

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

رضا رضایی مکرم^{1*}، سید علی مرتضوی²، محمد باقر حبیبی نجفی²،
فخری شهیدی²، مرتضی خمیری³

1- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد

2- عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد

3- عضو هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه گرگان

(تاریخ دریافت: 87/5/24 تاریخ پذیرش: 87/10/29)

چکیده

به منظور بهبود قابلیت زنده مانی در شرایط نامساعد معده و روده باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC 1643 بوسیله آلترینات کلسیم میکروکپسول شد و در شرایط شبیه سازی شده معده و روده به مدت 0، 30، 60، 90، 120 دقیقه در 37 درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. قابلیت زیستی باکتری بر حسب مدت زمان مورد نیاز برای کاهش یک پایه لگاریتمی در جمعیت میکروبی (D_v) محاسبه شد. برای تعیین نحوه پراکنش اندازه ذرات کپسول از روش پارتیکل سایز آنالایزر استفاده گردید. برای مطالعه شکل ظاهری کپسول ها از تکنیک SEM استفاده شد. میکروانکپسولاسیون در سطح $p < 0/05$ سبب کاهش مرگ باکتری های پروبیوتیک در شرایط اسیدی معده (pH 1/5, 2 h) می شود. همچنین پس از گرمخانه گذاری به مدت 60 دقیقه در شرایط شبیه سازی شده معده و دو ساعت در شرایط مشابه شیر معده (pH 7/25) تعداد سلولهای زنده برابر $6/5 \log cfu / g$ بدست آمد در حالیکه این مقدار برای سلولهای شاهد $2/3 \log cfu / g$ بود.

کلید واژگان: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، میکروانکپسولاسیون، آلترینات کلسیم

1 - مقدمه

که در مقیاس میکروسکوپی این پدیده را میکروانکپسولاسیون می نامند [1 و 2].
بر حسب تعریف، پروبیوتیک ها به میکروارگانیسمهای زنده ای گفته می شوند که پس از دریافت به مقدار معین دارای توانایی ایجاد ویژگیهای سلامت بخشی خاصی هستند که این ویژگیها فرای خواص معمول مواد غذایی است [3] استفاده از این میکروارگانیسم ها در دهه

میکروانکپسولاسیون یکی از بزرگترین نوآوریهای افرینش محسوب می شود و نقطه آغاز حیات بشمار می رود در طی 2-3 میلیاردسال طبیعت با محصور کردن مولکولهای حیاتی در واحدهای ساختمانی به نام سلول امکان حیات را بر روی کره خاکی میسر نموده است. انسان نیز با الهام از طبیعت سعی کرده است تا ترکیبات مورد نیاز خود را تغلیظ و پوشش دهی و حفاظت نماید

* مسئول مکاتبات: rmokarram@tabrizu.ac.ir

2- مواد و روشها

2-1 - آماده سازی میکروارگانیسمها

لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس PTCC 1643¹ از سازمان پژوهشهای علمی صنعتی بخش کلکسیون میکروبی خریداری شد. یک ویال لیوفلیزه از باکتری در 5 ml محیط مایع MRS (Merck Germany) تلقیح و به مدت زمان 24 ساعت در 37 درجه سانتیگراد در شرایط هوازی تکثیر شد. سپس نمونه حاصل در 95 ml محیط مایع MRS تلقیح و تحت شرایط فوق تکثیر گردید. بیومس حاصل بوسیله سانتریفیوژ در 3000×g برای مدت 5 دقیقه و دمای 4 درجه سانتیگراد جداسازی و در دو مرحله با محلول استریل 0/1 در صد پپتون شسته و در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری شد.

2-2 - کپسولاسیون باکتریها

میکروانکپسولاسیون باکتریها با استفاده از روش ژلاتیناسیون خارجی [21] که قبلاً توسط تراستراپ (2002) و الان (2008) نیز گزارش شده، اجرا شد [22و 23]. مراحل روش را می توان بطور خلاصه چنین بیان کرد، ابتدا 10 گرم آلژینات (Sigma A 2033; High mannuronic acid) ایجاد کننده ویسکوزیته متوسط در یک لیتر آب مقطر فاقد یون، حل شد. سپس 18 گرم از محلول فوق با یک گرم سوسپانسیون باکتریایی مخلوط و ترکیب حاصل در 100 گرم روغن نباتی مایع، حاوی مقدار 5 g/l توپین 80 (P 8074 Sigma) با استفاده از همزن مغناطیسی در 900 rpm به مدت 20 دقیقه پراکنده گردید. در مرحله بعد با افزودن 32 ml امولسیون حاوی یون کلسیم (تهیه شده از انحلال 60 گرم روغن نباتی مایع، 5 g/l توپین و 62/5 mM کلرور کلسیم) عمل ژلاتیناسیون آغاز شد. میکروکپسولهای آلژینات با ادامه همزدن بمدت 20 دقیقه تشکیل یافته و اجازه داده شد تا به مدت زمان 30 دقیقه دیگر نیز در شرایط فوق باقی بماند تا ژلاتیناسیون کامل شود. در نهایت کپسولها با محلول 0/1 در صد پپتون بر روی کاغذ صافی شسته و با

