JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره چهارم، شماره اول، بهار ۱۳۹۲
صفحات ۳۹-۲۹
دریافت مقاله: ۹۱/۱۰/۱۱
پذیرش مقاله: ۹۲/۱/۲۷

تاثیر ریزپوشانی بر روی زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در شرایط شبیه سازی شده معده و روده

محمد علی خسروی زنجانی[۱]، نیما محمدی[۲*]، کسری بهروز نسب[۳]، امیر علی صولتی[۴]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، گروه تخصصی میکروبیولوژی، تهران، ایران

۴- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، گروه دامپزشکی، ساوه، ایران

***نویسنده مسئول:** Nima.mohammadi@yahoo.com

چکیده

ریزپوشانی به عنوان یکی از جدیدترین شیوه‌ها، تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر زنده مانی پروبیوتیک‌ها دارد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده و آزاد، در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان است.

باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (1608PTCC) و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (PTCC 1644) به روش امولسیون با آلژینات کلسیم، نشاسته مقاوم ذرت و اینولین ریزپوشانی شدند و در شرایط شبیه سازی شده مایع معده (با حضور پپسین، pH=1.5) و روده (با حضور پانکراتین و نمک‌های صفراوی، pH=8) به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. اندازه و شکل ظاهری کپسول‌های تشکیل شده به وسیله میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها در سطح معنی دار منجر به افزایش بقای پروبیوتیک‌ها در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان شد ($p > ۰/۰۵$). نشاسته مقاوم ذرت، بقای پروبیوتیک‌ها را در شرایط معده و روده انسان بهبود بخشید و هیچ تاثیری بر اندازه کپسول‌ها نداشت. اندازه کپسول‌های تشکیل شده به روش امولسیون در حد میکرون بوده و از لحاظ شکل ظاهری همگی کروی بودند.

در مجموع این پژوهش نشان داد، ریزپوشانی، زنده مانی پروبیوتیک‌ها را در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان در سطح معنی داری بهبود می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی: ریزپوشانی، لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، شبیه سازی معده و روده، نشاسته مقاوم ذرت

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 4(1)29-39, 2013
Received: December 31, 2012
Accepted: April 16, 2013

The effect of microencapsulation on Lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum survival under simulated gastro-intestinal condition

Khosravi Zanjani M.A.[1], Mohammadi N.[2*], Behrooz Nasab K.[3], Solati A.A.[4]

1- Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

4- Department of veterinary medicine, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

**** Corresponding author:*** Nima.mohammadi@yahoo.com

Abstract

Microencapsulation as one of the most modern methods has remarkable effects on probiotic survival. The objective of this study is to evaluate the survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in simulated human gastro-intestinal condition.

Lactobacillus casei (PTCC 1608) and Bifidobacterium bifidum (PTCC1644) were encapsulated with calcium alginate, resistant maize starch and inulin via emulsion technique and incubated in simulated gastric juice (pepsin included, pH= 1/5) and simulated intestinal juice (pancreatin and bile salts included, pH= 8) for 2 hours at 37 oC. The morphology and size of microcapsules were measured by SEM technique and optical microscopy. The results showed that the survival of microencapsulated probiotic was increased significantly in simulated gastro-intestinal condition ($P<0.05$). Resistant maize starch was played a significant role in the protection of probiotic bacteria in simulated gastro-intestinal condition and did not affect the size of microcapsules. In the emulsion technique capsules are formed in micron range size and the shape of microcapsules was generally spherical.

In general, this study indicated that microencapsulation enhanced the survival rate of probiotic bacteria significantly in the simulated human gastro-intestinal condition.

