Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۶۶، شماره ۴، ۳۴۲-۳۳۷

تأثیر ریز پوشانی با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم بر میزان بقاء لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(*La5*) در شرایط مشابه مایع معدی-روده‌ای

حمید میرزایی [۱] هادی پورجعفر [۲*] عزیز همایونی راد [۳]

۱) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، گروه بهداشت مواد غذایی، تبریز - ایران.

۲) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز - ایران.

۳) گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۳ شهریور ماه ۱۳۸۹ ، پذیرش نهایی: ۵ تیر ماه ۱۳۹۰)

چکیده

یکی ازشیوه‌های نوین در زمینه افزایش ماندگاری پروبیوتیک‌ها در داخل فرآورده‌های غذایی پروبیوتیکی و در حین گذر از جهازگوارشی، به منظور انتقال ایمن آنها به روده بزرگ، ریزپوشانی (میکروواینکپسولاسیون) سلول‌های پروبیوتیکی می‌باشد. این مطالعه با هدف تعیین تأثیر ریزپوشانی با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم بر میزان بقاء لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(*La5*) درشرایط مشابه مایع معدی-روده ای انجام پذیرفت. بقاپذیری باکتری مورد نظر در محلول نمک صفراوی ۰/۶ درصد وهمچنین شرایط مشابه مایع معدی (pH=۱/۵۵) وبه دنبال آن گرمخانه‌گذاری درشرایط مشابه مایع روده‌ای (pH=۸/۲۵) با وبدون نمک صفراوی ۰/۶ درصد مورد بررسی قرارگرفت. در این مطالعه جهت انجام فرآیند ریزپوشانی باکتری از روش اکستروژن استفاده‌شد. داده‌ها با استفاده ازآزمون t-test مستقل موردآنالیز قرارگرفتند. نتایج نشان دادند که میزان بقاءسلول‌های ریزپوشانی‌شده درشرایط اسیدی مشابه مایع معدی و همچنین شرایط مایع روده‌ای با و بدون نمک صفراوی ۰/۶ درصد بطور معنی‌داری بیشتر ازسلول‌های آزاد است (p<۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، ریزپوشانی، آلژینات کلسیم، نشاسته مقاوم، مایع معدی - روده‌ای.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که وقتی وارد دستگاه گوارش می‌شوند در یک شمار مشخص و معینی یک یا چند اثر مفیدی را روی سلامتی میزبان می‌گذارند (۱۱). میزان بقاء اندک پروبیوتیک‌ها در شرایط دشوار فرآورده‌های غذایی و نیز شرایط اسید - صفراوی دستگاه گوارش، پژوهشگران را همواره به یافتن شیوه‌های بهبود این شاخص ترغیب کرده است. ریزپوشانی بعنوان یکی از تازه‌ترین این شیوه‌ها، اثر قابل ملاحظه‌ای در این ارتباط داشته است (۱،۱۵). از دیدگاه میکروب‌شناسی ریزپوشانی عبارت است از پوشش دادن لایه‌ای از هیدروکلوئید به دور سلولهای ریززنده در مقیاس میکروسکوپی و محصور کردن آنها به منظور تفکیک کردن از محیط، طوریکه بقای قابل توجهی از سلول‌ها را باعث شود (۶). در کل هدف اصلی ریز پوشانی پروبیوتیک‌ها بالا بردن مدت زمان ماندگاری پروبیوتیک‌ها در داخل محصول و ایجاد امکان انتقال و آزادسازی ایمن آنها در نقاط مناسب دستگاه گوارش است که نحوه انتقال و عبور انواع مختلفی از باکتریهای پروبیوتیک از جمله لاکتوباسیلوس کازئی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶). مطالعات مختلف دیگری نیز در ارتباط با اثر ریز پوشانی برروی میزان ماندگاری پروبیوتیک‌ها در حین گذر از مایع معدی - روده‌ای انجام گرفته است (۴،۱۲،۱۷،۲۱). پیشرفت‌های اخیر در زمینه ریز پوشانی پروبیوتیک‌ها، هم در راستای مصارف صنعتی و هم در راستای اهداف ذکر شده می‌باشد و راهگشای بسیاری از مشکلات موجود در زمینه مدت زمان بقای ارگانیسم‌های پروبیوتیک در داخل محصول و همچنین داخل دستگاه گوارش و افزایش میزان تاثیرگذاری محصولات حاوی آنها است (۳،۵). در این راستا Sultana و همکاران در سال ۲۰۰۰ میزان افزایش بقای پروبیوتیک ریز پوشانی شده با آلژینات - نشاسته را در شرایط مشابه معدی - روده‌ای نشان داده‌اند (۲۱). در مطالعه دیگر Krasaekoopt و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر مفید ریز پوشانی در افزایش بقای پروبیوتیک‌ها را با استفاده از سه ماده کیتوزان، آلژینات سدیم و پلی - ال - لیزین را نشان داده‌اند (۱۲). Cui و همکاران نیز در سال ۲۰۰۰ نقش ریز پوشانی در افزایش بقاء پروبیوتیک ها را نتیجه گیری کرده‌اند (۴). هدف از مطالعه حاضر تعیین تاثیر ریز پوشانی با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم بر میزان بقاء لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*La5*) در شرایط مشابه مایع معدی - روده‌ای می‌باشد.

