مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال نهم ● شماره ۴ ● صفحات ۲۳۳ تا ۲۴۰ ● زمستان ۱۳۹۰

بررسی ویژگی‌های ریخت شناسی و حفاظتی دانک‌های حاصل از ریزپوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان فلور طبیعی و غالب روده انسان

*هادی پورجعفر[۱]، حمید میرزایی[۲]، رضا قاسم نژاد[۳]، عزیز همایونی‌راد[۴]

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۹۰/۴/۱۱ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۹۰/۷/۴

چکیده

سابقه و هدف: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان یک پروبیوتیک دارای اثرات مفید زیادی می‌باشد و قابلیت زیستی اندک این باکتری و سایر پروبیوتیک‌ها در شرایط دشوار اسیدی- صفراوی دستگاه گوارش و نیز فرآورده‌های غذایی، پژوهشگران را همواره به یافتن شیوه‌های بهبود این شاخص ترغیب کرده است. ریزپوشانی به عنوان یکی از تازه‌ترین شیوه‌ها، اثر قابل ملاحظه‌ای در این ارتباط داشته است. هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های ریخت شناسی و حفاظتی دانک‌های های حاصل از ریزپوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بعد از فعال سازی کشت آغازگر La۵ درمحیط broth MRS، جهت تخلیص باکتری از دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰rpm به‌مدت۱۰دقیقه استفاده شد. ریزپوشانی به وسیله آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم و با روش اکستروژن انجام گرفت و ریخت شناسی دانک‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی استحکام دانک‌ها در طی ۱۲ ساعت و بررسی میزان بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده در طی ۱۲۰ دقیقه، در داخل محلول اسید هیدروکلریک، بافر فسفات ۰/۱ مولار و محلول حاوی پودر دایجستیو انجام گرفتند.

یافته‌ها: ویژگی‌های ریخت شناسی دانک‌ها با میکروسکوپ نوری نشان داده شد. نتایج نشان دادند که میزان استحکام دانک‌ها تحت تاثیر محیط‌های مختلف، متفاوت بوده و تنش فیزیکی نقش مهمی در آن دارد. تحت شرایط نامساعد محیطی، ریزپوشانی با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم، نقش بسیار مهمی در حفاظت از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ایفا می‌کند و میزان زنده مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده در تمام شرایط، به‌طور معنی‌داری بیشتر از باکتری‌های آزاد بود ($p<0/05$).

بحث ونتیجه‌گیری: ویژگی‌های ریخت شناسی و استحکام دانک‌ها جهت بررسی عملکرد حفاظتی آن‌ها از باکتری‌های پروبیوتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و ریزپوشانی با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم، نقش مهمی در افزایش زنده مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ایفا می‌کند.

کلمات کلیدی: ریزپوشانی، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، فلور غالب روده

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در یک شمار مشخص وارد دستگاه گوارش شده و یک یا چند اثر مفید روی سلامتی میزبان می‌گذارند. از جمله این اثرات مفید می‌توان به افزایش هضم مواد غذایی، تقویت سیستم ایمنی بدن و بالا بردن مقاومت در برابر عفونت‌ها، کاهش کلسترول خون و خواص ضد جهش‌زایی

۱- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی (*نویسنده مسؤول)
تلفن: ۹۱۴۴۰۸۲۴۵۵ آدرس الکترونیک: drhpsglad@yahoo.com
۲- دانشیار، ایران، تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی
۳- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی
۴- استادیار، ایران، تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده تغذیه

www.SID.ir

و ضد سرطانی اشاره کرد (۱). از طرف دیگر امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزین مناسب آنتی بیوتیک‌ها برای مقابله با عوامل پاتوژن در انسان و حیوانات معرفی می‌شوند و مقبولیت و مصرف فرآوردهای غذایی و داروهای پروبیوتیکی رواج چشمگیری یافته است (۲). غذاهایی که حاوی این باکتری‌ها هستند در کلاس غذاهای عملگر یا فرآویژه قرار می‌گیرند و بر طبق توصیه فدراسیون بین المللی فرآورده‌های لبنی (IDF)، این غذاها بایستی حاوی 10^7cfu/g باکتری پروبیوتیک باشند و مصرف کننده بایستی حداقل ۱۰۰ گرم در روز از این غذا را مصرف بکند تا اثرات مفید این دسته از غذاها را دریافت کند (۱، ۳).

قابلیت زیستی اندک پروبیوتیک‌ها در شرایط دشوار اسیدی- صفراوی دستگاه گوارش و نیز فرآورده‌های غذایی، پژوهشگران را همواره به یافتن شیوه‌های بهبود این شاخص ترغیب کرده است. ریزپوشانی به عنوان یکی از تازه‌ترین شیوه‌ها، اثر قابل ملاحظه‌ای در این ارتباط داشته است (۳، ۴). ریزپوشانی از دیدگاه میکروب شناسی، پوشش دادن لایه‌ای از هیدرکلوئید در اطراف سلول‌های زنده می‌باشد که آن‌ها را از شرایط نامساعد محیط اطراف مصون داشته و میزان بقا این سلول‌ها را بالا می‌برد (۵). مواد مختلفی جهت ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک از جمله ژلاتین، کیتوزان و غیره مورد استفاده قرار گرفته اند ولی ریزپوشانی به وسیله آلژینات کلسیم به‌دلیل داشتن مزیت‌های متعدد، مثل غیر سمی بودن و بی ضرر بودن آن برای بدن انسان، قیمت مناسب و آسانی کار با آن، به طور وسیعی برای این منظور و به خصوص بر روی باکتری‌های اسیدلاکتیک انجام گرفته است (۳، ۴، ۶). ترکیب آلژینات با نشاسته به ویژه نشاسته مقاوم نتایج بهتری را نشان داده است، چرا که منجر به تشکیل یک پوشینه اضافی در اطراف دانک‌ها شده و میزان استحکام دیواره تشکیل شده و متعاقبا زنده مانی باکتری‌های درون آن را بالا می‌برد (۷). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جزو فلور طبیعی و غالب روده انسان و حیوانات می‌باشد و در داخل فرآورده‌های معمول تخمیری نیز وجود دارد و به عنوان مهمترین و پرمصرف‌ترین پروبیوتیک دارای بسیاری از اثرات مفید ذکر شده می‌باشد (۸)، بنابراین بررسی و بالا بردن میزان بقا این باکتری با ریزپوشانی مناسب و مستحکم در داخل محصولات غذایی و داروهای پروبیوتیکی و ایجاد امکان انتقال و آزادسازی ایمن آن در نقاط مناسب دستگاه گوارش از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و در این رابطه نحوه انتقال و عبور انواع مختلفی از باکتری‌های پروبیوتیک دیگر از جمله لاکتوباسیلوس کازیی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (۹).

