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

[1*]رضایی مکرم، رضا؛ [2]مرتضوی، سیدعلی؛ [3]حبیبی نجفی، محمدباقر؛ [4]شهیدی، فخری؛ [5]خمیری، مرتضی

[1*]گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[2، 3 و 4]گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[5]گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

به منظور بهبود قابلیت زنده مانی در شرایط نامساعد معده و روده باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC ۱۶۴۳ بوسیله الژینات کلسیم میکروکپسول گردید به منظور بررسی نحوه رفتار و قابلیت زنده مانی پروبیوتیکها در دستگاه گوارش باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس۱۶۴۳ PTCC بوسیله الژینات کلسیم میکروکپسول گردید و در شرایط شبیه سازی شده معده و روده به مدت ۰، ۳۰، ۶۰ ، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد اینکوباسیون شد . قابلیت زنده مانی 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 کپسولها از تکنیک SEM استفاده شد. میکروانکپسولاسیون در سطح $P<$ ۰/۰۵ سبب کاهش مرگ باکتری ناشی از اثر اسیدیته (معده) ۲ h) pH = ۱/ ۵) گردید . همچنین پس از اینکوباسیون بمدت ۶۰ دقیقه در شرایط معده و دو ساعت در شرایط روده (pH = ۷/ ۲۵) تعداد سلولهای زنده log cfu / g ۶/۵ بدست امد در حالیکه این مقدار برای سلولهای شاهد log cfu / g ۲/۳ بود.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، میکروانکپسولاسیون، الژینات کلسیم

18th National Congress on Food Technology
Mashhad, I.R.Iran
15-16 Oct. 2008
هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی
جمهوری اسلامی ایران
۲۵ تا ۲۴ مهر ۱۳۸۷
مشهد مقدس

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

The influence of alginate microencapsulation on survivability of microencapsulated probiotic *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 in simulated gastric and intestinal juice

رضا رضایی مکرم[۱]* سید علی مرتضوی[۲] محمد باقر حبیبی نجفی[۲] فخری شهیدی[۲] مرتضی خمیری[۳]

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

۱ * عضو هیات علمی گروه علوم وصنایع غذایی دانشگاه تبریز ۲ - عضو هیات علمی گروه علوم وصنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد ۳ - عضو هیات علمی گروه علوم وصنایع غذایی دانشگاه گرگان

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

*نویسنده عهده دار مکاتبات

*تلفن : ۰۹۱۵۳۰۰۷۵۸٤ فاکس ٤۳۰۸۷۸۷ – ۰۵۱۱

* E-mail rmokarram@tabrizu.ac.ir

نشانی فعلی:

مشهد میدان ازادی دانشگاه فردوسی دانشکده کشاورزی گروه علوم و صنایع غذایی

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

چکیده

به منظور بهبود قابلیت زنده مانی در شرایط نامساعد معده و روده باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC ۱٦٤۳ بوسیله الژینات کلسیم میکروکپسول گردید به منظور بررسی نحوه رفتار و قابلیت زنده مانی پروبیوتیکها در دستگاه گوارش باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC ۱٦٤۳ بوسیله الژینات کلسیم میکروکپسول گردید و در شرایط شبیه سازی شده معده و روده به مدت ۰، ۳۰، ٦۰ ، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد اینکوباسیون شد . قابلیت زنده مانی 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 کپسولها از تکنیک SEM استفاده شد. میکروانکپسولاسیون در سطح $P<$ ۰/۰۵ سبب کاهش مرگ باکتری ناشی از اثر اسیدیته(معده) (pH = ۱/ ۵ , 2 h) گردید . همچنین پس از اینکوباسیون بمدت ٦۰ دقیقه در شرایط معده و دو ساعت در شرایط روده (pH = ۷/ ۲۵) تعداد سلولهای زنده log cfu / g ٦/۵ بدست امد در حالیکه این مقدار برای سلولهای شاهد log cfu / g ۲/۳ بود.