گذشته عمومیت بیشتری یافته است و به صورت افزودنی در صنایع مختلف بکار گرفته شده اند. بر حسب استانداردها، برای بروز ویژگیهای سلامت زایی این باکتریها باید به تعداد 10^6 تا 10^7 سلول زنده در هر گرم از محصول مصرف شده وجود داشته باشند [4-6]. عوامل متعددی بر زنده ماندن و نحوه فعالیت این باکتریها تاثیر گذار هستند که از جمله می توان از دمای نگهداری [8و 9]، pH [9]، غلظت اسید لاکتیک و اسید استی [10] و شرایط فراوری [11] نام برد. از عمده ترین ترکیبات مورد استفاده در کپسولاسیون پروبیوتیکها آلژینات سدیم است. این صمغ یک هترو پلی ساکارید خطی متشکل از واحدهای ساختمانی D - مانورونیک اسید¹ و L - گولورونیک اسید² می باشد و از جلبکهای دریایی استخراج می شود. کپسولهای آلژینات را می توان به روشهای اکستروژن و امولسیون تهیه کرد [12و 13]. دلایل استفاده از آلژینات را می توان در ارزانی سهولت کاربرد و زیست سازگاری آن خلاصه کرد [14-16]. این ماده به هنگام ایجاد ژل دارای منافذی با قطر حدود 17 نانومتر است و بخوبی می تواند باکتریها را که در اندازه میکرون هستند در خود بدام اندازد [14]. با این حال ژل حاصل در شرایط اسیدی شدید و یا حضور یونهای تک ظرفیتی اندکی ناپایدار خواهد بود [17]. در چنین شرایطی مولکولهای صمغ دچار تغییر وضعیت شده [18] و در نتیجه باکتریهای بدام افتاده در محیط رها می شوند [9]. بر اساس برخی تحقیقات حداکثر حجم سلولهای قابل نگهداری در این کپسولها 25% حجم کپسول است [20] برای غلبه بر چنین شرایطی کپسولها را مجدداً در محلول 0/1 % آلژینات غوطه ور می کنند تا با تشکیل یک لایه حفاظتی جدید مقاومت آنها را افزایش دهند. در مقاله پیش رو مطالعه ای را در اختیار دارید که تاثیر کپسولاسیون را بر روی قابلیت زنده ماندن پروبیوتیکها نحوه پراکنش اندازه ذرات کپسول و خواص ظاهری آنها در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش مطالعه شده است.

2-5- بررسی قابلیت زنده مان

لاکتوباسیوس / اسیدوفیلوس PTCC 1643

در شرایط شبیه سازی شده معده

این مشاهده بر اساس روش توصیفی بوسیله (Rao et al., 1989) انجام گردید [24]. یک گرم از کپسول حاوی باکتری بطور کامل در 10 ml شیر شبیه سازی شده معدی (0/08 M HCl و 0/2 در صد NaCl و pH حدود 1/5) بدون حضور پپسین پراکنده و برای مدت‌های 0، 30، 60، 90 و 120 دقیقه در دمای 37 درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از گذشت زمان لازم، کپسولها جداسازی و بوسیله محلول 0/1 در صد پپتون شسته و تعداد باکتریها با روش گفته شده در قسمت 2-3 با سه تکرار شمارش شدند.

2-6- بررسی قابلیت زیستی سلولها پس

از گرمخانه گذاری متوالی در شرایط شبیه

سازی شده معده و روده

1 گرم از میکروکپسولهای تازه و حاوی باکتری مورد آزمایش ابتدا در 10 ml محلول معدی به مدت 60 دقیقه و دمای 37 درجه گرمخانه گذاری شدند، آنگاه با محلول سود خنثی و در 9 ml محلول شبیه شیر روده (M 0/05 KH₂PO₄ و pH حدود 7/25 و 0/6 در صد نمکهای صفراوی گاوی (oxgall; 70168 Sigma) استریل شده بوسیله میکروفیلتر 0/2 μm (0.2 μm, 0/2 μm IWAKI, Japan) 2032-013 برای زمانهای 30، 60، 90 و 120 دقیقه در 37 درجه، گرمخانه گذاری شدند. پس از گذشت زمانهای مورد نظر 1 گرم از کپسول مورد نظر به روش گفته شده در بند 2-3 با سه تکرار مورد شمارش قرار گرفت.

