مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ریزپوشانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La_5 در بستر آلژینات سدیم و کازئینات سدیم و قابلیت زنده‌مانی آن در شرایط شبیه‌سازی شده گوارشی

فاطمه حسینی طباطبایی[۱]، امیرحسین الهامی‌راد[۲*]، رضا کاراژیان[۳]، حجت کاراژیان[٤]، محمد آرمین[٥]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

۳- جهاد دانشگاهی مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی صنعتی میکروارگانیسم‌ها، مشهد، ایران.

٤- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تربت حیدریه، دانشگاه آزاد اسلامی، تربت حیدریه، ایران.

٥- گروه کشاورزی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/٤/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/٦/۲۱

کلمات کلیدی:

ریزپوشانی

پروبیوتیک،

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس،

آلژینات سدیم،

کازئینات سدیم

DOI:10.22034/FSCT.22.159.144.

* مسئول مکاتبات:

ahelhamirad@yahoo.com

چکیده

زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در محیط‌های حساس به‌خصوص شرایط گوارشی اهمیت زیادی دارد. در این تحقیق از تکنیک ریزپوشانی به‌عنوان روشی برای افزایش امکان زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La_5) در شرایط شبیه‌سازی شده گوارشی استفاده گردید. باکتری‌های مذکور به روش امولسیون‌سازی در بستر آلژینات سدیم و کازئینات سدیم در پنج سطح غلظتی به‌صورت تک غلظتی و ترکیب دو ماده میکروانکپسوله شدند و از نظر تعداد سلول زنده مانده، بازده انکپسولاسیون، زنده‌مانی در برابر نمک صفرا، زنده‌مانی در برابر اسید معده و مایع روده‌ای با و بدون نمک صفرا مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها در تمامی آزمون‌ها بین تیمارهای مختلف اختلاف معناداری وجود داشت ($p<0/05$)؛ به‌طوری که زنده‌مانی سلول‌های آزاد در شرایط گوارشی به شدت کاهشی بود اما میکروانکپسولاسیون به‌عنوان یک عامل محافظتی عمل نموده و زنده‌مانی سویه‌های میکروانکپسوله بیشتر از سلول‌های آزاد بود. از طرفی ترکیب آلژینات سدیم و کازئینات سدیم به عنوان پوشش توانست مقاومت باکتری را در برابر شرایط گوارشی به‌طور معناداری افزایش دهد($p<0/05$). در بین تیمارها، سلول‌های آزاد (L-FC) کمترین زنده‌مانی در برابر محیط گوارشی را از خود نشان داد به‌طوری که در آزمون زنده‌مانی در محیط روده با نمک صفرا پس از ۳۰۰ دقیقه سلول زنده‌ای وجود نداشت اما تیمار با پوشش ۷۵٪ آلژینات سدیم و ۲۵٪ کازئینات سدیم ($L\text{-}SA_3SC_1$) بالاترین بازده را در فرآیند میکروانکپسولاسیون داشته و بهترین اثر محافظتی در برابر نمک صفرا، اسید معده و مایع روده‌ای را از خود نشان داد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت میکروانکپسولاسیون به روش امولسیون‌سازی با استفاده از ترکیب آلژینات سدیم و کازئینات سدیم می‌تواند در افزایش زنده ماندن باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس موثر باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

۱-مقدمه

پروبیوتیک‌ها مهم‌ترین مکمل‌های میکروبی مفید زنده هستند که از طریق همکاری با پری‌بیوتیک‌ها[1]، اگر به مقدار مناسب در حدود 10^{8}-10^{9} CFU/g در ماده غذایی مصرفی وجود داشته باشند، عملکرد روده‌ها را در انسان بهبود می‌بخشند [۱, ۲]. پروبیوتیک‌ها در تولید محصولات غذایی پروبیوتیک تخمیری و غیرتخمیری لبنی و غیرلبنی، محصولات دارویی پروبیوتیک، مکمل‌های غذایی و غذای حیوانات کاربرد دارند [۳, ٤]. یک ماده غذایی حاوی مقدار کافی از باکتری‌های زنده پروبیوتیک، فلور میکروبی روده را تغییر داده و نقش آنتی‌اکسیدانی در سلامت مغز و سیستم عصبی دارد، بیماری‌های گوارشی از قبیل سندرم روده تحریک پذیر، بیماری التهابی روده، دیابت و اسهال را از طریق رقابت با عوامل بیماری‌زا برای اتصال به مخاط روده و افزایش تولید باکتریوسین و اسیدهای آلی برای کاهش pH درمان می‌کند [۵]، اشتها را تحریک کرده و تغذیه میزبان را از طریق تولید ویتامین‌ها، حذف سموم در رژیم غذایی و تجزیه ذرات قابل هضم بهبود می‌بخشد [٦]. اغلب پروبیوتیک‌های مورد استفاده در غذا و مکمل‌های غذایی و دارویی جزو باکتری‌های اسید لاکتیک[2] هستند و عمدتاً به دو جنس لاکتوباسیلوس [3] و بیفیدوباکتریوم [4] تعلق دارند [۶]. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La_5)[5] یکی از گونه‌های تجاری مورد استفاده در محصولات لبنی، غذای نوزاد و مکمل‌های غذایی با اثرات پروبیوتیک است، فعالیتی مشابه آنتی‌بیوتیک-ها دارد و همچنین مولکول‌های ترشح شده در محیط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس فعالیت کشندگی وابسته به زمان در برابر باکتری‌هایی مانند سالمونلا تیفی‌موریوم[6]، لیستریا مونوسیتوژنز [7]، اشرشیاکلی انتروپاتوژن [8] و هلیکوباکتر پیلوری[9] دارند [۷].

پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش تحت تأثیر عواملی از جمله pH، اسیدی شدن بعد از تخمیر محصولات، تولید هیدروژن پراکسید و شرایط نگهداری غذا خصوصاً دما قرار می‌گیرند [۳]؛ در این راستا استفاده از تکنیک ریزپوشانی[10] و قرار دادن پروبیوتیک‌ها در یک کپسول حامل، منجر به بهبود بقای این باکتری‌ها در مواد غذایی، محافظت در برابر شرایط معده، رهاسازی کنترل‌شده آن‌ها در بخش‌های بعدی دستگاه گوارش و نقطه هدف و افزایش عملکرد آن‌ها می‌شود [۳, ۸]. از طرفی رهاسازی کنترل شده ترکیبات زیست فعال، راندمان آن‌ها را افزایش می‌دهد و امکان تعیین دوز بهینه آن را فراهم می‌کند [۸]. بر این اساس ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها به عنوان فرآیند به دام انداختن/ محصور کردن میکروارگانیسم‌ها در پلیمر مناسب برای جداسازی آن‌ها از محیط اطراف و محافظت از ترکیبات فعال ناپایدار (مواد هسته) در ماتریکس‌های مختلف پلیمری دیواره برای انتقال آن‌ها به نقطه هدف و بهبود ماندگاری محصول تعریف می‌شود [۹, ۱۰].

