Archive of SID

# اثر میکروانکپسولاسیون آلژینات کلسیم بر قابلیت زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC 1643 در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان

رضا رضایی مکرم[1]*، سید علی مرتضوی[2]، محمد باقر حبیبی نجفی[2]، فخری شهیدی[2]، مرتضی خمیری[3]

1- دانشجوی دکتری گروه علوم وصنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
2- عضو هیات علمی گروه علوم وصنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
3- عضو هیات علمی گروه علوم وصنایع غذایی دانشگاه گرگان

**(تاریخ دریافت: 87/5/24 تاریخ پذیرش:87/10/29)**

## چکیده

به منظور بهبود قابلیت زنده مانی در شرایط نامساعد معده و روده باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC 1643 بوسیله الژینات کلسیم میکروکپسول شد و در شرایط شبیه سازی شده معده و روده به مدت 0، 30، 60، 90، 120 دقیقه در 37 درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. قابلیت زیستی باکتری بر حسب مدت زمان مورد نیاز برای کاهش یک پایه لگاریتمی در جمعیت میکروبی ($D_v$) محاسبه شد. برای تعیین نحوه پراکنش اندازه ذرات کپسول از روش پارتیکل سایز انالایزر استفاده گردید. برای مطالعه شکل ظاهری کپسول ها از تکنیک SEM استفاده شد. میکروانکپسولاسیون در سطح $p< 0/05$ سبب کاهش مرگ باکتری های پروبیوتیک در شرایط اسیدی معده (pH 1/ 5 ,2 h ) می شود. همچنین پس از گرمخانه گذاری به مدت 60 دقیقه در شرایط شبیه سازی شده معده و دو ساعت در شرایط مشابه شیره روده ( pH 7/ 25 ) تعداد سلولهای زنده برابر 6/5 log cfu / g بدست آمد در حالیکه این مقدار برای سلولهای شاهد 2/3 log cfu / g بود.

**کلید واژگان**: پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، میکروانکپسولاسیون، الژینات کلسیم

## 1 - مقدمه

میکروانکپسو لاسیون یکی از بزرگترین نواوریهای افرینش محسوب می شود و نقطه اغاز حیات بشمار می رود در طی 3-2 میلیاردسال طبیعت با محصور کردن مولکولهای حیاتی در واحدهای ساختمانی به نام سلول امکان حیات را بر روی کره خاکی میسر نموده است. انسان نیز با الهام از طبیعت سعی کرده است تا ترکیبات مورد نیاز خود را تغلیظ و پوشش دهی و حفاظت نماید که در مقیاس میکروسکوپی این پدیده را میکروانکپسولاسیون می نامند[ 1و2].

بر حسب تعریف، پروبیوتیک ها به میکروارگانیسمهای زنده ای گفته می شوند که پس از دریافت به مقدار معین دارای توانایی ایجاد ویژگیهای سلامت بخشی خاصی هستند که این ویژگیها فرای خواص معمول مواد غذایی است [3] استفاده از این میکروارگانیسم ها در دهه

* مسئول مکاتبات: rmokarram@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

گذشته عمومیت بیشتری یافته است و به صورت افزودنی در صنایع مختلف بکار گرفته شده اند. بر حسب استانداردها ، برای بروز ویژگیهای سلامت زایی این باکتریها باید به تعداد $10^6$ تا $10^7$ سلول زنده در هر گرم از محصول مصرف شده وجود داشته باشند[6-4]. عوامل متعددی بر زنده مانی و نحوه فعالیت این باکتریها تاثیر گذار هستند که از جمله می توان از دمای نگهداری [7و8]، pH [9]، غلظت اسید لاکتیک و اسید استی[10] و شرایط فراوری[11] نام برد. از عمده ترین ترکیبات مورد استفاده در کپسولاسیون پروبیوتیکها الژینات سدیم است. این صمغ یک هترو پلی ساکارید خطی متشکل از واحدهای ساختمانی D – مانورونیک اسید [1] و L – گولورونیک اسید [2] می باشد و از جلبکهای دریایی استخراج می شود کپسولهای الژینات را می توان به روشهای اکستروژن و امولسیون تهیه کرد [13و 12]. دلایل استفاده از الژینات را می توان در ارزانی سهولت کاربرد و زیست سازگاری ان خلاصه کرد[16-14]. این ماده به هنگام ایجاد ژل دارای منافذی با قطرحدود 17 نانومتراست و بخوبی می تواند باکتریها را که در اندازه میکرون هستند در خود بدام اندازد[14]. با این حال ژل حاصل در شرایط اسیدی شدید و یا حضور یونهای تک ظرفیتی اندکی ناپایدارخواهد بود[17]. در چنین شرایطی مولکولهای صمغ دچار تغییر وضعیت شده[18] و در نتیجه باکتریهای بدام افتاده در محیط رها می شوند[9]. بر اساس برخی تحقیقات حداکثر حجم سلولهای قابل نگهداری دراین کپسولها 25% حجم کپسول است[20] برای غلبه بر چنین شرایطی کپسولها را مجددادر محلول 0/1 % الژینات غوطه ور می کنند تا با تشکیل یک لایه حفاظتی جدید مقاومت انها را افزایش دهند. در مقاله پیش رو مطالعه ای را در اختیار دارید که تاثیر کپسولاسیون را بر روی قابلیت زنده مانی پروبیوتیکها نحوه پراکنش اندازه ذرات کپسول وخواص ظاهری انها در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش مطالعه شده است.