Key words: Microencapsulation, Lactobacillus casei, Bifidobacterium bifidum, Simulated gastro-intestinal condition, Resistant maize starch.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها (Probiotics) میکروارگانیسم‌هایی هستند که اگر به تعداد کافی و به صورت زنده به روده انسان برسند، اثرات سلامتی بخش در میزبان بر جای می گذارند. فعالیت وزنده ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات سلامتی بخش است(۲۲). از اثرات سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها می‌توان به حفظ میکروفلور طبیعی روده، ارتقاء سیستم ایمنی بدن، کاهش عدم تحمل لاکتوز در افرادی که نمی توانند لاکتوز را هضم کنند، کاهش سطح کلسترول خون، و خواص ضد جهش زایی و ضد سرطانی آن‌ها اشاره کرد (۱و۲۸). بر حسب استانداردها، برای بروز ویژگیهای سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها، باید به تعداد 10^6 تا 10^7 cfu از این باکتری‌ها در هر گرم ازمحصول پروبیوتیک وجود داشته باشند. کارایی پروبیوتیک‌ها در بدن انسان، بستگی به تعداد اولیه پروبیوتیک‌ها هنگام مصرف و بقای آن‌ها در شرایط دستگاه گوارش دارد (۲۸). اکثر محصولات غذایی پروبیوتیکی و فرآوردهای دارویی حاوی لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها می باشند (۲۰و۲۸). پری بیوتیک‌ها (Prebiotics)، ترکیبات غذایی غیر قابل هضم یا با قابلیت هضم اندک هستند که علاوه بر خواص سلامتی بخش برای انسان، می‌توانند رشد و فعالیت پروبیوتیک‌ها را تشدید سازند. اینولین و نشاسته مقاوم ذرت مثالی از همین ترکیبات هستند(۵و۸). به منظور بهبود زنده مانی پروبیوتیک‌ها و کاهش اثرات تخریبی ناشی از تغییرات pH، تنش های مکانیکی، شرایط ماده غذایی و شرایط نامساعد اسیدی–صفراوی دستگاه گوارش، از فرآیند ریزپوشانی (Microencapsulation) استفاده می شود (۱۰و۱۹). از دیدگاه میکروب شناسی، ریز پوشانی عبارت است از پوشش دادن لایه‌ای از هیدرو کلوییدها به دور سلول‌های ریز زنده در مقیاس میکروسکوپی، به منظور محصور کردن و تفکیک کردن آن‌ها از محیط، که در نتیجه آن، زنده مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط مختلف محیطی افزایش می‌دهد و آزاد سازی هدفمند پروبیوتیک‌ها را (در مکان و زمان مناسب) در پی دارد (۱۱). در نتیجه ریزپوشانی، می‌تواند زنده مانی پروبیوتیک‌ها را در شرایط دشوار و تخریبی دستگاه گوارش بهبود بخشد. مطالعات زیادی در رابطه با ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با استفاده از ترکیبات گوناگون نظیر سلولز(۱۸)، ژلاتین(۲۱)، صمغ‌های گیاهی(۲۵)، چربی (۲۶) و کاپا کاراگینان (۲) صورت گرفته است، اما در این میان، آلژینات، به میزان گسترده در فرآیند ریزپوشانی استفاده شده است. این ماده از جلبک‌های دریایی استخراج شده و با کلسیم کلرید ساختار مستحکمی را بوجود می‌آورد (۲۳). از مزایای آلژینات کلسیم می‌توان به غیر سمی بودن، آسان بودن تشکیل کپسول آن و هزینه پایین آن اشاره کرد (۲۳و۲۴). پری بیوتیک‌هایی نظیر اینولین و نشاسته مقاوم ذرت، علاوه بر داشتن خاصیت پری بیوتیکی، می‌توانند به استحکام دیواره کپسول‌ها کمک کنند و باعث ارتقاء سطح زنده مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط اسیدی و تخریبی قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش، شوند (۹و۲۴و۲۷). باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به عنوان مهمترین و پرمصرف ترین باکتری‌های پروبیوتیک در صنایع غذایی و دارویی به شمار می‌روند، بنابراین بررسی بقا این باکتری با ریزپوشانی مناسب و مستحکم در داخل محصولات غذایی و داروهای پروبیوتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، از آنجایی که زنده ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات سلامتی بخش این باکتری‌ها می‌باشد، هدف این پژوهش بررسی زنده مانی دو گونه مهم پروبیوتیکی، لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش به صورت آزاد و ریزپوشانی شده است.

مواد و روش کار

آماده سازی میکروارگانیسم ها: باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (Lactobacillus casei PTCC 1608) و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (*Bifidibacterium bifidum* PTCC 1644) به صورت خالص و لیوفیلیزه از کلکسیون سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری و در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MRS براث (de Man- Rogasa-Sharpe Merck Germany,) در دمای ۳۷ ^{o}C به مدت ۲۴ ساعت به ترتیب در شرایط هوازی و بی هوازی فعال گردیدند. سپس نمونه حاصل در ۹۵ میلی لیتر محیط کشت MRS براث تلقیح شد و تحت شرایط فوق تکثیر گردید. بیومس حاصله بوسیله سانتریفیوژ g1500 برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ ^{o}C جدا سازی شده و در دو مرحله با محلول استریل ۰/۱ درصد آب پپتونه شسته شد (۱۶).

