فصلنامه علمی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۹، دوره ۱۵، شماره ۳، تابستان۱۴۰۱، صفحه ۷۷تا ۸۷
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

# بررسی هیستوپاتولوژیکی روده و تنوع جمعیت میکروبی در رت‌های مصرف کننده نوشیدنی ماءالشعیر و نوشیدنی چاودار حاوی لاکتوباسیلوس کازئی میکروانکپسوله

شادی رخسارطلب آذر[۱]، پروانه جعفری[۲]، امیر توکمه چی[۳]، حسن ملکی نژاد[۴و۵]

۱. دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران. نویسنده مسئول: shadi.rokhsartalab@yahoo.com
۲. استادیار میکروبیولوژی، گروه علوم پایه، میکروبیولوژی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران
۳. دانشیار میکروبیولوژی گروه علوم پایه، بخش میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴. استاد گروه داروسازی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۵. استاد گروه میکروبیولوژی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳

## چکیده

**زمینه و هدف:** نیاز جامعه بشری به سمت غذاهای سالم و مفیدتر کشیده می‌شود و از صنعت غذا انتظار می‌رود به این نیاز توجه کند. این مطالعه با هدف افزودن لاکتوباسیلوس کازئی کپسوله شده به نوشیدنی چاودار و بررسی تنوع جمعیت باکتریایی و بررسی هیستوپاتولوژی خمل‌های روده در مدل حیوانی رت انجام شد.

**مواد و روش ها:** لاکتوباسیلوس کازئی با غلظت ۲ درصد (وزنی) پلیمر آلژینات سدیم به روش امولسیونی کپسوله شد. پس از افزودن دوز استاندارد باکتری کپسوله شده به نوشیدنی چاودار، آزمایشات درون تنی بر روی ۴ گروه از موش‌های صحرایی نر بالغ به‌عنوان: شاهد، نوشیدنی مالت، نوشیدنی چاودار، و نوشیدنی چاودار با پروبیوتیک انجام شد. حیوانات نوشیدنی‌های پیشنهادی را به مدت ۲۸ روز دریافت کردند. تنوع جمعیت باکتریایی با روش مولکولی (PCR-DGGE) و بررسی هیستوپاتولوژیکی با استفاده از رنگ آمیزی (H&E) انجام گرفت.

**نتایج:** در محتویات روده موش‌های مورد مطالعه تنوع باکتریایی وجود داشته و بیشترین ترکیب جمعیتی مربوط به لاکتوباسیلوس کازئی در محتوای روده رت‌هایی که نوشیدنی چاودار با پروبیوتیک دریافت کردند، شناسایی شد. همچنین مطالعات هیستوپاتولوژیک در هیچ یک از گروه‌ها پیامد منفی نداشته است.

**نتیجه گیری:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد استفاده از تکنیک میکروکپسولاسیون می‌تواند باعث افزایش ماندگاری لاکتوباسیلوس کازئی روده شود.