کلید واژه : پروبیوتیک ، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ، میکروانکپسولاسیون ، الژینات کلسیم

The influence of alginate microencapsulation on survivability of microencapsulated probiotic *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 in simulated gastric and intestinal juice

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

The influence of alginate microencapsulation on survivability of microencapsulated probiotic *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 in simulated gastric and intestinal juice

Abstract

The probiotic, *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 was encapsulated into 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 ^{oC}. 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 cfu ml $^{-1}$ was obtained for free cells.

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

۱ – مقدمه

میکروانکپسولاسیون یکی از بزرگترین نواوریهای افرینش محسوب می شود و نقطه اغاز حیات بـشمار مـی رود در طی ۳-۲ میلیاردسال طبیعت با محصور کردن مولکولهای حیاتی در واحدهای ساختمانی به نام سلول امکان حیـات را بر روی کره خاکی میسر نموده است . انسان نیز با الهام از طبیعت سعی کرده است تا ترکیبات مورد نیاز خـود را تغلیظ و پوشش دهی و حفاظت نماید که در مقیاس میکروسکوپی این پدیـده را میکروانکپـسولاسیون مـی نامنـد . [۱و۲]

بر حسب تعریف پروبیوتیکهابه میکروارگانیسمهای زنده که پس از هضم به مقـدار معـین توانـایی القـای خـواص حیاتی ویژه هستند اطلاق مس شود و این تواناییها فرای خواص ذاتـی مـواد غـذایی اسـت [۳] اسـتفاده از ایـن میکروارگانیسمها در دهه گذشته عمومیت بیشتری یافته است و در صورت افزودنی در صنایع مختلف بکـار گرفتـه شده اند. بر حسب استانداردها برای بروز ویژگیهای سلامت زایی این باکتریها باید به صورت میانگین به تعداد $۱۰^{٦}$ در هر گرم از محصول مصرف شده وجود داشته باشند [٦و٥و٤] . عوامل متعددی بر زنده مانی و نحـوه فعالیـت این باکتریها تاثیر گذار هستند که از جمله می توان از دما [۸و۷] pH [۹] غلظت اسید لاکتیک و اسید استیک [۱۰] و شرایط فراوری [۱۱] نام برد . از عمده ترین ترکیبات مورد استفاده در کپسولاسیون پروبیوتیکها الژینات سدیم است . این صمغ یک هترو پلی ساکارید خطی متشل از واحدهای ساختمانی D-mannuronic acid و L-guluronic acid می باشد و از جلبکهای دریایی استخراج مـی شـود . کپـسولهای الژینـات را مـی تـوان بـه روشهای اکستروژن و امولسیون تهیه کرد [۱۳ و ۱۲] . دلایل استفاده از الژینات را مـی تـوان در ارزانـی سـهولت

کاربرد و سازگاری با سازه های حیاتی خلاصه کرد [١٦ و ١٥ و ١٤] . این ماده به هنگام ایجاد ژل دارای منافذی با قطر ١٧ نانومتراست که بخوبی می تواند باکتریها را که در اندازه میکرون هستنددر خود بدام اندازد[١٤] با این حال ژل حاصل در شرایط اسیدی شدید و یا حضور یونهای تک ظرفیتی اندکی ناپایدار می باشد [١٧]. در چنین شرایطی مولکولهای صمغ دچار تغییر وضعیت شده [١٨] و در نتیجه باکتریها ی بدام افتاده در محیط رها می شوند [١٩] . بر اساس برخی تحقیقات حداکثر حجم سلولهای قابل نگهداری دراین کپسولها ٪٢٥ حجم کپسول است [٢٠] برای غلبه بر چنین شرایطی کپسولهای الژینات را در محلول ٠,١ ٪ 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 چند لایه را بر روی قابلیت زنده مانی پروبیوتیکها نحوه پراکنش اندازه ذرات کپسول وخواص ظاهری انها در شرایط شبه سازی شده دستگاه گوارش مطالعه شده است.

٢ – مواد و روشها

٢ – ١ – اماده سازی میکروارگانیسمها

لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس١٦٤٣ PTCC (Persian type collection culture) از سازمان پژوهشهای علمی صنعتی بخش کلکسیون میکروبی خریداری شد. یک ویال لیوفلیزه از باکتری در ٥ ml محیط مایع MRS (Merck Germany) تلقیح و برای ٢٤ ساعت در ٣٧ درجه سانتیگرا د در شرایط هوازی تکثیر شد. سپس نمونه حاصل در٩٥ ml محیط مایع MRS تلقیح و تحت شرایط فوق تکثیر گردید. بیومس حاصل بوسیله سانترفوژ در g ×٣٠٠٠ برای مدت ٥ دقیقه جداسازی و در ٢٥ درجه دو مرحله با محلول استریل ٠/١ در صد پپتون شسته و در دمای چهار درجه نگهداری شد.