بررسی ریخت شناسی دانک‌های حاصل از ریزپوشانی از جمله شکل، اندازه، تعداد لایه‌های دیواره و پوشینه دانک‌ها که به عنوان حائل بین باکتری‌ها و محیط بیرون قرار می‌گیرند، چگونگی توزیع باکتری‌ها درون دانک، چگونگی تراکم ماده ماتریکس در اطراف باکتری‌ها و در نهایت چگونگی آزاد شدن باکتری‌ها از درون دانک، از یک طرف (۷، ۱۰، ۱۱) و همچنین بررسی استحکام و قدرت حفاظتی دانک‌ها (بالا نگه داشتن میزان زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک) در شرایط نامساعد دستگاه گوارش و محیط داخلی برخی محصولات غذایی مثل پنیر و ماست، از طرف دیگر، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و در این خصوص مطالعات متعددی صورت گرفته است (۱۲، ۱۳، ۱۴). درحال حاضربه کارگیری اثر استحکام بخشی اشعه U.V جهت پایداری ذاتی خوب دانک‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (۱۵). هدف از مطالعه حاضر بررسی ویژگی‌های ریخت شناسی و حفاظتی دانک‌های حاصل از ریزپوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان فلور طبیعی و غالب روده انسان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی می‌باشد که بر روی دانک‌های حاصل از ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و میزان زنده مانی این باکتری در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده انجام گرفته است.

فعال سازی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

کشت آغازگر اغلب به صورت خشک شده انجمادی به بازار عرضه می‌شود. پس از تهیه آغازگر مورد نظر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La۵ (CHR-Hansen, Horsholm, Denmark)، بسته حامل با دقت در شرایط استریل باز شده و یک گرم از آغازگر در ۱۰۰ میلی لیتر محیط MRS broth (de Man- Rogasa-Sharpe) به صورت یکنواخت مخلوط گردیده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد تا آغازگر با جذب آب از حالت کمون خارج شده و وارد مرحله رشد لگاریتمی شود. روز بعد یک میلی لیتر

Archive of SID
www.SID.ir

از کشت حاصل، دوباره با ۹۹ میلی لیتر محیط کشت تازه (یک درصد) رقیق گردیده و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در طول هفته، کشت مذکور سه بار به محیط کشت تازه انتقال داده شده و در پایان ۲۴ساعت گرمخانه گذاری، در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. هدف از این کار، دسترسی دائم به باکتری‌های پروبیوتیک در فاز رشد لگاریتمی بود (۷).

خالص سازی باکتری

در این پژوهش، حدود ۲ میلی لیتر از محیط کشت تهیه شده در مرحله فعال سازی کشت آغازگر که در یخچال نگهداری می‌شد را به حدود ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت تازه انتقال داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس ازآن جهت تخلیص باکتری مورد نظراستفاده شد. برای این منظور محیط کشت مذکور کامل هم زده شد تا به حالت همگن درآید، سپس توسط دستگاه سانتریفوژ (Centurion centrifuge, Model ۲۰۱۰، West Sussex, BNI۸OHY,U.K) با سرعت ۱۰۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ مایع رویی بیرون ریخته شد و رسوب باکتری ته میکروتیوب‌ها دو بار دیگر نیز توسط سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد سانتریفوژ شد تا کاملا مورد شستشو قرار گیرد (۱۶). از این امولسیون باکتریایی برای انجام فرآیند ریزپوشانی استفاده گردید.

ریزپوشانی باکتری

در این پژوهش، ریزپوشانی پروبیوتیک مورد نظر به‌وسیله آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم با روش اکستروژن و با دستگاه میکروواینکپسولاتور روزن ران چند نازلی (۱۷) انجام گرفت. بدین منظور مخلوطی از آلژینات سدیم (Sigma, USA) و نشاسته مقاوم ذرت Hi-maize (Merk, Darmstadt, 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 میلی لیتر 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 به خوبی 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 حالی که روی دستگاه هات پلیت (IKA Labortechnik, Model V۹۲۱۹ staufen, KG, Germany) به وسیله مگنت و با دور منظم هم زده می‌شد، اضافه گشت و بعد ۱۰عدد از میکروتیوب‌های حاوی امولسیون باکتریایی تهیه شده در مرحله قبل در کل به میزان ۱۰ میلی لیتر به مخلوط آلژینات/ نشاسته تخلیه شدند و حدود ۰/۵ میلی لیتر توین ۸۰ (Merk, Hohenbrunn, Germany) به آن اضافه شد. سپس مخلوط حاصل آرام وارد مخزن دستگاه میکروواینکپسولاتور شد تا پروسه ریزپوشانی انجام شود. بعد از تزریق مخلوط حاصل به درون محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار، در اثر تماس آلژینات با یون‌های کلسیم، دیواره کپسول کامل شکل گرفت و دانک‌ها به صورت قطراتی ریز در محلول کلرید کلسیم ته نشین شدند (۷، ۱۶، ۱۸). در نهایت دانک‌های حاصل، از مخزن خروجی دستگاه جمع‌آوری شدند.