**کلید واژه‌ها:** کپسولاسیون، پروبیوتیک، جمعیت میکروبی، هیستوپاتولوژیکی

**مقدمه**

شناخته‌شده‌ترین غذاهای مؤثر آن‌هایی هستند که دارای ترکیبات فعال مانند فیبر تغذیه‌ای، الیگوساکاریدها و باکتری‌های مفید که می‌توانند با باکتری‌های لوله گوارشی به تعادل برسند. در کنار ویتامین ها، مواد معدنی و ریزمغذی ها، پروبیوتیک و پربیوتیک‌ها از مواد فعال می‌با شند که امروزه وارد مواد غذایی و آشامیدنی می‌شوند(۱). اثرات سودمند مواد غذایی با اضافه کردن میکروب‌ها (پروبیوتیک‌ها) بر سلامت انسان افزایش‌یافته است. بااین‌حال با در نظر گرفتن آلرژی نسبت به شیر، بیماری‌های مربوط به کلسترول و همچنین ذائقه گیاهخواری سبب شده که محققین به این فکر کنند که محصولات غیرلبنی نیز می‌توانند حا مل مواد مؤثر ازجمله پروبیوتیک ها و پربیوتیک‌ها باشند(۲). پروبیوتیک‌ها عموماً از منابع انسانی بوده و به‌عنوان باکتری‌های غیر بیماری‌زا محسوب می‌شوند. استفاده از پروبیوتیک‌ها جهت تخمیر غلات یک رویداد منطقی برای توسعه غذاهای فراسودمند است. غلات حاوی مقدار زیادی از کربوهیدرات‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی برای میکروب‌ها طی تخمیر عمل می‌کند. بسیاری از کربوهیدرات‌ها در غلات به‌عنوان نشاسته و پس از هیدرولیز آمیلولیتیکی در دسترس باکتری قرار می‌گیرند. آنزیم‌های درونی غلات فعال‌شده و می‌توانند باعث شکست نشاسته به قندهای قابل تخمیر (مالتوز و گلوکز) شود که توسط پروبیوتیک‌ها به‌عنوان منبع کربن قابل‌استفاده است. محصولات بر پایه غلات می‌توانند سبب رشد باکتری‌ها به دلیل غلظت بالای فیبرشان ازجمله زایلوالیگوساکاریدها، زایلان، آرابینوزایلان، به‌عنوان یک بستر مناسب برای رشد پروبیوتیک‌ها باشند. علاوه بر کربوهیدرات‌ها، غلات حاوی مقدار زیادی از مواد معدنی، ویتامین‌ها، استرول‌ها و سایر فاکتورهای رشد هستند که رشد میکروب‌ها ازجمله لاکتوباسیلوس‌ها را بهبود می‌بخشد. تمام غلات منبع غنی از مواد شیمیایی گیاهی ازجمله فیتواستروژن، ترکیبات فنولی، آنتی‌اکسیدان‌ها و اسید فیتیک هستند که موجب کارایی غذاهای فراسودمند می‌شوند. در طی تخمیر در اثر بهبود شرایط pH باعث تجزیه آنزیمی فیتات و آزاد شدن مواد معدنی ازجمله منگنز (فاکتور مهم جهت رشد پروبیوتیک‌ها)، آهن، روی و کلسیم می‌شود. سویه‌های لاکتوباسیلوس به‌عنوان میکروارگانیسم‌های پیچیده شناخته شده‌اند که به کربوهیدرات‌های تخمیری، آمینواسیدها، ویتامین‌های گروه B، اسیدفولیک و مواد معدنی جهت رشد نیاز دارند. غلات دارای بستر مناسبی جهت رشد پروبیوتیک‌ها به‌خصوص لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدو باکتریوم ها بوده و همچنین کربوهیدرات های غیرقابل‌هضم خاصی هستند که به‌عنوان پربیوتیک محسوب می‌شوند که ازجمله علل استفاده از غلات در غذاهای فراسودمند است(۳-۶).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که اگر به تعداد کافی و به‌صورت زنده به روده برسند، اثرات سلامتی بخش در میزبان بر جای می‌گذارند (۷، ۸). از اثرات سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها می‌توان به حفظ میکروفلور طبیعی روده، تقویت سیستم ایمنی بدن، کاهش سطح کلسترول خون و خواص ضد جهش‌زایی

و ضد سرطانی آن‌ها اشاره کرد(۷و۸). بر اساس استانداردها، برای بروز ویژگی‌های سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها باید به تعداد $10^6$ تا $10^7$ CFU از این باکتری‌ها در هر گرم از محصول پروبیوتیک وجود داشته باشند (۸-۱۰).

ریزپوشانی (Microencapsulation) به‌عنوان یکی از نوین‌ترین شیوه‌ها عبارت است از پوشش دادن سلول‌های ریز زنده توسط لایه‌ای از هیدروکلوئید در مقیاس میکروسکوپی به‌منظور محصور کردن و تفکیک کردن آن‌ها از محیط که درنتیجه‌ی آن، زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط مختلف محیطی افزایش می‌یابد. در مورد پروبیوتیک‌ها هدف از این امر افزایش میزان ماندگاری تا حد قابل‌قبول (۱۰۶) در هنگام مصرف و محافظت از این باکتری‌ها در حین عبور از محیط اسیدی معده و محیط قلیایی روده می‌باشد (۱۱).

در این مطالعه، سویه لاکتوباسیلوس کازئی با روش امولسیون کپسوله گردید، سپس تحت شرایط استریل دانک‌های کپسول به نوشیدنی اضافه گردید. بررسی هیستولوژیکی بافت روده و بررسی تنوع جمعیت میکروبی در رت‌های مصرف کننده این نوشیدنی و رت‌های مصرف کننده نوشیدنی ماءالشعیر صورت گرفت.