فرآیند ریزپوشانی: برای انجام فرآیند ریزپوشانی، ۴۰ گرم آلژینات سدیم (Sigma-Aldrich 71238) و ۱ گرم اینولین و ۲۰ گرم نشاسته مقاوم ذرت (Hi- maize 260 National starch UK) و به ۱۰۰۰میلی لیتر آب مقطر اضافه گشته سپس در اتوکلاو استریل گشت. پس ار آنکه محلول آلژینات با محیط هم دما شد با ۱ درصد سوسپانسیون میکروبی مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. برای تشکیل امولسیون، ۱۰۰ میلی لیتر از مخلوط حاصله به ۱ لیتر روغن کانولا حاوی ۰/۲ درصد امولسیفایر توئین۸۰ (Merck Germany) اضافه گشت و با سرعت (۳۰۰ rpm) به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شد تا امولسیون یکنواختی تشکیل شد، به منظور تشکیل کپسول‌ها به محلول مورد نظر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار اضافه گشت، پس از ۳۰ دقیقه، کپسول‌ها ته نشین شده، که به منظور جداسازی کپسول‌ها از سانتریفیوژg ۳۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد، در نهایت کپسول‌های جدا شده با محلول آب پپتونه ۰/۱ درصد شسته شده ودر دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۲و۲۷).

برای شمارش تعداد باکتری‌های به دام افتاده در کپسول‌ها، ۱ گرم از کپسول‌های تهیه شده را با ۹ میلی لیتر محلول استریل بافر سیترات (pH=6 , M 0/1) پراکنده کرده و به مدت ۱۵دقیقه با استفاده از دستگاه Stomacher هم زده شد تا باکتری‌ها به طور کامل در بافر آزاد شوند. سپس با استفاده از محیط جامد MRS آگار باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند و تعداد باکتری‌ها شمارش گردید (۲۷).

بررسی شکل و اندازه کپسول ها: برای تعیین اندازه ذرات از میکروسکوپ نوری مدل (Leica DMLB) استفاده گردید. قطر کپسول‌ها بوسیله آنالیز تصویری نرم افزارLeica Qwin 550 برای ۱۱۰ نمونه تصادفی ریزپوشانی شده، محاسبه شد. برای مشاهده شکل ظاهری کپسول‌ها از میکروسکوپ نوری مدل (Motic BA300) با بزرگ نمایی ×۴۰ استفاده شد و به منظور مشاهده گرانول‌های نشاسته بر سطح کپسول‌های حاوی نشاسته، محلول لوگول بر روی کپسول‌ها ریخته شد، هم چنین برای شناسایی دقیق سطح کپسول‌ها از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. بدین منظور کپسول‌ها، بوسیله چسب دو طرفه بر روی لام دستگاه، تثبیت و به مدت یک ساعت، بوسیله طلا پوشش داده شدند. مشاهده کپسول‌ها بوسیله میکروسکوپ الکترونی با تابش الکترونی ۱۵ کیلو وات انجام گرفت (۱۶).

آماده سازی شرایط شبیه سازی شده معده و روده: شرایط شبیه سازی شده شیره معده، مطابق با روش Michida و همکاران انجام گرفت (۱۵)، بدین گونه که پپسین (Sigma Aldrich P7000) با محلول سدیم کلرید ۰/۵ درصد تا رسیدن به غلظت ۳ گرم بر لیتر مخلوط شد، و سپس pH آن به وسیله اسید کلریدریک استریل (۰/۱ مولار) به ۱/۵ رسانده شد. شرایط شبیه سازی شده شیره روده مطابق روش Charteris وهمکاران انجام گرفت (۷). بدین ترتیب که، پانکراتین (Sigma Aldrich P1500) با سدیم کلرید ۰/۵ درصد، تا رسیدن به غلظت نهایی ۱ گرم بر لیتر با ۴/۵ درصد محلول نمک‌های صفراوی (Oxoid , Basingstoke , UK) مخلوط شد، سپس pH آن با محلول سود ۰/۱ مولار استریل به حدود ۸ رسانده شد. هر دو محلول حاصله بوسیله میکرو

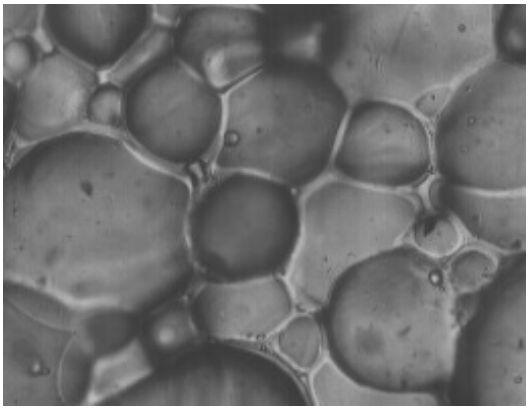
فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر (IWAKI JAPAN) استریل گشتند.