تکنیک‌های مختلفی برای ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال در صنایع غذایی به‌کار می‌روند که به روش‌های شیمیایی شامل امولسیون‌سازی[11] و به‌دام افتادن لیپوزوم[12]، روش‌های فیزیکی از قبیل خشک‌کردن پاششی[13]، سردکردن پاششی[14]،

1 Prebiotics
2 Lactic acid bacteria (LAB)
3 Lactobacillus
4 Bifidobacterium
5 Lactobacillus acidophilus
6 Salmonella Typhimurium
7 Listeria monocytogenes
8 Enteropathogenic Escherichia coli
9 Helicobacter pylori
10 Encapsulation
11 Emulsification
12 Liposomes entrapment
13 Spray-drying
14 Spray- chilling

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]
[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

اکستروژن[15]، پوشش بستر سیال[16] و الکتروریسی[17] و روش‌های فیزیکوشیمیایی شامل فرآیند کواسرواسیون[18] و انکپسولاسیون سل- ژل[19] تقسیم‌بندی می‌شوند [۳, ۱۰]. رایج‌ترین روش‌های ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها اکستروژن، خشک‌کردن پاششی و امولسیون‌سازی هستند. اکستروژن و خشک‌کردن پاششی به‌علت حساسیت پروبیوتیک به دماهای اعمال شده و اندازه ذرات بزرگ، کمتر کاربرد دارند؛ بنابراین روش امولسیون‌سازی بهترین روش ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها می‌باشد[۳, ۱۱, ۱۲]. امولسیون‌سازی روش جاگذاری شیمیایی است که مواد هسته و دیواره (فاز پراکنده) به روغن گیاهی(فاز پیوسته) افزوده شده، سپس امولسیفایر برای تشکیل امولسیون پایدار اضافه شده و ریزپوشانی در مقیاس میکرو[20] تحت فعالیت عامل اتصال عرضی انجام می‌شود [۱۳].

از بین مواد کاربردی برای ریزپوشانی، تعداد محدودی به عنوان عوامل پوشش‌دهنده[21] ایمن تأیید شده‌اند که عوامل بیوپلیمری از قبیل کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، صمغ‌ها، لیپیدها یا مشتقات آن‌ها می‌باشند [۱٤]. با توجه به پژوهش‌های پیشین، آلژینات سدیم ترکیب اصلی مورد استفاده در ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها است که به دلیل ایمنی بالا، غیر سمی بودن، سازگاری زیستی، خواص ژل‌کنندگی بالا (وابسته به دما و pH)، سهولت در تشکیل دانک‌ها و قابلیت هضم آن می‌باشد [۱۷-۱۵]، همچنین آلژینات سدیم در pH پایین تجزیه می‌شود تا پروبیوتیک‌ها در شرایط گوارشی آزاد شوند [۱۸]. بنابراین آلژینات سدیم یکی از بهترین بیوپلیمرها برای استفاده در میکروکپسول‌ها برای محافظت و تحویل کنترل‌شده پروبیوتیک‌ها در محیط روده می‌باشد [۱۵]. خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی بالا از جمله ظرفیت امولسیفایری، توانایی تشکیل ژل و ظرفیت تشکیل فیلم، پروتئین‌ها را به ماده پوشش‌دهنده عالی تبدیل کرده است که کاربردهای زیادی در صنایع غذایی دارد [۱٤]. کازئینات سدیم در سیستم تحویل، بهبود تشکیل امولسیون و پایداری آن توسط کاهش کشش سطحی و تشکیل لایه محافظتی در اطراف قطرات روغن کاربرد دارد، همچنین دارای خواص عملکردی برجسته‌ای مانند تغلیظ‌کنندگی، امولسیون کنندگی، تشکیل کف و پایداری حرارتی می‌باشد. با توجه به pH اسیدی معده و خنثی در روده، رفتار وابسته به pH کازئین می‌تواند برای رهایی کنترل‌شده مواد مفید باشد. علاوه بر این، کازئین می‌تواند در روشی مستقل از انرژی به غشای پلاسمایی نفوذ کند و جذب سلولی را افزایش دهد. همچنین ساختار پیچ‌خورده[22] کازئین، آن را به راحتی در دسترس پروتئولیز قرار داده و رهاسازی خوبی توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک در دستگاه گوارش را فراهم می‌کند [۱۹]. به دلیل حساسیت کازئینات سدیم به pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک آن، ممکن است به تنهایی قادر به فراهم نمودن شرایط ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال نباشد که این مسئله اثر منفی بر پایداری امولسیون دارد؛ بنابراین محققین ترکیب دو ماده به عنوان مواد دیواره را پیشنهاد می‌کنند [۲۰].

تأثیر آلژینات سدیم و کازئینات سدیم به عنوان عامل پوشش‌دهی بر روی افزایش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک از جمله سویه لاکتوباسیلوس در شرایط گوارشی، در تحقیقات مشابه گزارش شده است. کی و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر پوشش‌دهی دوگانه لاکتوباسیلوس رامنوسوس توسط آلژینات سدیم و متوکسیل پکتین با چگالی کم یا K-کاراگینان در شرایط شبیه‌سازی شده گوارشی را بررسی نموده و دریافتند فرآیند پوشش‌دهی تأثیر مثبتی بر افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک دارد [۱٦]. مطلبی و همکاران (۲۰۲۱)

15 Extrusion
16 Fluidized bed coating
17 Electrospinning
18 Coacervation process
19 Sol-Gel encapsulation
20 Microencapsulation
21 Encapsulants
22 Enfold structure

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]
[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

نیز گزارش کردند ترکیب پکتین با آلژینات سدیم در افزایش زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La_5 تأثیر بسزایی داشت [۲۱]. در پژوهش شاه‌مرادی و همکاران (۲۰۲۳) گزارش شد پوشش‌دهی دوگانه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La_5 و سلنیوم با کازئینات سدیم و موسیلاژ دانه ریحان، زنده‌مانی این باکتری پروبیوتیک را در شرایط اسیدی آزمایشگاهی افزایش داد [۲۲]. در تحقیق اُبروی و همکاران (۲۰۲۱) تأثیر پوشش‌دهی لاکتوباسیلوس رامنوسوس با آلژینات سدیم و ترکیب آن با کازئینات سدیم نیز بررسی شد و گزارش شد فرآیند پوشش‌دهی باعث افزایش زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک شد [۲۳].

هدف از ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک تثبیت و حفظ قابلیت حیات در طول فرآیند، استفاده در فرمولاسیون‌های غذایی و قرارگیری در شرایط گوارشی بدن انسان است؛ این مطالعه به منظور بررسی تأثیر فرآیند ریزپوشانی بر تغییرات میزان بقای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La_5) ریزپوشانی شده در بستر ترکیبی کربوهیدرات- پروتئین (آلژینات سدیم- کازئینات سدیم) در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان انجام شد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- فعال‌سازی باکتری‌های پروبیوتیک:

در این تحقیق از کشت خالص لیوفلیزه باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(La_5) (Pro-Gen- Batch NO.: R LAA5-165) استفاده شد. به‌منظور فعال‌سازی باکتری‌ها و تهیه سوسپانسیون باکتریایی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ۱۰ml محیط کشت MRS براث[۲۳] تحت شرایط هوازی تلقیح، و به مدت ٤۸ -۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه (انکوباتور یخچال‌دار Binder- KB 400) شد. ایجاد کدورت در محیط نشان‌دهنده رشد کلنی باکتری‌ها بود. سپس سلول‌ها توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (HERMLE- Z 326 K- آلمان) با دور ۳۰۰۰rpm در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه جداسازی و برای فرآیند انکپسولاسیون آماده شدند [۲٤].