## مواد و روش ها

### آماده سازی و کشت باکتری

باکتری مورد استفاده در این بررسی، لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC 1608)، از مجموعه باکتری‌ها و قارچ‌های صنعتی ایران (مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی) به صورت ویال لیوفیلیزه تهیه گردید. جهت فعال نمودن باکتری از محیط آبگوشت MRS استفاده شد. برای این کار پودر لیوفیلیزه باکتری در ۲۰ میلی‌لیتر محیط ذکر شده و دمای ۳۷°C، شرایط بی‌هوازی با حضور ۵ درصد گاز دی اکسیدکربن به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از رشد باکتری شناسایی اولیه آن به کمک رنگ آمیزی گرم، مورفولوژی و آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شد (۱۲). پس از تایید تشخیص، باکتری در حضور ۱۰ درصد گلیسرین استریل در دمای ۸۰- تا زمان استفاده ذخیره شد (۱۳).

### تهیه سوسپانسیون باکتری برای ریزپوشانی

یک پرگنه باکتری در ۱۰ میلی لیتر محیط آبگوشت MRS در دمای ۳۷ °C، شرایط بی‌هوازی و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس محیط کشت با ۲۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب حاصل دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. در پایان رسوب حاصل در سرم فیزیولوژی سوسپانسیون گردید و تراکم آن با لوله استاندارد مک فارلند شماره ۱۰ (CFU/ml $3\times10^9$) تنظیم شد(۱۴). جهت اطمینان از صحت تراکم باکتری، شمارش آن با روش Pour plate count انجام گردید. به طور خلاصه، ابتدا رقت‌هایی از سوسپانسیون تهیه شد (CFU/ml $10^{-1}$-$10^{-8}$). سپس از هر رقت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط MRS آگار کشت داده شد. کشت در دمای ۳۷ °C، شرایط هوازی و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انجام گردید. در پایان پس از ظاهر شدن پرگنه‌ها شمارش انجام و نتیجه بر

حسب CFU/ml گزارش شد، لازم به ذکر است که آزمایش در سه تکرار انجام شد(۱۵).

### تهیه محلول اولیه آلژینات سدیم ۲ درصد

۲ گرم از آلژینات سدیم به طور جداگانه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. محلول آلژینات سدیم به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل گردید و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ °C نگهداری شد(۱۶).

### ریزپوشانی

در این مطالعه برای ریزپوشانی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی از روش امولسیون استفاده شد(۱۷). ، ۱۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی با تراکم (۳×۱۰$^{۹}$ CFU/ml) به ترتیب با ۴۰ میلی‌لیتر آلژینات سدیم مخلوط شد. این مخلوط در ۱۹۸ میلی‌لیتر روغن نباتی مایع کلزا (لادن) حاوی ۵ g/l گرم توئین ۸۰ بر روی همزن مغناطیسی اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰ rpm هم زده شد. سپس ۸۰ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار تهیه شده به ترکیب اضافه و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد تا عمل ژلاتیناسیون آغاز شود. فاز روغنی جدا و دانک‌ها با استفاده از سانتریفوژ ۵۰۰×g در دمای ۴ °C به مدت ۵ دقیقه جداسازی گردید. در نهایت عمل شستشوی دانک‌ها با استفاده از پیپتون واتر ۰/۱ درصد صورت گرفت.

### شمارش تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده

یک گرم از دانک‌های باکتری ریزپوشانی شده با ۹ میلی‌لیتر محلول سیترات سدیم استریل (۲ درصد وزنی/وزنی، pH برابر با ۷) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق توسط همزن مغناطیسی، همزده شد(۱۶). سپس سوسپانسیون حاصل با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت‌سازی شد (۱۰$^{-۱}$CFU/ml– ۱۰$^{-۸}$). با استفاده از محیط MRS آگار در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۸-۲۴ ساعت کشت میکروبی داده شد. در نهایت تعداد باکتری‌ها شمارش شدند، این شمارش در سه تکرار صورت پذیرفت (۱۵).

### بررسی در مدل حیوان آزمایشگاهی

برای این منظور تعداد ۲۰ سر موش رت نر سالم در محدوده وزنی ۲۰۰-۱۵۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تهیه گردید. موش‌ها در ۴ گروه با پنج تکرار توزیع شدند: گروه شاهد فقط با آب شیر، گروه دوم با نوشیدنی مالت، گروه سوم با نوشیدنی چاودار و گروه چهارم با نوشیدنی‌چاودار حاوی پروبیوتیک به مدت ۲۸ روز تیمار شد.