آزمون دانک‌ها

اندازه و شکل دانک‌های حاصل ازریزپوشانی سلول‌های میکروبی و طرز قرارگیری باکتری‌ها درون دانک‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری مجهز به میکرومتر (Nikon- Model Alphaphot-۲ YS۲-T. Japan) و پاشیدن لوگول روی دانک‌ها و همچنین رنگ‌آمیزی گرم دانک‌های شکاف داده شده مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت شکاف دادن دانک‌ها، ابتدا دانک‌های درشت‌تر انتخاب و سپس روی لام به وسیله 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 کامل روشن زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شد.

آزاد سازی باکتری از دانک

برای آزاد سازی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از دانک‌ها، یک گرم از دانک‌ها در ۹ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار و با pH برابر ۷ روی شیکر گیره‌دار (IKA- Model Janke & Kunkel GMBH. Typ VX۵-Germany) به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد تا دانک‌ها حل و به صورت همگن درآیند (۷، ۱۶).

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی استحکام دانک‌ها

در این پژوهش، استحکام دانک‌های حاصل از ریزپوشانی مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی استحکام دانک‌ها به میزان ۱گرم دانک با قطر تقریبی ۲۰۰ –۵۰ میکرون تولید و در هر مرحله تحت تاثیر:

۱- نه میلی لیتر محلول اسیدهیدروکلریک (pH=۲) با و بدون تنش مکانیکی (تنش مکانیکی توسط مگنت و با دور ۴۰۰ rpm برای هر آزمایش انجام گرفت)،

۲- نه میلی لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷) با و بدون تنش مکانیکی،

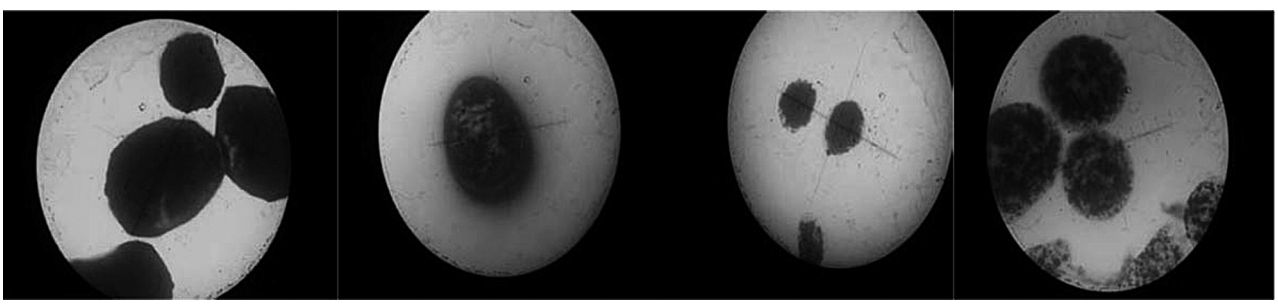
۳- نه میلی لیترآب مقطر حاوی پودر دایجستیو (شامل ۴۵۰۰ واحدآمیلاز، ۶۰۰۰واحدلیپاز، ۵۰میلی لیترهمی سلولز، ۲۵میلی لیتر عصاره صفراوی گاو و pH=۸/۳۰) با و بدون تنش مکانیکی، دردمای ۳۷°C قرارگرفتند و استحکام دانک‌ها و زنده ماندن باکتری‌های حاوی آن تحت تاثیر شرایط فوق برحسب زمان (از حداقل ۳۰ دقیقه تا حداکثر ۱۲ساعت) مورد بررسی قرار گرفت. در صورتی که دانک تخریب می‌شد ۱ میلی لیتر از محلولی که دانک در آن حل شده بود برداشت شده و به محیط کشت ام-آر-اس- برات منتقل شده و۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری می‌شد تا به زنده مانی باکتری‌های آزاد شده به محیط پی ببریم، و در صورتی که دانک‌ها در طی حداکثر زمان مورد نظر (۱۲ساعت) حفظ می‌شد، ابتدا باکتری‌ها آزاد و سپس همانند مرحله قبل به محیط کشت ام-آر-اس- برات منتقل شده و۲۴ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شد تا به رشد و یا عدم رشد باکتری‌های درون دانک‌ها پی برده شود.

