[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

اثر ریزپوشانی با آلژینات/کیتوزان بر بقاء باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) در شرایط شبیه سازی شده معده و روده در فیل ماهی (*Huso huso*)

سید صمد حسینی[۱]، تکاور محمدیان*[۱]، محمدرضا عباسپور[۲]، مجتبی علیشاهی[۱]

*takavar_m2002@yahoo.com

۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- مرکز تحقیقات دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

چکیده

اثر مثبت ریزپوشانی بر قابلیت تحمل شرایط شبیه سازی شده معده و روده توسط پروبیوتیک‌ها ثابت شده است. از مهم‌ترین عوامل کاهش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها هنگام عبور از دستگاه گوارش، pH پایین معده و وجود پروتئازها و املاح صفراوی می باشد. به منظور بهبود قابلیت زنده‌مانی در شرایط نامساعد معده و روده، باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) توسط آلژینات/کیتوزان با استفاده از روش امولسیون ریزپوشانی شد. اهداف این تحقیق بررسی کارآمدی ریزپوشانی با آلژینات/کیتوزان جهت حمل باکتری و بررسی بقاء باکتری در شرایط شبیه سازی شده معده و روده می‌باشد. برای مطالعه شکل ظاهری ریزپوشینه‌ها از تکنیک SEM[1] و برای تعیین اندازه و نحوه پراکنش ذرات ریزپوشینه از روش تجزیه اندازه ذرات [2] استفاده شد. برای بررسی قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد در شرایط شبیه سازی شده معده و روده ، در فواصل زمانی صفر ، ۶۰ ، ۱۲۰ دقیقه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. نتایج این تحقیق بیانگر این است که d_{peak} به روش امولسیون ۱۰/۴ µm و میانگین قطر ذرات ۲/۳۹ µm، مقدار پتانسیل زتا در این تحقیق ۳۶/۲+ mv ، تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده CFU/g $۱۰^{۹}$ ×۰/۰۶±۲/۰۲ و زنده‌مانی باکتری‌ها بعد از ۱۲۰ دقیقه شرایط شبیه سازی شده شیره گوارشی در باکتری آزاد CFU/g $۱۰^{۹}$ ×۰/۰۹±۱/۵۹ و در باکتری‌های ریزپوشانی شده CFU/g $۱۰^{۹}$ × ۰/۰۶±۲/۰۳ محاسبه شد ($p<۰/۰۵$). نتیجه این پژوهش نشان داد که بین باکتری‌های ریزپوشانی شده و آزاد، زنده‌مانی و تحمل شرایط شبیه سازی شده شیره گوارشی در باکتری‌های ریزپوشانی شده به مراتب بالاتر می‌باشد.

لغات کلیدی: ریزپوشانی ،*لاکتو باسیلوس پلانتاروم*، شرایط شبیه سازی شده معده و روده ، آلژینات /کیتوزان

*نویسنده مسئول

[1] . Scanning electron microscope
[2] . Particle size Analyzer

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

مقدمه

توسعه پایدار آبزی‌پروری، نیازمند به‌کارگیری تکنیک‌های نوین می‌باشد. در بین تکنیک‌های معرفی شده، استفاده از باکتری‌های مفید یا زیست‌یار با اهدافی نظیر بهینه‌سازی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب، ارتقاء عملکرد رشد، افزایش ایمنی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا درآبزیان، صورت می‌گیرد. تاثیرگذاری باکتری‌های زیست‌یار در خصوص ارتقاء معیارهای ذکر شده، درتحقیات زیادی به اثبات رسیده است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیزم‌های زنده‌ای هستند که اگر به تعداد کافی به روده موجود برسند، اثرات سلامتی بخش در میزبان برجای می‌گذارند. فعالیت و زنده‌ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات سلامتی بخش است (Shah, 2007). مکانیسم عملکرد پروبیوتیک‌ها احتمالا به دلیل دفع رقابتی عوامل بیماری‌زا است؛ یعنی پروبیوتیک‌ها از طریق رقابت برای مواد مغذی و یا جایگاه‌های اتصال، تغییر متابولیسم باکتری‌ها و یا با تحریک سیستم ایمنی بدن مانع تشکیل کلونی پاتوژن‌ها در لوله گوارش میزبان می‌شوند. هم‌چنین از طریق تولید ویتامین‌ها، ترکیبات مسمومیت‌زدا در جیره و تجزیه ذرات غیرقابل هضم سبب تحریک اشتها و بهبود تغذیه میزبان می‌شوند. پروبیوتیک‌ها باید با منشا گونه جانوری باشند. این معیار بر پایه دلایل اکولوژیک است و به زیستگاه اصلی پروبیوتیک انتخابی (در فلور روده) توجه دارد. یعنی پروبیوتیک انتخاب شده با گونه هدف سازگاری داشته باشد زیرا بسیاری از محققین اعتقاد دارند این باکتری از شانس بیشتری برای رقابت با باکتری‌های بومی روده و استقرار در مقادیر قابل ملاحضه در میزبان جدید را دارا می‌باشد (Rengpipat *et al.*, 2003; Alvandi *et al*, 2004).