بررسی زنده مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط شبیه سازی شده مایع معده و روده: در این پژوهش، زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در ۳ حالت مختلف: آزاد (ریزپوشانی نشده)، ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و اینولین، ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم، اینولین و نشاسته مقاوم ذرت، در شرایط شبیه سازی شده معده و روده، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بدین صورت که یک گرم از پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده و یک میلی لیتر از سوسپانسیون پروبیوتیک‌های آزاد به طور جداگانه در ۱۰ میلی لیتر محلول شبیه سازی شده مایع معده و سپس در۱۰ میلی لیتر محلول شبیه سازی شده مایع روده مخلوط و به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. شمارش پروبیوتیک‌ها آزاد و ریزپوشانی شده در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه، مطابق روش ذکر شده انجام گرفت (۴).

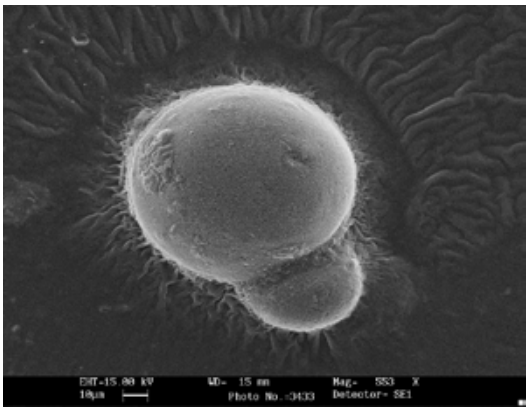
تجزیه و تحلیل آماری: طراحی آزمایش‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار توسط نرم افزار SPSS Statistics ۲۰ انجام پذیرفت. مقایسه بین نتایج بدست آمده بوسیله آزمون‌های آماری چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت و تمامی نمودارها با استفاده از نرم افزار SPSS Statistics ۲۰ رسم شد.

نتایج

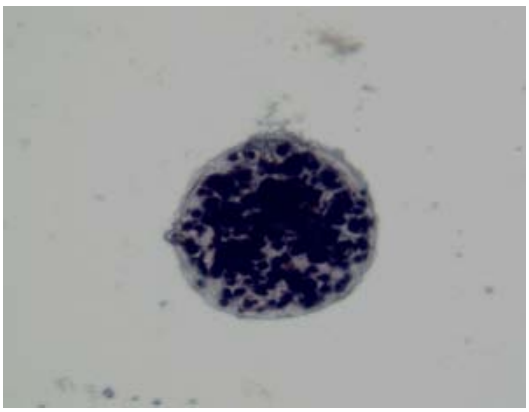
اندازه و شکل ظاهری کپسول ها: قطر میانگین ۱۱۰ نمونه کپسول با استفاده از آنالیز تصویری، برای کپسول‌های آلژینات کلسیم و اینولین حدود ۲/۳ ±۱۱۲ میکرومتر و برای کپسول‌های آلژینات کلسیم و اینولین همراه با نشاسته مقاوم ذرت حدود ۱/۴ ±۱۱۱ محاسبه شد، در نتیجه نشاسته تاثیری بر اندازه کپسول‌ها نداشت. همچنین مشاهدات صورت گرفته با میکروسکوپ نوری والکترونی در شکل ۱،۲و۳ نشان می‌دهد که کپسول‌ها از نظر شکل، کروی و بیضوی هستند و گرانول‌های نشاسته در سطح کپسول‌ها با معرف لوگول قابل شناسایی هستند.



تصویر۱- تصویر میکروسکوپ نوری از کپسول‌های آلژینات کلسیم واینولین، با بزرگ نمایی ×۴۰