مواد و روش کار

فعال‌سازی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(*La5*): پس از تهیه آغازگر مورد نظر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس *La5* (*CHR-Hansen, Horsholm, Denmark*)، بسته حامل با دقت در شرایط استریل باز شده و یک گرم از آغازگر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط آبگوشت (Man- Rogasa- sharpe de) MRS بصورت یکنواخت مخلوط گردیده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد تا آغازگر با جذب آب از حالت کمون خارج شده و وارد مرحله رشد لگاریتمی شود. روز بعد یک

(*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۴۱۱-۲۸۰۴۸۲۸ نمابر: ۰۴۱۱-۲۸۱۸۶۸۲ Email: drhpsglad@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر از کشت حاصل، دوباره با ۹۹ میلی‌لیتر محیط کشت تازه (یک درصد) رقیق گردیده و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرارداده شد. در طول هفته، کشت مذکور سه بار به محیط کشت تازه انتقال داده شده و در پایان ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. هدف از این کار، دسترسی دائم به باکتری‌های پروبیوتیک در فاز رشد لگاریتمی بود (۸،۹،۱۴).

جداسازی توده سلولی (خالص‌سازی باکتری): در این مرحله، حدود ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت آبگوشت MRS تهیه شده در مرحله فعال‌سازی کشت آغازگر که در یخچال نگهداری می‌شد را به حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه انتقال داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس از آن جهت تخلیص باکتری مورد نظر استفاده شد. برای این منظور محیط کشت مذکور کاملاً هم زده شد تا به حالت همگن درآید، سپس توسط سمپلر یک میلی‌لیتری به داخل هرکدام از ۲۰ عدد میکروتیوب یک میلی‌لیتری انتقال داده شد و بعد توسط دستگاه سانتریفوژ (U.K و BNI8OHY و West Sussex و 2010 Model) و (Centrion centrifuge سانتریفوژ شد rpm) ۱۰۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه بعد از سانتریفوژ مایع رویی بیرون ریخته شد و رسوب باکتری ته میکروتیوب‌ها دو بار دیگر نیز توسط یک میلی لیتر از سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد سانتریفوژ شد تا کاملاً مورد شستشو قرار گیرد (۱۹). از این امولسیون باکتریایی جهت استفاده در ریز پوشانی باکتری استفاده شد.

ریزپوشانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس *(La5)*: بدین منظور مخلوطی از آلژینات سدیم (Sigma, USA) و نشاسته مقاوم ذرت (Hi-maiza (Merk, Daemstadt, Germany با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد و مقدار قابل توجهی باکتری مورد نظر بعد از تخلیص از محیط کشت در داخل آب مقطر استریل تهیه شد.