۲-۲- ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک:

ریزپوشانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La_5) با استفاده از تکنیک امولسیون‌سازی در بستر آلژینات سدیم (Sigma- Aldrich, CAS NO.: 90005-38-3) و کازئینات سدیم (Sigma- Aldrich, CAS NO.: 90005-46-3) در پنج سطح غلظتی به‌صورت تک غلظتی و ترکیب دو ماده شامل ۲۵ درصد آلژینات سدیم و ۷۵ درصد کازئینات سدیم، ۵۰ درصد آلژینات سدیم و ۵۰ درصد کازئینات سدیم و ۷۵ درصد آلژینات سدیم و ۲۵ درصد کازئینات سدیم انجام شد. بدین منظور یک قسمت از سوسپانسیون باکتریایی حاوی 10^{9}-10^{10} CFU/g با ٤ قسمت آلژینات سدیم و کازئینات سدیم با ویسکوزیته متوسط توسط همزن مغناطیسی مخلوط و به مخلوط روغن گیاهی(کانولا) که در حال هم خوردن بود، به صورت قطره قطره اضافه و جهت تشکیل امولسیون آلژینات سدیم و کازئینات سدیم و روغن گیاهی به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۹۰۰ rpm توسط سانتریفیوژ با هم مخلوط شدند. برای شکستن امولسیون و تشکیل میکروانکپسول‌های آلژینات سدیم و کازئینات سدیم از روش ژلاتیناسیون خارجی استفاده شد؛ بدین منظور ml ۲۰۰ محلول کلرور کلسیم ۰/۱M به صورت قطره قطره به داخل امولسیون آلژینات سدیم/ سلول باکتری و همچنین کازئینات سدیم/ سلول باکتری و روغن گیاهی در حال هم زدن به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰ rpm اضافه شد و برای تکمیل عمل ژلاتیناسیون و تشکیل میکروانکپسول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه به حالت سکون باقی ماند. مخلوط به دست آمده شامل دو فاز روغنی در بالا و فاز پایینی شامل میکروانکپسول‌های ته‌نشین شده در بستر بود. فاز روغنی تخلیه شده و جهت جداسازی میکروانکپسول‌ها، فاز پایینی با دور ٦۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس عمل شستشوی

23 Lactobacilli MRS (Man- Rogosa- Sharpe) broth

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

میکروانکپسول‌ها با محلول پپتون واتر انجام گردید. در نهایت کپسول‌های به‌دست آمده تا زمان استفاده در محلول کلرور کلسیم پراکنده شده و در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شد [٢٥, ٢٦].

٢-٣- شمارش تعداد سلول زنده پس از ریزپوشانی:

بلافاصله پس از ریزپوشانی، یک گرم از سلول‌های ریزپوشانی‌شده در ٩٩ml محلول سدیم سیترات ($\frac{W}{V}$) ١٪ استریل با pH معادل ٦ به‌صورت محلول درآمد و به‌مدت ١ دقیقه در دمای محیط تکان داده شد. پس از ١٠دقیقه سکون به‌منظور حل‌شدن، در محیط کشت MRS آگار تحت شرایط هوازی در ٣٧ درجه سانتیگراد به‌مدت ٧٢ ساعت انکوبه و سپس شمارش شد [٢٤].

٢-٤- بازده فرآیند ریزپوشانی:

به منظور محاسبه بازده فرآیند ریزپوشانی، میکروکپسول‌ها به محلول پپتون نمکی (١ g/L پپتون و٨/٥ g/L سدیم کلراید) در دمای ٣٧ درجه سانتیگراد اضافه و به مدت ٣٠ دقیقه برای ترکیب شدن کامل، تکان داده شدند و نتایج بازده ریزپوشانی با استفاده از معادله ١ محاسبه و به صورت تعداد واحد تشکیل کلنی (CFU/g) بیان شد [٢٧, ٢٨].

معادله ١:

$$EY=\frac{N}{N0}\times 100$$

در رابطه فوق، N تعداد سلول‌های زنده مانده آزاد شده از کپسول و N_0 تعداد سلول‌های اولیه در فرآیند ریزپوشانی می‌باشند.

٢-٥- تعداد سلول‌های ریزپوشانی شده زنده مانده در برابر نمک صفراوی:

یک گرم از سلول‌های ریزپوشانی شده در لوله آزمایش حاوی ١٠ml محلول استریل صفرا ٠/٦٪ در pH معادل ٨/٢٥ قرار گرفت و در ٣٧ درجه سانتیگراد به‌مدت ٢ ساعت انکوبه شد. در زمان‌های ٦٠، ١٢٠، ١٨٠ و ٢٤٠ دقیقه شستشو و جداسازی دانه‌ها توسط پپتون واتر ٠/١٪ صورت گرفت و شمارش باکتری‌های زنده مانده بر اساس روش بیان شده در قسمت٢-٣ انجام شد [٢٤].

٢-٦-تعداد سلول‌های ریزپوشانی شده زنده‌مانده در برابر محیط شبیه‌سازی شده اسید معده و روده، با و بدون نمک صفراوی:

یک گرم از سلول‌های ریزپوشانی شده در لوله آزمایش حاوی ١٠ml محلول استریل شبیه‌سازی شده اسید معده بدون پپسین (0.08M HCl حاوی 0.2% NaCl با pH معادل ١/٥٥) قرار گرفتند و در زمان‌های ٣٠، ٦٠، ٩٠ و ١٢٠ دقیقه تحت دمای ٣٧ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس در معرض ml ٩ مایع روده‌ای (0.05M KH_2PO_4 با pH معادل ٧/٤٣) با و بدون نمک صفرا استریل قرار گرفت و به مدت ٣٠٠، ٢٤٠، ٢١٠، ١٨٠، ١٥٠ دقیقه تحت دمای ٣٧ درجه سانتیگراد انکوبه شد. ١ml از دانک‌های حل شده برداشته شد و شمارش باکتری‌های زنده مانده بر اساس روش بیان شده در قسمت ٢-٣ انجام گرفت [٢٤].

٢-٦- روش تجزیه و تحلیل اطلاعات:

به منظور آنالیز داده‌ها از آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده گردید که در آن باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La_5) با عوامل ریزپوشانی در ٥ سطح غلظتی توضیح داده شده در بخش ٢-٢ پوشش‌دهی شد و با نمونه شاهد (L-FC) شامل باکتری‌های آزاد و پوشش‌دهی نشده مقایسه شدند، سپس با استفاده از روش برش‌دهی مناسب‌ترین تیمار انتخاب گردید. تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS (ورژن ٢١) صورت گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از روش دانکن در سطح ٥ ٪ استفاده شد.

٣-نتایج و بحث

٣-١- شمارش تعداد میکروارگانیسم‌های زنده مانده پس از ریزپوشانی و بررسی کارآیی ریزپوشانی:

نتایج حاصل از تعداد سلول‌های زنده مانده پس از ریزپوشانی در مقیاس میکرو (log CFU/g) و بازده ریزپوشانی بر حسب درصد در جدول (١) نشان داده شده است.

