مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۳، ۳۲۰-۳۱۱
Original Article
Journal of Veterinary Research. 71,3:311-320, 2016

مطالعه نقش حفاظتی دانک‌های دوپوشینه‌ای آلژینات کلسیم-کیتوزان- نانوذرات اودوراژیت S۱۰۰ حاصل از ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان فلور غالب روده انسان و حیوانات

هادی پورجعفر نگین نوری* حسن گندمی نصرآبادی افشین آخوندزاده بستی
گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۲۲ فروردین ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۳۰ خرداد ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: پروبیوتیک‌ها دارای اثرات سودمند زیادی می‌باشند و توانایی زنده‌مانی پایین آن‌ها در شرایط دشوار اسیدی صفراوی دستگاه‌گوارش و شرایط محصولات غذایی، محققین را همیشه به پیدا کردن راه‌های حل این مشکل تشویق کرده است. ریزپوشانی به عنوان یک روش کارا اثر قابل توجهی در این زمینه داشته است. **هدف:** این مطالعه با هدف بررسی نقش حفاظتی دانک‌های دوپوشینه‌ای آلژینات کلسیم- کیتوزان- نانوذرات اودوراژیت S۱۰۰ حاصل از ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بعنوان فلور غالب روده انسان و حیوانات انجام گرفت. **روش کار:** پس از فعال‌سازی باکتری استارتر ل. اسیدوفیلوس در محیط MRS broth، برای خالص‌سازی باکتری از سانتریفیوژ (سرعت ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰min) استفاده شد. ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک به روش اکستروژن انجام گرفت. بررسی استحکام دانک‌ها در طول h ۱۲ و بررسی میزان زنده‌مانی باکتری‌ها در طول min ۱۲۰ در درون اسیدهیدروکلریک، بافرفسفات و محلول پودر دایجستیو در دو حالت با و بدون تنش مکانیکی انجام گرفت. جهت کشت از محیط MRS-Salicin-agar و روش کشت سطحی و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. داده‌ها بوسیله آزمون t-test مستقل مورد آنالیز قرار گرفتند. **نتایج:** شکل و اندازه دانک‌ها بوسیله میکروسکوپ نوری نشان داده شد. نتایج نشان دادند که میزان زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی-شده در شرایط فوق در دو حالت با و بدون تنش مکانیکی بطور معنی‌داری بیشتر از باکتری‌های آزاد می‌باشد ($p<۰/۰۵$). **نتیجه‌گیری نهایی:** ریزپوشانی با آلژینات کلسیم-کیتوزان-اودوراژیت S۱۰۰ نقش مهمی در ارتقای میزان زنده‌مانی پروبیوتیک ل. اسیدوفیلوس ایفا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: اودوراژیت S۱۰۰، آلژینات کلسیم، کیتوزان، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، ریزپوشانی

مقدمه

مفهوم پروبیوتیک برای اولین بار در قرن بیستم توسط الی مچنیکف روسی ارائه و معروف شد. پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که وقتی وارد دستگاه گوارش می‌شوند در یک شمار معینی یک یا چند اثر سلامت‌بخش روی میزبان می‌گذارند (۶،۱۳). از جمله این اثرات سلامت‌بخش می‌توان به تقویت سیستم ایمنی بدن و بالا بردن مقاومت در برابر عفونت‌ها، خواص ضدسرطانی و کاهش کلسترول خون و غیره اشاره کرد (۱۳،۳۰،۳۴،۳۵). همچنین پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزین مفید و مناسب آنتی بیوتیک‌ها برای مبارزه با پاتوژن‌ها در انسان و حیوانات معرفی می‌شوند (۲۹). بالا رفتن روز افزون هزینه‌های درمان و سلامتی و همچنین افزایش استقبال مردم برای داشتن زندگی سالم و با انرژی، زمینه ساز مطالعه و تولید فرآورده‌های غذایی فرآویژه به خصوص غذاهای پروبیوتیکی بوده است. برای اینکه میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بتوانند ویژگی‌های عملکردی و سلامت بخش خود را در بدن نشان دهند، بایستی به شکل زنده و فعال در داخل غذا تا زمان مصرف باقی مانده و نهایتا در داخل بدن انسان هم تا رسیدن به ارگان هدف که عمدتا قولون می‌باشد به تعداد مناسب و معینی ($۱۰^۷$ cfu/g یا بیشتر) حفظ شوند (۶،۷،۳۴). توانایی زیستی کم پروبیوتیک‌ها در شرایط سخت محصولات غذایی و به ویژه شرایط اسیدی و قلیایی لوله گوارشی، محققین را به پیدا کردن راه‌های بهبود این شاخص تشویق کرده است. ریزپوشانی به عنوان یکی از تازه‌ترین این روش‌ها، اثر قابل توجهی در این رابطه داشته است (۱،۲،۱۶،۳۳،۳۷). باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان فلور غالب روده انسان و حیوانات می‌باشد و در درون محصولات تخمیری معمول نیز یافت می‌شود و یکی از مهمترین و پرمصرف‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک معرفی شده است (۱۰،۲۲،۳۱). در نتیجه ارزیابی و ارتقای میزان زنده‌مانی این باکتری با استفاده از ریزپوشانی مناسب و قوی در درون فرآورده‌های غذایی و ایجاد امکان انتقال و رهاسازی مناسب آن در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش به خصوص قولون از اهمیت به خصوصی برخوردار می‌باشد و این موضوع در مطالعات متعددی مورد پژوهش قرار گرفته است (۲۲،۲۵،۳۲،۳۵).

در سال‌های اخیر مطالعات متعددی در زمینه ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با استفاده از مواد مختلف (از قبیل آلژینات، نشاسته، زانتان- ژلان، کاراگینان، کیتوزان، ژلاتین و غیره) و روش‌های مختلف (روزن‌رانی و امولسیون) انجام گرفته است که نتایج اکثر به اتفاق آن‌ها نشان‌دهنده نقش مؤثر ریزپوشانی در بالا بردن میزان زنده‌مانی این ریززنده‌ها در شرایط نامساعد داخل محصولات مختلف و شرایط معدی روده‌ای می‌باشند

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۶۷ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: nnoori@ut.ac.ir

(۴،۵،۸،۲۶،۲۷،۴۲،۴۴).