2-7- آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی صورت گرفت (نرم افزار MINITAB ویرایش

استفاده از همین محلول در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

2-3- شمارش تعداد باکتریهای بدام

افتاده در کپسولها

1 گرم از نمونه های کپسول تهیه شده در 99 ml محلول 1% w/v سدیم سیترات استریل در pH حدود 6 پراکنده و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق همزده شد تا کپسولها بطور کامل حل و باکتریها آزاد شوند، آنگاه با استفاده از محیط جامد MRS در شرایط هوایی، دمای 37 درجه و به مدت زمان 24 ساعت گرمخانه گذاری شد و تعداد باکتریها شمارش گردیدند، این شمارش در سه تکرار صورت پذیرفت.

2-4- آزمون فیزیکی کپسولها

2-4-1- تعیین اندازه ذرات ونحوه پراکنش آنها

اندازه کپسولهای حاصل از هر یک از تیمارها و فراوانی هریک از آنها با استفاده از دستگاه اندازه گیری قطری ذرات¹ مدل (SALD-2101 SHIMADZU Japan) تعیین گردید. برای این منظور کپسول ها در آب یون زدایی شده (Milli Q Millipore USA) با ضریب هدایت 0/054 μs پراکنده و نتایج براساس قطر حجم میانگین² (VMD) ذرات ± استاندارد خطا، d_{peak} و همچنین d₁₀، d₅₀ و d₉₀ گزارش شدند.

2-4-2- تعیین مرفولوژی ذرات برای تعیین

مرفولوژی ذرات و مشاهده شکل ظاهری آنها از میکروسکوپ الکترونی و تکنیک SEM استفاده شد. بدین جهت کپسولها بوسیله چسب دو طرفه بر روی کوتر (SC 7620 England) تثبیت و به مدت 2 دقیقه بوسیله طلا و پالادیم پوشش داده شدند. مشاهده کپسولها بوسیله میکروسکوپ الکترونی مدل (LEO 1450 VP Germany) با تابش الکترونی 10 Kv انجام پذیرفت.

2004)، بررسی تفاوت معنی دار بین میانگین داده ها نیز با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

قطر حجم میانگین کپسولها (VMD)، $0/161 \mu m \pm$ 23/758 بود. قطر 90% (d₉₀) ذرات مساوی و یا کمتر از 35/641 میکرون، 50% (d₅₀) مساوی 23/901 میکرون و برای 10% کپسولها (d₁₀) قطری مساوی و یا

