

ارزیابی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش دهی شده در سوسپانسیون سین‌بیوتیک در شرایط شبیه‌سازی شده سیستم گوارش

متینا یکتا^۱، وحید حکیم‌زاده^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
* نویسنده مسئول (v.hakimzadeh@yahoo.com)

چکیده

امروزه باتوجه به نقش باکتری‌های پروبیوتیک در سلامتی افراد جامعه و از طرفی در معرض بودن این باکتری‌ها در برابر شرایط حاد فرایندهای غذایی و دستگاه گوارش، ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با بیوپلیمرهای زیستی در امولسیون‌های فراسودمند به عنوان یک تکنیک نوین مورد توجه محققین زیادی قرار دارد. معمولاً میزان تحمل نمونه‌های غذایی پوشش‌دهی شده در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این پژوهش، سه فرمولاسیون برای آماده‌سازی سوسپانسیون ریزپوشانی (ترکیبی از کنسانتره پروتئین آب‌پنیر، اینولین و صمغ فارسی در محدوده ۱۴ تا ۱۴/۳ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) آماده گردید. نتایج نشان داد، راندمان ریزپوشانی، مقاومت نسبت به تنش اسیدی و بازی، ارزیابی ویسکوزیته، خصوصیات میکروسکوپی و در نهایت نرخ سنتیک رهایش در فرمولاسیون دوم (۸/۵، ۵/۵ و ۰/۲ گرم به ترتیب برای کنسانتره پروتئین آب‌پنیر، اینولین و صمغ فارسی) بهترین شرایط را داشت و از این رو به عنوان ماتریکس مناسب در نظر گرفته شد و در ادامه به بررسی خصوصیات ماندگاری بهترین فرمولاسیون طی دو ماه و در دو سطح دمایی ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد پرداخته شد. طول مدت ماندگاری سبب کاهش جمعیت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در دو دمای یاد شده گردید که مقدار کاهش جمعیت در دمای نگهداری ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مراتب بیشتر از دمای محیط بود. نتایج حاصل از تصاویر ریزکپسول که با میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه شدند نیز نشان داد که خصوصیات سطح ظاهری و اثر ترکیبات دیواره بر ریزساختارهای ذرات در دو دمای مختلف، متفاوت است. بدین صورت که دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد چروکیدگی سطحی به مراتب بالاتری را در مقایسه با دمای محیط در ریزکپسول‌ها ایجاد کرد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۵

واژه‌های کلیدی

امولسیون
ریزپوشانی
سیستم گوارش
لاکتوباسیلوس پلانتاروم
ماتریکس فراسودمند

مقدمه

ریزپوشانی است. محافظت از مواد هسته در برابر شرایط سخت بیرونی، پوشاندن طعم و بوی نامطلوب ترکیبات هسته، کاهش فرارپذیری برخی ترکیبات زیست‌فعال غذایی و دارویی، حفاظت از رنگدانه‌های غذایی و حفاظت از

در سال‌های اخیر تکنیک‌های مختلفی با هدف افزایش محافظت و پایداری پروبیوتیک‌ها به کار گرفته شده است. از جمله تکنیک‌های مؤثر در این زمینه استفاده از روش

وجود خواهد داشت (Patel, Singh, Panaich, & Cardozo, 2014).

شرط اصلی اثرگذاری مصرف ماده غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، قابلیت زنده ماندن آن سویه در دستگاه گوارش است. به صورتی که سویه میکروبی باید در مقابل نمک‌های صفراوی موجود در روده کوچک، شرایط اسیدی معده و متابولیت‌های سمی تولیدشده در طول هضم مقاوم باشد (Homayouni, Azizi, Ehsani, Yarmand, & Razavi, 2008). همچنین در طول فراوری محصول نیز از بین نرود. جهت رسیدن به این هدف استفاده از تکنولوژی ریزپوشانی سبب حل مشکل اخیر شده است؛ ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک جهت افزایش تقویت کارایی آنها در حین فرایند و همچنین رهایش کنترل شده در دستگاه گوارش در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه‌های متعددی تاکنون در خصوص ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با ترکیبات مختلفی از جمله آلزینات، کیتوزان، صمغ‌ها، نشاسته، پروتئین آب‌پنیر و ژلاتین و استفاده از آنها در مواد غذایی مختلفی مانند ماست، شیر، بستنی و محصولات بر پایه غلات صورت گرفته است (Huq, Khan, Khan, Riedl, & Lacroix, 2013). در تحقیقی که به بررسی زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم^۲ با دو زیست‌گونه مختلف ریزپوشانی شده تحت ماتریکس‌های بیوپلیمری مختلف در شرایط شبیه‌سازی معده و روده در طول مدت ماندگاری پرداخته شد، نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) در میزان کاهش جمعیت هر کدام از سویه‌ها تحت شرایط شبیه‌سازی معده و روده وجود داشت (عابدفر، ادیب‌پور و حسینی‌نژاد، ۱۳۹۷). نتایج در رابطه با ریزپوشانی بیفیدوباکتریوم سودولانگوم^۳ با ترکیبات سلولزاستات فتالات^۴ نشان داد که تنش اسیدی سبب کاهش شدیدی در جمعیت باکتری مذکور نشده، در حالی که سلول‌های بدون ریزپوشانی پس از ۱ ساعت در مجاورت با تنش اسیدی معده به‌طور کامل از بین رفتند (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003). مطالعه‌های انجام‌شده روی میزان آسیب‌پذیری سلول‌های آغازگر ریزپوشانی‌شده با آلزینات در شیر کامل (۳ درصد چربی)

ترکیبات مغذی و رهایش کنترل‌شده مواد هسته توسط ترکیبات بیوپلیمری نظیر کربوهیدرات‌ها (مالتودکسترین‌ها و مواد جامد شربت ذرت، نشاسته اصلاح‌شده، سیکلو دکسترین‌های طبیعی و اصلاح‌شده، ساکارز، کیتین، کیتوزان و سلولز)، صمغ‌ها (عصاره جلبک دریایی، صمغ‌های ترش‌حی و صمغ میکروبی)، چربی‌ها (موم‌ها، استو آسیل‌گلیسرول‌ها^۱، لستین‌ها، لیپوزوم‌ها) و پروتئین‌ها از جمله کاربردهای مهم روش ریزپوشانی می‌باشند (Botelho, Canas, & Lameiras, 2017). در این راستا فناوری نانو در زمره جدیدترین فناوری‌هایی است که پتانسیل بهبود ایمنی و کیفیت در مواد غذایی را دارا می‌باشد. کاربرد فناوری نانو در صنعت غذا در مقایسه با به‌کارگیری آن در صنایع دارویی و سیستم‌های دارورسانی نسبتاً جدید می‌باشد (Mortazavian, Amir, Razavi, Ehsani, & Sohrabvandi, 2007). نانو و میکرومولسیون‌ها می‌توانند به‌عنوان حامل ترکیبات زیست‌فعال مانند پروبیوتیک‌ها و ضد میکروبی مثل اسانس‌های گیاهی، انواع آنتی‌اکسیدان‌ها و سایر ترکیبات فراسودمند مورد استفاده قرار گیرند، زیرا با تمام ترکیبات طبیعی توانایی فرموله‌شدن را دارند و کمترین تأثیر را بر خصوصیات مواد غذایی می‌گذارند. آنها قادر به حفظ خصوصیات زیست‌فعال ترکیبات خوراکی می‌باشند که تقریباً مشابه با حالت طبیعی آنهاست که در شرایط مختلف نگهداری می‌شوند. همچنین به دلیل داشتن اندازه ریزتر دسترس‌زیستی آنها در روده افزایش می‌یابد. به‌عنوان مثال اسانس‌های گیاهی به راحتی می‌توانند در ترکیب با نانوامولسیون‌ها در سیستم‌های غذایی مورد استفاده قرار گیرند (Mortazavian, et al., 2008).