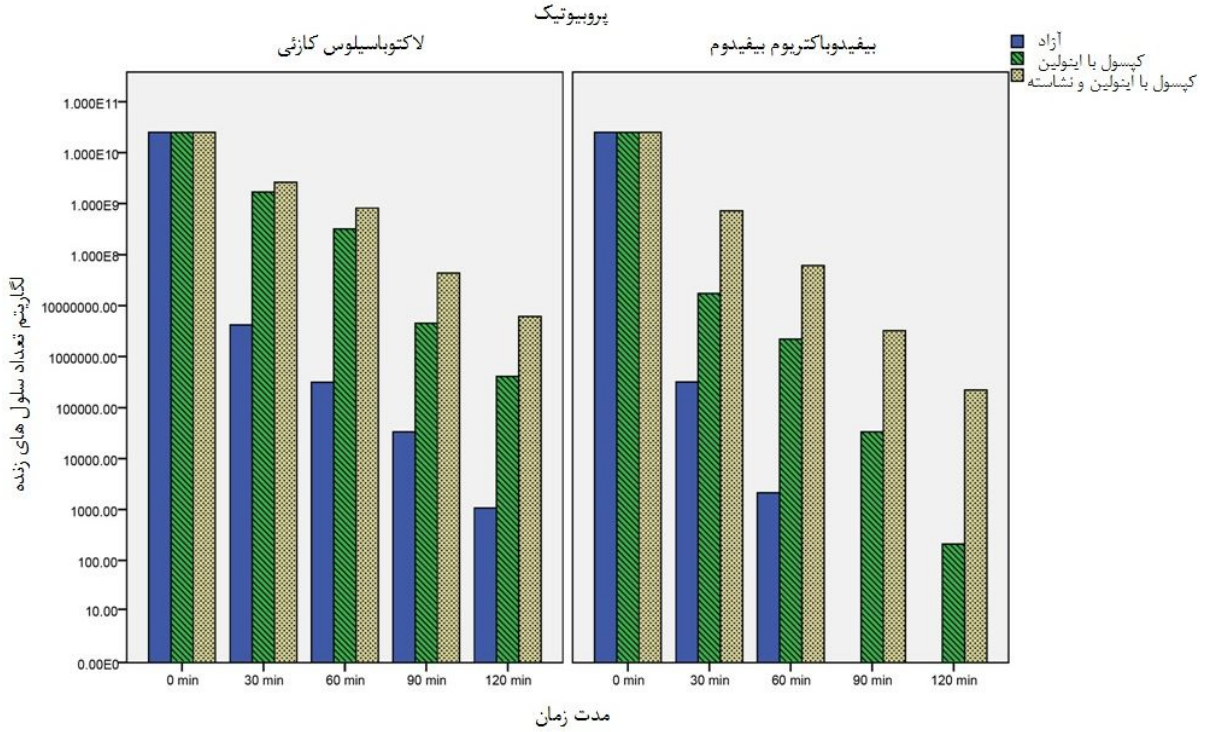


تصویر ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی کپسول‌های آلژینات کلسیم و اینولین

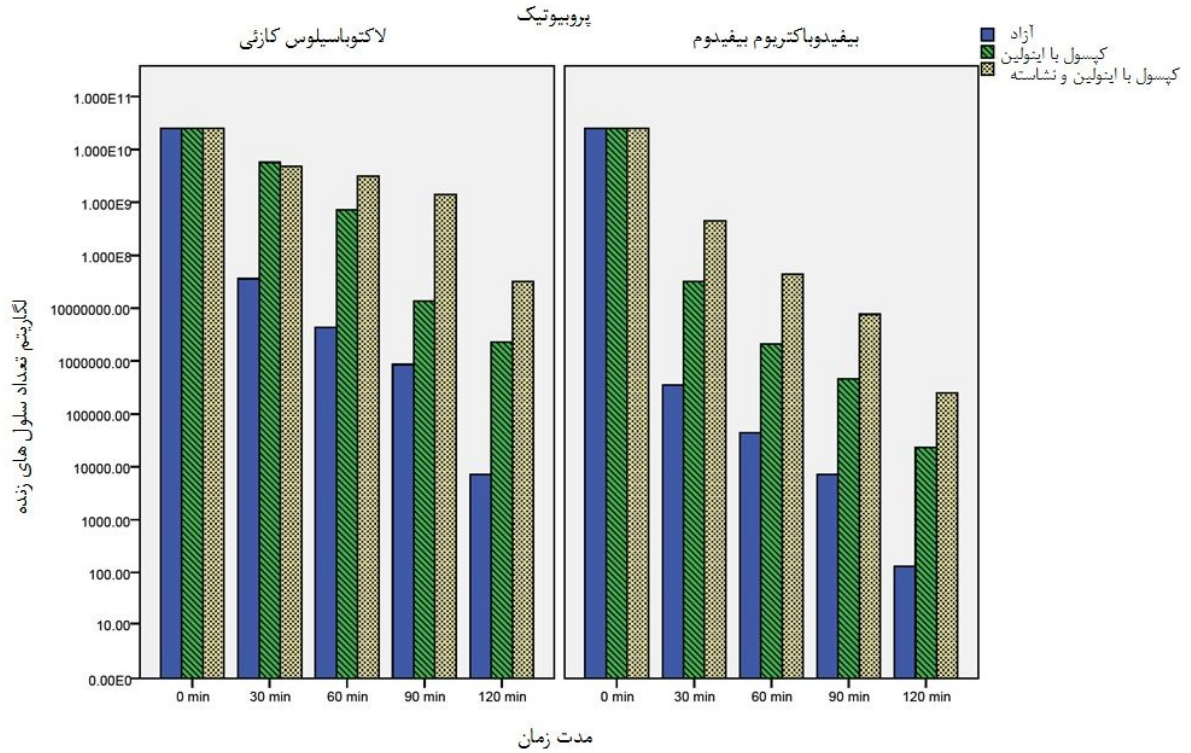


تصویر ۳- تصویر میکروسکوپ نوری از کپسول‌های آلژینات کلسیم و اینولین به همراه نشاسته، بعد از اضافه کردن محلول لوگل با بزرگ نمایی ×۴۰