آلژینات یک هتروپلی‌ساکارید خطی است که از D- مانورونیک اسید و L- گلورونیک اسید تشکیل شده و از جلبک‌های مختلف بدست می‌آید. از مهمترین مزایای این ماده که آن را بر دیگر مواد جهت ریزپوشانی ارجحیت می‌دهد می‌توان به غیرسمی بودن آن بر روی باکتری و سلول‌های بدن مصرف کننده، شناخته شدنش به عنوان افزودنی مجاز، سهولت استفاده آن و ارزان بودنش اشاره کرد. از معایب آن نیز می‌توان به حساسیت و از هم پاشیدگی در شرایط اسیدی، از هم پاشیدگی در حضور یون‌های تک ظرفیتی به دلیل رقابت با یون کلسیم، انتشار سریع رطوبت و سایر سیالات از آن اشاره کرد که این نقایص آلژینات را می‌توان با ایجاد یک پوشینه مقاوم روی آن و یا مخلوط کردن سایر مواد در ساختمان شیمیایی آن برطرف کرد (۵،۱۴،۴۱،۴۵). از مواد پوشینه ساز مهم می‌توان نشاسته معمولی، نشاسته مقاوم، کیتوزان و کاراگینان را نام برد که در مطالعات متعددی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۹،۲۰،۳۹،۴۰،۴۵). کیتوزان پلی‌ساکارید خطی و با بار مثبت می‌باشد که از کیتین بدست می‌آید و به عنوان پوشینه جهت مستحکم‌تر کردن ریزپوشانی، روی سایر ریزپوشاننده‌های با بار منفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده همانند آلژینات ارزان و بی ضرر بوده و شبکه ژلی خوبی را ایجاد می‌کند اما در شرایط اسیدی استحکام خوبی ندارد (۱۱،۱۵،۱۸،۲۰،۳۹،۴۵).

علاوه بر حفاظت مناسب باکتری‌های پروبیوتیک از عوامل نامساعد محیطی، چیزی که در این میان مهم بوده و در اکثر مطالعات به آن توجه کمی شده است، آزادسازی هدفمند و قوی باکتری‌های پروبیوتیک در ارگان‌های مختلف به ویژه در داخل قولون می‌باشد تا بتوان تمام و یا اکثریت بار پروبیوتیکی مورد نظر را با یک استراتژی مطمئن دقیقا در داخل قولون که جایگاه اصلی و عملکردی این باکتری‌هاست رهاسازی کرد. اودوراژیت (Eudragit) یک کوپلیمر بر پایه مت آکریلیک اسید و متیل متآکریلات (با نسبت ۱:۲) می‌باشد. این ماده غیرمحلول در اسیدها و آب خالص است، در حالیکه در محلول با pH برابر ۷ یا بالاتر حل می‌شود. این ماده باعث آزادسازی دارو در محل قولون می‌شود. از این ماده می‌توان به عنوان پوشینه دوم یا ثانویه هم برای مستحکم کردن ریزپوشانی و هم آزادسازی هدفمند پروبیوتیک‌ها و یا مواد دارویی در قولون (هدف اصلی) که جایگاه اصلی و عملکردی آن‌ها است استفاده نمود که این اثر در مطالعات مختلفی مثل مطالعه Badhana و همکاران در سال ۲۰۱۳، Khaleghi در سال ۲۰۱۲ و همچنین Hu و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده شده است (۳،۹،۱۲). هدف از مطالعه حاضر تعیین نقش حفاظتی دانک‌های دوپوشینه‌ای آلژینات کلسیم-کیتوزان- نانوذرات اودوراژیت حاصل از ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس \سیدوفیلوس به عنوان فلور غالب روده انسان و حیوانات می‌باشد.

روش کار

فعال سازی باکتری پروبیوتیک: باکتری لیوفیلیزه لاکتوباسیلوس \سیدوفیلوس (ATCC ۴۳۵۶): ۱۶۴۳ از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. سپس بسته لیوفلیزه در شرایط استریل باز و طبق دستورالعمل موجود در بسته به محیط MRS broth (QUELAB, Canada) منتقل و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴h گرمخانه‌گذاری شد تا آغازگر با جذب آب از حالت کمون خارج شده و وارد مرحله رشد لگاریتمی شود (۸،۲۳).

خالص سازی توده باکتری: در این مطالعه محیط کشت مرحله قبل کاملاً هم زده شد و بعد از انتقال به درون لوله‌های ۳۰ml بوسیله دستگاه سانتریفیوژ (R, Germany ۵۸۱۰ eppendorf, Centrifuge) با سرعت ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰min سانتریفیوژ شد. از این رسوب باکتریایی جهت تلقیح مستقیم باکتری‌ها به مایع اسیدی، خنثی و قلیایی و نیز جهت استفاده در فرآیند ریزپوشانی استفاده گردید (۸،۲۳).

تهیه محلول نانوذرات اودوراژیت S۱۰۰: برای تبدیل پودر اودوراژیت (Darmstadt, Germany ,۶۴۲۷۵-Evonik, D) به نانوذرات اودوراژیت از روش SAS (Supercritical Antisolvent Technique) استفاده گردید. در این روش برای تولید نانوذرات اودوراژیت S۱۰۰، ابتدا پودر اودوراژیت S۱۰۰ موجود را که به طور آماده خریداری شده بود را به میزان mg/ml^{-1} ۴ در داخل حلال استون (Scharlau Chemie S.A, Spain) اضافه کردیم. سپس محلول حاصل را به وسیله سرنگ به آرامی به داخل سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۱ml امولسی فایر توییـن ۸۰ (Merk, Hohenbrunn, Germany) که در زیر دستگاه هوموژنیزاتور (Wisetise, DAIHAN Scientific Co., Ltd, Korea) با سرعت ۲۳۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ min قرار گرفته بود، تزریق کردیم. سپس محلول حاصل را در طول شب در دمای ۳۷ °C قرار دادیم تا فاز حلال(استون) تبخیر و از مایع جدا شود. برای بررسی اندازه نانوذرات تولید شده از دستگاه Laser Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, USA) استفاده شد (۹).

ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک و پوشینه‌سازی اولیه و ثانویه دانک‌های حاصل: در این مطالعه، ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با روش اکستروژن و با آلژینات کلسیم-کیتوزان و نانوذرات اودوراژیت S۱۰۰ انجام گرفت. ابتدا ۴g آلژینات سدیم (Sigma, USA) به ۱۰۰ml(۴٪) آب مقطر اضافه 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. بعد لوله‌های حاوی امولسیون باکتریایی تهیه شده در مرحله قبل داخل آلژینات تخلیه و حدود ۱ml توییـن ۸۰ نیز به آن اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل جهت تشکیل دانک‌ها به روش اکستروژن و

با اســتفاده از سرنگ انسولین (با قطر ۰/۲ mm) وارد محلول کلریدکلسیم ۰/۱ mol (Merk, Darmstadt, Germany)گردید و در مدت کوتاهی در اثر تماس آلژینات با یون‌های کلســیم، دیواره کپسول از جنس آلژینات کلســیم تشــکیل و قطرات به صــورت دانک‌هایی در قســمت ته محلول کلریدکلسیم رسوب کردند. دانک‌ها در داخل محلول کلریدکلسیم به مدت ۳۰min نگهداری و ســپس محلول کلریدکلســیم زهکشی و جدا گردید. سپس برای ایجاد پوشینه روی لایه اول، دانک‌ها به داخل محلول استریل ۰/۸٪ کیتوزان (Sigma, USA) که قبلا به آن محلول ۰/۱٪ اسید استیک (Merk, Darmstadt, Germany) اضافــه و pH آن در ۵/۸ تنظیــم شــده بود انتقال داده شــد. بعد از h ۱ ســاعت دانک‌ها جمع‌آوری و سپس جهت تشکیل پوشینه ثانویه روی غلاف کیتوزان، دانک‌ها به داخل محلول نانوذرات اودوراژیت منتقل شــدند. در نهایت دانک‌های پوشینه‌دار حاصل جمع‌آوری و تا انجام مراحل بعدی نگهداری شدند. تمام مراحل فوق تحت شرایط استریل انجام گرفت (۹،۱۱،۱۸،۲۰،۲۸،۳۹،۴۵).

بررسی و ارزیابی دانک‌ها: شکل و اندازه تقریبی دانک‌های تولید شده و نحوه جای گیری باکتری مورد نظر در داخل دانک‌ها توسط میکروسکوپ نــوری (T. Japan-YS۲ ۲-Nikon- Model Alphaphot) و رنــگ آمیــزی گرم دانک‌هــای برش داده شــده مورد ارزیابی قــرار گرفت. برای ایجاد برش در دانک‌ها، چند دانک بزرگتر انتخاب و روی لام به وسیله تیغ میکرومتر از وسط برش داده شد و سپس روی سطح برش رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت تا باکتری‌ها در زیر میکروسکوپ تشخیص داده شوند (۲۳،۳۱).

رهاسازی باکتری‌ها از داخل دانک‌ها: جهت بررسی میزان بقای باکتری ریزپوشانی شده، ۱g از دانک همراه با ۹ml بافر فسفات ۰/۱mol و با pH برابر ۷ در داخل کیسه استومکر ریخته شده و به مدت h ۳ در داخل دستگاه اســتومکر (netech-laboratory, Bag Tech®) هم زده شد تا پوشینه و دیواره دانک‌ها تخریب و کاملاً حل گردد. سپس رقت‌های لازم با پپتون واتــر ۰/۱٪ (QUELAB, Canada) تهیه و در محیط کشــت اختصاصی لاکتوباسـیلوس \سـیدوفیلوس MRS-Salicin-agar (MRS agar; QUELAB, Canada and Salicin; Sigma, USA) در دمــای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شدند (۲۳،۳۱،۳۶).

ارزیابی اســتحکام دانک‌ها: برای بررسی استحکام دانک‌ها، به میزان ۱g دانک تولید و در هر مرحله تحت تأثیر موارد زیر (الف، ب و ج) با و بدون تنــش مکانیکی در دمای ۳۷°C قرار گرفت و اســتحکام دانک‌ها و میزان زنده‌مانی باکتری‌های حاوی آن برحسب زمان از حداقل ۳۰min تا حداکثر ۱۲h مطالعه شد (برای هر آزمایش تنش مکانیکی روی دستگاه‌هات پلیت (staufen, KG, Germany ۷۹۲۱۹ IKA Labortechnik, Model) به وسیله مگنت و با دور ۵۰۰ rpm در دمای ۳۷°C انجام شد):

الف) ۹ ml محلول اسیدهیدروکلریک (pH=۲)،

ب) ۹ ml محلول بافر فسفات ۰/mol۱ (pH=۷)،

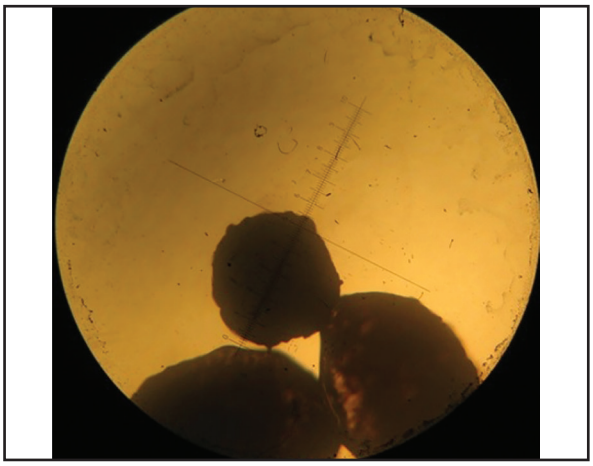
ج) ۹ ml آب مقطر حاوی پودر دایجســتیو (شامل ۴۵۰۰ واحدآمیلاز، ۶۰۰۰ واحدلیپــاز، ۵۰ml همــی ســلولز، ۲۵ml عصــاره صفــراوی گاو و pH=۸/۳۵).

در این آزمایش زمانیکه دانک متلاشــی می‌شــد ۱ml از محلولی که دانک در آن تخریب و حل شده بود به محیط کشت MRS broth منتقل و ۱۸ ســاعت گرمخانه‌گذاری شد تا به زنده بودن باکتری‌های آزاد شده به محیــط پی ببریم، و زمانیکــه دانک‌ها در طول حداکثر زمان در نظر گرفته شــده (۱۲h) تخریب نشده و ســالم باقی ماندند، ابتدا باکتری‌ها از دانک‌ها آزاد و ســپس مانند مرحله قبل به محیط کشــت MRS broth منتقل و ۱۸ ســاعت گرمخانه‌گذاری شــدند تا زنده بودن باکتریهای درون دانک‌ها مشخص شود (۳۱).