۲ – ۲ – کپسولاسیون باکتریها

میکروانکپسولاسیون باکتریها با استفاده از روش ژلاتیناسیون خارجی [۲۱] که قبلا توسط تراستراپ(۲۰۰۲) و الان (۲۰۰۸) نیز گزارش شده اجرا گردید [۲۳ و ۲۲] . مراحل روش بطور خلاصه عبارت است از انحلال ۱۰ گرم الژینات (Sigma A 2033; High mannuronic acid) با ویسکوزیته متوسط در یک لیتر اب مقطر دیونایز . سپس ۱۸ گرم از محلول فوق با یک گرم سوسپانسیون باکتریایی مخلوط گردید. انگاه مخلوط حاصل در ۱۰۰ گرم روغن نباتی مایع حاوی مقدار ۵ g/l تویین ۸۰ (P 8074 Sigma) با استفاده از همزن مغناطیسی در ۹۰۰ rpm بمدت ۲۰ دقیقه پراکنده گردید. سپس با افزودن ۳۲ ml امولسیون حاوی یون کلسیم (تهیه شده از انحلال ٦۰ گرم روغن نباتی مایع ۵ g/l تویین و ٦۲/۵ mM کلرور کلسیم) عمل ژلاتیناسیون اغاز گردید . میکروکپسولهای الژینا ت با ادامه همزدن بمدت ۲۰ دقیقه تشکیل یافته و اجازه داده شد تا بمدت ۳۰ دقیقه دیگر نیز در شرایط فوق باقی بماند تا ژلاتیناسیون کامل شود . در نهایت کپسولها با محلول ۰,۱ در صد پپتون شسته وبا استفاده از همین محلون در دمای ٤ درجه نگهداری شدند.

۲ – ۳ – شمارش تعدادباکتریهای بدام افتاده در کپسولها

۱ گرم از نمونه های کپسول تهیه شده در ۹۹ ml محلول ۱٪ w/v سدیم سیترات استریل در pH حدود ٦ پراکنده بمدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق همزده شد انگاه با استفاده از حیط جامد MRS در شرایط هوازی دمای ۳۷ درجه وبمدت ۲٤ ساعت کشت میکروبی داده شد و تعداد باکتریها شمارش گردیدند این شمارش در سه تکرار صورت پذیرفت .

۲ – ٤ – ازمون فیزیکی کپسولها

۲ – ٤ – ۱ – تعیین اندازه ذرات ونحوه پراکنش انها

اندازه کپسولها ی حاصل از هر یک از تیمارها و فراوانی هریک از انها با استفاده از دستگاه Particle size analyzer مدل (SALD-2101 SHIMADZU Japan) تعیین گردید برای این منظور کپسولها در اب دیونایز (Milli Q Millipore USA) با ضریب هدایت µs ۰۵٤ /۰ پراکنده شدند و نتایج براساس میانگین حجمی ذرات ± استاندارد خطا گزارش شدند.

۲ – ٤ – ۲ – تعیین مرفولوژی ذرات

برای تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده شکل ظاهری انها از میکروسکوپ الکترونی و تکنبک SEM استفاده گردید. بدین جهت کپسولها بوسیله چسب دو طرفه بر روی کوتر (SC 7620 England) تثبیت شدند و بمدت ۲ دقیقه بوسیله طلا و پالادیم پوشش داده شدند مشاهده کپسولها بوسیله میکروسکوپ الکترونی مدل (LEO 1450 VP Germany) با تابش الکترونی Kv ۱۰ انجام پذیرفت.

