $1 \log$ در $6/14$ در زمان صفر به $52 \log$ در ۲۴ ساعت و $55 \log$ در ۴۸ ساعت رسیده است (۱).

Najgebauer-Lejko نیز در سال ۲۰۱۴ بیان کرد که بیفیدوباکتریوم 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 فرآورده شیری و روش تولید آن نسبت داد. البته لازم به ذکر است که Shah و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ خاصیت آنتی‌اکسیدانی 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 پروبیوتیک‌ها 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 پری بیوتیکی طی ۲۱ روز نگهداری در یخچال ایجاد نموده است (۲۲). قابل ذکر است که در فاکتورهای بررسی شده در آنالیز شیمیایی نیز



- 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) Opalmitoylcurdlan 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 proanthocyanidins. *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



- 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 glycyrrhizinate. *Int J Pharm.* 241: 319-327.
30. Vernazza, C.L., Rabi, 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.



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 $44/7 \pm 1/9$ nm and had $0/203 \pm 0/014$ polydispersity index. Entrapment efficiency 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* during 48 h.

Figure 3. Effect of free and nanoliposomal green tea extract on the growth of *Bifidobacterium lactis* during 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.