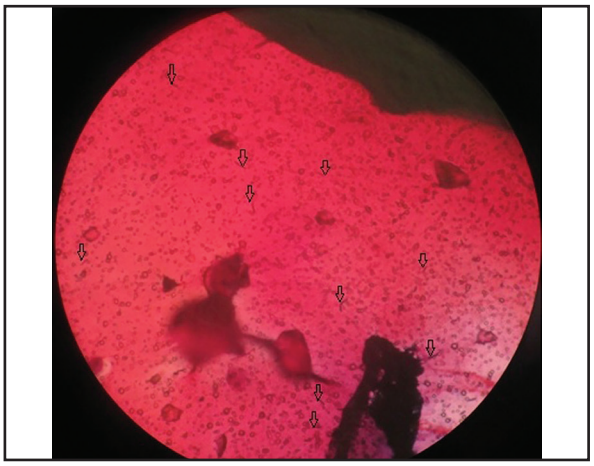
بررســی میزان زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی‌شــده تحت شرایط محلول اســید هیدروکلریک، محلول بافر فســفات و محلــول حاوی پودر دایجســتیو، با و بدون تنش مکانیکی: برای رســیدن به این هدف از یک ســو g ۱ از باکتری‌های ریزپوشانی‌شده به صورت دانک دوپوشینه‌ای و از ســوی دیگر ml ۱ باکتری آزاد (از رســوب باکتری که با ســرم فیزیولوژی بصورت امولســیون درآمده) در شــرایط کاملاً یکســان به ترتیب به داخل ۱۰ml محلول اسید هیدروکلریک با pH=۲، ۱۰ ml محلول بافر فسفات ۰/۱mol با pH=۷ و ۱۰ ml محلول حاوی پودر دایجســتیو (شامل ۴۵۰۰ واحدآمیلاز، ۶۰۰۰ واحدلیپاز، ۵۰ ml همی سلولز، ۲۵ ml عصاره صفراوی گاو و pH=۸/۳۵) که قبلاً در اتوکلاو (۱۲۱°C بمدت ۱۵ min) استریل شده بود افزوده شــدند و در دمــای ۳۷°C در دو حالت با و بدون تنش مکانیکی گرمخانه‌گذاری شدند. سپس به منظور بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های ریزپوشانی‌شــده در زمان‌های صفــر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه، هر کدام از محیط‌ها بوسیله پپتون واتر ۰/۱٪ رقیق‌سازی شده و در محیط اختصاصی MRS-Salicin-agar برای لاکتوباسیلوس \سیدوفیلوس بصورت کشت ســطحی و بمدت ۴۸ ســاعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شدند (۳۱). برای مقایسه میزان زنده‌مانی باکتری‌های زنده در هر برهه زمانی از آزمون تی مستقل در سطح α= ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج

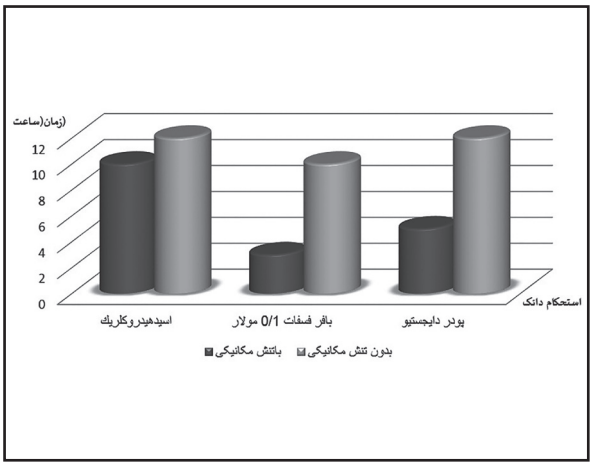
برای بررســی اندازه نانوذرات اودوراژیت تولید شــده به روش SAS از دســتگاه Laser Particle size analyzer استفاده شد و اندازه متوسط ذرات ۱۰۰ nm بدست آمد. اندازه متوسط و شکل دانک‌های تولید شده با اســتفاده از میکروسکوپ نوری در تصویر ۱ نشــان داده شده است. در کل شــکل دانک‌ها کروی تا بیضی شکل بود و اندازه متوسط آن‌ها، به صورت میانگیــن حاصل از اندازه ۴۰ دانک متفــاوت که بصورت تصادفی انتخاب شــده بودند بدســت آمد که در حدود ۲۰۰-۸۰ µm بود (تصویر۱). پراکنش باکتری‌های پروبیوتیک در درون ماتریکس آلژینات در تصویر ۲ مشــاهده



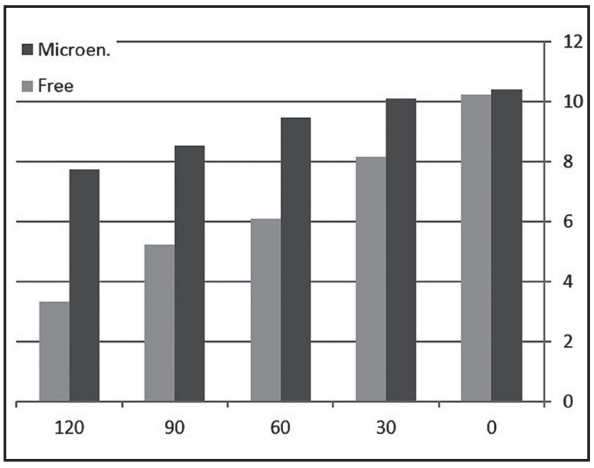
تصویر۱. عکس میکروسکوپ نوری از دانک‌های دوپوشینه‌ای با بزرگنمایی ۱۰× (قطر دانک: ۲۰۰-۸۰ µm).



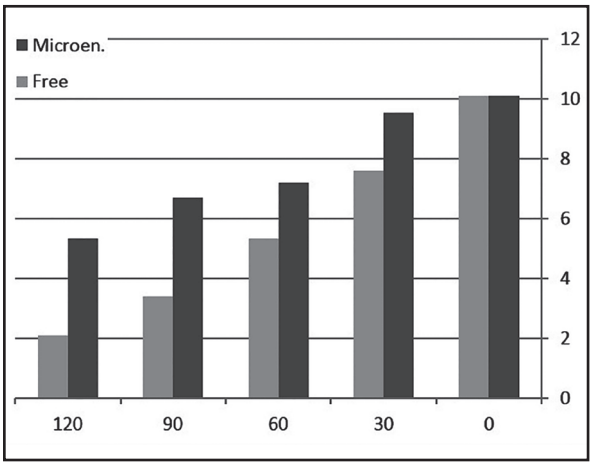
تصویر۲. نمای داخلی دانک‌ها، و پراکنش باکتری‌ها در داخل دانک‌ها با بزرگنمایی۴۰×.



