sina-pub.ir

ارزیابی زیست پذیری باکتری‌های لاکتیک اسید آزاد و انکپسوله با استفاده از مدل معدی روده‌ای in vitro و مطالعات قابلیت بقا میکروکپسول‌های سین بیوتیک در ماتریکس غذایی خشک در طی ذخیره سازی

چکیده

مقاومت معدی روده‌ای، برای پروبیوتیک‌ها اجتناب ناپذیر است تا رسیدن سلول‌های زنده‌ی کافی در کولون برای اعطا مزایای سلامتی خودشان را ممکن سازد. اثربخشی باکتری‌های لاکتیک اسید (LAB) در مسیر کولون در یک مدل معدی روده‌ای in vitro مورد مطالعه قرار گرفته است. اثر ذخیره سازی روی میکروکپسول‌های باکتریایی و سین بیوتیک در ماتریکس غذایی خشک با استفاده از پلوروتوس استراتوس به عنوان منبعی از پروبیوتیک‌ها مطالعه شده است. مخلوط سالم غلات گرفته شده از تامیل نادو، اسنک غذای خشک سنتی هندی و نوشیدنی سالم مالت جهانی به عنوان مواردی برای مطالعه‌ی پایداری میکروکپسول‌ها در فرمولاسیون‌های خشک مورد استفاده قرار گرفتند. LAB در اشکال آزاد و انکپسوله برای مقاومت در برابر شرایط تنش کنترل شد و مشخص شد که انکپسولاسیون از باکتری‌ها محافظت می‌کند و بقا آن‌ها را افزایش می‌دهد. یک قابلیت بقا 72٪-87٪ از باکتری‌ها در میکروکپسول‌های سین بیوتیک بعداز ذخیره سازی در ماتریکس غذایی خشک وجود داشت. L. بولگاریکوس NCIM 2056 و L. پلانتاروم NCIM 2038 بالاترین سطح از قابلیت بقا را در میکروکپسول‌های سین بیوتیک ذخیره شده در همه‌ی ماتریس‌های غذایی خشک مورد مطالعه نشان داد. مواد غذایی پروبیوتیک خشک که در قفسه پایدار هستند (که نیاز به نگه داری در یخچال ندارند)، مسیر شکست محصولات در صنعت پروبیوتیک‌ها برای غلبه بر معایب فرمولاسیون‌های پروبیوتیک مایع خواهند بود. کار اخیر یک نوآوری در مورد فرمولاسیون‌های چنین محصولاتی می‌باشد که می‌توانند با استفاده از LAB پروبیوتیک تکرار شوند.

کلمات کلیدی: انکپسولاسیون، پلوروتوس استراتوس، سین بیوتیک، ماتریکس مواد غذایی خشک، مدل معدی روده‌ای in vitro.

1. مقدمه

sina-pub.ir

یک هیاهویی از محصولات پروبیوتیک سلامت محور در طی یک دهه اخیر به وجود آمده است. فعالیت بیولوژیک باکتری‌های پروبیوتیک، مدیون توانایی اتصال آن‌ها به انتروسیت‌ها می‌باشد که از این رو، با روش مستثنی کردن رقابتی، مانع از اتصال پاتوژن‌های روده‌ای، می‌شود. باکتری‌های پروبیوتیک، به دلیل خصوصیات سودمند مختلف خودشان، از جمله کاهش علایم سندرم روده تحریک پذیر، اثرات تنظیم کنندگی ایمنی و کاهش کلسترول، در صنعت غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (FAO/WHO, 2006). شمول باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات تخمیری، ارزش آن‌ها را به عنوان غذاهای با عملکرد درمانی بهتر افزایش می‌دهد. برای همه‌ی محصولاتی که ادعای سلامت پروبیوتیک دارند لازم است که حداقل 10^6CFU/ml باکتری پروبیوتیک، تا تاریخ انقضا داشته باشند، چون مینیمم سطح درمانی در هر روز، 10^8-10^9 سلول در نظر گرفته می‌شود (Kailasapathy & Chin, 2000). کریمی، مرتضویان و دا کروز (2011) بیان کردند که محصولات پروبیوتیک زمانی که 100 گرم در روز مصرف می‌شوند حدود 10^9 سلول زنده را درون روده تحویل می‌دهند. گزارش‌ها نشان دهنده‌ی بقا ضعیف پروبیوتیک‌ها در محصولات غذایی و همچنین در سیستم معدی روده‌ای انسان می‌باشد. بقا پروبیوتیک‌ها در یک محصول در طی مصرف، برای اثر بخشی آن‌ها دارای اهمیت است، چون بقا آن‌ها در طی فراوری و ذخیره سازی محصولات غذایی ضروری است (Mortazavian, Mohammadi, & Sohrabvandi, 2012). انتخاب سویه‌های پروبیوتیک بهتر و ارائه‌ی لایه بندی فیزیکی به آن‌ها، برای افزایش بقا آن‌ها، از جمله، استفاده از پروبیوتیک‌های مناسب و ترکیب نرمالی از پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها (سین بیوتیک‌ها) می‌تواند تحویل پروبیوتیک‌های زنده‌ی کافی در محصولات غذایی عملکردی به مصرف کنندگان را افزایش دهد. بقا پروبیوتیک‌ها در ماتریکس غذایی توسط عواملی مانند PH، اسیدی شدن در طی ذخیره سازی محصولات تخمیری، تولید هیدروژن پروکسید، سمیت اکسیژن، دماهای فراوری و ذخیره سازی، نرخ و نسبت تلقیح، میکروانکپسولاسیون و پایداری در طی ذخیره سازی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Mortazavian et al., 2012). به منظور فعالیت به عنوان پروبیوتیک در دستگاه گوارش (GIT) و به منظور اعمال اثرات سودمند خودشان روی میزبان، برای باکتری‌ها ضروری است که مکانیسم‌های محافظتی برای مقاومت در برابر PH پایین در معده، آنزیم‌های هاضمه و صفرای موجود در روده کوچک داشته باشند (Argyri et al., 2012). مدل معدی روده‌ای in vitro (سیستم تک ظرفی) ترجیحا برای تقلید این میکرو محیط GIT مورد استفاده قرار می-گیرد.