در این میان اسیدلاکتیک باکتری‌ها مهمترین باکتری‌های پروبیوتیک هستند که اثرات سودمندی روی میزبانشان دارند. این باکتری‌ها گرم مثبت هستند و معمولا در محیط‌های بی‌هوازی زندگی می‌کنند اما آن‌ها می‌توانند شرایط هوازی را هم تحمل کنند. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یک باکتری پروبیوتیک، گرم مثبت، هتروفرمنتاتیو، میله‌ای، غیر اسپورزا، غیر متحرک و تولید کننده اسیدلاکتیک بوده که می‌تواند در محدوده دمایی ۱۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد رشد کند (Iyer and Hittinahalli, 2008). برحسب استانداردها، برای بروز ویژگی‌های سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها باید به تعداد 10^6 CFU/g تا 10^7 CFU/g از محصول پروبیوتیک وجود داشته باشند. مانع اصلی برای حفظ این سطوح پیشنهادی، قابلیت زنده‌مانی ناچیز ناشی از تنش اسیدیته و اکسیژن توسعه یافته و نقصان مواد غذایی می باشد (Shah and Ravula, 2000; Talwalkar and Kailasapathy, 2004). علاوه بر این pH بسیار پایین معده، همچنین حضور نمک‌های صفراوی در روده، دلایل اصلی کاهش ناگهانی در قابلیت زیستی سلول‌های انتقال یافته است. از این رو بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در مسیر دستگاه گوارش از اهمیت زیادی برخوردار است (Ding and Shah, 2008; El-Shafei *et al*, 2010; ayalalitha *et al*, 2012). جهت غلبه بر این مشکلات، شیوه‌های مختلفی شامل کشت‌های میکروبی (Luorens and Viloen, 2001)، ریزپوشانی و افزودن پری‌بیوتیک‌ها وجود دارد (Capela *et al*, 2006). از دیدگاه میکروب شناختی، ریزپوشانی عبارت است از پوشش دادن لایه‌ای از هیدروکلوئیدها به دور سلول‌های زنده در مقیاس میکروسکپی و محصور کردن آن‌ها به منظور تفکیک کردن از محیط، بطوری که آزاد سازی هدفمند سلول‌ها (در مکان و زمان مناسب) را در پی داشته باشد (Krasakoopt *et al*, 2003; Sultana *et al*, 2000). از عمده‌ترین ترکیبات مورد استفاده در ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها، آلژینات سدیم است که یک هتروپلی ساکارید خطی است و از دو مونومر D- مانورونیک اسید و L- گلورونیک اسید تشکیل شده است و از انواع جلبک‌های دریایی استخراج می‌شود. علت استفاده از آن ارزانی، سهولت کاربرد، سمی نبودن، فناوری آسان و

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

مطابقت و سازگاری با محیط زیست می‌باشد و به عنوان افزودنی مجاز غذایی شناخته شده است (Mortazavian *et al.*, 2007; Ariful *et al*, 2010). به دلیل اینکه آلژینات در حضور یون کلسیم ژل تشکیل می‌دهد، قرارگرفتن آن در محیط‌های یونی یا عوامل شلاته کننده مانند فسفات‌ها، لاکتات‌ها، و سیترات (که یون کلسیم را جذب می‌کنند) باعث از هم‌پاشی کامل کپسول آلژینات می‌شود (Ariful *et al.*, 2010). که این عیب را می‌توان به وسیله پوشش دادن سطح بیرونی آلژینات با سایر ترکیبات پلی‌مری بهبود بخشید.

کیتوزان یک پلی ساکارید خطی با بار منفی ناشی از گروه‌های آمینی است که از دی‌استیلاسیون کیتین به دست می‌آید. بعد از سلولز، کیتین فراوان‌ترین پلی ساکارید طبیعی در زمین است. به دلیل اینکه بازده کیتوزان در افزایش قابلیت زنده مانی سلول‌ها رضایت بخش نیست معمولا این پلی ساکارید بیشتر به عنوان پوشش ثانویه استفاده می‌شود (Kumar *et al*, 2007; Mortazavian *et al*, 2007). در کنار این خصوصیت محافظت کنندگی، مخلوط آلژینات-کیتوزان مزیت دیگری دارد که باعث می‌شود مواد مغذی و متابولیت‌ها بتوانند از کپسول به بیرون یا داخل انتشار پیدا کنند. در نتیجه مواد هسته دارای متابولیسم فعالی خواهند بود (Charalampopoulos and Rastall, 2009). در حقیقت ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با پوشش آلژینات و کیتوزان محافظت در برابر شرایط شیره گوارشی را فراهم می‌کند. بنابراین روش خوبی برای تحویل سلول‌های باکتریایی زنده به روده می‌باشد. لذا در این مقاله از تکنیک ریزپوشانی به منظور افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی استفاده شده است.

مواد و روش کار

تهیه باکتری: دراین تحقیق از پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده از روده ماهی شیربت (*Tor grypus*) استفاده شد. این باکتری با استفاده از ژن 16s rRNA جداسازی و شناسایی شد (Mohammadian *et al*, 2016). اکتری مورد نظر در۲۰ mL محیط کشت MRS broth در دمای ^{O}C ۳۷ به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی فعال گردید، سپس نمونه حاصل در محیط کشت MRS Agar به مدت ۴۸ ساعت در دمای ^{O}C ۳۷ و در شرایط بی‌هوازی و در انکوباتور کشت داده شد. پس از رشد، نمونه_ها با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند و با دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون در آمد و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند با غلظت $۲/۴\times۱۰^{۹}$ CFU/g تنظیم شدند و جهت ریزپوشانی کردن به دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور منتقل شدند.

