Archive of SID

مجله علمی – پژوهشی دانشگاه اصفهان (علوم پایه)
جلد سی و پنجم، شماره ٦، سال ١٣٨٧
صص ٢٣٢-٢٢٣

بررسی خصوصیات پروبیوتیکی دو سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده از علوفه سیلوشده ذرت و سبوس برنج و پوشش دادن آنها با پلیمرهای آلژینات و کیتوزان برای افزایش پایداری آنها

شراره پیمانفر*، روحا کسری کرمانشاهی* و جمشید فولادی*

*دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

چکیده

پروبیوتیکها میکروارگانیسم های زنده‌ای هستند که دارای فوایدی برای سلامتی انسان وحیوانات هستند. هدف از این مطالعه، بررسی خصوصیات پروبیوتیکی باکتریهای جداسازی شده از علوفه سیلوشده و سبوس برنج بود. در تحقیق حاضر، اقدام به جداسازی گونه‌هایی از لاکتوباسیلوس از علوفه سیلوشده ذرت و سبوس برنج از مناطق سردسیر کشور(بروجرد، تبریز) به روش کشت بی هوازی گردید. آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند رنگ آمیزی گرم، واکنش کاتالاز ، رشددر ^{oc}۱۵ و ^{oc}۵۰ ، هیدرولیز آرژینین و تخمیر قندهای مختلف انجام شد. میزان تحمل اسیدی و رشد در مقابل نمک های صفراوی در زمانهای مختلف تعیین گردید. به منظور افزایش بقا در شرایط نامساعد، اقدام به پوشش دهی آنها با استفاده از پلیمرهای آلژینات و کیتوزان گردید. مطالعه حاضرمشخص نمود که باکتری‌های جداشده گونه هایی از لاکتوباسیلوس هستند که قادر به تخمیر کربوهیدراتهای آزمایش شده بودند و تنها لاکتوباسیلوس علوفه قادر به رشد در ۵۰ درجه سانتیگراد است. بعلاوه، این باکتری‌ها قادر به رشد در شرایطی تا pH=۲ و تحمل نمک‌های صفراوی هستند. نتایج نشان داد که باکتری جداسازی شده از علوفه، گونه‌ای از لاکتوباسیلوس است که احتمالاً می‌توان از آن در نگهداری علوفه سیلوشده استفاده نمود. با توجه به اینکه لاکتوباسیلوس سبوس نمی‌تواند تا دمای ۵۰ درجه (دمای تخمیر در علوفه) رشد نماید، بنابراین، نمی تواند به‌عنوان افزودنی در علوفه به کار رود.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک ، لاکتوباسیلوس ، علوفه سیلوشده ، سبوس ، پوشش دهی ، آلژینات ، کیتوزان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه :

واژه پروبیوتیک واژه‌ای یونانی به معنای «برای زندگی» است . پروبیوتیکها مکمل‌های غذایی میکروبی هستند که از طریق بهبود تعادل میکروبی رودهٔ تأثیرات سودمندی بر روی میزبان دارند (۱). لاکتوباسیلوس‌ها ، انتروکوکوس ها و پدیوکوکوس ها از پروبیوتیکهای مفید علوفه هستند. پروبیوتیک علوفه باید خصوصیاتی، از قبیل: رشد در درجه جرارت ۵۰ درجه سانتیگراد ، تحمل به اسید و صفرا، آنتاگونیست علیه قارچها و باکتریهای آلوده کننده علوفه و غیره را داشته باشد تا بتواند در نگهداری علوفه و بهبود کیفیت علوفه به کار رود (۱،۳،۵). از سوی دیگر،باید یاد آوری شود که با توجه به پایداری کم باکتریها در شرایط نامساعد محیطی از قبیل pH پایین، اکسیژن مولکولی، آنزیم های گوارشی، H_2O_2 و غیره ، پوشش دارکردن باکتریهای پروبیوتیک، با استفاده از پلیمرهای مناسب، از قبیل: آلژینات و کیتوزان می تواند باعث بهبود پایداری و بقا آنها گردد (۷ ، ۸). در این مطالعه، اقدام به جداسازی و شناسایی گونه‌های لاکتوباسیلوس موجود در علوفه سیلوشده ذرت و سبوس برنج گردید و خصوصیات پروبیوتیکی آنها بررسی گردید پس به منظور افزایش پایداری و بقا در مقابل شرایط نامساعد ، اقدام به پوشش دار کردن باکتری‌های جداسازی شده، بااستفاده ازپلیمرهای آلژینات و کیتوزان گردید.

