نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۴ شماره ۳/ سال ۱۳۹۳

اثر میکروانکپسولاسیون بر زنده مانی باکتری پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط شبیه سازی شده معده و روده

معظمه کاظمی گورجی*[1]، حبیب اله عباسی[2]، لیلاروزبه نصیرایی[3] و الناز میلانی[4]

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۲٤ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۸

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی- علوم وصنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

[2] استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی جندی شاپور دزفول

[3] استادیار گروه علوم و صنایع غذیی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نور

[4] استادیار گروه پژوهشی فراوری مواد غذایی پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد

* مسئول مکاتبه: Email: mo_kazemi62@yahoo.com

چکیده

طی دو دهه اخیر، ردیابی و شناسایی سویه‌های بومی با کتری‌های لاکتیک، بخش عمده ایی از مطالعات مربوط به این گروه از میکروارگانیسم‌ها را به خود اختصاص داده است. هدف از این تحقیق بررسی کارآمدی کپسولاسیون جهت حمل باکتری بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (KC355240) و بررسی بقای باکتری در شرایط شبیه سازی شده معده و روده می‌باشد. باکتری بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* فعال‌سازی شده و با استفاده از آلژینات کلسیم ریزپوشانی گردید و اندازه و مورفولوژی ذرات تعیین شد. سپس قابلیت زنده‌مانی باکتری پروبیوتیکی طی عبور از شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده (pH=۲، آنزیم پپسین در معده و pH=۷/٤ ، نمک صفراوی روده) مورد بررسی قرار گرفت. ریخت‌شناسی دانک‌ها با روش SEM، کپسول‌هایی با ظاهرکروی را نشان داد؛ که نشان دهنده اثر مثبت آلژینات به منظور تشکیل دیواره‌ای یکنواخت برای این باکتری است. نتایج این مطالعه بیانگر این است که کپسولاسیون باکتری با آلژینات منجر به تولید دانک‌هایی یک شکل، منظم و کروی با قطر کمتر از ۱۰۰ میکرومتر شده، همچنین ریزپوشانی با آلژینات کلسیم بقای باکتری *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* طی عبور از سیستم گوارشی را تا ٤ سیکل لگاریتمی بهبود می‌بخشد.

واژگان کلیدی: باکتری پروبیوتیک بومی، ریزپوشانی، محیط شبیه سازی شده معده و روده، میکروسکوپ الکترونیSEM

مقدمه

پروبیوتیک‌ها اجزاء غذایی از نوع میکروب‌های زنده هستند که اثرات مفیدی بر سلامت میزبان مصرف کننده شان به جای می‌گذارند و عمدتاً جزوخانواده‌ی اسید لاکتیک باکتری‌ها هستند که استفاده از آن‌ها پیشینه طولانی دارد؛ از این رو ایمن بودن آن ها کاملاً محرز گشته است (سالمینن و همکاران ۱۹۹۹)، به منظور استفاده از پروبیوتیک‌ها در محصولات غذایی مختلف همواره سعی بر بهبود زنده‌مانی آن‌ها در محصولات غذایی و شرایط شبیه سازی شده معده و روده بوده است به این منظور از فرایند میکروانکپسولاسیون در جهت افزایش زنده مانی پروبیوتیک‌ها استفاده شده است. میکروانکپسولاسیون به عنوان روشی برای حفاظت سلول‌های زنده در برابر شرایط نامناسب محیطی است که منجر به افزایش بقای آن ها در محصول و شرایط شبیه سازی شده معده و روده می‌گردد. نگهداری فیزیکی سلول‌ها در ماتریکس انکپسوله شده سلول‌ها را از تماس مستقیم با عوامل مضر حفظ کرده و همزمان باعث ورود و خروج مواد مغذی از ماتریکس می‌شود (همایونی ۱۳۸۷؛ آنال و سینگ ۲۰۰۷؛ تالواکر و کایلاساپاتی ۲۰۰٤). گزارشات گوناگونی مبنی بر ثمربخشی ریزپوشانی در افزایش قابلیت بقای پروبیوتیک‌ها طی گذر از شرایط اسیدی– آنزیمی– صفراوی معده، لوزالمعده و روده کوچک در دست است. برای مثال راا در ۱۹۸۹ دریافت که ریزپوشانی *بیفیدوباکتریوم. سودولانگوم* با پوشینه سلولز – استات – فتالات (CAP) بقای آن را در شرایط شبیه‌سازی‌شده اسید معده افزایش می‌دهد. آزمایشات لی در سال ۲۰۰۰ نشان داد که بقای *بیفیدو باکتریوم. لانگوم* ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم در شرایط شبیه‌سازی شده اسید معده (pH=۱/۵) به طور قابل ملاحظه ای افزایش می‌یابد (مرتضویان و سهراب‌وند ۱۳۸۵). با در نظر گرفتن غنای ذخائر ژنتیکی ملل و توجه به تنوع ژنتیکی در مناطق جغرافیایی، معرفی سویه‌های آغازگر بومی و سازگار با شرایط آب و هوایی هر منطقه بسیار حائز اهمیت است. لذا هدف از این پژوهش بررسی تأثیر ریزپوشانی با آلژینات‌کلسیم بر میزان بقاء سوش بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم La7*، که خواص پروبیوتیکی آن اثبات رسیده است، در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش می‌باشد.