فرآیند ریزپوشانی

براساس روش Huiyi و همکاران (۲۰۱۳) ابتدا g ۵ پودر کربنات کلسیم به mL ۱۰۰ آب مقطر اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه سونیکه شد. مقدار mL ۳/۵ سوسپانسیون کربنات کلسیم به mL ۵۵ محلول آلژینات ۲ درصد (Sigma-Aldrich Viscosity 200_400 cP/Lit) بر روی دستگاه هم‌زن مغناطیسی با دور rpm ۲۰۰ در حال گردش اضافه و مدت ۳۰ دقیقه هموژن گردید. مقدار mL ۱۰ از محلول حاصل با mL ۵ سوسپانسیون میکروبی با غلظت ($۲/۴\times۱۰^{۹}$ CFU/g) مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با هم‌زن با دورrpm ۳۵۰ هموژن شد. در بشردیگر، مقدار mL ۳۵ روغن گیاهی (روغن کلزا) را با g ۰/۵ اسپن ۸۰ مخلوط و به مدت ۵ دقیقه آن را با دور rpm ۱۰۰ هم زده، سپس محلول حاصل با محلول بالا مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با هم‌زن آزمایشگاهی هموژن گردید. mL ۱۰روغن کلزا و mL ۰/۵ اسید استیک با هم مخلوط و قطره قطره به محلول فوق اضافه شد تا pH به حدود ۳/۵ رسید و ۳۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰ هم‌زده شد. در مرحله بعد با استفاده از بافر نمکی فسفات محلول حاصل به مدت

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا روغن از محصول جدا شود. در مرحله نهایی به میزان mL ۱۵ محلول کیتوزان ۰/۴ درصد (Sigma-Aldrich :Low molecular weight) به مدت ۳۰ دقیقه ، قطره قطره با دور rpm ۸۰۰ به محلول اضافه شد و بعد به مدت یک ساعت در حالت چرخش گذاشته شد تا به‌هم زده شود. در نهایت باکتری‌های ریزپوشانی شده به وسیله سانتریفیوژ با دورrpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری شد.

شمارش تعدادباکتری‌های بدام افتاده درریزپوشینه‌ها

۱ گرم از نمونه‌های ریزپوشانی شده را در mL ۹۹ محلول ۱ درصد وزنی-حجمی (W/V) سدیم سیترات استریل در pH حدود ۷/۲ پراکنده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق هم‌زده تا ریزپوشینه‌ها بطور کامل حل و باکتری‌ها آزاد شوند، آنگاه با استفاده از محیط کشت MRS agar در شرایط بی‌هوازی، دمای $37^{O}C$ و به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری و سپس تعداد باکتری‌ها شمارش شد، این شمارش در ۳ تکرار صورت پذیرفت (Mokarram 2009 *et al.*,).

آزمون فیزیکی ذرات

تعیین اندازه ذرات و نحوه پراکنش آن‌ها: اندازه ریزپوشینه‌های حاصل و فراوانی آن‌ها با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری قطر ذرات مدل Scatter scope 1 Qudix (Korea) تعیین و برای این منظور ریزپوشینه‌ها در آب یون‌زدایی شده پراکنده و نتایج بر اساس قطر حجم میانگین (VMD) ذرات ± استاندارد خطا، d_{peak}، d_{10}، d_{50} و d_{90} گزارش و بر اساس فرمول مربوط به قطر میانگین مورد آنالیز قرار گرفت (Mokarram *et al.*, 2009).

تعیین مرفولوژی ذرات: برای تعیین مرفولوژی ذرات و مشاهده شکل ظاهری آن‌ها از میکروسکوپ الکترونی و تکنیک SEM استفاده شد. بدین جهت ریزپوشینه‌ها بوسیله چسب دو طرفه بر روی کوتر (SC 7620 England) تثبیت و به مدت ۲ دقیقه بوسیله طلا و پالادیم پوشش داده شدند. مشاهده ریزپوشینه‌ها بوسیله میکروسکوپ الکترونی مدل (LEO 1455 VP Germany) با تابش الکترونی Kv ۱۰ در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید چمران انجام پذیرفت.

قطر میانگین=100^{μ}

$$\mu = 1/100 \sum_{nj=1}^{n} qj \frac{log10xj + log10xj + 1}{2}$$

$$\sigma = \sqrt{\left\{\frac{1}{100}\sum_{J=1}^{n} qj \left(\frac{log10xj + log10xj + 1}{2}\right)^2\right\} - \mu^2}$$

پتانسیل زتا

به منظور تعیین پتانسیل زتای نمونه‌ها، از دستگاه زتا سایزر Nano-ZS ساخت شرکت Malvern انگلستان استفاده شد.

آماده سازی شرایط شبیه سازی شده معده

شرایط شبیه سازی شده شیره معده، مطابق با روش Michida و همکاران (۲۰۰۶) انجام گرفت. بدین گونه که پپسین (Sigma Aldrich P7000) با محلول سدیم کلراید ۰/۵ درصد تا رسیدن به غلظت g/L ۳ مخلوط شد، و سپس pH آن به وسیله اسید کلریدریک استریل (۰/۱ مولار) به ۲/۵ رسانده شد، محلول حاصله بوسیله میکرو فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر (Millipore) استریل گشت.

آماده سازی شرایط شبیه سازی شده روده

شرایط شبیه سازی شده شیره روده مطابق روش Charteris و همکاران (۱۹۹۸) انجام گرفت. بدین ترتیب که، پانکراتین (Sigma Aldrich P1500) با سدیم کلرید ۰/۵ درصد تا رسیدن به غلظت نهایی g/L ۱ با ۴/۵ درصد محلول نمک‌های صفراوی (Oxoid, Basingstoke UK) مخلوط شد، سپس pH آن با محلول سود ۰/۱ مولار

استریل به حدود ۷/۴ رسانده شد، محلول حاصل بوسیله میکرو فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر (Millipore) استریل گشت.