ابتدا موش‌ها چند روز قبل از شروع آزمایش‌ها به بخش تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی جهت تطبیق با محیط جدید انتقال یافتند. وزن حیوانات در روز اول آزمایش، توسط ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد، همچنین در روز پایانی دوره، بار دیگر حیوانات را برای بررسی تغییرات وزن حاصل شده در طول دوره، وزن‌کشی کرده و وزن آن‌ها ثبت شد. لازم به ذکر است که در ساعات مشخصی به فاصله ۱۲ ساعت در طول شبانه روز (جهت تشنگی موش‌ها و اطمینان از مصرف مقدار مد نظر از نوشیدنی) نوشیدنی در اختیارشان قرار گرفت. برای غذا دهی موش‌ها به طور استاندارد از غذای

تجاری پلت استفاده شد و موش‌ها بدون محدودیت به آب و غذا دسترسی داشتند.

بعد از اتمام دوره، حیوانات از محل نگهداری به آزمایشگاه انتقال یافته و توسط دی اتیل اتر و در داخل دیسکاتور به آن‌ها بیهوشی سبک داده شد. نمونه‌های خون توسط سرنگ ۵ سی‌سی آغشته به هپارین جهت جلوگیری از لخته شدن با توجه به ناحیه توپوگرافیک قلب، به طور مستقیم از قلب حیوانات جمع‌آوری شد. جهت تهیه سرم از نمونه‌های خون، به مدت ۱۰ دقیقه و با دور g ×۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند. نمونه‌های سرم را به میکروتیوپ‌های اپندورف منتقل کرده و برای انجام سایر آنالیزها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

علاوه بر نمونه‌های سرم، بخشی از بافت روده و مدفوع از روده هر حیوان برداشته شد و پس از شست و شو با سرم فیزیولوژی، به دو قسمت تقسیم گردید که یک قسمت از بافت روده بلافاصله بعد از نمونه گیری با استفاده از نیتروژن مایع منجمد شده سپس در فویل آلومینیومی قرار گرفت و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد (Deep Freeze) برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی نگه‌داری شد. قسمت دیگر نیز به ظرف‌های مخصوص حاوی فرمالین ۱۰٪ برای انجام کارهای هیستوپاتولوژیک انتقال یافت(۱۸).

### بررسی هیستولوژیک خمل‌های روده به عنوان محل جذب مواد غذایی

با استفاده از رنگ آمیزی به روش H&E انجام شد. همان‌طور که ذکر شد، پس از اخذ نمونه‌ها از حیوانات، قسمتی از آن در فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند و برای انجام بررسی‌های هیستوپاتولوژیک، به آزمایشگاه بافت شناسی فرستاده شدند تا عمل مقطع برداری و رنگ‌آمیزی اختصاصی PAS انجام گیرد و سپس با کمک متخصص پاتولوژی، لام‌های مربوطه تفسیر گردیدند(۱۹).

### بررسی رفتار و تنوع پروبیوتیک‌ها پس از مصرف در کولون

روش مولکولی PCR-DGGE[1] جهت بررسی تغییرات جمعیتی گونه‌های باکتری استفاده شد. در این روش ژن کلی استخراج شده، PCR بر اساس ژن‌های ۱۶srRNA انجام شده و محصولات بر اساس الکتروفورز بر روی یک شیب دمایی از هم جدا گردید (۲۰).

### آنالیز مولکولی

استخراج DNA از نمونه های مدفوع با روش جوشاندن، انجام شد(۲۱). مایع رویی حاوی DNA آزاد شده از سلول‌های باکتریایی بود که به میکروتیوب جدید انتقال داده و برای واکنش PCR استفاده شد.

تکثیر ژن 16s rRNA با بکار بردن یک جفت پرایمر اختصاصی باکتریایی با توالی F: 5´- actcctavgggaggcagcag-3´ و R: 5´- attaccgcggctgctgg-3´صورت گرفت .

**جهت انجام DGGE** محلول پرو سولفات آمونیوم (۲۰٪ APS)، محلول پلی آکریل آمید ۳۰٪ و

[1]Polymerase Cain Reaction-Denaturation Gradient Gel Electrophoresis

محلول بافر TAE (تریس استات – EDTA) برای پر کردن تانک DGGE و ساخت ژل پلی آکریل آمید تهیه گردید.