## 2- مواد و روشها

### 2 – 1 - آماده سازی میکروارگانیسمها

لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس PTCC 1643 [1] از سازمان پژوهشهای علمی صنعتی بخش کلکسیون میکروبی خریداری شد. یک ویال لیوفلیزه از باکتری در 5 ml محیط مایع MRS ( Merck Germany ) تلقیح و به مدت زمان 24 ساعت در 37 درجه سانتیگرا د در شرایط هوازی تکثیر شد. سپس نمونه حاصل در 95 ml محیط مایع MRS تلقیح و تحت شرایط فوق تکثیر گردید. بیومس حاصل بوسیله سانتریفیوژ در 3000× g برای مدت 5 دقیقه و دمای 4درجه سانتیگراد جداسازی و در دو مرحله با محلول استریل 0/1 در صد پپتون شسته و در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری شد.

### 2 – 2 - کپسولاسیون باکتریها

میکروانکپسولاسیون باکتریها با استفاده از روش ژلاتیناسیون خارجی[21] که قبلا توسط تراستراپ( 2002 ) و الان ( 2008 ) نیز گزارش شده، اجرا شد[23و 22]. مراحل روش را می توان بطور خلاصه چنین بیان کرد، ابتدا 10 گرم الژینات ( Sigma A 2033; High mannuronic acid ) ایجاد کننده ویسکوزیته متوسط در یک لیتر اب مقطر فاقد یون، حل شد. سپس 18 گرم از محلول فوق با یک گرم سوسپانسیون باکتریایی مخلوط و ترکیب حاصل در 100 گرم روغن نباتی مایع، حاوی مقدار 5 g/l تویین 80 (P 8074 Sigma) با استفاده از همزن مغناطیسی در 900 rpm به مدت 20 دقیقه پراکنده گردید. در مرحله بعد با افزودن 32 ml امولسیون حاوی یون کلسیم ( تهیه شده از انحلال 60 گرم روغن نباتی مایع، 5 g/l تویین و 62/5 mM کلرور کلسیم ) عمل ژلاتیناسیون اغاز شد . میکروکپسولهای الژینا ت با ادامه همزدن بمدت 20 دقیقه تشکیل یافته و اجازه داده شد تا به مدت زمان 30 دقیقه دیگر نیز در شرایط فوق باقی بماند تا ژلاتیناسیون کامل شود. در نهایت کپسولها با محلول0/1 در صد پپتون بر روی کاغذ صافی شسته وبا

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از همین محلول در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

## 2 – 3 - شمارش تعدادباکتریهای بدام افتاده در کپسولها

1 گرم از نمونه های کپسول تهیه شده در 99 ml محلول 1% w/v سدیم سیترات استریل در pH حدود 6 پراکنده و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق همزده شدتا کپسولها بطور کامل حل و باکتریها ازاد شوند، انگاه با استفاده از محیط جامد MRS در شرایط هوازی، دمای 37 درجه وبه مدت زمان24 ساعت گرمخانه گذاری شد و تعداد باکتریها شمارش گردیدند، این شمارش در سه تکرار صورت پذیرفت.

## 2– 4- آزمون فیزیکی کپسولها

**2– 4– 1- تعیین اندازه ذرات ونحوه پراکنش آنها**

اندازه کپسولها ی حاصل از هر یک از تیمارها و فراوانی هریک از آنها با استفاده از دستگاه اندازه گیری قطر ذرات[1] مدل (SALD-2101 SHIMADZU Japan) تعیین گردید. برای این منظور کپسول ها در آب یون زدایی شده(Milli Q Millipore USA) با ضریب هدایت 0/ 054 µs پراکنده و نتایج براساس قطر حجم میانگین[2] (VMD) ذرات ± استاندارد خطا، $d_{peak}$ و همچنین $d_{10}$ ، $d_{50}$ و $d_{90}$ گزارش شدند.