بررسی زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده در شرایط شبیه سازی شده شیره معده و روده

بر اساس روش Mokarram و همکاران (۲۰۰۹)، مقدار یک گرم از ریزپوشینه‌ها همراه با mL ۱ از سوسپانسیون باکتری‌های آزاد داخل تیوب‌های حاوی mL ۹ از شیره معده ریخته شد و برای مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در حال هم‌زدن قرار گرفت. سپس ریزپوشینه‌ها و باکتری آزاد خارج و به تیوبی که حاوی mL ۱۰ محیط شبیه سازی شده روده بود انتقال داده شدند و ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در طی این مدت، در فواصل زمانی صفر ، ۶۰ ، ۱۲۰ دقیقه تعداد باکتری‌ها در ریزپوشینه‌ها و باکتری‌های آزاد با استفاده از روش رقیق سازی توسط پپتون واتر، در محیط MRS Agar کشت داده شد، و تعداد کلونی‌های تشکیل شده بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شمارش شد. این کار با ۳ تکرار برای هر نمونه انجام شد.

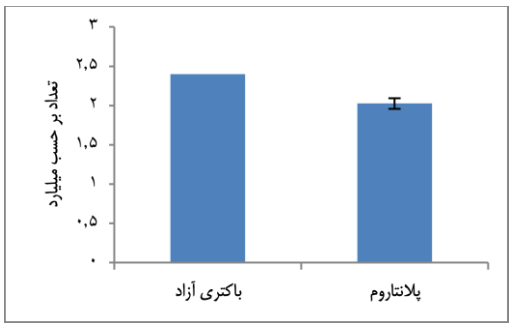
تجزیه و تحلیل داده ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه نرم افزار SPPS نسخه شماره ۲۲ استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از پس آزمون دانکن استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها نیز در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۰۷) انجام گرفت.

نتایج

شمارش تعداد ریزپوشینه‌ها و تعیین اندازه ذرات و نحوه پراکنش آن‌ها

تعداد اولیه باکتری‌های زنده قبل از ریزپوشانی CFU/mL $۲/۴\times۱۰^{۹}$ محاسبه شد. بر حسب داده‌های بدست آمده تعداد باکتری‌های ریزپوشینه شده CFU/mL $۲/۰۲\pm۰/۰۶\times۱۰^{۹}$ محاسبه شد (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده با باکتری‌های آزاد (بدون پوشش)

Figure 1: Comparison of microencapsulated bacteria and bacteria-free.

مشاهده با روش SEM نشان داد که ریزپوشینه‌ها از نظر شکل ظاهری تا حدود زیادی به شکل کروی و بیضوی هستند (شکل ۲). قطر حجم میانگین ریزپوشینه (VMD) در روش امولسیون µm ۲/۳۹ بود. قطر ۹۰ ٪ (d_{90}) ذرات مساوی یا کمتر از µm ۳/۸۲ ، قطر ۵۰ ٪ ذرات (d_{50}) مساوی و یا کمتر از µm ۲/۳۹ و برای ۱۰ ٪ ذرات (d_{10}) قطری مساوی یا کمتر از µm ۱/۵۰ بدست آمد. هم چنین d_{peak}، µm ۱۰/۴ محاسبه شد (شکل‌های ۲ و ۳).

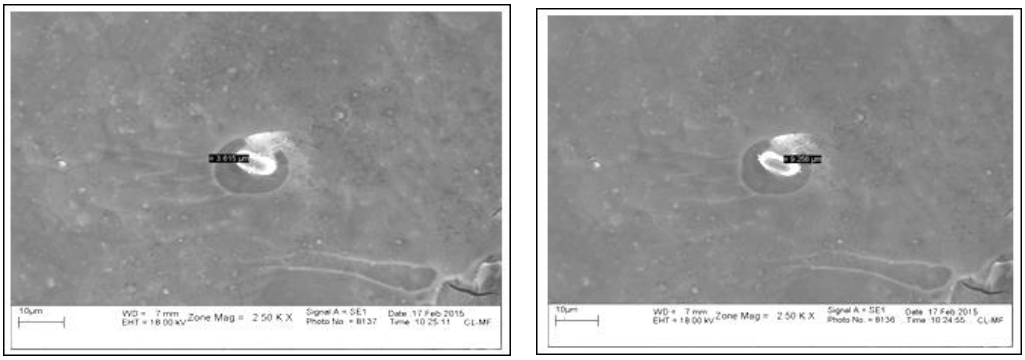
پتانسیل زتا

مقدار پتانسیل زتا در این تحقیق، به روش امولسیون mv ۳۶/۲+ محاسبه شد (pH محلول ۳/۵) (شکل ۴).

زنده‌مانی باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده در شرایط مشابه شیره معده و روده

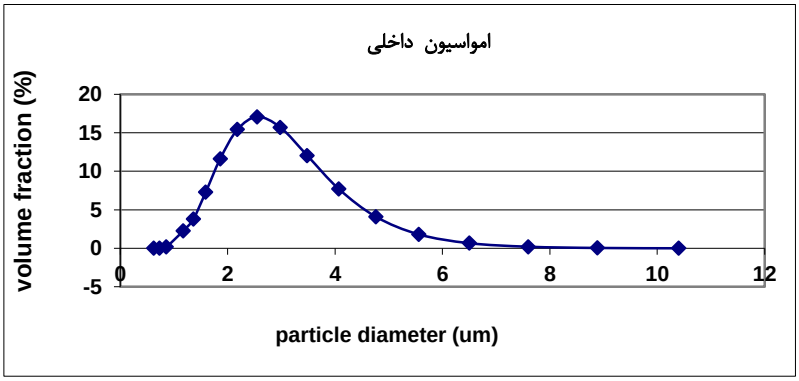
در این پژوهش زنده مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به صورت ریزپوشانی شده و بدون پوشش در طی ۱۲۰ دقیقه در شرایط شبیه سازی شده معده و روده فیل ماهی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (جدول ۱).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی از ریزپوشینه‌ها