استخراج رشته DNA از ژل پلی آکریل آمید طبق پروتکل شرکت سینا ژن انجام گردید. پس از استخراج DNA از ژل آکریل آمید، برای تقویت باند DNA بار دیگر PCR انجام شد. در این مرحله از PCR برنامه دمایی در ۳۵ چرخه با دمای واسرشت ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه اتصال ۵۴ درجه به مدت ۱ دقیقه و تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۵۵ ثانه صورت گرفت. پس از حصول اطمینان از وجود باندها، باقی محصول PCR نمونه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید.

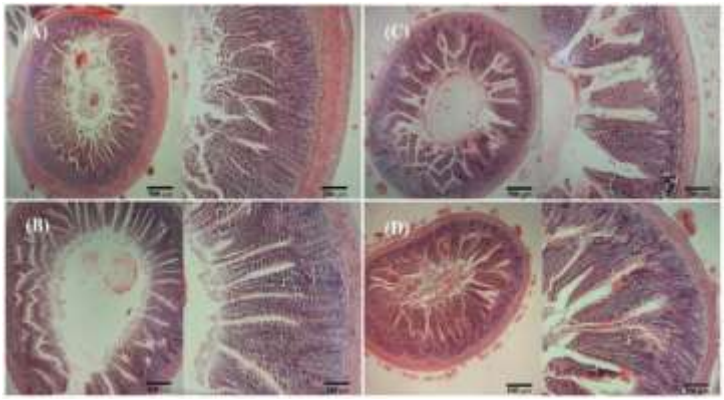
### آنالیز آماری

برای مقایسه فارماکوکینتیک گروه‌های مورد مطالعه، از برنامه ANOVA و به دنبال آن از تست Bonferroni post hoc استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean±SD) بیان شد و مقادیر P<0/05 معنی دار درنظر گرفته شد.

## نتایج

### آنالیز هیستوپاتولوژیک

در هیچ یک از گروه کنترل و گروه آزمایش ویژگی پاتولوژیکی مشاهده نشد (شکل ۱). تغییرات طول پرزها به دلیل مصرف انواع نوشیدنی‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. اثر احتمالی مصرف ۲۸ روزه مالت، نوشیدنی چاودار، و نوشیدنی چاودار با پروبیوتیک بر روی ساختار روده در اثنی عشر بررسی شد. اگرچه افزایش ناچیز اما غیر قابل توجهی از طول پرزها در نوشیدنی بر پایه مالت ثبت شد، اما هیچ تغییر قابل توجه دیگری در طول پرزهای گروه های دیگر یافت نشد.

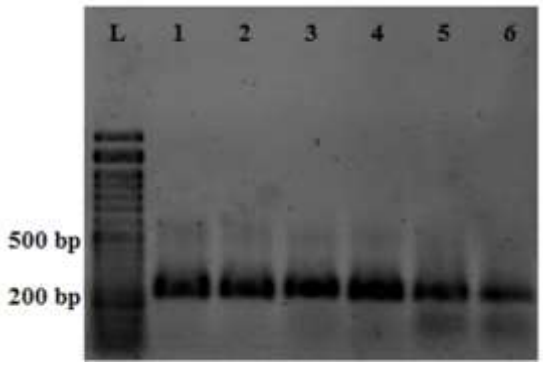


**شکل ۱. تصاویر میکروسکوپی از بافت روده با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۱۰۰× (A,B,C,D)**

### نتایج مولکولی آنالیز جدایه‌ها

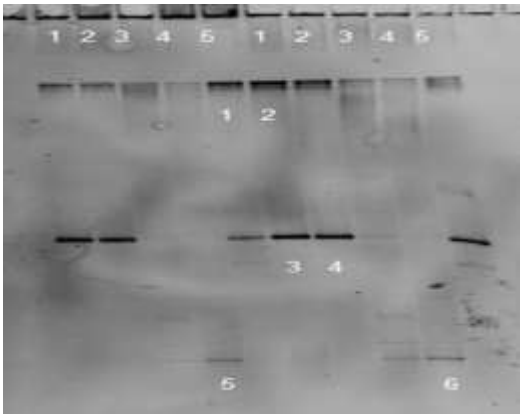
الکتروفورز محصول واکنش PCR در شکل ۲ نشان داد که در تمامی تیمارها باند یکسان و هم اندازه‌ای به وزن حدود ۲۲۰ جفت باز حاصل شد. با توجه به اینکه تکنیک PCR به تنهایی قادر به جداسازی سویه‌ها و یا حتی گونه‌های مخلوط باکتری نیست لذا از تکنیک DGGE به عنوان تکنیک مکمل برای تشخیص گونه‌ها

و یا سویه‌های باکتری‌های موجود در نمونه‌های محتویات روده تیمارها استفاده شد.