مواد و روشها :

۱ . جداسازی و شناسایی باکتری ها

دو نمونه علوفه سیلو شده ذرت و سبوس برنج به طور تصادفی از دومنطقه سردسیر کشور (تبریز و بروجرد) جمع آوری شده ، در ظروف استریل به آزمایشگاه انتقال یافتند. ۱۰ گرم از علوفه ذرت سیلو شده به ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد . مخلوط با دست بخوبی تکان داده شد و سریال رقت تا رقت 10^{-6} تهیه شد. از اولین اولیه و رقت‌های 10^{-4} به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به لوله‌های حاوی محیط کشت MRS براث (Rogosa agar de-Man) اضافه گردید. لوله‌ها در جار بی‌هوازی حاوی گازپک نوع A و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ٤۸ ساعت گرما گذاری شدند . پس از طی این مدت ، از لوله های حاوی کدورت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در محیط کشت MRS آگار به صورت چمنی کشت داده شد . پلیت ها در جار بی هوازی حاوی گازپک نوع A و انکوباتور۳۷ درجه سانتیگراد به مدت دو روز گرماگذاری شدند. بعد از دو روز کلنی های سفید رنگ کوچک . محدب، براق و با اندازهٔ حدود ۳-۲ میلی لیتر جداسازی شدند و کلنی های تک با کشت مجدد در محیط MRS آگار به دست آمدند.همچنین همهٔ کارها برای نمونه سبوس انجام شد. رنگ آمیزی گرم ، ارزیابی واکنش کاتالاز با استفاده از آب اکسیژنه ۰/۳٪ وآزمایش تخمیر قندهای مختلف در محیط پایه MRS براث بدون گلوکز و عصاره گوشت، اما حاوی ۰/۵٪ هیدرات های کربن مختلف، مثل: گالاکتوز، لاکتوز، مانیتول، رافیتوز و ۰/۰۰٤٪ بروموکرزول ارغوانی انجام شد. همچنین آزمایش هیدرولیز آرژینین توسط باکتری‌های لاکتوباسیلوس احتمالی جداسازی شده در محیط MRS براث بدون گلوکز و عصاره گوشت، اما حاوی ۰/۳٪ آرژینین و ۰/۲٪ سیترات سدیم به جای سیترات آمونیوم انجام شد (۲، ٤).

www.SID.ir

Archive of SID

۲ . ارزیابی تحمل اسیدی

باکتریهای جداسازی شده هر کدام به طور جداگانه در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت MRS براث کشت داده شدند و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد در جار بی هوازی به مدت ۲٤ ساعت گرماگذاری شدند . سپس کشت های ۲٤ ساعته (۵۰ میلی لیتر) به دو قسمت تقسیم شدند و هر ۲۵ میلی لیتر آن در فالکون های ۵۰ میلی لیتری در دور ٤۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی آنها دور ریخته شد و به رسوب حاصل ۲۰ میلی لیتر PBS اسیدی (pH = ۲/۵) اضافه گردید. نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد گرما گذاری شدند. بعد از دو ساعت مخلوط‌های حاصل در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. مجدداً مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل ۲۰ میلی لیتر PBS خنثی اضافه گردیده، در دور rpm ٤۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی ریخته شد و به رسوب حاصل کمی سرم فیزیولوژی (حدود ۲ میلی لیتر) اضافه شد، رسوب در آن حل گردید و از این سوسپانسیون ، سریال رقت تهیه شد و از رقت ها بر روی محیط MRS آگار، پور پلیت شد و پلیت ها به مدت ٤۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به صورت بی هوازی گرماگذاری شدند . پس از دو روز تعداد کلنی ها و نهایتاً تعداد باکتری زنده مانده در pH اسیدی بررسی شد .