sina-pub.ir

میکروانکپسولاسیون به عنوان یک فرایندی تعریف می‌شود که در آن، سلول‌ها درون یک غشا حفظ می‌شوند تا آسیب سلولی و مرگ را کاهش دهند که ذراتی در حد نانومتر (نانوانکپسولاسیون)، میکرومتر (میکروانکپسولاسیون) یا مقیاس میلی متری ایجاد می‌کنند (Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011). انکپسولاسیون سلول‌های پروبیوتیک را پایدار می‌کند، که به طور معنی داری بقا و پایداری آن‌ها در تولید و مدیریت غذاهای عملکردی و همچنین در طی هیدراتاسیون مجدد و لیپوفیلیز شدن آن‌ها را افزایش می‌دهد. آن همچنین از فعالیت متابولیک پروبیوتیک‌ها در دستگاه معدی روده‌ای محافظت می‌کند (Picot & Lacroix, 2004) و پایداری در طی ذخیره سازی درازمدت را تضمین می‌کند (Zuidam & Nedovic, 2010). به علاوه، انکپسولاسیون، خصوصیات چشایی غذا را بهبود می‌دهد و پایدار می‌کند و همچنین به توزیع همگن پروبیوتیک‌ها در کل محصول کمک می‌کند (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003). به نظر می‌رسد که قارچ‌ها یک کاندیدای بالقوه برای پری بیوتیک‌ها باشند چون آن‌ها حاوی کربوهیدرات‌هایی مانند کیتین، همی سلولز، بتا و آلفا گلوکان، مانان، زایلان و گالاکتان‌ها هستند. مطالعات پیشین پیشنهاد می‌کنند که پلی ساکاریدهای گرفته شده از قارچ، خصوصیات تعدیل کننده‌ی ایمنی مانند افزایش تکثیر لنفوسیت و تولید آنتی بادی (Bao, Liu, Fang, & Li, 2001) و همچنین خصوصیات ضد سرطانی (Wasser, 2002) و کمک به حذف کلسترول و جلوگیری از چاقی دارند. آخرین یافته توسط هرست و همکارانش (2009) و تسایی و همکارانش (2009)، به ترتیب، خصوصیات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی قارچ‌ها را نشان داد. به جز خصوصیات پزشکی آن‌ها، قارچ‌های خوراکی، بهبود سلامتی معنی داری را نشان دادند چون آن‌ها محتوای پایینی از کالری، سدیم، چربی و کلسترول دارند و در عین حال در پروتئین، کربوهیدرات، فیبر، ویتامین‌ها و مواد معدنی غنی هستند. این خصوصیات تغذیه‌ای به قارچ‌ها، این پتانسیل را اعطا می‌کند که یک مکمل غذایی و همچنین یک عامل دارویی باشند. آن‌ها قادر به دستکاری ترکیب میکروبیوتای کولون در روده انسان توسط مهار پاتوژن‌های اگزوژن هستند (Rycroft, Jones, Gibson, & Rastall, 2001)، بنابراین، سلامت میزبان را بهبود می‌دهند (Roberfroid, 2002). سینیتسیا و همکارانش (2009) نشان دادند که عصاره‌های قارچ قادر به تحریک رشد پروبیوتیک‌ها هستند. نوشیدنی‌های پروبیوتیک عموما حاوی باکتری‌های زنده هستند. آن‌ها همچنین باید حاوی یک منبعی از مواد مغذی برای باکتری‌ها برای تغذیه باشند (Savini et al., 2010). در نتیجه، مسایل کوتاه شدن ذخیره سازی و دوام در قفسه برای برخی محصولات زنده وجود دارد. به علاوه، رقابت برای مواد مغذی بین سویه‌های

sina-pub.ir

باکتریایی درون یک نوشیدنی یک عارضه‌ی مهم دیگر می‌باشد. به علاوه، پروبیوتیک‌های مایع نیاز به نگه داری در یخچال دارند. از طرف دیگر، پودرهای پروبیوتیک شامل پروبیوتیک‌هایی هستند که تحت دما و فشار پایین با سرما خشک شده‌اند بدون اینکه سلول‌ها آسیب ببینند. این یک رشد مناسب را در حالت معلق برای ذخیره سازی درازمدت باکتری‌های پروبیوتیک فراهم می‌کند. بعداز هضم، به محض اینکه مجددا رطوبت در دسترس قرار می‌گیرد، آن‌ها مجددا هیدراته می‌شوند و سپس مجددا یک نسبتی از سلول‌ها، همانند چیزی که قبل از خشک شدن با سرما بوده‌اند، آغاز به تقسیم شدن می‌کنند. محققین، فهمیده‌اند که پروبیوتیک‌هایی که مجددا هیدراته شده‌اند، قادر به فراهم کردن موثر مزایای مربوطه‌ی خودشان هستند (Bohbot & Cardot 2012). اینکه آیا نگه داری در یخچال برای پروبیوتیک‌ها مورد نیاز هست یا نه بستگی به سویه‌های معین دارد، برخی از آن‌ها مقاوم به گرما و قفسه هستند و برخی از آن‌ها اینطور نیستند. بنابراین، کار اخیر برای مطالعه‌ی اثربخشی میکروکپسولاسیون در حفاظت از LAB از اسید، صفرا، و آنزیم‌های گوارشی برنامه ریزی شده است. این کار همچنین به ارزیابی اثربخشی انکپسولاسیون LAB با مولکول‌های پری بیوتیک به منظور افزایش قابلیت بقا آن‌ها در طی ذخیره سازی در ماتریکس غذایی خشک کمک کرده است.

2. مواد و روش‌ها

2.1. مواد شیمیایی

پپسین، نمک صفراوی، و محلول پانکراسی از سیگما آلدریچ، USA خریداری شد. همه‌ی مواد شیمیایی استفاده شده‌ی دیگر، از درجه تحلیلی از هایمدیا، بمبئی، هند بودند.

2.2. میکروارگانیسم‌ها

4 سویه‌ی باکتریایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس NCIM 2660، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس NCIM 2056، لاکتوباسیلوس فرمنتوم NCIM 2165 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم NCIM 2083 از مجموعه ملی میکروارگانیسم-های صنعتی (NCIM)، پونه، هند خریداری شدند. پلوروتوس استراتوس از آقای آشوک، خانه‌ی قارچ ایسپات، رووركلا، اودیشا، هند خریداری شد.

2.3. مدل معدی روده‌ای in vitro

sina-pub.ir

مدل معدی روده‌ای in vitro، یک دستگاه سفارشی می‌باشد که در بخش تخمیر و بیوسنتز موسسه‌ی تکنولوژی منشا گیاهی، دانشکده علوم غذایی و مواد غذایی، دانشگاه پوزنان علوم زیستی، پوزنان، لهستان مونتاژ شده است. آن شامل 3 مولفه‌ی اصلی می‌باشد (i) کنترل کننده‌ی اتوماتیک PH، (ii) توزیع کننده‌ی اسید (محلول 1 مولار HCl) و بازها (محلول ا مولار NaHCO3) و (iii) حمام بخار با تکان دهنده‌ی مغناطیسی. مجرای هاضمه با کاپ محکم هوا همراه با موادی برای تیوب نمونه‌گیری، پروب PH، ترمومتر، و آمادش‌هایی برای افزودن محلول‌های اسید / باز در دسترس است.

2.4. ارزیابی سلول‌های باکتریایی آزاد برای مقاومت آن‌ها در شرایط معده و روده کوچک

محلول آنزیم پپسین با حل کردن 0.02 گرم پپسین (800-2500 واحد پودر موکوز روده‌ای خوکی / میلی گرم پروتئین) در 2میلی لیتر از 0.1 مول HCl آماده سازی شد. محلول صفراوی و پانکراسی توسط حل کردن 0.12 گرم از صفرا و 0.02 گرم از پانکراس در 10 میلی‌لیتر از محلول 0.1 مولار NaHCO3 آماده سازی شد. سلول-های باکتریایی به مدت 48 ساعت در MRS برات رشد داده شدند و سپس سلول‌ها توسط سانتریفیوژ در دور 15000 به مدت 15 دقیقه برداشت شدند. 10 میلی لیتر از نمک به گلوله‌ی سلولی افزوده شد و کاملا مخلوط شد. بار سلول توسط رقیق سازی سریالی و قرار دادن رقت‌های مناسب روی پلیت‌های آگار MRS شمارش شد. نه میلی لیتر از سوسپانسیون گلوله‌ی سلولی به 200 میلی لیتر MRS برات در مجرای هاضمه به همراه مهره‌های مغناطیسی افزوده شد و کاملا روی تکان دهنده‌ی مغناطیسی مخلوط شد. واحد هاضمه سپس در حمام آب نگه داری شد. PH تا 2.0 با استفاده از کنترل کننده‌ی اتوماتیک PH تعدیل شد و 2 میلی لیتر پپسین به آن افزوده شد. دو میلی لیتر از برات مصرف شده از مجرای هاضمه بعداز 2 ساعت برداشته شد و سپس PH مخلوط هاضمه تا 6.0 تعدیل شد. بار سلول نمونه‌ی براشته شده، توسط پلیت کردن غیر رقیق شده و همچنین رقت‌های مناسب روی پلیت‌های آگار MRS و انکوباسیون در 37 درجه به مدت 48 ساعت شمارش شد. بعداز 2 ساعت، محلول صفراوی (10 میلی لیتر) به مجرای هاضمه، یعنی زمانی که PH برابر 6.0 بود افزوده شد و PH تا 7.4 تعدیل شد. مجددا 2 میلی لیتر از برات مصرف شده، از مجرای هاضمه بعداز 2 ساعت برداشته شد و مانند قبل شمارش شد.