زنده مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در شرایط مشابه مایع معده و روده ای: در این پژوهش زنده مانی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در ۳ حالت مختلف: آزاد (ریزپوشانی نشده)، ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و اینولین، ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم، اینولین و نشاسته مقاوم ذرت در طی ۱۲۰ دقیقه در شرایط شبیه سازی شده معده و روده، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. یافته‌های مربوط به میزان زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ریزپوشانی شده و آزاد در نمودار ۱ و ۲ به ترتیب در شرایط مشابه مایع معده و روده‌ای نشان داده شده است. با مقایسه این نمودارها نقش و تاثیر ریزپوشانی در طی ۱۲۰ دقیقه قابل ملاحظه است. فرآیند ریزپوشانی، زنده مانی پروبیوتیک‌ها را در شرایط شبیه سازی شده معده و روده چندین سیکل لگاریتمی بهبود بخشید (نمودار ۱و۲). با توجه به یافته‌های حاصله، لاکتوباسیلوس کازئی زنده مانی بیشتری را درمقایسه با بیفیدوباکتریوم بیفیدوم نشان داده است ($P < ۰/۰۵$).



نمودار۱- نمودار زنده مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در شرایط مشابه مایع معده در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه



نمودار۲- نمودار زنده مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در شرایط مشابه مایع روده در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه

بحث و نتیجه گیری

اندازه و شکل ظاهری کپسول ها: مشاهدات صورت گرفته با میکروسکوپ نوری نشان می‌دهد که کپسول‌ها از نظر شکل کروی و بیضوی هستند (شکل‌های ۱،۲و۳). همچنین مشاهدات نشان داد که ذرات نشاسته مقاوم ذرت در بافت کپسول‌های آلژینات کلسیم وجود دارند. نشاسته مقاوم ذرت و اینولین تاثیری بر روی قطر کپسول‌های تشکیل شده نداشتند. نشاسته مقاوم ذرت علاوه بر خاصیت پری بیوتیکی، با شرکت در ساختار آلژینات کلسیم، باعث استحکام ساختار کپسول‌ها می‌شود (۲۷). همچنین محققان استرالیایی گزارش کردند نشاسته مقاوم ذرت، تاثیری بر افزایش اندازه کپسول‌ها نداشته و فقط باعث استحکام ساختار کپسول‌های آلژینات کلسیم می‌گردد (۲۷). قطر میانگین ذرات که بوسیله دستگاه آنالیز تصویری اندازه گیری شد حدود ۱۱۲ میکرون بود که این ابعاد در مقایسه با انواع گزارش شده توسط برخی محققان که در ابعادی بزرگتر و یا در حد میلی متر بوده، کوچکتر بوده است (۳و۲۷)، هم چنین در صورتی این کپسول‌ها وارد مواد غذایی شوند، کوچک تر بودن کپسول‌ها تغییرات کمتری در بافت محصول و هم چنین مانع از بروز پدیده شنی شدن در ماده غذایی می‌شود (۹). در حالی که در روش‌های متعارف ریزپوشانی نظیر اکستروژن و خشک کردن پاششی ابعاد کپسول‌ها بزرگتر هستند، که این امر منجر به بوجود آمدن احساس دهانی و شنی شدن در مصرف کننده می‌شود (۱۳و۲۷). در صورتی که اندازه کپسول‌ها بسیار کوچک باشند نمی توانند محافظ خوبی برای پروبیوتیک‌ها در مواد غذایی باشند و این امر باعث نابودی پروبیوتیک‌ها می‌شود(۱۴و۲۴). گزارش شده است کپسول‌های کوچکتر از ۱۰۰ میکرومتر نمی توانند در سطح معنی داری موجب افزایش بقای پروبیوتیک‌ها در شرایط اسیدی معده شوند (۹). Hansen و همکاران گزارش کردند که در صورت اضافه شدن کپسول‌های حاوی باکتری‌های پروبیوتیک به مواد غذایی، کپسول‌های بزرگتر از ۱ میلی متر

موجب خشن شدن بافت مواد غذایی می‌شود (۹).