این کار برای pH های ۳/۵ ، ٤/۵ ، ۵/۵ ، ٦/۵ انجام شد و نتایج ثبت گردید . این آزمایش برای باکتری استاندارد *L . plantarum* ATCC 8014 هم انجام شد (۲،۷، ۸) .

۳ . ارزیابی تحمل نمک صفراوی

به منظور ارزیابی تحمل باکتریهای جداسازی شده به نمک های صفراوی و باکتریهای جداسازی شده، هر کدام به طور جداگانه به صورت ۲٤ ساعته در محیط MRS براث کشت داده شدند . از کشت ۲٤ ساعته به ۵۰ میکرولیتر محیط کشت (MRS براث + ۰/۳٪ نمک صفراوی دزوکسی کلات سدیم) افزوده شد و ۵۰ میکرولیتر هم به محیط کشت MRS براث بدون نمک صفراوی اضافه گردید. پس از لحظه صفر در طول موج ٦۰۰ نانومتر (nm ٦۰۰ = A) هر نیم ساعت یک بار جذب آنها خوانده شد . نمونه اصلی (محیط کشت با و بدون نمک صفراوی + باکتری) در این مدت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داشت. این کار تا مدت ۸ ساعت انجام شد. سپس نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به صورت بی هوازی به مدت ۲٤ ساعت گرماگذاری شدند و پس از ۲٤ ساعت مجدداً جذب در ٦۰۰ نانومتر خوانده شد و نتایج بررسی گردید. این آزمایش برای باکتری استاندارد *L . plantarum* ATCC 8014 هم انجام شد(۲،۵،٦).

٤ . پایدارسازی پروبیوتیکها با تکنیک پوشش دادن آنها (Microencapsulation)

روش تهیه میکروکپسول

تهیه محلول آلژینات سدیم برای پوشش‌دهی باکتریها به این صورت است که: آلژینات سدیم (۲٪)، محیط MRS براث (w/v ۵/۵٪)، گلیسرول (v/ v ۵٪)، صمغ زانتان (w/v ۲٦ /۰٪)، توئین ۲۰ (۱/۰ v/v) در ۱۰۰ میلی لیتر آب با هم مخلوط شدند. محلول در اتوکلاو و در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد، فشار ۱۵ پوند براینچ مربع و به مدت ۷- ۵ دقیقه استریل شد. این محلول به عنوان کپسول برای افزایش بقا پروبیوتیک ها به کار برده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

برای تهیه محلول کیتوزان به منظورپوشش دهی بهتر و مؤثرتر در بقا باکتریها، ۰/٤ گرم کیتوزان در ۹۰ میلی لیتر آب مقطر اسیدی شده (با ۰/٤ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال) حل گردید تا اینکه غلظت ٤ گرم بر لیتر حاصل شود. pH سپس با اضافه نمودن NaoH ۱ مولار به نزدیک ٦-۷ /۵ رسید و حجم مخلوط به ۱ لیتر رسید. سپس در اتوکلاو و در ۱۱۰ درجه سانتیگراد ، فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع و به مدت ۷- ۵ دقیقه استریل شد. این محلول برای پوشش دادن کپسول‌ها استفاده شد.