sina-pub.ir

2.5. ارزیابی سلول‌های باکتریایی انکپسوله شده برای مقاومت در شرایط معده و روده کوچک

نشاسته در محلول CaCl2 با استفاده از حل 4 گرم نشاسته در 0.61 گرم / 100 میلی لیتر محلول CaCl2 آماده سازی شد. محلول سدیم آلژینات (0.6g/100ml)، محلول CaCl2 (1.22g/100ml) برای انکپسولاسیون و محلول تری سدیم سیترات (3g/100ml) برای حل کپسول‌ها برای رهاسازی سلول‌های باکتریایی آماده سازی شد. نشاسته در محلول CaCl2 (30 میلی لیتر) به گلوله‌ی سلولی اضافه شد و کاملا مخلوط شد. بار سلولی توسط رقیق سازی سریالی و پلیت کردن رقت‌های مناسب روی پلیت‌های آگار MRS شمارش شد. سوسپانسیون گلوله-ی سلولی با سرنگ درجه 31 برداشته شد و قطره قطره از طریق سوزن به محلول اسید آلژینیک افزوده شد و روی تکان دهنده‌ی مغناطیسی به صورت ممتد مخلوط شد. مهره‌های شکل گرفته فیلتر شدند و به محلول CaCl2 انتقال داده شدند و روی تکان دهنده‌های مغناطیسی به مدت 15 دقیقه انتقال داده شدند. مهره‌ها مجددا فیلتر شدند و در یخچال نگه داری شدند. میانگین قطر مهره‌ها با استفاده از مقیاس خط کش اندازه گیری شد. میانگین بار سلول میکروکپسول‌های هضم شده (هضم، همانطوری که در زیربخش 2.4 بیان شده بود، انجام شد) بعداز حل مهره‌ها در 10 میلی لیتر محلول تری سدیم سیترات توسط رقیق سازی سریالی و پلیت کردن رقت-های معین روی پلیت‌های آگار MRS و انکوباسیون در 37 درجه سانتی گراد به مدت 48 ساعت محاسبه شد. بازه‌ی انکپسولاسیون (EY)، که یک اندازه گیری ترکیبی از اثربخشی به دام انداختن و بقا سلول‌های زنده در طی رویکرد میکروکپسولاسیون می‌باشد بر طبق زیر محاسبه شد:

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

در این فرمول، N تعداد سلول‌های به دام افتاده‌ی زنده‌ی رها شده از میکروکپسول‌ها می‌باشد و N0 تعداد سلول-های زنده‌ی افزوده شده به مخلوط آلژینات در طی رویکرد انکپسولاسیون می‌باشد (Ch_avarri et al., 2010; Sathyabama, Ranjith, Bruntha, Vijayabharathi, & Brindha, 2014).

2.6. ارزیابی مقاومت دمایی سلول‌های باکتریایی آزاد

یک میلی لیتر از کشت شبانه روزی L. اسیدوفیلوس NCIM 2660 به هر لوله تست حاوی 9 میلی لیتر آب رقیق شده انتقال داده شد (1 تیوپ برای هر بازه‌ی زمانی). این تیوپ‌های تست در معرض دماهای مختلف (60، 70، 80 و 90 درجه سانتی گراد، به ترتیب)، به مدت 30 دقیقه در بازه‌ی منظم 5 دقیقه‌ای در حمام آب قرار داده

sina-pub.ir

شدند. بار سلول زنده توسط پخش کردن روی آگار MRS شمارش شد و در 37 درجه به مدت 48 ساعت انکوبه شد. ارزیابی مشابهی برای 3 باکتری دیگر نیز انجام شد. این آزمایش 3 مرتبه برای هر 4 باکتری تکرار شد.

2.7. ارزیابی مقاومت دمایی سلول‌های باکتریایی انکپسوله

مقاومت L. اسیدوفیلوس NCIM 2660 انکپسوله به دما که محدوده‌ای از 100 تا 140 درجه درجه سانتی گراد داشت با استفاده از آب مقطر به عنوان یک کشت معلق در حمام روغن مورد مطالعه قرار گرفت. یک گرم از میکروکپسول‌های تازه‌ی الحاق شده به باکتری‌ها (10^{10} سلول / گرم) به لوله‌ی تست حاوی 9 میلی لیتر آب مقطر انتقال داده شد. بعداز تیمار حرارتی، محتوا تا دمای اتاق سرد شد و بار سلولی زنده همانطوری که قبلا در زیر بخش 2.5 گفته شد، محاسبه شد. ارزیابی مشابهی برای 3 باکتری دیگر نیز اجرا شد. آزمایش 3 مرتبه برای همه‌ی 4 باکتری تکرار شد.

2.8. آماده سازی عصاره‌ی پلوروتوس استراتوس

P. استراتوس از آقای آشوک، خانه‌ی قارچ ایسپات، رووركلا، اودیشا، هند جمع آوری شد و به منظور حذف آلودگی و مواد خارجی با آب مقطر شسته شد. بعداز خشک شدن در آون، در دمای 70 درجه سانتی گراد به مدت 48 ساعت، برای ایجاد پودر نرم آسیاب شد. اول، عصاره گیری سرد با آب مقطر سرد به مدت 3 ساعت انجام شد. بعداز خشک شدن بیومس جامد، دو مرتبه با اتر 80٪ شسته شد. ته نشینی پروتئین بیومس با عامل sevag (کلروفرم، بوتانول در نسبت 4:1) به مدت 3 ساعت انجام شد. بعداز خشک شدن در هوا، آب دیونیزه به بیومس جامد افزوده شد تا یک ماده‌ی آبکی را شکل دهد (PH تا 7 تعدیل شد) و در حمام آب داغ در 50 درجه سانتی گراد به مدت 10 ساعت نگه داری شد سپس توسط سانتریفیوژ در 5000 rpm به مدت 20 دقیقه دنبال شد. سوپرنانت جمع آوری شد و 3 بخش اتانول مطلق به آن اضافه شد و سپس با خشک کردن در هوا و سوسپانسیون مجدد در آب دیونیزه دنبال شد. عصاره سپس به مدت 4 ساعت لیپوفیلیز شد و در ظرف مهر و موم شده تا زمان مصرف ذخیره سازی شد.

2.9. تخمین بتا گلوکان در قارچ خشک شده

محتوای بتا گلوکان پلوروتوس استراتوس با استفاده از کیت تست بتا گلوکان مگازیم (ایرلند) بر طبق رویکرد ارائه شده توسط کارخانه تخمین زده شد.

sina-pub.ir

2.9.1. اندازه گیری گلوکان کلی (آلفا گلوکان + بتا گلوکان) به اضافه‌ی D گلوکز در الیگوساکاریدها، سوکروز، و D – گلوکز آزاد

a) حل کردن و هضم جزئی محتوای گلوکان کل به دست آمده از پودر قارچ خشک شده

قارچ در آون هوای گرم در 90 درجه سانتی گراد در طی شبانه روز خشک شد و پودر شد. 100 میلی گرم پودر قارچ در لوله شیشه‌ای قرار داده شد. 1.5 میلی لیتر از HCL غلیظ (37٪ v/v) به لوله افزوده شد. بعداز ورتکس مناسب، آن در حمام آب در 30 درجه سانتی گراد به مدت 45 دقیقه قرار داده شد. سپس 10 میلی لیتر از آب مقطر به لوله افزوده شد و مجددا ورتکس شد. آن در یک حمام آب جوش (تقریبا 100 درجه سانتی گراد) به مدت 2 ساعت قرار داده شد و سپس توسط سرد کردن در دمای اتاق ادامه پیدا کرد. سپس 10 میلی لیتر از 2N KOH افزوده شد. همه‌ی محتوای لوله به فلاسک‌های حجمی 100 میلی لیتری انتقال داده شد. بافر سدیم استات (200 میلی مولار، PH 5.0) برای تعدیل حجم تا 100 میلی لیتر مورد استفاده قرار گرفت. سپس نمونه در 5762 دور به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد.

b) اندازه گیری گلوکان کل به اضافه‌ی D گلوکز در الیگوساکاریدها، سوکروز و D گلوکز آزاد.