موادوروش ها

تجهیزات و مواد اولیه ای که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت عبارت اند از:

کشت خالص لیوفیلیزه باکتری بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم La7* (مرکز نگهداری سوش های بومی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (میرلوحی و همکاران۱۳۸۷؛ میرلوحی ۱۳۸۷؛ فاضلی و همکاران ۲۰۱۰؛ میرلوحی و همکاران ۲۰۰۸؛ میرلوحی و همکاران ۲۰۰۹)، محیط کشتMRS Agar (شرکت مرک، آلمان)، املاح صفراوی (شماره تجاری B8756 از شرکت سیگما)، آلژینات سدیم با ویسکوزیته متوسط (شماره تجاری ۲۰۳۳ از شرکت سیگما)، روغن کلزا (شرکت صنایع غذایی عالیا گلستان)، توین۸۰ با شماره تجاری ۸۲۲۱۸۷ (P 8074 Sigma)، کلرور کلسیم (شرکت مرک، آلمان)، سیترات سدیم (مرک، آلمان)، سود ۱ نرمال (مرک، آلمان).

آماده سازی میکروارگانیزم

برای فعال سازی سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم (کد دسترسی KC355240) ، که به صورت لیوفیلیزه از اصفهان تهیه شده است، آنس سوزنی آغشته به مقداری از باکتری لیوفیلیزه را به ٥ میلی لیتر محیط مایع MRS افزوده و به مدت زمان ٢٤–١٦ ساعت (بسته به سرعت رشد باکتری به طوری که از فاز لگاریتمی خود خارج نشود) در ۳۷°C تکثیر گردید. سپس نمونه حاصل در ۹۵ میلی لیتر محیط مایع MRS تلقیح و تحت شرایط فوق تکثیر شد. در پایان بیومس حاصله بوسیله سانتریفوژ یخچال دار در ۷۸۰۰×g برای مدت ٥ دقیقه و

دمای ٤ درجه سانتی‌گراد جداسازی و در دو مرحله با محلول استریل پپتون واتر ۰/۱٪ شسته شده و جهت اینکپسولاسیون مورد استفاده قرار گرفت (مکرم و همکاران ۱۳۸۹).

کپسولاسیون *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* در آلژینات

در این روش ریزپوشانی با استفاده از روش ژلاتیناسیون خارجی که توسط تراستراپ (۲۰۰۲) و الان (۲۰۰۸) گزارش گردیده است، انجام می‌گیرد. بدین منظور مقدار ۰/۵گرم آلژینات سدیم در ۵۰ میلی لیترآب دیونیزه غیر استریل حل شده، سپس اتوکلاو گردیده و به مدت یک شبانه روز در یخچال نگهداری گردید تا ذرات آلژینات به خوبی آب جذب کنند. روز بعد آلژینات به خارج از یخچال به منظور هم دمایی با محیط آزمایشگاه منتقل شد. سپس مقدار یک گرم از رسوب باکتری سانتریفوژ شده به مقدار کمی آلژینات سدیم اضافه و قطره قطره به محلول حاوی ۹۹ گرم روغن مایع نباتی (کلزا) حاوی ۱ گرم توئین ۸۰ که با استفاده از هم زن مغناطیسی در ۷۵۰rpm درحال مخلوط شدن بود اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در همین دور قرار گرفت. سپس ٤۰ میلی لیتر از یک امولسیون حاوی یون کلسیم (تهیه شده از انحلال ٦۰ گرم روغن مایع نباتی (کلزا)، ۰/۵گرم توبین ۸۰ و ۳۹/۵ گرم کلرور کلسیم ۰/۱ مولار) در بورت ریخته شده و قطره قطره به بشر حاوی رسوب باکتری اضافه گردید (۱۰۰ rpm). در اثر تماس آلژینات با محلول کلسیم دیواره‌ی کپسول شکل گرفت و دانک ها به شکل قطرات ریز ته‌نشین شد. درمرحله بعد محلول حاصل درون قیف دکانتور ریخته شده مقدار ٤۰ میلی لیتر بافر PS[1] به منظور جداسازی فازها به آن اضافه گردید، محلول به مدت ۳۰ دقیقه تحت این شرایط قرار گرفت، سپس کپسول ها به راحتی از دکانتور جدا شد. تمام این مراحل تحت شرایط کاملاً استریل انجام گردید.