باکتریهای جداسازی شده در محیط MRS براث به صورت ۲٤ ساعته کشت داده شدند . سپس۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری با OD برابر ۰/۵ مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$) به محلول آلژینات اضافه شد و خوب با هم مخلوط شدند، سپس سوسپانسیون حاصله با استفاده از سرنگ انسولین استریل در ۵۰۰ میلی لیتر کلرید کلسیم (۰/۵ مولار) به صورت قطره قطره چکانده شد. پس از اینکه تمام سوسپانسیون به صورت میکروکپسول درآمد، حدود ۱۵ -۱۰ دقیقه صبر نمودیم تا بیدها سفت شوند. سپس با استفاده از کاغذ صافی استریل بیدها از محلول جدا شدند آنگاه بیدها سه مرتبه با استفاده از آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

پوشش دهی میکروکپسولها

بعد از اتمام مرحله تهیه کپسول، نوبت به پوشش دهی کپسولها می رسد .

بیدهای تهیه شده طبق روش قبل به ۵۰ میلی لیتر محلول کیتوزان اضافه شدند و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی مگنت هیتر با استفاده از مگنت بار به آرامی به هم زده شدند. سپس دوباره با استفاده از کاغذ صافی استریل از محلول حاصله جدا شدند و دو بار با استفاده از آب مقطر استریل شستشو داده شدند . سپس بیدها در پلیت های استریل در دماهای ٤ ، ۸ و ۲٤ در جه سانتیگراد نگهداری شدند .

این کار برای باکتری *L . plantarum* ATCC 8014 هم انجام شد . سپس بقا باکتریها بعد از ۱، ۷ و ۳۰ روز بررسی شد. باکتری بدون کپسول هم به عنوان شاهد در این دماها نگهداری شد و بقا آن بررسی گردید.

نتایج :

۱ . جداسازی و شناسایی باکتریهای مفید

کلنی‌های سفیدرنگ ، براق ، محدب با اندازه ۳ – ۲ میلی متر بر روی محیط MRS آگار مشاهده شد. سپس با استفاده از رنگ آمیزی گرم و مشاهده باکتریهای باسیلی شکل گرم مثبت با آرایش موازی در کنار هم ،آزمایش های بیوشیمیایی بیشتری بررسی گردیدند. نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی کلیدی در جدول (۱) آمده است.

www.SID.ir

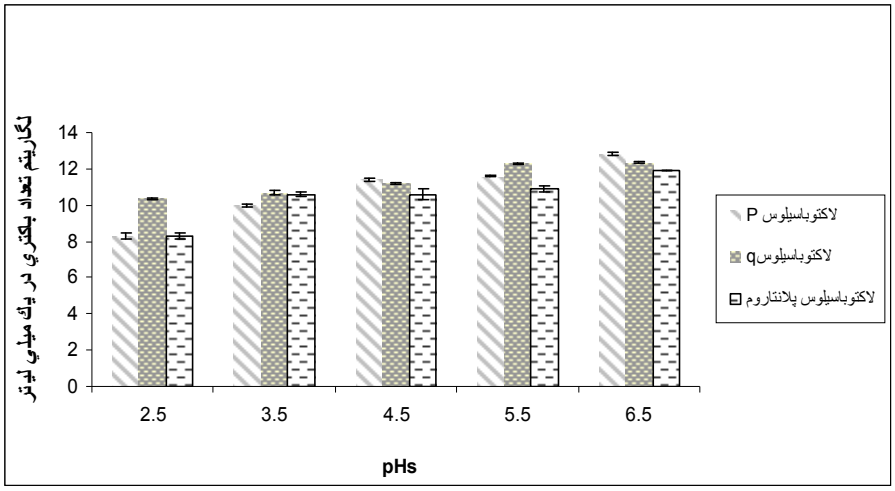
Archive of SID

جدول ۱ - خصوصیات بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس های جداسازی شده (لاکتوباسیلوس های جداسازی شده ازعلوفه و سبوس به ترتیب به صورت p و q نشان داده شده اند.