به ترکیب پروبیوتیک و پری‌بیوتیک، سین‌بیوتیک می‌گویند. در واقع سین‌بیوتیک غذایی است که حاوی هر دو عامل پروبیوتیک و پری‌بیوتیک به صورت هم‌زمان است. در غذاهای سین‌بیوتیک حضور پری‌بیوتیک‌هایی مانند الیگوساکاریدهای غیرنشاسته‌ای و غیرقابل هضم همچون اینولین موجب تحریک رشد و افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در غذا شده و اثرات سلامتی‌بخش را بر میزبان می‌گذارند، به طوری که در هنگام مصرف غذای سین‌بیوتیک تعداد سلول‌های زنده پروبیوتیک بیشتری

² *Lactobacillus Plantarum*

³ *Bifidobacterium Pseudolongum*

⁴ Cellulose Acetate Phthalate

¹ Aceto Acylglycerol

تکنیک ریزپوشانی میکروبی

مطابق با جدول (۱) ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده دیواره ریزپوشانی از سه سوسپانسیون که حاوی پروتئین آب‌پنیر در محدوده ۷/۵-۹/۵ درصد، اینولین به‌عنوان ترکیب پری‌بیوتیک در محدوده ۴/۵-۶/۵ درصد و صمغ فارسی با نسبت ۰/۱-۰/۳ درصد بود، در مجاورت پالیده کشت فعال در فاز لگاریتمی سویه پروبیوتیک با جمعیت اولیه 10^{12} واحد تشکیل کلنی در گرم به‌طور جداگانه بررسی شد. بدین‌منظور غلظت نهایی هر سوسپانسیون تهیه‌شده جهت ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک ارزیابی گردید. روند تهیه و آماده‌سازی شرایط سوسپانسیون ریزپوشانی با استفاده از روش Ananta, Volkert, Knorr و (۲۰۰۵) و همچنین Quezada- Moreno-Terrazas, Altamirano-Fortoul, Rosell و Gallo (۲۰۱۲) با کمی تغییرات انجام گردید.

جدول ۱- نسبت ترکیبات ریزپوشانی سوسپانسیون مناسب

ترکیبات ریزپوشانی	فرمولاسیون‌ها (گرم)		
	اول	دوم	سوم
کنسانتره پروتئین آب‌پنیر	۷/۵۰	۸/۵۰	۹/۵۰
اینولین	۶/۵۰	۵/۵۰	۴/۵۰
صمغ فارسی	۰/۱۰	۰/۲۰	۰/۳۰

تهیه پودر ریزپوشانی امولسیون با خشک‌کن پاششی

عمل ریزپوشانی به‌وسیله خشک‌کن پاششی (مدل Buchi-B191، ساخت سوئیس) در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد. در این پژوهش هوای ورودی به خشک‌کن پاششی در دمای ثابت 145 ± 2 درجه سانتی‌گراد و هوای خروجی در دمای 50 ± 3 درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. در این روش سویه میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم در سه سوسپانسیون (هر سوسپانسیون حاوی ماتریکس‌های بیوپلیمری یکسان ولی با نسبت‌های متغیر) به‌طور جداگانه تحت تحریک مغناطیسی در دمای اتاق نگاه‌داشته شد و سپس از طریق یک پمپ پرستالیتیک با جریان ورودی سوسپانسیون ۶ میلی‌لیتر بر دقیقه به محفظه اصلی خشک‌کن تغذیه شد (Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011). علاوه بر این جریان هوای خشک‌کن و فشار هوای کمپرسور به ترتیب در ۳۵ مترمکعب بر ساعت و ۰/۷ مگاپاسکال تنظیم گردید. نمونه پودر خشک‌شده توسط سیکلون جمع‌آوری و در بطری‌های پلاستیکی استریل‌شده در دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ماه ذخیره شدند.

طی خشک‌کن پاششی نشان داد که مخلوط گلیسرول با آلزینات طی درون‌پوشانی پروبیوتیک‌ها زنده‌مانی این باکتری‌ها را در شرایط خشک‌کن و همچنین انجماد شدید بهبود داد (Picot & Lacroix, 2003). بررسی ریزپوشانی بفریدوباکتریوم سودولانگوم نیز کاملاً مؤید آن بود که بقای باکتری ریزپوشانی‌شده در مقایسه با سلول آزاد در شرایط اسیدی معده حفظ می‌گردد (Mohammadi & Mortazavian, 2011).

هدف از این پژوهش ارزیابی زنده‌مانی و خصوصیات لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی‌شده در یک امولسیون سین‌بیوتیک تحت تأثیر شرایط شبیه‌سازی‌شده سیستم گوارش طی ۲ ماه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

ترکیبات ریزپوشینه در ماتریکسی متشکل از کنسانتره پروتئین آب‌پنیر، اینولین و صمغ فارسی تهیه شدند که از شرکت‌های داخلی و سیگما آلدریج تهیه گردیدند. همچنین محیط‌های کشت مصرفی در این پژوهش شامل ام‌آراس برات^۱ (MRS Broth) و ام‌آراس آگار^۲ (MRS Agar) نیز از شرکت‌های مرک آلمان تأمین شدند. سایر ترکیبات شیمیایی و تجهیزات مصرفی عمدتاً از بازارهای داخلی تهیه گردیدند.

آماده‌سازی و فعال‌سازی سویه میکروبی پروبیوتیک

باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم با شماره سریال (PTCC 1896) در محیط کشت ام‌آراس برات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تا ایجاد 10^{12} واحد تشکیل کلنی در گرم کشت داده شد. سپس سلول‌های تازه میکروبی، تحت عمل سانتریفیوژ با ۶۰۰۰ دور در دقیقه (هرمل، Z36 HK، ساخت آلمان)، ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه از محیط کشت پایه جدا گردید. در ادامه زیست‌توده تولیدی در دو مرحله با محلول استریل ۰/۱ درصد آب پیتونه شسته شد و در نهایت جهت ریزپوشانی در شرایط کاملاً بهداشتی نگهداری شدند. (Mokarram, Mortazavi, Najafi, & Shahidi, 2009).

¹ Man, Rogosa and Sharp (MRS) Broth

² Man, Rogosa and Sharp (MRS) Agar

ارزیابی راندمان ریزپوشانی

در این پژوهش تعداد باکتری‌های اولیه (N_0) در پالیده کشت تلقیح‌شده به سوسپانسیون قبل از خشک‌کن پاششی روی محیط‌کشت جامد شمارش شد. همچنین تعداد سلول‌های پروبیوتیک زنده پس از فرایند خشک‌کردن (N) اندازه‌گیری شد. درنهایت راندمان ریزپوشانی که بیانگر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی‌شده بود براساس رابطه (۱) بررسی گردید (Michida et al., 2006).

رابطه (۱)

$$EY = (N/N_0) \times 100$$

در رابطه (۱)، N تعداد سلول‌های باکتری بعد از فرایند خشک‌کن پاششی (لگاریتم واحد تشکیل کلنی در گرم)، N_0 تعداد سلول‌های باکتری قبل از فرایند خشک‌کن پاششی (لگاریتم واحد تشکیل کلنی در گرم) و EY بازده یا راندمان زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک بعد از ریزپوشانی می‌باشد.

تعداد کلنی‌های باکتری بعد از ریزپوشانی درون محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷ به روش آمیخته^۱ کشت داده شد و تعداد باکتری‌ها در رقت‌های مختلف شمارش گردید.

تعداد باکتری‌های به‌دام‌افتاده در کپسول‌های ریزپوشانی

جهت بررسی میزان باکتری به‌دام‌افتاده در امولسیون ریزپوشانی‌کننده، ۱ گرم از کپسول ریزپوشانی تهیه‌شده به ۹ میلی‌لیتر محلول استریل بافر فسفات ۰/۱ نرمال با pH ۷ اضافه‌شده و ورتکس گردید. سپس طی مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از دستگاه همزن مغناطیسی یکنواخت شد، تعداد باکتری‌های کل آزادشده در بافر فسفات با استفاده از محیط‌کشت ام‌آراس آگار به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به روش آمیخته کشت داده شدند و جمعیت میکروبی کاهش‌یافته بعد از فرایند خشک‌کن پاششی محاسبه شد (Ananta et al., 2005).

بررسی زنده‌مانی باکتری ریزپوشانی‌شده در سه ماتریکس تحت تنش اسیدی معده

جهت شبیه‌سازی شرایط اسیدی معده، پپسین (Sigma Aldrich, P7000) با محلول سدیم کلراید ۰/۵ درصد تا

رسیدن به غلظت ۳ گرم بر لیتر مخلوط شد و در ادامه pH آن به وسیله اسید کلریدریک استریل (۰/۱ مولار) به ۲ رسانده شد. درنهایت محلول حاصله با استفاده از میکروفیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل گردید. سپس به‌منظور ارزیابی میزان بقای سلول‌های ریزپوشانی‌شده در زمان‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه، محیط‌های شبیه‌سازی‌شده با سرم فیزیولوژی ۰/۸ درصد و در محیط ام‌آراس آگار به‌صورت کشت سطحی و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت سوپه پروبیوتیک به شکل آزاد و ریزپوشینه‌شده گرم‌خانه‌گذاری شدند. شرایط شبیه‌سازی‌شده شیره معده، مطابق با روش Michida و همکاران (۲۰۰۶) با کمی تغییرات صورت گرفت. درنهایت مقایسه تعداد سلول‌های زنده باکتری در هرکدام از مقاطع زمانی مطرح‌شده با استفاده از آزمون t مستقل و در سطح ۵ درصد انجام شد.