ابتدا ۲۰ گرم آلژینات سدیم به ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گشت و سپس استریل شد. پس از آن محلول آلژینات به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد تا ذرات آلژینات بخوبی آب جذب کنند. روز بعد محلول آلژینات از یخچال به محیط آزمایشگاه منتقل شد تا با محیط هم دما شود. در همین موقع ۲۰ گرم نشاسته مقاوم به آرامی به داخل محلول آلژینات در حالیکه روی دستگاه هات پلیت (Germanty و KG و staufen 79219 Model و IKA Labortechnik) بوسیله مگنت و با دور منظم هم زده می‌شد، اضافه گشت و بعد ۱۰ عدد از میکروتیوب‌های حاوی امولسیون باکتریایی تهیه شده در مرحله قبل مجموعاً به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به مخلوط آلژینات/ نشاسته تخلیه شدند و حدود ۰/۵ میلی‌لیتر توین ۸۰ (Merk, Hohenbrunn, Germany) به آن اضافه شد. سپس مخلوط حاصل وارد محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار گردید. در اثر تماس آلژینات با یون‌های کلسیم، دیواره کپسول کاملاً شکل گرفت و دانک‌ها بصورت قطراتی ریز در محلول کلرید کلسیم ته‌نشین شدند (۸،۹،۱۹،۲۲). سپس محلول کلرید کلسیم زهکشی و جدا گردیده و دانک‌های حاصل جمع‌آوری شدند. همه مراحل فوق در شرایط کاملاً استریل انجام پذیرفت.

آزمون دانک‌ها: اندازه و شکل دانک‌های حاصل از ریز پوشانی سلولهای میکروبی و طرز قرارگیری باکتری‌ها در درون دانک‌ها بوسیله میکروسکوپ نوری مجهز به میکرومتر (Alphaphot-2 Y52-T. Japan Nikon-Model) و پاشیدن لوگول روی دانک‌ها و همچنین رنگ‌آمیزی گرم دانک‌های شکاف داده شده مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت شکاف دادن دانک ها، ابتدا دانک‌های درشت‌تر انتخاب و سپس روی لام بوسیله تیغ جراحی از وسط برش داده شد و بلافاصله روی سطح برش رنگ آمیزی گرم انجام گرفت. دراین روش‌ها ساختمان کروی و یا بیضی دانک‌های حاصل و پوشینه نشاسته اطراف آنها و همچنین باکتریهای باسیلی شکل درون دانک‌ها به طور کاملاً روشن زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شد.

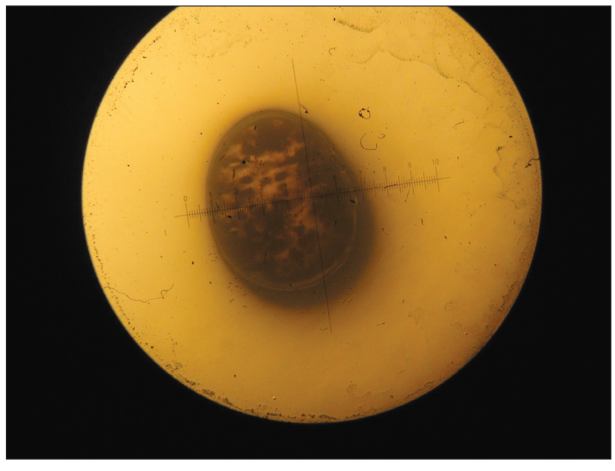
آزادسازی باکتری از دانک: برای ارزیابی زنده مانی گونه‌های پروبیوتیکی ریز پوشانی شده، ۱ گرم از دانک در ۹ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار و با pH برابر ۷ روی شیکرگیره‌دار (GMBH. Typ VX5-Germany IKA- Model Janke & Kunkel) بمدت ۳۰ دقیقه بصورت همگن در آمده و رقت‌های لازم با بافر فسفات تهیه شد (۸،۹،۱۹) و در محیط کشت agar; Merck, Darmstadt, Germany and Salicin; Sigma, USA) MRS-Salicin-agar (MRS در ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد (۱۸).

بررسی میزان بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده در محلول نمک صفراوی: برای این منظور از یک طرف ۱ گرم باکتری ریز پوشانی شده بصورت دانک و از طرف دیگر ۱ میلی لیتر باکتری آزاد (یکی از تیوب‌های حاوی رسوب باکتری که با سرم فیزیولوژی بصورت امولسیون درآمده) تحت شرایط مشابه به داخل ۱۰ میلی لیتر نمک صفراوی ۰/۶ درصد با pH برابر ۸/۲۵ که قبلاً در داخل اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ دقیقه) استریل شده بود افزوده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری، هر کدام از محیط ها بوسیله پیپتون واتر ۰/۱ درصد رقیق سازی شده و در محیط MRS-Salicin-agar بصورت کشت مخلوط و بمدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند، سپس جهت آنالیز آماری میزان بقای باکتری‌های آزاد و ریز پوشانی شده مورد شمارش قرار گرفتند (۱۲).