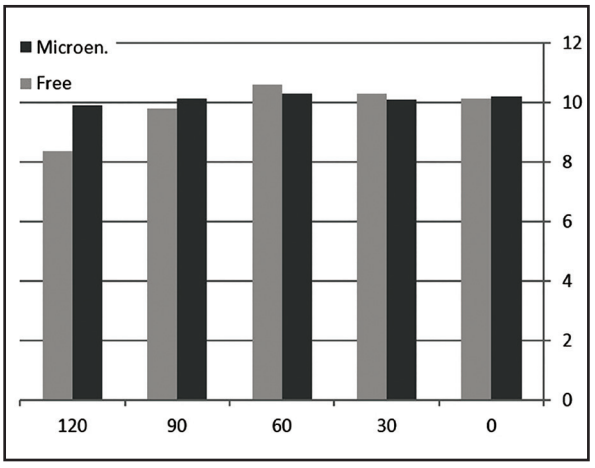
نمودار۱. میزان استحکام دانک در داخل اسیدهیدروکلریک، بافرفسفات و محلول پودر دایجستیو با و بدون تنش مکانیکی.



نمودار ۲. زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در اسیدهیدروکلریک بدون تنش مکانیکی (محور افقی: زمان -دقیقه؛ محور عمودی: Log تعداد باکتری‌های زنده- cfu/g).

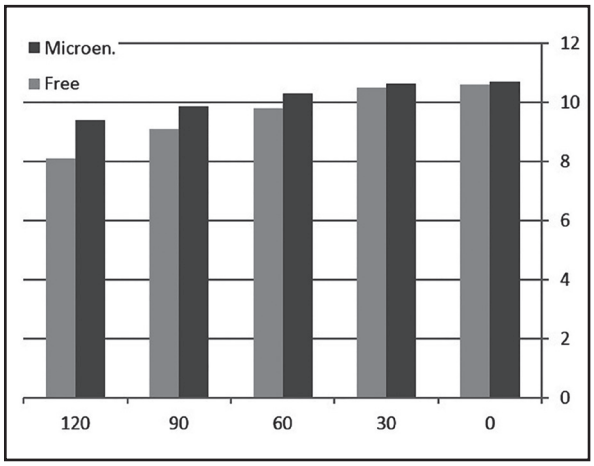


نمودار ۳. زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در محلول اسیدهیدروکلریک با تنش مکانیکی (محور افقی: زمان -دقیقه؛ محور عمودی: Log تعداد باکتری‌های زنده- cfu/g).

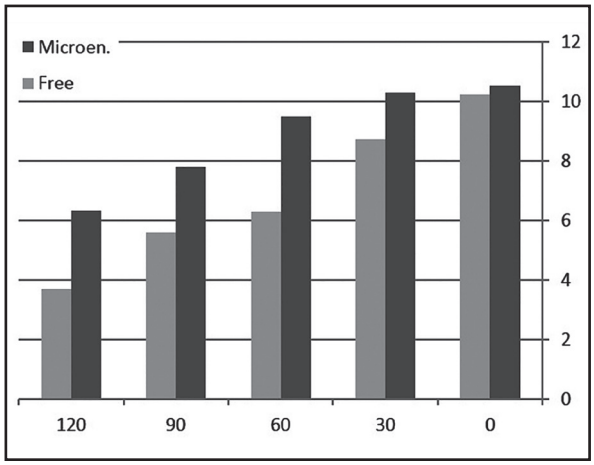


نمودار ۴. زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در محلول بافرفسفات بدون تنش مکانیکی (محور افقی: زمان -دقیقه؛ محور عمودی: Log تعداد باکتری‌های زنده- cfu/g).

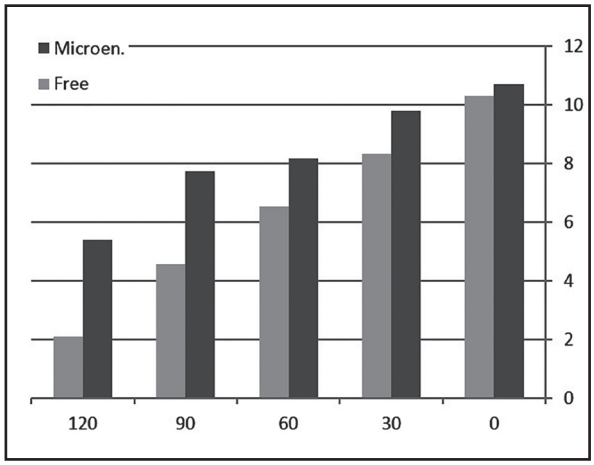
در بررسی استحکام دانک‌ها در درون محلول اسید هیدروکلریک (نمودار۱)؛ ساختمان دانک، بدون تنش مکانیکی تا ۱۲ ساعت سالم باقی ماند و باکتری‌های داخل آن پس از آزادسازی و منتقل شدن به محیط می‌شود.



نمودار ۵. زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در محلول بافرفسفات با تنش مکانیکی (محور افقی: زمان -دقیقه؛ محور عمودی: Log تعداد باکتری‌های زنده- cfu/g).



نمودار ۶. زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در محلول دایجستیو بدون تنش مکانیکی (محور افقی: زمان -دقیقه؛ محور عمودی: Log تعداد باکتری‌های زنده- cfu/g).



نمودار ۷. زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در محلول دایجستیو با تنش مکانیکی (محور افقی: زمان -دقیقه؛ محور عمودی: Log تعداد باکتری‌های زنده- cfu/g).

کشت توانایی رشد را داشتند، و با تنش مکانیکی ساختمان دانک بعد از ۱۰ ساعت متلاشی و بلافاصله بعد از آن باکتری‌ها توانایی رشد در محیط کشت را داشتند.

در بررسی استحکام دانک‌ها در درون محلول بافر فسفات (نمودار۱)؛ ساختمان دانک، بدون تنش مکانیکی تا ۱۰ ساعت حفظ و باکتری‌های داخل آن پس از آزادسازی و منتقل شدن به محیط کشت توانایی رشد را داشتند، و با تنش مکانیکی ساختمان دانک بعد از ۳ ساعت متلاشی و بلافاصله بعد از آن باکتری‌ها توانایی رشد در محیط کشت را داشتند.