بررسی میزان بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده در محلول اسید هیدرو کلریک، محلول بافر فسفات و محلول حاوی پودر دایجستیو، با و بدون تنش مکانیکی

برای این منظور از یک طرف ۱ گرم باکتری ریزپوشانی شده به صورت دانک و از طرف دیگر ۱ سی‌سی باکتری آزاد (یکی از تیوب‌های حاوی رسوب باکتری که با سرم فیزیولوژی به صورت امولسیون درآمده) تحت شرایط مشابه به ترتیب به داخل ۱۰ میلی‌لیتر محلول اسید هیدرو کلریک با pH=۲، ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷ و ۱۰ میلی‌لیتر محلول حاوی پودر دایجستیو (شامل: ۴۵۰۰ واحدآمیلاز، ۶۰۰۰ واحدلیپاز، ۵۰ میلی لیتر همی سلولز، ۲۵میلی لیترعصاره صفراوی گاو و pH=۸/۳۰) که همگی از قبل در داخل اتوکلاو (۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه) استریل شده بود افزوده شدند و در دمای ۳۷°C در دو شرایط با و بدون تنش مکانیکی گرمخانه‌گذاری شدند. سپس به منظور ارزیابی میزان بقای سلول‌های ریزپوشانی شده در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه، هر کدام از محیط‌ها به وسیله پپتون واتر ۰/۱ درصد رقیق‌سازی شده و در محیط MRS-Salicin-agar به صورت کشت مخلوط و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند (۱۹). برای مقایسه تعداد سلول‌های زنده باکتری در هر کدام از مقاطع زمانی مطرح شده از آزمون تی مستقل در سطح α=۰/۰۵ استفاده شد.

یافته‌ها

شکل و اندازه تقریبی دانک‌های حاصل از پروسه ریزپوشانی به وسیله میکروسکوپ نوری در شکل ۱ نشان داده شده است. شکل دانک‌های حاصل کروی شکل بود و اندازه تقریبی دانک‌ها، به صورت میانگین حاصل از اندازه ۴۰ دانک متفاوت که به صورت

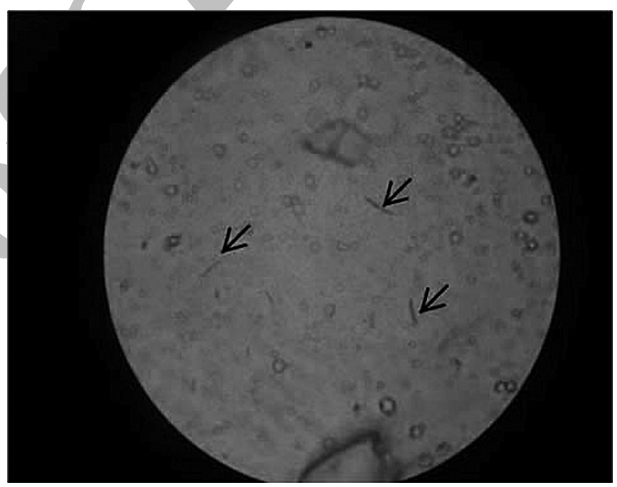


شکل ۱- شکل دانک‌های حاصله از ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La۵ با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم با قطر تقریبی ۲۰۰-۵۰ میکرون بعد از پاشیدن لوگول و با بزرگنمایی ۱۰×

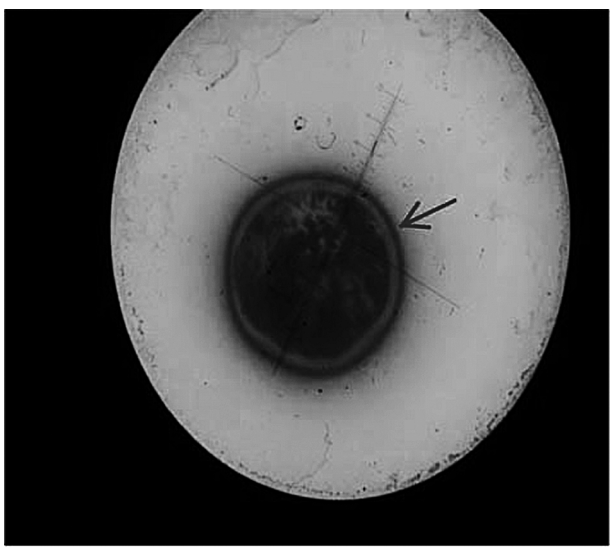
Archive of SID
www.SID.ir

تصادفی انتخاب شده بودند به دست آمد که در حدود ۲۰۰-۵۰ میکرون بود. پراکنش باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La۵ در داخل دانک‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است که باکتری‌ها به صورت چوب کبریتی شکل در داخل ماتریکس آلژینات مشاهده می‌شوند. دیواره آلژینات کلسیم و پوشینه نشاسته مقاوم در شکل ۳ نشان داده شده است که به شکل یک دیواره ضخیم و تیره رنگ در محیط خارجی دانک‌ها مشاهده می‌شود.

در ارزیابی استحکام دانک‌ها در داخل محلول اسید هیدروکلریک (نمودار۱)؛ ساختمان دانک، بدون تنش مکانیکی تا ۱۲ ساعت حفظ و باکتری‌های درون آن بعد از رها سازی و انتقال به محیط کشت قادر به رشد بودند و با تنش مکانیکی ساختمان دانک بعد از ۳ ساعت به طور کامل حل شده و بلافاصله بعد از آن باکتری‌ها قادر به رشد در محیط کشت بودند.



شکل ۲- مشاهده باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La۵ در برش عرضی دانک با بزرگ نمایی ۱۰۰×

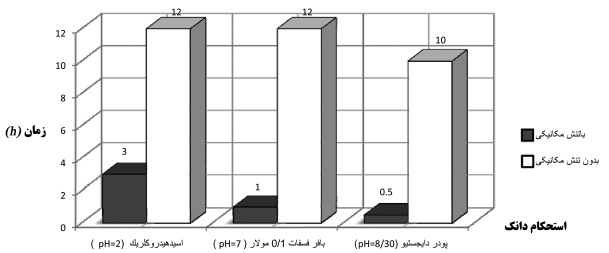


شکل۳- مشاهده دیواره آلژینات کلسیم و پوشینه نشاسته مقاوم با بزرگ نمایی ۱۰×

در ارزیابی استحکام دانک‌ها در داخل محلول بافر فسفات (نمودار۱)؛ ساختمان دانک، بدون تنش مکانیکی تا ۱۲ ساعت حفظ و باکتری‌های درون آن بعد از رها سازی و انتقال به محیط کشت قادر به رشد بودند و با تنش مکانیکی ساختمان دانک بعد از ۱ ساعت به طور کامل حل شده و باکتری‌ها قادر به رشد در محیط کشت بودند.