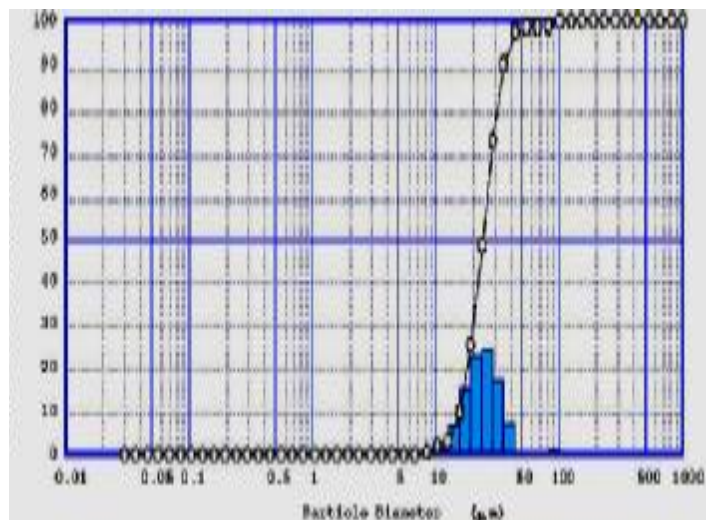
3 - نتایج و بحث

3-1- شمارش تعداد باکتریهای بدام افتاده

در کپسولها و تعیین اندازه ذرات ونحوه

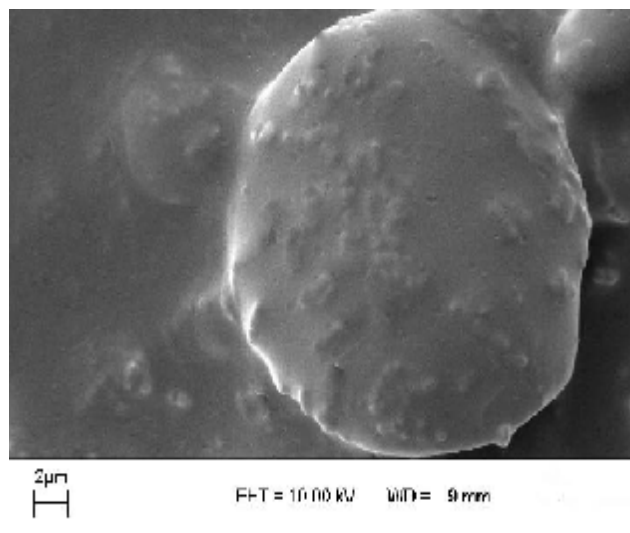
پراکنش آنها

تعداد اولیه سلولهای زنده قبل از کپسولاسیون log cfu / ml 10/01 - 9/02 محاسبه شد. برحسب داده های بدست آمده تعداد سلول بدام افتاده در کپسولها در حد $9/0 - 9/2 \log cfu / g$ کپسول گزارش گردید. تعداد کم از دست رفتن باکتریها در مرحله کپسولاسیون نشانه دقت مناسب بکار رفته در این مرحله است. عبارت دیگر بر اساس نتایج، کپسولاسیون تأثیری در شمار باکتریها نداشته است. مشاهده با روش SEM نشان داد که کپسولها از نظر شکل ظاهری کاملاً کروی هستند (شکل 1).



شکل 2 نمودار نحوه پراکنش اندازه ذرات میکروکپسول و در صد فراوانی آنها بر اساس داده های دستگاه اندازه گیری قطر ذرات (Particle size analyzer)

همچنین d_{peak} معادل 26/121 میکرون بدست آمد. این امر گویای آن است که می توان با این شیوه کپسولهایی با قطر میکرونی تهیه نمود که در مقایسه با انواع گزارش شده توسط سایر محققین که قطر کپسولهای تولید شده در حد میلیمتر است [25]، بافت نرمتری را در مواد غذایی ایجاد خواهند کرد. این نتیجه همچنین با گزارش (Truelstrup et al., 2002) که گفته است کپسولهای (>1 mm) موجب خشن شدن بافت افزودنیهای غذایی می شوند مطابقت دارد [22].



شکل 1 تصویر میکروسکوپ الکترونی به روش SEM از یک میکروکپسول حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

جدول 1 تعداد (کپسول\g cfu) باکتریهای زنده مانده پس از تیمار pH=1.5 در زمانهای متفاوت کمتر از 508 / 15 میکرون محاسبه گردید (شکل 2).

تیمار	زمان (دقیقه)					مقدار D_v
	0 دقیقه	30 دقیقه	60 دقیقه	90 دقیقه	120 دقیقه	
لاکتوباسیلوس	$3/3 \pm 0/2 \times 10^9$ a	$1/6 \pm 0/2 \times 10^7$ b	$1/1 \pm 0/3 \times 10^6$ b	$1/1 \pm 0/05 \times 10^5$ b	$2/8 \pm 0/2 \times 10^4$ b	$23/66 \pm 2/47^b$ *
شاهد						
اسیدوفیلوس	$3/6 \pm 0/3 \times 10^9$ a	$8/3 \pm 0/3 \times 10^8$ a	$4/1 \pm 0/2 \times 10^7$ a	$1/1 \pm 0/3 \times 10^6$ a	$2/3 \pm 0/2 \times 10^6$ a	$37/61 \pm 4/94^a$
کپسوله						

* حروف a و b مشخص کننده تفاوت معنی دار در سطح $p < 0/05$ است.

اعداد جدول میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف معیار هستند .