۲ – ۵ – 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 [٢٤] . ۱ گرم از کپسول حاوی باکتری بطور کامل در ml ۱۰ شیره شبیه سازی شده معدی (M HCl ۰/۰۸ و ۰/۲ در صد NaCl و pH حدود ۱/۵) بدون حضور پپسین پراکنده و برای مدتهای ۰ ، ۳۰ ، ٦۰ ، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه

سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند . پس از گذشت زمان لازم کپسولها جداسازی و بوسیله محلول ۰/۱ در صد پپتـون شسته شدند. و تعداد باکتریها با روش گفته شده در قسمت۲ – ۳ با سه تکرار شمارش شدند .

۲ – ٦ – بررسی قابلیت زده مانی سلولها پس از گرمخانه گذاری متوالی در شرایط شبیه سازی شـده معـده و روده

۱ گرم از میکروکپسولهای تازه و حاوی هر یک از باکتریهای مورد ازمایش ابتدا در ۱۰ ml محلـول معـدی بمـدت ٦۰ دقیقه و دمای ۳۷ درجه اینکوباسیون شدند انگاه با محلول سود خنثی و در ۹ ml محلول شبیه شیره روده (M KH_2PO_4 ۰/۰۵ و pH حـدود ۷/۲۵ و ۰/٦ در صـد نمکهـای صـفراوی گـاوی (Sigma ;70168 oxgall) استریل شده بوسیله میکروفیلتر ۰/۲ (0.2µm, 2032-013 IWAKI, Japan) برای زمانهای۰ ، ۳۰ ، ٦۰ ، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه اینکوباسیون شدند . پس از گذشت زمانهای مورد نظر ۱ گرم از کپسول مورد نظر بـه روش گفته شده در بند۲ – ۳ با سه تکرار مورد شمارش قرار گرفتند.

۲ – ۷ – انالیز اماری

انالیز اماری با اسفاده از طرح فاکتوریل کاملا تصادفی صورت گرفت ازمون میانگین داده ها بـه روش LSD انجـام شد.

۳ – نتایج و بحث

۳ – ۱ – شمارش تعدادباکتریهای بدام افتاده در کپسولها و تعیین اندازه ذرات ونحوه پراکنش انها

تعداد اولیه سلولهای زنده قبل از کپسولاسیون ۱۰/۰۱ – ۹/۰۲ log cfu / ml محاسبه گردید . برحـسب داده هـای بدست امده تعداد سلول بدام افتاده در کپسولها در حد ۹/۲ – ۹/۰ log cfu / g کپسول گزارش گردید تعداد کـم

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 کپسولها از نظر شکل ظاهری کاملا کروی مشاهده شدند . (شکل ۱) .میانگین حجمی قطر کپسولها ۰/۱۶۱ ± ۲۳/۷۵۸ µm بود وقطر ۹۰ ٪ ذرات کمتر از ۳۵/ ٦٤١ میکرون محاسبه گردید همچنین ۱۰٪ کپسولها قطری کمتر از ۵۰۸ / ۱۵ میکرون داشتند (شکل۲) . این امر گویای ان 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 [۲۵] بافت نرمتری را در مواد غذایی ایجاد خواهند کرد. این نتیجه همچنین با گزارش (Truelstrup et al ., 2002) که گفته است کپسولهای (mm ۱ <) موجب خشن شدن بافت افزودنیهای غذایی می شوند مطابقت دارد [۲۲].

۳ – ۲ – زنده مانی 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 زنده مانی باکتریهای اسیدوفیلوس براساس زمان لازم برای کاهش یک پایه لگاریتمی(D_v) از جمعیت اولیه انها محاسبه گردید . برای لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس ۱٦٤۳ PTCC با جمعیت اولیه $۱۰^{۹}$ × ۰/۱ ±۳/٦ – $۱۰^{۹}$ ×۰/٤ ±۲/۳ در سطح احتمال P< ۰/۰۵ کپسولاسیون در مقایسه با انواع فاقد کپسول شرایط بهتری را برای زنده مانی فراهم می کرد (جدول ۱). 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 [۲٦] . با این حال نتایج دیگری این داده ها را تایید می کند . این محققین گزارش کرده اند که در pH ۱/۲ پس از یک ساعت اینکوباسیون کلیه باکتریهای لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس نابود می شوند. در حالیکه در حالت کپسوله شده تعداد این