در ارزیابی استحکام دانک‌ها در داخل محلول پودر دایجستیو (نمودار۱)؛ ساختمان دانک، بدون تنش مکانیکی بعد از ۱۰ ساعت به طور کامل حل و باکتری‌های درون آن بعد از رها سازی و انتقال به محیط کشت قادر به رشد بودند و با تنش مکانیکی ساختمان دانک بعد از ۳۰ دقیقه به طور کامل حل شده و باکتری‌ها قادر به رشد در محیط کشت بودند.

میزان بقای سلول‌های آزاد و ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La۵ بعد از گرمخانه‌گذاری در محلول اسید هیدروکلریک، محلول بافر فسفات و محلول حاوی پودر دایجستیو در طی ۲ ساعت در ۳۷°c با و بدون تنش مکانیکی به ترتیب در جدول‌های ۱، ۲، ۳ نشان داده شده است. برای مقایسه تعداد سلول‌های زنده باکتری در هر کدام از مقاطع زمانی مطرح شده از آزمون تی مستقل در سطح α=۰/۰۵ استفاده شد. در همه شرایط، تعداد سلول‌های باکتری زنده ریزپوشانی شده به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های آزاد بود (p<۰/۰۵). همچنین تعداد سلول‌های زنده آزاد و ریزپوشانی شده در شرایط بدون تنش مکانیکی به طور معنی‌داری بیشتر از تعداد این سلول‌ها در شرایط با تنش مکانیکی بود (p<۰/۰۵).



نمودار ۱- مقایسه استحکام دانک در داخل اسیدهیدروکلریک (pH = ۲)، بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH = ۷) و محلول حاوی پودر دایجستیو (pH = ۸/۳۰)، در دو وضعیت با و بدون تنش مکانیکی

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- میزان بقای سلول‌های آزاد و ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La۵ بعد از گرمخانه‌گذاری در محلول اسید هیدروکلریک، در طی ۲ ساعت در ۳۷°C با و بدون تنش مکانیکی

شرایط	نوع باکتری	۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه
بدون تنش مکانیکی	باکتری‌های آزاد (cfu/gr)	$۴/۱\pm۰/۳\times۱۰^{۱۰\dagger}$	$۱/۲\pm۰/۲\times۱۰^{۸\dagger}$	$۱/۶\pm۱/۱\times۱۰^{۶\dagger}$	$۳/۴\pm۰/۳\times۱۰^{۵\dagger}$	$۱/۰\pm۰/۲\times۱۰^{۳\dagger}$
	باکتری ریزپوشانی شده(cfu/gr)	$۷/۱\pm۰/۱\times۱۰^{۱۰*\varphi}$	$۵/۵\pm۰/۴\times۱۰^{۹*\varphi}$	$۱/۵\pm۰/۹\times۱۰^{۸*\varphi}$	$۵/۳\pm۱/۳\times۱۰^{۶*\varphi}$	$۳/۲\pm۰/۶\times ۱۰^{۵*\varphi}$
با تنش مکانیکی	باکتری آزاد (cfu/gr)	$۲/۰\pm۰/۲\times۱۰^{۱۰}$	$۷/۹\pm۰/۵\times۱۰^{۷}$	$۱/۸\pm۱/۶\times۱۰^{۵}$	$۱/۱\pm۰/۲\times۱۰^{۳}$	$۴/۲\pm۰/۹\times۱۰^{۲}$
	باکتری ریزپوشانی شده (cfu/gr)	$۱/۱\pm۰/۷\times۱۰^{۱۰*}$	$۷/۳\pm۱/۸\times۱۰^{۸*}$	$۹/۸\pm۰/۱\times۱۰^{۷*}$	$۲/۱\pm۱/۵\times۱۰^{۵*}$	$۲/۲\pm۱/۴\times۱۰^{۴*}$

*در هر ستون تعداد سلول‌های زنده ریزپوشانی شده به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های آزاد می‌باشد (p<۰/۰۵).
† در هر ستون تعداد سلول‌های زنده آزاد تحت شرایط بدون تنش مکانیکی بطور معنی‌داری بیشتر از تعداد سلول‌های زنده آزاد تحت شرایط با تنش مکانیکی می‌باشد (p<۰/۰۵).
φ در هر ستون تعداد سلول‌های زنده ریز پوشانی شده تحت شرایط بدون تنش مکانیکی به طور معنی‌داری بیشتر از تعداد سلول‌های زنده ریز پوشانی شده تحت شرایط با تنش مکانیکی می‌باشد (p<۰/۰۵).