**شکل۲. الکتروفورز محصول واکنش PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد، مارکر بکار رفته از نوع bp ۵۰ بوده و ستون‌های ۱ تا٦ مربوط به تعدادی از سویه‌های باکتریایی می‌باشند.**

به کمک تکنیک DGGE قطعات بسیار نزدیک به هم DNA ، که تفاوتشان تنها در یک تا چند نوکلئوتید است شناسایی شدند. بر این اساس شکل ۳ نتایج الکتروفورز DGGE را نشان می‌دهد. این بررسی نشان داد که در محتویات روده موش‌های مورد مطالعه تنوع باکتریایی وجود داشته و بیشترین ترکیب جمعیتی مربوط به لاکتوباسیلوس کازئی (در موش‌هایی که نوشیدنی چاودار حاوی لاکتوباسیلوس کازئی را دریافت نمودند) بود.




**شکل۳. الکتروفورز ژل آکریل آمید مربوط به DGGE. نمونه ها به ترتیب از شماره ۱ الی ۵ در ۲ تکرار در ژل بار گذاری شده اند.**

بررسی نتایج تعیین توالی نشان داد که لاکتوباسیلوس کازئی و اشریشیا کلی با همپوشانی بالای ۹۵٪ و همسانی حدود ۹۲٪ مربوط به باکتری‌های دیگری نظیر انتروباکتر کلوآکه، انتروکوکوس فکالیس، باسیلوس، کلستریدیوم و پروتئوس میرابیلیس بوده است.

مطالعه توالی‌یابی شش نمونه بوسیله نرم افزارMultiple sequence alignment نشان داد که اختلافات درون جمعیتی نیز در بین دوگونه شناسایی شده وجود داشته است.

## بحث

امروزه تهیه محصولات غیرلبنی پروبیوتیکی یک چالش عمده برای صنعت مواد غذایی می‌باشد که تلاش برای استفاده از منابع طبیعی جهت تولید محصولات فراسومند با کیفیت بالا می‌باشد. در سال‌های اخیر با توجه به پتانسیل بالای پروبیوتیک‌ها استفاده از آن‌ها در غذاهای فراسودمند مورد توجه قرار گرفته است (۲۲و۲۳).

میکروانکپسولاسیون به‌منظور پوشش یا به دام انداختن یک ماده اصلی با مواد پلیمری برای تولید میکروسفرها در محدوده اندازه ۱۰۰۰-۱ میکرومتر است. از این تکنیک برای محاصره طیف گسترده‌ای از مواد از جمله مواد دارویی، طعم‌دهنده‌ها، روغن‌های فرار، عصاره‌های گیاهی، آنزیم‌ها، میکروارگانیسم‌ها و سایر موارد استفاده شده است. در دهه‌های اخیر، این فناوری به دلیل مزایای بی‌شماری که نسبت به سایر تکنیک‌های تثبیت سلول از قبیل ظرفیت بالای بارگذاری سلول، افزایش بقای سلول و افزایش میزان تولید محصولات میکروبی دارد به کار برده می‌شود (۶).

جهت اینکه باکتری‌های پروبیوتیکی سودمند واقع شوند، لازم است تا غلظت پروبیوتیک‌ها در فراورده‌های غذایی که به عنوان حامل در نظر گرفته شده‌اند، بالا باشد. برای جلوگیری و کاهش آسیب ناشی از تنش اسیدی (تغییر pH) و اکسیژن، باکتری به کار رفته میکروکپسوله گردید. میکروکپسوله کردن باکتری‌ها به منظور افزایش ثبات آن و کاهش آسیب‌های محیطی انجام می‌شود. کپسوله کردن یا پوشش داخلی باکتری برای زنده ماندن در شرایط اسیدی معده که ممکن است از pH ۲ هم کمتر باشد انجام می‌شود (۲۲).