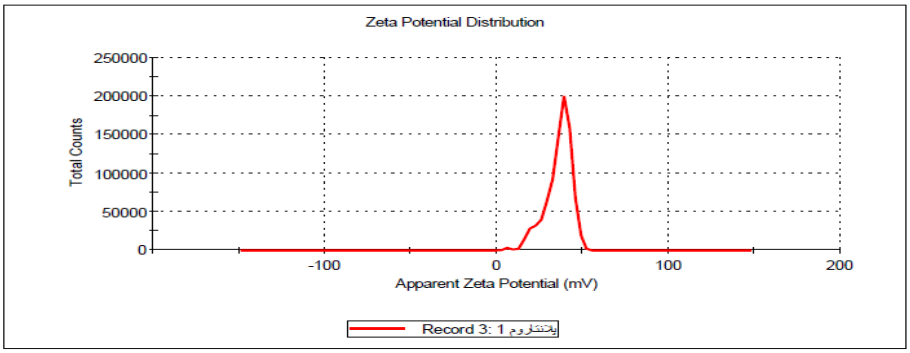
Figure 2: Electron microscope image of a microcapsule method based.



شکل ۳: نحوه پراکنش اندازه ذرات ریزپوشینه و درصد فراوانی آن‌ها بر اساس داده‌های دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر

Figure 3: Particle size distribution of microcapsules using ionic gelation and frequency are based on data Particle Size Analyzer.

		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 36.2	Peak 1:	36.3	99.4	7.48
Zeta Deviation (mV): 7.74	Peak 2:	6.93	0.6	1.73
Conductivity (mS/cm): 1.44	Peak 3:	0.00	0.0	0.00
Result quality : Good				



شکل ۴: پتانسیل زتای ریزپوشینه‌ها با استفاده از آلژینات (با ویسکوزیته متوسط)
و کیتوزان (با وزن مولکولی پایین). pH محلول آلژینات و کیتوزان ۳/۵ بود.

Figure 4: Microcapsules of zeta potential ionic gelation method using alginate and chitosan (low molecular weight). PH of alginate and chitosan solution was 3.5.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

جدول ۱: تعداد (کپسول CFU/g) باکتری‌های زنده مانده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* آزاد و ریزپوشانی شده در شرایط شبیه سازی شده معده و روده در توالی های زمانی مختلف بعد از انکوبا سیون در pH =۷/۲ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون، و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ در هر ردیف می‌باشد.

Table 1: Number (CFU / g capsule) of *Lactobacillus plantarum* bacteria, free and microencapsulated from incubation in simulated gastrointestinal conditions in different time sequences (pH = 7.2). Non-homogeneous Latin letters on the standard deviation indicate a significant difference at the level of 0.05 in each column, and non-homonymous Latin letters indicate a significant difference at the level of 0.05 in each row.

پروبیوتیک / زمان (دقیقه)	صفر	۶۰	۱۲۰
تیمار			
باکتری آزاد	$۱/۸۴±۰/۰۶\times ۱۰^{۹aA}$	$۱/۷۴±۰/۰۹\times۱۰^{۹aA}$	$۱/۵۹±۰/۰۹\times۱۰^{۹bB}$
باکتری ریزپوشانی شده	$۱/۳۳±۰/۳۰\times۱۰^{۹bC}$	$۱/۸۶± ۰/۵۵\times۱۰^{۹aB}$	$۲/۰۳±۰/۰۶\times۱۰^{۹aA}$

بحث

استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در آبزیان در حال افزایش می‌باشد. با این حال هنوز نیاز به تحقیقات زیادی در این مورد می باشد. به منظور افزایش زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط معده و روده فیل‌ماهی این باکتری به وسیله آلژینات سدیم ریزپوشانی و با کیتوزان پوشش داده شد. مشاهده با روش SEM نشان داد که ریزپوشینه‌ها از نظر شکل ظاهری تا حدود زیادی به شکل کروی و بیضوی هستند (شکل ۱). قطر حجم میانگین ریزپوشینه‌ها (VMD)، ۲/۳۹ µm ، قطر متوسط ۹۰ درصد دانک‌ها (d_{90}) برابر ۳/۸۲ µm ، قطرمتوسط نیمی از دانک‌ها (d_{50}) مساوی و یا کمتر از ۲/۳۹ µm و قطر متوسط ۱۰ درصد دانک‌ها (d_{10}) برابر ۱/۵۰ µm محاسبه شد. هم‌چنین d_{peak}، ۱۰/۴ µm بدست آمد. اندازه متوسط ریزپوشینه ها یک ویژگی مهم برای پایداری و کارایی ریزپوشانی است. ریزپوشینه ها با اندازه بزرگ حفاظت بیشتری را ارائه می‌دهند اما ریزپوشینه‌های بزرگ دارای تاثیر حسی منفی بر محصول هستند. هم‌چنین ریزپوشینه‌های با اندازه کوچک ممکن است حفاظت کافی برای پروبیوتیک‌ها فراهم نکنند (Ma *et al.*, 2008, 2012). Hansen و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که اندازه زیر ۱۰۰ µm برای اجتناب از تاثیر حسی منفی در محصولات مطلوب است. این نتایج هم‌چنین با گزارشات (Hansen *et al.*, 2002) و (Allan *et al*, 2008) که گفته‌اندریزپوشینه‌های (۱ mm >) موجب خشن شدن بافت افزودنی‌های غذایی می‌شوند مطابقت دارد.