بررسی زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی‌شده در سه ماتریکس تحت تنش قلیایی روده

جهت شبیه‌سازی شرایط قلیایی روده، پانکراتین (Sigma Aldrich P1500) با مونونپتاسیم فسفات ۰/۱ مولار، تا رسیدن به غلظت نهایی ۱ گرم بر لیتر با ۴/۵ درصد محلول نمک‌های صفراوی مخلوط شد. سپس pH آن با محلول سود استریل ۱ مولار استریل به حدود ۸ رسانده شد. درنهایت محلول حاصله با استفاده از میکروفیلتر ۰/۲۲ میکرومتر (Iwaki، ساخت ژاپن) استریل گردید. سپس به‌منظور ارزیابی میزان بقای سلول‌های ریزپوشانی‌شده در زمان‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه محیط شبیه‌سازی‌شده با سرم فیزیولوژی ۰/۸ درصد و در محیط ام‌آراس آگار به‌صورت کشت سطحی و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت سوپه پروبیوتیک به شکل آزاد و ریزپوشینه‌شده گرم‌خانه‌گذاری شدند. براین‌اساس شرایط شبیه‌سازی‌شده محیط قلیایی روده مطابق روش Charteris, Kelly, Morelli و Collins (۱۹۹۸) با کمی تغییرات انجام گرفت. درنهایت برای مقایسه تعداد سلول‌های زنده باکتری در هرکدام از مقاطع زمانی مطرح‌شده از آزمون t مستقل و با احتمال ۹۹ درصد مقایسه گردید.

^۱ Pour plate

بررسی خصوصیات مورفولوژی ریزکپسول‌ها و توپولوژی سطحی در دو دمای مختلف

جهت ارزیابی ریزساختار و توپولوژی بیرونی پودر ریزپوشانی در دو دمای مختلف از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل LEO 1450 VP، ساخت آلمان) در بزرگ‌نمایی معین تا جایی که الکترون‌های برانگیخته شده به سطح نمونه‌های ریزکپسول آسیبی وارد نکنند، استفاده شد. جهت استفاده از میکروسکوپ الکترونی نمونه‌ها ابتدا باید با لایه نازکی از طلا توسط یک دستگاه اسکاتر (مدل ZEISS، ساخت آلمان) پوشانده شوند. به‌همین منظور نمونه توسط یک دستگاه پوشاننده به مدت ۵ دقیقه تحت تأثیر طلا قرار گرفته و لایه بسیار نازکی از طلا در حد چند میکرومتر روی نمونه‌ها قرار گرفت و سپس در بزرگ‌نمایی که بهترین تصاویر را بتوان استخراج نمود، عکس‌برداری صورت گرفت (خسروی‌زنجانی، محمدی، اهری، غیائی‌طرزی و باخدا، ۱۳۹۲).

ارزیابی زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی‌شده در طول مدت ماندگاری

پایش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی‌شده طی مدت ماندگاری (۲ ماه) در دو دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ درجه سانتی‌گراد ارزیابی گردید (Chávarri *et al.*, 2010). بدین‌صورت که ۱ گرم از هر سوسپانسیون پروبیوتیک ریزپوشینه‌شده به‌طور جداگانه در ۹ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس لگاریتم تعداد کلنی‌های باکتری بعد از ریزپوشانی درون محلول مذکور ۰/۱ مولار با pH ۷ به روش آمیخته کشت داده شد و شمارش نهایی صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از این پژوهش براساس طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و با استفاده از نرم‌افزارهای SAS (نسخه ۹،۱) و Microsoft Office Excel نسخه ۲۰۱۳ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) و آزمون دانکن در سطح ۹۵ درصد انجام شد.

سنتیک ره‌ایش ماتریکس سلول‌های ریزپوشانی‌شده در شرایط آزمایشگاهی

درصد نرخ سنتیک ره‌ایش لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی‌شده در شرایط شبیه‌سازی‌شده معده و روده به‌طور تلفیقی با استفاده از روش He و همکاران (۲۰۱۵) مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، ۴/۵ میلی‌لیتر از محلول تلفیقی اسید معده (SGF^۱) و نمک صفراوی روده در قالب محلول دستگاه گوارش (SIF^۲) آماده گردید. مقدار ۰/۵ گرم از نمونه‌های پوشش‌داده‌شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه در هر دو محیط به‌طور جداگانه یکنواخت گردید. در ادامه به‌منظور ارزیابی میزان بقای سلول‌های ریزپوشانی‌شده در مقایسه با سلول‌های آزاد در زمان‌های صفر، ۱۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه، محیط شبیه‌سازی‌شده با سرم فیزیولوژی ۰/۸ درصد و در محیط ام‌آراس آگار به‌صورت کشت سطحی و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت سوبه پروبیوتیک به شکل آزاد و ریزپوشینه‌شده گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس ره‌ایش هر سلول مطابق با مدل‌های ریاضی هیگوچی^۳، ریتگر-پپاس^۴ و فرست اوردر ریلیز^۵ و براساس رابطه‌های (۲)، (۳) و (۴) تنظیم گردید.

رابطه (۲)

$$\ln(M_{\infty} - M_t) = -K_1 t + C_1$$

رابطه (۳)

$$M_t = K_H t^{1/2} + C_H$$

رابطه (۴)

$$\frac{M_t}{M_0} = K t^n$$

در رابطه‌های (۲)، (۳) و (۴)، M_{∞} مجموع ره‌ایش باکتری، M_t ره‌ایش سلول‌های باکتری در زمان t ، K_1 ثابت مدل سنتیکی، K_H ثابت مدل سنتیکی، t زمان ره‌ایش و C_1 ، C_H و K اعداد ثابت هستند. نسبت M_t/M_0 نیز ترکیبات ره‌ایش‌یافته در هر مدل در زمان t و عدد n در مدل ریتگر پپاس به‌عنوان پارامتر ره‌ایش می‌باشد.

¹ Simulated Gastric Fluid

² Simulated Intestinal Fluid

³ Higuchi

⁴ Ritger-peppas

⁵ First Order Release

⁶ Least Significant Difference

نتایج و بحث

راندمان ریزپوشانی امولسیون روی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم نتایج حاصل از بازده (برحسب درصد) حاصل نسبت

تعداد اولیه باکتری قبل از ریزپوشانی (N_0) و بعد از فرایند پوشش دهی سوسپانسیون سین بیوتیک (N) و همچنین راندمان آنها بعد از هیدرولیز شدن دیواره درون محلول بافر فسفات در جدول (۲) مورد مقایسه قرار گرفت.

جدول ۲- بازده ریزپوشانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم

درصد بازدهی	تعداد باکتری ثانویه (لگاریتم واحد تشکیل کلنی)	تعداد باکتری اولیه (لگاریتم واحد تشکیل کلنی)	ماتریکس سن بیوتیک	سوش پروبیوتیک
۸۱/۱۶۲	۹/۸۰۶	۱۲/۰۵۶	فرمول اول	لاکتوباسیلوس پلانتاروم
۹۱/۰۰۳	۱۰/۹۹۵	۱۲/۰۵۶	فرمول دوم	لاکتوباسیلوس پلانتاروم
۸۷/۵۶۰	۱۰/۵۷۹	۱۲/۰۵۶	فرمول سوم	لاکتوباسیلوس پلانتاروم

ارزایی زنده ماننی باکتری آزاد و ریزپوشانی شده در شرایط شبیه سازی مایع معده و روده ای

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد با گذشت زمان ماندگاری باکتری های پروبیوتیک تحت تنش اسیدی معده روند کاهشی داشته است. نتایج حاصل در جدول (۳) نیز نشان داد تأثیر ریزپوشانی در حفظ جمعیت پروبیوتیک سوپه ذکر شده در تنش اسیدی معده در مقایسه با سلول های باکتری آزاد کاملاً معنی دار بود به طوری که با گذشت ۱۲۰ دقیقه تنش اسیدی فقط سبب کاهش سه سیکل لگاریتمی در فرمولاسیون شماره ۲ ریزپوشانی شد

و حدود ۴ سیکل کاهش جمعیت در فرمولاسیون شماره ۱ و ۳ سوپه ریزپوشانی شده ایجاد گردید که در مقایسه با سلول آزاد آن حدود ۹ سیکل لگاریتمی کاهش نشان داد. در واقع این نتایج مقاومت فرمولاسیون شماره ۲ در حفظ جمعیت میکروبی را تأیید می نماید. نتایج به دست آمده از جمعیت نهایی سوپه میکروبی ریزپوشانی شده بعد از ۲ ساعت تنش مستقیم اسیدی نشان از حفظ جمعیت پروبیوتیک ها بود که هر روز مقدار ($10^7 - 10^6$) واحد تشکیل کلنی در هر گرم) مصرف کافی پروبیوتیک را تأیید می نماید (Kailaspathy, 2002).