**2– 4– 2- تعیین مرفولوژی ذرات** برای تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده شکل ظاهری انها از میکروسکوپ الکترونی و تکنیک SEM استفاده شد. بدین جهت کپسولها بوسیله چسب دو طرفه بر روی کوتر ( SC 7620 England ) تثبیت و به مدت 2 دقیقه بوسیله طلا و پالادیم پوشش داده شدند. مشاهده کپسولها بوسیله میکروسکوپ الکترونی مدل (LEO 1450 VP Germany) با تابش الکترونی 10 Kv انجام پذیرفت.

## 2– 5- بررسی قابلیت زنده مانی لاکتوباسیوس *اسیدوفیلوس* PTCC 1643 در شرایط شبیه سازی شده معده

این مشاهده بر اساس روش توصیفی بوسیله ( Rao et al., 1989 ) انجام گردید[24]. یک گرم از کپسول حاوی باکتری بطور کامل در 10 ml شیره شبیه سازی شده معدی (0/08 M HCl و 0/2 در صد NaCl و pH حدود 1/5) بدون حضور پپسین پراکنده و برای مدتهای 0، 30، 60، 90 و 120 دقیقه در دمای 37 درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند . پس از گذشت زمان لازم، کپسولها جداسازی و بوسیله محلول 0/1 در صد پپتون شسته و تعداد باکتریها با روش گفته شده در قسمت2 – 3 با سه تکرار شمارش شدند.

## 2– 6- بررسی قابلیت زیستی سلولها پس از گرمخانه گذاری متوالی در شرایط شبیه سازی شده معده و روده

1 گرم از میکروکپسولهای تازه و حاوی باکتری مورد آزمایش ابتدا در 10 ml محلول معدی به مدت 60 دقیقه و دمای 37 درجه گرمخانه گذاری شدند، آنگاه با محلول سود خنثی و در 9 ml محلول شبیه شیره روده ( M 0/05 $KH_2PO_4$ و pH حدود 7/25 و 0/6 در صد نمکهای صفرای گاوی (oxgall;70168 Sigma) استریل شده بوسیله میکروفیلتر µm 0/2 (0.2µm, IWAKI, Japan) 2032-013 برای زمانهای0، 30، 60، 90 و 120 دقیقه در 37 درجه، گرمخانه گذاری شدند . پس از گذشت زمانهای مورد نظر 1 گرم از کپسول مورد نظر به روش گفته شده در بند2 – 3 با سه تکرار مورد شمارش قرار گرفت.

## 2– 7- آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از طرح فاکتوریل کاملا تصادفی صورت گرفت ( نرم افزار MINITAB ویرایش

www.SID.ir

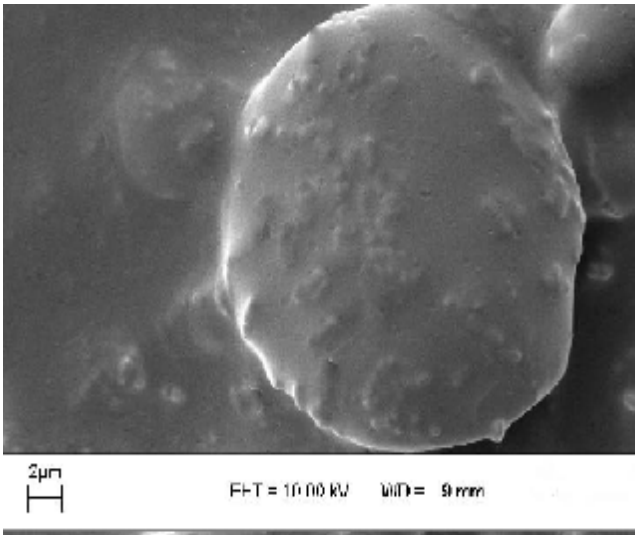
Archive of SID

2004)، بررسی تفاوت معنی دار بین میانگین داده ها نیز با استفاده از ازمون LSD انجام شد.

## 3 - نتایج و بحث

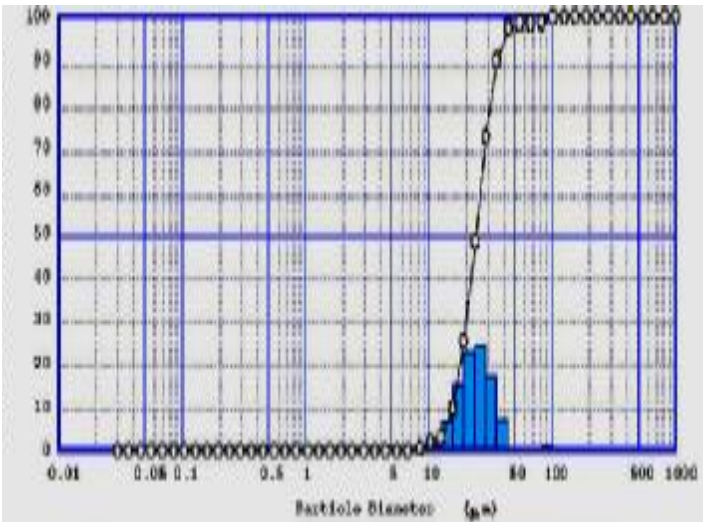
### 3– 1- شمارش تعداد باکتریهای بدام افتاده در کپسولها و تعیین اندازه ذرات ونحوه پراکنش آنها