سوپرنانت (0.1 میلی لیتر) در یک لوله‌ی تست تازه انتقال داده شد. سپس 0.1 میلی لیتر از مخلوط اگزو – 1، 3 بتا گلوکان (20 u/ml) و بتا گلوکوزیداز (4 U/ml) در 200 میلی مولار بافر سدیم استات (PH 5.0) به آن افزوده شد و به صورت مناسب ورتکس شد. آن سپس در حمام آب در 40 درجه سانتی گراد به مدت 60 دقیقه قرار داده شد. سپس 3 میلی لیتر از مخلوط گلوکز اکسیداز / پروکسیداز (GOPOD) به لوله افزوده شد و مجددا در حمام آب در 40 درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه قرار داده شد. جذب محلول در 510 نانومتر در برابر معرف بلنک (واکنش بدون سوپرنانت) با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV- visible ثبت شد.

2.9.2. اندازه گیری آلفا گلوکان (فیتوگلیکان و نشاسته) به اضافه‌ی D گلوکز در سوکروز، و D گلوکز آزاد

a) حل کردن، هیدرولیز، و اندازه گیری آلفا گلوکان

قارچ در آون هوای داغ در 90 درجه سانتی گراد در یک شبانه روز خشک شد و پودر شد. 100 میلی گرم از پودر قارچ، در لوله‌ی شیشه‌ای ریخته شد. دو میلی لیتر از 2M KOH افزوده شد و لوله روی یخ در یک شیکر در 150rpm به مدت 20 دقیقه برای مخلوط شدن مناسب و هیدرولیز نمونه نگه داری شد. سپس 8 میلی لیتر از

sina-pub.ir

بافر سدیم استات 1.2 مولار (PH 3.8) به لوله، تحت تکان دادن مداوم افزوده شد. فورا 0.2 میلی لیتر از آمیلوگلوکوزیداز (1630U/ml) به اضافه‌ی اینورتاز (500 U/ml) به تیوپ افزوده شد و به صورت مناسب ورتکس شد. آن سپس در حمام آب در 40 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه قرار داده شد سپس توسط سانتریفیوژ در 6930g به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد.

b) اندازه گیری گلوکان کل به اضافه‌ی D- گلوکز در الیگوساکاریدها، سوکروز و D گلوکز آزاد

سوپرنانت (0.1 میلی لیتر) به درون یک لوله‌ی تست تازه انتقال داده شد. سپس 0.1 میلی لیتر از بافر سدیم استات (200 میلی مولار، PH 5.0) و 3 میلی لیتر از معرف GOPOD به نمونه افزوده شد و با انکوباسیون در حمام آب در 40 درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه انکوبه شد. جذب محلول همانطوری که در بالا در مورد تخمین گلوکان کل گفته شد، ثبت شد.

2.9.3. تخمین بتا گلوکان در عصاره‌های قارچ

محتوای بتا گلوکان = محتوای گلوکان کل – (محتوای آلفا گلوکان)

2.10. آماده سازی میکروکپسول سین بیوتیک و کاربرد آن برای فرمولاسیون محصولات غذایی عملکردی خشک

میکروکپسول‌ها با استفاده از روش بیرون اندازی (حذف) آماده سازی شدند. عصاره‌ی تغلیظ شده‌ی P. استراتوس در محلول آلژینات سدیم 2.0٪ در نسبت 2:1 مخلوط شد و باکتری‌های لیپوفیلیز شده به آن افزوده شد که با مخلوط کامل روی تکان دهنده‌های مغناطیسی به مدت 10 دقیقه دنبال شد. مخلوط سپس به درون یک سرنگ درجه 31 ریخته شد و قطره قطره به 0.075 میلی مولار محلول CaCl2 سرد با تکان دادن آهسته افزوده شد. مهره‌های ریز شکل گرفته فیلتر شدند و در محلول 100 میلی مولار CaCl2 معلق شدند تا سخت شوند و اندازه‌ی آن‌ها اندازه گیری شد. بعداز 15 دقیقه، مهره‌ها فیلتر شدند و به مدت 4 ساعت در 45- درجه سانتی گراد لیپوفیلیز شدند. این کپسول‌های سین بیوتیک سپس با ماتریکس‌های غذایی خشک در نسبت 1:1 مخلوط شدند. غذاهای خشک مورد استفاده شامل این موارد بودند: یک مخلوط سالم غلات محلی (غذاهای سلامت جنوبی Pvt. Ltd، چنای، هند؛ ترکیبات: غلات (82٪ - راگی، ذرت، ارزن، جوآر، گندم، جو)، پالس‌ها (12٪ باقلای سرخ شده، باقلای سبز)، آجیل‌ها (2٪ بادام زمینی، بلارد، و بادام)، 3٪ ساگو و 1٪ هل، یک اسنک هندی

sina-pub.ir

سرخ شده‌ی سنتی (هالدیرام، نگپور، هند؛ ترکیبات: عدس نخود جوجه (25٪)، روغن سبزیجات، آرد نخود جوجه (10٪)، عدس قرمز (8٪)، بادام زمینی (7٪)، سیب زمینی، پوسته‌های برنج (2٪)، نخود سبز (1.5٪) و گندم) و یک نوشیدنی سالم مالت عمومی (GlaxoSmithKline؛ ترکیبات: آرد گندم (46٪)، آب جو، (26٪)، کشک خشک شده، (شیر)، قند، کلسیم کربنات، شیر خامه گرفته، روغن پالم، نمک، مخلوط ویتامین (ویتامین A، C، D، E، B1، B2، B5، B6، B12، نیاسین، فولیک اسید، بیوتین)، فریک پیروفسفات و روی اکسید). سپس قابلیت بقا باکتری‌ها در طی ذخیره سازی در ماتریکس‌های غذایی خشک مختلف همانطوری که در زیربخش‌های آینده توصیف شده است مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیز بعدی برای تغییرات در مزه و طعم فرمولاسیون‌های ذخیره شده نیز در بازه‌های منظم انجام شد.

2.10.1. ارزیابی قابلیت بقا باکتری‌ها در طی ذخیره سازی در میکروکپسول‌های سین بیوتیک الحاق شده در ماتریکس غذای خشک (مخلوط سلامتی (سالم) غلات)

مخلوط سلامت غلات مطابق با اولین مدل غذای خشک اتخاذ شد. میکروکپسول‌های سین بیوتیک لیپوفیلیز شده در پودر سلامت مخلوط شد (نسبت 1:1) و در مخزن مهر و موم شده به مدت 3 هفته در دمای اتاق ذخیره شد. نمونه برداری در بازه‌ی زمانی یک هفته انجام شد و بقا سلول‌ها بعداز هضم و رقیق سازی همانطوری که قبلا در زیر بخش 2.5 گفته شده بود، کنترل شد. آنالیز مقایسه‌ای قابلیت بقا ذخیره سازی آینده‌ی باکتری‌ها در میکروکپسول‌ها در حضور و غیاب عصاره‌ی P. استراتوس انجام شد.