شمارش باکتری های به دام افتاده در کپسول ها

جهت تعیین کارایی فرایند ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی، میکروکپسول‌ها را توسط کاغذهای صافی استریل از محلول PS که در آن معلق بودند جدا کرده و مقدار ۱ گرم از میکروکپسول ها، داخل ۹۹میلی لیتر محلول ۱٪ (وزنی/حجمی) سیترات‌سدیم استریل که pH آن در حدود ٦ تنظیم شده است پراکنده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق توسط همزن مغناطیسی، عمل همزدن ادامه پیدا کرد. در طی این فرایند دیواره دانک‌های آلژینات تخریب شده و سلول‌های باکتریایی به بیرون رها می شوند. بعد از این مرحله عمل رقت‌سازی و کشت میکروبی با استفاده از محیط MRS Agar در شرایط بی هوازی و در دمای ۳۷° C به مدت ٤۸ساعت انجام شد و تعداد باکتری ها شمارش گردید (مکرم و همکاران ۲۰۰۹).

بررسی ویژگی های فیزیکی کپسول ها

تعیین اندازه ذرات و نحوه پراکنش آن ها

برای تعیین اندازه کپسول و فراوانی هریک از آن ها ازدستگاه اندازه گیری قطر ذرات مدل (Japan SHIMADZU 2101-SALD) استفاده شد. برای این منظور کپسول‌های آلژینات در اتانول ۹٦ درجه پراکنده شد و نتایج بر اساس قطر حجم میانگین ذرات±استاندارد خطا و بر اساس فرمول های مربوط به قطر میانگین مورد آنالیز قرار گرفت.

$$\text{قطر میانگین} = 100^{\mu}$$

$$\mu = \frac{1}{100}\sum_{j-1}^{n} q_j \frac{\log_{10} x_{j+\log_{10} x_{j+1}}}{2}$$

$$\sigma = \sqrt{\left\{\frac{1}{100}\sum_{j-1}^{n} q_j\left(\frac{\log_{10} x_{j+\log_{10} x_{j+1}}}{2}\right)^2\right\} - \mu^2}$$

که x_j و q_j و σ به تر تیب قطر ذرات بر حسب میکرون، درصد توزیع ذرات و استاندارد خطا هستند.

[1] Peptone saline

تعیین مورفولوژی ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

برای تعیین مورفولوژی ذرات و مشاهده شکل ظاهری آنها از روش میکروسکوپ الکترونی SEM استفاده می‌شود. بدین جهت کپسول ها به وسیله چسب دو طرفه بر روی کوتر (SC7620) ساخت کشور انگلستان تثبیت و به مدت ۲ دقیقه بوسیله طلا وپلادیم پوشش داده شدند. مشاهده کپسول ها بوسیله میکروسکوپ الکترونی مدل (LEO 1450 VP) ساخت کشور آلمان با تابش الکترونی Kv20 انجام شد (مکرم و همکاران ۱۳۸۹).

ارزیابی بقاء باکتری در شرایط شبیه سازی شده معده و روده

به این منظور، طبق روش ارائه شده توسط ویزوسو پینتو و همکاران (۲۰۰٦) جهت تهیه شیرهٔ معده، محلول الکترولیت حاوی ٦/۲۳ گرم در لیتر کلرورسدیم، ۲/۲۹ گرم درلیتر کلرور پتاسیم، ۰/۲۲۹ گرم در لیتر کلرورکلسیم و ۱/۲ گرم درلیتر بی‌کربنات سدیم به شکل استریل تهیه و pH آن بوسیله اسید کلریدریک ۸ نرمال تا ۰/۲ ± ۲ کاهش داده شد. در زمان انجام آزمایش آنزیم پپسین تا غلظت نهایی ۰/۳درصد به آن افزوده شد. شیرهٔ شبیه سازی شده روده با استفاده از محلول الکترولیت استریل حاوی ۰/۲۳۹ گرم درلیتر کلورپتاسیم، ۱/۲۸ گرم درلیتر کلرور سدیم، ٦/٤ گرم درلیتر بی‌کربنات کلسیم و ۰/۵ درصد اکسگال تهیه شد (ویزوسو پینتو ۲۰۰٦).