جدول ۲- میزان بقای سلول‌های آزاد و ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La۵ بعد از گرمخانه‌گذاری در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار، در طی ۲ ساعت در ۳۷°C با و بدون تنش مکانیکی

شرایط	نوع باکتری	۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه
بدون تنش مکانیکی	باکتری‌های آزاد (cfu/gr)	$۵/۰\pm۰/۵\times۱۰^{۱۱\dagger}$	$۶/۱\pm۱/۱\times۱۰^{۱۰\dagger}$	$۲/۱\pm۰/۲\times۱۰^{۱۰\dagger}$	$۲/۵\pm۰/۵\times۱۰^{۹\dagger}$	$۱/۲\pm۱/۶\times۱۰^{۹\dagger}$
	باکتری ریزپوشانی شده(cfu/gr)	$۸/۴\pm۰/۴\times۱۰^{۱۱*\varphi}$	$۳/۲\pm۰/۷\times۱۰^{۱۱*\varphi}$	$۱/۰\pm۱/۶\times۱۰^{۱۱*\varphi}$	$۹/۸\pm۰/۲\times۱۰^{۱۰*\varphi}$	$۳/۱\pm۱/۵\times۱۰^{۱۰*\varphi}$
با تنش مکانیکی	باکتری آزاد (cfu/gr)	$۳/۱\pm۱/۱\times۱۰^{۱۱}$	$۶/۰\pm۰/۶\times۱۰^{۱۰}$	$۸/۱\pm۱/۲\times۱۰^{۹}$	$۱/۳\pm۱/۱\times۱۰^{۹}$	$۹/۲\pm۰/۱\times۱۰^{۸}$
	باکتری ریزپوشانی شده (cfu/gr)	$۷/۸\pm۰/۶\times۱۰^{۱۱*}$	$۲/۱\pm۰/۹\times۱۰^{۱۱*}$	$۲/۷\pm۱/۸\times۱۰^{۱۰*}$	$۱/۹\pm۰/۱\times۱۰^{۱۰*}$	$۱/۰\pm۰/۲\times۱۰^{۱۰*}$

*در هر ستون تعداد سلول‌های زنده ریزپوشانی شده به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های آزاد می‌باشد (p<۰/۰۵).
† در هر ستون تعداد سلول‌های زنده آزاد تحت شرایط بدون تنش مکانیکی به طور معنی‌داری بیشتر از تعداد سلول‌های زنده آزاد تحت شرایط با تنش مکانیکی می‌باشد (p<۰/۰۵).
φ در هر ستون تعداد سلول‌های زنده ریز پوشانی شده تحت شرایط بدون تنش مکانیکی به طور معنی‌داری بیشتر از تعداد سلول‌های زنده ریز پوشانی شده تحت شرایط با تنش مکانیکی می‌باشد (p<۰/۰۵).

جدول ۳- میزان بقای سلول‌های آزاد و ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La۵ بعد از گرمخانه‌گذاری در محلول حاوی پودر دایجستیو، در طی ۲ ساعت در ۳۷°C با و بدون تنش مکانیکی

شرایط	نوع باکتری	۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه
بدون تنش مکانیکی	باکتری‌های آزاد (cfu/gr)	$۲/۷\pm۰/۴\times۱۰^{۱۰\dagger}$	$۸/۱\pm۱/۲\times۱۰^{۸\dagger}$	$۴/۰\pm۰/۵\times۱۰^{۵\dagger}$	$۷/۲\pm۰/۳\times۱۰^{۴\dagger}$	$۱/۱\pm۱/۶\times۱۰^{۳\dagger}$
	باکتری ریزپوشانی شده(cfu/gr)	$۵/۲\pm۰/۶\times۱۰^{۱۰*\varphi}$	$۱/۵\pm۰/۱\times۱۰^{۱۰*\varphi}$	$۳/۷\pm۱/۱\times۱۰^{۸*\varphi}$	$۱/۶\pm۰/۹\times۱۰^{۶*\varphi}$	$۴/۶\pm۱/۷\times ۱۰^{۵*\varphi}$
با تنش مکانیکی	باکتری آزاد (cfu/gr)	$۱/۴\pm۱/۲\times۱۰^{۱۰}$	$۱/۱\pm۰/۸\times۱۰^{۸}$	$۸/۱\pm۰/۴\times۱۰^{۴}$	$۳/۳\pm۱/۷\times۱۰^{۳}$	$۱/۹\pm۰/۷\times۱۰^{۲}$
	باکتری ریزپوشانی شده (cfu/gr)	$۳/۰\pm۰/۲\times۱۰^{۱۰*}$	$۶/۵\pm۱/۲\times۱۰^{۹*}$	$۱/۷\pm۱/۰\times۱۰^{۷*}$	$۴/۵\pm۱/۵\times۱۰^{۵*}$	$۲/۷\pm۰/۹\times۱۰^{۴*}$

*در هر ستون تعداد سلول‌های زنده ریزپوشانی شده به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های آزاد می‌باشد (p<۰/۰۵).
† در هر ستون تعداد سلول‌های زنده آزاد تحت شرایط بدون تنش مکانیکی به طور معنی‌داری بیشتر از تعداد سلول‌های زنده آزاد تحت شرایط با تنش مکانیکی می‌باشد (p<۰/۰۵).
φ در هر ستون تعداد سلول‌های زنده ریز پوشانی شده تحت شرایط بدون تنش مکانیکی به طور معنی‌داری بیشتر از تعداد سلول‌های زنده ریز پوشانی شده تحت شرایط با تنش مکانیکی می‌باشد (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات متعددی که بر روی ماندگاری باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس انجام گرفته است نشان از اهمیت ویژه این باکتری به عنوان فلور طبیعی و مهم روده انسان و همچنین به عنوان باکتری مهم داخل اغلب فرآورده‌های تخمیری می‌باشد (۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳). همانطور که گفته شد، ریزپوشانی یکی از جدیدترین روش‌های افزایش زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک به شمار می‌آید. در مطالعه حاضر، ویژگی‌های ریخت شناسی دانک‌های حاصل از ریزپوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، با استفاده از آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم و روش اکستروژن نشان داده شد. در مطالعات متعددی، ویژ گی‌های ریخت شناسی دانک‌های حاصل از ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با استفاده از مواد و روش‌های مختلف و با بکارگیری میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۶، ۱۰، ۱۱، ۲۴). در مطاله حاضر نتایج