خصوصیات بیوشیمیایی	لاکتوباسیلوس جداشده از نمونه علوفه p	لاکتوباسیلوس جداشده از سبوس q
رنگ آمیزی گرم	+	+
کاتالاز	-	-
رشد در ^{c} ۵۰	+	-
رشد در ^{c} ۱۰	+	-
هیدرولیز آرژینین	+	+
تخمیر هیدراتهای کربن		
د- گلوکز	+	+
د- مانیتول	+	+
د- گالاکتوز	+	+
د- لاکتوز	+	+
ال رافینوز	+	+

۲ . ارزیابی تحمل اسیدی

بررسی تحمل اسیدی با استفاده از روش مجاورت با PBS اسیدی (بافر فسفات اسیدی) نشان داد که باکتریهای جداسازی شده قادر به تحمل و رشد خوب در pH های اسیدی تا حدود ۲ هستند و نسبت به سویه شاهد رشد بهتری داشته اند و می‌توانند به عنوان باکتری ایده آل در نگهداری علوفه استفاده شوند. رشد در pH=۷ به عنوان شاهد برای مقایسه بقا باکتری در شرایط اسیدی و خنثی بررسی گردیده است. نتایج این بررسی در نمودار (۱) نشان داده شده است.



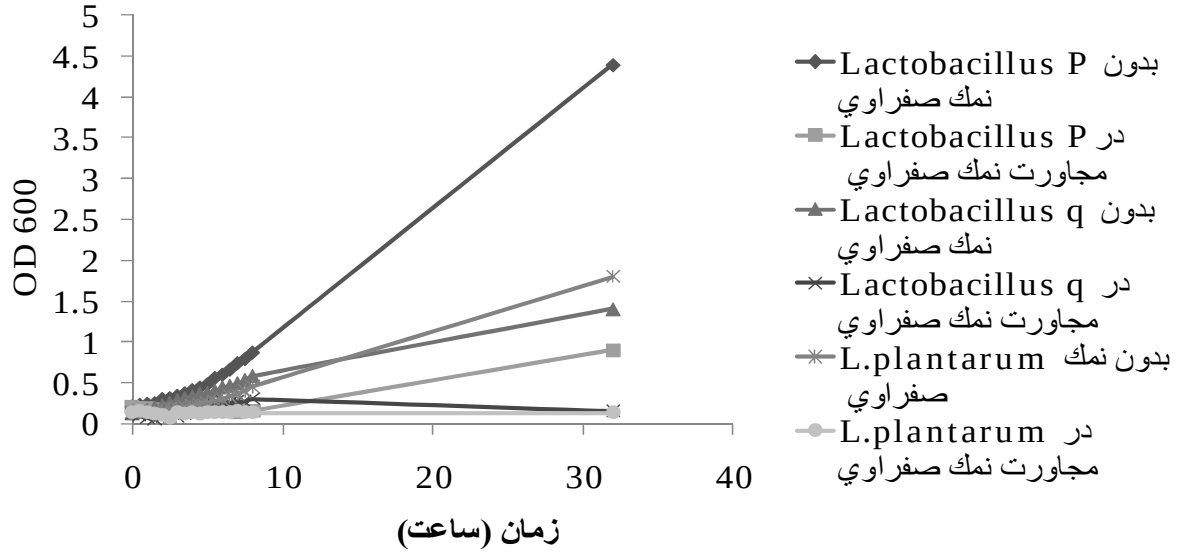
نمودار - ۱- بررسی تحمل اسیدی در دو سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده از علوفه ذرت و سبوس برنج و سویه استاندارد *L.plantarum* ATCC 8014 در مقابل PBS اسیدی به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ($P<0/05$).