جدول ۳- میزان بقای سلول های آزاد و ریزپوشانی شده بعد از گرم خانه گذاری در محیط اسیدی معده (لگاریتم واحد تشکیل کلنی)

زمان (دقیقه)	فرمولاسیون ماتریکس	تعداد سلول های انکپسوله	تعداد سلول های آزاد
۱۰	فرمول ۱	$4/40 \pm 0/03 \times 10^9$ b	$9/70 \pm 0/02 \times 10^{11}$ a
	فرمول ۲	$8/30 \pm 0/01 \times 10^{10}$ a	$9/70 \pm 0/02 \times 10^{11}$ a
	فرمول ۳	$1/13 \pm 0/05 \times 10^{10}$ b	$9/70 \pm 0/02 \times 10^{11}$ a
۳۰	فرمول ۱	$9/40 \pm 0/20 \times 10^8$ abc	$1/01 \pm 0/20 \times 10^9$ b
	فرمول ۲	$8/70 \pm 0/20 \times 10^9$ b	$1/01 \pm 0/20 \times 10^9$ b
	فرمول ۳	$1/01 \pm 0/20 \times 10^9$ abc	$1/01 \pm 0/20 \times 10^9$ b
۶۰	فرمول ۱	$4/80 \pm 0/04 \times 10^8$ c	$8/40 \pm 0/35 \times 10^9$ c
	فرمول ۲	$4/60 \pm 0/05 \times 10^9$ b	$8/40 \pm 0/35 \times 10^9$ c
	فرمول ۳	$8/80 \pm 0/02 \times 10^8$ abc	$8/40 \pm 0/35 \times 10^9$ c
۹۰	فرمول ۱	$8/50 \pm 0/01 \times 10^8$ e	$3/30 \pm 0/01 \times 10^9$ d
	فرمول ۲	$8/30 \pm 0/06 \times 10^8$ abc	$3/30 \pm 0/01 \times 10^9$ d
	فرمول ۳	$3/20 \pm 0/08 \times 10^9$ d	$3/30 \pm 0/01 \times 10^9$ d
۱۲۰	فرمول ۱	$4/80 \pm 0/03 \times 10^8$ f	$8/40 \pm 0/30 \times 10^9$ e
	فرمول ۲	$7/80 \pm 0/02 \times 10^9$ d	$8/40 \pm 0/30 \times 10^9$ e
	فرمول ۳	$3/90 \pm 0/04 \times 10^8$ e	$8/40 \pm 0/30 \times 10^9$ e

حروف کوچک غیرمشابه در هر ستون (در یک زمان مشخص) از نظر آماری در سطح ($P \leq 0/05$) تفاوت معنی داری دارند. حروف بزرگ غیریکسان هر سطر (ماتریکس مشخص) از نظر آماری در سطح ($P \leq 0/05$) تفاوت معنی داری دارند.

بهبتر عمل نمود.

علاوه بر این، نتایج حاصل از تنش مستقیم اسید-باز (معهده و روده) نیز نشان داد (شکل ۱) که تأثیر مدت زمان تماس سلول‌های میکروبی آزاد و ریزپوشانی شده سبب کاهش در پایش جمعیت آنها خواهد شد. به طوری که با مقایسه تعداد سلول‌های زنده باکتری در هر کدام از مقاطع زمانی مطرح شده از آزمون t مستقل و در سطح ۵ درصد کاهش معنی‌داری در سلول‌های آزاد به دست آمد. علاوه بر این سلول‌های ریزپوشانی شده طی زمان تماس مستقیم در دو شرایط، کاهش کمتری در مقایسه با سلول‌های آزاد از خود نشان دادند که نشان از عملکرد مناسب پوشش انجام شده در محافظت سلول در برابر تنش‌های ذکر شده بوده که در این میان فرمولاسیون ۲ بهترین راندمان را در حفظ بقای باکتری‌های پوشش داده شده طی ۲ ساعت از خود نشان داد.

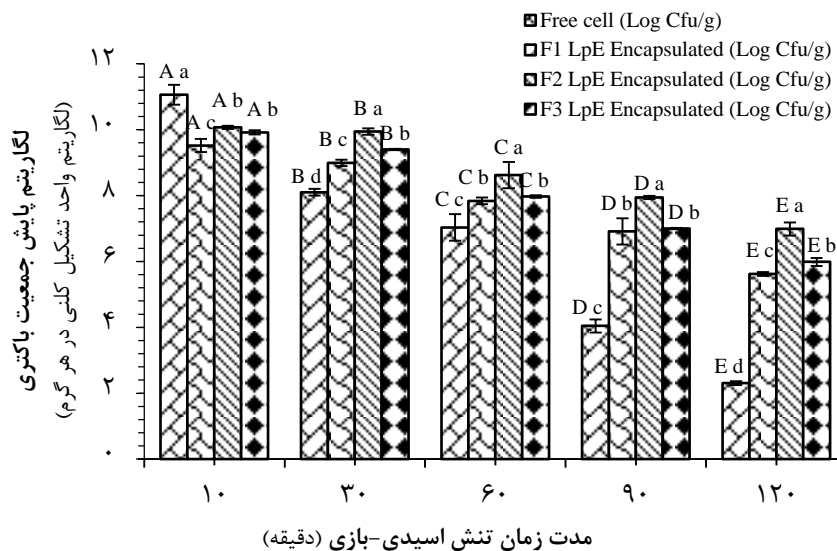
در ادامه بررسی بقای سلول‌های ریزپوشانی شده در ۳ ماتریکس مختلف طی ۱۲۰ دقیقه در شرایط محیط قلیایی روده نتایج نشان داد (جدول ۴) که با گذشت زمان و اثر تنش بازی (قلیایی) روده، تعداد باکتری لاکتوباسیلوس پلانناروم سلول آزاد و ریزپوشینه شده روند کاهشی داشت. تأثیر ریزپوشانی در حفظ جمعیت پروبیوتیک سوئیة ذکر شده در شرایط قلیایی روده در مقایسه با سلول‌های باکتری آزاد نیز کاملاً مشهود بود که با گذشت ۱۲۰ دقیقه تنش قلیایی نتایج مشابهی با تنش اسیدی به دست آمد، به طوری که سبب کاهش ۳ سیکل لگاریتمی در امولسیون شماره ۲ ریزپوشانی شده و حدود ۴ سیکل کاهش جمعیت سوئیة ذکر شده در فرمولاسیون شماره ۱ و ۳ ریزپوشانی شده گردید که در مقایسه با سلول آزاد آن حدود ۹ سیکل لگاریتمی کاهش داشت. با نتایج حاصل از این پژوهش امولسیون ریزپوشانی کننده شماره ۲ در حفظ جمعیت میکروبی به مراتب نسبت به دو ماتریکس دیگر

جدول ۴- میزان بقای سلول‌های آزاد و ریزپوشانی شده بعد از گرم‌خانه‌گذاری در محیط قلیایی روده (لگاریتم واحد تشکیل کلنی)

زمان (دقیقه)	فرمولاسیون ماتریکس	تعداد سلول‌های انکبوسوله	تعداد سلول‌های آزاد
۱۰	فرمول ۱	$8/90 \pm 0/03 \times 10^9 b$	$4/10 \pm 0/03 \times 10^{11a}$
	فرمول ۲	$9/70 \pm 0/01 \times 10^{10a}$	$4/10 \pm 0/03 \times 10^{11a}$
	فرمول ۳	$1/45 \pm 0/05 \times 10^{10b}$	$4/10 \pm 0/03 \times 10^{11a}$
۳۰	فرمول ۱	$1/03 \pm 0/20 \times 10^9 c$	$8/90 \pm 0/04 \times 10^9 b$
	فرمول ۲	$1/02 \pm 0/20 \times 10^{10b}$	$8/90 \pm 0/04 \times 10^9 b$
	فرمول ۳	$2/80 \pm 0/20 \times 10^9 bc$	$8/90 \pm 0/04 \times 10^9 b$
۶۰	فرمول ۱	$5/30 \pm 0/04 \times 10^8 c$	$6/60 \pm 0/10 \times 10^8 c$
	فرمول ۲	$8/70 \pm 0/05 \times 10^9 b$	$6/60 \pm 0/10 \times 10^8 c$
	فرمول ۳	$7/80 \pm 0/02 \times 10^8 c$	$6/60 \pm 0/10 \times 10^8 c$
۹۰	فرمول ۱	$1/70 \pm 0/01 \times 10^7 d$	$2/70 \pm 0/30 \times 10^7 d$
	فرمول ۲	$9/30 \pm 0/06 \times 10^8 c$	$2/70 \pm 0/30 \times 10^7 d$
	فرمول ۳	$6/50 \pm 0/08 \times 10^7 cd$	$2/70 \pm 0/30 \times 10^7 d$
۱۲۰	فرمول ۱	$6/90 \pm 0/03 \times 10^8 f$	$3/30 \pm 0/11 \times 10^8 e$
	فرمول ۲	$4/30 \pm 0/02 \times 10^7 cd$	$3/30 \pm 0/11 \times 10^8 e$
	فرمول ۳	$4/70 \pm 0/04 \times 10^8 e$	$3/30 \pm 0/11 \times 10^8 e$

حروف کوچک غیرمشابه در هر ستون (در یک زمان مشخص) از نظر آماری در سطح ($P \leq 0/05$) تفاوت معنی‌داری دارند.