باکتری در pH حدود ۱/۵ پس از دو ساعت به 10^{6} cfu /ml می رسد [۲۷] . همچنین ترینیدال و گراسو(۲۰۰۳) در ازمایشی بر روی لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس La-5 نشان دادند که در pH =۱ 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 [۲۸] . چاندرامولی (۲۰۰٤) نیز نتایج مشابهی گزارش کرده است [۲۹] . مطالعه حاضر نشان داد که باکتریهای لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس ۱٦٤۳ PTCC در حالت فاقد کپسول در pH= ۱/۵ پس از گذشت ۲ ساعت جمعیت اولیه انها ۵ پایه لگاریتمی کاهش می یابد . اما استفاده از کپسول در سطح P< ۰/۰۵ به شکل معنی داری قابلیت زنده مانی این باکتریها افزایش می دهد که احتمالا ناشی از کاهش شدت شوک وارده به باکتری است (شکل ۳). این نظریه با گزارش موراتا مطابقت دارد [۳۰].

۳ – ۳ – زنده مانی سلولهای کپسوله شده در شرایط ترکیبی معده و روده

برای ایجاد شرایط اسیدی مشابه معده باکتریها بمدت ٦۰ دقیقه در شرایطی مانند انچه که در بند قبل گفته شد قرار گرفتند سپس پروبیوتیکها شرایطی شبیه شیره روده را برای زمانهای۰ ، ۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه تجربه کردند .نتایج در جدول ۲ ارائه شده است.

شمار اولیه سلولهای اسیدوفیلوس در حدود $7/4 \pm 0/8 \times 10^{9}$ – $4/6 \pm 0/5 \times 10^{9}$ cfu ml^{-1} محاسبه گردید . مقدار D_v برای انواع کپسول شده ۳/۵٦ ± ۲۹/۷۰ دقیقه بدست امد که در مقایسه با سلولهای شاهد ۰/٤۳± ۱٦/۱۹ دقیقه در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی داری را نشان دادند. به عبارت دیگر کپسولاسیون در شرایط روده می تواند سبب افزایش زنده مانی باکتریها شود . بطور کلی قابلیت زنده مانی اسیدوفیلوس در شرایط ترکیبی معده وروده کمتر از

حالت معده بتنهایی است که احتمالا بدلیل نامناسب بودن pH روده (۷/۲۵) برای این باکتری اسید دوست است. این نتایج با داده های کراسی کوپت (۲۰۰٤) همسانی دارد [۳۱] بعلاوه کیم و همکاران نشان دادند که کپسولاسیون روش موثری برای تحمل بیشتر نمکهای صفراوی توسط اسیدوفیلوس ٤۳۱۲۱ ATCC خواهد بود [۲۷] . نتایج مشابهی توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است [۳٤ و ۳۳ و ۳۲] . از انچه گفته شد چنین بر می اید که میکروانکپسولاسیون بر زنده مانی پروبیوتیکها تاثیر گذار است (شکل ٤). جدول ۲ نشان می دهد که نسبت به کنترل تعداد زنده مانده در کپسولها 10^3افزایش می یابد. این نتایج با مشاهدات تراستراپ(۲۰۰۲) مطابقت دارد اگر چه وی گزارش کرده است که کپسولهای کوچکتر از ۱۰۰ نمی توانند بشکل معنی داری موجب افزایش زنده مانی پروبیوتیکها دز شرایط اسیدی معده شوند [۲۲] . به عقیده انیل (۲۰۰۷) تشکیل لایه محافظ هیدروژل بر روی پروبیوتیکها سبب تاخیر در نفوذ شیره معده به کپسول و در نتیجه سبب افزایش زنده مانی سلولها می شود [۳۵] .

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 رفتار 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 ثابت نیست و تا زمان مصرف غذاهای پر چرب مقدار این ترکیب در روده بسیار کم است این خود عاملی است که می تواند در جهت سازگار شدن باکتریها و افزایش مقاومت انها در برابر صفرا عمل کند بعلاوه وجود مواد غذایی در روده می

تواند سبب ایجاد سپر حفاظتی برای این میکروارگانیسمها شود و برخی از پروبیوتیکها بدون اینکه بـا صـفرا تمـاس یابند در روده به فعالیت بپردازند. بالاخره فعالیت نمکهای صفراوی در شرایط ازمایشگاهی ممکن است بسیار بـیش از عمل واقعی انها در روده باشد زیرا در روده امکان ترکیب این نمکها با فسفولیپیدها نیز وجود دارد [٣٦] .