www.SID.ir

Archive of SID

۳ . ارزیابی تحمل به نمک صفراوی

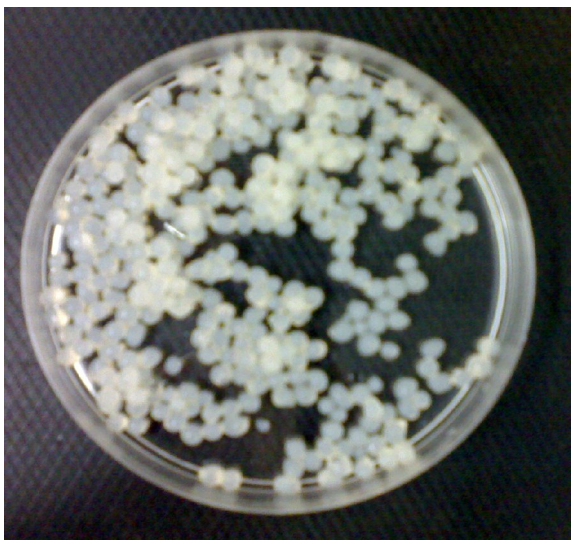
یررسی تحمل به نمکهای صفراوی با در مجاورت قرارگرفتن باکتریهای جداسازی شده با دزوکسی کلات سدیم به مدت ۳۲ ساعت نشان داد که باکتریهای جداسازی شده نسبت به سویه شاهد (لاکتوباسیلوس پلانتاروم) تحمل بهتری دارند و می‌توانند به عنوان باکتری ایده آل در نگهداری علوفه مورد استفاده قرار گیرند.نتایج این بررسی در نمودار۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲ – بررسی تحمل به نمک صفراوی دزوکسی کلات سدیم در مورد لاکتوباسیلوس های جداسازی شده ازعلوفه ذرت و سبوس برنج و *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014، در مدت ۳۲ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ($P < 0/05$).

٤ . بررسی نتایج پوشش دادن پروبیوتیک‌ها و ارزیابی بقای پروبیوتیک‌ها

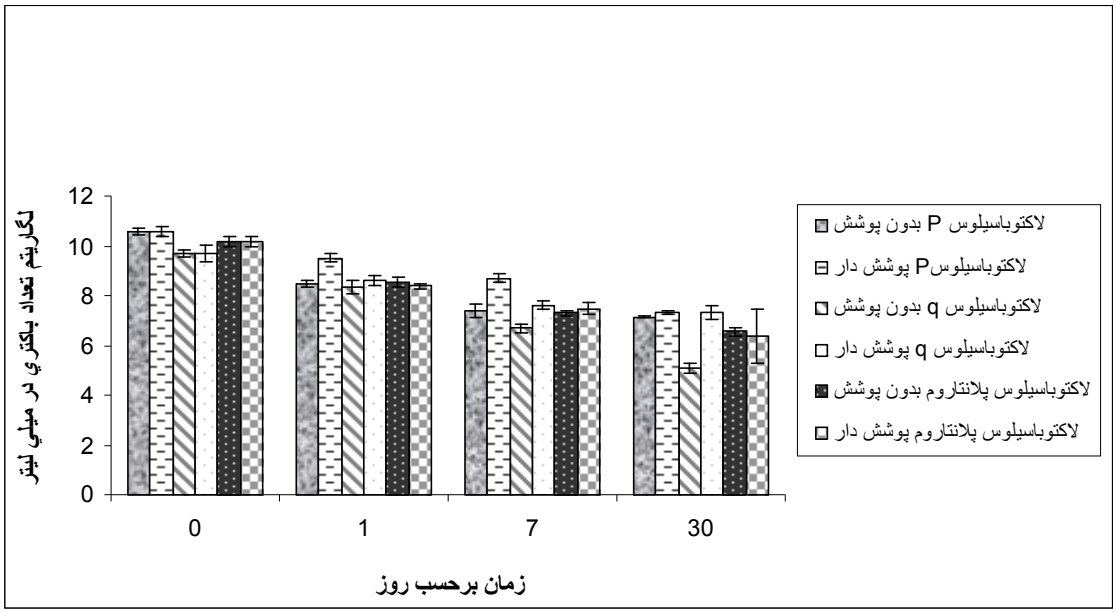
به منظور افزایش مقاومت باکتریها به شرایط نامساعد محیطی (شرایط اسیدی ، وجود اکسیژن در محیط) باکتریها با استفاده از پلیمرهای آلژینات و کیتوزان به صورت کپسولهایی پوشش دار شدند و نتایج نشان داد که پوشش دهی تأثیر زیادی درافزایش بقا و پایداری باکتریها داشته است. نتایج این بررسی درشکل(۱)و نمودار (۳) نشان داده شده است.