جدول 2 تعداد (کپسول\g cfu) سلولهای زنده مانده و مقدار D_v لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس آزاد و کپسول شده از اینکوباسیون در شرایط شبیه سازی شده روده در توالیهای زمانی مختلف pH= 7/2 و 37 درجه سانتیگراد

تیمار	زمان (دقیقه)					مقدار D_v
	0 دقیقه	30 دقیقه	60 دقیقه	90 دقیقه	120 دقیقه	
لاکتوباسیلوس	$5/6 \pm 2/3 \times 10^9$ a	$3/3 \pm 2/2 \times 10^6$ b	$2/1 \pm 0/7 \times 10^5$ b	$3/4 \pm 1/1 \times 10^4$ b	$2/2 \pm 0/4 \times 10^2$ b	$16/19 \pm 0/43^b$ *
شاهد						
اسیدوفیلوس	$4/6 \pm 5/5 \times 10^9$ a	$2/3 \pm 0/6 \times 10^7$ a	$5/2 \pm 0/7 \times 10^6$ a	$5/6 \pm 0/4 \times 10^5$ a	$4/2 \pm 1/1 \times 10^5$ a	$29/70 \pm 3/56^a$
کپسوله						

* حروف a و b مشخص کننده تفاوت معنی دار در سطح $p < 0/05$ است.

اعداد جدول میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف معیار هستند .

3-2- قابلیت زیستی سلولهای کپسوله

شده در شرایط معده همانطور که قبلا نیز اشاره شد

از محلول HCl برای ایجاد شرایط شدید اسیدی همانند آنچه که در معده می گذرد استفاده گردید و قابلیت زیستی باکتریهای اسیدوفیلوس براساس زمان لازم برای کاهش یک پایه لگاریتمی (D_v) از جمعیت اولیه آنها محاسبه شد . برای لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس 1643 PTCC با جمعیت اولیه $10^9 \times (3/6 \pm 0/1)$ - 10^9 $\times (2/3 \pm 0/4)$ در سطح احتمال $p < 0/05$ کپسولاسیون

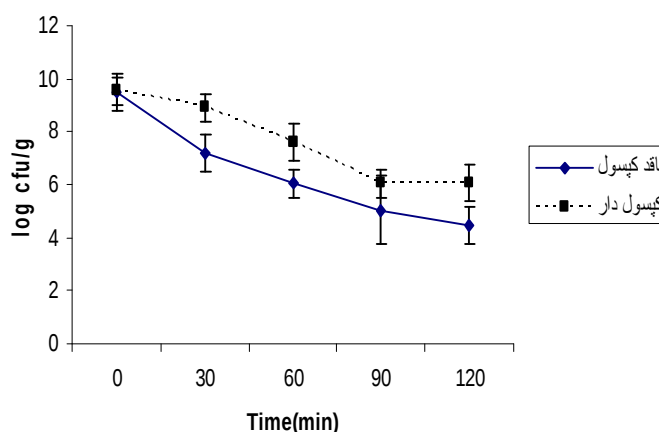
در مقایسه با انواع فاقد کپسول شرایط بهتری را برای زنده مانی فراهم می کرد (جدول 1). این نتایج با یافته های برخی محققین تفاوت دارد، بر اساس نظر این گروه در شرایط اسیدی کپسولاسیون تاثیری بر زنده مانی باکتریهای پروبیوتیک ندارد [26]. با این حال نتایج دیگری این داده ها را تایید می کند. این محققین گزارش کرده اند که در pH 1/2 پس از یک ساعت گرمخانه گذاری تمامی باکتریهای لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس نابود می شوند، در حالیکه در حالت کپسوله

3-3- قابلیت زیستی سلولهای کپسوله

شده در شرایط ترکیبی معده و روده

برای ایجاد شرایط اسیدی مشابه معده، باکتریها به مدت 60 دقیقه در شرایطی مانند آنچه که در بند قبل گفته شد قرار گرفتند، سپس پروبیوتیکها شرایطی شبیه شیر معده را برای زمانهای 0، 30، 60، 90، 120 دقیقه در 37 درجه تجربه کردند، نتایج در جدول 2 ارائه شده است. شمار اولیه سلولهای اسیدوفیلوس در حدود $10^9 \text{ cfu ml}^{-1} \times$ ($0/8 \pm 7/4$) - $(0/5 \pm 4/6)$ محاسبه شد مقدار D_v برای انواع کپسول شده $29/70 \pm 3/56$ دقیقه بدست آمد که در مقایسه با D_v سلولهای شاهد ($16/19 \pm 0/43$) دقیقه (در سطح $0/05$ تفاوت معنی داری را نشان داد، به عبارت دیگر کپسولاسیون در شرایط روده می تواند سبب افزایش زنده مانی باکتریها شود. بطور کلی قابلیت زیستی اسیدوفیلوس در شرایط ترکیبی معده و روده کمتر از حالت معده به تنهایی است که احتمالاً بدلیل نامناسب بودن pH روده (7/25) برای این باکتری اسید دوست است. این نتایج با داده های کراسی کوپت (2004) همسانی دارد [31]. بعلاوه کیم و همکاران نشان دادند که کپسولاسیون روش موثری برای تحمل بیشتر نمکهای صفراوی توسط اسیدوفیلوس ATCC 43121 خواهد بود [27]. نتایج مشابهی توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است [31-34]. از آنچه گفته شد چنین بر می آید که میکروانکپسولاسیون بر زنده مانی پروبیوتیکها تاثیر گذار است (شکل 4). جدول 2 نشان می دهد که نسبت به نمونه شاهد تعداد زنده مانده در کپسولها 10^3 بار افزایش یافته است. این نتایج با مشاهدات تراستراپ (2002) مطابقت دارد، اگر چه وی گزارش کرده است که کپسولهای کوچکتر از $100 \mu\text{m}$ نمی توانند بشکل معنی داری موجب افزایش زنده مانی پروبیوتیکها در شرایط اسیدی معده شوند [22]. به عقیده انیل (2007) تشکیل لایه محافظ هیدروژل بر روی پروبیوتیکها سبب تاخیر در نفوذ شیر معده به کپسول و در نتیجه سبب افزایش قابلیت زیستی سلولها می شود [35].