2.10.2. ارزیابی قابلیت بقا باکتری‌ها در طی ذخیره سازی در میکروکپسول سین بیوتیک در یک اسنک غذایی خشک هندی

میکروکپسول‌های سین بیوتیک L. بولگاریکوس NCIM 2056 و L. پلانتاروم NCIM 2083 به ترتیب، در نسبت 1:1 به اسنک غذایی خشک افزوده شدند و اثر ذخیره سازی (در دمای اتاق در محفظه‌ی مهروموم شده) روی بقا به مدت 2 هفته مورد مطالعه قرار گرفت. هر هفته، مهره‌های ذخیره شده از مخلوط غذایی جداسازی شدند و در تری سدیم سیترات (3٪، PH 6) حل شدند. از مهره‌های حل شده، 200 میکرولیتر، توسط روش پاشیدن روی پلیت، روی آگار MRS پاشیده شد و در 37 درجه به مدت 48 ساعت انکوبه شد. سلول‌ها یک به یک محاسبه شدند.

sina-pub.ir

2.10.3. ارزیابی قابلیت بقا باکتری‌ها در طی ذخیره سازی در میکروکپسول‌های سین بیوتیک الحاق شده در مخلوط سلامت خشک (نوشیدنی سلامت مالت)

یک گرم از میکروکپسول سین بیوتیک L. بولگاریس NCIM 2056 و L. پلانتاروم NCIM 2083 به مخلوط سلامت (نوشیدنی سلامت مالت) در نسبت 1:1 افزوده شد و اثر ذخیره سازی (در دمای اتاق در مخزن مهر و موم شده) روی بقا بعداز 2 هفته مورد مطالعه قرار گرفت. مهره‌ها از ماتریکس غذایی بعداز 2 هفته جداسازی شدند و در تری سدیم سیترات حل شدند (3٪، PH 6). از مهره‌های حل شده، 200 میکرولیتر روی آگار MRS توسط روش پاشیدن روی پلیت، پاشیده شد و در دمای 37 درجه به مدت 48 ساعت انکوبه شد. سلول‌ها شمارش شدند.

2.11. آنالیز آماری

همه‌ی تست‌ها سه مرتبه انجام شدند مگر اینکه آن تخصصی باشد. اکسل 2010 برای محاسبه‌ی انحراف استاندارد و مقادیر Log مورد استفاده قرار گرفت. نرم افزار SPSS (آمار IBM) ورژن 19.0 برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از طریق ANOVA یک طرفه مورد استفاده قرار گرفت و میانگین تفاوت‌ها با استفاده از تست چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفت.

3. نتایج و بحث

میکروب‌های پروبیوتیک برای ارائه‌ی مزایای سلامتی به انسان‌ها توسط چندین محقق در سرتاسر جهان تایید شده‌اند. میکروب‌ها باید برخی خصوصیات ضروری را داشته باشند تا بتوانند به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار بگیرند. یکی از مهم‌ترین خصوصیات، مقاومت در برابر شرایط تنش معده (PH 2.0 و آنزیم هاضمه‌ی پپسین) و روده‌ی کوچک (صفرا و آنزیم‌های پانکراسی) می‌باشد. برای کنترل پتانسیل پروبیوتیک ایزوله‌های میکروبی ما، توانایی آن‌ها برای عبور از طریق معده و روده کوچک در مدل معدی روده‌ای in vitro مورد مطالعه قرار گرفت.

3.1. ارزیابی سلول‌های باکتریایی آزاد برای مقاومت آن‌ها در شرایط معده و روده کوچک

4 نمونه‌ی باکتریایی در شکل آزاد کنترل شدند و مشخص شد که سه تا از آن‌ها شرایط تنش معده و روده کوچک را تحمل می‌کنند. سلول آزاد به دست آمده از L. بولگاریس NCIM 2056 و L. فرمنتوم NCIM 2156 مقاومت متوسطی به محیط تنش زای روده نشان داد. در حالی که L. اسیدوفیلوس NCIM 2660 و L. پلانتاروم

sina-pub.ir

2083 NCIM مقاومت قابل چشم پوشی نشان داد. به هرحال، آن باکتری‌هایی که (جدول 1) به شرایط تنش معده مقاوم نبودند (PH 2.0 و آنزیم پپسین)، بعداز 4 ساعت از هضم در شرایط روده کوچک (صفرا و پانکراس در PH 6.0)، رشد در مقدار متوسط را نشان دادند. این نشان می‌دهد که سلول‌های باکتریایی تحت حالت سکوت قرار می‌گیرند که به دلیل شوک اسیدی در معده می‌باشد و رشد خودشان را مجددا زمانی که PH در روده کوچک به 6 می‌رسد از سر می‌گیرند. جین، زنگ، گائو، کوئی، و جیانگ (2012) گزارش کردند که به محض مواجهه با تنش اسیدی، سلول‌ها، تمامیت دیواره‌ی سلولی را تقویت می‌کنند و نفوذ پذیری غشا سلولی را برای حفظ H^+ از ورود، بعداز افزیش فعالیت ATPase –F0F1 تغییر می‌دهند. ترمیم پروتئین القا شده با اسید و آسیب DNA یک پاسخ مهم به تنش اسیدی در LABs ها می‌باشد. این می‌تواند یک دلیل احتمالی برای احیا سلول‌های مشاهده شده توسط ما باشد.

3.2. ارزیابی سلول‌های باکتریایی انکپسوله برای مقاومت آن‌ها در شرایط معده و روده کوچک

شکل انکپسوله‌ی L. اسیدوفیلوس NCIM 2660 افزایش مقاومت را در مقایسه با شکل آزاد نشان داد. اگرچه L. بولگاریس NCIM 2056 و L. فرمنتوم NCIM 2156 هیچ افزایشی را در بقا بعداز انکپسولاسیون نشان ندادند. این نشان می‌دهد که انکپسولاسیون، در برابر شرایط تنش،به باکتری‌ها حفاظت اعطا می‌کند که بستگی به نوع باکتری دارد. بار باکتریایی دیده شده باید در برات بیشتر از میکروکپسول‌ها بعداز 4 ساعت هضم باشد (جدول 2) که نشان می‌دهد که رهاسازی اساسی از سلول‌های باکتریایی از میکروکپسول‌ها وجود دارد. دابل انکپسولاسیون ممکن است به منظور کاهش این نشت و فراهم آوردن حفاظت بهتر برای سلول‌ها مطابق با بیان موکارام، مرتضوی، نجفی، و شهیدی (2009) اتخاذ شود.

جدول 1. تعداد سلول‌های باکتریایی آزاد که قبل و بعداز هضم زنده مانده‌اند.

Free cells	Time of digestion (hours)		
	0	2	4
	Log_{10} number of cells		
L. acidophilus NCIM 2660	9.0 ± 0.2^a	2.0 ± 0.1^b (22.2)	2.2 ± 0.1^b (24.4)
L. bulgaricus NCIM 2056	8.6 ± 0.2^a	0	3.3 ± 0.1^b (38.3)
L. fermentum NCIM 2156	9.1 ± 0.1^a	0	3.1 ± 0.1^b (34.0)
L. plantarum NCIM 2083	9.0 ± 0.1^a	0	0

مقادیر، نشان دهنده‌ی میانگین ± انحراف استاندارد هستند؛ n=4 (دونسخه از دو رقت)

Log10 تعداد سلول‌ها، در هر میلی لیتر محاسبه شد

sina-pub.ir

مقادیر موجود در پرانتز نشان دهنده‌ی درصد سلول‌های اصلی باقی مانده هستند یعنی سلول‌های زنده.

حروف بالانویس که مشابه نیستند به طور معنی داری متفاوت از یکدیگر هستند ($P< 0.05$).

مطابق با بیان کیم، چو، و کیم (2008)، باکتری‌های پروبیوتیک انکپسوله شده مقاومت بیشتری را در طی در معرض قرار گیری با بخش معدی روده‌ای و تیمار دمایی در مقایسه با شکل آزاد خودشان نشان دادند. به هرحال، ژل سدیم آلژینات، تخلخل و حساسیت به PH خیلی زیاد را نشان داد که می‌تواند هم با رهاسازی و هم با حفاظت از ترکیبات تداخل کند (Mortazavian & Sohrabvandi, 2007). بنابراین، به منظور غلبه بر این مانع، و بهبود بقا میکروارگانیسم‌ها، شمول پری بیوتیک‌ها در فرمولاسیون کپسول می‌تواند در نظر گرفته شود (چن، 2005). اسیدی شدن بعدی با باکتری‌های پروبیوتیک انکپسوله، در مقایسه با اسیدی شدن با شکل آزاد در طی دوره‌ی ذخیره سازی، آهسته تر بود (Kailasapathy, 2006).