شکل ۱ – کپسول های حاوی باکتریهای لاکتوباسیلوس پوشش دار شده با استفاده از آلژینات و کیتوزان

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳ – ارزیابی بقای لاکتوباسیلوس های جداسازی شده p وq و *L.plantarum* ATCC 8014 پوشش‌دار شده بااستفاده از آلژینات و کیتوزان در فواصل زمانی معین و در دمای ۸ درجه سانتیگراد ($P < 0/05$).

بحث و نتیجه گیری:

به کارگیری پروبیوتیک ها در پیشگیری از بیماریها و بهبود وضعیت سلامتی انسان و دام پیشینه‌ای چندین هزار ساله دارد. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در محیط های غنی از مواد غذایی مثل غشاهای موکوسی انسانها و حیوانات، روی گیاهان و خیلی از غذاها وجود داشته باشند. علوفه سیلو شده، مهمترین منبع غذا برای دام و حیوانات نشخوار کننده است. سیلو کردن یک روش نگهداری است که در آن باکتریهای اسید لاکتیک تحت شرایط بی هوازی، کربوهیدراتها را به اسیدهای آلی عمدتاً اسید لاکتیک تخمیر می کنند و در نتیجه pH کاهش یافته و علوفه از فساد توسط میکرو ارگانیسم های مضرمحافظت می شود. سویه‌های جداسازی شده همگی متعلق به گونه لاکتوباسیلوس بودند. نتایج نشان داد که از بین دو باکتری جداسازی شده از علوفه وسبوس، تنها لاکتوباسیلوس علوفه قادر به رشد در ۵۰ درجه سانتیگراد است. بررسی ها مشخص نمود که دو باکتری تحمل خوبی در برابر شرایط اسیدی داشته، تحمل کمتری در برابر نمک‌های صفراوی دارند. نتایج به دست آمده، با مطالعات انجام شده توسط Cebeci(۲۰۰۲) و Charteries (۱۹۹۸) بر روی مقاومت به شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی سویه ها مطابقت دارد. نتایج نشان داد که تنها لاکتوباسیلوس پلانتاروم بود که پوشش دار کردن هیچ تأثیری در افزایش بقای آن ندارد و اما در مورد لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده، بقای باکتریهای پوشش دار شده، بهتر از باکتریهای بدون پوشش بوده است. میکروکپسول‌های نگهداری شده در دمای ٤ درجه سانتیگراد بعد از حدود یک ماه مقدار زیادی از آب خود را از دست می دهند و کپسولهای نگهداری شده در ۲۵ درجه سانتیگراد بعد از حدود یک ماه کپک زده‌اند و وکپسولهای نگهداری شده در ۸ درجه سانتیگراد در حالت طبیعی اولیه وجود دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج این آزمایش، با نتایج مطالعات Lee و همکاران (۲۰۰٤) مطابقت می کند . Lee و همکاران در بررسی های خود نشان دادند که پوشش دهی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس سویه KFRI 673 با استفاده ازآلژینات و کیتوزان تأثیر درخور توجهی در بهبود بقای آن داشته است. بنابر نتایج به دست آمده از این تحقیق، می توان نتیجه گیری نمود که پوشش دار کردن در بهبود بقا و پایداری باکتریهای پروبیوتیک می تواند سودمند باشد و استفاده از پروبیوتیک ها می تواند باعث بهبود کیفیت غذای دام و سلامتی آن شود.