حروف بزرگ غیریکسان هر سطر (ماتریکس مشخص) از نظر آماری در سطح ($P \leq 0/05$) تفاوت معنی‌داری دارند.



شکل ۱- نتایج حاصل از تنش مستقیم اسید-باز (معدة و روده)

حروف کوچک غیرمشابه در فرمولاسیون‌های مختلف و حروف بزرگ غیریکسان طی گذشت زمان از نظر آماری در سطح ($P \leq 0.05$) تفاوت معنی‌داری دارند.

به ترتیب نسبت ۳:۸ و ۳:۹ لگاریتم واحد تشکیل کلنی در هر گرم بود. به‌طور کلی قابلیت زنده‌مانی لاکتوباسیلوس‌ها در شرایط ترکیب معده و روده، کمتر از حالت معده به تنهایی است (حسینی‌نژاد و عابدفر، ۱۳۹۷).

ارزیابی خصوصیات ویسکوزیته سوسپانسیون حاوی سویه لاکتوباسیلوس پلاتناروم

اساس اندازه‌گیری ویسکوزیته اغلب اوقات سریع‌ترین، دقیق‌ترین و قابل‌اعتمادترین راه به‌منظور آنالیز بعضی از مهم‌ترین فاکتورهایی است که عملکرد یک محصول یا روابط رئولوژیکال (مرتبط با جریان و تغییر شکل ماده) آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (باقری، گرایی و کاشانی‌نژاد، ۱۳۹۴). ارزیابی خصوصیات ویسکوزیت، سه ماتریکس ریزپوشانی‌کننده باکتری لاکتوباسیلوس پلاتناروم نشان داد که بین سه فرمولاسیون ریزپوشانی با افزایش تنش برشی، سرعت برشی متناسب با مدل قانون توان^۲ در دمای ثابت (۲۵ درجه سانتی‌گراد) روند افزایشی داشت. در واقع باتوجه‌به خصوصیات ویسکوزیته سه فرمولاسیون به مراتب، فرمولاسیون ۲ روند ویسکوزیته متناسب‌تری در مقایسه با دو فرمولاسیون دیگر داشت (شکل ۲).

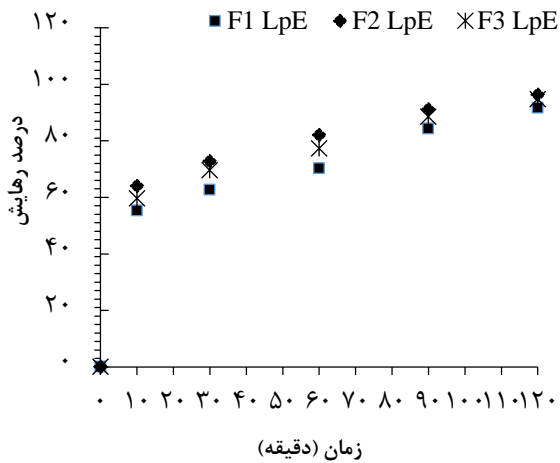
در این رابطه می‌توان گفت عوامل محیطی باعث تقویت یا تضعیف رفتار میکروارگانیسم‌ها در شرایط خاص می‌شود. برخلاف شرایط آزمایشگاهی، مقادیر اسیدهای صفاوی در روده ثابت نیست و تا زمان مصرف مواد غذایی پرچرب، مقدار این ترکیبات در روده بسیار کم است، این خود عاملی در جهت سازگار شدن باکتری‌ها و همچنین افزایش مقاومت آنها در برابر صفا می‌شود (میلانی، نعیمی، مرتضوی و کوچکی، ۱۳۹۱). همچنین عملکرد واقعی نمک‌های صفاوی در روده تحت تأثیر ترکیب با فسفولیپید است. از این رو، حضور آنزیم پانکراتین و اثر آن به‌طور مستقیم روی تجزیه دیواره سلولی باکتری‌های پروبیوتیک در حالت آزاد سبب کاهش شدیدتر در سیکل جمعیت آن در مقایسه با سلول‌های ریزپوشانی‌شده می‌شود که به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم روی دیواره ماتریکس کنسانتره پروتئین آب‌پنیر بوده است (Mokarram et al., 2009).

نتایج تحقیق‌ها نیز نشان داد که اختلاف معنی‌داری در کاهش سیکل لگاریتمی جمعیت لاکتوباسیلوس /سیدوفیلیوس^۱ ریزپوشانی‌شده نسبت به آزاد در شرایط شبیه‌سازی معده وجود دارد، درحالی‌که در شرایط بازی روده نسبت کاهش لگاریتمی جمعیت باکتری‌های ریزپوشانی‌شده به سلول‌های آزاد آن در سویه‌های ذکرشده

² Power law

¹ *Lactobacillus acidophilus*

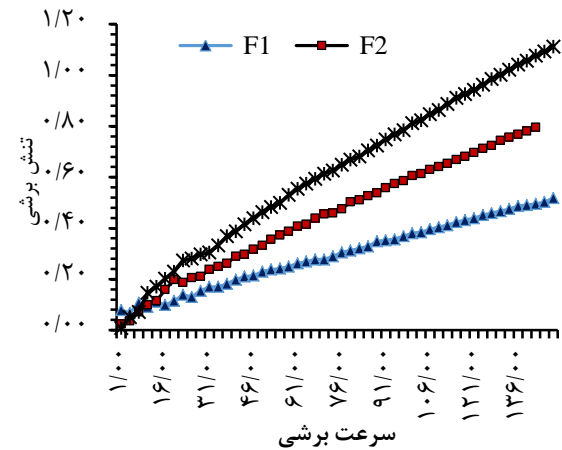
ظرفیت بافری ماتریکس‌های بیوپلیمر بر پایه پروتئین در پوشش‌دهی باکتری سبب کاهش میزان تخلخل و تراکم سطح دیواره ریزپوشینه در طول زمان رهایش می‌گردد (Shori, 2017).



شکل ۳- بررسی خصوصیات ویسکوزیته در سه فرمولاسیون ریزپوشانی مختلف

بعد از بررسی صورت‌گرفته براساس ویژگی‌هایی همچون راندمان ریزپوشانی، مقاومت نسبت به تنش اسیدی و بازی، ارزیابی ویسکوزیته، خصوصیات میکروسکوپی و درنهایت نرخ سنتیک رهایش، فرمولاسیون دوم به‌عنوان ماتریکس مناسب در نظر گرفته شد و در ادامه به بررسی خصوصیات ماندگاری در طی دو ماه در دو سطح دمایی ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد پرداخته شد. بررسی پایش جمعیت لاکتوباسیلوس پلانناروم به‌طور متوالی هفته به هفته تا بازه ذکر شده کشت داده‌شده تا خاصیت پروبیوتیکی سوپه یادشده ریزپوشینه‌شده تأیید گردد.

نتایج حاصل از پژوهش قهرمانی‌فر، محمدی‌ثانی، نجف‌نجفی و قهرمانی‌فر (۱۳۸۹) نیز نشان داد که با افزایش غلظت ترکیبات تشکیل‌دهنده دیواره ریزپوشانی و رسیدن به یک نسبت نرمال، منحنی توزیع اندازه ذرات به یکدیگر نزدیک می‌شود و می‌تواند یک انسجام در ایجاد ویسکوزیته در سوسپانسیون به‌وجود آورد که با نتایج حاصل از این پژوهش به لحاظ ویسکوزیته ظاهری مطابقت دارد.