در بررسی استحکام دانک‌ها در درون محلول پودر دایجستیو (نمودار۱)؛ ساختمان دانک، بدون تنش مکانیکی تا ۱۲ ساعت حفظ و باکتری‌های داخل آن پس از آزادسازی و منتقل شدن به محیط کشت توانایی رشد را داشتند، و با تنش مکانیکی ساختمان دانک بعد ۵ ساعت متلاشی و بلافاصله بعد از آن باکتری‌ها توانایی رشد در محیط کشت را داشتند.

میزان زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی‌شده لاکتوباسیلوس \سیدوفیلوس پس از گرمخانه‌گذاری در محلول اسید هیدروکلریک، محلول بافر فسفات و محلول حاوی پودر دایجستیو در طی ۲ ساعت در دمای ۳۷°C با و بدون تنش مکانیکی به ترتیب در نمودارهای ۲ تا ۷ نشان داده شده است. برای مقایسه میزان زنده‌مانی باکتری‌های زنده در هر برهه زمانی از آزمون تی مستقل در سطح $\alpha=$ ۰/۰۵ استفاده گردید. در تمام شرایط موجود، شمار باکتری‌های ریزپوشانی‌شده به طور معنی‌داری بیشتر از باکتری‌های آزاد بود ($p<$۰/۰۵). همچنین شمار باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی‌شده در شرایط بدون تنش مکانیکی بطور معنی‌داری بیشتر از تعداد این باکتری‌ها در شرایط با تنش مکانیکی بود ($p<$۰/۰۵).

بحث

با توجه به پژوهش‌های گسترده‌ای که در رابطه با میزان زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس \سیدوفیلوس صورت گرفته‌اند می‌توان به اهمیت بالای این باکتری به عنوان فلور طبیعی و غالب لوله گوارشی انسان و نیز بعنوان یک پروبیوتیک پرمصرف در درون اغلب محصولات غذایی تخمیری پی برد. همانطور که ذکر شد، ریزپوشانی یکی از نوین‌ترین شیوه‌های ارتقای میزان بقای باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شود. در پژوهش حاضر، خصوصیات ریخت‌شناسی و استحکامی دانک‌های دوپوشینه‌ای حاصل از ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس \سیدوفیلوس با استفاده از آلژینات کلسیم-کیتوزان-اودوراژیت و روش اکستروژن نشان داده شد. در پژوهش-های متعددی، خصوصیات ریخت شناسی دانک‌های حاصل از ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با به کارگیری مواد و روش‌های مختلف و با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۴،۳۱،۳۲،۳۵). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان دادند که میزان استحکام دانک‌ها، در شرایط محیطی مختلف متفاوت بوده و تنش فیزیکی نقش پراهمیتی در آن دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که کلرید کلسیم سبب بالا رفتن استحکام ژل آلژینات می‌شود و هر چه قدر میزان Ca^{+2}

بیشتر باشد میزان ضخامت پوشینه و در نتیجه استحکام آن بیشتر می‌شود (۱،۱۴،۱۵،۱۸،۲۱). Krasakoopt و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثرات مواد پوشینه‌ساز بر روی ویژگی‌های استحکامی و حفاظتی دانک‌های آلژینات و میزان زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده را مورد ارزیابی قرار دادند، در این پژوهش میزان بقای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۵۴۷ و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس کازئی ۰۱ در درون دانک‌های آلژینات کلسیم فاقد پوشش و در مقابل با دانک‌های پوشش‌دار با سه ماده کیتوزان، آلژینات سدیم و پلی- ال- لیزین مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان دادند که با تشکیل پوشینه ضخامت دیواره دانک‌ها افزایش یافت و دانک‌های آلژینات با پوشینه کیتوزان بهترین حفاظت را برای باکتری‌های ل. اسیدوفیلوس و ل. کازئی فراهم کرد (۱۴).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان دادند که ریزپوشانی و پوشینه سازی با آلژینات کلسیم- کیتوزان -اودوراژیت نقش مؤثری در حفاظت از باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تحت شرایط محلول اسید هیدروکلریک، محلول بافر فسفات و محلول حاوی پودر دایجستیو با و بدون تنش مکانیکی ایفا می‌کند و میزان بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده در تمام شرایط، بطور معنی‌داری بالاتر از باکتری‌های آزاد بود. این به این معنی است که ریزپوشانی باکتری به صورت حایلی اثرات نامساعد محیطی را روی باکتری کاهش داده و سبب افزایش میزان زنده‌مانی آن‌ها می‌گردد. Pourjafar و همکاران در سال ۲۰۱۱ ویژگی‌های ریخت‌شناسی و حفاظتی دانک‌های حاصل از ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را با استفاده از آلژینات کلسیم- نشاسته مقاوم را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه؛ در محیط HCl، دانک‌ها تحت شرایط بدون تنش مکانیکی بعد از ۱۲ ساعت و با تنش مکانیکی بعد از ۳ ساعت متلاشی شدند، و در محیط بافرفسفات، دانک‌ها تحت شرایط بدون تنش بعد از ۱۲ ساعت و با تنش بعد از ۱ ساعت متلاشی شدند، و نهایتاً در محیط محلول پودر دایجستیو دانک‌ها در شرایط بدون تنش بعد از ۱۰ ساعت و با تنش بعد از ۳۰min رهاسازی کامل را انجام دادند. این نتایج بدست آمده و همچنین نتایج مربوط به بررسی میزان زنده‌مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مطالعه مذکور با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارند (۳۱). این محققین در سال ۲۰۱۰ تأثیر ریزپوشانی با آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم بر میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تحت شرایط مشابه مایع معدی-روده‌ای را مورد بررسی قرار داده و نقش حفاظتی ریزپوشانی در بقای باکتری‌ها در شرایط دشوار معدی-روده‌ای را نشان دادند (۲۲). همچنین نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های Krasaekoopt و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز همخوانی دارد (۱۴).

Badhana و همکاران در سال ۲۰۱۳ داروی mesalamine را با استفاده از کیتوزان- اودوراژیت S۱۰۰ ریزپوشانی کرده و رهاسازی هدفمند داروی مورد نظر در ناحیه قولون و نقش حفاظتی ریزپوشانی در معده و روده کوچک را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دادند که رهاسازی دارو از دانک‌های کیتوزان- ادوراژیت وابسته به pH می‌باشد. نشان داده شد که دانک‌های کیتوزان پوشیده شده با اودوراژیت S۱۰۰ رهاسازی در شرایط مشابه مایع معدی نداشت، به میزان ناچیزی رهاسازی در شرایط مشابه مایع روده‌ای داشت و بیشترین رهاسازی در محیط قولون انجام گرفت (۳). همچنین Khaleghi در سال ۲۰۱۲، با نانوکپسولاسیون داروی Silibin با استفاده از Eudragit RL، رهاسازی هدفمند در ناحیه قولون را نشان داد (۱۲).