همچنین تنوع جمعیت میکروبی در محتوای روده همه گروه‌ها مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج ثابت کرد رت‌هایی که نوشیدنی با پروبیوتیک L. casei دریافت کردند، تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها داشتند. امروزه مشخص است که باکتری های اسید لاکتیک در روده وجود دارند و اثرات مفیدی بر میزبان دارند. تعداد باکتری‌ها در روده حیوانات به شدت با عوامل مختلفی به ویژه ترکیب رژیم غذایی ارتباط دارد (۲۴).

در این مطالعه از تکنیک DGGE برای شناسایی تنوع فلور باکتریایی روده رت‌های مورد آزمایش استفاده شد. مطالعات زیادی از روش DGGE برای بررسی رابطه بین ترکیب میکروبیوتای روده استفاده کرده‌اند (۲۵).

## نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که تنوع فلور روده موش‌هایی که نوشیدنی چاودار با پروبیوتیک دریافت کردند با گروه های دیگر متفاوت بود. باکتری اصلی شناسایی شده در همه گروه‌ها اشریشیاکلی بود و *L. Casei* فقط در محتوای روده رت‌هایی که نوشیدنی چاودار با پروبیوتیک دریافت کردند، شناسایی شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد استفاده از تکنیک میکروکپسولاسیون می‌تواند باعث افزایش ماندگاری لاکتوباسیلوس کازئی روده شود و می‌توان برای بهبود و به منظور تهیه محصولات با کیفیت در قالب غذاهای موثر استفاده شود.

## تعارض منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

## فهرست منابع


**1.** Mishra S, Mishra HN. Technological aspects of probiotic functional food development. Nutrafoods. 2012 Dec;11(4):117-30.

**2.** Vasudha S, Mishra HN. Non dairy probiotic beverages. International Food Research Journal. 2013;20(1):7.

**3.** Herrera-Ponce A, Nevárez-Morillón G, Ortega-Rívas E, Pérez-Vega S, Salmerón I. Fermentation adaptability of three probiotic L actobacillus strains to oat, germinated oat and malted oat substrates. Letters in applied microbiology. 2014 Oct;59(4):449-56.

**4.** Salmerón I. Fermented cereal beverages: From probiotic, prebiotic and synbiotic towards Nanoscience designed healthy drinks. Letters in applied microbiology. 2017 Aug;65(2):114-24.

**5.** Patel HM, Wang R, Chandrashekar O, Pandiella SS, Webb C. Proliferation of

Lactobacillus plantarum in solid-state fermentation of oats. Biotechnology progress. 2004;20(1):110-6.

**6.** Rathore S, Salmerón I, Pandiella SS. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. Food Microbiology. 2012 May 1;30(1):239-44.

**7.** Aragon-Alegro LC, Alegro JH, Cardarelli HR, Chiu MC, Saad SM. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. LWT-Food Science and technology. 2007 May 1;40(4):669-75.

**8.** Ranjha MM, Shafique B, Batool M, Kowalczewski PŁ, Shehzad Q, Usman M, Manzoor MF, Zahra SM, Yaqub S, Aadil RM. Nutritional and health potential of probiotics: a review. Applied Sciences. 2021 Nov 25;11(23):11204.

**9.** Sabikhi L, Babu R, Thompkinson DK, Kapila S. Resistance of microencapsulated Lactobacillus acidophilus LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. Food and Bioprocess Technology. 2010 Aug;3(4):586-93.

**10.** Capela P, Hay TK, Shah NP. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International. 2006 Mar 1;39(2):203-11.

**11.** Rodrigues FJ, Cedran MF, Bicas JL, Sato HH. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications–A narrative review. Food research international. 2020 Nov 1;137:109682.

**12.** Odds FC. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Journal of Clinical Pathology. 1981 May;34(5):572.

**13.** Chaikham P, Apichartsrangkoon A, Worametrachanon S, Supraditareporn W, Chokiatirote E, Van der Wiele T. Activities of free and encapsulated Lactobacillus acidophilus LA5 or Lactobacillus casei 01 in processed longan juices on exposure to simulated gastrointestinal tract. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2013 Jul;93(9):2229-38.

**14.** Calasans-Maia MD, Junior CA, Soriano-Souza CA, Alves AT, de Pinheiro Uzeda MJ, Martinez-Zelaya VR, Mavropoulos E, Leão MH, de Santana RB, Granjeiro JM, Rossi AM. Microspheres of alginate encapsulated minocycline-loaded nanocrystalline carbonated hydroxyapatite: Therapeutic potential and effects on bone regeneration. International Journal of Nanomedicine. 2019;14:4559.