تعداد اولیه باکتری‌های زنده قبل از ریزپوشانی CFU/mL $۲/۴\times۱۰^{۹}$ محاسبه شد. بر حسب داده‌های بدست آمده تعداد باکتری‌های به دام افتاده در ریزپوشینه‌ها CFU/mL $۲/۰۲±۰/۰۶\times۱۰^{۹}$ محاسبه شد. حفظ قابلیت زیست سلول هم یک عامل مهم در انتخاب فرآیند تولید کپسول‌ها است. تعداد کم باکتری‌های از دست رفته نشانگر دقت مناسب بکار رفته در روش و نحوه ریزپوشانی می‌باشد. به عبارت دیگر بازده ریزپوشانی برحسب درصد در روش امولسیون ۸۴ درصد بدست آمد. در مطالعه Huiyi و همکاران (۲۰۱۳) که سلول‌های مخمر را با روش امولسیون ریزپوشانی کرد، بازده ریزپوشانی ۸۰ درصد گزارش شد. در مورد روش امولسیون صدمه زننده‌ترین عامل به قابلیت زیست سلول ممکن است عامل کاربرد اسید باشد ولی با توجه شرایط یکسان هر دو پژوهش از لحاظ نوع اسید و غلظت به کار رفته و هم‌چنین سرعت هم‌زدن و غلظت امولسیفایر، این اختلاف در بازده ریزپوشانی را احتمالا می‌توان ناشی از سلول‌های ریزپوشانی شده متفاوت در دو پژوهش دانست. از طرفی دیگر بسیاری از منابع گزارش کردند که غلظت پلیمر می‌تواند بر بازده ریزپوشانی اثر بگذارد. Klemmer و

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که سطوح بالاتر پروتئین شیر برای ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها به طور قابل توجهی باعث افزایش بازده ریزپوشانی می‌گردد.

در یک سیستم کلوییدی اختلاف پتانسیل بین لایه یونی غیرمتحرک (لایه استرن) و لایه متحرک (لایه انتشار) در اتمسفر یونی اطراف ذرات باردار، پتانسیل زتا نامیده می‌شود. پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطح ذرات است. چون نشان دهنده میزان تجمع بار در لایه غیر متحرک و شدت جذب یون‌های مخالف بر روی سطح ذره است و بنابراین بار ذرات اغلب بر حسب پتانسیل زتا گزارش می‌شود. بالا بودن پتانسیل زتای ذرات کلوئیدی موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی سیستم می‌شود (Borges *et al.*, 2008). دامنه متعادل پتانسیل زتا بالای ۳۰ mv + یا زیر ۳۰ mv- در نظر گرفته می‌شود. مقدار به دست آمده در این تحقیق ۳۶/۲+ mv بود (pH محلول آلژینات و کیتوزان ۳/۵) که نشان می‌دهد ریزپوشینه‌های تولیدی دارای تعادل کلوئیدال مناسبی هستند، این پایداری در جلوگیری از انباشته شدن مهم می‌باشد. عوامل مختلفی از جمله pH، قدرت یونی و غلظت ماکرومولکول های پلی‌ساکاریدی و پروتئینی مورد استفاده، نسبت بین آن‌ها و .... بر روی میزان بار سطحی و پتانسیل زتا کمپلکس حاصل موثر است (Peinado *et al.*, 2010).

نتایج بدست آمده از شمارش باکتری‌ها نشان می‌دهد که ریزپوشانی توانسته تاثیر چشمگیری در قابلیت زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه سازی شده شیره معده و روده داشته باشد. تعداد اولیه باکتری در حالت آزاد و ریزپوشانی شده به ترتیب $۲/۴\times۱۰^{۹}$ CFU/mL، $۲/۰۲\pm۰/۰۶\times۱۰^{۹}$ CFU/mL بود که بعد از سپری شدن در زمان های صفر، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه در شرایط مشابه مایع معدی (pH=۲/۵) و به دنبال آن به مدت ۱۲۰ دقیقه در شرایط مشابه مایع روده ای (pH=۷/۴)، به ترتیب به $۱/۵۹\pm۰/۰۹\times۱۰^{۹}$ CFU/mL و $۲/۰۳\pm۰/۰۶\times۱۰^{۹}$ CFU/mL رسید.

در طول این مدت تعداد باکتری در حالت آزاد به طور معنی داری کاهش یافت که این نتیجه نشان می‌دهد که ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در بستر آلژینات و کیتوزان تا اندازه زیادی منجر به حفاظت سلول باکتری در مقابل شرایط اسیدی معده و روده می‌شود، به عبارت دیگر ریزپوشانی باکتری به مانند حایلی تاثیر سوء شرایط نامساعد محیطی روی باکتری را کاهش داده و باعث افزایش ماندگاری آن‌ها می‌شود. Lu و همکاران (۲۰۱۳) بقاء باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* ریزپوشانی شده با آلژینات و شیر را در شرایط شبیه سازی شده شیره گوارشی مورد ارزیابی قرار دادند، نتایج نشان داد که ریزپوشانی می تواند مقاومت *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به محیط های نامساعد را افزایش دهد. Mokarram و همکاران (۲۰۰۹) اثر مثبت ریزپوشانی با آلژینات کلسیم بر بهبود بقاء *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در شرایط شبیه سازی شده شیره گوارشی را گزارش دادند. Gbassi و همکاران (۲۰۰۹) ریزپوشانی سه سویه از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در پوشش آلژینات – وی پروتئین (Wehy protein) را سبب افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری در شرایط شبیه سازی شده معده و روده دانست. نتایج به دست آمده از این پژوهش، با نتایج Krasaekoopt و همکاران (۲۰۰۴) که *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* ATCC1994 را با آلژینات سدیم ، کیتوزان و پلی- ال- لیزین پوشش دادند و باکتری‌ها در شرایط اسیدی معده حتی وقتی ریزپوشانی شدند، زنده نماندند و Gildas و همکاران (۲۰۰۹) که بیان کردند ریزپوشانی باکتری‌ها در مهره‌های آلژینات، به شکل موثر از میکروارگانیسم‌ها در برابر اسیدیته بالا محافظت نکرد، در تناقض می‌باشد.