زنده مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در شرایط مشابه مایع معده ای: نمودار ۱، زنده مانی پروبیوتیک‌ها را در شرایط مشابه مایع معده نشان می‌دهد. در نمودار ۱، زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی آزاد و ریزپوشانی شده در طی ۱۲۰ دقیقه با بیفیدوباکتریوم بیفیدوم آزاد و ریزپوشانی شده مقایسه شده است. ریزپوشانی به طور معنی داری زنده مانی پروبیوتیک‌ها را در شرایط شبیه سازی شده شیره معده بهبود بخشید، به طوری که تعداد بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ریزپوشانی شده با آلژینات کلسیم و اینولین همراه با نشاسته مقاوم ذرت با جمعیت اولیه $۲/۵\times۱۰^{۱۰}$ cfu/g در شرایط شبیه سازی شده شیره معده پس از ۱۲۰ دقیقه به ۴×۱۰^{۵} cfu/g رسید، که زنده مانی باکتری‌ها را در مقایسه با نوع آزاد، ۵ سیکل لگاریتمی بهبود بخشید. این نتایج با یافته های Sultana و همکاران در سال ۲۰۰۰ متفاوت است، براساس نظر این گروه، در شرایط اسیدی معده، ریزپوشانی تاثیری بر روی زنده مانی باکتری های پروبیوتیکی ندارد (۲۷). در مطالعه ای که توسط Mandal و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام گرفته است، گزارش شده است که ریزپوشانی باعث افزایش قابلیت زنده مانی باکتری‌ها در pH=۱/۵ می‌شود (۱۴). Chandramouli و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز گزارش کردند که ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها، زنده مانی آن‌ها را در شرایط اسیدی شبیه سازی شده معده، چندین سیکل لگاریتمی بهبود می‌بخشد (۶). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از آلژینات کلسیم، اینولین و نشاسته مقاوم ذرت، در سطح معنی داری، قابلیت زنده مانی هر دو باکتری را افزایش می‌دهد ($P>۰/۰۵$). Brinques و همکاران در سال ۲۰۱۱ با ریزپوشانی لاکتوباسیلوس پلانتاریوم با آلژینات کلسیم و کیتوزان، قابلیت زنده مانی این باکتری را در شرایط مشابه مایع معده بهبود دادند (۴). مطالعه حاضر نشان داد که از جمعیت اولیه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم آزاد پس از ۹۰ دقیقه در شرایط مشابه مایع معده‌ای هیچ باکتری زنده‌ای باقی نماند، در حالی که لاکتوباسیلوس کازئی آزاد حتی در ۱۲۰ دقیقه نگهداری، قابلیت زنده مانی بیشتری را نشان داد که مطابق با نتایج Krasaekoopt و همکاران بود (۱۳). این محققان استرالیایی در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که بیفیدوباکتریوم بیفیدوم‌های آزاد، زنده مانی بسیار پایینی در شرایط شبیه سازی شده معده دارند (۱۳). در واقع یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که قابلیت زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط مشابه مایع معده بیشتر از بیفیدوباکتریوم بیفیدوم است که احتمالا می‌تواند ناشی از مقاومت کلی بیشتر لاکتوباسیلوس‌ها به شرایط اسیدی، نسبت به بیفیدوباکتریوم‌ها باشد (۱۳و۲۷).

زنده مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در شرایط مشابه مایع روده ای: نمودار ۲، زنده مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم را در حالت آزاد و ریزپوشانی شده در شرایط مشابه مایع روده نشان می‌دهد. در نمودار ۲، زنده مانی پروبیوتیک‌ها با جمعیت اولیه $۲/۵\times۱۰^{۱۰}$ cfu/g در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفته شده است. نتایج نشان می‌دهد که آلژینات کلسیم با اینولین و نشاسته مقاوم ذرت، زنده مانی را به طور قابل ملاحظه‌ای برای هر دو باکتری افزایش می‌دهد ($P<۰/۰۵$). برای لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ریزپوشانی شده با نشاسته مقاوم ذرت، زنده مانی به ترتیب پس از ۱۲۰ دقیقه به $۳/۲\times۱۰^{۷}$ cfu/g و $۲/۴\times۱۰^{۵}$ cfu/g می‌رسد که محافظت بهتری را نسبت به پروبیوتیک‌ها در حالت آزاد دارد. این نتایج با یافته‌های Krasaekoopt و همکاران مطابقت دارد (۱۳). محققان هندی نیز گزارش کردند که پوشش آلژینات کلسیم و نشاسته ذرت باعث ارتقاء سطح زنده مانی پرویبوتیک‌ها در شرایط روده می‌شود (۱۹). همچنین این محققان اظهار داشتند، حضور ترکیبات پری بیوتیک نظیر نشاسته مقاوم ذرت درکپسول‌های آلژینات کلسیم، سبب تاخیر در نفوذ شیره معده و روده به کپسول‌ها و در نتیجه سبب افزایش قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها

می‌شود (۱۹). Picot و Lacroix در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که گونه‌های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ریزپوشانی شده مقاومت خوبی در شرایط مشابه مایع معده و روده‌ای در مقایسه با نوع آزاد دارند (۱۷). به طور کلی قابلیت زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط مشابه روده بهتر از بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ارزیابی شده است. از آنجایی که بیفیدوباکتریوم‌ها عموما بی هوازی مطلق هستند و نسبت به شرایط اسیدی و قلیایی در مقایسه با لاکتوباسیلوس‌ها حساس تر هستند، شرایط نامساعد دستگاه گوارش منجر به کاهش بیشتر آن‌ها می‌شود (۱۳).