www.SID.ir

نشان دادند که میزان استحکام دانک‌ها، تحت تاثیر محیط‌های مختلف، متفاوت بوده و تنش فیزیکی نقش مهمی در آن دارد. 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^{+2} بیشتر باشد میزان ضخامت پوشینه و در نتیجه استحکام آن بیشتر می‌شود (۲۵). Anselmi و همکاران در سال ۲۰۰۲ استفاده از تکنولوژی جدید در بهبود ویژگی‌های ریزپوشانی، با به‌کارگیری اثر استحکام بخشی اشعه U.V، پایداری ذاتی خوب دانک‌ها، سمزایی پایین و توانایی مقامت بهتر و فرمولاسیون ساده و ارزان که از اهداف مهم این تکنولوژی می‌باشند را مورد بحث و بررسی قرار داده‌اند (۱۵).

در مطالعه حاضر، یافته‌های حاصل از شمارش باکتریایی در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تحت شرایط محلول اسید هیدروکلریک، محلول بافر فسفات و محلول حاوی پودر دایجستیو با و بدون تنش مکانیکی، نشان داد که ریزپوشانی با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم، نقش بسیار مهمی در حفاظت از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ایفا می‌کند و میزان زنده مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده در تمام شرایط، بطور معنی‌داری بیشتر از باکتری‌های آزاد بود. این بدان معنی است که ریزپوشانی 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 (۱۰). همچنین Sultana و همکاران در سال ۲۰۰۰ ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک با آلژینات – نشاسته را انجام داده و بقای این باکتری را در شرایط مشابه مایع معدی–روده‌ای و در داخل ماست، مورد بررسی قرار داده‌اند. براساس نتایج حاصل از این پژوهش به‌کارگیری نشاسته با آمیلوز بالا یا Hi-maize (به عنوان پری بیوتیک)، کپسول سازی باکتری زنده را در مقایسه با مورد بدون نشاسته بهبود می‌بخشد 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 – نشاسته در افزایش بقای باکتری پروبیوتیک در شرایط نامساعد با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۴).

Kailasapathy و همکاران در سال ۲۰۰۲ ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک، تولید محصولات پروبیوتیکی و افزایش ماندگاری این ارگانیسم‌ها در داخل محصولات و به خصوص داخل دستگاه معدی– روده‌ای انسان را مورد بررسی قرار داده‌اند. در این پژوهش اعلام شده است که ریزپوشانی با هدف فراهم آوردن یک سد فیزیکی برای حفاظت پروبیوتیک‌ها در مقابل شرایط نامساعد محیطی موجود و بی‌حرکت نگه داشتن باکتری‌های پروبیوتیکی در بیوتکنولوژی انجام می‌گیرد. روش‌های مختلف میکروواینکپسولاسیون نیز مورد بحث در این مطالعه می‌باشد و آمده است که بیشترین موارد این فن آوری آلژینات کلسیم می‌باشد و این نشان دهنده اهمیت این ماده است. مواد دیگر که بعد از آلژینات بیشترین استفاده را دارند کاپا – 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 می‌باشند که کاربردهای تجاری زیادی دارد. حامل‌های غذایی گزارش شده، شامل: ماست، پنیر، بستنی و سس مایونز می‌باشد (۶).