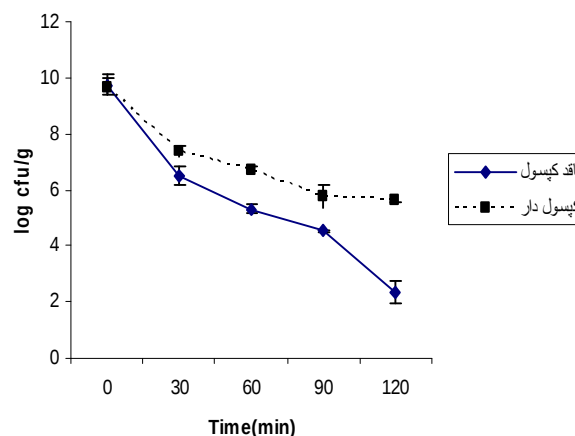
شده تعداد این باکتری در pH حدود 1/5 پس از دو ساعت به 10^6 cfu /ml می رسد [27]. همچنین ترینیدال و گراسو (2003) در آزمایشی بر روی لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس $La-5$ نشان دادند که در $pH=1$ پس از گذشت یک ساعت تقریباً هیچ باکتری زنده ای باقی نمی ماند، در حالیکه جمعیت همین باکتری در حالت کپسوله شده در شرایط اسیدی فوق پس از گذشت دو ساعت تنها یک پایه لگاریتمی کاهش می یابد [28]. چاندرامولی (2004) نیز نتایج مشابهی گزارش کرده است [29]. مطالعه حاضر نشان داد که باکتریهای لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس PTCC 1643 در حالت فاقد کپسول در $pH=1/5$ پس از گذشت 2 ساعت جمعیت اولیه آنها 5 پایه لگاریتمی کاهش می یابد، اما استفاده از کپسول در سطح $p < 0/05$ به شکل معنی داری قابلیت زیستی این باکتریها را افزایش می دهد که احتمالاً ناشی از کاهش شدت شوک وارده به باکتری است (شکل 3). این نظریه با گزارش موراتا مطابقت دارد [30].



شکل 3 نمودار نحوه تاثیر گذاری میکروانکپسولاسیون بر قابلیت زنده مانی لاکتوباسیوس اسیدوفیلوس در شرایط شبیه سازی شده معده (pH 1/5) در فواصل زمانی مختلف

4 - نتیجه گیری

کپسولاسیون به روش امولسیون موجب تشکیل کپسولهایی به قطر حجم میانگین $0/161 \mu\text{m} \pm$ $23/758 \mu\text{m}$ شد مشاهده با میکروسکوپ الکترونی به روش SEM ایجاد کپسولهای کاملاً کروی و یکسان را تایید کرد. در مقایسه بین انواع کپسول شده و سلولهای فاقد پوشش، انواع با لایه پوششی از قابلیت زیستی بهتری برخوردار بودند. همچنین در گرماخانه گذاری متوالی در شرایط معدی - روده ای، کپسولاسیون سبب افزایش D_v به مقدار $1/83$ برای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس گردید. همچنین در شرایط معدی این نوع پوشش سبب افزایش D_v به مقدار $1/58$ برا بر، برای این باکتری در مقایسه با انواع فاقد کپسول شد.