3.3. ارزیابی مقاومت دمایی سلول‌های باکتریایی آزاد

این مشخص شده است که L. اسیدوفیلوس NCIM 2660 و L. فرمنتوم NCIM 2156 می‌تواند تا 90 درجه را به مدت 1 دقیقه تحمل کند در حالی که L. بولگاریکوس NCIM 2056 و L. پلانتاروم NCIM 2083 تا 100 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه مقاوم می‌باشد (شکل 1). همه‌ی 4 ارگانیسم قادر به بقا تا 70 درجه سانتی گراد حدود 25- 30 دقیقه بودند. آن‌ها همچنین می‌توانستند تا 80 درجه سانتی گراد به مدت 5-10 دقیقه مقاومت کنند. در LAB بسیاری از پروتئین‌های شوک حرارتی و پروتئازها شناسایی شده‌اند و مشخص شده است که به خوبی محافظت شده هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهد که در دمای بالا مقاومت کنند (Prasad, McJarrow & Gopal, 2003).

جدول 2. تعداد سلول‌های باکتریایی زنده در میکروکپسول‌ها قبل و بعداز هضم.

Encapsulated cells	Time of digestion (hours)				
	0	4	EY (%)	2	4
	Log_{10} number of cells from microcapsules			Log_{10} number of cells from broth	
L. acidophilus NCIM 2660	8.6 ± 0.2^{a}	2.6 ± 0.5^{c} (30.2)	30.2	3.4 ± 0.1^{b} (39.5)	3.4 ± 0.1^{b} (40.0)
L. bulgaricus NCIM 2056	8.9 ± 0.2^{a}	3.3 ± 0.3^{c} (37.0)	37	3.2 ± 0.1^{b} (36.0)	3.3 ± 0.1^{b} (37.0)
L. fermentum NCIM 2156	9.4 ± 0.1^{a}	3.1 ± 0.1^{c} (32.9)	32.9	3.0 ± 0.1^{b} (32.0)	2.3 ± 0.1^{b} (24.4)
L. plantarum NCIM 2083	8.0 ± 0.1^{a}	0	0	0	0

مقادیر، نشان دهنده‌ی میانگین ± انحراف استاندارد هستند؛ N= 4 (دونسخه از دو رقت).

Log10 تعداد سلول، در هر میلی لیتر از مهره‌های حل شده محاسبه شد.

مقادیر موجود در پروتئین نشان دهنده‌ی درصد سلول‌های اصلی باقی مانده می‌باشد یعنی سلول‌های زنده.

sina-pub.ir

EY= (N/No) × 100 (در اینجا EY بازده انکپسولاسیون می‌باشد، N تعداد سلول‌های به دام افتاده‌ی زنده ترشح شده از میکروکپسول‌ها و No تعداد سلول‌های آزاد افزوده شده به مخلوط آلژینات در طی انکپسولاسیون می‌باشد).

حروف بالانویس که مشابه نیستند به طور معنی داری متفاوت از یکدیگر هستند ($P< 0.05$).

3.4. ارزیابی مقاومت دمایی سلول‌های باکتریایی انکپسوله

دیده شده است که (جدول 3) انکپسولاسیون معیوب، مقاومت دمایی L. بولگاریکوس NCIM 2056 و L. پلانتاروم NCIM 2083 را از 100 درجه سانتی گراد (برای 10 دقیقه) به 130 درجه سانتی گراد (برای دو دقیقه) افزایش می‌دهد. این افزایش مقاومت دمایی، توسط انکپسولاسیون اعطا می‌شود (Ding & Shah, 2007) و می‌تواند در تکنیک-های اسپری خشک بهره برداری شود که می‌تواند برای افزودن بار زنده‌ی پروبیوتیک‌ها به ماتریکس غذایی خشک در شکل پودر شده به کار گرفته شود.

3.5. محتوای بتا گلوکان در قارچ P. اسراتوس

محتوای بتا گلوکان (g/100g) قارچ، برابر 48٪ از وزن خشک آن محاسبه شد. این در تطابق با مقادیر گزارش شده توسط سینیتسیا، میکووا، جابلونسکی، اسلوکویا، و کوپیکووا (2008) می‌باشد. بتا گلوکان، به عنوان یک فیبر پری بیوتیک قدرتمند در قارچ‌ها در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند رشد گروه‌های ویژه‌ی باکتری‌ها در کولون را تحریک کند. P. استراتوس حاوی یک بتا گلوکان اختصاصی می‌باشد که پلوران نامیده می‌شود و یک ترکیب پری بیوتیک شناخته شده می‌باشد.

3.6. آماده سازی میکروکپسول سین بیوتیک و کاربرد آن برای فرمولاسیون محصولات غذایی عملکردی خشک

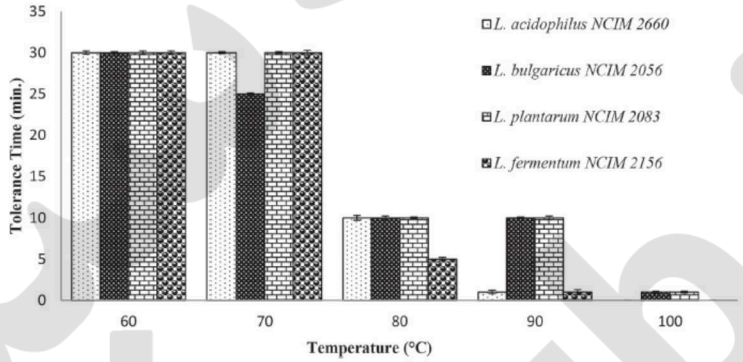
میکروکپسول‌های سین بیوتیک (حاوی کشت باکتریایی و همچنین عصاره‌ی قارچ) با میانگین اندازه‌ی 0.5 میلی متر تا 1 میلی متر آماده سازی شد. هیچ تفاوتی در اندازه‌ی کپسول‌هایی با و بدون عصاره قارچ وجود نداشت. محصولات غذایی عملکردی خشک توسط افزودن میکروکپسول‌های باکتریایی و میکروکپسول‌های سین بیوتیک در ماتریس‌های غذایی خشک مختلف مانند مخلوط سلامت غلات، اسنک غذایی سنتی و نوشیدنی سلامت مالت فرموله شد و برای مطالعات بیشتر ذخیره شد. هیچ تغییر معنی داری در مزه و طعم فرمولاسیون‌های ذخیره شده (داده‌ها ارائه نشده‌اند) در مقایسه با محصولات غذایی اصلی (کنترل) مشاهده نشد. مطالعه نشان می‌دهد که الحاق باکتری‌های آزاد و انکپسوله به صورت اساسی، خصوصیات چشایی عمومی محصولات غذایی را تغییر نداده

sina-pub.ir

بود و میکروکپسولاسیون به بهبود بقا آن‌ها در طی ذخیره سازی محصولات غذایی کمک کرده بود (Kailasapathy, 2006).

3.6.1. مطالعه قابلیت بقا در طی ذخیره سازی باکتری‌ها در میکروکپسول‌های باکتریایی و میکروکپسول‌های سین بیوتیک الحاق شده به درون یک ماتریکس غذایی خشک محلی (مخلوط سلامت غلات)

قابلیت بقا در میکروکپسول‌های باکتریایی (که تنها حاوی کشت باکتریایی بدون عصاره‌ی قارچ هستند) و میکروکپسول‌های سین بیوتیک (که حاوی کشت باکتریایی و همچنین عصاره قارچ هستند) بعداز الحاق و ذخیره سازی در یک ماتریکس غذایی خشک محلی (مخلوط سلامت غلات) مورد مطالعه قرار گرفتند. ٪71-٪90 قابلیت بقا باکتری‌ها در میکروکپسول‌ها بعداز 3 هفته از ذخیره سازی وجود داشت (جدول 4).