منابع

فولر، روی.(۱۳۸٦). پروبیوتیک‌ها و کاربرد آنها درتغذیه دام و طیور، ترجمه: دکتر نادر افشار مازندران و دکتر ابوالفضل رجب، تهران: انتشارات نوربخش، چاپ سوم.

میر حسینی، محبوبه. (۱۳۸۳). بررسی اثرنیزین و باکتریهای تولیدکننده نیزین روی لیستریا منوسیتوژنز وباسیلوس سرئوس، پایان نامه کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان.

Andersson H N-G, Asp A° , Bruce S, Roos T, Wadstro¨m and Wold A. Health effects of probiotics and prebiotics.A literature review on human studies. Scan J Nutr. 45:58–75. 2001.

CAI Y. Identification and Characterization of *Enterococcus* Species Isolated from Forage Crops and Their Influence on Silage Fermentation. J Dairy Sci. 82: 2466–2471. 1999.

Chou L-S, Weimer B. Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. J Dairy Sci. 82:23–31. 1999.

Succi M, and et al. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS Microbiol Lett. 244: 129–137. 2005.

Jansson S. Lactic acid bacteria in silage – growth , antibacterial activity and antibiotic resistance. 2005.

Mortazavian A. and et al. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganism.A review article.Ir J of Biotech. .Vol. 5, No 1. 2007.

Anal A K, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery.18 : 240-251. 2007.

Kailasapathy K. Microencapsulation of Probiotic Bacteria:Technology and Potential Applications. Curr. Issues Intest. Microbiol. 3: 39-48. 2002.

Kim S-H, Lee s-S-H , Park N-Y, Prinyawiwatkul W. Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. Carbohydrate Polymers. 65: 174-178. 2006 .

www.SID.ir

Archive of SID

Lee J- S, Cha D – S, Park H- J. Survival of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus KFRI 673* in Chitosan-Coated Calcium Alginate Microparticles. J. Agric. Food Chem. 52: 7300-7305. 2004.

Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H-C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage.Food Sci . Technol. 39.2: 177-183. 2006.

Klinkenberg G, Lystad K – Q, Levine D - W, Dyrset N. Cell Release from Alginate Immobilized *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* in Chitosan and Alginate Coated Beads. J. Dairy Sci. 84:1118–1127. 2001.

Cai Y, Benno Y, Ogawa M, Ohmomo S, Kumai S , and Nakase K. Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 64:2982–2987. 1998.

Sharp R P, Hooper G, and Armstrong D G. The digestion of grass silages produced using inoculants of lactic acid bacteria. Grass Forage Sci. 49:42–53. 1994.

Weinberg Z G, Ashbell G, Hen Y, and Azrieli A. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. J. Appl. Bacteriol. 75:512–518. 1993.

Jankows T, Zielinsk M, Wysakowska A. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules.Biotech Techniq. Vol 11.No1:31 – 34. 1997.

Sheu T, Marshall Y R T. Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. J. Food Sci. *54*, 557-561. 1993,

Klinkenberg G, Lystad K – Q, Levine D - W, Dyrset N. Cell Release from Alginate Immobilized *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* in Chitosan and Alginate Coated Beads. J Dairy Sci. 84:1118–1127. 2001.

Champagne C P ,Gaudy CH, Poncelet D, Neufeld R J. Lactococcus lactis Release from Calcium Alginate Beads. Americ soc microbiol. 58: 1429-1434. 1992.

Cebeci A ,Guracan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains**.**Food microbiol.20 : 511-518. 2002.

Charteris W-P. Ingredient selection criteria for probiotic micro-organisms in functional dairy food .Dairy technol. 51:123-136. 1998.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir