

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

حمید میرزایی^۱ هادی پورجعفر^{۲*} عزیز همایونی راد^۳

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

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

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

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

چکیده

یکی از شیوه‌های نوین در زمینه افزایش ماندگاری پروبیوتیک‌ها در داخل فرآورده‌های غذایی پروبیوتیکی و در حین گذر از جهاز گوارشی، به منظور انتقال ایمن آنها به روده بزرگ، ریز پوشانی (میکرواینکپسولاسیون) سلول‌های پروبیوتیکی می‌باشد. این مطالعه با هدف تعیین تأثیر ریز پوشانی با آلزینات کلسیم و نشاسته مقاوم بر میزان بقاء لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*La5*) در شرایط مشابه مایع معدی - روده ای انجام پذیرفت. بقای باکتری مورد نظر در محلول نمک صفرای ۰/۶ درصد و همچنین شرایط مشابه مایع معدی (pH=۱/۵۵) و به دنبال آن گرمخانه‌گذاری در شرایط مشابه مایع روده‌ای (pH=۸/۲۵) با وبدون نمک صفرای ۰/۶ درصد مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه جهت انجام فرآیند ریز پوشانی باکتری از روش اکستروژن استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون t-test مستقل مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که میزان بقاء سلول‌های ریز پوشانی شده در شرایط اسیدی مشابه مایع معدی و همچنین شرایط مایع روده‌ای با وبدون نمک صفرای ۰/۶ درصد بطور معنی داری بیشتر از سلول‌های آزاد است. (p<۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، ریز پوشانی، آلزینات کلسیم، نشاسته مقاوم، مایع معدی - روده‌ای.

موجود در زمینه مدت زمان بقای ارگانیزم‌های پروبیوتیک در داخل محصول و همچنین داخل دستگاه گوارش و افزایش میزان تأثیرگذاری محصولات حاوی آنها است (۳،۵). در این راستا Sultana و همکاران در سال ۲۰۰۰ میزان افزایش بقای پروبیوتیک ریز پوشانی شده با آلزینات - نشاسته را در شرایط مشابه مایع معدی - روده‌ای نشان داده‌اند (۲۱). در مطالعه دیگر Krasaekoopt و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر مفید ریز پوشانی در افزایش بقای پروبیوتیک‌ها را با استفاده از سه ماده کیتوزان، آلزینات سدیم و پلی - ال - لیزین نشان داده‌اند (۱۲). Cui و همکاران نیز در سال ۲۰۰۰ نقش ریز پوشانی در افزایش بقاء پروبیوتیک‌ها را نتیجه‌گیری کرده‌اند (۴). هدف از مطالعه حاضر تعیین تأثیر ریز پوشانی با آلزینات کلسیم و نشاسته مقاوم بر میزان بقاء لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*La5*) در شرایط مشابه مایع معدی - روده‌ای می‌باشد.

مواد و روش کار

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

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که وقتی وارد دستگاه گوارش می‌شوند در یک شمار مشخص و معینی یک یا چند اثر مفیدی را روی سلامتی میزبان می‌گذارند (۱۱). میزان بقاء اندک پروبیوتیک‌ها در شرایط دشوار فرآورده‌های غذایی و نیز شرایط اسید - صفرای دستگاه گوارش، پژوهشگران را همواره به یافتن شیوه‌های بهبود این شاخص ترغیب کرده است. ریز پوشانی بعنوان یکی از تازه‌ترین این شیوه‌ها، اثر قابل ملاحظه‌ای در این ارتباط داشته است (۱،۱۵). از دیدگاه میکروبیولوژی ریز پوشانی عبارت است از پوشش دادن لایه‌ای از هیدروکلوئید به دور سلول‌های ریز زنده در مقیاس میکروسکوپی و محصور کردن آنها به منظور تفکیک کردن از محیط، طوریکه بقای قابل توجهی از سلول‌ها را باعث شود (۶). در کل هدف اصلی ریز پوشانی پروبیوتیک‌ها بالا بردن مدت زمان ماندگاری پروبیوتیک‌ها در داخل محصول و ایجاد امکان انتقال آزادسازی ایمن آنها در نقاط مناسب دستگاه گوارش است که نحوه انتقال و عبور انواع مختلفی از باکتری‌های پروبیوتیک از جمله لاکتوباسیلوس کارژی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶). مطالعات مختلف دیگری نیز در ارتباط با اثر ریز پوشانی بر روی میزان ماندگاری پروبیوتیک‌ها در حین گذر از مایع معدی - روده‌ای انجام گرفته است (۴،۱۲،۱۷،۲۱). پیشرفت‌های اخیر در زمینه ریز پوشانی پروبیوتیک‌ها، هم در راستای مصارف صنعتی و هم در راستای اهداف ذکر شده می‌باشد و راهگشای بسیاری از مشکلات



جمع‌آوری شدند. همه مراحل فوق در شرایط کاملاً استریل انجام پذیرفت.

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

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

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

بررسی میزان بقای باکتری ریز پوشانی شده در شرایط مشابه مایع معدی و مایع روده ای با وبدون نمک صفراوی: برای این منظور از یک طرف ۱ گرم دانک و از طرف دیگر یکی از تیوب‌های حاوی باکتری آزاد (۱ میلی لیتر امولسیون باکتری) تحت شرایط مشابه وارد لوله‌های حاوی ۱۰ میلی لیتر مایع معدی (اسید هیدروکلریک ۰/۸ مول حاوی ۰/۲ درصد NaCl و با PH برابر ۱/۵۵ و بدون پیپسین) شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه

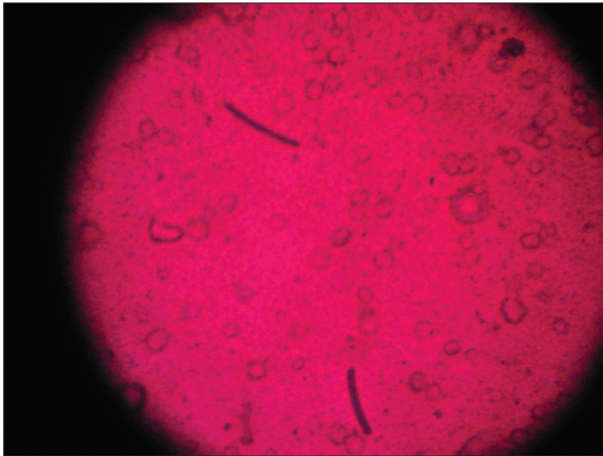
میلی لیتر از کشت حاصل، دوباره با ۹۹ میلی لیتر محیط کشت تازه (یک درصد) رقیق گردیده و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. در طول هفته، کشت مذکور سه بار به محیط کشت تازه انتقال داده شده و در پایان ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. هدف از این کار، دسترسی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

جداسازی توده سلولی (خالص‌سازی باکتری): در این مرحله، حدود ۲ میلی لیتر از محیط کشت آبگوشت MRS تهیه شده در مرحله فعال‌سازی کشت آغازگر که در یخچال نگهداری می‌شد را به حدود ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت تازه انتقال داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس از آن جهت تخلیص باکتری مورد نظر استفاده شد. برای این منظور محیط کشت مذکور کاملاً هم‌زده شد تا به حالت همگن درآید، سپس توسط سمپلر یک میلی لیتری به داخل هر کدام از ۲۰ عدد میکروتیوب یک میلی لیتری انتقال داده شد و بعد توسط دستگاه سانتریفیوژ (U.K. و BNI80HY و West Sussex و 2010 Model) و (Centrion centrifuge سانتریفیوژ شد rpm) ۱۰۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه بعد از سانتریفیوژ مایع رویی بیرون ریخته شد و رسوب باکتری ته میکروتیوب‌ها دو بار دیگر نیز توسط یک میلی لیتر از سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد سانتریفیوژ شد تا کاملاً مورد شستشو قرار گیرد (۱۹). از این امولسیون باکتریایی جهت استفاده در ریز پوشانی باکتری استفاده شد.

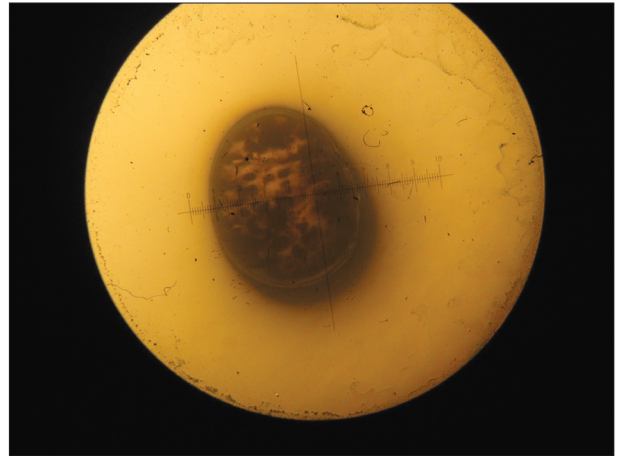
ریز پوشانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La5): بدین منظور مخلوطی از آلژینات سدیم (Sigma, USA) و نشاسته مقاوم ذرت (Hi-maiza (Merk, Daemstadt, Germany) با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد و مقدار قابل توجهی باکتری مورد نظر بعد از تخلیص از محیط کشت در داخل آب مقطر استریل تهیه شد.

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





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



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

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

گرمخانه‌گذاری ۱ میلی لیتر از آنها به داخل ۹ میلی لیتر مایع روده‌ای (فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۵ مول با PH برابر ۷/۴۳ با و بدون نمک صفراوی ۰/۶ درصد) انتقال داده شده و به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس هر کدام از محیط‌ها بوسیله پیتون واتر ۰/۱ درصد رقیق سازی شده و در محیط Salicin-agar-MRS بصورت کشت مخلوط و بمدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند، سپس جهت آنالیز آماری میزان بقای باکتری‌های آزاد و ریز پوشانی شده مورد شمارش قرار گرفتند (۱۲). برای مقایسه تعداد سلول‌های زنده باکتری مورد نظر در هر کدام از مقاطع زمانی مطرح شده از آزمون آماری تی مستقل در سطح $p < 0.05$ استفاده شد.

نتایج

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

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

بحث

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



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

۱۲۰ دقیقه	۹۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۰ دقیقه	
<1 ^۷	<1 ^۷	۴±۰/۴×۱۰ ^۷	۹±۰/۵×۱۰ ^۸	۲±۰/۱×۱۰ ^{۱۰}	باکتری های آزاد (cfu/ml)
۹±۰/۴×۱۰ ^{۸*}	۱±۰/۷×۱۰ ^{۸*}	۱±۰/۱×۱۰ ^{۹*}	۱±۰/۱×۱۰ ^{۱۰*}	۵±۰/۴×۱۰ ^{۱۰*}	باکتری های ریز پوشانی شده (cfu/ml)

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

۱۲۰ دقیقه	۹۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۰ دقیقه		
<1 ^۷	<1 ^۷	۱±۰/۴×۱۰ ^۷	۱±۰/۴×۱۰ ^۸	۳±۰/۳×۱۰ ^۹	باکتری های آزاد (cfu/ml)	با صفر
۱±۰/۴×۱۰ ^{۸*}	۴±۰/۸×۱۰ ^{۸*}	۵±۱×۱۰ ^{۸*}	۱±۰/۷×۱۰ ^{۹*}	۷±۱/۱×۱۰ ^{۹*}	باکتری ریز پوشانی شده (cfu/ml)	
۳±۰/۱×۱۰ ^۷	۱/۷±۱/۷×۱۰ ^۸	۱/۲±۱/۱×۱۰ ^۹	۴±۰/۶×۱۰ ^۹	۲±۰/۴×۱۰ ^{۱۰}	باکتری آزاد (cfu/ml)	بدون صفر
۱±۰/۱×۱۰ ^{۹*}	۱±۰/۲×۱۰ ^{۱۰*}	۵±۱×۱۰ ^{۱۰*}	۸±۰/۵×۱۰ ^{۱۰*}	۹±۰/۶×۱۰ ^{۱۰*}	باکتری ریز پوشانی شده (cfu/ml)	

آلژینات میزان بقای پروبیوتیک ها هم متناسب با آن افزایش می یابد، بدون اینکه تأثیری در آزادسازی سلول های به دام افتاده در آن داشته باشد (۱۳). و در مطالعه ای که توسط Simpson و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام گرفته است این نتیجه حاصل شد که کلرید کلسیم باعث افزایش استحکام ژل آلژینات می شود و هر چه قدر میزان Ca^{۲+} بیشتر باشد میزان ضخامت پوشینه و در نتیجه استحکام آن بیشتر می شود (۲۰).

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

Anselmi و همکاران در سال ۲۰۰۲ هم استفاده از تکنولوژی جدید در بهبود ویژگی های ریز پوشانی، با بکارگیری اثر استحکام بخشی اشعه UV، پایداری ذاتی خوب دانک ها، سم زایی پائین و توانایی مقامت بهتر و فرمولاسیون ساده و ارزان که از اهداف مهم این تکنولوژی می باشند را

گونه های مختلف بیفیدو باکتریوم ریز پوشانی شده با آلژینات کلسیم را در شیر و شرایط مشابه معدی - روده ای مورد بررسی قرار داده اند. در این مطالعه ۹ سویه از این جنس انتخاب شده بود که اثر کلی ریز پوشانی در افزایش بقای این جنس از باکتری نشان داده شد و از این نظر با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۷). همچنین Sultana و همکاران در سال ۲۰۰۰ ریز پوشانی باکتری پروبیوتیک با آلژینات - نشاسته را انجام داده و بقای این باکتری را در شرایط مشابه مایع معدی - روده ای و در داخل ماست، مورد بررسی قرار داده اند. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش بکارگیری نشاسته با آمیلوز بالا یا Hi- maize (بعنوان پری بیوتیک)، کپسول سازی باکتری زنده را در مقایسه با مورد بدون نشاسته بهبود می بخشد و بقا پذیری باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و سویه های مختلف بیفیدو باکتر کپسول دار 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 (۲۱). لازم به ذکر است که یکی از فاکتورهای مرتبط و مهم در زمینه ریز پوشانی پروبیوتیک ها با ژل آلژینات کلسیم که مورد توجه پژوهشگران نیز می باشد غلظت های آلژینات و همچنین کلسیم به کار گرفته شده در این پروسه می باشد. در این رابطه Mandal و همکاران در سال ۲۰۰۶ تأثیر غلظت های آلژینات روی بقای باکتری L.casei NCDC-298 ریز پوشانی شده را مورد بررسی قرار داده اند. در این مطالعه مقاومت غلظت های متفاوت آلژینات ۲، ۳ و ۴ درصد در pH برابر ۱/۵ و نمک های صفرای با غلظت های بالای ۲-۱ درصد و پروسه گرمایی ۵۵، ۶۰، ۶۵ درجه سانتیگراد برای ۲۰ دقیقه مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه در شرایط pH پایین قولون و در حضور املاح صفرای و پروسه گرمادهی، با افزایش غلظت



References

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

مورد بحث و بررسی قرار داده اند (۲).

بر اساس نتایج بسیار ارزشمندی که در مطالعات متعدد بدست آمده است، اینگونه نتیجه گیری می شود که ریزپوشانی پروبیوتیک ها نقش بسیار مهمی در حفاظت این ارگانیسیم ها در برابر شرایط نامساعد محیطی از جمله شرایط داخل فرآورده های تخمیری و شرایط مشابه مایع معدی - روده ای ایفا می کند و در نتیجه میزان بقای این ارگانیسیم ها در شرایط ذکر شده بهبود می بخشد.

در مجموع نتایج این تحقیق نیز نشان می دهد که ریزپوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس *La5* با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم باعث افزایش معنی داری در بقای این باکتری در شرایط مشابه مایع معدی - روده ای می شود.



- in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. Dairy. J.* 14: 505-515.
18. Shah, N.P. (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy Foods. *J. Dairy Sci.* 83: 894-907.
19. Sheu, T.Y., Marshall, R.T. (1993) Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *J. Food Sci.* 54: 557-561.
20. Simpson, N.E., Stabler, C.L., Simpson, C.P., Sambanis, A., Constantinidis, I. (2004) The role of The CaCl₂-guluronic acid interaction on alginate encapsulated β TC3 Cells. *Biomaterial.* 25: 2603-2610.
21. Sultana, K., Godward, G, Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., KailasaPathy, K. (2000) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 47-55.
22. Talwalker, A.N., Kailasapathy, K. (2003) Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *J. Dairy Tech.* 58: 36-39.



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

Mirzaei, H.¹, pourjafar, H.^{2*}, Homayouni Rad, A.³

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

²Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

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

(Received 14 September 2010 , Accepted 26 June 2011)

Abstract:

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

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

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