تعداد اولیه سلولهای زنده قبل از کپسولاسیون log cfu / ml 10/01 – 9/02 محاسبه شد . برحسب داده های بدست آمده تعداد سلول بدام افتاده در کپسولها در حد log cfu / g 9/2 – 9/0 کپسول گزارش گردید. تعداد کم از دست رفتن باکتریها در مرحله کپسولاسیون نشانه دقت مناسب بکار رفته در این مرحله است. بعبارت دیگر بر اساس نتایج، کپسولاسیون تاثیری در شمار باکتریها نداشته است. مشاهده با روش SEM نشان داد که کپسولها از نظر شکل ظاهری کاملا کروی هستند (شکل 1).




**شکل 1** تصویر میکروسکوپ الکترونی به روش SEM از یک میکروکپسول حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

قطر حجم میانگین کپسولها (VMD)، $0/161 \pm 23/758$ µ m بود. قطر 90 % ($d_{90}$) ذرات مساوی و یا کمتر از 641 /35 میکرون ، 50% ( $d_{50}$ ) مساوی 23/901 میکرون و برای 10% کپسولها ( $d_{10}$) قطری مساوی و یا




**شکل 2** نمودار نحوه پراکنش اندازه ذرات میکروکپسول و در صد فراوانی انها بر اساس داده های دستگاه اندازه گیری قطر ذرات( Particle size analyzer)

همچنین $d_{peak}$ معادل 26/121 میکرون بدست آمد. این امر گویای آن است که می توان با این شیوه کپسولهایی با قطر میکرونی تهیه نمود که در مقایسه با انواع گزارش شده توسط سایر محققین که قطر کپسولهای تولید شده در حد میلیمتر است [25]، بافت نرمتری را در مواد غذایی ایجاد خواهند کرد. این نتیجه همچنین با گزارش (Truelstrup et al., 2002) که گفته است کپسولهای (>1 mm) موجب خشن شدن بافت افزودنیهای غذایی می شوند مطابقت دارد[22].

www.SID.ir

Archive of SID

**جدول1** تعداد (کپسول\cfu\g) باکتریها ی زنده مانده پس از تیمار pH=1.5 در زمانهای متفاوت کمتر از 508 / 15 میکرون محاسبه گردید (شکل2).

| پروبیوتیک / تیمار | زمان( دقیقه) | | | | | مقدار $D_v$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 دقیقه | 30 دقیقه | 60 دقیقه | 90 دقیقه | 120 دقیقه | |
| لاکتوباسیلوس شاهد | $3/3\pm 0/2 \times 10^{9\ a}$ | $1/6\pm 0/2 \times 10^{7\ b}$ | $1/1\pm 0/3\times 10^{6\ b}$ | $1/1\pm 0/05\times 10^{5\ b}$ | $2/8\pm 0/2\times 10^{4\ b}$ | * $23/66 \pm 2/47^{b}$ |
| اسیدوفیلوس کپسوله | $3/6\pm 0/3\times 10^{9\ a}$ | $8/3\pm 0/3 \times 10^{8\ a}$ | $4/1\pm 0/2\times 10^{7\ a}$ | $1/1\pm 0/3\times 10^{6\ a}$ | $2/3\pm 0/2\times 10^{6\ a}$ | $37/61 \pm 4/94^{a}$ |

*حروف a و b مشخص کننده تفاوت معنی دار در سطح $p< 0/05$ است.
اعداد جدول میانگین سه تکرار± انحراف معیار هستند .

**جدول 2** تعداد (کپسول\cfu\g) سلولهای زنده مانده و مقدار Dv لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس آزاد **و** کپسول شده از اینکوباسیون در شرایط شبیه سازی شده روده در توالیهای زمانی مختلف pH= 7/2 و 37 درجه سانتیگراد

| پروبیوتیک / تیمار | زمان( دقیقه) | | | | | مقدار $D_v$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 دقیقه | 30 دقیقه | 60 دقیقه | 90 دقیقه | 120 دقیقه | |
| لاکتوباسیلوس شاهد | $5/6\pm 2/3\times 10^{9\ a}$ | $3/3\pm 2/2\times 10^{6\ b}$ | $2/1\pm 0/7\times 10^{5\ b}$ | $3/4\pm 1/1\times 10^{4\ b}$ | $2/2\pm 0/4\times 10^{2\ b}$ | * $16/19 \pm 0/43^{b}$ |
| اسیدوفیلوس کپسوله | $4/6\pm /5\times 10^{9\ a}$ | $2/3\pm 0/6\times 10^{7\ a}$ | $5/2\pm 0/7\times 10^{6\ a}$ | $5/6\pm 0/4\times 10^{5\ a}$ | $4/2\pm 1/1\times 10^{5\ a}$ | $29/70 \pm 3/56^{a}$ |

*حروف a و b مشخص کننده تفاوت معنی دار در سطح $p< 0/05$ است.
اعداد جدول میانگین سه تکرار± انحراف معیار هستند .