فعالیت نمک‌های صفراوی در شرایط آزمایشگاهی ممکن است بسیار بیشتر از عمل واقعی آن‌ها در روده باشد، زیرا در روده امکان ترکیب این نمک‌ها با فسفو لیپیدها نیز وجود دارد. Zou و همکاران (۲۰۱۲) پایداری ذخیره سازی *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* را درریزپوشینه‌های

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

آلژینات، ریزپوشینه‌های ترکیب شده با نشاسته، پکتین، کیتوزان و پلی – ال – لیزین را مورد مطالعه قرار دادند. ریزپوشینه‌های پوشیده شده با کیتوزان حمایت بهتری را برای باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به ریزپوشینه‌های دیگر در طول ذخیره سازی از خود نشان دادند، این احتمالا ناشی از یک غشا متراکم تشکیل شده درریزپوشینه‌های پوشیده شده با کیتوزان بوده است. براساس پژوهش انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها نقش بسیار مهمی در حفاظت این میکروارگانیسم‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی ازجمله شرایط شبیه سازی شده روده و معده ایفا می‌کند و درنتیجه میزان بقای این ارگانیسم‌ها را در شرایط ذکر شده بهبود می‌بخشد. ریزپوشانی با روش امولسیون توانسته راندمان بالایی در به دام اندازی سلول پروبیوتیک داشته باشد و ریزپوشینه‌های یکنواختی را تولید کند. هم چنین تعادل کلوئیدال ریزپوشینه‌ها در سطح مناسبی قرار داشت.

منابع

Allan-Wotas, P., Hansen, L.T. and Paulson, A. T., 2008. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *LWT-Food Science and Technology*, 41(1): 101-108. DOI: 10.1016/.lwt.2007.02.003.

Alvandi, S.V., Viayan, K.K., Santiago, T.C., Poornima, M., ithendran, K.P., Ali, S.A. and Raan, S., 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, 17:115–120. DOI:10.1016/.fsi.2003.11.007.

Ariful, I.M., Yun, C.H., Choi, Y.. and Cho, C.S., 2010. Microencapsulation of live probiotic bacteria. *Microbiol Biotechnol*, 20(10): 1367-1377. DOI: 10.4014/mb.1003.03020.

Borges, O., Silva, M., de Sousa, A., Borchard, G., unginger, H.E. and Cordeiro-da-Silva,A., 2008. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous aduvant for hepatitis B surface antigen. *Int. Immunopharmacol*., 8: 1773–1780. DOI: 10.1016/.intimp.2008.08.013.

Capela, P., Hay, T.K.C. and Shan, N.P., 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freezedried yoghurt. *Food Research International*, 39. 203-211. DOI: 10.1016/.foodres.2005.07.007.

Charalampopoulos, D. and Rastall, R.A. (Eds.), 2009. Prebiotics and probiotics science and technology (Vol. 1). New York: Springer.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, .K., 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. *ournal of Applied*

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

Huiyi, S., Yu, W., Gao, M., Liu, X. and Ma, X., 2013. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 181-189. DOI: 10.1016/.carbpol.2013.03.068.

Iyer, R. and Hittinahalli, V., 2008. Modified Pap method to among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates tertiary care hospital. . *Medical Microbiology*, 26,176-179.

ayalalitha, V., Balasundaram, B. and Palanidorai, R., 2012. In vitro assessment of microencapsulated probiotic beads. International ournal of Agriculture: *Research and Review*, 2(1), 1-6.

Klemmer, K.., Korber, D.R., Low, N.H. and Nickerson, M.T., 2011. Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery. *International ournal of Food Science and Technology*, 46(11), 2248-2256. DOI: 10.1111/.1365-2621.2011.02743.x.

Krasakoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H., 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy ournal*, 13, 3-13. DOI:10.1016/S0958-6946(02)00155-3.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H., 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic *Microbiology*, 84(5), 759-768. DOI: 10.1046/.1365-2672.1998.00407.x.

Ding, W.K. and Shah, N.P., 2008. Survival of free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple uices. *International Food Research ournal*, 15(2), 219-232.

El-Shafei, K., Tawfik, N.F., Dabiza, M.A., Sharaf, O.M. and Effat, B.A., 2010. In vitro assessment of gastrointestinal viability of potentially probiotic Lactobacilli. *ournal of American Science*, 6(11), 430-435.

Gbassi, G.K., Vandamme, T., Ennahar, S. and Marchioni, E., 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp. in an alginate matrix coated with whey proteins. *International ournal of Food Microbiology*, 129(1), 103-105. DOI: 10.1016/.ifoodmicro.2008.11.012.

Gildas, K.G., Randamme, T., Ennahar, S., Marchioni, E., 2009, Microencapsulation of *lactobacillus plantarum* spp. in an alginate matrix coated with wehy proteins. *International ournal of Food Microbilogy*, 129: 103-105. 74. DOI: 10.1016/.ifoodmicro.2008.11.012.