بررسی میزان بقای باکتری ریزپوشانی شده در شرایط مشابه مایع معدی و مایع روده ای با و بدون نمک صفراوی: برای این منظور از یک طرف ۱ گرم دانک و از طرف دیگر یکی از تیوب‌های حاوی باکتری آزاد (۱ میلی لیتر امولسیون باکتری) تحت شرایط مشابه وارد لوله‌های حاوی ۱۰ میلی لیتر مایع معدی (اسید هیدروکلریک ۰/۰۸ مول حاوی ۰/۲ درصد Nacl و با PH برابر ۱/۵۵ و بدون پپسین) شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱ـ شکل دانک‌های حاصله از ریز پوشانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La5) با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم با قطر تقریبی ۱۰۰-۵۰ میکرون (بعد از پاشیدن لوگول و با بزرگنمایی ۱۰).

گرمخانه‌گذاری ۱ میلی‌لیتر از آنها به داخل ۹ میلی‌لیتر مایع روده‌ای (فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم ۰/۰۵ مول با PH برابر ۷/۴۳ با و بدون نمک صفراوی ۰/۶ درصد) انتقال داده شده و به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس هر کدام از محیط‌ها بوسیله پپتون واتر ۰/۱ درصد رقیق‌سازی شده و در محیط Salicin-agar-MRS بصورت کشت مخلوط و بمدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند، سپس جهت آنالیز آماری میزان بقای باکتری‌های آزاد و ریز پوشانی شده مورد شمارش قرار گرفتند (۱۲). برای مقایسه تعداد سلول‌های زنده باکتری مورد نظر در هر کدام از مقاطع زمانی مطرح شده از آزمون آماری تی مستقل در سطح $p<0/05$ استفاده شد.

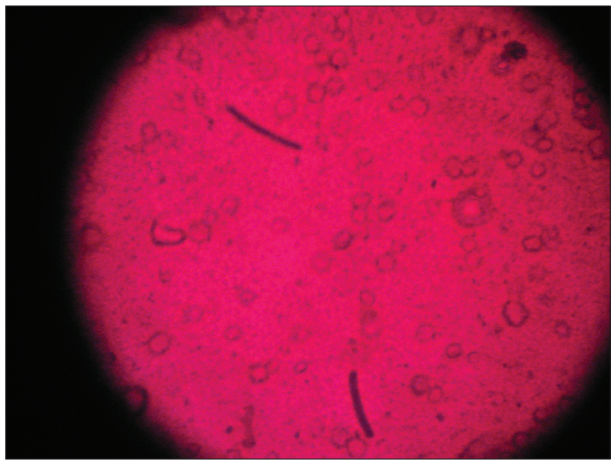
نتایج

در تصویر ۱، شکل و اندازه تقریبی دانک‌های حاصل از پروسه ریز پوشانی و در تصویر ۲ پراکنش باکتری لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس *La5* در داخل دانک‌ها نشان داده شده است. اندازه تقریبی دانک‌ها در حدود ۱۰۰-۵۰ میکرون بود.

نتایج مربوط به میزان بقای لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس *La5* آزاد و ریز پوشانی شده در شرایط مشابه مایع معدی - روده‌ای در جدول ۱ و ۲ آورده شده است.

بحث

اهمیت روزافزون پروبیوتیک‌ها و فرآورده‌های غذایی پروبیوتیکی از یک طرف و قابلیت زنده‌مانی اندک این میکروارگانیسم‌ها در داخل مواد غذایی از جمله فرآورده‌های تخمیری و دستگاه گوارش عمدتاً به دلیل pH پایین از طرف دیگر، باعث شده تا پژوهشگران همیشه بدنبال راه‌هایی برای افزایش ماندگاری این میکروارگانیسم‌ها باشند.