**15.** Shafizadeh A, Golestan L, Ahmadi M, Darjani P, Ghorbani-HasanSaraei A. Encapsulation of Lactobacillus casei in alginate microcapsules: improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions using flaxseed mucilage. Journal of food measurement and characterization. 2020 Aug;14(4):1901-8.

**16.** Mathews S. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate and gelatin and evaluation of its survival in simulated human gastro-intestinal condition. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2017;6:2080-7.

**17.** Holkem AT, Raddatz GC, Nunes GL, Cichoski AJ, Jacob-Lopes E, Grosso CR, de Menezes CR. Development and characterization of alginate microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. LWT-Food Science and Technology. 2016 Sep 1;71:302-8.

**18.** Meng W, McElroy JP, Volinia S, Palatini J, Warner S, Ayers LW, Palanichamy K, Chakravarti A, Lautenschlaeger T. Comparison of microRNA deep sequencing of matched formalin-fixed paraffin-embedded and fresh

frozen cancer tissues. PloS one. 2013 May 16;8(5):e64393.

**19.** Geyra A, Uni Z, Sklan D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. British Journal of Nutrition. 2001 Jul;86(1):53-61.

**20.** Bianchi F, Rossi EA, Sakamoto IK, Adorno MA, Van de Wiele T, Sivieri K. Beneficial effects of fermented vegetal beverages on human gastrointestinal microbial ecosystem in a simulator. Food Research International. 2014 Oct 1;64:43-52.

**21.** Queipo-Ortuño MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. Clinical and Vaccine Immunology. 2008 Feb;15(2):293-6.

**22.** Adlercreutz H. Can rye intake decrease risk of human breast cancer?. Food & nutrition research. 2010 Jan 1;54(1):5231.

**23.** van Dam RM, Hu FB, Rosenberg L, Krishnan S, Palmer JR. Dietary calcium and magnesium, major food sources, and risk of type 2 diabetes in US black women. Diabetes care. 2006 Oct 1;29(10):2238-43.

**24.** Bolnick DI, Snowberg LK, Hirsch PE, Lauber CL, Org E, Parks B, Lusis AJ, Knight R, Caporaso JG, Svanbäck R. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. Nature communications. 2014 Jul 29;5(1):1-3.

**25.** Vael C, Vanheirstraeten L, Desager KN, Goossens H. Denaturing gradient gel electrophoresis of neonatal intestinal microbiota in relation to the development of asthma. BMC microbiology. 2011 Dec;11(1):1-7.

# Intestinal histopathological investigation and microbial population diversity in rats consuming malt beverage and Rye-based beverage containing microencapsulated Lactobacillus casei

**Shadi Rokhsartalab azar**[1], parvaneh jafari[2], Amir Tukmehchi[3], Hassan Malekinejad[4,5]

1. PhD of Microbiology, Department of Microbiology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran. Corresponding Author: shadi.rokhsartalab@yahoo.com
2. Assistant Professor in Microbiology, Department of Microbiology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
3. Associate Professor in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, West Azarbaijan, Iran
4. Professor of Toxicology & Pharmacology, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
5. Professor of Toxicology & Pharmacology, Department of Microbiology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

**Received:2022.07. 16** **Accepted: 2022.09.14**

**Abstract**

**Introduction & Objective:** The need of human society is drawn towards healthier and more useful foods and the food industry is expected to pay attention to this need. This study was conducted with the aim of adding encapsulated *Lactobacillus Casei* to rye drink and investigating the diversity of the bacterial population and intestinal histopathology in the rat animal model

**Materials & Methods**: *Lactobacillus Casei* was encapsulated with a concentration of 2% sodium alginate polymer by emulsion method. After adding a standard dose of encapsulated bacteria to rye drink, in vivo experiments were performed on 4 groups of adult male rats as: control, malt drink, rye drink, and rye drink with probiotics. Animals received the recommended beverages for 28 days. Bacterial population diversity was done by molecular method (PCR-DGGE) and histopathological examination using staining (H&E).

**Results*:*** There was bacterial diversity in the intestinal contents of the studied rats, and the highest population composition related to *Lactobacillus Casei* was detected in the intestinal contents of rats that received rye drink with probiotics. Also, histopathological studies did not have negative results in any of the groups.

**Conclusion:** The results of this research show that the use of microencapsulation technique can increase the shelf life of *Lactobacillus Casei* in the intestine.

**Key words:** Encapsulation, probiotics, microbial population, histopathology