٤ – نتیجه گیری

کپسولاسیون به روش امولسیون موجب تشکیل کپسولهایی به قطرμm ۰/۱۶۱ μm± ۲۳/۷۵۸ گردیـد مـشاهده بـا میکروسکوپ الکترونی به روش SEM ایجاد کپسولهای کاملا کروی و یکسان را تایید کرد در مقایـسه بـین انـوع کپسول شده و سلولهای فاقد پوشـش انـواع بـا لایـه پوشـشی از قابلیـت زنـده مـانی بهتـری برخـوردار بودنـد در اینکوباسیون متوالی در شرایط معدی- روده ای کپسولاسیون سبب افزایش D_v بمقـدار ۱/۸۳ بـرای لاکتوباسـیلوس اسیدوفیلوس گردید. همچنین در شراط معدی این نوع پوشش سبب افـزایش D_v بمقـدار۱/۵۸ بـرا بـر بـرای ایـن باکتری در مقایسه با انواع فاقد کپسول شد .

References

[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 conditions and in yoghurt, International Dairy Journal, 14, (6), 505-515

[5] Shah, N. P., 2002. Bifidobacterium spp: Applications in fermented milks. In: Encyclopaedia of Dairy Science, London: Academic press, 147–151

[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. Østlie, 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 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] Buchholz, H., Luttmann, R., Zakrzewski, W., Schügerl, K., 1980. A comprehensive study on the cultivation of yeast in a tower bioreactor Chemical Engineering Science, 35, Issues 1-2, 1980, Pages 111-118

[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 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 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

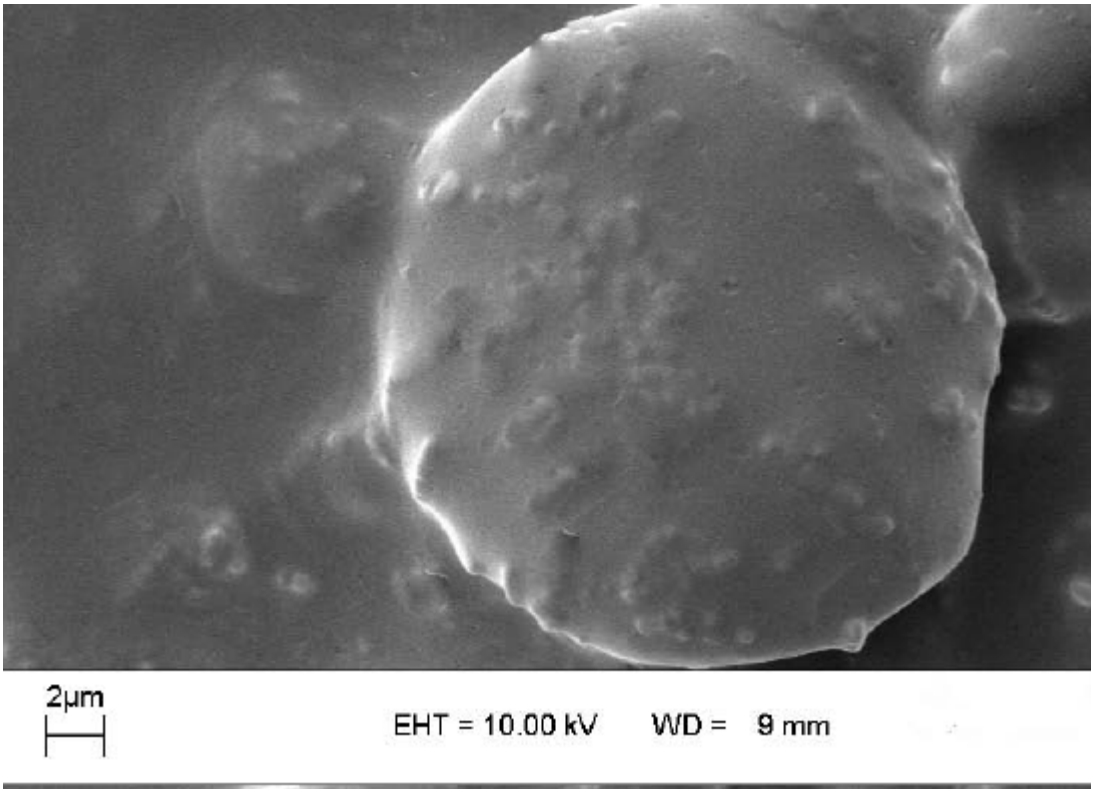
[32] Mituoka, T., 1992. The human gastrointestinal tract. In: B. J. B. Wood (Ed.), The lactic acid bacteria: The lactic acid bacteria in health and disease, Vol. 1. London, NY: Elsevier Applied Science.

[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.

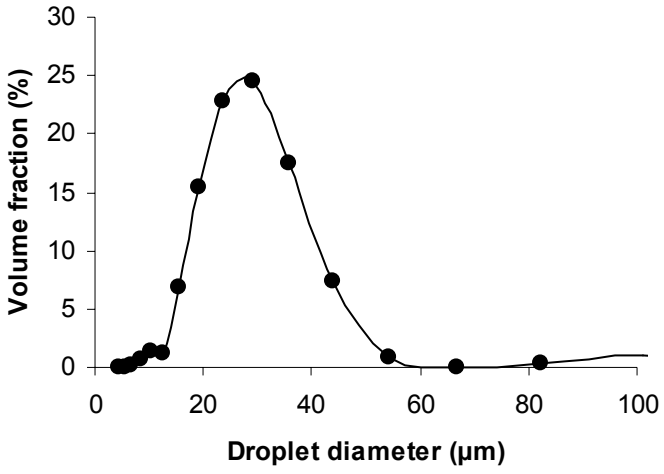
[34] Gilliland, S. E., Walker, D. K., 1990. Factors to consider when selecting a culture of Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. Journal of Dairy Science, 73(4), 905–911.

[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

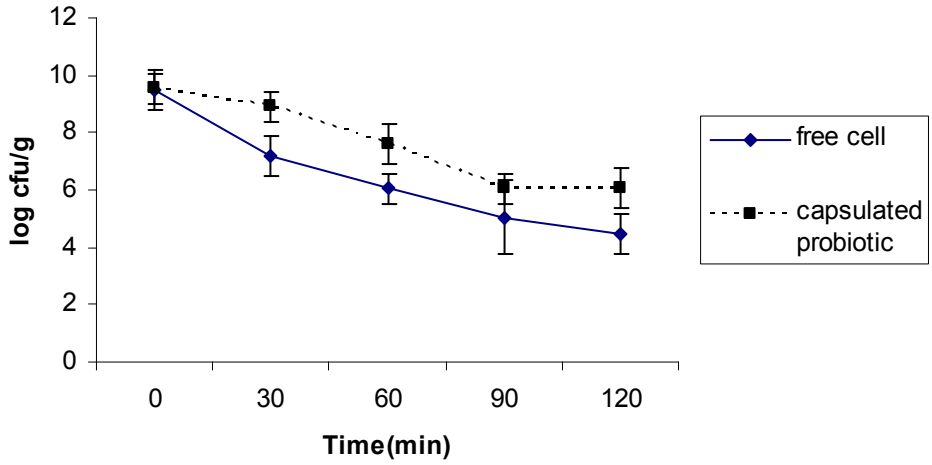


شکل ۱ – تصویر میکروسکوپ الکترونی به روش SEM از یک میکروکپسول حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس



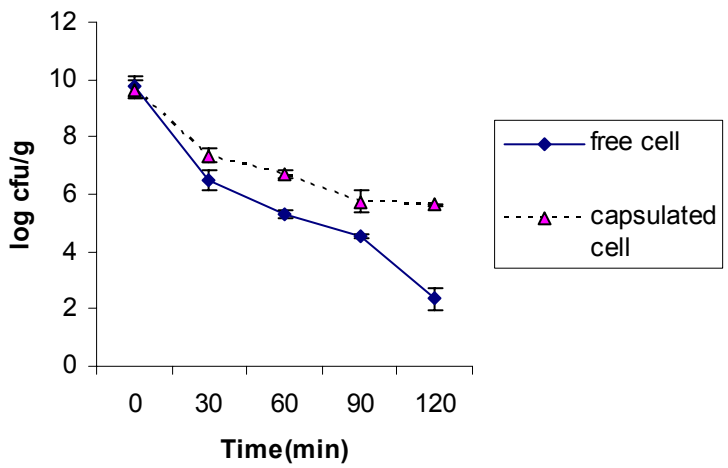
شکل۲- نمودار نحوه پراکنش اندازه ذرات میکروکپسول و در صد فراوانی انها بر اساس داده های دستگاه

particle size analyzer



شکل ۳- نمودار رفتار باکتری لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط شبیه سازی شده معده(pH = ۱/۵)در طی

زمانهای مختلف



شکل ٤- نمودار نحوه تاثیر گذاری میکروانکپسولاسیون بر قابلیت زنده مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط ترکیبی معده (pH = ۱/ ۵) بمدت ٦٠ دقیقه و روده (pH = ۷/ ۲۵) در زمانهای مختلف

جدول ۱ - تعداد(کپسول cfu / g) باکتریهای زنده مانده پس از تیمار در pH= ۱/۵ در زمانهای متفاوت

پروبیوتیک	تیمار	زمان(دقیقه)					مقدار D_v
		0 دقیقه	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه	
لاکتوباسیلوس	کنترل	$۳/۳ \pm ۰/۲ \times ۱۰^{۹}$	$۱/۶ \pm ۰/۲ \times ۱۰^{۷}$	$۱/۱ \pm ۰/۳ \times ۱۰^{۶}$	$۱/۱ \pm ۰/۰۵ \times ۱۰^{۵}$	$۲/۸ \pm ۰/۲ \times ۱۰^{۴}$	۲۳/۶۶ ± ۲/۴۷ b ❋
اسیدوفیلوس	کپسول	$۳/۶ \pm ۰/۳ \times ۱۰^{۹}$	$۸/۳ \pm ۰/۳ \times ۱۰^{۸}$	$۴/۱ \pm ۰/۲ \times ۱۰^{۷}$	$۱/۱ \pm ۰/۳ \times ۱۰^{۶}$	$۲/۳ \pm ۰/۲ \times ۱۰^{۶}$	۳۷/۶۱ ± ۴/۹۴ a

حروف a و b مشخص کننده تفاوت معنی دار در سطح $P<$ ۰/۰۵ است.

اعداد جدول میانگین سه تکرار± انحراف معیار هستند .

جدول ۲ – تعداد (کپسول cfu / g) سلولهای زنده مانده و مقدار D_v لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ازاد و کپسول شده پس اینکوباسیون در شرایط شبیه سازی شده معده (٦٠ دقیقه) و شرایط شبیه سازی شده روده در توالیهای زمانی مختلف (pH= ۷/۲۵) و ۳۷ درجه سانتیگراد

پروبیوتیک	تیمار	زمان(دقیقه)					مقدار D_v
		0 دقیقه	۳۰ دقیقه	٦٠ دقیقه	۹۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه	
لاکتوباسیلوس	کنترل	۵/٦±۲/۳× ۱۰^{۹}	۳/۳± ۲/۲×۱۰^{٦}	۲/۱± ۰/۷×۱۰^{٥}	۳/٤±۱/۱×۱۰^{٤}	۲/۲± ۰/٤×۱۰^{۲}	۱٦/۱۹ ±۰/٤۳ ^{b} *
اسیدوفیلوس	کپسول	٤/٦± ۰/۵× ۱۰^{۹}	۲/۳± ۰/٦×۱۰^{۷}	۵/۲± ۰/۷×۱۰^{٦}	۵/٦± ۰/٤×۱۰^{٥}	٤/۲± ۱/۱× ۱۰^{٥}	۲۹/۷۰ ± ۳/۵٦^{a}

حروف a و b مشخص کننده تفاوت معنی دار در سطح $P<$ ۰/۰۵ است.

اعداد جدول میانگین سه تکرار± انحراف معیار هستند .