تصویر ۲ـ مشاهده باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La5) در برش عرضی دانک آلژینات کلسیم با پوشینهٔ نشاسته مقاوم با بزرگنمایی ۱۰۰ ×.

این مطالعه به منظور تعیین میزان بقای لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس (*La5*) آزاد و ریز پوشانی شده با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم در شرایط مشابه مایع معدی - روده‌ای انجام گرفت. بر اساس نتایج حاصل از شمارش باکتریائی در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط محلول نمک صفراوی ۰/۶ درصد (pH=۸/۲۵) و همچنین در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط مشابه مایع معدی (pH=۱/۵۵) و به دنبال آن گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵۰ دقیقه در شرایط مشابه مایع روده‌ای (pH=۷/۴۳) با و بدون نمک صفراوی ۰/۶ درصد، نشان داده شد که ریز پوشانی با ژل آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم باعث افزایش معنی‌داری در بقای باکتری مورد نظر در شرایط فوق شده است. این بدان معنی است که ریز پوشانی باکتری به مانند حایلی تأثیر سوء شرایط نامساعد محیطی روی باکتری را کاهش داده و باعث افزایش ماندگاری آنها می‌شود. این نتیجه با یافته‌های Krasaekoopt و همکاران در سال ۲۰۰۴ همخوانی دارد (۱۲). در مطالعه Cui و همکاران در سال ۲۰۰۰ بقای بیفیدوباکتریوم به دام افتاده در آلژینات پلی - ال - لیزین در شرایط اسیدی و شرایط مایع روده‌ای چشمگیر بود (۴). Picot و همکاران در سال ۲۰۰۴ ریز پوشانی بیفیدوباکتریوم در میکروکپسول‌های بر پایه پروتئین آب پنیر و بقا در شرایط شبیه سازی شده مایع معدی - روده‌ای و در داخل ماست را مورد بررسی قرار داده‌اند. در این پژوهش باکتری B. breve R070 و *B.longum R023* با روش امولسیون و خشک کردن افشانی در پروتئین آب پنیر دناتوره شده بعنوان ماده غیر متحرک ساز، ریز پوشانی شده بودند. میزان بقای B. breve R070 ریز پوشانی شده نسبت به سلول‌های آزاد در طی ۲۸ روز ذخیره‌سازی در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ماست Log cycles ۲/۶+ و بعد از قرار گرفتن در شرایط مشابه معدی - روده‌ای Log cycles ۲/۷ + بود که این مقدار بسیار بالا و قابل توجه بود (۱۷). Hansen و همکاران در سال ۲۰۰۲ ماندگاری

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ـ میزان بقای سلول‌های آزاد و ریز پوشانی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La5 بعد از گرمخانه‌گذاری در محلول نمک صفراوی ۰/۶ درصد (pH = ۸/۲۵) در ۳۷ در طی ۲ ساعت. *در هر ستون تعداد سلول های زنده ریز پوشانی شده بطور معنی داری بیشتر از سلول های آزاد می باشد (p<۰/۰۵).

	۰دقیقه	۳۰دقیقه	۶۰دقیقه	۹۰دقیقه	۱۲۰دقیقه
باکتری‌های آزاد (cfu/ml)	$۲\pm۰/۱\times۱۰^{۱۰}$	$۹\pm۰/۵\times۱۰^{۸}$	$۴\pm۰/۴\times۱۰^{۷}$	$<۱۰^{۷}$	$<۱۰^{۷}$
باکتری‌های ریز پوشانی شده (cfu/ml)	$۵\pm۰/۴\times۱۰^{۱۰*}$	$۱\pm۰/۱\times۱۰^{۱۰*}$	$۱\pm۰/۱\times۱۰^{۹*}$	$۱\pm۰/۷\times۱۰^{۸*}$	$۹\pm۰/۴\times۱۰^{۸*}$

جدول ۲ـ میزان بقای سلول‌های آزاد و ریز پوشانی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La5 بعد از گرمخانه‌گذاری. در محلول مشابه مایع معدی (pH = ۱/۵۵) در طی ۲ ساعت و سپس مایع مشابه روده (pH = ۷/۴۳). با و بدون نمک صفراوی ۰/۶ درصد برای ۱۵۰ دقیقه در ۳۷ . *در هر ستون تعداد سلول های زنده ریز پوشانی شده بطور معنی داری بیشتر از سلول های آزاد می‌باشد (p<۰/۰۵).