Table 1- Number (log CFU/g) of surviving cells after microencapsulation and microencapsulation efficiency at different treatments

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

TREATMENT	SURVIVAL CELLS	MICROENCAPSULATION EFFICIENCY (PERCENTAGE)
L-FC	10.056 ± 0.123^{a}	0.000^{e}
L-SA	9.336 ± 0.06^{b}	92.847 ± 0.805^{ab}
L-SC	8.436 ± 0.289^{e}	83.881 ± 2.146^{d}
L-SA_1SC_3	8.703 ± 0.070^{cd}	86.551 ± 1.198^{cd}
L-SA_2SC_2	9.160 ± 0.141^{bc}	91.096 ± 1.197^{bc}
L-SA_3SC_1	9.673 ± 0.047^{ab}	96.197 ± 1.093^{a}

Different lowercase letters in each column indicate a significant difference at the level ($p<0.05$). The numbers in the table are the mean of three replicates ± standard deviation. L-Fc: Free cells, L-SA: Sodium alginate, L-SC: Sodium caseinate, L-SA_1SC_3: 25% Sodium alginate+75% Sodium caseinate, L-SA_2SC_2: 50% Sodium alginate+50% Sodium caseinate, L-SA_3SC_1: 75% Sodium alginate+25% Sodium caseinate.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در آزمون تعیین تعداد سلول‌های زنده مانده پس از ریزپوشانی و کارآیی ریزپوشانی نشان داد بین تیمارهای مختلف اختلاف معناداری وجود دارد ($p<0/05$). تعداد اولیه سلول‌های زنده قبل از فرآیند ریزپوشانی در سوسپانسیون باکتریایی ۱۰/۰۵٦ CFU/g شمارش شد. طبق داده‌ها، تعداد سلول به‌دام افتاده در کپسول‌ها در تیمارهای مختلف نشان‌دهنده تعداد کم سلول‌های باکتری از دست رفته در مرحله ریزپوشانی است. با توجه به درصد بازده ریزپوشانی، تیمار L-SA_3SC_1 با ۹٦/۱۹٪ بیشترین و تیمار L-SC با ۸۳/۸۸٪ کمترین میزان به دام افتادن تعداد سلول‌های زنده در درون میکروکپسول‌ها را نشان دادند که با تحقیق Motalebi و همکاران (۲۰۲۱) در مورد ریزپوشانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La_5) و بیفیدوباکتریوم انیمالیس (BB-12) در بستر پکتین و آلژینات سدیم مطابقت دارد [۲۱]. راندمان ریزپوشانی بر خصوصیات فیزیکی مانند پایداری فیزیکی، مورفولوژی و رهاسازی موثر است؛ راندمان بالا باعث فراهمی زیستی[24] و اثربخشی بهتر می‌شود در حالی که نشت مواد فعال در اثر اضافه بار یا تخریب کپسول باعث کاهش راندمان می‌شود که ممکن است به دلیل همگن‌سازی طولانی مدت باشد [۲۹]. با توجه به جدول (۱)، راندمان در سطوح غلظتی در فرآیند پوشش‌دهی، بیشتر از ۸۳ درصد می‌باشد که مناسب بودن پوشش‌ها برای انکپسولاسیون پروبیوتیک‌ها را نشان داد. Lieu و همکاران (۲۰۲۰) دو روش ریزپوشانی اکستروژن و امولسیون‌سازی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را با هم مقایسه نموده و بیان کردند که راندمان روش امولسیون‌سازی در حدود ۹۳/۸٦ درصد است که نشان‌دهنده هم‌راستا بودن نتایج این تحقیق با پژوهش مذکور می‌باشد [۳۰].

بارگذاری بالای سلولی در محدوده ٤۳٦–٦۷۳ log CFU/g ۸/۹ و بالا بودن راندمان ریزپوشانی بین ۹٦/۱۹ –۸۳/۸۸ درصد در باکتری‌های ریزپوشانی شده به دست آمده، اختلاف معناداری با یکدیگر داشتند($p<0/05$). روش‌های ملایم مورد استفاده در طی ریزپوشانی و دقت عمل مناسب، دلیل تعداد کم از دست رفتن باکتری‌ها در این مرحله می‌باشد که با نتایج Krasaekoopt و همکاران (۲۰۰٤) در بررسی تأثیر ریزپوشانی با آلژینات سدیم بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها نیز مطابقت داشت [۲٤]. همچنین Zhang و همکاران (۲۰۱۵) راندمان مناسب روش امولسیون‌سازی تک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای را تأیید کردند [۲۸]. به‌طور کلی، نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که آسیب‌های باکتریایی در طی فرآیند ریزپوشانی به روش امولسیون کم است؛ بنابراین روشی کاربردی و مناسب به نظر می‌رسد.

۳-۲- تعداد میکروارگانیسم‌های میکروانکپسوله شده زنده مانده در برابر نمک صفراوی:

تعداد میکروارگانیسم‌های آزاد و ریزپوشانی شده زنده مانده در برابر نمک صفراوی در زمان‌های صفر،۱۲۰،٦۰، ۱۸۰ و ۲٤۰ دقیقه در جدول (۲) گزارش شده است. قابلیت زیستی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس براساس زمان لازم

24 Bioavailability

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

بـرای کاهش یک پایـه لگـاریتمی (D-value) از جمعیـت اولیـه آن‌هـا محاسبه شد [۲٤].

Table 2 – Number (log CFU/g) of encapsulated cells surviving against bile salt at different times

TREATMENT	TIME(MIN)					D-VALUE
	0	60	120	180	240	
L-FC	10.820±0.145^{a}	8.270±0.130^{c}	6.940±0.098^{c}	5.506±0.251^{c}	4.846±0.119^{d}	40.209±1.353^{b}
L-SA	10.140±0.220^{b}	9.266±0.128^{a}	8.646±0.120^{a}	7.303±0.112^{a}	6.630±0.190^{ab}	68.985±7.927^{a}
L-SC	9.137±0.122^{d}	8.210±0.147^{c}	7.556±0.920^{b}	6.710±0.292^{b}	5.953±0.140^{c}	75.720±6.142^{a}
L-SA_1SC_3	9.816±0.196^{bc}	8.616±0.137^{bc}	7.660±0.111^{b}	6.820±0.155^{b}	6.350±0.088^{bc}	69.361±3.645^{a}
L-SA_2SC_2	9.416±0.116^{cd}	8.273±0.085^{c}	7.490±0.790^{b}	6.733±0.087^{b}	6.093±0.179^{c}	72.572±6.179^{a}
L-SA_3SC_1	10.010±0.138^{b}	8.886±0.270^{ab}	7.753±0.145^{b}	7.213±0.080^{a}	6.903±0.086^{a}	77.503±5.288^{a}

Different lowercase letters in each column indicate a significant difference at the level ($p<0.05$). The numbers in the table are the mean of three replicates ± standard deviation. L-Fc: Free cells, L-SA: Sodium alginate, L-SC: Sodium caseinate, L-SA_1SC_3: 25% Sodium alginate+75% Sodium caseinate, L-SA_2SC_2: 50% Sodium alginate+50% Sodium caseinate, L-SA_3SC_1: 75% Sodium alginate+25% Sodium caseinate.

تحمل صفرا به عنوان معیاری برای انتخاب سویه پروبیوتیک می‌باشد. در این تحقیق نیز محلول نمک صفراوی برای تعیین اینکه آیا پوشش آلژینات سدیم و کازئینات سدیم بقای سلول‌ها را در این محیط که شبیه به سیستم گوارشی است، افزایش می‌دهد، استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها در جدول (۲)، بین سلول‌های آزاد و تیمارهای مختلف اختلاف معناداری مشاهده گردید ($p<0/05$) و تعداد سلول با گذشت زمان کاهش یافت ولی این کاهش در تیمارهای ریزپوشانی شده نسبت به سلول‌های آزاد کمتر است. در مورد باکتری‌های آزاد، بیشترین زنده‌مانی در برابر نمک صفراوی در زمان اولیه قرار گیری در محیط صفرا و کمترین میزان زنده‌مانی در دقیقه ۲٤۰ بود و روند کاهشی با D-value معادل ٤۰/۲۰۹ برای نمونه شاهد مشاهده شد. بین تیمارهای ریزپوشانی شده، بیشترین زنده‌مانی با گذشت زمان‌های تعیین شده برای تیمار L-SA_3SC_1 با D-value معادل ۷۷/۵۰۳ و کمترین زنده‌مانی مربوط به تیمار L-SA با D-value معادل ٦۸/۹۸۵ می‌باشد؛ بنابراین ریزپوشانی تأثیر مناسبی در افزایش زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در برابر نمک صفراوی در زمان‌های تعیین شده دارد.