شکل ۲- بررسی خصوصیات ویسکوزیته در سه فرمولاسیون ریزپوشانی مختلف

سنتیک رهایش ماتریکس سلول‌های ریزپوشانی‌شده در

شرایط Invitro

نتایج درصد سنتیک رهایش باکتری پروبیوتیک نشان داد که تأثیر گذشت زمان و تماس مستقیم با شرایط اسید-قلیای، بر رهایش سلول‌های ریزپوشانی در ماتریکس دوم به مراتب بیشتر از دو ماتریکس دیگر و درنهایت در مقایسه با نمونه شاهد بود (شکل ۳). همچنین سنتیک رهایش تخمین‌زده‌شده در هر سه محیط (اسیدی، قلیایی و تنش مستقیم دو محیط) مطابق با مدل‌های ریاضی با ضریب همبستگی مناسب در رهایش سلول‌های ریزپوشانی‌شده بیان گردید و با نتایج حاصل از رابطه‌های ذکر شده (مدل هیگوچی) به‌عنوان بهترین مدل جهت برازش داده ارائه شد (جدول ۵). نتایج تحقیق‌ها نشان داده است که به‌دلیل

جدول ۵- تجزیه و تحلیل داده‌های رهایش یافته در ماتریکس باکتری پروبیوتیک با استفاده از مدل‌های ریاضی

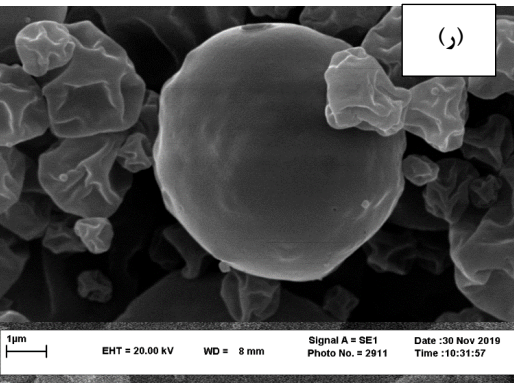
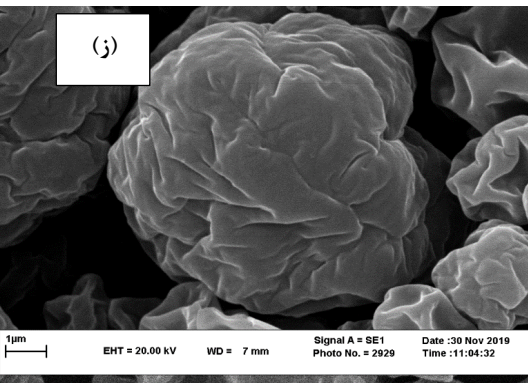
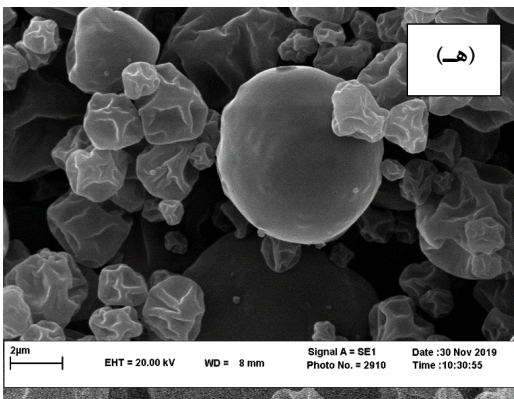
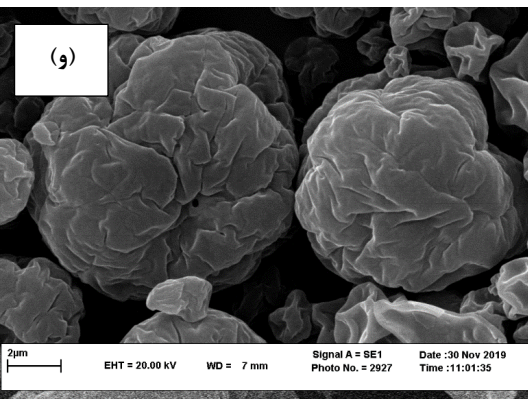
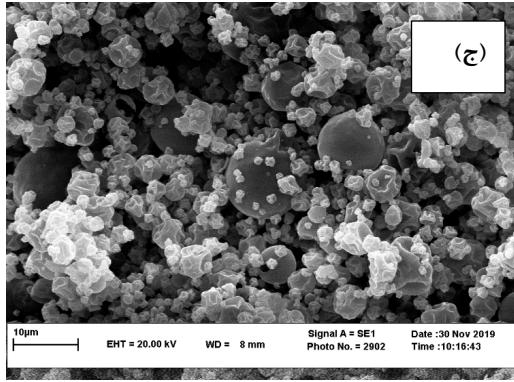
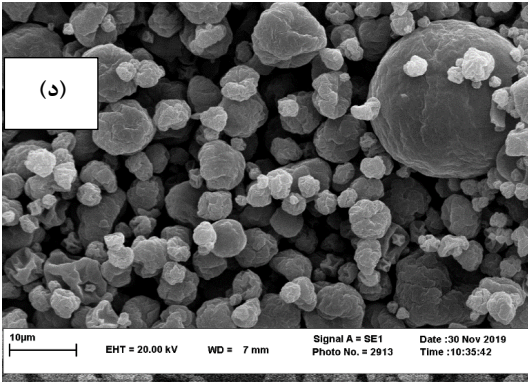
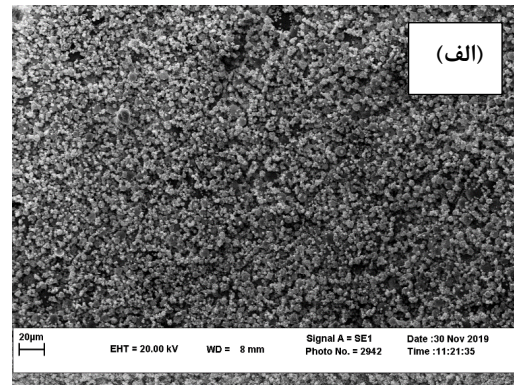
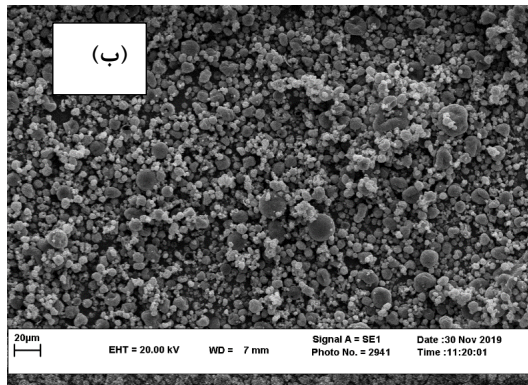
مدل ریتگر- پاس			مدل هیگوچی			مدل فرست اورد			نمونه‌ها	شرایط
n	k	R ²	C _H	K _H	R ²	C	K	R ²		
۰/۳۷	۰/۰۶	۰/۹۰	۲/۴۳	۳/۰۳	۰/۸۹	۴/۴۷	۰/۰۰۳	۰/۷۵	فرمول اول	محیط اسید معده
۰/۳۹	-۰/۰۵	۰/۹۸	۱۰/۱۰	-۰/۳۳	۰/۹۹	۱/۲۳	۰/۰۲۶	۰/۹۶	فرمول دوم	
۰/۶۹	۰/۰۱۳	۰/۹۵	-۳/۱۵	۳/۵۹	۰/۹۳	۴/۱۰	۰/۰۰۵	۰/۹۴	فرمول سوم	
۰/۲	۰/۰۵	۰/۹۰	۲/۶۲	۱/۹۰	۰/۸۷	۴/۵۸	۰/۰۰۲	۰/۶۸	فرمول اول	محیط نمک صفراوی
۰/۳۲	-۰/۰۴	۰/۹۶	۱۰/۱۰	-۰/۲۰	۰/۹۴	۰/۷۱	۰/۲۹	۰/۸۸	فرمول دوم	
۰/۸۵	۰/۰۰۶	۰/۹۵	-۲/۱۱	۲/۰۵	۰/۹۷	۴/۲۴	۰/۰۰۶	۰/۹۴	فرمول سوم	
۰/۶۵	۰/۰۱۲	۰/۸۵	-۰/۰۷	۲/۴۳	۰/۸۳	۴/۶	۰/۰۰۲	۰/۸۳	فرمول اول	محیط ترکیبی
۱/۱۹	۰/۰۰۶	۰/۹۶	-۲/۹۰	۴/۰۷	۰/۹۶	۴/۲۲	۰/۰۰۵	۰/۹۶	فرمول دوم	
۰/۷۲	-۰/۰۴	۰/۹۱	۹/۰۲	-۰/۳۲	۰/۹۳	۱/۷۲	۰/۰۴	۰/۹۰	فرمول سوم	

ذرات ریزکپسول در نمونه ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود.