		۰دقیقه	۳۰دقیقه	۶۰دقیقه	۹۰دقیقه	۱۲۰دقیقه
باصفرا	باکتری‌های آزاد (cfu/ml)	$۳\pm۰/۳\times۱۰^{۹}$	$۱\pm۰/۴\times۱۰^{۸}$	$۱\pm۰/۴\times۱۰^{۷}$	$<۱۰^{۷}$	$<۱۰^{۷}$
	باکتری ریز پوشانی شده (cfu/ml)	$۷\pm۱/۱\times۱۰^{۹*}$	$۱\pm۰/۷\times۱۰^{۹*}$	$۵\pm۱\times۱۰۸^{*}$	$۴\pm۰/۸\times۱۰^{۸*}$	$۱\pm۰/۴\times۱۰^{۸*}$
بدون صفرا	باکتری آزاد (cfu/ml)	$۲\pm۰/۴\times۱۰^{۱۰}$	$۴\pm۰/۶\times۱۰^{۹}$	$۱/۲\pm۱/۱\times۱۰^{۹}$	$۱/۷\pm۱/۷\times۱۰^{۸}$	$۳\pm۰/۱\times۱۰^{۷}$
	باکتریریز پوشانی شده (cfu/ml)	$۹\pm۰/۶\times۱۰^{۱۰*}$	$۸\pm۰/۵\times۱۰^{۱۰*}$	$۵\pm۱\times۱۰^{۱۰*}$	$۱\pm۰/۲\times۱۰^{۱۰*}$	$۱\pm۰/۱\times۱۰^{۹*}$

گونه‌های مختلف بیفیدوباکتریوم ریز پوشانی شده با آلژینات کلسیم را در شیر و شرایط مشابه معدی ـ روده‌ای مورد بررسی قرار داده‌اند. در این مطالعه ۹ سویه از این جنس انتخاب شده بود که اثر کلی ریز پوشانی در افزایش بقای این جنس از باکتری نشان داده شد و از این نظر با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۷). همچنین Sultana و همکاران در سال ۲۰۰۰ ریز پوشانی باکتری پروبیوتیک با آلژینات ـ نشاسته را انجام داده و بقای این باکتری را در شرایط مشابه مایع معدی ـ روده‌ای و در داخل ماست، مورد بررسی قرار داده‌اند. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش بکارگیری نشاسته با آمیلوز بالا یا Hi- maize (بعنوان پری بیوتیک)، کپسول سازی باکتری زنده را در مقایسه با مورد بدون نشاسته بهبود می بخشد و بقاپذیری باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و سویه‌های مختلف بیفیدوباکتر کپسول‌دار شده در طی ۸ هفته نگهداری در ماست به اندازه ۰/۵ لگاریتم و در سلولهای آزاد ۱ لگاریتم کاهش داشت. در این مطالعه نیز نقش توأم آلژینات ـ نشاسته در افزایش بقای باکتری پروبیوتیک در شرایط نامساعد با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۱). لازم به ذکر است که یکی از فاکتورهای مرتبط و مهم در زمینه ریز پوشانی پروبیوتیک‌ها با ژل آلژینات کلسیم که مورد توجه پژوهشگران نیز می باشد غلظت‌های آلژینات وهمچنین کلسیم به کار گرفته شده در این پروسه می‌باشد. در این رابطه Mandal و همکاران در سال ۲۰۰۶ تأثیر غلظت‌های آلژینات روی بقای باکتری L.casei NCDC-298 ریز پوشانی شده را مورد بررسی قرار داده‌اند. در این مطالعه مقاومت غلظت‌های متفاوت آلژینات ۲، ۳ و ۴ درصد در pH برابر ۱/۵ و نمک‌های صفراوی با غلظت‌های بالای ۲-۱ درصد و پروسه گرمایی ۵۵، ۶۰، ۶۵ درجه سانتیگراد برای ۲۰ دقیقه مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه در شرایط pH پایین قولون و در حضور املاح صفراوی و پروسه گرمادهی، با افزایش غلظت آلژینات میزان بقای پروبیوتیک‌ها هم متناسب با آن افزایش می یابد، بدون اینکه تأثیری در آزادسازی سلول‌های به دام افتاده در آن داشته باشد(۱۳). و در مطالعه‌ای که توسط Simpson و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام گرفته است این نتیجه حاصل شد که کلرید کلسیم باعث افزایش استحکام ژل آلژینات می‌شود و هر چه قدر میزان $Ca^{۲+}$ بیشتر باشد میزان ضخامت پوشینه و در نتیجه استحکام آن بیشتر می‌شود(۲۰).