در اثر جذب نمک صفراوی توسط پروبیوتیک‌ها، واکنش تبادل یونی صورت می‌گیرد. در غشای آلژینات سدیم-کازئینات سدیم یک کمپلکس نامحلول بین آلژینات سدیم-کازئینات سدیم و نمک صفراوی تشکیل می‌گردد و باعث محدودیت انتشار نمک به داخل میکروکپسول می‌شود که از سلول‌های ریزپوشانی شده در برابر نمک صفراوی محافظت می‌کند. نقطه ایزوالکتریک[25] کازئینات سدیم ٦/٤ است؛ مولکول‌های کازئینات سدیم در معرض محیط گوارشی، بارهای مثبت خالص حمل می‌کنند بنابراین به دفع یکدیگر تمایل دارند در نتیجه میکروکپسول‌ها حل شده و محافظت از باکتری‌ها را از دست می‌دهند. در مقابل، گروه‌های کربوکسیل آلژینات سدیم پیوندهای هیدروژنی قوی با گروه‌های آمیدی و کربوکسیل مولکول‌های کازئینات سدیم تشکیل می‌دهند که آلژینات سدیم استحکام شبکه پلیمری را افزایش داده، از انحلال میکروکپسول‌ها جلوگیری می‌کند و از سلول‌های درون ماتریکس پلیمری محافظت می‌کند [۳۱]. Kim و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی تأثیر ریزپوشانی بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(ATCC43121) گزارش دادند ریزپوشانی روش موثری در افزایش تحمل نمک‌های صفراوی توسط باکتری است که با نتایج این تحقیق هم‌راستا است [۳۲]. در مطالعات Kailasapathy (۲۰۰٦) و

25 Isoelectric Point

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

Chandramouli و همکاران (۲۰۰٤) در زمینه تأثیر ریزپوشانی بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها با استفاده از غلظت‌های بین ۱ تا ۳ درصد نمک‌های صفراوی گزارش شد که زنده‌مانی پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده بیشتر از سلول‌های پروبیوتیک آزاد می‌باشد [۳۳, ۳٤].

۳-۳- تعداد میکروارگانیسم‌های ریزپوشانی شده زنده مانده در برابر اسید معده و محیط روده شبیه‌سازی شده با و بدون نمک صفراوی:

قبل از اینکه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بتواند به عنوان یک محصول عملگرا استفاده شود و اثرات مثبتی بر سلامتی داشته باشد، باید در طول عبور از محیط معده تا زمانی که به تعداد کافی برای تکثیر در روده بزرگ نیاز است[۲٦]، زنده بماند. در این تحقیق زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی‌شده در مدت زمان انکوباسیون ۱۲۰-۰ دقیقه در محلول شبیه‌سازی شده معده و مدت زمان ۳۰۰-۱۵۰ دقیقه در محلول شبیه‌سازی شده روده در دو حالت با و بدون نمک صفراوی آزمایش شد [۲٤].

۳-۳-۱- تعداد میکروارگانیسم‌های ریزپوشانی شده زنده مانده در برابر اسید معده:

تعداد میکروارگانیسم‌های آزاد و ریزپوشانی شده زنده مانده در برابر محیط شبیه‌سازی شده معده در زمان‌های صفر، ۳۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در جدول (۳) گزارش شده است. قابلیت زیستی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس براساس زمان لازم برای کاهش یک پایه لگاریتمی (D-value) از جمعیت اولیه آن‌ها محاسبه شد [۲٤].

Table 3 - Number (log CFU/g) of microencapsulated cells surviving against gastric acid

TREATMENT	TIME(MIN)					D-VALUE
	0	30	60	90	120	
L-FC	10.486±0.170^{a}	7.933± 0.061^{b}	5.870±0.140^{c}	4.893±0.257^{c}	2.976±0.180^{d}	16.001±0.744^{c}
L-SA	9.956±0.061^{bc}	8.863±0.145^{a}	7.173±0.085^{b}	6.336±0.132^{a}	5.176±0.115^{ab}	25.120±0.764^{a}
L-SC	9.333±0.182^{d}	8.543±0.462^{ab}	6.846±0.070^{b}	5.541±0.120^{bc}	4.076±0.159^{c}	22.831±0.352^{b}
L-SA_1SC_3	9.990±0.125^{b}	9.106±0.142^{a}	8.036±0.015^{a}	6.103±0.159^{a}	5.273±0.092^{a}	25.445±0.384^{a}
L-SA_2SC_2	9.543±0.070^{cd}	8.810±0.174^{a}	7.136±0.055^{b}	6.266±0.128^{a}	5.036±0.140^{ab}	26.712±0.536^{a}
L-SA_3SC_1	9.323±0.085^{d}	8.470±0.045^{ab}	7.070±0.121^{b}	5.846±0.081^{ab}	4.863±0.095^{b}	26.912±0.514^{a}

Different lowercase letters in each column indicate a significant difference at the level ($p<0.05$). The numbers in the table are the mean of three replicates ± standard deviation. L-Fc: Free cells, L-SA: Sodium alginate, L-SC: Sodium caseinate, L-SA_1SC_3: 25% Sodium alginate+75% Sodium caseinate, L-SA_2SC_2: 50% Sodium alginate+50% Sodium caseinate, L-SA_3SC_1: 75% Sodium alginate+25% Sodium caseinate.

با توجه به نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها در آزمون تعداد میکروارگانیسم‌های ریزپوشانی شده زنده مانده در برابر اسید معده، بین سلول‌های آزاد و تیمارهای مختلف اختلاف معناداری وجود دارد ($p<0/05$). پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه در تمامی تیمارها زنده‌مانی کاهش یافت اما در نمونه‌های ریزپوشانی شده، زنده‌مانی نسبت به نمونه شاهد به‌طور قابل توجهی بیشتر حفظ شده است($p<0/05$). به دلیل مقاومت کم نسبت به شرایط اسیدی، بقای سلول‌های آزاد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در حضور شیره معده وجود نداشت و تعداد سلول‌های آزاد در عرض ۱۲۰ دقیقه به ۲/۹۷٦ CFU/g کاهش یافت که در مقابل در شرایط و زمان مشابه در تیمارهای ریزپوشانی شده بین ٦/۳۳٦ CFU/g – ٤/۰۷٦ به‌دست آمد. با توجه به نتایج، بیشترین اثر زنده‌مانی در تیمارها مربوط به تیمار L-SA_3SC_1 با D-value معادل ۲٦/۹۱۲ می‌باشد و در مقابل سلول‌های آزاد(L-FC) با D-value معادل ۱٦/۰۰۱ کمترین زنده‌مانی را داشتند. روند بقای بهتر میکروکپسول‌ها به‌دلیل عدم تماس مستقیم سلول‌ها با محیط اسیدی و تأخیر در نفوذ شیره معده می‌باشد؛ در نتیجه منجر به افزایش زنده‌مانی و افزایش قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها می‌شود که هدف ریزپوشانی است. در این

26 Colonization

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

مطالعه، زنده‌مانی بهتر سلول‌های ریزپوشانی‌شده در محیط شبیه‌سازی شده معده احتمالاً با اثر هم‌افزایی آلژینات سدیم و کازئینات سدیم و همچنین با پیش‌سازگاری سلول‌های باکتریایی در ژل‌های کازئینات با pH پایین توجیه می‌شود [۳۵].