## 3 – 2 – قابلیت زیستی سلولهای کپسوله شده در شرایط معده

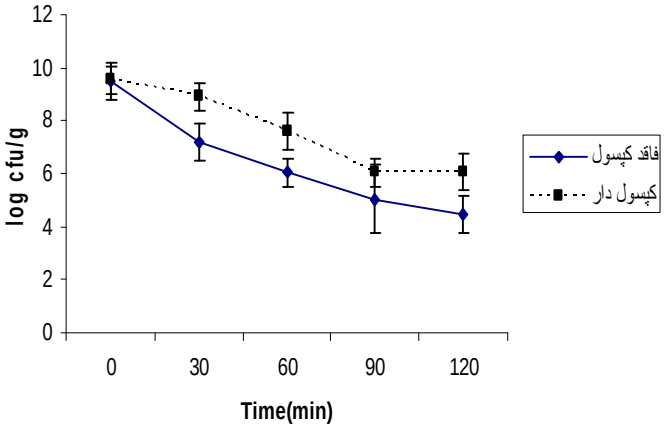
همانطور که قبلا نیزاشاره شد از محلول HCl برای ایجاد شرایط شدید اسیدی همانند انچه که در معده می گذرد استفاده گردید و قابلیت زیستی باکتریهای اسیدوفیلوس براساس زمان لازم برای کاهش یک پایه لگاریتمی($D_v$) از جمعیت اولیه انها محاسبه شد . برای *لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس* 1643 PTCC با جمعیت اولیه $10^9 \times (0/1\pm 3/6) - 10^9 \times (0/4\pm 2/3)$ در سطح احتمال $p< 0/05$، کپسولاسیون در مقایسه با انواع فاقد کپسول شرایط بهتری را برای زنده مانی فراهم می کرد (جدول 1).

این نتایج با یافته های برخی محققین تفاوت دارد، بر اساس نظر این گروه در شرایط اسیدی کپسولاسیون تاثیری بر زنده مانی باکتریهای پروبیوتیک ندارد[26]. با این حال نتایج دیگری این داده ها را تایید می کند. این محققین گزارش کرده اند که در pH 1/2 پس از یک ساعت گرمخانه گذاری تمامی باکتریهای *لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس* نابود می شوند، در حالیکه در حالت کپسوله

www.SID.ir

Archive of SID

شده تعداد این باکتری در pH حدود 1/5 پس از دو ساعت به $10^6$ cfu /ml می رسد[27]. همچنین ترینیدال و گراسو (2003) در ازمایشی بر روی لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس *La-5* نشان دادند که در pH=1 پس از گذشت یک ساعت تقریبا هیچ باکتری زنده ای باقی نمی ماند، در حالیکه جمعیت همین باکتری در حالت کپسوله شده در شرایط اسیدی فوق پس از گذشت دو ساعت تنها یک پایه لگاریتمی کاهش می یابد[28]. چاندرامولی (2004) نیز نتایج مشابهی گزارش کرده است[29]. مطالعه حاضر نشان داد که باکتریهای لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس PTCC 1643 در حالت فاقد کپسول در pH= 1/5 پس از گذشت 2 ساعت جمعیت اولیه انها 5 پایه لگاریتمی کاهش می یابد، اما استفاده از کپسول در سطح $p< 0/05$ به شکل معنی داری قابلیت زیستی این باکتریها را افزایش می دهد که احتمالا ناشی از کاهش شدت شوک وارده به باکتری است (شکل 3). این نظریه با گزارش موراتا مطابقت دارد[30].