سپس براساس روش رضایی مکرم و همکاران (۲۰۰۹)، مقدار ۱ گرم از کپسولهای باکتریایی یا معادل آن یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری های آزاد، داخل ویال حاوی ۹ میلی لیتر از شیره معده ریخته‌شده، برای مدت دو ساعت در انکوباتور ۳۷°C در حال شیک‌شدن قرار گرفته و زنده مانی آن طی فواصل زمانی نیم ساعته (۰،۳۰،٦۰،۹۰،۱۲۰دقیقه) در شیره معده بررسی گردید. سپس به منظور تعیین قابلیت زنده مانی در روده، ابتدا به مدت یک ساعت در محیط معده شیک شده، سپس به ویال حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط شبیه‌سازی شده روده انتقال یافته و به مدت دو ساعت در انکوباتور ۳۷° C قرار گرفت. زنده مانی آن طی فواصل زمانی نیم ساعته (۰،۳۰،٦۰،۹۰،۱۲۰دقیقه) محاسبه گردید. تعداد سلولهای زنده در نمونه‌های حاوی پروبیوتیک به صورت آزاد، با استفاده از روش رقیق سازی توسط پیپتون واتر کشت داده شد، در حالیکه نمونه‌های حاوی دانک، به منظور حل شدن دیواره آن، در محلول سیترات سدیم ۱ درصد، قرار گرفت. بعد از این مرحله عمل رقت سازی در محیط کشت انتخابی انجام شد و تعداد پروبیوتیک‌های باقیمانده، بعد از ۲٤ تا ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷°C، شمارش گردید. این شمارش با ۳ تکرار برای هر نمونه صورت پذیرفت (مکرم وهمکاران ۲۰۰۹).

آنالیز آماری

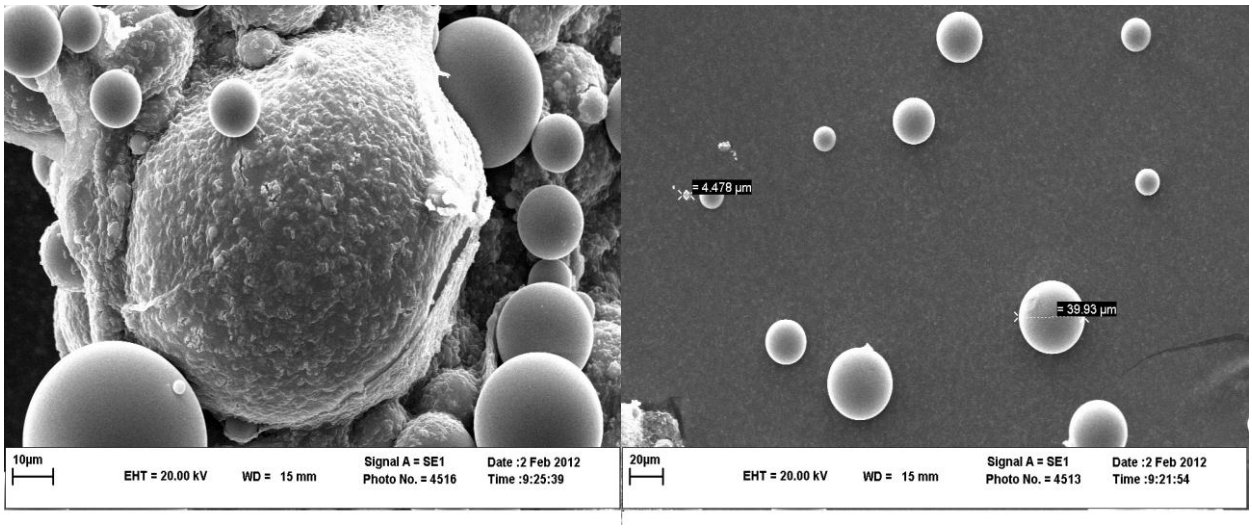
آنالیز آماری داده ها با استفاده از طرح فاکتوریل کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