Kailasapathy و همکاران در سال ۲۰۰۲ ریز پوشانی باکتری پروبیوتیک، تولید محصولات پروبیوتیکی و افزایش ماندگاری این ارگانیسم‌ها در داخل محصولات و مخصوصاً داخل دستگاه معدی ـ روده‌ای انسان را مورد بررسی قرار داده‌اند. در این پژوهش اعلام شده است که ریز پوشانی با هدف فراهم آوردن یک سد فیزیکی برای حفاظت پروبیوتیک‌ها در مقابل شرایط نامساعد محیطی موجود و بی حرکت نگه داشتن باکتری‌های پروبیوتیکی در بیوتکنولوژی انجام می‌گیرد. روشهای مختلف ریز پوشانی نیز مورد بحث در این مطالعه می باشد و آمده است که بیشترین موارد این فن آوری آلژینات کلسیم می باشد و این نشان دهنده اهمیت این ماده است. مواد دیگر که بعد از آلژینات بیشترین استفاده را دارند کاپا ـ کاراگینان، صمغ ژلان، ژلاتین و نشاسته معرفی شده‌اند. نیازهای تحقیقاتی در این زمینه شامل طراحی دانکها در سایزهای کوچک و با مقاومت بالا در حد میکرو و نانو می باشند که کاربردهای تجاری زیادی دارد. حامل‌های غذایی گزارش شده شامل ماست، پنیر، بستنی و سس مایونز می‌باشد(۱۰).

Anselmi و همکاران در سال ۲۰۰۲ هم استفاده از تکنولوژی جدید در بهبود ویژگی‌های ریز پوشانی، با بکارگیری اثر استحکام بخشی اشعه U.V، پایداری ذاتی خوب دانک‌ها، سم‌زایی پائین و توانایی مقامت بهتر و فرمولاسیون ساده و ارزان که از اهداف مهم این تکنولوژی می‌باشند را

www.SID.ir

Archive of SID

مورد بحث و بررسی قرار داده‌اند (۲).

بر اساس نتایج بسیار ارزشمندی که در مطالعات متعدد بدست آمده است، اینگونه نتیجه‌گیری می‌شود که ریز پوشانی پروبیوتیک‌ها نقش بسیار مهمی در حفاظت این ارگانیسم‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی از جمله شرایط داخل فرآورده‌های تخمیری و شرایط مشابه مایع معدی - روده‌ای ایفا می‌کند و در نتیجه میزان بقای این ارگانیسم‌ها را در شرایط ذکر شده بهبود می‌بخشد.

در مجموع نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد که ریز پوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس *La5* با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم باعث افزایش معنی‌داری در بقای این باکتری در شرایط مشابه مایع معدی - روده‌ای می‌شود.