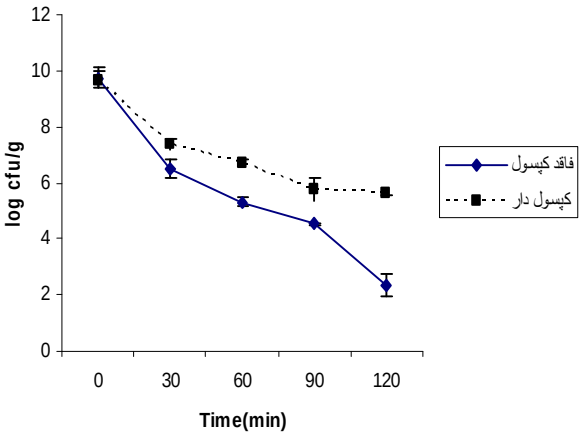

**شکل** 3 نمودار نحوه تاثیر گذاری میکروانکپسولاسیون بر قابلیت زنده مانی لاکتو *باسیلوس اسیدوفیلوس* در شرایط شبیه سازی شده معده(pH 1/ 5 )در فواصل زمانی مختلف

## 3 – 3 – قابلیت زیستی سلولهای کپسوله شده در شرایط ترکیبی معده و روده

برای ایجاد شرایط اسیدی مشابه معده، باکتریها به مدت 60 دقیقه در شرایطی مانند انچه که در بند قبل گفته شد قرار گرفتند، سپس پروبیوتیکها شرایطی شبیه شیره روده را برای زمانهای0، 30، 60، 90، 120 دقیقه در 37 درجه تجربه کردند، نتایج در جدول 2 ارائه شده است. شمار اولیه سلولهای اسیدوفیلوس در حدود $10^9 \times (0/8 \pm 7/4) - 10^9 \times (0/5 \pm 4/6)$ cfu $ml^{-1}$ محاسبه شد مقدار $D_v$ برای انواع کپسول شده 3/56 ± 29/70 دقیقه بدست آمد که در مقایسه با $D_v$ سلولهای شاهد ( 0/43± 16/19 دقیقه ) در سطح 0/05 تفاوت معنی داری را نشان داد، به عبارت دیگر کپسولاسیون در شرایط روده می تواند سبب افزایش زنده مانی باکتریها شود. بطور کلی قابلیت زیستی *اسیدوفیلوس* در شرایط ترکیبی معده وروده کمتر از حالت معده به تنهایی است که احتمالا بدلیل نامناسب بودن pH روده (7/25) برای این باکتری اسید دوست است. این نتایج با داده های کراسی کوپت (2004) همسانی دارد [31]. بعلاوه کیم و همکاران نشان دادند که کپسولاسیون روش موثری برای تحمل بیشتر نمکهای صفراوی توسط *اسیدوفیلوس* ATCC 43121 خواهد بود [27]. نتایج مشابهی توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است[34-31]. از انچه گفته شد چنین بر می اید که میکروانکپسولاسیون بر زنده مانی پروبیوتیکها تاثیر گذار است (شکل 4). جدول 2 نشان می دهد که نسبت به نمونه شاهد تعداد زنده مانده در کپسولها $10^3$ بار افزایش یافته است. این نتایج با مشاهدات تراستراپ (2002) مطابقت دارد، اگر چه وی گزارش کرده است که کپسولهای کوچکتر از 100 µm نمی توانند بشکل معنی داری موجب افزایش زنده مانی پروبیوتیکها در شرایط اسیدی معده شوند [22]. به عقیده انیل (2007) تشکیل لایه محافظ هیدروژل بر روی پروبیوتیکها سبب تاخیر در نفوذ شیره معده به کپسول و در نتیجه سبب افزایش قابلیت زیستی سلولها می شود[35].

www.SID.ir

Archive of SID




**شکل 4** نمودار نحوه تاثیر گذاری میکروانکپسولاسیون بر قابلیت زنده مانی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در شرایط ترکیبی معده (pH 1/ 5 ) بمدت 60 دقیقه و روده (pH 7/ 25 ) در زمانهای مختلف

البته باید توجه داشت که مقاومت باکتریها در شرایط ازمایشگاهی در برابر صفرا گویای رفتار واقعی انها در دستگاه گوارش نیست، زیرا همانند سایر شوکهای فیزیولوژیک شبیه سازی واقعی انها مشکل است. بسیار مشاهده می شود که عوامل محیطی باعث تقویت یا تضعیف مقاومت میکروارگانیسم در برابر عاملی خاص می شود. پیش تیمار باکتریها با اسیدها ، دماها و شرایط اتمسفری مختلف بر مقاومت باکتری نسبت به صفرا تاثیر گذار است و می تواند سبب مقاومتر شدن انها شود. بعلاوه بر خلاف شرایط ازمایشگاهی مقدار اسیدهای صفراوی در روده و در افراد مختلف و سنین متفاوت ثابت نیست و تا زمان مصرف غذاهای پر چرب مقدار این ترکیب در روده بسیار کم خواهد بود، این خود عاملی در جهت سازگار شدن باکتریها و افزایش مقاومت انها در برابر صفرا بشمار می رود، همچنین وجود مواد غذایی در روده می تواند سبب ایجاد سپر حفاظتی برای این میکروارگانیسمها شود و برخی از پروبیوتیکها بدون اینکه با صفرا تماس یابند در روده به فعالیت بپردازند. بالاخره فعالیت نمکهای صفراوی در شرایط ازمایشگاهی ممکن است بسیار بیش از عمل واقعی انها در روده باشد زیرا در روده امکان ترکیب این نمکها با فسفولیپیدها نیز وجود دارد [31].