شکل 1. مقاومت سلول‌های باکتریایی آزاد نسبت به افزایش در معرض قرار گیری با دما

جدول 3. تعداد سلول‌های باکتریایی زنده در میکروکپسول‌ها بعداز در معرض قرار گیری با دماهای مختلف.

Encapsulated bacteria	Initial count (Log_{10} number of cells)	Log_{10} number of cells after respective temperature exposure (tolerance time in min)				
		100 °C	110 °C	120 °C	130 °C	140 °C
L. acidophilus NCIM 2660	9.1 ± 0.1	NG (1 min)	NG (1 min)	NG (1 min)	NG (1 min)	NG (1 min)
L. bulgaricus NCIM 2056	8.8 ± 0.1[a]	6.48 ± 0.1[a] (74.0) (10 min)	3.47 ± 0.2[a,b] (39.4) (1 min)	3.00 ± 0.1[a,b] (34.0) (1 min)	NG (1 min)	NG (1 min)
L. fermentum NCIM 2156	8.8 ± 0.1	NG (1 min)	NG (1 min)	NG (1 min)	NG (1 min)	NG (1 min)
L. plantarum NCIM 2083	7.5 ± 0.1[a]	7.00 ± 0.3[a] (93.3) (10 min)	4.90 ± 0.1[a] (65.3) (4 min)	4.20 ± 0.1[a] (56.0) (2 min)	3.70 ± 0.1[a] (49.3) (2 min)	NG (1 min)

NG= بدون رشد. مقادیر بدون دقیقه‌ی موجود در پرانتزها، نشان دهنده‌ی درصد سلول‌های اصلی باقی مانده یعنی سلول‌های زنده هستند. مقادیر موجود در پرانتزها با پسوند دقیقه، نشان دهنده‌ی زمانی (دقیقه) می‌باشد که سلول‌های باکتریایی انکپسوله در دمای مربوطه مقاومت می‌کنند.

مقادیر نشان دهنده‌ی میانگین ± انحراف استاندارد می‌باشد؛ n=3.

سلول‌ها از 20 مورد از میکروکپسول‌ها شمارش شدند.

Log10 تعداد سلول‌ها، در هر میلی لیتر مهره‌های حل شده محاسبه شدند.

sina-pub.ir

حروف بالانویس که مشابه نیستند به طور معنی داری متفاوت از یکدیگر می‌باشند ($P< 0.05$).

L. اسیدوفیلوس NCIM 2660 بالاترین بقا را نشان داد و سپس L. بولگاریکوس NCIM 2056 و L. پلانتاروم NCIM 2083 وجود داشت. به هرحال، L. فرمنتوم NCIM 2156 کمترین بقا بعداز ذخیره سازی را نشان داد. همانطور که می‌توان به وضوح در جدول 5 دید، L. بولگاریکوس NCIM 2056 بالاترین سطح از قابلیت بقا (87٪) را در میکروکپسول‌های سین بیوتیک الحاق شده به مخلوط سلامت خشک که به مدت 3 هفته ذخیره شده بود، نشان داد و بعداز آن L. پلانتاروم NCIM 2083 وجود داشت (حدود 85٪). به جز برای L. اسیدوفیلوس NCIM 2660، سایرین افزایش قابلیت بقا در حضور ترکیبات پری بیوتیک P. استراتوس را در مقایسه با غیاب آن نشان دادند. دلیل پشت این، شناخته شده نیست و نیاز به آنالیزهای مفصل دارد. بتا گلوکان، پلی ساکاریدهای غیر قابل هضم، عصاره‌ی P. استراتوس ممکن است یکی از ترکیبات پری بیوتیک بالقوه برای افزایش قابلیت بقا باکتری‌ها در مورد میکروکپسول‌های سین بیوتیک باشد. آرنا و همکارانش (2014) گزارش کردند که بتا گلوکان‌ها نرخ رشد باکتری‌های پروبیوتیک را در شرایط بدون تنش بهبود می‌دهند و مقاومت به تنش دهانی –معدی روده‌ای را افزایش می‌دهند.

3.6.2. ارزیابی قابلیت بقا در طی ذخیره سازی میکروکپسول‌های سین بیوتیک در یک اسنک غذایی خشک سنتی هندی

از آنجایی که L. بولگاریکوس NCIM 2056 (87٪) و L. پلانتاروم NCIM 2083 (85٪) بالاترین سطح از قابلیت بقا را در میکروکپسول‌های سین بیوتیک الحاق شده به درون ماتریکس غذایی خشک (مخلوط سلامت غلات) ذخیره شده برای 3 هفته نشان داده بود، این دو برای آنالیز مقایسه‌ای بعدی قابلیت بقا بعداز ذخیره سازی در سایر ماتریکس‌های غذایی خشک در حضور و غیاب عصاره P. استراتوس انتخاب شدند. این مشخص شده است که قابلیت بقا L. بولگاریکوس NCIM 2056 و L. پلانتاروم NCIM 2083 در حضور عصاره P. استراتوس، در مقایسه با غیاب آن بعداز 2 هفته از ذخیره سازی میکروکپسول‌های مربوطه در اسنک غذایی خشک سنتی، بالاتر بود (جدول 6)، قابلیت بقا باکتری‌های پروبیوتیک افزوده شده در ماتریکس غذایی خشک ضروری می‌باشد و برای غلبه بر عیب فرمولاسیون‌های پروبیوتیکی مبتنی بر مایع لازم است.

sina-pub.ir

جدول 4. قابلیت بقا در طی ذخیره سازی باکتری‌ها در میکروکپسول‌ها

Bacteria	Viability (weeks)		
	1	2	3
	Log_{10} number of cells (in microcapsules)		
L. acidophilus NCIM 2660	2.08 ± 0.2^a	1.92 ± 0.1^b (92.4)	1.88 ± 0.2^c (90.4)
L. bulgaricus NCIM 2056	2.16 ± 0.1^a	1.89 ± 0.1^b (87.4)	1.79 ± 0.3^c (82.8)
L. fermentum NCIM 2156	2.28 ± 0.3^a	1.81 ± 0.2^b (79.3)	1.62 ± 0.4^c (71.0)
L. plantarum NCIM 2083	2.27 ± 0.2^a	1.93 ± 0.3^b (85.3)	1.81 ± 0.2^c (81.4)

سلول‌ها از 10 میلی گرم از میکروکپسول‌ها شمارش شدند.

مقادیر نشان دهنده‌ی میانگین ± انحراف استاندارد هستند؛ n=4 (دو نسخه از رقت‌ها).

مقادیر موجود در پرانتزها نشان دهنده‌ی درصد سلول‌های اصلی باقی مانده یعنی سلول‌های زنده می‌باشد.

Log10 تعداد سلول‌ها در هر میلی لیتر از مهره‌های حل شده محاسبه شد.

حروف بالانویس که مشابه نیستند به طور معنی داری متفاوت از یکدیگر هستند ($P< 0.05$).

جدول 5. قابلیت بقا در طی ذخیره سازی باکتری‌ها در میکروکپسول‌های سین بیوتیک الحاق شده به درون یک مخلوط سلامت غلات خشک

Bacteria	Viability (weeks)		
	1	2	3
	Log_{10} number of cells (in synbiotic microcapsules incorporated dry cereal health mix)		
L. acidophilus NCIM 2660	2.52 ± 0.2^a	2.21 ± 0.2^b (87.5)	1.89 ± 0.1^c (72.4)
L. bulgaricus NCIM 2056	2.51 ± 0.1^a	2.43 ± 0.1^b (97.0)	2.18 ± 0.1^c (87.0)
L. fermentum NCIM 2156	2.56 ± 0.3^a	2.13 ± 0.1^b (83.3)	1.91 ± 0.1^c (74.5)
L. plantarum NCIM 2083	2.64 ± 0.2^a	2.56 ± 0.2^b (97.1)	2.23 ± 0.2^c (84.6)

نسبت 2:1 عصاره P. استراتوس: مخلوط سدیم آلژینات مورد استفاده قرار گرفت.