نتایج مشابهی در تحقیق Shamoradi و همکاران (۲۰۲۳) در مورد تأثیر ریزپوشانی با کازئینات سدیم در افزایش زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ریزپوشانی شده نسبت به سلول‌های آزاد وجود دارد [۲۲]. همچنین Oberoi و همکاران (۲۰۲۱) و Holkem و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش کردند که ریزپوشانی با آلژینات سدیم بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط اسیدی گوارشی موثر است [۲۳, ۲۶].

۳-۳-۲- تعداد میکروارگانیسم‌های ریزپوشانی شده زنده مانده در برابر محیط روده شبیه‌سازی شده با و بدون نمک صفراوی: تعداد میکروارگانیسم‌های آزاد و ریزپوشانی شده زنده مانده در برابر محیط شبیه‌سازی شده روده در حضور نمک صفراوی در زمان‌های ۱۵۰، ۱۸۰، ۲۱۰، ۲۴۰ و ۳۰۰ دقیقه در جدول (٤) گزارش شده است. قابلیت زیستی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس براساس زمان لازم برای کاهش یک پایه لگاریتمی (D-value) از جمعیت اولیه آن‌ها محاسبه شد [۲٤].

Table 4– Number (log CFU/g) of microencapsulated cells surviving against the simulated intestinal environment with bile salt

TREATMENT	TIME(MIN)					D-VALUE
	150	180	210	240	300	
L-FC	2.603 ± 0.165^{d}	1.43 ± 0.160^{d}	0.923 ± 0.188^{d}	0.566 ± 0.073^{d}	0^{d}	46.220 ± 2.974^{b}
L-SA	4.813 ± 0.045^{a}	4.043 ± 0.065^{b}	3.523 ± 0.090^{b}	3.556 ± 0.187^{ab}	3.036 ± 0.060^{ab}	67.573 ± 1.775^{ab}
L-SC	3.580 ± 0.105^{c}	3.246 ± 0.060^{c}	2.826 ± 0.145^{c}	2.426 ± 0.135^{c}	2.156 ± 0.176^{c}	86.024 ± 14.200^{a}
L-SA_1SC_3	5.046 ± 0.065^{a}	4.573 ± 0.140^{a}	4.256 ± 0.068^{a}	3.826 ± 0.040^{a}	3.426 ± 0.173^{a}	74.629 ± 7.690^{ab}
L-SA_2SC_2	4.423 ± 0.450^{b}	3.973 ± 0.073^{b}	3.653 ± 0.132^{b}	3.280 ± 0.110^{b}	2.866 ± 0.135^{b}	84.146 ± 8.964^{a}
L-SA_3SC_1	4.750 ± 0.140^{ab}	4.550 ± 0.079^{a}	4.116 ± 0.090^{a}	3.833 ± 0.102^{a}	3.383 ± 0.030^{a}	88.184 ± 7.078^{a}

Different lowercase letters in each column indicate a significant difference at the level ($p<0.05$). The numbers in the table are the mean of three replicates ± standard deviation. L-Fc: Free cells, L-SA: Sodium alginate, L-SC: Sodium caseinate, L-SA_1SC_3: 25% Sodium alginate+75% Sodium caseinate, L-SA_2SC_2: 50% Sodium alginate+50% Sodium caseinate, L-SA_3SC_1: 75% Sodium alginate+25% Sodium caseinate.

تعداد میکروارگانیسم‌های آزاد و ریزپوشانی شده زنده مانده در برابر محیط شبیه‌سازی شده روده بدون نمک صفراوی با شرایط مشابه با نمک صفراوی در جدول (۵) گزارش شده‌اند. قابلیت زیستی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس براساس زمان لازم برای کاهش یک پایه لگاریتمی (D-value) از جمعیت اولیه آن‌ها محاسبه شد [۲٤].

Table 5- Number (log CFU/g) of microencapsulated cells surviving against the simulated intestinal environment without bile salt

TREATMENT	TIME(MIN)					D-VALUE
	150	180	210	240	300	
L-FC	2.850 ± 0.069^{d}	2.430 ± 0.070^{e}	2.120 ± 0.124^{d}	0.920 ± 0.600^{c}	0.296 ± 0.145^{d}	47.037 ± 1.678^{d}
L-SA	4.956 ± 0.037^{a}	4.436 ± 0.075^{b}	3.753 ± 0.135^{b}	3.326 ± 0.136^{b}	3.123 ± 0.04^{b}	65.508 ± 2.339^{c}
L-SC	3.830 ± 0.110^{c}	3.573 ± 0.097^{d}	3.153 ± 0.106^{c}	2.900 ± 0.045^{b}	2.090 ± 0.953^{c}	69.618 ± 8.337^{bc}
L-SA_1SC_3	4.863 ± 0.080^{a}	4.526 ± 0.085^{b}	3.986 ± 0.055^{b}	3.636 ± 0.125^{ab}	3.243 ± 0.08^{b}	74.419 ± 6.066^{bc}
L-SA_2SC_2	4.606 ± 0.015^{b}	4.153 ± 0.060^{c}	3.750 ± 0.090^{b}	3.433 ± 0.115^{ab}	3.146 ± 0.102^{b}	82.995 ± 5.339^{b}
L-SA_3SC_1	4.916 ± 0.051^{a}	4.780 ± 0.026^{a}	4.593 ± 0.083^{a}	4.263 ± 0.104^{a}	4.006 ± 0.05^{a}	131.941 ± 3.783^{a}

Different lowercase letters in each column indicate a significant difference at the level ($p<0.05$). The numbers in the table are the mean of three replicates ± standard deviation. L-Fc: Free cells, L-SA: Sodium alginate, L-SC: Sodium caseinate, L-SA_1SC_3: 25% Sodium alginate+75% Sodium caseinate, L-SA_2SC_2: 50% Sodium alginate+50% Sodium caseinate, L-SA_3SC_1: 75% Sodium alginate+25% Sodium caseinate.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