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه و مطالعات مشابه انجام گرفته این مطلب روشن است که ریزپوشانی با آلژینات کلسیم و سپس استفاده از موادی مثل کیتوزان برای پوشینه سازی آن می‌تواند استحکام نسبتاً مناسبی را برای حفاظت از محتویات داخلی دانک‌ها (باکتری‌های پروبیوتیک، داروها، ترکیبات ضدمیکروبی مختلف، اسانس‌ها و غیره) می‌باشند فراهم آورد (۱۸،۱۹،۲۰،۲۱،۳۹). همچنین می‌توان با استفاده از مواد ویژه‌ای مثل اودوراژیت (انواع مختلف اودوراژیت) علاوه بر افزایش و بهبود اثر حفاظتی بر روی محتویات درون دانک، رهاسازی هدفمند این محتویات را در منطقه خاصی از بدن و لوله گوارشی فراهم آورد (۱۷،۲۴،۴۳). در این مطالعه، مکانیسم نقش حفاظتی دانک‌ها چنین است که با ایجاد دیواره آلژینات‌کلسیم یک حائل اولیه ضعیف، بین باکتری‌های درون دانک و محیط نامساعد بیرونی ایجاد می‌شود که برای افزایش استحکام این لایه اولیه، یک پوشینه بیرونی از جنس کیتوزان روی این حائل کشیده می‌شود. با در نظر گرفتن اینکه کیتوزان در شرایط اسیدی و pHهای پایین حل شده و کم‌کم از روی دیواره آلژینات-کلسیم ریزش می‌نماید لذا برای جلوگیری از این حالت و بهبود هرچه بیشتر استحکام لایه کیتوزان کاتیونی، یک پوشینه ثانویه از نانوذرات اودوراژیت آنیونی (با ایجاد پیوند الکترواستاتیک بین بارهای مثبت و منفی) به دور این لایه کشیده می‌شود که بدون افزایش محسوس اندازه دانک‌ها نسبت به شرایط اسیدی مقاوم بوده ولی در pH مشابه قولون باعث آزادسازی هدفمند محتویات دانک‌ها می-شود. همانطور که در این تحقیق نشان داده شد، نانوذرات EU S۱۰۰ با ایجاد یک پوشینه ثانویه نازک بر روی پوشینه کیتوزان، در مقایسه با سلول‌های آزاد، باعث حفاظت بهینه باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط نامساعد شده و شمار مناسب و قابل قبولی از این باکتری‌ها را در داخل دانک‌ها حفظ نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که از کارشناسان آزمایشگاه بهداشت و کنترل موادغذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران خانم‌ها مهندس قدمی و مهندس طیار و همچنین دانشجوی دکترای قارچ‌شناسی دانشگاه تهران دکتر حسن قربانی به خاطر همکاری در انجام آزمایشات تشکر و قدرانی نمایند.

References

1. 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.
2. Arpita, D., Sohini, R., Utpal, R., Runu, C. (2014) Microencapsulation of probiotic bacteria and its potential application in food technology. Int J Agric Environ Biotechnol. 7: 47-53.
3. Badhana, S., Garud, N., Garud, A. (2013) Colon specific drug delivery of mesalamine using eudragit S100-coated chitosan microspheres for the treatment of ulcerative colitis. Int Curr Pharm J. 2: 42-48.
4. Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C., Marzo, F., Villarán, M. (2010) Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. Int J Food Microbiol. 142: 185-189.
5. 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. Int J Pharm. 210: 51-59.
6. Drisko, J.A., Giles, C.G., Bischoff, B.J. (2003) Probiotics in health maintenance and disease prevention. Alter Med Rev. 8: 143-215.
7. Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., Lopez, M.C., Bernhardt, D., Blasco, R., Pedroza-lslas, R., Hermida, L.G. (2013) Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. Food Res Int. 52: 473-482.
8. 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.
9. Hu, D., Liu, L., Chen, W., Li, S., Zhao, Y. (2012) A novel preparation method for 5-Aminosalicylic acid loaded Eudragit S100 nanoparticles. Int J Mol Sci. 13: 6454-6468.
10. Kailasapathy, K., Harmstorf, I., Phillips, M. (2008) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacterium animalis ssp. Lactis in stirred fruit yogurts. LWT-Food Sci Technol. 41: 1317-1322.
11. Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., Arul, V. (2011) Cryopreservation and microencapsulation of a probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. Biotechnol Bioprocess Eng. 16: 1106-1114.
12. Khaleghi, N. (2012) Nanoencapsulation of silibin with Eudragit RL for colon targeted delivery. Res Pharm Sci. 7: 222.
13. Klaenhammer, T.R. (2001) Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. (2nd ed.) ASM press. Washington D.C, USA.
14. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004) The influence of coating materials on some properties of alginate beeds and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. Int Dairy J. 14: 737-743.
15. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2005) Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. LWT-Food Sci Technol. 14: 315-324.
16. Kristo, E., Bilianderis, C.G., Tzanetakis, N. (2003) Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of Lactobacillus paracasei. Int Dairy J. 13: 517-528.
17. Lam, P.L., Gambari, R. (2014) Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. J Control Release. 178: 25-45.
18. Lee, J.S., Cha, D.S., Park, H.J. (2004) Survival of freeze-dried Lactobacillus bulgaricus KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. J Agric Food Chem. 52: 7300-7305.
19. Li, P., Dai, Y.N., Zhang, J.P., Wang, A.Q., Wei, Q. (2008) Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for Nifedipine. Int J Biomed Sci. 4: 221-228.
20. Liserre, A.M., Ines Ré, M., Franco, B.D.G.M. (2007) Microencapsulation of Bifidobacterium animalis subsp. Lactis in Modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. Food Biotech-