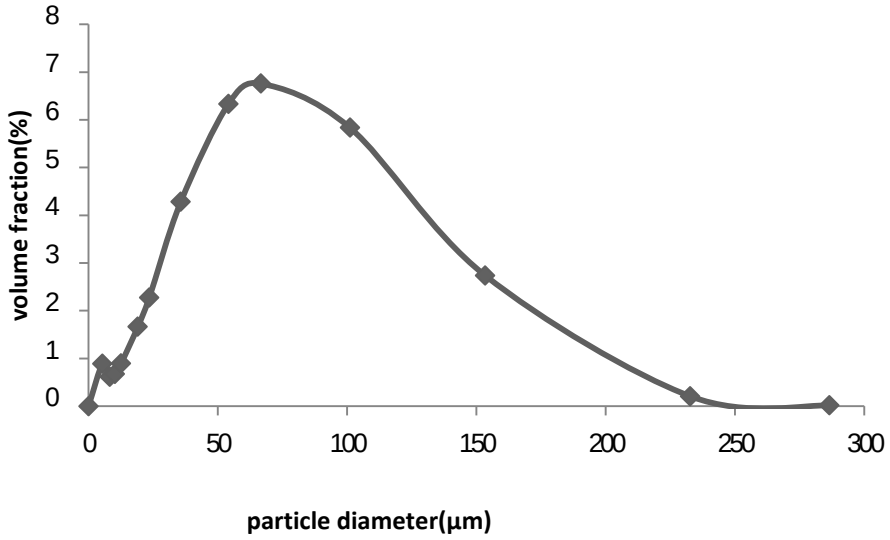
نتایج این پژوهش با بررسی تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی از میکروکپسول‌های حاوی باکتری پروبیوتیک حاکی از این بود که با استفاده از روش امولسیونی دانک‌هایی یک شکل، منظم و کروی با قطر کمتر از ۱۰۰ میکرومتر تولید گردید که بیان کننده تأثیر بسزای آلژینات به عنوان پوشش برای باکتری بوده و منجر به تشکیل دیواره‌ای یکنواخت وکروی می‌گردد (شکل ۱). قطر حجم میانگین (VMD) کپسول-ها برابر ۸/٤۹ میکرومتر و مقدار انحراف معیار از میانگین معادل ۰/۸۹۷میکرومتر به دست آمد. قطر ۹۰٪ ذرات (d_{90}) مساوی و یا کمتر از۹۵/۹۷۳ میکرومتر، ۵۰٪ (d_{50}) مساوی ۱۷/۲ میکرومتر و برای ۱۰٪ کپسول‌ها (d_{10}) قطری مساوی و یا کمتر از ۰/۵۸۹ میکرومتر به

دست آمد (شکل ۲). ادعا شده است که اندازه کپسول‌ها بر روی ظاهر ماده غذایی و قابلیت زنده مانی باکتری‌ها تاثیر دارد. به عبارت دیگر کپسول‌های بزرگتر از یک میلی متر موجب خشن شدن بافت ماده غذایی می شوند و کپسول های با قطر کمتر از۱۰۰ میکرون تاثیری در زنده مانی باکتری‌ها ندارند و اثر حفاظتی خود را از دست می‌دهند بر اساس این مطالعه، باکتری ها باید در دامنه مشخصی از اندازه کپسول ها حفاظت شوند تا مهمترین راندمان در PH معده و غلظت صفرای روده به دست آید. علاوه بر قطر کپسول ها، نوع میکروارگانیزم حفاظت شده نیز بر قابلیت زنده مانی باکتری موثراست (تراستراپ و همکاران ۲۰۰۲). همچنین کروی بودن شکل ظاهری کپسول های تهیه شده در بستر آلژینات کلسیم توسط همایونی و همکاران (۲۰۰۸) و مکرم و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش شده است.

حال با در نظر گرفتن اندازه و شکل باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در این پژوهش میزان بقای این باکتری تحت شرایط شبیه سازی شده ی معده و روده بررسی شد و همان طور که انتظار می رفت ریزپوشانی با آلژینات کلسیم باعث افزایش معنی داری در بقای باکتری *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* گردید چرا که ریزپوشانی، باکتری را در مقابل شرایط نامساعد محیطی محافظت می کند. نتایج مربوط به بقای این باکتری در شرایط شبیه سازی‌شده معده وروده در جدول ۱ آمده است و شکل۳ به درستی بیان کننده افزایش بقای این باکتری می باشد. مطالعات گوناگونی در مورد بقای باکتری تحت این شرایط انجام شده است.