## 4 - نتیجه گیری

کپسولاسیون به روش امولسیون موجب تشکیل کپسولهایی به قطر حجم میانگین 0/161 µm± 23/758µm شد مشاهده با میکروسکوپ الکترونی به روش SEM ایجاد کپسولهای کاملا کروی و یکسان را تایید کرد. در مقایسه بین انوع کپسول شده و سلولهای فاقد پوشش، انواع با لایه پوششی از قابلیت زیستی بهتری برخوردار بودند.همچنین درگرمخانه گذاری متوالی در شرایط معدی- روده ای، کپسولاسیون سبب افزایش $D_v$ به مقدار 1/83 برای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* گردید. همچنین در شراط معدی این نوع پوشش سبب افزایش $D_v$ به مقدار 1/58 برا بر، برای این باکتری در مقایسه با انواع فاقد کپسول شد.

## 5-تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئول محترم ازمایشگاه فناوریهای نوین اقای مهندس جواد قزوینی و همکاری صمیمانه اقای دکتر سجادی ، خانمها مهندس صادقیان و مهندس شکیب در ازمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی و اقایان دکتر موسویان و مهندس علیرضا بختیاری در ازمایشگاه تحقیقاتی شیمی صمیمانه سپاسگزاری می شود.

## 6- منابع

[1] Trau, D., Rrnneberg, R., 2003. Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer by layer film: immobilization and biosensor applications, Biosensors and Bioelectronics; 18, 1491- 1499

[2] Mokarram, R.R., Azizi, M. (1996). Micro encapsulation and its applications in food industries, In: proceeding of the 8th national congress of food industry, 219 - 225. Tehran. Iran.

[3] Guarner, F., Schaafsma, G. J., 1998. probiotics, International Journal of Food Microbiology, 39,(3), 237-238

[4] Picot, A., Lacroix, C., 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal

www.SID.ir

Archive of SID

encapsulation techniques of probiotics for yoghurt International Dairy Journal, 13,(1), 3-13

[14] Klein J, StockJ, Vorlop K.D., 1983. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts; Eur. J. Appl. Microb. Biotech. 18, 86-91

[15] Mokarram, R.R.,. Mokarram, A.R. (2000). Preparation of micro particles containing orange blossom essential oil using bee wax - alginate complex, In: proceeding of the 7th Iranian seminar of pharmaceutical sciences (ISPS), p.111. Mashhad. Iran

[16] Martinsen, A., Skjak-Braek, C., Smidsrod, O., 1989. Alginate as immobilization material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. Biotechnology and Bioengineering, 33(1), 79–89.[17] Smidsrod, O., Skjak-Braek, G., 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology, 8(3), 71–78.

[18] Gombotz, W. R., Wee, S. F., 1998. Protein release from alginate matrices. Advanced Drug Delivery Reviews, 31, 276–285.

[19] Kuhn, S.P., Pfister R.M., 1989. Adsorption of mixed metals and cadmium by calcium-alginate immobilized Zoogloea ramigera; Appl. Microbiol. Biotechnol. 31; 613-8

[20] Park, J.K., Chang, H.N., 2000. Microencapsulation of microbial cells, Biotechnology Advances, 18, 303- 319

[21] Sheu, T. Y., & Marshall, R. T., (1993). Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. Journal of Food Science, 54, 557–561.

[22] Truelstrup Hansen, L., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y.-L., & Paulson, A. T., 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiology, 19, 35–45.

[23] Allan-Wojtas, P., Truelstrup Hansen, L., Paulson, A.T., 2008. LWT 41,101–108

[24] Rao, A. V., Shiwnarain, N., & Maharaj, I., 1989. Survival of microencapsulated Bifidobacterium pseudolongum in simulated gastric and intestinal juices. Canadian Institute of conditions and in yoghurt, International Dairy Journal, 14, (6), 505-515

[5] Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, M.R., Sohrabvandi, S., 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms, Iranian Journal of Biotechnology, 5, (1), 1-18

[6] Capela, P., T.K.C. Hay, 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, 203–211

[7] Hilde M. stlie, Janneke Treimo, Judith A. Narvhus, 2005. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk, International Dairy Journal, 15, (10), 989-997

[8] Vinderola, C. G., Bailo, N., Reinheimer, J. A., 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. Food Research International, 33(2), 97–102.