Rosenberg, Kopelman و Talmon (۱۹۹۰)، نشان دادند که علت دندان‌داربودن سطوح ریزکپسول‌ها، چروکیدگی آنها در طی خشک‌شدن در محفظه خشک‌کن پاششی در اثر تبخیر سریع آب موجود در امولسیون می‌باشد که با توجه به نوع ترکیبات دیواره و دمای نگهداری میزان این چروکیدگی متفاوت است. Sootitawat و همکاران (۲۰۰۵) نیز گزارش کردند با افزایش صافی سطح و گردی ریزکپسول‌ها میزان ازدست‌رفتن ماده هسته (باکتری پروبیوتیک) به دلیل کم‌شدن سطح ریزکپسول‌ها کاهش می‌یابد. از طرفی حضور پروتئین آب‌پنیر به تنهایی جهت تشکیل دیواره ریزکپسول سبب شکاف و سوراخ در سطح آنها خواهد شد که در مجاورت پلی‌ساکاریدهای پری‌بیوتیک مانند اینولین و صمغ فارسی یکنواختی ساختار افزایش می‌یابد.

بررسی خصوصیات مورفولوژی ریزکپسول‌ها و توپولوژی سطحی در دو دمای مختلف

نتایج حاصل از تصاویر ذرات ریزکپسول که با میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه شدند (شکل ۴)، نشان داد که خصوصیات سطح ظاهری و اثر ترکیبات دیواره بر ریزساختارهای ذرات در دو دمای مختلف، متفاوت است. در واقع ریزکپسول ساخته شده در فرمولاسیون دوم (۸/۵)، ۵/۵ و ۰/۲ گرم به ترتیب برای کنسانتره پروتئین آب‌پنیر، اینولین و صمغ فارسی) که در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، چروکیدگی سطحی به مراتب بالاتری در مقایسه با ذرات ریزکپسول نگهداری شده در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) داشت، که شاید بتوان علت را به ترکیبات پایه در ماتریکس دیواره ریزپوشانی نسبت داد. از آنجایی که بخش اعظم دیواره این ذرات را ترکیبات پروتئینی نظیر کنسانتره پروتئین آب‌پنیر تشکیل داده است، نگهداری طولانی مدت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد سبب می‌شود ضمن ازدست‌دادن رطوبت ناچیز سطحی تغییر در کنفورماسیون فضایی ماتریکس دیواره نیز صورت گیرد. بررسی میکروبی و پایش جمعیت در طول مدت ماندگاری، نتایج فوق را تأیید می‌نماید که جمعیت پروبیوتیکی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مراتب لگاریتم سیکل زنده‌مانی کمتری در مقایسه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد دارد. علاوه بر این پایداری و انسجام



شکل ۴ بررسی تصاویر ریزکپسول با میکروسکوپ الکترونی در بهترین فرمولاسیون با دو دمای مختلف

(الف) دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر، ب: دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر، ج: دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰ برابر، د: دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰ برابر، ه: دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بزرگ‌نمایی ۲۰۰۰۰ برابر، و: دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و بزرگ‌نمایی ۲۰۰۰۰ برابر، ز: دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بزرگ‌نمایی ۳۰۰۰۰ برابر و ر: دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و بزرگ‌نمایی ۳۰۰۰۰ برابر)

با هفته‌های قبل نگهداری داشت. در این حالت ضعیف‌شدن دیواره در طول زمان ماندگاری سبب کاهش در جمعیت سلول‌های زنده پروبیوتیک گردیده است. García-Lobato-Calleros, Sandoval-Castilla و Alvarez-Ramírez, Galindo و Vernon-Carter (۲۰۱۰) در ارزیابی ریزپوشانی روی زنده‌مانی سویه‌های پروبیوتیک نیز راندمان مناسب و کاهش سلول‌ها را طی زمان تأیید کردند. این محققین همچنین بازده ریزپوشانی و افزایش زنده‌مانی در طول مدت ماندگاری را به افزایش غلظت پلیمر آلژینات سدیم در ماتریکس پروتئینی نسبت دادند که نتایج حاصل با نتایج Shi و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت داشت.

نتایج عملکرد ماتریکس ریزپوشانی در طول مدت ماندگاری

در جدول (۶) زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی‌شده تحت فرمولاسیون دوم طی مدت نگهداری نشان داده شده است. براین اساس طول مدت ماندگاری سبب کاهش تعداد جمعیت میکروبی در هر دو دمای نگهداری گردید که این مقدار کاهش در دمای نگهداری ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مراتب نسبت به دمای محیط شدیدتر بود. همچنین نتایج نشان داد ابتدای هفته اول از ماه دوم، دو سیکل لگاریتمی از جمعیت نسبت به هفته‌های اول در ماه اول کاسته شده است. طی دوره نگهداری در ماه دوم بالاخص هفته‌های سوم و چهارم آن مقاومت ماتریکس بیوپلیمره اختلاف معنی‌داری در مقایسه

جدول ۶- ارزیابی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم انکپسوله‌شده در فرمول دوم طی مدت ماندگاری در دمای (۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد)

تعداد باکتری‌ها (لگاریتم واحد تشکیل کلنی در گرم)		زمان	
۴۰ درجه سانتی‌گراد	۲۵ درجه سانتی‌گراد	هفته	ماه
۱۰/۹۱۹±۰/۰۳۶ ^{Aa}	۱۰/۹۷۳±۰/۰۲۱ ^{Aa}	۱	اول
۱۰/۲۳۰±۰/۰۳۵ ^{Bb}	۱۰/۸۷۵±۰/۰۸۵ ^{Aa}	۲	
۹/۷۴۸±۰/۰۱۴ ^{Ac}	۹/۹۶۸±۰/۰۱۵ ^{Ab}	۳	
۸/۶۹۸±۰/۰۸۱ ^{Bd}	۸/۹۵۴±۰/۰۱۶ ^{Ac}	۴	
۸/۴۲۳±۰/۰۴۲ ^{Bd}	۸/۹۰۳±۰/۰۲۳ ^{Ac}	۱	دوم
۸/۰۰۱±۰/۰۲۹ ^{Be}	۸/۶۰۲±۰/۰۴۵ ^{Ad}	۲	
۷/۹۰۳±۰/۰۳۸ ^{Be}	۸/۲۰۴±۰/۰۷۱ ^{Ae}	۳	
۷/۴۱۴±۰/۰۱۶ ^{Bf}	۸/۰۴۱±۰/۰۲۲ ^{Ae}	۴	

حروف غیرمشابه کوچک و بزرگ به ترتیب در هر ستون و در هر سطر (در یک دمای مشخص) از نظر آماری در سطح ($P \leq 0.05$) تفاوت معنی‌داری دارند.

رهایش مناسب و ویسکوزیته قابل قبول برای ریزپوشانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم فراهم کند. در ادامه بررسی‌های به عمل آمده، مورفولوژی سویه ریزپوشانی‌شده با فرمولاسیون دوم طی نگهداری در دمای محیط خصوصیات سطحی بهتر و زنده‌مانی بیشتری را طی گذشت زمان از خود نشان داد. استفاده از ترکیبات پری‌بیوتیک همانند مواد استفاده‌شده در این تحقیق می‌تواند در محصولات غذایی فراسودمند، باکتری‌های پروبیوتیک را به شکل یک محصول سین‌بیوتیک معرفی کند.