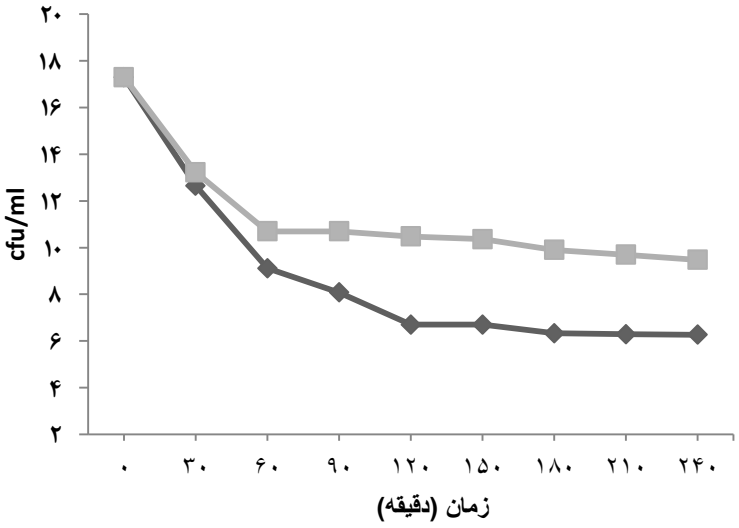
شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی از به دام اندازی باکتری در دانک های آلژینات



شکل ۲- نحوه پراکنش اندازه ذرات میکروکپسول و در صد فراوانی آن ها بر اساس داده های دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر

جدول۱- میزان بقای سلول های آزاد و ریز پوشانی شده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم La7* بعد از۲ ساعت گرمخانه گذاری در محلول شبیه‌سازی شده معده (pH=۲) و ۲ ساعت گرمخانه گذاری در محلول شبیه سازی شده روده (pH=۷/۴) بعد از ۶۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در شرایط مشابه معده (۳۷°C)

شرایط شبیه سازی شده روده		شرایط شبیه سازی شده معده		
سلول ریزپوشانی شده (cfu/g)	سلول آزاد (cfu/ml)	سلول ریزپوشانی شده (cfu/g)	سلول آزاد (cfu/ml)	زمان(دقیقه)
(۲±۰/۲)×۱۰^۱۷	(۲±۰/٤)×۱۰^۱۷	(۲±۰/۲)×۱۰^۱۷	(۲±۰/٤)×۱۰^۱۷	۰
(۲/۳±۰/٤)×۱۰^۱۰	(۰/٥±۰/۳)×۱۰^٦–۱۰^۷	(۱/۷±۰/۳) ×۱۰^۱۱	(٤/٥±۰/۷)×۱۰^۱۲	۳۰
(۸±۰/۲)×۱۰^۹	(۲/۱٥±۰/۱)×۱۰^٦	(٥ ±۰/۱)×۱۰^۱۰	(۱/۳±۰/٥) ×۱۰^۹	٦۰
(٥±۰/۳)×۱۰^۹	(۱/۹٤±۰/٤)×۱۰^٦	(٥ ±۰/۱)×۱۰^۱۰	(۱/۲±۰/۲) ×۱۰^۷–۱۰^۸	۹۰
(۳±۰/۱)×۱۰^۹	(۱/۸٤±۰/٤) ×۱۰^٦	(۳±۰/٥)×۱۰^۱۰	(۰/٥ ±۰/۲)×۱۰^٦–۱۰^۷	۱۲۰



شکل ۳- منحنی قابلیت زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط شبیه سازی شده معده و روده .(♦) *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* آزاد، (■) *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* کپسوله شده

تراستراپ و همکاران (۲۰۰۲) نه گونه مختلف بیفیدوباکتریوم را از نظر تحمل شرایط دستگاه گوارش مورد مطالعه قرار داده و اختلاف زیادی در تحمل آنها نسبت به شیره معده و غلظت نمک(۵-۱۰gr/l) مشاهده کردند. در بین این ها بیفیدوباکتریوم لاکتیس نسبت به pH پایین و نمک‌های صفراوی مقاوم ترین باکتری بود. این محققان برخی از نژادها را در کپسول های آلژینات با اندازه ۲۰-۷۰µm، امولسیفیکاسیون مخلوط سلول ها و آلژینات سدیم در یک روغن گیاهی و سپس اتصال عرضی با کلرورکلسیم انکپسوله کردند. نتایج بررسی میکروکپسول ها با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که این ذرات ریز متخلخل بوده و به میزان زیادی با باکتری ها انباشته شده اند. این میکروکپسول ها درطول دوره نگهداری در ٤°C در محلول کلرورکلسیم M ۰/۰۵و در شیر (۲٪چربی) و خامه‌ترش برای ١٦ روز و در محیط شبیه سازی شده معده (pH=۲) برای یکساعت در۳۷°C زنده ماندند. اما میکروکپسوله کردن اثری بر حفاظت بیفیدوباکتریهای حساس به اسید در محیط معده نداشت. در مطالعه دیگری کیم و همکاران (۲۰۰۸) نیز نشان دادند که کپسولاسیون روش موثری برای تحمل بیشتر نمکهای صفراوی توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس خواهد بود (کیم و همکاران ۲۰۰۸). مکرم و همکاران (۲۰۰۹) ضمن گزارش اثر مثبت میکروکپسولاسیون در بستر آلژینات کلسیم بر بهبود بقای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط روده نشان دادند که قابلیت زنده مانی این باکتری در شرایط ترکیبی معده و روده کمتر از شرایط معده به تنهایی است (مکرم و همکاران ۲۰۰۹). در عین حال بر اساس نظر برخی از پژوهشگران کپسولاسیون تاثیری بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک ندارد (سلطانا و همکاران ۲۰۰۰).