[9] Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, P., 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. Applied and Environmental Microbiology, 71, 3060–3067.

[10] Samona A., Robinson R. K., Marakis S. 1996 acid production by Bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk Food Microbiology, 13, (4), 275-280

[11] Jaana Mättö, Hanna-Leena Alakomi, Anu Vaari, Ilkka Virkajärvi, Maria Saarela., 2006. Influence of processing conditions on Bifidobacterium animalis subsp. lactis functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it International Dairy Journal, 16, (9), 1029-1037

[12] Mokarram, R.R., Mokarram, A.R. 2000. Preparation of uniform size microcapsules containing pepperiment oil and determination of its particle size distribution, In: proceeding of the 1st International congress on traditional medicine and material medica, p. 235 . Tehran. Iran.

[13] Krasaekoopt, W., Bhesh Bhandari, Deeth, H., 2003. Evaluation of

www.SID.ir

Archive of SID

alginate gel beads containing chitosan salt and their function. International
Journal of Pharmaceutics, 176(2), 265–268.
[31] Krasaekoopt, W., Bhesh Bhandari, Deeth, H., 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria International Dairy Journal, 14,(8), 737-743
[32] Mituoka, T., 1992. The human gastrointestinal tract. In: B. J. B. Wood (Ed.), The lactic acid bacteria: The lactic acid bacteria in health and disease, Vol. 1. London, NY: Elsevier Applied Science.
[33] Buck, L. M., Gilliland, S. E., 1994. Comparisons of freshly isolated strains of Lactobacillus acidophilus of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. Journal of Dairy Science, 77(10), 2925–2933.
[34] Gilliland, S. E., Walker, D. K., 1990. Factors to consider when selecting a culture of Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. Journal of Dairy Science, 73(4), 905–911.
[35] Anil Kumar Anal, Harjinder Singh., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery Trends in Food Science & Technology, 18, 240-251[36] Begley, M., Cormac G.M. Gahan, Colin Hill., 2005. The interaction between bacteria and bile, FEMS Microbiology Reviews, 29, 4, 625-651
Food Science and Technology Journal, 22(4), 345–349.
[25] Arnaud, J. P., Lacroix, C., Choplin, L., 1992. .Effect of agitation rate on cell release rate and metabolism during continuous fermentation with entrapped growing. Biotechnology Techniques, 6, (3), 265–270
[26] Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K., 2000. Encapsulation of probiotics bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Journal of Food Microbiology, 62(1–2), 47–55.
[27] Kim Se-Jin, Seung Yong Cho, Sae Hun Kim, Ok-Ja Song, II-Shik Shin, Dong Su Cha, Hyun Jin park, 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121, LWT - Food Science and Technology, 41, (3), 493-500[28] Favaro-Trindale, C. S., Grosso, C. R. F., 2002. Microencapsulation of L. acidophilus (La-05) and B. lactis (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. Journal of Microencapsulation, 19(4), 485–494.
[29] Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M., 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect Lactobacillus spp. in simulated gastric conditions. Journal of Microbiological Methods, 56(1), 27–35.
[30] Murata, Y., Toniwa, S., Miyamoto, E., Kawashima, S., 1999. Preparation of

www.SID.ir

Archive of SID



# The influence of alginate microencapsulation on survivability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 under simulated gastrointestinal condition

**Rezai Mokarram, S. R.[1 *], Mortazavi, S. A. [2], Habibi Najafi, M. B. [2], Shahidi F. [2], Khomeiri, M. [3]**

1- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University,
2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University,
3- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Gorgan University,

**(Received:87/5/24 Accepted: 87/10/29)**

The probiotic, *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 was encapsulated in calcium alginate beads with the objective of enhancing survival during exposure to the adverse conditions of the gastro-intestinal tract. The probitic was incubated in simulated gastro-intestinal conditions for 0, 30, 60, 90 and 120 min. at 37 $^{o}$C. The survivability of the probiotic, *L. acidophilus* PTCC 1643 was expressed as the destructive value (D-value). Particle size distribution was measured using laser diffraction technique. bead appearance was observed by scanning electron microscopy (SEM). The alginate coat prevented acid-induced reduction of the probiotic in simulated gastric juice (pH 1.5, 2 h), resulting in significantly ($P < 0.05$) higher numbers of survivors due to retarding the permeation of the gastric fluid into the cells. After sequential incubation in simulated gastric (60 min) and intestinal juices (pH 7.25, 2 h), number of surviving cells were 6.5 log cfu ml $^{-1}$ for encapsulated *L. acidophilus* while 2.3 log cfu ml $^{-1}$ was obtained for free cells.

**Keywords**: probiotic, microencapsulation, calcium alginate, *L. acidophilus*.

* Corresponding Author E-mail address: shivasheikholeslami@yahoo.com

www.SID.ir