در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که ریزپوشانی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم با آلژینات کلسیم، اینولین و نشاسته مقاوم ذرت به طور قابل ملاحظه‌ای زنده مانی آن‌ها را در شرایط اسیدی معده و شرایط قلیایی روده بهبود ببخشد، به طوری که بقای باکتری‌های ریزپوشانی شده پس از ۱۲۰ ساعت در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش، به صورت معنی داری بیش تر از پروبیوتیک‌های آزاد بوده است.

References

1- Adams, M. (1999) Safety of industrial lactic acid bacteria. Journal of Biotechnology 68(2–3), 171-178.

2- Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I.U. Fernando, L. (2000) Viability of Microencapsulated Bifidobacteria in Set Yogurt During Refrigerated Storage. Journal of Dairy Science 83(9), 1946-1951.

3- Arnaud, J., 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.

4- Brinques, G.B. Ayub, M.A.Z. (2011) Effect of microencapsulation on survival of Lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. Journal of Food Engineering 103(2), 123-128.

5- Capela, P., Hay, T.K.C. 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(2), 203-211.

6- 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.

7- Charteris, Kelly, Morelli and Collins. (1998) Developmentandapplicationofaninvitromethodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology 84(5), 759-768.

8- Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A. Roberfroid, M.B. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutr Res Rev 17(2), 259-75.

9- Hansen, L.T., 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(1), 35-45.

10- Kailasapathy K. (2002) Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. Current Issues in Intestinal Microbiology 3- 39–48.

11- Kailasapathy, K. (2006) Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT - Food Science and Technology 39(10), 1221-1227.

12- Khalil, A.H. Mansour, E.H. (1998) Alginate Encapsulated Bifidobacteria Survival in Mayonnaise. Journal of Food Science 63(4), 702-705.

13- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H.C. (2006) Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. LWT - Food Science and Technology 39(2), 177-183.

14- Mandal, S., Puniya, A.K. Singh, K. (2006) Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated Lactobacillus casei NCDC-298. International Dairy Journal 16(10), 1190-1195.

15- Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S.S., Webb, C., Fukuda, H. Kondo, A. (2006) Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of Lactobacillus plantarum under gastrointestinal tract conditions. Biochemical Engineering Journal 28(1), 73-78.

16- Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Najafi, M.B.H. 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(8), 1040-1045.

17- Picot, A. Lacroix, C. (2004) Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Dairy Journal 14(6), 505-515.

18- Rao, A.V., Shiwnavain, N., Maharaj, I. (1989) Survival of microencapsulated Bifidobacterium pseudolongum in simulated gastric and intestinal juices. Can Inst Food Sci Technol 22- 345–349.

19- Sabikhi, L., Babu, R., Thompkinson, D. Kapila, S. (2010) Resistance of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. Food and Bioprocess Technology 3(4), 586-593.

20- Schrezenmeir, J., de Vrese, M. (2001) Probiotics, prebiotics, and synbioticsd approaching a definition. Am. J. Clin. Nutr 77- 361–364.

21- Shah, N.P. (2000) Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. Journal of Dairy Science 83(4), 894-907.

22- Shah, N.P. (2007) Functional cultures and health benefits. International Dairy Journal 17(11), 1262-1277.

23- Sheu, T.Y. Marshall, R.T. (1993) Microentrapment of Lactobacilli in Calcium Alginate Gels. Journal of Food Science 58(3), 557-561.

24- Sheu, T.Y., Marshall, R.T. and Heymann, H. (1993) Improving Survival of Culture Bacteria in Frozen Desserts by Microentrapment. Journal of Dairy Science 76(7), 1902-1907.

25- Simonoska Crcarevska, M., Glavas Dodov, M. Goracinova, K. (2008) Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 68(3), 565-578

26- Siuta-Cruce, P., Goulet, J. (2001) Improving probiotic survival rates. Food Technol 55,44–36 .

27- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N.,

Arumugaswamy, R., Peiris, P. Kailasapathy, K. (2000) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Journal of Food Microbiology 62(1–2), 47-55.

28- You, H.J., Oh, D.-K. Ji, G.E. (2004) Anticancerogenic effect of a novel chiroinositol-containing polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4. FEMS Microbiology Letters 240(2), 131-136.