نتیجه‌گیری

سوسپانسیون‌های ریزپوشانی‌کننده در سیستم‌های درون‌پوشانی به‌عنوان حامل ترکیبات زیست‌فعال و ضد میکروبی بوده و کمترین تأثیر را بر ویژگی‌های ذاتی مواد غذایی دارند. آنها قادر به حفظ خصوصیات زیست‌فعال ترکیبات بوده و همچنین به دلیل داشتن اندازه ریزتر زیست‌دسترسی به مواد غذایی را در روده افزایش می‌دهند. به‌طور کلی نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که فرمولاسیون دوم به‌عنوان یک ترکیب پری‌بیوتیک توانست بهترین خصوصیات را از نظر راندمان، مقاومت ۱۲۰ دقیقه‌ای در برابر محیط‌های شبیه‌سازی‌شده معده و روده،

منابع

- باقری، ه.، گرایلی، ز.، و کاشانی‌نژاد، م. (۱۳۹۴). بررسی تغییرات رئولوژیکی صمغ قدومه‌شهری به عنوان تابعی از غلظت و فرآیند انجماد و مقایسه آن با صمغ تجاری زانتان. *فناوری‌های نوین غذایی*، ۳(۱)، ۳۳-۴۲. doi:<https://doi.org/10.22104/JIFT.2015.228>
- حسینی‌نژاد، م.، و عابدفر، ع. (۱۳۹۷). بررسی خصوصیات کیفی و زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باسیلوس کواگولانس در نان پروبیوتیک. *پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی*، ۷(۳)، ۳۳۷-۳۵۲. doi:<https://doi.org/10.22101/JRIFST.2018.10.20.738>
- خسروی‌زنجانی، م.، محمدی، ن.، اهری، ح.، غیائی‌طرزی، ب.، و باخدا، ح. (۱۳۹۲). تأثیر ریزپوشانی با پوشش کیتوزان بر روی زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در بستنی. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*، ۸(۴)، ۱۲۵-۱۳۴
- عابدفر، ع.، ادیب‌پور، ن.، و حسینی‌نژاد، م. (۱۳۹۷). مقایسه زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانٹارم A7 و S2G ریزپوشانی شده با ماتریکس‌های بیوپلیمری مختلف در شرایط شبیه‌سازی معده و روده و در طول مدت ماندگاری. *میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی*، ۴(۳)، ۳۶-۴۹
- قهرمانی‌فر، ا.، محمدی‌ثانی، ع.، نجف‌نجفی، م.، و قهرمانی‌فر، م. (۱۳۸۹). تأثیر ویژگی‌های امولسیون بر خصوصیات پودرهای حاصل از فرایند ریزپوشانی. *نوآوری در علوم و فناوری غذایی (علوم و فناوری غذایی)*، ۲(۵)، ۴۵-۵۴.
- میلانی، ا.، نعیمی، ه.، مرتضوی، س.ع.، و کوچکی، آ. (۱۳۹۱). تأثیر شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک ریزپوشانی شده لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) در بستنی ماستی سین‌بیوتیک. *پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، ۸(۲)، ۱۹۰-۱۹۹. doi:<https://doi.org/10.22067/ifstrj.v8i2.17279>
- Abedfar, A., Adibpour, N., & Hosseini Nezhad, M. (2018). The survivability comparison of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* (S₂G and A₇) in different biopolymer matrices in simulated gastrointestinal tract during storage time. *Applied Microbiology in Food Industry*, 4(3), 36-49. (in Persian)
- Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, A., & Rosell, C. M. (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 166-174. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.015>
- Ananta, E., Volkert, M., & Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International dairy journal*, 15(4), 399-409. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.004>
- Bagheri, H., Graïli, Z., & Kashaninezhad, M. (2015). Evaluation rheological of Qudomeh shahri a function of concentration and freezing proces and compare it's with commercial Xanthan gum. *Innovative Food Technologies*, 3(1), 33-42. doi:<https://doi.org/10.22104/jift.2015.228> (in Persian)
- Botelho, G., Canas, S., & Lameiras, J. (2017). Development of phenolic compounds encapsulation techniques as a major challenge for food industry and for health and nutrition fields. In *Nutrient Delivery* (pp. 535-586): Elsevier.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering*, 104(4), 467-483. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>
- Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L., & Collins, J. (1998). Development and application of an in vitro methodology 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.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & del Carmen Villarán, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International journal of food microbiology*, 142(1-2), 185-189. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>
- Ghahramanifar, A., Mohamadi Sani, A., Najaf Najafi, M., & Ghahramanifar, M. (2010). The effect of emulsion properties on the powder characteristics produced with encapsulation process. *Innovation In Food Science And Technology (Journal Of Food Science And Technology)*, 2(2(5)), 45-54. (in Persian)

- He, Y., Wu, Z., Tu, L., Han, Y., Zhang, G., & Li, C. (2015). Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. *Applied Clay Science*, 109-110, 68-75. doi:<https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.02.001>
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M., Yarmand, M., & Razavi, S. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food chemistry*, 111(1), 50-55. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.036>
- Hosseininezhad, M., & Abedfar, A. (2018). A study on the qualitative characteristics and microbial survival of lactobacillus acidophilus and bacillus coagulans in probiotic bread. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 7(3), 337-352. doi:<https://doi.org/10.22101/JRIFST.2018.10.20.738> (in Persian)
- Huq, T., Khan, A., Khan, R. A., Riedl, B., & Lacroix, M. (2013). Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(9), 909-916. doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2011.573152>
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*, 3(2), 39-48.
- Khosravi Zanjani, M., Mohammadi, N., Ahari, H., Ghiassi Tarzi, B., & Bakhoda, H. (2014). Effect of microencapsulation with chitosan coating on survival of Lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum in ice cream. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(4), 125-134. (in Persian)
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International dairy journal*, 13(1), 3-13. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.09.004>
- Milani, E., Naemi, H., Mortazavi, S.A., & Koocheki, A. (2012). Influence of simulated gastrointestinal conditions on survivability of microencapsulated probiotic Lactobacillus casei in symbiotic frozen yogurt. *Iranian Food Science & Technology Research Journal*, 8(2), 190-199. doi:<https://doi.org/10.22067/ifstrj.v8i2.17279> (in Persian)
- Mohammadi, R., & Mortazavian, A. (2011). Technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks. *Food Reviews International*, 27(2), 192-212. doi:<https://doi.org/10.1080/87559129.2010.535235>
- Mokarram, R., Mortazavi, S., Najafi, M. 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.023>
- Mortazavian, A., Azizi, A., Ehsani, M., Razavi, S., Mousavi, S., Sohrabvandi, S., & Reinheimer, J. (2008). Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft*, 63(4), 349-427.
- 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.
- Patel, P. J., Singh, S. K., Panaich, S., & Cardozo, L. (2014). The aging gut and the role of prebiotics, probiotics, and synbiotics: A review. *Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics*, 5(1), 3-6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcgg.2013.08.003>
- Picot, A., & Lacroix, C. (2003). Optimization of dynamic loop mixer operating conditions for production of o/w emulsion for cell microencapsulation. *Le Lait*, 83(3), 237-250. doi:<https://doi.org/10.1051/lait:2003013>
- Rosenberg, M., Kopelman, I., & Talmon, Y. (1990). Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5), 1288-1294. doi:<https://doi.org/10.1021/jf00095a030>
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped Lb. casei in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111-117. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.010>

- Shi, L.-E., Li, Z.-H., Li, D.-T., Xu, M., Chen, H.-Y., Zhang, Z.-L., & Tang, Z.-X. (2013). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of food engineering*, 117(1), 99-104. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.012>
- Shori, A. B. (2017). Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. *HAYATI journal of biosciences*, 24(1), 1-5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.12.008>
- Soottitantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2005). Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 107-114. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.09.003>

Evaluation of Survival of *Lactobacillus plantarum* Capsulated in Synbiotic Suspension under Simulated Gastrointestinal Conditions

Matina Yekta¹, Vahid Hakimzadeh^{2*}

1- MSc. Student, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran

*Corresponding author (v.hakimzadeh@yahoo.com)

Abstract

Nowadays due to the role of nutrition in public health, as well as the use of probiotic bacteria that exposed to acute conditions of food processes and the gastrointestinal tract, is always one of the concerns of researchers in food and pharmaceutical sciences. Therefore, probiotics has been proven as a new technique for the tolerability of food samples coated with biopolymers in beneficial emulsions under gastric and intestinal simulation conditions. In this study, three formulations were prepared for microcoating suspension (a combination of whey protein concentrate, inulin and Persian gum in the range of 14 to 14.3 g per 100 mL). The results showed that microcoating efficiency, resistance to acid and alkali stress and viscosity evaluation, microscopic properties and finally the release rate synthesis, the second formulation (8.5, 5.5 and 0.2 g for whey protein concentrate, inulin and Persian gum, respectively) was considered as a suitable matrix, in the following, the durability characteristics during two months were evaluated at two temperature levels of 25 and 40 °C. The effect of shelf life caused a decrease in the population of *Lactobacillus plantarum* at two temperatures, which was much more severe at a temperature of 40 °C than the ambient temperature. The results of capsule microparticle images obtained by scanning electron microscopy showed that the surface of properties and the effect of wall compositions on the microstructures of the particles at two different temperatures were different. According to the results, the temperature of 40 °C had a much higher surface shrinkage compared to the small particles of the capsule stored at room temperature.

Keywords: Emulsion, Functional matrix, Gastrointestinal system, *Lactobacillus plantarum*, Microencapsulation