شکل 4 نمودار نحوه تاثیر گذاری میکروانکپسولاسیون بر قابلیت زنده ماندن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط ترکیبی معده (pH 1/5) بمدت 60 دقیقه و روده (pH 7/25) در زمانهای مختلف

البته باید توجه داشت که مقاومت باکتریها در شرایط آزمایشگاهی در برابر صفرا گویای رفتار واقعی آنها در دستگاه گوارش نیست، زیرا همانند سایر شوکهای فیزیولوژیک شبیه سازی واقعی آنها مشکل است. بسیار مشاهده می شود که عوامل محیطی باعث تقویت یا تضعیف مقاومت میکروارگانیسم در برابر عوامل خاص می شود. پیش تیمار باکتریها با اسیدها، دماها و شرایط اتمسفری مختلف بر مقاومت باکتری نسبت به صفرا تاثیر گذار است و می تواند سبب مقاومت شدن آنها شود. بعلاوه بر خلاف شرایط آزمایشگاهی مقدار اسیدهای صفراوی در روده و در افراد مختلف و سنین متفاوت ثابت نیست و تا زمان مصرف غذاهای پر چرب مقدار این ترکیب در روده بسیار کم خواهد بود، این خود عاملی در جهت سازگار شدن باکتریها و افزایش مقاومت آنها در برابر صفرا بشمار می رود، همچنین وجود مواد غذایی در روده می تواند سبب ایجاد سپر حفاظتی برای این میکروارگانیسمها شود و برخی از پروبیوتیکها بدون اینکه با صفرا تماس یابند در روده به فعالیت بپردازند. بالاخره فعالیت نمکهای صفراوی در شرایط آزمایشگاهی ممکن است بسیار بیش از عمل واقعی آنها در روده باشد زیرا در روده امکان ترکیب این نمکها با فسفولیپیدها نیز وجود دارد [31].

5- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئول محترم آزمایشگاه فناوریهای نوین آقای مهندس جواد قزوینی و همکاری صمیمانه آقای دکتر سجادی، خانمها مهندس صادقیان و مهندس شکیب در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی و آقایان دکتر موسویان و مهندس علیرضا بختیاری در آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی صمیمانه سپاسگزاری می شود.

6- منابع

- [1] Trau, D., Rmneberg, R., 2003. Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer by layer film: immobilization and biosensor applications, Biosensors and Bioelectronics; 18, 1491- 1499
- [2] Mokarram, R.R., Azizi, M. (1996). Micro encapsulation and its applications in food industries, In: proceeding of the 8th national congress of food industry, 219 - 225. Tehran. Iran.
- [3] Guarner, F., Schaafsma, G. J., 1998. probiotics, International Journal of Food Microbiology, 39,(3), 237-238
- [4] Picot, A., Lacroix, C., 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal

- encapsulation techniques of probiotics for yoghurt *International Dairy Journal*, 13,(1), 3-13
- [14] Klein J, Stock J, Vorlop K.D., 1983. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts; *Eur. J. Appl. Microb. Biotech.* 18, 86-91
- [15] Mokarram, R.R., Mokarram, A.R. (2000). Preparation of micro particles containing orange blossom essential oil using bee wax - alginate complex, In: proceeding of the 7th Iranian seminar of pharmaceutical sciences (ISPS), p.111. Mashhad. Iran
- [16] Martinsen, A., Skjak-Braek, C., Smidsrod, O., 1989. Alginate as immobilization material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(1), 79-89.
- [17] Smidsrod, O., Skjak-Braek, G., 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8(3), 71-78.
- [18] Gombotz, W. R., Wee, S. F., 1998. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 276-285.
- [19] Kuhn, S.P., Pfister R.M., 1989. Adsorption of mixed metals and cadmium by calcium-alginate immobilized *Zoogloea ramigera*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31; 613-8
- [20] Park, J.K., Chang, H.N., 2000. Microencapsulation of microbial cells, *Biotechnology Advances*, 18, 303- 319
- [21] Sheu, T. Y., & Marshall, R. T., (1993). Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54, 557-561.
- [22] Truelstrup Hansen, L., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y.-L., & Paulson, A. T., 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35-45.
- [23] Allan-Wojtas, P., Truelstrup Hansen, L., Paulson, A.T., 2008. *LWT* 41,101-108
- [24] Rao, A. V., Shiwnarain, N., & Maharaj, I., 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Canadian Institute of conditions and in yoghurt*, *International Dairy Journal*, 14, (6), 505-515
- [5] Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, M.R., Sohrabvandi, S., 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms, *Iranian Journal of Biotechnology*, 5, (1), 1-18
- [6] Capela, P., T.K.C. Hay, Shah, N.P., 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt, *Food Research International* 39, 203-211
- [7] Hilde M. stlie, Janneke Treimo, Judith A. Narvhus, 2005. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk, *International Dairy Journal*, 15, (10), 989-997
- [8] Vinderola, C. G., Bailo, N., Reinheimer, J. A., 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33(2), 97-102.
- [9] Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, P., 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3060-3067.
- [10] Samona A., Robinson R. K., Marakis S. 1996 acid production by *Bifidobacteria* and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk *Food Microbiology*, 13, (4), 275-280
- [11] Jaana Mättö, Hanna-Leena Alakomi, Anu Vaari, Ilkka Virkajärvi, Maria Saarela., 2006. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it *International Dairy Journal*, 16, (9), 1029-1037
- [12] Mokarram, R.R., Mokarram, A.R. 2000. Preparation of uniform size microcapsules containing pepperment oil and determination of its particle size distribution, In: proceeding of the 1st International congress on traditional medicine and material medica, p. 235 . Tehran. Iran.
- [13] Krasaekoopt, W., Bhesh Bhandari, Deeth, H., 2003. Evaluation of