با توجه به نتایج به‌دست آمده در جداول(٤)و(٥)از مقایسه میانگین داده‌ها در آزمون تعداد میکروارگانیسم‌های ریزپوشانی شده زنده‌مانده در محیط روده با و بدون نمک صفراوی، بین سلول‌های آزاد و تیمارها اختلاف معناداری وجود دارد ($p<0/05$) و با گذشت زمان در همه تیمارها زنده‌مانی کاهش یافت. بیشترین زنده‌مانی در تیمارها، مربوط به تیمار $L\text{-}SA_3SC_1$ با D-value معادل ۱۳۱/۹٤۱در محیط روده بدون نمک صفراوی و ۸۸/۱۸٤ در حضور نمک صفراوی است و کمترین زنده‌مانی مربوط به سلول‌های آزاد با D-value معادل ٤۷/۰۳۷ در محیط روده بدون نمک صفراوی و ٤٦/۲۲۰ در حضور نمک صفراوی است؛ بنابراین میکروانکپسولاسیون در شرایط روده می‌تواند سبب افزایش زنده‌مانی باکتری‌ها شود. همچنین بین شرایط با و بدون نمک صفراوی، تیمارها در محیط روده بدون نمک صفراوی زنده‌مانی بیشتری نسبت به وجود نمک صفراوی نشان دادند. در پژوهش Zeashan و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی ریزپوشانی بر زنده‌مانی پروبیوتیک، سلول‌های آزاد در مقایسه با سلول‌های ریزپوشانی شده روند کاهشی سریعی را نشان دادند؛ در این تحقیق از آلژینات سدیم نیز استفاده شد که بقای پروبیوتیک را در شرایط شبیه‌سازی شده روده بهبود بخشید [۳٦]. Oberoi و همکاران (۲۰۲۱) بر روی بررسی اثر ریزپوشانی لاکتوباسیلوس رامنوسوس اعلام کردند استفاده از آلژینات سدیم در ترکیب با صمغ زانتان می‌تواند اثر محافظت کنندگی در محیط روده داشته باشد [۲۳]. از طرفی در تحقیقی Mokarram و همکاران (۲۰۰۹) پس از انکوباسیون گونه‌های ریزپوشانی شده، D-value لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوسوس با آلژینات سدیم در محیط شبیه‌سازی شده معده (٦۰ دقیقه) و سپس محلول روده‌ای (pH ۷.۲۵، ۲ ساعت)، را به ترتیب ۳۰/۸٤ CFU/g و ۲٦/٤۳ CFU/g اعلام کردند در حالی که برای سلول‌های آزاد به ترتیب ۱٦/۱۹ CFU/g و ۱٥/۱۳ CFU/g به دست آمد [۳۷]. در تحقیق Krasaekoopt و همکاران (۲۰۰٤) نیز سلول‌های ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در کپسولی از آلژینات سدیم پس از انکوباسیون متوالی در شیره‌های شبیه‌سازی شده معده و روده، با و بدون نمک صفراوی، بهتر از سلول‌های آزاد زنده ماندند و پوشش کیتوزان بقای سلول ها را بیش از سایر مواد پوشش افزایش داد [۲٤]. نتایج تحقیق حاضر با تمامی تحقیقات ذکر شده هم‌راستا می‌باشد.

٤-نتیجه‌گیری

در مورد مصرف مواد غذایی پروبیوتیک، علاوه بر تعداد استاندارد باکتری پروبیوتیکی که باید به روده برسد، شرط اصلی ایجاد اثرات فراسودمند مورد نظر و قابلیت زنده ماندن باکتری‌های پروبیوتیک تا رسیدن به انتهای دستگاه گوارش است، به صورتی که سویه میکروبی باید در مقابل شرایط اسیدی معده و نمک‌های صفراوی موجود در روده کوچک در طول هضم و فرآوری مقاوم بوده و از بین نرود. اهمیت و تنوع فرآورده‌های پروبیوتیک و موفقیت روش ریزپوشانی برای بهبود قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها، باعث افزایش توجه به این روش شده است. نتایج به دست آمده از باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La_5 در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم وکازئینات سدیم به روش امولسیون‌سازی در این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از این روش انکپسوله کردن باعث افزایش زنده‌مانی این پروبیوتیک نسبت به نمونه آزاد شده است؛ به‌طوری که اختلاف معناداری بین افزایش زنده‌مانی سویه‌های میکروانکپسوله نسبت به باکتری‌های آزاد در تمامی آزمون‌ها مشاهده شد. از طرفی استفاده از ترکیب آلژینات سدیم و کازئینات سدیم به عنوان عامل پوشش دهنده در موفقیت‌آمیز بودن میکروانکپسولاسیون نقش به سزایی داشت. طبق نتایج به‌دست آمده، می‌توان گفت که ریزپوشانی باکتری اثر مثبتی بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در طی قرار گرفتن در معرض شبیه سازی محیط دستگاه گوارش دارد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

۵-منابع

[1] Rahmati, F., (2018). Identification and characterisation of Lactococcus starter strains in milk-based traditional fermented products in the region of Iran. *AIMS Agriculture & Food*, 3(1).

[2] Sohrabpour, S., M. Rezazadeh Bari, M. Alizadeh, and S. Amiri, (2021). Investigation of the rheological, microbial, and physicochemical properties of developed synbiotic yoghurt containing Lactobacillus acidophilus LA-5, honey, and cinnamon extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(4), p: e15323.

[3] Rashidinejad, A., A. Bahrami, A. Rehman, A. Rezaei, A. Babazadeh, H. Singh, and S.M. Jafari, (2022). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their application in functional/synbiotic dairy products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(9), p: 2470-2494.

[4] Gao, J., X. Li, G. Zhang, F.A. Sadiq, J. Simal-Gandara, J. Xiao, and Y. Sang, (2021). Probiotics in the dairy industry—Advances and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), p: 3937-3982.

[5] Mofid, V., A. Izadi, S.Y. Mojtahedi, and L. Khedmat, (2020). Therapeutic and nutritional effects of synbiotic yoghurts in children and adults: a clinical review. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12, p: 851-859.

[6] Homayouni, A., A. Azizi, M. Ehsani, M. Yarmand, and S. Razavi, (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111(1), p: 50-55.

[7] María Remes-Troche, J., E. Coss-Adame, M. Ángel Valdovinos-Díaz, O. Gómez-Escudero, M. Eugenia Icaza-Chávez, J. Antonio Chávez-Barrera, . . . M. Antonio Lira-Pedrín, (2020). Lactobacillus acidophilus LB: A useful pharmabiotic for the treatment of digestive disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 13, p: 1756284820971201.

[8] Amiri, S., Z.M. Moghanjougi, M.R. Bari, and A.M. Khaneghah, (2021). Natural protective agents and their applications as bio-preservatives in the food industry: An overview of current and future applications. *Italian Journal of Food Science*, 33(SP1), p: 55-68.

[9] Afzaal, M., A.U. Khan, F. Saeed, M.S. Arshad, M.A. Khan, M. Saeed, A. Ahmed, (2020). Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Science & Nutrition*, 8(3), p: 1649-1656.

[10] Coelho, S.C., B.N. Estevinho, and F. Rocha, (2021). Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying–A review. *Food Chemistry*, 339, p: 127850.

[11] Saini, A., D. Panwar, P.S. Panesar, and M.B. Bera, (2021). Encapsulation of functional ingredients in lipidic nanocarriers and antimicrobial applications: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, p: 1107-1134.

[12] Dos Santos, D.X., A.A. Casazza, B. Aliakbarian, R. Bedani, S.M.I. Saad, and P. Perego, (2019). Improved probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in a mousse containing Lactobacillus acidophilus La-5 microencapsulated with inulin by spray drying. *Lwt*, 99, p: 404-410.

[13] Yang, M., Z. Liang, L. Wang, M. Qi, Z. Luo, and L. Li, (2020). Microencapsulation delivery system in food industry—Challenge and the way forward. *Advances in polymer technology*, 2020(1), p: 7531810.

[14] Timilsena, Y.P., M.A. Haque, and B. Adhikari, (2020). Encapsulation in the food industry: A brief historical overview to recent developments. *Food and Nutrition Sciences*, 11(6), p: 481-508.

[15] Sánchez-Portilla, Z., L.M. Melgoza-Contreras, R. Reynoso-Camacho, J.I. Pérez-Carreón, and A. Gutiérrez-Nava, (2020). Incorporation of Bifidobacterium sp. into powder products through a fluidized bed process for enteric targeted release. *Journal of dairy science*, 103(12), p: 11129-11137.