براساس گزارش جیبابسی و همکاران (۲۰۰۹)، کپسولاسیون سه سویه از لاکتوباسیلوس پلانتاروم در پوشش آلژینات- وی پروتئین سبب افزایش قابلیت زنده مانی باکتری در شرایط شبیه سازی شده روده و معده می شود. به عقیده آن ها تنها باکتریهای پوشش‌دار پس از گذر از شرایط اسیدی (pH حدود ۱/۸، به مدت یک ساعت) می توانند صفرای موجود در روده را تحمل نمایند و هیچ یک از انواع فاقد کپسول در چنین شرایطی زنده نمانده اند. بر طبق قوانین اتحادیه اروپا این باکتری

می تواند به تعداد $۱۰^{۹}$ در هر گرم ماده غذایی استفاده شود. بعلاوه وجود حالت بافری در فرمولاسیون از ضروریات می باشد تا شوکهای ناشی از تغییر اسیدیته به حداقل برسد (جیبابسی و همکاران ۲۰۰۹).

این نتایج همچنین با کارهای سلطانا و همکاران (۲۰۰۰)، مطابقت دارد که نشان دادند استفاده از آلژینات به تنهایی به عنوان پوشش نمی‌تواند حفاظت کافی را فراهم آورد و بر لزوم استفاده از پوشش ثانویه تاکید کردند (سلطانا و همکاران ۲۰۰۰). کاپلا و همکاران (۲۰۰٦) در آزمایشی بر روی پروبیوتیک‌های کپسول‌شده مشاهده کردند که در طی نگهداری در$۳۷^{\circ}C$ پس از یک ماه، فقط نمونه های کپسول شده، درحد ٦ پایه لگاریتمی زنده مانده اند و در طی ماه دوم نگهداری تعداد باکتری ها به کمتر از مقدار یک میلیون در گرم کاهش یافت، آن ها بیان داشتند که استفاده از دمای $۲۱^{\circ}C$ یا$۴^{\circ}C$ می تواند تا ٦ ماه موجب حفظ زنده مانی باکتری ها در حد استاندارد شود (کاپلا و همکاران ۲۰۰٦). همچنین ریبکا (۱۹۹۵) گزارش کرده است که پروبیوتیک‌های کپسوله بیش از دو ماه قابلیت زنده‌مانی ندارند (ریبکا و کایلاساپاتی ۱۹۹۵).

براساس نتایج مطالعات گوناگون می توان نتیجه گرفت که ریزپوشانی پروبیوتیک ها نقش بسیار مهمی در حفاظت این میکروارگانیزم ها در برابر شرایط نامساعد محیطی از جمله شرایط شبیه سازی شده روده و معده ایفا می کند. در مجموع نتایج این پژوهش بیان‌گر این است که ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم (La7)* با آلژینات کلسیم سبب می‌گردد زنده‌مانی باکتری بعد از عبور از مدل سیستم گوارشی تا ٤ سیکل لگاریتمی بهبود یابد.

تقدیر و تشکر

بر خود لازم میدانم از مساعدت های پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی دانشگاه فردوسی مشهد و همکاری عزیزان دست اندر کارکمال تشکر و قدر دانی را نمایم.

منابع مورد استفاده

رضایی مکرم ر، مرتضوی ع، حبیبی نجفی م ب، شهیدی ف و خمیری م، ۱۳۸۹. میکروانکپسولاسیون باکتری های پروبیوتیک. رساله دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

مرتضویان ا م و سهراب وند س، ۱۳۸۵. پروبیوتیک ها و فراورده های غذایی پروبیوتیک. تهران: انتشارات اتا.