References

1. Anal, A.K., Singh, H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery.Trends Food Sci. Tech.18: 240-251.
2. Anselmi, C., Centini, M., Rossi, C., Ricci, M., Rastrelli, A., Anderassi, M., Buonocore, A., La Rosa, C. (2002) New microencapsulated sunscreens: technology and comparative evaluation. I. J. Pharmacol. 242: 207-211.
3. Boylston,T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B., Reinheimer, J.A. (2004) Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. Int. Dairy. J. 14: 375-387.
4. Cui, J.H., Goh, J.S., Kim, P.H., Choi, S.H., Lee, B.J. (2000) Survival and Stability of Bifidobacteria Loaded in Alginate Poly-l-lysine Microparticles. I. J. Pharmacol. 210: 51-59.
5. Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N.P.(2006) Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. Int. Dairy. J. 16: 1181-1189.
6. Gong, C., Zhang, H., Wang, x. (2009) Effect of shell materials on microstructure and properties of microencapsulated n-Octadecane. Iranian Polym. J. 18: 501-512.
7. Hansen, L.T., Allan-Wojtas, D.M., Jin, Y.L., Paulson, A.T. (2001) Survival of Ca-alginate microencapsulated bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiol. 19: 35-45.
8. Homayouni, A., Ehsani, M.R., Azizi, A., Yarmand, M.S., Razavi, S.H. (2007) Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beeds. Iranian Polym. J.16: 597-606.
9. Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R, Yarmand, M.S., Razavi, S.H. (2008) Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. Food Chem.111:50-55.
10. Kailasapathy, K. (2002) Microencapsulation of probiotc bacteria: technology and potential applications. Curr. Issues intest. Microbiol. 3: 39-48.
11. Klaenhammer, T.R. (2001) Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM press. Washington D.C, USA.
12. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004) The Influence of coating materials on some properties of alginate beeds and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. Int. Dairy. J. 14: 737-743.
13. Mandal, S., Puniya, A.K., Singh, K. (2006) Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. Int. Dairy. J. 16:1190-1195.
14. Mirzaei, H., Nahaei, M.R., Javadi, A., Ahmadi-Manesh, M. (2009) Effect of some propiotics on *Escherichia coli* O157:H7 during associated growth in milk. J. Vet. Res. 64: 279-282.
15. Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, M.R., Sohrabvandi, S. (2007) Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian J. Biotechnol. 5: 1-18.
16. Ohashi, Y., Umesaki, Y., Ushida, K. (2004) Transition of the probiotic bacteria,*Lactobacillus casei* strain shirota, in the gastrointestinal tract of a Pig. Int. J. Food Microbiol. 96: 61-66.
17. Picot, A., Lacroix, C. (2004) Encapsulation of bifidobacteria

www.SID.ir

Archive of SID

in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointeatinal conditions and in yoghurt. Int. Dairy. J. 14: 505-515.

18. Shah, N.P. (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy Foods. J. Dairy Sci. 83: 894-907.
19. Sheu, T.Y., Marshall, R.T. (1993) Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. J. Food Sci. 54: 557-561.
20. Simpson, N.E., Stabler, C.L., Simpson, C.P., Sambanis, A., Canstantinidis, I. (2004) The role of The CaCl2-guluronic acid interaction on alginate encapsulated βTC3 Cells. Biomaterial. 25: 2603-2610.
21. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., KailasaPathy, K. (2000) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int. J. Food Microbiol.62: 47-55.
22. Talwalker, A.N., Kailasapathy, K. (2003) Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. J. Dairy Tech. 58: 36-39.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Vet. Res. 66, 4:337-342, 2011

THE EFFECT OF MICROENCAPSULATION WITH CALCIUM ALGINATE AND RESISTANT STARCH ON THE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (LA5) SURVIVAL RATE IN SIMULATED GASTROINTESTINAL JUICE CONDITIONS

Mirzaei, H.[1], pourjafar, H.[2*], Homayouni Rad, A.[3]

[1]*Department of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.*

[2]*Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.*

[3]*Department of Food Science and Technology, Faculty of Health and Nutrition, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran.*

(Received 14 September 2010 , Accepted 26 June 2011)

Abstract:

Microencapsulation of probiotic cells is the newest method for increasing probiotics' survival in probiotic food products in gastrointestinal conditions and safely transferring them to the large intestine. The aim of this study was to investigate the effect of microencapsulation with calcium alginate and resistant starch on the *lactobacillus acidophilus* (La5), and the survival rate in simulated gastrointestinal juice conditions. Survivability of this bacteria was conducted in 0.6% bile salt solution and simulated gastric juice(PH1.55), followed by incubation in simulated intestinal juice with and without 0.6% bile salt. In this study the extrusion method was performed for the microencapsulation process. Data were analyzed using an independent t-test. Our results showed that survivability of microencapsulated cells in a simulated gastric juice condition, and also in simulated intestinal juice with and without 0.6% bile salt, is significantly more than free cells($p<0/05$).

Key words: *lactobacillus acidophilus*, microencapsulation, calcium alginate, resistant starch, gastrointestinal juice.

***Corresponding author's email: drhpsglad@yahoo.com, Tel: 0411-2804828, Fax: 0411-2818682**

www.SID.ir