در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ریزپوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس که به عنوان فلور مهم روده انسان و داخل فرآورده‌های تخمیری شناخته شده می‌باشد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و باعث افزایش معنی‌داری در بقای این باکتری در شرایط دشوار محیطی می‌شود. نیازهای تحقیقاتی در این زمینه، بررسی میزان بقای سایر باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده موجود در دستگاه گوارش انسان در شرایط دشوار محیطی و همچنین بررسی ویژگی‌های ریخت شناسی دانک‌های حاصل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی می‌باشد. همچنین پیشنهاد می‌شود تا سایر مواد ریزپوشاننده مثل ژلاتین، کیتوزان و پلی– ال– لیزین، جهت ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و سایر باکتری‌های مفید روده مورد مطالعه قرار بگیرند.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1- Klaenhammer TR. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM press, Washington D.C, USA, 2001; p: 797-800.
2- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. probiotics: mechanisms and established effects, Idairyj 1999; 9: 43-52.
3- Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, Food Sci Tech 2007; 18: 240-251.
4- Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principles and Methods of Microencapsulation of probiotic Microorganisms, Iranian J Biotech 2007; 5: 1-18.
5- Gong C, Zhang H, Wang x. Effect of Shell Materials on Microstructure and Properties of Microencapsulated n-Octadecane, Iranian Poly J 2009; 18: 501-512.
6- Kailasapathy K. Microencapsulation of Probiotc bacteria: Technology and Potential Applications, Curr.Issues intest. Microbiol 2002; 3: 39-48.
7- Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS, Razavi SH. Effect of Microencapsulation and Resistant starch on the Probiotic Survival and Sensory Properties of Symbiotic Ice cream, Food Chem 2008; 111: 50-55.
8- Mikelsaar M, Mander R, Sepp E. Lactic acid bacteria in human microbial ecosystem and its development in Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects 1998; 279-342.
9- Ohashi Y, Umesaki Y, Ushida K. Transition of the Probiotic bacteria, Lactobacillus casei Strain Shirota in the Gastrointestinal Tract of a Pig, International J Food Mic 2004; 96: 61-66.
10- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The Influence of Coating Materials on some Properties of Alginate beads and Survivability of Microencapsulated Probiotic bacteria, Idairyj 2004; 14: 737-743.
11- Homayouni A, Ehsani MR, Azizi A, Yarmand MS, Razavi SH. Effect of Lecithin and Calcium chloride Solution on the Microencapsulation Process Yield of Calcium alginate Beeds, Iranian Poly. J 2007; 16: 597-606.
12- Boylston TD, Vinderola CG, Ghoddusi HB, Reinheimer JA. Incorporation of Bifidobacteria into Cheeses: Challenges and Rewards, Idairy 2004; 14: 375-387.
13- Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NP. Effect of Acidification on the Activity of Probiotics in Yoghurt during Cold Storage, Idairyj 2006; 16: 1181-1189.
14- Hansen LT, Allan-Wojtas DM, Jin YL, Paulson AT. Survival of Ca-alginate Microencapsulated Bifidobacterium spp. In Milk and Simulated Gastrointestinal Conditions, Food Mic 2001; 19: 35-45.
15- Anselmi C, Centini M, Rossi C, Ricci M, Rastrelli A, Anderassi M, Buonocore A, La Rosa C. New Microencapsulated Sunscreens: Technology and Comparative Evaluation, I.J.Pharma 2002; 242: 207-211.
16- Sheu TY, Marshall RT. Microentrapment of lactobacilli in Calcium alginate Gels, J Food Sci 1993; 54: 557-561.
17- Pourjafar H. IR. Patent: Invent Related to Multi Nozzle Extrusion Microencapsulator Device, in order to Probiotic Microorganism Microencapsulation 2011; Inventory record: 68678.
18- Talwalker AN, Kailasapathy K. Effect of Microencapsulation on Oxygen Toxicity in Probiotic bacteria, J Dairy Tech 2003; 58: 36-39.
19- Shah NP. Probiotic bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods, Jdairysci 2000; 83: 894-907.
20- Phillips M, Kailasapathy K, Tran L. Viability of Commercial probiotic Cultures (L. acidophilus, Bifidobacterium sp., L. casei, L. paracasei and L. rhamnosus) in cheddar cheese, Ijfoodmicro 2006; 108: 276-280.
21- Shima M, Morita Y, Yamashita M, Adachi S. Protection of Lactobacillus acidophilus from the Low pH of a Model Gastric Juice by Incorporation in a W/O/W Emulsion, Food Hyd 2006; 10: 1016-1027.
22- Oh S, Kim SH, Worobo RW. Characterization and Purification of a Bacteriocin Produced by a Potential Probiotic Culture, Lactobacillus acidophilus 30SC, jdairysci 2000; 83: 2747-2752.
23- Oliveria AC, Moretti TS, Boschini C, Baliero JCC, Freitas LAP, Freitas O, Favaro-Trindade CS. Microencapsulation of B.lactis (BL 01) and L.acidophilus (LAC 4) by Complex Coacervation Followed by Spouted-bed Drying, Drying Tech 2007; 25: 1687-1693.
24- Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, KailasaPathy K. Encapsulation of Probiotic bacteria with alginate-starch and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt, Ijfoodmicro 2000; 62: 47-55.
25- Simpson NE, Stabler CL, Simpson CP, Sambanis A, Canstantinidis I. The Role of the CaCl2-guluronic acid Interaction on Alginate Encapsulated βTC3 Cells, Biomaterial 2004; 25: 2603-2610.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of Morphological and Protective Characteristics of beads obtained from Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus Probiotic as a Predominant and Natural flora in human gut

*Pourjafar H; DVM[1], Mirzaei H; MD[2], Ghasemnezhad R; PhD[3], Homayouni Rad A; DVM[4]

Received: 2 Jul 2011 Accepted: 26 Sep 2011

Archive of SID

Abstract

Background: lactobacillus acidophilus as a probiotic has more useful effects and low viability of this bacterium and other probiotics under hard acidic-bile conditions of digestive system and food products, have encouraged researchers to find methods to solve this problem. Microencapsulation as one of the newest methods has noticeable effects in this field. The aim of this study was to evaluate the morphological and protective characteristics of beads obtained from microencapsulation of Lactobacillus acidophilus.

Materials and methods: After activation of starter culture of la5 in MRS-broth medium, in order to purification bacteria was used centrifuge device with speed of 10000rpm for 10 minutes. Microencapsulation was done by calcium alginate and resistant starch with extrusion method. Morphology of beads was evaluated by optical microscope. The study of beads stability was done for 12 hours and the study of survival microencapsulated bacteria was done for 120 minutes within hydrochloric acid, phosphate buffer (0.1 mol) and digestive powder inclusion solution.

Results: A morphological characteristics of beads was indicated by optical microscope. These results showed that the strength of beads in various environments is different and in this regard physical tension is very important. Under unfavorable environmental conditions, microencapsulation with calcium alginate and resistant starch was played an important role in the protection of lactobacillus acidophilus. The survival rate of microencapsulated bacteria in all conditions was significantly higher than free bacteria (P <0/05).

Conclusion: Morphological characteristics and strength of beads had great importance in theirs protective function of probiotic bacteria. Microencapsulation with calcium alginate and resistant starch plays an important role in increasing the rate of lactobacillus acidophilus survival.

Keywords: microencapsulation, probiotic, lactobacillus acidophilus, predominant gut flora

1- (*Corresponding Authors) Food hygiene Department, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran. Tel: +989144082455, E-mail: drhpsglad@yahoo.com.

2- food hygiene Department, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

3- Food hygiene Department, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Campus, Tehran, Iran

4- Food Science and Technology Department, Faculty of Health and Nutrition, Tabriz University of medical Science, Tabriz, Iran.

www.SID.ir