میر لوحی م، سلیمانیان زاد ص، دخانی ش و شیخ زین الدین م، ۱۳۸۷. کاربرد نشانگر مولکولی ژن rec A در شناسایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم La7* با قابلیت پروبیوتیکی جدا شده از فلور طبیعی کودک ایرانی. هجدهمین کنگره علوم و صنایع غذایی.

همایونی راد ع، ۱۳۸۷. خواص سلامت بخش غذاهای فراسودمند پروبیوتیک، پری بیوتیک وسین بیوتیک. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تبریز.

Allan-Wojtas P, Truelstrup Hansen L and Paulson AT, 2008. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. LWT - Food Science and Technology 41: 101-108.

Anal AK and Singh H, 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science and Technology 18: 240-251.

Capela P, Haytk C and Shah NP, 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International 39: 203-211.

Fazelii H, Moshtaghian J, Mirlohi M and Shirzadi M, 2010. Reduction in serum lipid parameters by incorporation of a native strain of *Lactobacillus Plantarum A7* in Mice. Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders 9: 1-7.

Gbassi G K, Vandamme T, Ennahar S and Marchioni E, 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum spp* in an alginate matrix coated with whey proteins. International Journal of Food Microbiology 129: 103-105.

Hansen LT, Allan-Wojtas P, Jin YL and Paulson AT, 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp*. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiology 19: 35-45.

Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS and Razavi SH, 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. Food Chemistry 111: 50-55.

Kim SJ, Cho S, Kim SH and Shin IS, 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. LWT-Food Science and Technology 3: 493-500.

Mirlohi M, Soleimanian-Zad S and Sheikh-Zeinodin M, 2008. Identification of Lactobacilli from Fecal Flora of Some Iranian Infants. Journal Iran J pediatr 18: 357-363.

Mirlohi M, Soleimanian-Zad S and Sheikh-Zeinodin M and Dokhani S, 2009. Investigation of acid and bile tolerance of native lacto- bacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. Iranian Journal of Biotechnology 7: 233-240.

Mokarram RR, Mortazavi SA, Najafi MBH and Shahidi F, 2009. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. Food Research International 42: 1040-1045.

Rybka S and Kailasapathy K, 1995. The survival of culture bacteria in fresh and frize- dried yoghurt. Australian Journal of Dairy Technology 50:51-57.

Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, and Lee YK, 1999. Probiotics: How should they be defined? Trends in Food Science & Technology 10:107-110.

Sultana K, Godward G, Reynolds N, Armugaswamy R and Peiris P, 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Interbational Journal of Food Microbiology 62: 47-55.

Talwalkar A and Kailasapathy K, 2004. A review of oxygen toxicity in probiotic yoghurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. Comprehensive reviews in Food Science and Food safety 3: 117-124.

Vizoso Pinto MG, Franz CMAP, Schillinger U and Holzapfel WH, 2006. *Lactobacillus spp*. within vitro probiotic properties from human faces and traditional fermented products. International Journal of Food Microbiology 109: 205-214.

Influence of microencapsulation of indigenous probiotic lactobacillus plantarum on bacterial survival in simulated gastrointestinal conditions

M Kazemi Goraji[1*], H Abbasi[2], L Roozbeh Nasiraii[3] and E Milani[4]

Received: July 15, 2013 Accepted: May 18, 2014
[1]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, University of Jundi Shapur, Dezful, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Nour Branch, Nour, Iran
[4]Assistant Professor, Food Processing Research Group, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad Iran
[*]Corresponding author: Email: Mo_kazemi62@yahoo.com

Abstract
During the last two decades, too many studies have been assigned to lactic acid bacteria (LAB) detection and identification of native strains of LAB. The aim of this study was to examine the efficacy of capsulation to carry native LAB, *Lactobacillus plantarum* (KC355240), and bacteria survival in simulated gastrointestinal conditions. The native *Lactobacillus plantarum* was activated and microencapsulated using calcium alginate, and then the size and morphology of the particles was determined. Then the ability of probiotic bacteria survival through passing the simulated gastrointestinal conditions (pH=2 pepsin and pH=7.4 bile salt solution) was investigated. Morphology of the beads using SEM showed globular capsules and this indicating positive effect of alginate in order to form a steady wall for these bacteria. In addition, improving survival ability of bacteria through passing gastrointestinal system simulation indicated appropriate substance of calcium alginate to microencapsulating. The results indicate that this method of microencapsulation lead to generate the same, regular and spherical beads with diameter less than 100 micrometers and also microencapsulating with calcium alginate will improve survival of *Lactobacillus plantarum* bacteria through passing digestive system in about four logarithmic cycles.

Keywords: Native bacteria, Microencapsulation**,** Simulated gastrointestinal conditions, SEM