nol. 21: 1-16.
21. Madziva, H., Kailasapathy, K., Phillips, M. (2006) Evaluation of alginate-pectin capsules in cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. Food Sci Technol-Lebenson Wiss Technol. 39: 146-151.
22. Mirzaei, H., pourjafar, H., Homayouni, A. (2011) The effect of microencapsulation with calcium alginate and resistant starch on the *Lactobacillus acidophilus* (LA5) survival rate in simulated gastrointestinal juice conditions. J Vet Res. 66: 337-342.
23. Mirzaei, H., Pourjafar, H., Homayouni, A. (2012) Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. Food Chem. 132: 1966-1970.
24. Nikam, V.K., Kotade, K.B., Gaware, V.M. Dolas, R.T. Dhamak, K.B., Somwanshi, S.B., Khadse, A.N., Kashid, V.A. (2011) Eudragit A Versatile Polymer: A Review. Pharmacologyonline. 1: 152-164.
25. Özer B., Kirmacia H., Ebru S, Enel b, Atamer M.B., Hayaloglu A. (2009) Improving the viability of Bifidobacterium bifidum BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. Int Dairy J. 19: 22-29.
26. Picot, A., Lacroix, C. (2004) Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int Dairy J. 14: 505-515.
27. Picout, D.R., Ross-Murphy S.B, Errington, N., Harding, S.E. (2001) Pressure cell assisted solution characterization of polysaccharides. 1. Guar gum. Biomacromolecules. 2: 1301-1309.
28. Porzio, M. (2008) Melt extrusion and melt injection. Perfumer Flavorist. 33: 48-53.
29. Pourjafar, H., Ghasemnezhad, R. (2010) Probiotics as a suitable replacement for common antibiotics against infectious disease. J IRIAF Health Administration. 13: 72-77.
30. Pourjafar, H., Ghasemnezhad, R. (2013) Role of probiotic bacteria in cancer prevention. Pejvad. 1: 129-134.
31. Pourjafar, H., Mirzaei, H., Ghasemnezhad, R., Homayouni, A. (2011) Study of morphological and protective characteristics of beads obtained from microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* probiotic as a predominant and natural flora in human gut. J Army Uni Med Sci. 9: 233-240.
32. Pourjafar, H., Mirzaei, H., Homayouni, A. (2010) Study of the survival rate of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* La5 in Iranian white cheese during manufacture and storage. Iranian Vet J. 7: 50-59.
33. Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., Sia Heng, P.W. (2013) Microencapsulation of microbial cells. J Food Eng. 116: 369-381.
34. Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R, Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberforid, M., Rowland, I. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. Br J Nutr. 1: 147-171.
35. Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., Järvenpää, S., Korpela, R., Mutanen, M., Hatakka, K. (2010) Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. Int J Food Microbiol. 144: 293-300.
36. Shah, N.P. (2000) Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. J Dairy Sci. 83: 894-907.
37. Shen, Q., Quek, S.Y. (2014) Microencapsulation of astaxanthin with blends of milk protein and fiber by spray drying. J Food Eng. 123: 165-171.
38. Shima, M., Morita, Y., Yamashita, M., Adachi, S. (2006) Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. Food Hydrocolloid. 10: 1016-1027.
39. Simonoska Crcarevska, M., Glavas Dodov, M., Goracinova, K. (2008) Chitosan coated Ca-alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. Eur J

Pharm Biopharm. 68: 565-578.
40. 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.
41. Tatar, F., Tugce, T., Dervisoglu, M., Cekmecelioglu, D., Kahyaoglu, T. (2014) Evaluation of hemicellulose as a coating material with gum Arabic for food microencapsulation. Food Res Int. 57: 168-175.
42. Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. (2000) Enumeration of Lactobacillus casei in the presence of L.acidophilus, Bifidobacteria and Lactic starter bacteria in fermented dairy products. Int Dairy J. 10: 271-275.
43. Yoo, J.W., Giri, N., Lee, C.H. (2011) pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. Int J Pharma. 403: 262-267.
44. Zarate, G., Nader-Macias, M.E. (2006) Viability and biological properties of probiotic vaginal Lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. Process Biochem. 41: 1779-1785.
45. Zuidam, N.J., Nedovic, V.A. (2010) Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. (1st ed.) St. Spring, Springe, New York, USA.

Study of protective role of double coated beads of calcium alginate-chitosan-eudragit s100 nanoparticles achieved from microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* as a predominant flora of human and animals gut

Pourjafar, H., Noori, N.*, Gandomi, H., Akhondzadeh Basti, A.

Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran
(Received 10 April 2016, Accepted 19 Jun 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Probiotics have more functional effects and less survival under hard acidic-bile circumstances of digestive system, and foodstuff products situation has persuaded investigators to find techniques to resolve this problem. Microencapsulation as a useful method has a perceptible effect in this regard. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to assess the protective role of double coated beads of calcium alginate-chitosan-eudragit S100 achieved from microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* as a predominant flora of human and animals gut. **METHODS:** Following activation of starter culture of L.acidophilus in MRS-broth medium, centrifuge (at aspeed of 5000 rpm for 10 minutes) was used to purify bacteria. Extrusion technique was used for Microencapsulation of probiotic bacterium. The survey of beads solidity was carried out for 12 hours and the study of survival of microencapsulated bacteria was done for 120 minutes inside hydrochloric acid, phosphate buffer and digestive powder solution. MRS-Salicin-agar and pour plate method and incubation at 37^{o}C for 48 h was done for cultivation. Data were analyzed by means of an independent t-test. **RESULTS:** Shape and size of beads were shown by optical microscope. The consequences demonstrated that survivability of microencapsulated bacteria in the mentioned conditions, in both situation with and without mechanical tensions, is significantly more than free bacteria ($p<0/05$). **CONCLUSIONS:** Microencapsulation with calcium alginate- chitosan-eudragit S100 plays a significant role in increasing the rate of *L. acidophilus* viability.

Keyword: eudragit S100, calcium alginate, chitosan, *Lactobacillus acidophilus*, microencapsulation

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Optical microscope image of double coated beads at 10 magnification.

Figure 2. Internal appearance of beads, and dispersion of bacteria into beads at 40 magnification.

Graph 1. Bead's strength into HCl, phosphate buffer and digestive powder solution.

Graph 2. Survival of free and encapsulated bacteria into HCl solution without mechanical tension.

Graph 3. Survival of free and encapsulated bacteria into HCl solution with mechanical tension.

Graph 4. Survival of free and encapsulated bacteria into phosphate buffer without mechanical tension.

Graph 5. Survival of free and encapsulated bacteria into phosphate buffer with mechanical tension.

Graph 6. Survival of free and encapsulated bacteria into digestive solution without mechanical tension.

Graph 7. Survival of free and encapsulated bacteria into digestive solution with mechanical tension.

***Corresponding author's email: nnoori@ut.ac.ir, Tel: 021-61117067, Fax: 021-66933222**