سلول‌ها از 10 میلی گرم از میکروکپسول‌ها شمارش شدند.

مقادیر نشان دهنده‌ی میانگین ± انحراف استاندارد می‌باشد؛ n=4 (دونسخه از دو رقت).

مقادیر موجود در پرانتزها، درصد سلول‌های اصلی باقی مانده یعنی سلول‌های زنده می‌باشد.

Log10 تعداد سلول‌ها، در هر میلی لیتر مهره‌های حل شده محاسبه شد.

حروف بالانویس که مشابه نیستند، به طور معنی داری از یکدیگر متفاوت هستند ($P< 0.05$).

جدول 6. قابلیت بقا در طی ذخیره سازی باکتری‌ها در میکروکپسول‌های سین بیوتیک در اسنک غذایی خشک سنتی: اثر زمان ذخیره سازی روی قابلیت بقا L. پلانتاروم NCIM 2083 و L. بولگاریکوس NCIM 2056.

sina-pub.ir

Bacteria	Microcapsules/Synbiotic microcapsules	viability (weeks)		
		0	1	2
L. plantarum (NCIM 2083)	Microcapsules without prebiotics	4.0 ± 0.3^{a}	2.02 ± 0.1^{b} (50.5)	1.70 ± 0.3^{c} (42.5)
	Synbiotic microcapsules with *P. ostreatus* extract	4.0 ± 0.1^{a}	3.00 ± 0.5^{b} (75.0)	2.47 ± 0.2^{c} (62.0)
L. bulgaricus (NCIM 2056)	Microcapsules without prebiotics	4.0 ± 0.4^{a}	1.54 ± 0.5^{b} (38.5)	0.84 ± 0.1^{c} (21.0)
	Synbiotic microcapsules with *P. ostreatus* extract	4.0 ± 0.2^{a}	2.35 ± 0.1^{b} (59.0)	1.77 ± 0.2^{c} (44.0)

نسبت 2:1 عصاره P. استراتوس: مخلوط سدیم آلژینات مورد استفاده قرار گرفت.

سلول‌ها از 10 میلی گرم میکروکپسول‌ها شمارش شدند.

مقادیر نشان دهنده‌ی میانگین $\pm$ انحراف استاندارد هستند؛ n=4 (دو نسخه از دو رقت).

مقادیر موجود در پرانتزها نشان دهنده‌ی درصد سلول‌های اصلی باقی مانده یعنی سلول‌های زنده می‌باشد.

Log_{10} تعداد سلول‌ها، در هر میلی لیتر مهره‌های حل شده محاسبه شد.

حروف بالانویس که مشابه نیستند به طور معنی داری از یکدیگر متفاوت نیستند ($P< 0.05$).

جدول 7. قابلیت بقا در طی ذخیره سازی باکتری‌ها در میکروکپسول‌های سین بیوتک در یک نوشیدنی سلامت مالت؛ اثر زمان ذخیره سازی روی قابلیت بقا L. پلانتاروم NCIM 2083 و L. بولگاریکوس NCIM 2056.

Bacteria	Microcapsules/Synbiotic microcapsules	viability (weeks)		
		0	1	2
L. plantarum (NCIM 2083)	Microcapsules without prebiotics	5.0 ± 0.5^{a}	2.3 ± 0.4^{b} (46.0)	1.7 ± 0.3^{c} (34.0)
	Synbiotic microcapsules with *P. ostreatus* extract	5.0 ± 0.1^{a}	3.8 ± 0.3^{b} (76.0)	2.5 ± 0.2^{c} (50.0)
L. bulgaricus (NCIM 2056)	Microcapsules without prebiotics	4.0 ± 0.4^{a}	2.3 ± 0.6^{b} (57.5)	1.2 ± 0.1^{c} (30.0)
	Synbiotic microcapsules with *P. ostreatus* extract	4.0 ± 0.2^{a}	2.8 ± 0.3^{b} (70.0)	1.9 ± 0.6^{c} (47.5)

نسبت 2:1 عصاره‌ی P. استراتوس؛ مخلوط آلژینات سدیم مورد استفاده قرار گرفت.

سلول‌ها از 10 میلی گرم از میکروکپسول‌ها شمارش شدند.

مقادیر نشان دهنده‌ی میانگین $\pm$ انحراف استاندارد می‌باشد؛ n=4 (دونسخه از دو رقت).

مقادیر موجود در پرانتزها نشان دهنده‌ی درصد سلول‌های اصلی باقی مانده یعنی سلول‌های زنده می‌باشد.

Log_{10} تعداد سلول‌ها، در هر میلی لیتر از مهره‌های حل شده محاسبه شد.

حروف بالانویس که مشابه نیستند به طور معنی داری متفاوت از یکدیگر نیستند ($P< 0.05$).

غذاهای پروبیوتیک که در قفسه پایدار هستند (که نیاز به نگه داری در یخچال ندارند)، مسیر شکست محصولات در صنعت پروبیوتیک خواهند بود. کار جاری، یک نوآوری در جهت فرمولاسیون چنین محصولاتی می‌باشد. کارهای بیشتر برای ارزیابی قابلیت بقا سلول‌های باکتریایی در ماتریکس غذایی خشک بعداز 2 هفته از دوره‌ی ذخیره سازی مورد نیاز است.

3.6.3. ارزیابی قابلیت بقا در طی ذخیره سازی میکروکپسول سین بیوتیک در نوشیدنی سلامت مالت خشک

sina-pub.ir

مشخص شده است که قابلیت بقا L. بولگاریکوس NCIM 2056 و L. پلانتاروم NCIM 2083 در حضور عصاره P. استراتوس در مقایسه با غیاب عصاره، بعداز 2 هفته از ذخیره سازی میکروکپسول‌های سین بیوتیک مربوطه در نوشیدنی سلامت مالت بالاتر بود (جدول 7).

4. نتیجه گیری

هدف کلی میکروکپسولاسیون باکتریایی و سین بیوتیک، حفاظت از باکتری‌ها در محصولات غذایی و همچنین در مسیر کولون می‌باشد چون سلول‌های آزاد معمولا بقا خودشان را در شرایط تنش GIT از دست می‌دهند. این مشاهده شده است که برخی از سویه‌های باکتریایی که به علت شوک اسیدی در معده تحت حالت کمون قرار می‌گیرند، زمانی که PH در روده کوچک به 6.0 می‌رسد رشد خودشان را مجدد از سر می‌گیرند. می‌توان نتیجه گرفت که انکپسولاسیون، حفاظت بیشتری را نسبت به باکتری‌ها در برابر شرایط تنش شبیه سازی روده و همچنین در معرض قرار گیری با دمای بالا ارائه می‌کند. رهاسازی معنی داری از سلول‌های باکتریایی از میکروکپسول‌ها و دابل انکپسولاسیون ممکن است به منظور جلوگیری از این نشت اتخاذ شود. 72٪-87٪ قابلیت بقا باکتری‌های مطالعه شده در میکروکپسول‌های سین بیوتیک یعنی در حضور عصاره P. استراتوس وجود داشت که در آن، L. بولگاریکوس NCIM 2056 و L. پلانتاروم NCIM 2083 بالاترین سطح از قابلیت بقا را در همه‌ی ماتریکس‌های غذایی خشک مورد مطالعه، بعداز ذخیره سازی نشان دادند. این فرایند ممکن است در آینده برای تولید کافی و تجاری سازی چندین غذای با عملکرد سین بیوتیک خشک پایدار در قفسه توسط تغییر منابع پروبیوتیک‌ها، ماتریکس غذایی خشک استفاده شده و نوع باکترهای پروبیوتیک افزایش دهنده‌ی سلامتی مورد استفاده قرار بگیرد. سایر قارچ‌های خوراکی همچنین می‌توانند به عنوان منبعی از پری بیوتیک‌ها برای یافتن بهترین افزاینده‌ی رشد LAB مورد استفاده قرار بگیرند.