[16] Qi, X., S. Simsek, B. Chen, and J. Rao, (2020). Alginate-based double-network hydrogel improves the viability of encapsulated probiotics during simulated sequential gastrointestinal digestion: Effect of biopolymer type and concentrations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, p: 1675-1685.

[17] Amine, K.M., C.P. Champagne, Y. Raymond, D. St-Gelais, M. Britten, P. Fustier, . . . M. Lacroix, (2014). Survival of microencapsulated Bifidobacterium longum in Cheddar cheese during production and storage. *Food Control*, 37, p: 193-199.

[18] Martin, M., F. Lara-Villoslada, M. Ruiz, and M. Morales, (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated Lactobacillus fermentum CECT5716. *LWT-Food Science and Technology*, 53(2), p: 480-486.

[19] Głąb, T.K. and J. Boratyński, (2017). Potential of casein as a carrier for biologically active agents. *Topics in Current Chemistry*, 375, p: 1-20.

[20] Lu, Y., B. Zhang, H. Shen, X. Ge, X. Sun, Q. Zhang, W. Li, (2021). Sodium caseinate and acetylated mung bean starch for the encapsulation of lutein: Enhanced solubility and stability of lutein. *Foods*, 11(1), p: 65.

[21] Motalebi Moghanjougi, Z., M. Rezazadeh Bari, M. Alizadeh Khaledabad, S. Amiri, and H. Almasi, (2021). Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus LA-5 and

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

Bifidobacterium animalis BB-12 in pectin and sodium alginate: A comparative study on viability, stability, and structure. *Food Science & Nutrition*, 9(9), p: 5103-5111.
[22] Shahmoradi, Z., M.A. Khaledabad, and S. Amiri, (2023). Effect of co-encapsulation of Lactobacillus acidophilus LA5 and selenium in hydrogelated matrix of basil seed mucilage/sodium caseinate on properties of set yogurt. *Food Bioscience*, 55, p: 103039.
[23] Oberoi, K., A. Tolun, Z. Altintas, and S. Sharma, (2021). Effect of alginate-microencapsulated hydrogels on the survival of lactobacillus rhamnosus under simulated gastrointestinal conditions. *Foods*, 10(9), p: 1999.
[24] Krasaekoopt, W., B. Bhandari, and H. Deeth, (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International dairy journal*, 14(8), p: 737-743.
[25] Sheu, T. and R. Marshall, (1993). Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 58(3), p: 557-561.
[26] Holkem, A.T., G.C. Raddatz, J.S. Barin, É.M.M. Flores, E.I. Muller, C.F. Codevilla, C.R. de Menezes, (2017). Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT-Food Science and Technology*, 76, p: 216-221.
[27] Santacruz, S. and M. Castro, (2018). Viability of free and encapsulated Lactobacillus acidophilus incorporated to cassava starch edible films and its application to Manaba fresh white cheese. *LWT*, 93, p: 570-572.
[28] Zhang, Y., J. Lin, and Q. Zhong, (2015). The increased viability of probiotic Lactobacillus salivarius NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*, 71, p: 9-15.
[29] Auwal, S.M., M. Zarei, C.P. Tan, and N. Saari, (2018). Comparative physicochemical stability and efficacy study of lipoid S75-biopeptides nanoliposome composite produced by conventional and direct heating methods. *International Journal of Food Properties*, 21(1), p: 1646-1660.
[30] My Dong, L., T.H. Le Quyen, T. Duc Thang, and D. Thi Kim Thuy, (2020). The Effects of Extrusion and Internal Emulsion Microencapsulation Methods on the Viability of Lactobacillus acidophilus. *Journal of Human Environment and Health Promotion*, 6(1), p: 1-5.
[31] Liu, H., J. Gong, D. Chabot, S.S. Miller, S.W. Cui, J. Ma, . . . Q. Wang, (2016). Incorporation of polysaccharides into sodium caseinate-low melting point fat microparticles improves probiotic bacterial survival during simulated gastrointestinal digestion and storage. *Food hydrocolloids*, 54, p: 328-337.
[32] Kim, S.-J., S.Y. Cho, S.H. Kim, O.-J. Song, I.-S. Shin, D.S. Cha, and H.J. Park, (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3), p: 493-500.
[33] Kailasapathy, K., (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*, 3(2), p: 39-48.
[34] Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris, and M. Jones, (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect Lactobacillus spp. in simulated gastric conditions. *Journal of microbiological methods*, 56(1), p: 27-35.
[35] Nag, A., K.-S. Han, and H. Singh, (2011). Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *International Dairy Journal*, 21(4), p: 247-253.
[36] Zeashan, M., M. Afzaal, F. Saeed, A. Ahmed, T. Tufail, A. Ahmed, and F.M. Anjum, (2020). Survival and behaviour of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated human gastrointestinal and technological conditions. *Food Science & Nutrition*, 8(5), p: 2419-2426.
[37] Mokarram, R., S. Mortazavi, M.H. Najafi, and F. Shahidi, (2009). The influence of multi-stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*, 42(8), p: 1040-1045.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus La_5 at Sodium Alginate and Sodium Caseinate Matrix and its viability under Simulated Gastrointestinal Conditions

Fatemeh Hosseini Tabatabaei [1], Amir Hossein Elhamirad [2*], Reza Karazhiyan [3], Hojjat Karazhiyan [4], Mohammad Armin [5].

1- Ph.D. student, Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

2- Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

3- Research Institute for Industrial Biotechnology, Department of Industrial Microbial Biotechnology, ACECR, Mashhad, Iran.

4- Department of Food Science and Technology, Torbat-e Heydarieh Branch, Islamic Azad University, Torbat-e Heydarieh, Iran.

5- Department of Agriculture, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received:2024/7/21

Accepted:2024/9/11

Keywords:

Microencapsulation,

Probiotic,

Lactobacillus acidophilus,

Sodium alginate,

Sodium caseinate

DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144.

*Corresponding Author E-ahelhamirad@yahoo.com

ABSTRACT

The viability of probiotics in sensitive environments, particularly gastrointestinal conditions, is of significant importance. In this study, we used microencapsulation to increase the viability of probiotics Lactobacillus acidophilus La5 under simulated gastrointestinal conditions. These bacteria were microencapsulated using the emulsification method in a matrix of Sodium alginate and Sodium caseinate at five concentration levels, individually and in combination. Then it was examined for viable cell count, encapsulation yield, survival against bile salts, and viability against gastric acid and intestinal fluid with and without bile salts. Our results showed significant differences between the treatments in all tests when comparing the average data ($p<0.05$). The survival of free cells in digestive conditions decreased sharply; however, microencapsulation acted as a protective role, and the survival of microencapsulated strains was higher than that of free cells. The results showed that microencapsulation acts as a protective mechanism for improving the viability of microencapsulated strains compared to free cells. On the other hand, the combination of Sodium alginate and Sodium caseinate as an encapsulant can significantly increase the bacteria's resistance to digestive conditions ($p<0.05$). Among the treatments, the free cells (L-FC) treatment showed the lowest survival against the simulated digestive environment. In the viability test in the intestinal environment with bile salt, no live cells were present after 300 minutes. However, in contrast, the treatment 75% Sodium alginate + 25% Sodium caseinate ($L\text{-}SA_3SC_1$), had the highest encapsulation yield and exhibited the best protective effect against bile salts, gastric acid, and intestinal fluid. In conclusion, microencapsulation using the emulsification method with a combination of Sodium alginate and Sodium caseinate effectively enhances the survival of Lactobacillus acidophilus, thus having potential beneficial effects on human health, particularly in reducing gastrointestinal diseases.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-13]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.159.144]