- alginate gel beads containing chitosan salt and their function. *International Journal of Pharmaceutics*, 176(2), 265–268.
- [31] Krasaekoopt, W., Bhesh Bhandari, Deeth, H., 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria *International Dairy Journal*, 14,(8), 737–743
- [32] Mituoka, T., 1992. The human gastrointestinal tract. In: B. J. B. Wood (Ed.), *The lactic acid bacteria: The lactic acid bacteria in health and disease*, Vol. 1. London, NY: Elsevier Applied Science.
- [33] Buck, L. M., Gilliland, S. E., 1994. Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. *Journal of Dairy Science*, 77(10), 2925–2933.
- [34] Gilliland, S. E., Walker, D. K., 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science*, 73(4), 905–911.
- [35] Anil Kumar Anal, Harjinder Singh., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery *Trends in Food Science & Technology*, 18, 240–251
- [36] Begley, M., Cormac G.M. Gahan, Colin Hill., 2005. The interaction between bacteria and bile, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 4, 625–651
- Food Science and Technology Journal*, 22(4), 345–349.
- [25] Arnaud, J. P., Lacroix, C., Choplin, L., 1992. Effect of agitation rate on cell release rate and metabolism during continuous fermentation with entrapped growing. *Biotechnology Techniques*, 6, (3), 265–270
- [26] Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K., 2000. Encapsulation of probiotics bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 47–55.
- [27] Kim Se-Jin, Seung Yong Cho, Sae Hun Kim, Ok-Ja Song, Il-Shik Shin, Dong Su Cha, Hyun Jin park, 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, *LWT - Food Science and Technology*, 41, (3), 493–500
- [28] Favaro-Trindale, C. S., Grosso, C. R. F., 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, 19(4), 485–494.
- [29] Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M., 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 27–35.
- [30] Murata, Y., Toniwa, S., Miyamoto, E., Kawashima, S., 1999. Preparation of

The influence of alginate microencapsulation on survivability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 under simulated gastrointestinal condition

Rezai Mokarram, S. R.^{1*}, Mortazavi, S. A.², Habibi Najafi, M. B.², Shahidi F.²,
Khomeiri, M.³

1- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University,

2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University,

3- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Gorgan University,

(Received:87/5/24 Accepted: 87/10/29)

The probiotic, *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 was encapsulated in calcium alginate beads with the objective of enhancing survival during exposure to the adverse conditions of the gastro-intestinal tract. The probiotic was incubated in simulated gastro-intestinal conditions for 0, 30, 60, 90 and 120 min. at 37 °C. The survivability of the probiotic, *L. acidophilus* PTCC 1643 was expressed as the destructive value (D-value). Particle size distribution was measured using laser diffraction technique. bead appearance was observed by scanning electron microscopy (SEM). The alginate coat prevented acid-induced reduction of the probiotic in simulated gastric juice (pH 1.5, 2 h), resulting in significantly ($P < 0.05$) higher numbers of survivors due to retarding the permeation of the gastric fluid into the cells. After sequential incubation in simulated gastric (60 min) and intestinal juices (pH 7.25, 2 h), number of surviving cells were 6.5 log cfu ml⁻¹ for encapsulated *L. acidophilus* while 2.3 log cfu ml⁻¹ was obtained for free cells.

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

* Corresponding Author E-mail address: shivasheikholeslami@yahoo.com