Hansen, L.T., Allan-Wotas, P.M., in, Y.L. and Paulson, A.T., 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food microbiology*, 19(1), 35-45. DOI: 10.1006/fmic.2001.0452.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

bacteria. *International Dairy ournal*, 14(8), 737-743. DOI: 10.1016/.idairy.2004.01.004.

Kumar, A. Singh, H. and Singh, A., 2007. Recent Advances in Microencapsulation of Probiotics for Industrial Applications and Targeted Delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 240-251. DOI: 10.1016/.tifs.2007.01.004.

Lourens, A. and Viloen, B.C., 2001. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International*, 34(9), 791-796. DOI: 10.1016/S0963-9969(01)00085-0.

Lu, E.S; Zhen, H.L., Dan, T.L., Min, X., Huai, Y.C., Zhi, L.Z. and Zhen, X., 2013. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. ournal of Food Engineering, 117:99-104. DOI: 10.1016/.foodeng.2013.02.012.

Ma, Y., Pacan, .C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A. and Sabour, P.M., 2008. Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. Applied and environmental microbiology, 74(15), 4799-4805. DOI: 10.1128/AEM.00246-08.

Ma, Y., Pacan, .C., Wang, Q., Sabour, P.M., Huang, X. and Xu, Y., 2012. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing Staphylococcus aureus intestinal carriage. Food hydrocolloids, 26(2), 434-440. DOI: 10.1016/.foodhyd.2010.11.017.

Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S.S., Webb, C., Fukuda, H. and Kondo, A., 2006. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. Biochemical engineering ournal, 28(1), 73-78. DOI: 10.1016/.be.2005.09.004.

Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M.R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Tollabi, M. and Rohanizade, S., 2016. Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and L. *delbrueckii* ssp. *bulguricus* on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. Aquaculture international, 24(1), 225-242. DOI: 10.1007/s10499-015-9921-8.

Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Naafi, M.H. and Shahidi, F., 2009. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal uice. Food Research International, 42(8), 1040-1045. DOI: 10.1016/.foodres.2009.04.023.

Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, M.R. and Sohrabvandi, S., 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms.Iranian ournal of Biotechnology, *5*(1), 1-18.

Peinado, I., Lesmes, U., Andrés, A. and McClements, D., 2010. Fabrication and morphological characterization of biopolymer particles formed by electrostatic complexation of heat treated lactoferrin and anionic polysaccharides. Langmuir, 26(12), 9827-9834. DOI:10.1021/la1001013.

Rengpipat, S., Tunyanun, A., Fast, A.W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., 2003. Enhanced growth and resistance to Vibrio challenge in pond-reared black tiger shrimp Penaeus monodon fed a Bacillus probiotic. Diseases of aquatic organisms, 55(2), 169-173. DOI: 10.3354/dao055169.

Shah, N.P. and Ravula, R.R., 2000. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy dessert. Austral. . Dairy. Technol. **55**:139–114.

Shah, N.P., 2007. Functional cultures and health benefits. Int. Dairy . 17, 1262–1277. DOI: 10.1016/.idairy.2007.01.014.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K., 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International ournal of Food Microbiology*, 62, 47-55. DOI:10.1016/S0168-1605(00)00380-9.

Talwalker, A.N., Kailasapathy, K., 2004. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. . *Dairy Tech*., 58: 36-39.

Zou, Q., Liu, X., Zhao, ., Tian, F., Zhang, H.P., Zhang, H. and Chen, W., 2012. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in Whey Protein-Based Microcapsules by Transglutaminase Induced Gelation. *ournal of Food Science*, 77(5), M270-M2. DOI: 10.1111/.1750-3841.2012.02673.x

.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.2.3.9]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018. 116798]

The effect of microencapsulation with alginate/chitosan on survival of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum)* in the simulated condition of stomach and intestines in *Huso huso*

Hosseini S.S.[1]; Mohammadian T.[*1]; Abbaspour M.R.[2]; Alishahi M.[1]

[*]takavar_m2002@yahoo.com

1- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Targeted Drug Delivery Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Abstract

The positive effect of microencapsulation on tolerance simulated gastrointestinal conditions has been demonstrated by probiotics. The most important factors in reducing the viability of probiotics during passing through the digestive system are low pH in stomach and proteases and bile salts. To improve the survival rate of *Lactobacillus plantarum* in unfavorable condition of stomach and intestines, bacteria encapsulated with alginate/chitosan microencapsulation-emulsion. The aims of this study were to evaluate the effectiveness of microencapsulation with alginate/chitosan to carry bacteria and the survival rate of bacteria in the simulated condition of gastrointestinal tract. The microcapsules SEM technique used to study the appearance and the Particle Size Analyzers microcapsules method used to determine the size and distribution of particles. The survival rate of microencapsulated bacteria and released one in simulated gastrointestinal condition were assayed. For this purpose, they were incubated with intervals of 0, 60, 120 minutes for 48 hours at 37° C. The results indicated that d_{peak} was calculated 10.4 µm by emulsification and the average particle diameter was 2.39 µm. Zeta potential value in this study was +36.2 mv. Number of microencapsulated bacteria was $2.02\pm 0.06\times10^{9}$ CFU/g and viability of bacteria after 120 minutes in simulated condition, digestive vices in free bacteria was $1.59\pm 0.09\times10^{9}$ CFU/g and in microencapsulated bacteria was $2.03\pm 0.06\times10^{9}$ CFU/g. The results from this study indicated that among microencapsulated and free bacteria, live-stay and enduring the conditions simulated digestive vices in encapsulated bacteria were much higher.

Keywords: Microencapsulation, *Lactobacillus plantarum*, Simulated gastrointestinal condition, Alginate/chitosan

[*]Corresponding author